

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991651 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(51) Int. Cl. *A61K 38/47* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.01.04

(54) МИКРОБНЫЙ ЛИЗОЦИМ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ СИНДРОМА
РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА ИЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ
КИШЕЧНИКА

(31) 17150258.6; 17155110.4; 17209209.0

(32) 2017.01.04; 2017.02.08; 2017.12.21

(33) EP

(86) PCT/EP2018/050189

(87) WO 2018/127532 2018.07.12

(71) Заявитель:
НОВОЗИМС А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Кьерульф Серен, Кон Марианне
Торуп, Кристенсен Нанна Нью (DK)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к микроб-
ному лизоциму, композициям, содержащим его, и
путям их применения.

A1

201991651

201991651

A1

**МИКРОБНЫЙ ЛИЗОЦИМ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ СИНДРОМА
РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА ИЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ
КИШЕЧНИКА**

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей в машиночитаемой форме. Машиночитаемая форма включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к микробному лизоциму и композициям, содержащим его, для стабилизации здоровой микробиоты и подавления роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника в желудочно-кишечном тракте (GI), а также для предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) или воспалительного заболевания кишечника (IBD).

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Кишечная флора человека включает большое количество бактерий, которые играют важную роль в здоровье кишечника у человека. Дистальная подвздошная кишка содержит от 10^7 до 10^8 преимущественно анаэробных бактерий/грамм содержимого просвета, тогда как в толстой кишке содержится от 10^{11} до 10^{12} бактериальных колоний/грамм с преобладанием видов *Bacteroides*, *Clostridium* и *Bifidobacterium*. Хроническое кишечное воспаление является следствием чрезмерно агрессивного клеточного иммунного ответа на симбиотические (нормальные эндогенные) кишечные бактерии у генетически восприимчивого хозяина.

Воспалительное заболевание кишечника (IBD) является изнурительным заболеванием, характеризующимся хроническим кишечным воспалением, которое часто проявляется прерывистым течением с острыми приступами, за которыми следуют периоды ремиссии. Клинические симптомы во время острых приступов включают диарею, кровотечение, боль в животе, лихорадку, боль в суставах и потерю массы тела. IBD может проявляться в различных формах, наиболее распространенными из которых являются болезнь Крона (хроническое трансмуральное воспаление кишечника, которое может поражать весь желудочно-кишечный тракт) и язвенный колит (хроническое воспалительное заболевание кишечника, поражающее толстую кишку). Язвенный колит и болезнь Крона возникают в

областях желудочно-кишечного тракта с наибольшей концентрацией внутрипросветных бактерий.

Лизоцим представляет собой О-гликозилгидролазу, продуцируемую в качестве защитного механизма против бактерий многими организмами. Фермент вызывает гидролиз клеточных стенок бактерий путем расщепления гликозидных связей пептидогликана. После того, как их клеточные стенки были ослаблены действием лизоцима, бактериальные клетки лизируются в результате несбалансированного осмотического давления. Кроме того, лизоцим может разлагать внеклеточный пептидогликан на растворимые фрагменты, которые, по-видимому, ограничивают воспаление.

Лизоцим был отнесен к пяти различным семействам гликозидгидролаз (GH) (CAZy, www.cazy.org): лизоцим белка куриного яйца (GH22), лизоцим белка гусиного яйца (GH23), лизоцим бактериофага T4 (GH24), белок жгутика *Sphingomonas* (GH73) и лизоцимы *Chalaropsis* (GH25). Лизоцимы из семейств GH23 и GH24 известны преимущественно у бактериофагов и только недавно были идентифицированы у грибов. Оказалось, что лизоцим семейства GH25 не является структурно родственным другим семействам лизоцима.

Лизоцим традиционно извлекают из белка куриного яйца по причине его естественного высокого содержания. Лизоцим, извлекаемый из белка куриного яйца, представляет собой основной продукт, доступный на коммерческом рынке, но он не расщепляет N,6-О-диацетилмурамовую кислоту, например, в клеточных стенках *Staphylococcus aureus*, и, следовательно, не способен лизировать этот важный патоген человека среди прочих (Masschalck B, Deckers D, Michiels CW (2002), "Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure", J Food Prot. 65(12):1916-23).

В каждом из WO2000/21381, GB2379166 и WO2004/026334 раскрыта композиция, содержащая лизоцим GH22 из белка куриного яйца. Зрелая аминокислотная последовательность лизоцима GH25 дикого типа из *Acremonium alcalophilum* раскрыта в WO 2013/076253.

Существует потребность в композиции, которая после введения обеспечивает изменение микробиоты с преимуществом для людей, характеризующихся нежелательной микробиотой, таких как пациенты, страдающие, например, от IBD и/или IBS. Настоящее изобретение

предусматривает способ получения таких изменений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к микробным лизоцимам и композициям, содержащим их, для различных путей применения.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены микробные лизоцимы и композиции, содержащие их, для применения в способе предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) или воспалительного заболевания кишечника (IBD).

В одном аспекте микробный лизоцим или композиция, содержащая его, обеспечивает стабилизацию здоровой микробиоты в желудочно-кишечном (GI) тракте и подавление роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника. В дополнительном аспекте микробный лизоцим или композиция, содержащая его, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления, и в еще одном дополнительном аспекте микробный лизоцим или композиция, содержащая его, обеспечивает уменьшение эктопического отложения липидов, связанного с ожирением, таким как, например, алиментарное ожирение.

Также в данном документе описан способ предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) или воспалительного заболевания кишечника (IBD).

Кроме того, описан способ улучшения здоровья кишечника у человека, где способ предусматривает уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* в пищеварительном тракте, включающий предоставление указанному человеку выделенного полипептида, обладающего лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

ОБЗОР ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 представляет собой зрелую аминокислотную последовательность лизоцима GH25 дикого типа из *Acremonium alcalophilum*, описанную в WO 2013/076253.

SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность гена лизоцима GH24, выделенного из *Trichophaea saccata*.

SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную последовательность, которая происходит из SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 4 представляет собой зрелую аминокислотную последовательность лизоцима GH24 дикого типа из *Trichophaea saccata*.

SEQ ID NO: 5 представляет собой зрелую аминокислотную

последовательность лизоцима GH22 дикого типа из *Gallus gallus* (лизоцим белка куриного яйца).

SEQ ID NO: 6 представляет собой праймер F-80470.

SEQ ID NO: 7 представляет собой праймер R-80470.

SEQ ID NO: 8 представляет собой праймер 8643.

SEQ ID NO: 9 представляет собой праймер 8654.

SEQ ID NO: 10 представляет собой прямой праймер 27F.

SEQ ID NO: 11 представляет собой обратный праймер 534R.

SEQ ID NO: 12 представляет собой последовательность, представляющую ген 16S rRNA, классифицированный как *Faecalibacterium prausnitzii*, описанный в Duncan S.H. et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (PT 6), 2141-2146 (2002) и поданный Hold G.L. 19 сентября 2001 г. в Gut Microbiology and Immunology.

SEQ ID NO: 13 представляет собой последовательность геномной ДНК лизоцима GH25, выделенного из *Myceliophthora fergusii*.

SEQ ID NO: 14 представляет собой аминокислотную последовательность, которая происходит из SEQ ID NO: 13.

SEQ ID NO: 15 представляет собой аминокислотную последовательность зрелого лизоцима GH25 из *Myceliophthora fergusii*.

SEQ ID NO: 16 представляет собой последовательность cDNA лизоцима GH25, выделенного из *Lecanicillium sp.* WMM742.

SEQ ID NO: 17 представляет собой аминокислотную последовательность, которая происходит из SEQ ID NO: 16.

SEQ ID NO: 18 представляет собой аминокислотную последовательность зрелого лизоцима GH25 из *Lecanicillium sp.* WMM742.

SEQ ID NO: 19 представляет собой последовательность cDNA лизоцима GH25, выделенного из *Zygomycetes sp.* XZ2655.

SEQ ID NO: 20 представляет собой аминокислотную последовательность, которая происходит из SEQ ID NO: 19.

SEQ ID NO: 21 представляет собой аминокислотную последовательность зрелого лизоцима GH25 из *Zygomycetes sp.* XZ2655.

SEQ ID NO: 22 представляет собой последовательность cDNA лизоцима GH25, выделенную из *Malbranchea flava*.

SEQ ID NO: 23 представляет собой аминокислотную последовательность, которая происходит из SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 24 представляет собой аминокислотную последовательность зрелого лизоцима GH25 из *Malbranchea flava*.

SEQ ID NO: 25 представляет собой кодон-оптимизированную ДНК лизоцима GH25, выделенного из *Hypholoma polytrichi*.

SEQ ID NO: 26 представляет собой аминокислотную последовательность, которая происходит из SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 27 представляет собой аминокислотную последовательность зрелого лизоцима GH25 из *Hypholoma polytrichi*.

SEQ ID NO: 28 представляет собой последовательность cDNA лизоцима GH25, выделенного из *Engyodontium album*.

SEQ ID NO: 29 представляет собой аминокислотную последовательность, которая происходит из SEQ ID NO: 28.

SEQ ID NO: 30 представляет собой аминокислотную последовательность зрелого лизоцима GH25 из *Engyodontium album*.

ФИГУРЫ

На фигуре 1 для примера 6 показаны исходные баллы повреждения толстой кишки (A), длина толстой кишки (B) и сырая масса толстой кишки (C) у мышей, которым вводили высокую, среднюю или низкую дозу SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 5 с последующей обработкой декстрансульфатом натрия (DSS, 3%), по сравнению с контролем с носителем, обработкой с помощью SEQ ID NO: 1 без DSS и контролем заболевания (обработка DSS без обработки лизоцимом). Каждый столбец представляет среднее значение для n=10-12.

На фигуре 2 для примера 6 показано сравнение изменения массы тела после обработки высокой дозой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 5 по сравнению с контролями. Линейный график, представляющий изменения средней массы тела в каждой группе относительно массы в день -3 (когда началась профилактическая обработка. Введение DSS начинали в 0-й день. Каждая строка соответствует каждому из указанных видов обработки в ходе эксперимента (n=10-12).

На фигуре 3 для примера 6 показано сравнение изменения массы тела после обработки высокой, средней и низкой дозой SEQ ID NO: 1 (A), SEQ ID NO: 15 (B) или SEQ ID NO: 5 (C) по сравнению с контролем. Линейный график, представляющий изменения средней массы тела в каждой группе относительно массы на 3-й день. Каждая строка соответствует каждому из указанных видов обработки в ходе эксперимента (n=10-12).

На фигуре 4 для примера 6 показан эффект SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 5 в отношении уровней цитокинов в ткани толстой кишки на 5-й день после начала введения DSS. Концентрации TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-12 (E), IL-17a (F) и IL-25 (G) на мг ткани толстой кишки показаны в ответ на каждое тестируемое соединение, вводимое в высокой, средней или низкой концентрации, по сравнению с контролями. Каждый столбец представляет среднее значение для n=10-12 мышей.

На фигуре 5 для примера 6 показан эффект SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 5 в отношении уровней цитокинов в ткани толстой кишки на 5-й день после начала введения DSS. Концентрации TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-12 (E), IL-17a (F) и IL-25 (G) на мг ткани толстой кишки показаны в ответ на каждое тестируемое соединение, вводимое в моль/день. Каждая точка представляет среднее значение для n=10-12.

На фигуре 6 показано изменение массы тела мышей из примера 7 за одну неделю до начала кормления рационом и на протяжении всего исследования (A), масса жира проанализирована в указанные моменты времени (B) и масса ткани в конце (C). Каждый столбец/точка представляет среднее значение для n=10-12.

На фигуре 7 показано для обработанных, как описано в примере 7, мышей следующее: глюкоза крови после 5 ч. голодания (A) инсулин после 5 ч. голодания (B), уровни глюкозы крови в указанные моменты времени после перорального введения 2 граммов глюкозы на кг массы нежировых тканей (C), уровни эндогенного инсулина в плазме крови в ответ на введение глюкозы (D) и проницаемость кишечника (E). Все измерения выполняли после 10 недель кормления рационом с высоким содержанием жиров (HFD) и ежедневных обработок через желудочный зонд. Каждый столбец/точка представляет среднее значение для n=10-12.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Алиментарное ожирение. Вызванное рационом ожирение (DIO) – это ожирение, вызванное приемом пищи (люди) или кормлением (животная модель) с применением рационов с высоким содержанием жиров и/или с высокой концентрацией.

Эктопическое отложение липидов. Термин "отложение липидов" используется для обозначения отложения жира в организме. Эктопический жир – это накопление триглицеридов в клетках отличной от жировой ткани, которые обычно содержат только небольшое количество жира, таких как печень, скелетные мышцы,

сердце и поджелудочная железа. Таким образом, термин "эктопическое отложение липидов" означает жир, запасенный в таких тканях, как печень, скелетные мышцы, сердце и поджелудочная железа.

Faecalibacterium. Известно (Větrovský T, Baldrian P (2013) The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. PLoS ONE 8(2): e57923. doi: 10.1371/journal.pone.0057923), что идентичность последовательности гена 16S rRNA варьируется в пределах рода. Было показано, что средняя идентичность составляет 95,56 со стандартным отклонением 3,68. Было также установлено, что 12,2% родов содержат виды со средним попарным сходством гена 16S rRNA ниже 90%.

SEQ ID NO: 12 содержит последовательности гена 16S rRNA, отнесенного к роду *Faecalibacterium prausnitzii*, как описано в Duncan S.H. et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (PT 6), 2141-2146 (2002) и поданный Hold G.L. 19 сентября 2001 г. в Gut Microbiology and Immunology. Таким образом, штаммы в настоящем документе определяются как *Faecalibacterium*, где идентичность последовательности области V1-V3 гена 16S rRNA указанного штамма характеризуется по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 12.

Пищевая композиция. "Пищевая композиция" представляет собой любую композицию, которую можно вводить человеку в виде пищи. Как используется в данном документе, пищевая композиция является тем же, что и "диетическая композиция".

Фрагмент. Термин "фрагмент" означает полипептид или каталитический домен, у которого отсутствуют одна или несколько (например, некоторое количество) аминокислот с амино- и/или карбоксильного конца зрелого полипептида или домена; причем фрагмент обладает лизоцимной активностью. В одном аспекте фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот из SEQ ID NO: 1 и обладает лизоцимной активностью.

В другом аспекте фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислот, например, по меньшей мере 215 аминокислот, по меньшей мере 220 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислот, по меньшей мере 230 аминокислот, по меньшей мере 235 аминокислот или по меньшей мере 240 аминокислот из SEQ ID NO: 4 и обладает лизоцимной активностью.

В другом аспекте фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот из SEQ ID NO: 15 и обладает лизоцимной активностью.

Нарушение регуляции глюкозы. Термин "нарушение регуляции глюкозы" представляет собой нарушение метаболизма и регуляции уровня глюкозы в крови. Примеры состояний, в первую очередь вызванных нарушением регуляции глюкозы, включают гипогликемию, гипергликемию, инсулинорезистентность, гиперинсулинемию, синдром X, метаболический синдром и диабет.

Увеличивает долю бактерий x в микробиоте GI-тракта. Термин "увеличивает долю бактерий x в микробиоте GI-тракта" означает, что количество бактерий определенного таксономического ранга (например, отряда или рода) увеличилось по сравнению с контрольным образцом. Образцы микробиоты можно взять из кишечника (т. е. желудочно-кишечного тракта) и проанализировать путем изучения последовательностей (считываемых фрагментов) генов 16S rRNA в образце. Считываемые фрагменты генов 16S rRNA можно сгруппировать вместе на основе идентичности последовательностей, и каждую группу можно сравнить с базой данных известных последовательностей гена 16S rRNA для идентификации типа бактерий в этой группе. Группы можно объединять на разных таксономических уровнях (тип, класс, отряд, семейство, род или вид), чтобы дать количественный анализ количества бактерий в пределах каждого таксономического уровня по всему образцу.

Путем сравнения групп от контрольного человека с человеком, которому вводят лизоцим по настоящему изобретению, можно определить различия в микробиоте. Примеры такого определения включают различия, например, в доле бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоте, взятой у животных или людей,

которым вводили лизоцим, по сравнению с контролем, которому не вводили лизоцим, или в доле бактерий отряда *Clostridiales* в микробиоте, взятой у животных или людей, которым вводили лизоцим, по сравнению с контролем.

Выделенный. Термин "выделенный" означает вещество в форме или среде, которые не встречаются в природе. Неограничивающие примеры выделенных веществ предусматривают (1) любое не встречающееся в природе вещество, (2) любое вещество, в том числе без ограничения любой фермент, вариант, нуклеиновую кислоту, белок, пептид или кофактор, которые по меньшей мере частично отделены от одного или нескольких или всех встречающихся в природе составляющих, с которыми они связаны в природе; (3) любое вещество, модифицированное человеком, по сравнению с таким веществом, встречающимся в природе или (4) любое вещество, модифицированное путем увеличения количества вещества по сравнению с другими компонентами, с которыми оно связано в природе (например, несколько копий гена, кодирующего вещество; применение более сильного промотора, чем промотор, связанный в природе с геном, кодирующим вещество). Выделенное вещество может присутствовать в образце в виде ферментационного бульона.

Лизоцимная активность. Термин "лизоцимная активность" означает ферментативный гидролиз 1,4-бета-связей между остатками *N*-ацетилмурамовой кислоты и *N*-ацетил-D-глюкозамина в пептидогликане или между остатками *N*-ацетил-D-глюкозамина в хитодекстринах, что приводит к бактериолизу из-за осмотического давления. Лизоцим принадлежит к классу ферментов EC 3.2.1.17. Лизоцимную активность обычно измеряют при турбидиметрическом определении. Способ основан на изменениях помутнения суспензии *Micrococcus luteus* ATCC 4698, вызванных литическим действием лизоцима. В соответствующих условиях эксперимента эти изменения пропорциональны количеству лизоцима в среде (сравните INS 1105 из Объединенного справочника характеристик пищевых добавок организации ООН по продовольствию и сельскому хозяйству (www.fao.org)). Для целей настоящего изобретения лизоцимную активность определяют в соответствии с анализом помутнения, описанным в примере 5 ("Определение лизоцимной активности"). В одном аспекте полипептиды по настоящему изобретению характеризуются по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере

70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% лизоцимной активностью SEQ ID NO: 1. В одном аспекте полипептиды по настоящему изобретению характеризуются по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% лизоцимной активностью SEQ ID NO: 4. В одном аспекте полипептиды по настоящему изобретению характеризуются по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% лизоцимной активностью SEQ ID NO: 15.

Зрелый полипептид. Термин "зрелый полипептид" означает полипептид в его окончательной форме после трансляции и любых посттрансляционных модификаций, таких как процессинг N-концевой части, усечение C-концевой части, гликозилирование, фосфорилирование и т. д.

Медицинское устройство. Под медицинским устройством в данном документе понимается продукт, который соответствует определению для медицинского устройства в разделе 201(h) Федерального Закона США о пищевых продуктах, лекарственных средствах и парфюмерно-косметических товарах (FD&C), включая инструмент, аппарат, прибор, машину, оборудование, имплантат, реагент *in vitro* или другой аналогичный или родственный предмет, включая его составную часть или аксессуар, который признан в официальном Национальном формуляре или в Фармакопее США, или в любом дополнении к ним, предназначенный для применения при уходе, смягчении, лечении или предупреждение заболевания у человека или других животных, или предназначенный для воздействия на структуру или любую функцию организма человека или других животных, и который не достигает своих основных целей посредством химического воздействия на организм человека или других животных, или внутри него, и который не зависит от того, подвергается ли он метаболизму, для достижения какой-либо из его основных целей.

Микробный лизоцим. Термин "микробный лизоцим" означает полипептид, обладающий лизоцимной активностью, который является полученным или получаемым из микробного источника. Примерами микробных источников являются грибы; т. е. лизоцим является

полученным или получаемым из представителей царства *Fungi*, где термин царство является таксономическим рангом. В частности, микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителей отдела *Ascomycota*, таких как представители подотдела *Pezizomycotina*, где термины отдел и подотдел являются таксономическими рангами.

Если таксономический ранг полипептида неизвестен, его может легко определить специалист в данной области, выполнив поиск полипептида в BLASTP (используя, например, веб-сайт Национального центра биотехнологической информации (NCIB) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и сравнивая его с ближайшими гомологами. Считается, что неизвестный полипептид, который является фрагментом известного полипептида, относится к тому же таксономическому виду. Считается, что неизвестный природный полипептид или искусственный вариант, который содержит замену, делецию и/или вставку по вплоть до 10 положением, относится к тому же таксономическому виду, что и известный полипептид.

Полученный или получаемый из. Термин "полученный или получаемый из" означает, что полипептид может быть обнаружен в организме конкретного таксономического ранга. В одном варианте осуществления полипептид является полученным или получаемым из представителей царства *Fungi*, где термин царство является таксономическим рангом. В предпочтительном варианте осуществления полипептид является полученным или получаемым из представителей отдела *Ascomycota*, где термин отдел является таксономическим рангом. В другом предпочтительном варианте осуществления полипептид является полученным или получаемым из представителей подотдела *Pezizomycotina*, где термин подотдел является таксономическим рангом. В другом предпочтительном варианте осуществления полипептид является полученным или получаемым из представителей класса *Eurotiomycetes*, где термин класс является таксономическим рангом.

Если таксономический ранг полипептида неизвестен, его может легко определить специалист в данной области, выполнив поиск полипептида в BLASTP (используя, например, веб-сайт Национального центра биотехнологической информации (NCIB) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и сравнивая его с ближайшими гомологами. Считается, что неизвестный полипептид, который является фрагментом известного полипептида, относится к тому же таксономическому виду. Считается, что неизвестный природный

полипептид или искусственный вариант, который содержит замену, делецию и/или вставку по вплоть до 10 положением, относится к тому же таксономическому виду, что и известный полипептид.

Операционная таксономическая единица (OTU). Термин "операционная таксономическая единица" означает группу последовательностей с определенной степенью сходства. В этом случае 97 процентов выбирают в качестве порога для отнесения последовательностей гена 16S rRNA к различным OTU, что означает, что все последовательности в пределах одной OTU имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательностей. На этом уровне идентичности каждая OTU часто считается (или предполагается) представителем отдельного вида бактерий.

Послеоперационное обострение. Означает интенсификацию заболевания или состояния после хирургического вмешательства. Таким образом, под выражением "предотвращать, уменьшать выраженность или лечить послеоперационные обострения IBS и/или IBD" подразумевается, что риск того, что IBS и/или IBD появится после операции, предупреждается, уменьшается или лечится.

Предупреждение. Означает остановку или торможение заболевания, нарушения или симптома заболевания или состояния посредством какого-либо действия.

Ремиссия (состояния). Означает период в ходе заболевания, когда симптомы становятся менее тяжелыми. Таким образом, под выражением "поддерживать ремиссию IBS и/или IBD" подразумевается, что риск повторного появления IBS и/или IBD предупреждается или уменьшается.

Идентичность последовательностей. Родство между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями описывается параметром "идентичность последовательностей".

В целях настоящего изобретения идентичность последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453), который реализован в программе Needle из пакета программ EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), предпочтительно версии 5.0.0 или более поздней. Применяемыми параметрами являются: штраф за открытие гэпа, составляющий 10, штраф за продление гэпа, составляющий 0,5, и матрица замен

EBLOSUM62 (версия BLOSUM62 для EMBOSS). Выходные данные в Needle, помеченные как "самая длинная идентичность" (полученные с применением опции nobrief), применяют в качестве процента идентичности и рассчитывают следующим образом:

(идентичные остатки $\times 100$) / (длина выравниваемого участка – общее число гэпов в выравниваемом участке).

По существу чистый полипептид. Термин "по существу чистый полипептид" означает препарат, который содержит не более 10%, не более 8%, не более 6%, не более 5%, не более 4%, не более 3%, не более 2%, не более 1% и не более 0,5% по весу другого полипептидного материала, с которым он связан в природе или при получении с помощью методик рекомбинантных ДНК. Предпочтительно полипептид является на по меньшей мере 92% чистым, например, на по меньшей мере 94% чистым, на по меньшей мере 95% чистым, на по меньшей мере 96% чистым, на по меньшей мере 97% чистым, на по меньшей мере 98% чистым, на по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% чистым и на 100% чистым по весу всего материала полипептида, присутствующего в препарате. Полипептиды согласно настоящему изобретению предпочтительно присутствуют в по существу чистой форме. Этого можно достичь, например, путем получения полипептида с помощью хорошо известных рекомбинантных способов или с помощью классических способов очистки.

Терапевтическая композиция. "Терапевтическая композиция" представляет собой любую непищевую композицию, содержащую фармацевтически активный ингредиент для введения человеку, которую применяют для предупреждения, уменьшения выраженности или лечения заболевания. Примеры терапевтических композиций включают без ограничения порошок, таблетку, такую как таблетка для рассасывания или шипучая таблетка, капсулу, компонент эмульсии или пасты, индивидуальный саше, жевательную резинку или более общие композиции, такие как масляные капли, или в любом другом подходящем носителе, определенном специалистами в данной области как эффективный носитель для микроорганизмов.

Вариант. Термин "вариант" означает полипептид, обладающий лизоцимной активностью, содержащий изменение, т. е. замену, вставку и/или делецию одного или нескольких (некоторого количества) аминокислотных остатков в одном или нескольких (например, некоторых) положениях. Замена означает смену аминокислоты, занимающей некое положение, на отличную аминокислоту; делеция означает удаление аминокислоты, занимающей

некое положение; и вставка означает присоединение 1, 2 или 3 аминокислот рядом и непосредственно после аминокислоты, занимающей данное положение.

В одном аспекте вариант лизоцима по настоящему изобретению может содержать от 1 до 5; от 1 до 10; от 1 до 15; от 1 до 20; от 1 до 25; от 1 до 30; от 1 до 35; от 1 до 40; от 1 до 45 или от 1 до 50, т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 изменений, и обладает по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% лизоцимной активностью исходного лизоцима, такого как SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 15.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Было обнаружено, что композиция, такая как пищевая или фармацевтическая композиция, или медицинское устройство, содержащие микробный лизоцим, при предоставлении человеку приводят к изменению микробиоты, что может быть преимущественным в отношении улучшения здоровья людей.

В одном варианте осуществления в настоящем документе описан способ предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) и/или воспалительного заболевания кишечника (IBD). В одном варианте осуществления способ включает предоставление и введение композиции, такой как, например, пищевая или фармацевтическая композиция или медицинское устройство, содержащей один или несколько микробных лизоцимов. В одном варианте осуществления микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя царства *Fungi*.

Таким образом, авторы настоящего изобретения обнаружили, что микробный лизоцим подходит для введения пациентам, страдающим синдромом раздраженного кишечника (IBS) и/или воспалительным заболеванием кишечника (IBD).

В одном варианте осуществления способ предназначен для предупреждения, уменьшения выраженности или лечения пациентов, страдающих синдромом раздраженного кишечника (IBS) и/или воспалительным заболеванием кишечника (IBD), в течение периода ремиссии, где период ремиссии представляет собой период, в

котором тяжесть симптомов IBS и/или IBD временно уменьшена. В одном варианте осуществления он предназначен для предупреждения, уменьшения выраженности или лечения пациентов, страдающих болезнью Крона или язвенным колитом, в течение периода ремиссии, где период ремиссии представляет собой период, в котором тяжесть симптомов IBS и/или IBD временно уменьшена.

Микробный лизоцим, описанный в данном документе, также можно вводить для получения прибавления массы тела, например, у таких людей, как пожилые люди, которые госпитализированы. В одном варианте осуществления способ включает введение одного или нескольких микробных лизоцимов пациентам после операции. В одном варианте осуществления способ предназначен для контроля массы тела, такого как, например, для удержания массы тела на желаемом уровне. В одном варианте осуществления способ предназначен для контроля массы тела госпитализированных пациентов с риском потери массы тела после хирургического вмешательства или во время госпитализации в целом.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей микробный лизоцим, для получения прибавления массы тела у человека, где пища или пищевая добавка содержит один или несколько микробных лизоцимов.

В одном варианте осуществления масса тела увеличивается на по меньшей мере 1% , например, на по меньшей мере 1,5%, на по меньшей мере 2,0%, на по меньшей мере 2,5%, на по меньшей мере 3%, на по меньшей мере 3,5%, на по меньшей мере 4% или на по меньшей мере 5% по сравнению с контролем, не получающим композицию, содержащую микробный лизоцим. В другом варианте осуществления масса тела увеличивается на величину, составляющую от 1% до 15%, например, от 1% до 12%, от 1% до 10%, от 1,5% до 8%, от 2,0% до 7%, по сравнению с контролем или любую комбинацию этих интервалов.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению полипептидов, которые обладают лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii*. *Lactobacillus johnsonii* является важной бактерией кишечной флоры у людей. Не связываясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что удаление погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* из кишечной флоры с помощью ферментативного лизиса частично разрушенной бактериальной клеточной стенки вносит важный вклад в здоровье кишечника человека.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептиды по настоящему изобретению обладают улучшенной лизоцимной активностью по сравнению с лизоцимной активностью лизоцима белка куриного яйца (SEQ ID NO: 5), которая определена согласно способу для определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

Один из аспектов настоящего изобретения направлен на способ улучшения здоровья кишечника у человека, предусматривающий уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки в пищеварительном тракте, включающий предоставление человеку полипептида, определенного по настоящему изобретению.

Один из аспектов настоящего изобретения направлен на способ улучшения здоровья кишечника у человека, предусматривающий уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки в пищеварительном тракте, включающий предоставление полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1.

Один из аспектов настоящего изобретения направлен на способ обеспечения устранения погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки из пищеварительного тракта, включающий предоставление человеку полипептида или источника полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 15, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 24, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90%

идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, или полипептида или источника полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1.

В последние годы все большее число исследований четко описывают важность *Faecalibacterium* как компонента микробиоты здорового человека. Например, *F. prausnitzii* характеризуется низкой распространенностью при многих кишечных расстройствах, особенно у пациентов с IBD (Current Opinion in Microbiology 16(3), pp. 1-7, July 2013).

В одном варианте осуществления композиции, способы и пути применения по настоящему изобретению являются высокоэффективными при лечении или предупреждении состояний, связанных с низким содержанием *Faecalibacterium* в GI-тракте. В дополнительном варианте осуществления композиции, способы и пути применения по настоящему изобретению обеспечивают увеличение *Faecalibacterium* в GI-тракте.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к одному или нескольким полипептидам, обладающим лизоцимной активностью, или композиции, предусматривающей такую как, например, пищевая или фармацевтическая композиция, или медицинскому устройству, содержащим один или несколько полипептидов, обладающих лизоцимной активностью, где полипептид относится к семейству гликозилгидролаз 24 (GH24) или семейству гликозилгидролаз 25 (GH25) и является полученным или получаемым из представителя царства *Fungi*.

В одном аспекте полипептид, обладающий лизоцимной активностью, применяемый в способе по настоящему изобретению, представляет собой микробный лизоцим. В одном варианте осуществления композиция, применяемая в настоящем изобретении, такая как, например, пищевая или фармацевтическая композиция, или медицинское устройство, содержащие один или несколько микробных лизоцимов, например, может применяться для стабилизации здоровой микробиоты людей путем подавления роста/кишечной колонизации бактериальных патогенов, таких как

Clostridium perfringens, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Campylobacter coli* и *Campylobacter jejuni*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp. и *Salmonella* spp., таких как *Salmonella enterica* и *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus* spp. и *Helicobacter pylori*. В дополнительном варианте осуществления лизоцим по настоящему изобретению оказывает положительное влияние на микробный баланс пищеварительного тракта.

В одном варианте осуществления композиция, применяемая в настоящем изобретении, обеспечивает увеличение доли бактерий из отряда *Clostridiales* в микробиоте GI-тракта. В одном варианте осуществления доля бактерий из отряда *Clostridiales* увеличивается на по меньшей мере 1%, например, на по меньшей мере 1,5%, на по меньшей мере 2%, на по меньшей мере 2,5%, на по меньшей мере 5% или на по меньшей мере 7,5%. В альтернативном варианте осуществления доля бактерий из отряда *Clostridiales* увеличивается на коэффициент, составляющий по меньшей мере 1,25, например, по меньшей мере 1,50, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5 или по меньшей мере 3,0.

В одном варианте осуществления микробный лизоцим характеризуется грибным происхождением. В одном варианте осуществления микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя царства *Fungi*. В одном варианте осуществления микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя отдела *Ascomycota*, такого как представитель подотдела *Pezizomycotina*. В одном варианте осуществления микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя класса *Eurotiomycetes*. В дополнительном варианте осуществления микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя отряда *Eurotiales*. В еще одном дополнительном варианте осуществления микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя семейства *Aspergillaceae*. В еще одном дополнительном варианте осуществления микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя рода *Aspergillus*.

В одном варианте осуществления микробный лизоцим содержит один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25. В одном варианте осуществления микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH24. В одном варианте осуществления микробный лизоцим содержит один или несколько

доменов из GH25.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу увеличения доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоте GI-тракта, где способ включает введение композиции, такой как пищевая или фармацевтическая композиция или медицинское устройство, содержащей микробный лизоцим. В одном варианте осуществления микробный лизоцим вводят на уровне от 8 до 250 ppm ферментного белка на кг композиции. В одном варианте осуществления доля бактерий из рода *Faecalibacterium* увеличивается на по меньшей мере 1%, например, на по меньшей мере 2%, на по меньшей мере 3%, на по меньшей мере 4%, на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 15% или на по меньшей мере 20%. В альтернативном варианте осуществления доля бактерий из рода *Faecalibacterium* увеличивается на коэффициент, составляющий по меньшей мере 1,25, например, по меньшей мере 1,50, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5 или по меньшей мере 3,0.

В одном варианте осуществления способ обеспечивает увеличение доли бактерий из рода *Faecalibacterium* в микробиоте GI-тракта, где бактерии из рода *Faecalibacterium* содержат 16S rRNA, которая характеризуется по меньшей мере 90% например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления доля бактерий из рода *Faecalibacterium* увеличивается на по меньшей мере 1%, например, на по меньшей мере 2%, на по меньшей мере 3%, на по меньшей мере 4% или на по меньшей мере 5%. В альтернативном варианте осуществления доля бактерий из рода *Faecalibacterium* увеличивается на коэффициент, составляющий по меньшей мере 1,25, например, по меньшей мере 1,50, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5 или по меньшей мере 3,0.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) и/или воспалительного заболевания кишечника (IBD), включающему введение композиции, такой как, например, пищевая или фармацевтическая композиция или медицинское устройство, содержащей один или несколько микробных лизоцимов, пациенту,

где:

(a) микробный лизоцим представляет собой микробный лизоцим, содержащий один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25; и

(b) необязательно микробный лизоцим вводят на ежедневной основе в течение по меньшей мере 5 дней.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) и/или воспалительного заболевания кишечника (IBD), включающему введение композиции, такой как, например, пищевая или фармацевтическая композиция или медицинское устройство, содержащей один или несколько микробных лизоцимов, пациенту, где:

(a) микробный лизоцим представляет собой микробный лизоцим, содержащий один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25; и

(b) микробный лизоцим вводят в период ремиссии;

(c) необязательно микробный лизоцим вводят на ежедневной основе в течение по меньшей мере 5 дней.

где период ремиссии представляет собой период, в котором тяжесть симптомов IBS и/или IBD временно уменьшена.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу увеличения доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоме GI-тракта, включающему введение композиции, такой как, например, пищевая или фармацевтическая композиция или медицинское устройство, содержащей один или несколько микробных лизоцимов, где:

(a) микробный лизоцим представляет собой лизоцим GH24, полученный или получаемый из представителя отдела *Ascomycota*, предпочтительно из представителя подотдела *Pezizomycotina*; и

(b) доля бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоте GI-тракта животного увеличивается на по меньшей мере 1%.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу увеличения доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоме GI-тракта, включающему введение композиции, такой как, например, пищевая или фармацевтическая композиция или медицинское устройство, содержащей один или несколько микробных лизоцимов, где:

(a) микробный лизоцим представляет собой лизоцим GH25,

полученный или получаемый из представителя отдела *Ascomycota*, предпочтительно из представителя подотдела *Pezizomycotina*;

(b) доля бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоте GI-тракта животного увеличивается на по меньшей мере 1%.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу увеличения доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоме GI-тракта, включающему введение композиции, такой как, например, пищевая или фармацевтическая композиция или медицинское устройство, содержащей один или несколько микробных лизоцимов, где:

(a) микробный лизоцим представляет собой лизоцим GH24, полученный или получаемый из представителя отдела *Ascomycota*, предпочтительно из представителя подотдела *Pezizomycotina*;

(b) доля бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоте GI-тракта животного увеличивается на по меньшей мере 1%; и

(c) бактерии рода *Faecalibacterium* содержат 16S rRNA, которая характеризуется по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 12.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу увеличения доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоме GI-тракта, включающему введение композиции, такой как, например, пищевая или фармацевтическая композиция или медицинское устройство, содержащей один или несколько микробных лизоцимов, где:

(a) микробный лизоцим представляет собой лизоцим GH25, полученный или получаемый из представителя отдела *Ascomycota*, предпочтительно из представителя подотдела *Pezizomycotina*;

(b) доля бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоте GI-тракта животного увеличивается на по меньшей мере 1%; и

(c) бактерии рода *Faecalibacterium* содержат 16S rRNA, которая характеризуется по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления микробный лизоцим, применяемый в настоящем изобретении, вводят в дозе на уровне от

0,1 до 1000 ppm ферментного белка на кг пищевого продукта, например, от 1 до 1000 ppm или от 0,1 до 500 ppm, от 1 до 500 ppm, от 10 до 500 ppm, от 10 до 300 ppm или от 10 до 200 ppm ферментного белка на кг пищевого продукта, или любой комбинации этих интервалов. В одном варианте осуществления микробный лизоцим вводят в дозе на уровне от 11 до 125 ppm ферментного белка на кг пищевого продукта, например, от 12 до 100 ppm, от 13 до 75 ppm, от 15 до 50 ppm, от 17,5 до 40 ppm, от 25 до 75 ppm или от 30 до 60 ppm ферментного белка на кг пищевого продукта, или любой комбинации этих интервалов.

В одном варианте осуществления микробный лизоцим характеризуется грибным происхождением. В одном варианте осуществления микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя отдела *Ascomycota*, такого как представитель подотдела *Pezizomycotina*.

В одном варианте осуществления микробный лизоцим характеризуется по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления микробный лизоцим содержит или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1 или ее аллельного варианта; или представляет собой ее фрагмент, обладающий лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот. В другом варианте осуществления микробный лизоцим содержит или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1 или ее аллельного варианта и N-концевой и/или C-концевой His-метки и/или HQ-метки. В другом аспекте полипептид содержит или состоит из аминокислот 1-208 из SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления микробный лизоцим представляет собой вариант SEQ ID NO: 1, где вариант обладает

лизозимной активностью и содержит одну или несколько замен, и/или одну или несколько делеций, и/или одну или несколько вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям. В другом варианте осуществления число положений, содержащих одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию в SEQ ID NO: 1, составляет от 1 до 45, например, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 или 1-5 положений. В одном варианте осуществления число положений, содержащих одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию в SEQ ID NO: 1, составляет не более 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В другом варианте осуществления число замен, делеций и/или вставок в SEQ ID NO: 1, составляет не более 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В дополнительном варианте осуществления число замен, предпочтительно консервативных замен, в SEQ ID NO: 1, составляет не более 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В дополнительном варианте осуществления число консервативных замен в SEQ ID NO: 1, составляет не более 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Изменения аминокислот могут быть незначительного характера, то есть являться консервативными аминокислотными заменами или вставками, которые не оказывают значительного влияния на укладку и/или активность белка; небольшими делециями, как правило, размером 1-30 аминокислот; небольшими удлинениями на amino- или карбоксиконце, такими как метиониновый остаток на аминоконце; небольшим линкерным пептидом размером до 20-25 остатков; или небольшим удлинением, которое облегчает очистку с помощью изменения суммарного заряда, или другой функциональной группой, такой как полигистидиновый тракт, антигенный эпитоп или связывающий домен.

Примерами консервативных замен являются замены в пределах групп основных аминокислот (аргинин, лизин и гистидин), кислых аминокислот (глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота), полярных аминокислот (глутамин и аспарагин), гидрофобных аминокислот (лейцин, изолейцин и валин), ароматических

аминокислот (фенилаланин, триптофан и тирозин) и небольших аминокислот (глицин, аланин, серин, треонин и метионин). Аминокислотные замены, которые в целом не изменяют удельную активность, известны из уровня техники и описаны, например, в Н. Neurath и R.L. Hill, 1979, *In, The Proteins*, Academic Press, New York. Обычные замены представляют собой Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly. Другими примерами консервативных замен являются G на A; A на G, S; V на I, L, A, T, S; I на V, L, M; L на I, M, V; M на L, I, V; P на A, S, N; F на Y, W, H; Y на F, W, H; W на Y, F, H; R на K, E, D; K на R, E, D; H на Q, N, S; D на N, E, K, R, Q; E на Q, D, K, R, N; S на T, A; T на S, V, A; C на S, T, A; N на D, Q, H, S; Q на E, N, H, K, R.

Незаменимые аминокислоты в полипептиде можно идентифицировать в соответствии с процедурами, известными из уровня техники, такими как сайтнаправленный мутагенез или аланинсканирующий мутагенез (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). В последней методике отдельные мутации, заключающиеся в замене на аланин, вводят по каждому остатку в молекуле, и полученные в результате мутантные молекулы исследуют в отношении лизоцимной активности для идентификации аминокислотных остатков, которые являются определяющими для активности молекулы. См. также Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. Активный сайт для ферментативного или другого биологического взаимодействия можно определять также с помощью физического анализа структуры, которую определяют с помощью таких методик, как ядерный магнитный резонанс, кристаллография, дифракция электронов или фотоаффинное мечение в сочетании с мутацией аминокислот предполагаемого контактирующего сайта. См., например, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. Об идентичности незаменимых аминокислот можно также сделать заключение на основании выравнивания с родственным полипептидом.

Кристаллическая структура лизоцима *Acremonium alcalophilum* CBS114.92 была получена с разрешением 1,3 Å, как раскрыто в WO 2013/076253. Эти атомные координаты можно применять для создания трехмерной модели, описывающей структуру лизоцима *Acremonium alcalophilum* CBS114.92 или гомологичные структуры (такие как

варианты согласно настоящему изобретению). С применением рентгеновской структуры аминокислотные остатки D95 и E97 (с применением SEQ ID NO: 1 для нумерации) идентифицировали в качестве каталитических остатков.

В одном варианте осуществления микробный лизоцим характеризуется по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления микробный лизоцим, применяемый в данном изобретении, содержит или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4 или ее аллельного варианта; или представляет собой ее фрагмент, обладающий лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислот, например, по меньшей мере 215 аминокислот, по меньшей мере 220 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислот, по меньшей мере 230 аминокислот, по меньшей мере 235 аминокислот или по меньшей мере 240 аминокислот. В другом варианте осуществления микробный лизоцим содержит или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4 или ее аллельного варианта и N-концевой и/или C-концевой His-метки и/или HQ-метки. В другом аспекте полипептид содержит или состоит из аминокислот 1-245 из SEQ ID NO: 4.

В другом варианте осуществления микробный лизоцим представляет собой вариант SEQ ID NO: 4, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько замен, и/или одну или несколько делеций, и/или одну или несколько вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям. В другом варианте осуществления число положений, содержащих одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию в SEQ ID NO: 4, составляет от 1 до 45, например, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 или 1-

5 положений. В одном варианте осуществления число положений, содержащих одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию в SEQ ID NO: 4, составляет не более 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В другом варианте осуществления число замен, делеций и/или вставок в SEQ ID NO: 4, составляет не более 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В дополнительном варианте осуществления число замен, предпочтительно консервативных замен, в SEQ ID NO: 4, составляет не более 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В дополнительном варианте осуществления число консервативных замен в SEQ ID NO: 4, составляет не более 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Изменения аминокислот могут быть незначительного характера, то есть являться консервативными аминокислотными заменами или вставками, которые не оказывают значительного влияния на укладку и/или активность белка; небольшими делециями, как правило, размером 1–30 аминокислот; небольшими удлинениями на амино- или карбоксиконце, такими как метиониновый остаток на аминоконце; небольшим линкерным пептидом размером до 20–25 остатков; или небольшим удлинением, которое облегчает очистку с помощью изменения суммарного заряда, или другой функциональной группой, такой как полигистидиновый тракт, антигенный эпитоп или связывающий домен.

Примерами консервативных замен являются замены в пределах групп основных аминокислот (аргинин, лизин и гистидин), кислых аминокислот (глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота), полярных аминокислот (глутамин и аспарагин), гидрофобных аминокислот (лейцин, изолейцин и валин), ароматических аминокислот (фенилаланин, триптофан и тирозин) и небольших аминокислот (глицин, аланин, серин, треонин и метионин). Аминокислотные замены, которые в целом не изменяют удельную активность, известны из уровня техники и описаны, например, в H. Neurath и R.L. Hill, 1979, *In, The Proteins*, Academic Press, New York. Обычные замены представляют собой Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly. Другими примерами консервативных замен являются G на A; A на G, S; V на I, L, A, T, S; I на V, L, M; L на I, M, V; M на L, I, V; P на A, S, N; F на Y, W, H; Y на F, W, H; W на Y, F, H;

R на K, E, D; K на R, E, D; H на Q, N, S; D на N, E, K, R, Q; E на Q, D, K, R, N; S на T, A; T на S, V, A; C на S, T, A; N на D, Q, H, S; Q на E, N, H, K, R.

Незаменимые аминокислоты в полипептиде можно идентифицировать в соответствии с процедурами, известными из уровня техники, такими как сайтнаправленный мутагенез или аланинсканирующий мутагенез (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). В последней методике отдельные мутации, заключающиеся в замене на аланин, вводят по каждому остатку в молекуле, и полученные в результате мутантные молекулы исследуют в отношении лизоцимной активности для идентификации аминокислотных остатков, которые являются определяющими для активности молекулы. См. также Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. Активный сайт для ферментативного или другого биологического взаимодействия можно определять также с помощью физического анализа структуры, которую определяют с помощью таких методик, как ядерный магнитный резонанс, кристаллография, дифракция электронов или фотоаффинное мечение в сочетании с мутацией аминокислот предполагаемого контактирующего сайта. См., например, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. Об идентичности незаменимых аминокислот можно также сделать заключение на основании выравнивания с родственным полипептидом.

Кристаллическая структура лизоцима *Acremonium alcalophilum* CBS114.92 была получена с разрешением 1,3 Å, как раскрыто в WO 2013/076253. Эти атомные координаты можно применять для создания трехмерной модели, описывающей структуру лизоцима *Acremonium alcalophilum* CBS114.92 или гомологичные структуры (такие как варианты согласно настоящему изобретению). С применением рентгеновской структуры аминокислотные остатки D95 и E97 (с применением SEQ ID NO: 1 для нумерации) идентифицировали в качестве каталитических остатков.

В одном варианте осуществления полипептид, обладающий лизоцимной активностью, характеризуется по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей

мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 27.

В одном варианте осуществления полипептид, обладающий лизоцимной активностью, характеризуется по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 30.

Примеры изменений аминокислот, консервативных замен и N-и/или C-концевых линкеров описаны выше.

Введение пробиотиков, определяемых Всемирной организацией здравоохранения как "живые организмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу хозяину", является безопасным вмешательством в отношении питания у здорового, в целом, населения. Пробиотики находятся в кишечном тракте человека и обычно присутствуют в йогурте и других диетических и/или пищевых продуктах (например, напитках, хлопьях и шоколадных батончиках).

Композиция:

Композиции, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут вводиться в форме пищевых продуктов или пищевых добавок и могут быть в любой жидкой, твердой или полутвердой форме. Они могут представлять собой, например, молочные продукты, такие как, например, ферментированные молочные продукты, содержащие по меньшей мере указанный микробный лизоцим, необязательно в сочетании с другими бактериями, например, с ферментами йогурта или сыром, или другими пищевыми продуктами, такими как энергетический батончик, шоколад или напитки, такие как сок. Неограничивающие примеры пищевых композиций включают цельное, обезжиренное, модифицированное, ароматизированное молоко, йогурт, в том числе натуральный, ароматизированный, замороженный или питьевой йогурт, тоники и спортивные напитки, другие молочные продукты, такие как заварные кремы, составы для сыра и творога и мороженое. Полутвердые пищевые композиции могут быть выбраны из

паст и спредов. Твердые композиции могут включать пищевые батончики, печенье, хлопья, пищевые волокна или любые другие пищевые продукты.

Микробный лизоцим также можно предоставить в виде пищевой добавки в форме порошка, таблетки, такой как таблетка для рассасывания или шипучая таблетка, в форме капсул, в качестве компонента эмульсии или пасты, или в любом другом подходящем носителе, определенном специалистами в данной области техники как эффективный носитель для живых микроорганизмов. Композиции, содержащие микробный лизоцим, могут быть в индивидуальных саше, капсулах, жевательной резинке или в более общих композициях, таких как масляные капли.

В одном варианте осуществления пищевая композиция представляет собой конечный продукт, который готов для потребления потребителем. Таким образом, он может быть куплен или иным образом получен потребителем. Однако пищевая композиция также может быть основным компонентом для производства других пищевых продуктов.

Пищевая композиция, описанная в данном документе, может содержать носитель. Термин "носитель" предполагает, что микробный лизоцим распределен по всему носителю, и он известен специалисту в данной области. Носители для применения согласно настоящему изобретению включают без ограничения, например, натуральную муку, предварительно высушенную муку, крахмал, модифицированный крахмал, растительные белки, молочные белки, денатурированные белки и сахарные спирты, такие как, например, маннит, сорбит, инозит, дульцит, ксилит или арабит. Таким образом, носитель является основным компонентом пищевой композиции. Предпочтительно общее количество микробного лизоцима в носителе составляет менее 5% (вес/вес), более предпочтительно менее 2% (вес/вес) или менее 0,5% (вес/вес) на основе объединенного количества носителя и микробного лизоцима. В конкретном варианте осуществления пищевая композиция состоит из микробного лизоцима и носителя. Однако композиция может содержать добавки. Предпочтительно такие добавки также распределены по всему носителю.

Предпочтительные варианты осуществления

1. Способ предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) или воспалительного заболевания кишечника (IBD), включающий введение

микробного лизоцима или композиции, содержащей микробный лизоцим.

2. Способ согласно варианту осуществления 1, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,1 до 1000 ppm ферментного белка на кг композиции.

3. Способ согласно вариантам осуществления 1 или 2, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 1 до 200 мг ферментного белка на кг массы тела, например, от 1 до 150 мг, от 2 до 100 мг, от 2 до 90 мг, от 2 до 80 мг или от 10 до 70 мг ферментного белка на кг массы тела.

4. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,04 до 11,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела, например, от 0,1 до 6,0 мкмоль, от 0,2 до 5,0 мкмоль, от 0,3 до 4,0 мкмоль или от 0,4 до 3,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела.

5. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя царства *Fungi*.

6. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где микробный лизоцим обеспечивает стабилизацию здоровой микробиоты в GI-тракте и подавление роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника.

7. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

8. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления GI-тракта.

9. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления верхних отделов GI-тракта.

10. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления нижних отделов GI-тракта.

11. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-10, где микробный лизоцим обеспечивает поддержание ремиссии IBS и/или IBD.

12. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-11, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение послеоперационного обострения.

13. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где микробный лизоцим обеспечивает уменьшение эктопического отложения липидов, связанного с ожирением, таким как, например, алиментарное ожирение.

14. Способ согласно варианту осуществления 13, где микробный лизоцим представляет собой полипептид, который характеризуется по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

15. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-14, где микробный лизоцим обеспечивает улучшение в отношении нарушения регуляции глюкозы, связанного с ожирением, таким как, например, алиментарное ожирение.

16. Способ согласно варианту осуществления 15, где микробный лизоцим представляет собой полипептид, который характеризуется по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

17. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-16, где композиция обеспечивает увеличение доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоте GI-тракта.

18. Способ согласно варианту осуществления 17, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на по меньшей мере 1%, например, на по меньшей мере 2%, на по меньшей мере 3%, на по меньшей мере 4%, на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 15% или на по меньшей мере 20%.

19. Способ согласно варианту осуществления 17, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на коэффициент, составляющий по меньшей мере 1,25, например, по меньшей мере 1,50, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере

2,5 или по меньшей мере 3,0.

20. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-19, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя отдела *Ascomycota*.

21. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-19, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя подотдела *Pezizomycotina*.

22. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-21, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25.

23. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-21, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH24.

24. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-21, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH25.

25. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-24, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(c) фрагмента полипептида из (a) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190

аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4;

(e) варианта SEQ ID NO: 4, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(f) фрагмента полипептида из (d) или (e), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислот, например, по меньшей мере 215 аминокислот, по меньшей мере 220 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислот, по меньшей мере 230 аминокислот, по меньшей мере 235 аминокислот или по меньшей мере 240 аминокислот;

(g) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(h) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,

36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(i) фрагмента полипептида из (g) или (h), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

26. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-24, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(c) фрагмента полипептида из (a) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере

мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(е) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(f) фрагмента полипептида из (d) или (е), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

27. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-25, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1-208 из SEQ ID NO: 1, аминокислот 1-245 из SEQ ID NO: 4 и аминокислот 1-207 из SEQ ID NO: 15.

28. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-26, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1-208 из SEQ ID NO: 1 и аминокислот 1-207 из SEQ ID NO: 15.

29. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-28 для применения в лечении человека.

30. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-29, где композиция представляет собой жидкий состав.

31. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-29, где композиция представляет собой твердый состав.

32. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-31, где композиция представляет собой пищевую или фармацевтическую композицию или медицинское устройство.

33. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-32, где композиция представляет собой пищевую композицию.

34. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-32, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

35. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-32,

где композиция представляет собой медицинское устройство.

36. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-35, где композиция представлена в форме порошка, таблетки, таблетки для рассасывания, шипучей таблетки, капсулы, эмульсии, пасты, индивидуального саше, жевательной резинки или масляных капель.

37. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-36, где композицию вводят путем перорального или ректального введения, насколько это возможно.

38. Способ улучшения здоровья кишечника у человека, предусматривающий уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* в пищеварительном тракте, который включает предоставление указанному человеку выделенного полипептида GH25, обладающего лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii*, определенной с помощью способа определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

39. Способ улучшения здоровья кишечника у человека, предусматривающий уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* в пищеварительном тракте, который включает предоставление указанному человеку полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 15, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 24, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO:

15, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, еще более предпочтительно полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, или полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27.

40. Способ улучшения здоровья кишечника у человека, предусматривающий уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки в пищеварительном тракте, который включает предоставление указанному человеку полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1.

41. Способ улучшения здоровья кишечника у человека, предусматривающий уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки в пищеварительном тракте, который включает предоставление указанному человеку полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по

меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21.

42. Способ улучшения здоровья кишечника у человека, предусматривающий уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки в пищеварительном тракте, который включает предоставление указанному человеку полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27.

43. Способ обеспечения устранения погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки из пищеварительного тракта человека, включающий предоставление указанному человеку выделенного полипептида GH25, обладающего лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii*, определенной с помощью способа определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

44. Способ обеспечения устранения погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки из пищеварительного тракта человека, включающий предоставление указанным людям источника полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 15, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 24, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO:

30, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 15, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, еще более предпочтительно полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, или полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27.

45. Способ обеспечения устранения погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки из пищеварительного тракта человека, включающий предоставление указанным людям источника полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1.

46. Способ обеспечения устранения погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки из

пищеварительного тракта человека, включающий предоставление указанным людям источника полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21.

47. Способ обеспечения устранения погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки из пищеварительного тракта человека, включающий предоставление указанным людям источника полипептида, выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27.

48. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–47, где полипептид обладает лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii* при 5 ppm, что обеспечивает увеличение измерения оптической плотности (OD) при 405 нм на по меньшей мере 0,20, как определено с помощью способа определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

49. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–48, где полипептид, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

50. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–48, где полипептид, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления GI-тракта.

51. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–48, где полипептид, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления верхних отделов GI-тракта.

52. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–48, где полипептид, обладающий лизоцимной активностью,

обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления нижних отделов GI-тракта.

53. Способ увеличения доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоме GI-тракта, включающий введение пациенту микробного лизоцима или композиции, содержащей микробный лизоцим.

54. Способ согласно варианту осуществления 53, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,1 до 1000 ppm ферментного белка на кг композиции.

55. Способ согласно вариантам осуществления 53 или 54, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 1 до 200 мг ферментного белка на кг массы тела, например, от 1 до 150 мг, от 2 до 100 мг, от 2 до 90 мг, от 2 до 80 мг или от 10 до 70 мг ферментного белка на кг массы тела.

56. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–55, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,04 до 11,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела, например, от 0,1 до 6,0 мкмоль, от 0,2 до 5,0 мкмоль, от 0,3 до 4,0 мкмоль или от 0,4 до 3,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела.

57. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–56, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя царства *Fungi*.

58. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–57, где микробный лизоцим обеспечивает стабилизацию здоровой микробиоты в GI-тракте и подавление роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника.

59. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–58, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

60. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–58, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления GI-тракта.

61. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–58, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления верхних отделов GI-тракта.

62. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–58, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления нижних отделов GI-тракта.

63. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–

62, где микробный лизоцим обеспечивает поддержание ремиссии IBS и/или IBD.

64. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-63, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение послеоперационного обострения.

65. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-64, где микробный лизоцим обеспечивает уменьшение эктопического отложения липидов, связанного с ожирением, таким как, например, алиментарное ожирение.

66. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-65, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на коэффициент, составляющий по меньшей мере 1,25, например, по меньшей мере 1,50, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5 или по меньшей мере 3,0.

67. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-66, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя отдела *Ascomycota*.

68. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-66, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя подотдела *Pezizomycotina*.

69. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-68, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25.

70. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-68, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH24.

71. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-68, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH25.

72. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-71, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(а) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью

последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(c) фрагмента полипептида из (a) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4;

(e) варианта SEQ ID NO: 4, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(f) фрагмента полипептида из (d) или (e), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислот, например, по меньшей мере 215 аминокислот, по меньшей мере 220 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислот, по меньшей мере 230 аминокислот, по меньшей мере 235 аминокислот или по меньшей мере 240 аминокислот;

(g) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%,

например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(h) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(i) фрагмента полипептида из (g) или (h), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

73. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–71, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,

36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(с) фрагмента полипептида из (а) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(е) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(f) фрагмента полипептида из (d) или (е), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

74. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–72, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1–208 из SEQ ID NO: 1, аминокислот 1–245 из SEQ ID NO: 4 и аминокислот 1–207 из SEQ ID NO: 15.

75. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53–73, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1–208 из SEQ ID NO: 1 и аминокислот 1–207 из SEQ ID

NO: 15.

76. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-75 для применения в лечении человека.

77. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-76, где композиция представляет собой жидкий состав.

78. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-76, где композиция представляет собой твердый состав.

79. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-78, где композиция представляет собой пищевую или фармацевтическую композицию или медицинское устройство.

80. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-79, где композиция представляет собой пищевую композицию.

81. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-79, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

82. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-79, где композиция представляет собой медицинское устройство.

83. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-82, где композиция представлена в форме порошка, таблетки, таблетки для рассасывания, шипучей таблетки, капсулы, эмульсии, пасты, индивидуального саше, жевательной резинки или масляных капель.

84. Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-83, где композицию вводят путем перорального или ректального введения, насколько это возможно.

85. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-84, где способ применяют при лечении болезни Крона и/или язвенного колита.

86. Применение микробного лизоцима или композиции, содержащей микробный лизоцим, при изготовлении лекарственного препарата, предназначенного для предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) или воспалительного заболевания кишечника (IBD).

87. Применение согласно варианту осуществления 86, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,1 до 1000 ppm ферментного белка на кг композиции.

88. Применение согласно вариантам осуществления 86 или 87, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 1 до 200 мг ферментного белка на кг массы тела, например, от 1 до 150 мг, от 2 до 100 мг, от 2 до 90 мг, от 2 до 80 мг или от 10 до 70 мг

ферментного белка на кг массы тела.

89. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-88, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,04 до 11,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела, например, от 0,1 до 6,0 мкмоль, от 0,2 до 5,0 мкмоль, от 0,3 до 4,0 мкмоль или от 0,4 до 3,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела.

90. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-89, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя царства *Fungi*.

91. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-90, где микробный лизоцим обеспечивает стабилизацию здоровой микробиоты в GI-тракте и подавление роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника.

92. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-91, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

93. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-92, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления GI-тракта.

94. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-92, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления верхних отделов GI-тракта.

95. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-92, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления нижних отделов GI-тракта.

96. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-95, где микробный лизоцим обеспечивает поддержание ремиссии IBS и/или IBD.

97. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-96, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение послеоперационного обострения.

98. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-97, где микробный лизоцим обеспечивает уменьшение эктопического отложения липидов, связанного с ожирением, таким как, например, алиментарное ожирение.

99. Применение согласно любому из вариантов осуществления

86-98, где композиция обеспечивает увеличение доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоте GI-тракта.

100. Применение согласно варианту осуществления 99, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на по меньшей мере 1%, например, на по меньшей мере 2%, на по меньшей мере 3%, на по меньшей мере 4%, на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 15% или на по меньшей мере 20%.

101. Применение согласно варианту осуществления 99, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на коэффициент, составляющий по меньшей мере 1,25, например, по меньшей мере 1,50, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5 или по меньшей мере 3,0.

102. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-101, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя отдела *Ascomycota*.

103. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-101, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя подотдела *Pezizomycotina*.

104. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-103, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25.

105. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-103, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH24.

106. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-103, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH25.

107. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-106, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен,

и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(с) фрагмента полипептида из (а) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4;

(е) варианта SEQ ID NO: 4, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(f) фрагмента полипептида из (d) или (е), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислот, например, по меньшей мере 215 аминокислот, по меньшей мере 220 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислот, по меньшей мере 230 аминокислот, по меньшей мере 235 аминокислот или по меньшей мере 240 аминокислот;

(g) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей

мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(h) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(i) фрагмента полипептида из (g) или (h), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

108. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-106, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(c) фрагмента полипептида из (a) или (b), который обладает

лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(e) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(f) фрагмента полипептида из (d) или (e), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

109. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-107, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1-208 из SEQ ID NO: 1, аминокислот 1-245 из SEQ ID NO: 4 и аминокислот 1-207 из SEQ ID NO: 15.

110. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-108, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1-208 из SEQ ID NO: 1 и аминокислот 1-207 из SEQ ID NO: 15.

111. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-110 для применения в лечении человека.

112. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-111, где композиция представляет собой жидкий состав.

113. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-111, где композиция представляет собой твердый состав.

114. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-113, где композиция представляет собой пищевую или фармацевтическую композицию или медицинское устройство.

115. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-114, где композиция представляет собой пищевую композицию.

116. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-114, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

117. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-114, где композиция представляет собой медицинское устройство.

118. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-117, где композиция представлена в форме порошка, таблетки, таблетки для рассасывания, шипучей таблетки, капсулы, эмульсии, пасты, индивидуального саше, жевательной резинки или масляных капель.

119. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-118, где композицию вводят путем перорального или ректального введения, насколько это возможно.

120. Применение микробного лизоцима или композиции, содержащей микробный лизоцим, при изготовлении лекарственного препарата, предназначенного для увеличения доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоме GI-тракта.

121. Применение согласно варианту осуществления 120, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,1 до 1000 ppm ферментного белка на кг композиции.

122. Применение согласно вариантам осуществления 120 или 121, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 1 до 200 мг ферментного белка на кг массы тела, например, от 1 до 150 мг, от 2 до 100 мг, от 2 до 90 мг, от 2 до 80 мг или от 10 до 70 мг ферментного белка на кг массы тела.

123. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-122, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,04 до 11,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела, например, от 0,1 до 6,0 мкмоль, от 0,2 до 5,0 мкмоль, от 0,3 до 4,0 мкмоль или от 0,4 до 3,0 мкмоль ферментного белка на кг

массы тела.

124. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-123, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя царства *Fungi*.

125. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-124, где микробный лизоцим обеспечивает стабилизацию здоровой микробиоты в GI-тракте и подавление роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника.

126. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-125, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

127. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-126, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления GI-тракта.

128. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-126, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления верхних отделов GI-тракта.

129. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-126, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления нижних отделов GI-тракта.

130. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-129, где микробный лизоцим обеспечивает поддержание ремиссии IBS и/или IBD.

131. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-130, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение послеоперационного обострения.

132. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-131, где микробный лизоцим обеспечивает уменьшение эктопического отложения липидов, связанного с ожирением, таким как, например, алиментарное ожирение.

133. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-132, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на по меньшей мере 1%, например, на по меньшей мере 2%, на по меньшей мере 3%, на по меньшей мере 4%, на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 15% или на по меньшей мере 20%.

134. Применение согласно любому из вариантов осуществления

120-132, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на коэффициент, составляющий по меньшей мере 1,25, например, по меньшей мере 1,50, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5 или по меньшей мере 3,0.

135. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-134, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя отдела *Ascomycota*.

136. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-135, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя подотдела *Pezizomycotina*.

137. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-136, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25.

138. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-136, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH24.

139. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-136, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH25.

140. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-139, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(c) фрагмента полипептида из (a) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере

170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4;

(e) варианта SEQ ID NO: 4, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(f) фрагмента полипептида из (d) или (e), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислот, например, по меньшей мере 215 аминокислот, по меньшей мере 220 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислот, по меньшей мере 230 аминокислот, по меньшей мере 235 аминокислот или по меньшей мере 240 аминокислот;

(g) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(h) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или

несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(i) фрагмента полипептида из (g) или (h), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

141. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-139, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(c) фрагмента полипептида из (a) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей

мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(е) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(f) фрагмента полипептида из (d) или (е), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

142. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120–140, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1–208 из SEQ ID NO: 1, аминокислот 1–245 из SEQ ID NO: 4 и аминокислот 1–207 из SEQ ID NO: 15.

143. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120–141, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1–208 из SEQ ID NO: 1 и аминокислот 1–207 из SEQ ID NO: 15.

144. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120–143 для применения в лечении человека.

145. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120–144, где композиция представляет собой жидкий состав.

146. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120–144, где композиция представляет собой твердый состав.

147. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120–146, где композиция представляет собой пищевую или фармацевтическую композицию или медицинское устройство.

148. Применение согласно любому из вариантов осуществления

120-147, где композиция представляет собой пищевую композицию.

149. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-147, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

150. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-147, где композиция представляет собой медицинское устройство.

151. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-150, где композиция представлена в форме порошка, таблетки, таблетки для рассасывания, шипучей таблетки, капсулы, эмульсии, пасты, индивидуального саше, жевательной резинки или масляных капель.

152. Применение согласно любому из вариантов осуществления 120-151, где композицию вводят путем перорального или ректального введения, насколько это возможно.

153. Применение согласно любому из вариантов осуществления 86-152, где применение осуществляют при лечении болезни Крона и/или язвенного колита.

154. Микробный лизоцим или композиция, содержащая микробный лизоцим, для применения согласно способу предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) или воспалительного заболевания кишечника (IBD).

155. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно варианту осуществления 154, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,1 до 1000 ppm ферментного белка на кг композиции.

156. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно вариантам осуществления 154 или 155, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 1 до 200 мг ферментного белка на кг массы тела, например, от 1 до 150 мг, от 2 до 100 мг, от 2 до 90 мг, от 2 до 80 мг или от 10 до 70 мг ферментного белка на кг массы тела.

157. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-156, где композицию, содержащую лизоцим, вводят на уровне от 0,04 до 11,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела, например, от 0,1 до 6,0 мкмоль, от 0,2 до 5,0 мкмоль, от 0,3 до 4,0 мкмоль или от 0,4 до 3,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела.

158. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-157, где

микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя царства *Fungi*.

159. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-158, где микробный лизоцим обеспечивает стабилизацию здоровой микробиоты в GI-тракте и подавление роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника.

160. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-159, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

161. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-160, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления GI-тракта.

162. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-160, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления верхних отделов GI-тракта.

163. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-160, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления нижних отделов GI-тракта.

164. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-163, где микробный лизоцим обеспечивает поддержание ремиссии IBS и/или IBD.

165. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-164, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение послеоперационного обострения.

166. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-165, где микробный лизоцим обеспечивает уменьшение эктопического отложения липидов, связанного с ожирением, таким как, например, алиментарное ожирение.

167. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-166, где композиция обеспечивает увеличение доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоте GI-тракта.

168. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно варианту осуществления 167, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на по меньшей мере 1%, например, на по меньшей мере 2%, на по меньшей мере 3%, на по меньшей мере 4%, на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 15% или на по меньшей мере 20%.

169. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно варианту осуществления 167, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на коэффициент, составляющий по меньшей мере 1,25, например, по меньшей мере 1,50, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5 или по меньшей мере 3,0.

170. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154–169, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя отдела *Ascomycota*.

171. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154–169, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя подотдела *Pezizomycotina*.

172. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154–171, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25.

173. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154–172, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH24.

174. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154–172, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH25.

175. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154–174, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(а) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(c) фрагмента полипептида из (a) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4;

(e) варианта SEQ ID NO: 4, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(f) фрагмента полипептида из (d) или (e), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислот, например, по меньшей мере 215 аминокислот, по меньшей мере 220 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислот, по меньшей мере 230 аминокислот, по меньшей мере 235 аминокислот или по меньшей мере 240 аминокислот;

(g) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(h) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(i) фрагмента полипептида из (g) или (h), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

176. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154–174, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(с) фрагмента полипептида из (а) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(е) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(f) фрагмента полипептида из (d) или (е), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

177. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154–175, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1–208 из SEQ ID NO: 1, аминокислот 1–245 из SEQ ID NO: 4 и аминокислот 1–207 из SEQ ID NO: 15.

178. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-176, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1-208 из SEQ ID NO: 1 и аминокислот 1-207 из SEQ ID NO: 15.

179. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-178 для применения в лечении человека.

180. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-179, где композиция представляет собой жидкий состав.

181. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-179, где композиция представляет собой твердый состав.

182. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-181, где композиция представляет собой пищевую или фармацевтическую композицию или медицинское устройство.

183. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-182, где композиция представляет собой пищевую композицию.

184. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-182, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

185. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-182, где композиция представляет собой медицинское устройство.

186. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-185, где композиция представлена в форме порошка, таблетки, таблетки для рассасывания, шипучей таблетки, капсулы, эмульсии, пасты, индивидуального саше, жевательной резинки или масляных капель.

187. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-186, где композицию вводят путем перорального или ректального введения, насколько это возможно.

188. Микробный лизоцим или композиция, содержащая микробный лизоцим, для применения согласно способу увеличения доли бактерий рода *Faecalibacterium* в микробиоме GI-тракта.

189. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно варианту осуществления 188, где композицию, содержащую

лизозим, вводят на уровне от 0,1 до 1000 ppm ферментного белка на кг композиции.

190. Микробный лизозим или композиция, содержащая его, согласно вариантам осуществления 188 или 189, где композицию, содержащую лизозим, вводят на уровне от 1 до 200 мг ферментного белка на кг массы тела, например, от 1 до 150 мг, от 2 до 100 мг, от 2 до 90 мг, от 2 до 80 мг или от 10 до 70 мг ферментного белка на кг массы тела.

191. Микробный лизозим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-190, где композицию, содержащую лизозим, вводят на уровне от 0,04 до 11,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела, например, от 0,1 до 6,0 мкмоль, от 0,2 до 5,0 мкмоль, от 0,3 до 4,0 мкмоль или от 0,4 до 3,0 мкмоль ферментного белка на кг массы тела.

192. Микробный лизозим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-191, где микробный лизозим является полученным или получаемым из представителя царства *Fungi*.

193. Микробный лизозим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-192, где микробный лизозим обеспечивает стабилизацию здоровой микробиоты в GI-тракте и подавление роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника.

194. Микробный лизозим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-193, где микробный лизозим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

195. Микробный лизозим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-194, где микробный лизозим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления GI-тракта.

196. Микробный лизозим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-194, где микробный лизозим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления верхних отделов GI-тракта.

197. Микробный лизозим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-194, где микробный лизозим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления нижних отделов GI-тракта.

198. Микробный лизозим или композиция, содержащая его,

согласно любому из вариантов осуществления 188-197, где микробный лизоцим обеспечивает поддержание ремиссии IBS и/или IBD.

199. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-198, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение послеоперационного обострения.

200. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-199, где микробный лизоцим обеспечивает уменьшение эктопического отложения липидов, связанного с ожирением, таким как, например, алиментарное ожирение.

201. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-200, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на по меньшей мере 1%, например, на по меньшей мере 2%, на по меньшей мере 3%, на по меньшей мере 4%, на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 15% или на по меньшей мере 20%.

202. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-200, где доля бактерий рода *Faecalibacterium* увеличивается на коэффициент, составляющий по меньшей мере 1,25, например, по меньшей мере 1,50, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5 или по меньшей мере 3,0.

203. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-202, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя отдела *Ascomycota*.

204. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-203, где микробный лизоцим является полученным или получаемым из представителя подотдела *Pezizomycotina*.

205. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-204, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25.

206. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-205, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH24.

207. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его,

согласно любому из вариантов осуществления 188-205, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов из GH25.

208. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-207, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(c) фрагмента полипептида из (a) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4;

(e) варианта SEQ ID NO: 4, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен,

и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(f) фрагмента полипептида из (d) или (e), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислот, например, по меньшей мере 215 аминокислот, по меньшей мере 220 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислот, по меньшей мере 230 аминокислот, по меньшей мере 235 аминокислот или по меньшей мере 240 аминокислот;

(g) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(h) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(i) фрагмента полипептида из (g) или (h), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

209. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188–207, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%,

например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(c) фрагмента полипептида из (a) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(e) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(f) фрагмента полипептида из (d) или (e), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

210. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-208, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1-208 из SEQ ID NO: 1, аминокислот 1-245 из SEQ ID NO: 4 и аминокислот 1-207 из SEQ ID NO: 15.

211. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-209, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из аминокислот 1-208 из SEQ ID NO: 1 и аминокислот 1-207 из SEQ ID NO: 15.

212. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-211 для применения в лечении человека.

213. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-212, где композиция представляет собой жидкий состав.

214. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-212, где композиция представляет собой твердый состав.

215. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-214, где композиция представляет собой пищевую или фармацевтическую композицию или медицинское устройство.

216. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-215, где композиция представляет собой пищевую композицию и/или добавку.

217. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-215, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

218. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-215, где композиция представляет собой медицинское устройство.

219. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-218, где

композиция представлена в форме порошка, таблетки, таблетки для рассасывания, шипучей таблетки, капсулы, эмульсии, пасты, индивидуального саше, жевательной резинки или масляных капель.

220. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 188-219, где композиция вводится путем перорального или ректального введения, насколько это возможно.

221. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-220, где микробный лизоцим или композиция, содержащая его, применяются при лечении болезни Крона и/или язвенного колита.

222. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 1-153, где микробный лизоцим обеспечивает уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки в пищеварительном тракте.

223. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 1-153, где микробный лизоцим обеспечивает стимуляцию устранения погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки из пищеварительного тракта человека.

224. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 1-153 или 222-223, где микробный лизоцим обладает лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii*, определенной с помощью способа определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

225. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 222-224, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 15, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 24, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90%

идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 15, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, еще более предпочтительно полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, или полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27.

226. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 222–224, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1.

227. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 222–224, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере

80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21.

228. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 222-224, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27.

229. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 222-228, где микробный лизоцим обладает лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii* при 5 ppm, что обеспечивает увеличение измерения оптической плотности (OD) при 405 нм на по меньшей мере 0,20, как определено с помощью способа определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

230. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 222-229, где микробный лизоцим, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

231. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 222-230, где микробный лизоцим, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления GI-тракта.

232. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 222-230, где микробный лизоцим, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления верхних отделов GI-тракта.

233. Способ или применение согласно любому из вариантов осуществления 222-230, где микробный лизоцим, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления нижних отделов GI-тракта.

234. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-221, где

микробный лизоцим обеспечивает уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки в пищеварительном тракте.

235. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-221, где микробный лизоцим обеспечивает стимуляцию устранения погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* или остатков их клеточной стенки из пищеварительного тракта людей.

236. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 154-221 или 234-235, где микробный лизоцим обладает лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii*, определенной с помощью способа определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

237. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 234-236, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 15, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 24, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 15, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO:

21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 18, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27, и полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 30, еще более предпочтительно полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21, или полипептида, характеризующегося по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27.

238. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 234–236, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 1.

239. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 234–236, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 21.

240. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 234–236, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из полипептида, характеризующегося по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с полипептидом под SEQ ID NO: 27.

241. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 234-240, где микробный лизоцим обладает лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii* при 5 ppm, что обеспечивает увеличение измерения оптической плотности (OD) при 405 нм на по меньшей мере 0,20, как определено с помощью способа определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

242. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 234-241, где микробный лизоцим, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

243. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 234-242, где микробный лизоцим, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления GI-тракта.

244. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 234-242, где микробный лизоцим, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления верхних отделов GI-тракта.

245. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, согласно любому из вариантов осуществления 234-242, где микробный лизоцим, обладающий лизоцимной активностью, обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления нижних отделов GI-тракта.

ПРИМЕРЫ

Штаммы

Trichophaea saccata CBS804.70 приобретали у Centraalbureau voor Schimmelcultures (Утрехт, Нидерланды). По данным Central Bureau vor Schnimmelkulture *Trichophaea saccata* CBS804.70 выделена из почв угольных терриконов в Стаффордшире, Англия, в мае 1968 года.

По данным Central Bureau vor Schnimmelkulture *Acremonium*

alcalophilum CBS 114.92 выделен А. Yoneda в 1984 году из осадка компоста свиных фекалий возле озера Цукуи, Япония.

Среды и растворы

Среда YP+2% глюкозы состояла из 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона и 2% глюкозы.

Среда YP+2% мальтодекстрина состояла из 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона и 2% мальтодекстрина.

Содержимое чашек с PDA агаром состояло из картофельного отвара (картофельный отвар получали путем кипячения 300 г нарезанных ломтиками (отмытых, но не чищенных) картофеля в воде в течение 30 минут и последующего сливания или сцеживания бульона через марлю. Затем добавляли дистиллированную воду, пока общий объем суспензии не достигал одного литра, с последующим добавлением 20 г декстрозы и 20 г порошка агара. Среду стерилизовали автоклавированием при давлении 15 фунт/кв. дюйм в течение 15 минут (Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998).

Содержимое чашек с LB состояло из 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г хлорида натрия, 15 г бактоагара и деионизированной воды в объеме до 1 литра.

Среда LB состояла из 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г хлорида натрия и деионизированной воды в объеме до 1 литра.

Содержимое чашек с сахарозой COVE состояло из 342 г сахарозы, 20 г порошка агара, 20 мл солевого раствора COVE и деионизированной воды в объеме до 1 литра. Среду стерилизовали автоклавированием при давлении 15 фунт/кв. дюйм в течение 15 минут (Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998). Среду охлаждали до 60°C и добавляли 10 мМ ацетамида, 15 мМ CsCl, TRITON® X-100 (50 мкг/500 мл).

Солевой раствор COVE состоял из 26 г MgSO₄•7H₂O, 26 г KCl, 26 г KH₂PO₄, 50 мл раствора металлов COVE, содержащихся в следовых количествах, и деионизированной воды в объеме до 1 литра.

Раствор металлов COVE, содержащихся в следовых количествах, состоял из 0,04 г Na₂B₄O₇•10H₂O, 0,4 г CuSO₄•5H₂O, 1,2 г FeSO₄•7H₂O, 0,7 г MnSO₄•H₂O, 0,8 г Na₂MoO₄•2H₂O, 10 г ZnSO₄•7H₂O и деионизированной воды в объеме до 1 литра.

Пример 1. Клонирование, экспрессия и очистка лизоцима GH25 из *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92

Лизоцим GH25 из *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92 (SEQ ID NO: 1) клонировали и экспрессировали, как описано в примере 2, и очищали, как описано в примере 5 из WO 2013/076253.

Пример 2. Экспрессия лизоцима GH24 из *Trichophaea saccata*

Штамм грибка культивировали в 100 мл среды YP+2% глюкозы во встряхиваемых колбах Эрленмейера объемом 1000 мл в течение 5 дней при 20°C. Мицелий собирали из колб путем фильтрации среды через вакуумную воронку Бюхнера, покрытую с внутренней стороны MIRACLOTH® (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс, США). Мицелий замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до дальнейшего применения. Геномную ДНК выделяли с использованием набора DNEASY® Plant Maxi (QIAGEN GMBH, Хильден, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

Информацию о геномной последовательности получали при помощи Illumina MySeq (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния). 5 мкг выделенной геномной ДНК *Trichophaea saccata* использовали для подготовки и анализа библиотеки в соответствии с инструкциями производителя. Применяли стратегию спаренных концов 100 п.о. с размером вставки библиотеки 200–500 п.о. Половину прогона HiSeq применяли для получения в целом 95744298 необработанных фрагментов 100 п.о. Затем фрагменты фракционировали до 25% с последующим выравниванием (извлечение самых длинных подпоследовательностей, имеющих баллы Phred 10 или больше). Эти фрагменты объединяли с применением Idba версии 0.19. Контиги короче 400 п.о. отбрасывали, что привело к получению 8954791030 п.о. с 10035 N-50. Гены называли с применением GeneMark.hmm ES версии 2.3с, а идентификацию каталитического домена проводили с применением скрытой марковской модели "Phage lysozyme PF00959", предоставленной Pfam. Кодировующую полипептид последовательность для всей кодирующей области клонировали из геномной ДНК *Trichophaea saccata* CBS804.70 методом ПЦР с использованием праймеров F-80470 и R-80470 (SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно), как описано ниже.

5'- ACACAAC**TGGGGATCCACCATGCACGCTCTCACCCCTTCT** -3' (SEQ ID NO: 6)

5'- CTAGATCTCGAGA**AAGCTTTTAGCACTTGGGAGGGTGGG** -3' (SEQ ID NO: 7)

Жирными буквами представлена последовательность, кодирующая фермент *Trichophaea saccata*. Сайты рестрикции подчеркнуты. Последовательность слева от сайтов рестрикции гомологична сайтам

вставки pDau109 (WO 2005/042735).

Для эксперимента использовали смесь для ПЦР Extensor HIFI с концентрацией 2x (Thermo Scientific, кат. № AB-0795).

Реакцию амплификации (25 мкл) проводили в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Scientific, кат. № AB-0795) со следующими конечными концентрациями:

смесь для ПЦР:

0,5 мкМ праймера F-80470,

0,5 мкМ праймера R-80470,

12,5 мкл смеси для ПЦР Extensor HIFI с конц. 2x,

11,0 мкл H₂O,

10 нг геномной ДНК *Trichophaea saccata* CBS804.70.

Реакционную смесь ПЦР инкубировали в термоциклере с двумя блоками DYAD® (BioRad, США), запрограммированном на 1 цикл при 94°C в течение 30 секунд; 30 циклов, каждый при 94°C в течение 30 секунд, 52°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 60 секунд, затем 1 цикл при 68°C в течение 6 минут. Образцы охлаждали до 10°C перед удалением и дальнейшей обработкой.

Три мкл реакционной смеси ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с использованием 40 mM трис-основания, 20 mM ацетата натрия, 1 mM буфера двунатриевой EDTA (TAE). Наблюдалась основная полоса приблизительно 946 п.о. Оставшуюся реакционную смесь ПЦР очищали непосредственно с применением набора для очистки ДНК из полоски геля после проведения ПЦР ILLUSTRATE™ GFX™ (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Два мкг плазмиды pDau109 расщепляли с использованием Bam HI и Hind III, и расщепленную плазмиду прогоняли на 1% агарозном геле, используя 50 mM трис-основания – 50 mM борной кислоты – 1 mM буфера двунатриевой EDTA (TBE) для удаления лишнего фрагмента из подвергнутой рестрикции плазмиды. Полосы визуализировали путем добавления красителя для геля с ДНК SYBR® Safe (Life Technologies Corporation, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США) и применения трансиллюминатора с длиной волны 470 нм. Полосу, соответствующую подвергнутой рестрикции плазмиде, вырезали и очищали с использованием набора для очистки ДНК из полоски геля после проведения ПЦР ILLUSTRATE™ GFX™. Плазмиду элюировали в 10 mM Трис, pH 8,0 и ее концентрацию доводили до 20 нг на мкл. Набор для ПЦР-клонирования IN-FUSION® (Clontech Laboratories, Inc., Маунтин-Вью, Калифорния, США) использовали для клонирования ПЦР-

фрагмента длиной 983 п.о. в pDau109, расщепленную Bam HI и Hind III (20 нг). Общий объем реакционной смеси IN-FUSION® составлял 10 мкл. Общий объем реакционной смеси IN-FUSION® составлял 10 мкл. Реакционную смесь IN-FUSION® трансформировали в клетки *E. coli* FUSION-BLUE™ (Clontech Laboratories, Inc., Маунтин-Вью, Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя и высевали на чашки с агаром LB с добавлением 50 мкг ампициллина на мл. После инкубации в течение ночи при 37°C наблюдали рост колоний-трансформантов при отборе на чашках с LB с добавлением 50 мкг ампициллина на мл.

Несколько колоний отбирали для анализа методом ПЦР для отбора колоний с использованием праймеров вектора pDau109, описанных ниже. Четыре колонии переносили из чашек с LB, дополненных 50 мкг ампициллина на мл, с помощью желтого стержня для посева (Nunc A/S, Дания) в новые чашки с LB, дополненные 50 мкг ампициллина на мл, и инкубировали в течение ночи при 37°C.

Праймер 8653: 5'-GCAAGGGATGCCATGCTTGG-3' (SEQ ID NO: 8)

Праймер 8654: 5'-CATATAACCAATTGCCCTC-3' (SEQ ID NO: 9)

Каждую из трех колоний переносили непосредственно в пробирки для ПЦР объемом 200 мкл, содержимое которых состояло из 5 мкл 2X смеси для ПЦР Extensor HIFI (Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США), 0,5 мкл праймера 8653 (10 пм/мкл), 0,5 мкл праймера 8654 (10 пм/мкл) и 4 мкл деионизированной воды. Каждую ПЦР для отбора колоний осуществляли при инкубации в термоциклере с двумя блоками DYAD®, запрограммированном на 1 цикл при 94°C в течение 60 секунд; 30 циклов, каждый при 95°C в течение 30 секунд, 60°C в течение 45 секунд, 72°C в течение 60 секунд, 68°C в течение 10 минут и 10°C в течение 10 минут.

Три мкл реакционной смеси от каждой завершенной ПЦР подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле с использованием буфера TAE. Все четыре трансформанта *E. coli* продемонстрировали полосу ПЦР приблизительно 980 п.о. Плазмидную ДНК выделяли из каждой из четырех колоний с использованием набора QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN GMBH, Хильден, Германия). Полученную плазмидную ДНК секвенировали с праймерами 8653 и 8654 (SEQ ID NO: 8 и 9) с применением автоматического секвенатора ДНК Applied Biosystems Model 3730 с набором реактивов BIG-DYE™ Terminator версии 3.1 (Applied Biosystems, Inc., Фостер-Сити, Калифорния, США). Одну плазмиду, обозначенную как pKKSC0312-2, выбрали для трансформации *Aspergillus oryzae* MT3568. *A. oryzae* MT3568

представляет собой производное *Aspergillus oryzae* JaL355 (WO 2002/40694) с разрушенным геном *amdS* (ацетамидаза), в котором ауксотрофия по *pyrG* была восстановлена путем инактивации гена *amdS* *A. oryzae*. Протопласты *A. oryzae* MT3568 получали в соответствии со способом, описанным в Европейском патенте EP0238023, страницы 14–15.

E. coli 3701, содержащую pKKSC0312-2, выращивали в течение ночи в соответствии с инструкциями производителя (Genomed), и плазмидную ДНК pKKSC0312-2 выделяли с использованием набора Plasmid Midi (Genomed JETquick, кат. № 400250, GENOMED GmbH, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенную плазмидную ДНК трансформировали в *Aspergillus oryzae* MT3568. Протопласты *A. oryzae* MT3568 получали в соответствии со способом Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419–1422. Содержимое чашек для отбора состояло из сахарозы COVE +10 мМ ацетамида +15 мМ CsCl+TRITON® X-100 (50 мкл/500 мл). Чашки инкубировали при 37°C. Коротко, 8 мкл плазмидной ДНК, представляющей 3 мкг ДНК, добавляли к 100 мкл протопластов MT3568. Добавляли 250 мкл 60% раствора PEG и пробирки осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Смесь добавляли к 10 мл предварительно расплавленной высокоочищенной агарозы Cove (высокоочищенную агарозу расплавляли, а затем температуру уравнивали до 40°C на теплой водяной бане перед добавлением в смесь протопластов). Объединенную смесь затем высевали на две чашки Петри для отбора с Cove-сахарозой с 10 мМ ацетамида. Чашки инкубировали при 37°C в течение 4 дней. Отдельные трансформированные колонии *Aspergillus* идентифицировали по росту на чашках с применением отбора на ацетимиде в качестве источника углерода. Каждый из четырех трансформантов *A. oryzae* инокулировали в 750 мкл среды YP, дополненной 2% глюкозы, а также в 750 мкл 2% мальтодекстрина, а также DAP4C в глубокие 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C в неподвижном состоянии в течение 4 дней. В то же время четыре трансформанта повторно высевали штрихом на агаровую среду с сахарозой COVE-2.

Затем культуральный бульон из трансформантов *Aspergillus oryzae* анализировали в отношении продуцирования полипептида GH24 с помощью SDS-PAGE с использованием 10% гелей Bis-Tris SDS NUPAGE® (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полосу белка приблизительно 27 кДа

наблюдали для каждого из трансформантов *Aspergillus oryzae*. Один трансформант *A. oryzae* культивировали во встряхиваемых колбах Эрленмейера объемом 1000 мл, содержащих 100 мл среды DAP4C, при 26°C в течение 4 дней с перемешиванием при 85 об./мин.

Пример 3. Очистка лизоцима GH24 из *Trichophaea saccata*

Ферментационную надосадочную жидкость с лизоцимом GH24 из примера 3 фильтровали через фильтр в горловине флакона Fast PES с отсеканием 0,22 мкм. Полученный раствор подвергали диафильтрации с 5 мМ ацетатом Na, pH 4,5, и концентрировали (объем уменьшался в 10 раз) на установке для ультрафильтрации (Sartorius) с отсекающей мембраной 10 кДа.

После предварительной обработки приблизительно 275 мл содержащего лизоцим раствора очищали с помощью хроматографии на сефарозе SP (приблизительно 60 мл) в колонке XK26 с элюированием связанного лизоцима в градиенте от 0 до 100% буфера А (50 мМ ацетата Na, pH 4,5) и буфера В (50 мМ ацетата Na+1 М NaCl, pH 4,5) на 10 объемах колонки. Фракции из колонки объединяли на основании хроматограммы (поглощение при 280 и 254 нм) и SDS-PAGE анализа.

Молекулярный вес, который оценивали по SDS-PAGE, составлял приблизительно 27 кДа, а чистота составляла > 90%.

Пример 4. Другие характеристики лизоцима GH24 из *Trichophaea saccata*

Определение N-концевой последовательности представляло собой: YPVKTDL.

Расчетная молекулярная масса для этой зрелой последовательности составляет 26205,5 Да (M+H)⁺.

Молекулярная масса, определенная с помощью анализа интактной молекулярной массы, составляла 26205,3 Да. (M+H)⁺.

Зрелая последовательность (из данных N-концевого секвенирования EDMAN, анализа интактной молекулярной массы и протеомного анализа):

YPVKTDLHCRSSPSTSASIVRTYSSGTEVQIQCTTGTSTVQGSNVWDKTQHGCVADYY
VKTGHSGIFTTKCGSSSGGSGCKPPPINAATVALIKEFEGFVPKPAPDPIGLPTVGYGHLCKTK
GCKEVPYSFPLTQETATKLLQSDIKTFTSCVSNYVKDSVKLNDNQYGALASWAFNVGCGNVQTS
SLIKRLNAGENPNTVAAQELPKWKYAGGKVMPLVRRRNAEVALFKKPSSVQAHPPKC (SEQ
ID NO: 4).

Пример 5. Определение лизоцимной активности

Лизоцимную активность определяли путем измерения уменьшения (падения) поглощения/оптической плотности раствора

ресуспендированного *Micrococcus lysodeikticus* ATTC No. 4698 (Sigma-Aldrich M3770) или *Exiguobacterium undae* (DSM14481), измеренных на спектрофотометре при 540 нм.

Получение субстрата *Micrococcus lysodeikticus*

Перед применением клетки ресуспендировали в лимонной кислоте – фосфатном буфере с pH 6,5 до концентрации 0,5 мг клеток/мл и измеряли оптическую плотность (OD) при 540 нм. Суспензию клеток затем регулировали таким образом, чтобы концентрация клеток соответствовала OD₅₄₀=1,0. Отрегулированную суспензию клеток затем хранили холодной до применения. Ресуспендированные клетки использовались в пределах 4 часов.

Получение высушенных клеток субстрата *Exiguobacterium undae*

Культуру *E. undae* (DSM14481) выращивали в 100 мл среды LB (Fluka 51208, 25 г/л) в встряхиваемой колбе объемом 500 мл при 30°C, 250 об./мин. в течение ночи. Выращиваемую в течение ночи культуру затем центрифугировали при 20°C и 5000 g в течение 10 минут, и затем осадок промывали два раза стерильной водой milliQ и ресуспендировали в воде Milli-Q. Промытые клетки центрифугировали в течение 1 минуты при 13000 об./мин. и декантировали как можно больше надосадочной жидкости. Промытые клетки высушивали в вакуумной центрифуге в течение 1 часа. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере лимонная кислота – фосфат, pH 4, 5 или 6, таким образом, чтобы оптическая плотность (OD) при 540 нм=1.

Измерение противомикробной активности лизоцима в анализе помутнения

Образец лизоцима, который нужно подвергнуть измерению, разводили до концентрации 100–200 мг ферментного белка/л в буфере лимонная кислота – фосфат, pH 4, 5 или 6, и держали на льду до применения. В 96-луночном микротитровальном планшете (Nunc) 200 мкл субстрата добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали при 37°C в течение 5 минут в микропланшет-ридере VERSAmax (Molecular Devices). После инкубирования измеряли поглощение в каждой лунке при 540 нм (начальное значение). Чтобы начать измерение активности, 20 мкл разведенного образца лизоцима добавляли к каждому субстрату (200 мкл) и проводили измерение кинетики поглощения при 540 нм в течение минимум 30 минут и вплоть до 24 часов при 37°C. Измеренное поглощение при 540 нм отслеживали для каждой лунки и со временем наблюдали падение поглощения, если лизоцим обладал лизоцимной активностью.

Результаты представлены в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Лизоцимная активность в отношении *Micrococcus lysodeikticus* и *Exiguobacterium undae*, измеренная с помощью падения оптической плотности

Лизоцим	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ¹	<i>Exiguobacterium undae</i> ¹
Лизоцим GH22 из <i>Gallus gallus</i> (SEQ ID NO: 5)	+++ (pH 6)	+ (pH 6)
Лизоцим из GH24 <i>Trichophaea saccata</i> (SEQ ID NO: 4)	++ (pH 6)	++ (pH 6)
Лизоцим из GH25 A. <i>alcalophilum</i> (SEQ ID NO: 1)	+ (pH 4)	+ (pH 5)

¹ – означает отсутствие эффекта; + означает небольшой эффект; ++ означает умеренный эффект; +++ означает значительный эффект. Значение pH в скобках показывает значение pH в анализе на основе комбинации лизоцим-субстрат.

Данные подтверждают, что лизоцим GH22 из *Gallus gallus*, лизоцим GH24 из *Trichophaea saccata* и лизоцим GH25 из *A. alcalophilum* обладают лизоцимной активностью.

Пример 6. Испытание in vivo на мышах – иммуномодулирующие свойства в мышинной модели колита

Животные и их содержание

Самок мышей BalbC (6-недельного возраста по прибытии, Charles Rivers UK Limited) случайным образом помещали в клетки по 3 по прибытии в зависимости от массы тела с 12-часовым циклом свет-темнота.

До начала экспериментальных процедур обеспечивали 14 дней акклиматизационного периода.

Кормление и обработка

Мыши имели доступ к стандартному корму (поддерживающая диета RM1P, Special Diet Services, Великобритания) ad libitum. Вода была доступна из бутылок ad libitum.

Мышей группировали в количестве 12. Животных обрабатывали перорально через желудочный зонд (<20 мл/кг) один раз в день

тестируемыми соединениями или носителем в соответствии с таблицей 2. Первое введение было за 2 дня до обработки декстрансульфатом натрия (DSS) и продолжалось до дня, предшествующего прекращению исследования (всего 7 дней обработки).

Таблица 2. Схема исследования

Группа	Обработка	DSS (+/-)	Ежедневная доза (перорально через желудочный зонд)	
			[мг]	[ммоль]
1	Носитель	–	–	–
2	Носитель	+	–	–
3	SEQ ID NO: 1 (высокая)	–	0,93	4,05E-05
4	SEQ ID NO: 1 (высокая)	+	0,93	4,05E-05
5	SEQ ID NO: 1 (средняя)	+	0,20	0,85E-05
6	SEQ ID NO: 1 (низкая)	+	0,04	0,17E-05
7	SEQ ID NO: 15 (высокая)	+	1,00	4,18E-05
8	SEQ ID NO: 15 (средняя)	+	0,21	0,86E-05
9	SEQ ID NO: 15 (низкая)	+	0,04	0,17E-05
10	SEQ ID NO: 5 (высокая)	+	1,07	7,47E-05
11	SEQ ID NO: 5 (средняя)	+	0,22	1,54E-05
12	SEQ ID NO: 5 (низкая)	+	0,04	0,31E-05

Индукция колита с помощью декстрансульфата натрия (DSS)

Чтобы индуцировать колит, в питьевую воду добавляли декстрансульфат натрия (DSS) (3% вес/об.). Через 5 дней после

введения DSS животных отбирали и проводили анализ конечных точек, как подробно описано ниже. DSS добавляли в питьевую воду сразу после введения тестируемых соединений в день 0.

Экспериментальные параметры и анализы

Тщательные клинические исследования проводились ежедневно и включали наблюдения изменений кожи, меха, глаз, слизистых оболочек, появления секрета и выделений (например, диареи) и вегетативной активности (например, слезотечение, слюноотделение, пилоэрекция, размер зрачка, необычный характер дыхания). Также отмечались изменения в походке, позе и реакции на манипуляции, а также наличие странного поведения, тремора, конвульсий, сонливости и комы. Массу тела каждого животного дополнительно регистрировали ежедневно.

Отбор проб фекалий всех мышей проводили в день -3 (перед первой обработкой тестируемыми соединениями) и в день 0 (непосредственно перед добавлением DSS в питьевую воду). Образцы собирали свежими при естественной дефекации от отдельных мышей. Их собирали в стерильные/не содержащие ДНКазы пробирки Эппендорфа и хранили при -80°C.

Через 5 дней после добавления DSS в питьевую воду животных безболезненно умерщвляли и проводили процедуры конечной точки, описанные ниже.

Толстую кишку извлекали, промывали и вскрывали. Оценку воспаления толстой кишки проводили макроскопически с применением светового микроскопа, и ее проводили 2 наблюдателя в "слепом" режиме на основе способа оценки по Уоллесу. Критериями для балльной оценки повреждения толстой кишки были:

- 0 – без повреждений.
- 1 – гиперемия. Без язв.
- 2 – гиперемия и утолщение стенки кишечника. Без язв.
- 3 – одна язва без утолщения стенки кишечника.
- 4 – два или более участка изъязвления или воспаления.
- 5 – два или более крупных участка изъязвления и воспаления или один участок изъязвления/воспаления, простирающийся > 1 см по длине толстой кишки.
- 6-10 – если повреждение охватывает > 2 см по длине толстой кишки, балл увеличивается на 1 для каждого дополнительного сантиметра.

Содержимое слепой кишки и толстой кишки удаляли во время отбора, быстро замораживали в отдельных пробирках и хранили при

-80°C до отправки.

Проксимальную половину толстой кишки удаляли после оценки по Уоллесу и взвешивали. Каждый образец помещали в пробирку Эппендорфа и быстро замораживали перед хранением при -80°C до использования для анализа цитокинов.

Срез проксимального отдела толстой кишки помещали в лизирующую пробирку, содержащую лизирующий раствор (ингибитор протеазы и реагент для экстракции белка ткани при соотношении 1 г ткани толстой кишки к 5 мл лизирующего раствора). Ткань гомогенизировали 3 раза при 6800 об./мин. в течение 30 с. Затем гомогенизированные образцы центрифугировали (1000 об./мин. в течение 5 мин. при 4°C) для экстрагирования белка и полученную надосадочную жидкость разделяли на аликвоты для анализа цитокинов.

В надосадочной жидкости из гомогенизированных срезов толстой кишки оценивали уровни цитокинов с применением мультиплексного анализа (Merck Millipore) для ряда Th1- и Th17-специфических цитокинов (IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17a, IL-25) с использованием системы Magpix (Luminex).

Результаты:

Обработка DSS (3% вес/об.) в питьевой воде в течение 5 дней вызывала воспалительный эффект в толстой кишке мышей по сравнению с контрольными животными, получавшими нормальную питьевую воду, о чем свидетельствует увеличение среднего балла по Уоллесу (фигура 1A).

Обработка с помощью SEQ ID NO: 1 дозозависимым образом обеспечивала подавление вызванного DSS воспалительного эффекта. Подобное влияние на балл по Уоллесу наблюдалось после обработки с помощью SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 15 также обеспечивал подавление вызванного DSS воспаления, хотя и не так эффективно, как SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5 (фигура 1A).

Длина толстой кишки является показателем тяжести поражения, так как колит увеличивает отек и укорачивает общую длину толстой кишки. В текущем исследовании длина толстой кишки во всех группах была сопоставимой, подтверждая, таким образом, что имело место только легкое воспаление, которое было индуцировано DSS (фигура 1B).

Вследствие воспаления масса толстой кишки у животных, подвергшихся воздействию DSS (3% вес/об.) и обработанных буфером-носителем, была увеличена по сравнению с контрольными

животными, получавшими нормальную питьевую воду. Обработка с помощью SEQ ID NO: 1 у животных, подвергшихся воздействию DSS, однако, вызвала дозозависимое уменьшение повышенной сырой массы толстой кишки, которая наблюдалась в контрольной группе заболевания. Дозозависимая тенденция к уменьшению массы толстой кишки также наблюдалась после обработки с помощью SEQ ID NO: 5, однако она не была такой выраженной, как для SEQ ID NO: 1, что указывает на лучшую эффективность SEQ ID NO: 1 по сравнению с SEQ ID NO: 5. Обработка с помощью SEQ ID NO: 15 не влияла на вызванное DSS увеличение сырой массы толстой кишки (фигура 1C).

Массу тела мышей контролировали с дня -3, когда начинали профилактическую обработку контрольными растворами или SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 5. Набор массы тела (дни -3-0) был сопоставим между группами (фигуры 2 и 3), масса тела продолжала увеличиваться во всех группах в течение этого периода, как и ожидалось для мышей этого возраста. Начиная с 0-го дня, когда было начато введение DSS, имело место очевидное умеренное уменьшение массы тела во всех группах животных, получавших DSS в питьевой воде, приблизительно на 2 или 3 г массы тела к 4-му дню (фигуры 2 и 3). Дозозависимое подавление потери массы тела, связанной с колитом, можно наблюдать после обработки любым из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 5 (фигура 3), при этом SEQ ID NO: 1 наиболее эффективен из них при испытаниях с наивысшей дозой (фигура 5).

Фактор некроза опухоли- α (TNF- α) представляет собой многофункциональный провоспалительный цитокин, секретируемый различными клетками, включая моноциты/макрофаги, нейтрофилы и Т-лимфоциты.

Как и ожидалось, контрольная группа заболевания экспрессирует высокий уровень провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17a и IL-25) в толстой кишке по сравнению со здоровыми контрольными животными. Кроме того, имеет место индукция провоспалительного цитокина IL-12, а также регуляторного цитокина IL-10, хотя и в меньшей степени, после введения DSS (фигура 4).

Обработка с помощью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 5 обеспечивает снижение индуцированных DSS уровней цитокинов дозозависимым образом. SEQ ID NO: 15 оказывал только небольшое влияние в отношении уровней цитокинов в толстой кишке по сравнению с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5. Неожиданно SEQ ID NO: 1

был в целом наиболее эффективным в снижении уровней цитокинов. В частности, для ключевых факторов воспаления TNF- α , IL-1b и IL-6 (фигура 4).

Превосходство SEQ ID NO: 1 над SEQ ID NO: 5 еще более отчетливо видно, когда принимается во внимание различный размер белков, так, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 5 характеризуются размером молекул 23,0, 24,0 и 14,3 кДа соответственно. На фигуре показаны 5 уровни цитокинов в толстой кишке в зависимости от моля тестируемых соединений/мышь/день. Хорошо видно, что SEQ ID NO: 1 в целом снижает уровни цитокинов более эффективно, чем SEQ ID NO: 5.

В текущем исследовании мышам вводили дозу при одинаковой концентрации (мг/мышь/день) каждого из тестируемых соединений, однако из-за разного размера молекул это означает, что была введена доза на приблизительно 40% меньше молекул с использованием SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 15 по сравнению с SEQ ID NO: 5, удивительно, что несмотря на это, иммуномодулирующее действие SEQ ID NO: 1 было лучше, чем у SEQ ID NO: 5.

В итоге, DSS (3% вес/об.), добавленный в питьевую воду в течение 5 дней, вызывал воспалительный эффект в толстой кишке, как и ожидалось. Это подтверждалось как с учетом балльной оценки по Уоллесу в качестве показателя воспаления, так и увеличением массы толстой кишки. Оцененные цитокины Th1 и Th17 также подтверждали воспалительный эффект, индуцируемый DSS.

Обработка (с дня -3 до 5-го дня) с помощью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 5 вызывала стойкий подавляющий эффект в уменьшении индуцированного DSS воспалительного эффекта в толстой кишке. Это наблюдалось по уменьшению как уровней провоспалительных цитокинов, так и общего наблюдаемого воспаления (как показано с помощью балльной оценки по Уоллесу). SEQ ID NO: 1 было наиболее эффективным соединением для уменьшения воспаления и улучшения здоровья животных, что указывает на то, что обработка с помощью SEQ ID NO: 1 обладает потенциальным защитным эффектом при предупреждении колита у человека.

Пример 7 Испытание in vivo на мышах – эффективность микробного модулирования в кишечнике в отношении алиментарного ожирения и толерантности к глюкозе

Животные и их содержание

36 самцов мышей C57BL/6J (Jackson Lab, Бар Харбор, Мэн,

США) в возрасте 6 недель по прибытии случайным образом распределяли по экспериментальным группам на основе их массы тела на момент включения в исследование, обеспечивая одинаковое стандартное отклонение и среднюю массу тела для всех групп. Мышей содержали по 3 на клетку с 12 мышами/4 клетками на группу и акклиматизировали на эталонной диете с низким содержанием жира (LFD) в течение 12 дней до начала эксперимента.

Кормление и обработка

Мышей кормили гранулированным неокрашенным кормом *ad libitum* с заменой трижды в неделю с измерением потребления корма. Мышей кормили с применением рациона с высоким содержанием жира и сахарозы (HFD, D12451, Research Diet) или эталонной диеты с низким содержанием жира (LFD, D12450N, Research Diet). Корм хранили при 4°C до применения (в соответствии с инструкциями производителя).

Стерильная вода была доступна из бутылок *ad libitum* и менялась еженедельно.

Экспериментальные параметры и анализы

Тестируемые соединения или носитель (PBS pH 7,4, см.: 10010-023, Gibco) вводили ежедневно перорально через желудочный зонд (игла 25G) по 100 мкл в 10 часов утра. SEQ ID NO: 1 ~5 мг/мл хранили при -20 градусах до применения.

Состав тела отдельных мышей оценивали по среднему из трех измерений магнитно-резонансного (MR) сканирования (Minispec LF90, Bruker, калиброванных ежедневно при применении) на 0-й, 4-й, 8-й и 12-й неделе экспериментального протокола. Свежие фекалии собирали одновременно с MR-сканированием в начале светового цикла (8 утра $\pm$ 1 час) до ежедневного введения зонда. Образцы немедленно замораживали на сухом льду и хранили при -80°C до дальнейшей обработки.

Пероральный тест толерантности к глюкозе, а также стимулированную глюкозой секрецию инсулина и проницаемость кишечника оценивали на 10-й неделе экспериментального протокола. Мышей подвергали голоданию до 8 часов утра в течение 5 ч., и им вводили желудочный зонд в 10 часов утра. Измерение уровня глюкозы в крови после 5-ч. голодания (OneTouch Vario Flex, LifeScan) и отбор крови из хвостовой вены выполняли перед пероральным введением через желудочный зонд 4 мкл/г массы нежировых тканей 50% раствора декстрозы и 150 мкл раствора сульфоновой кислоты. Раствор сульфоновой кислоты состоял из 1,5

мг флуоресцеин-5(6)-сульфоновой кислоты (Invitrogen), растворенной в 150 мкл суспензии 0,5% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (СМС) (средней вязкости, Sigma) в дистиллированной воде. Глюкозу крови измеряли в пункции из хвостовой вены в моменты времени 0, 15, 30, 60, 90 и 120 мин. после введения декстрозы, а образцы крови для определения инсулина и проницаемости кишечника отбирали в обработанные EDTA капиллярные пробирки (Microvette CB300, Sarstedt) в моменты времени 0, 15, 30, 60 и 120 мин. после введения. Мыши получали 0,5 мл физиологического раствора (0,9% хлорида натрия, Hospira) после процедуры, что позволяло мышам регидратироваться. Образцы крови центрифугировали в течение 10 мин. при 1000 rcf при комнатной температуре. Для измерений инсулина первые 5 мкл плазмы крови переносили в 96-луночные планшеты для ПЦР на сухом льду и хранили при -80°C до последующей обработки. Следующие 5 мкл плазмы крови, используемые для теста на проницаемость кишечника, переносили в черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном (Nunc) и хранили на влажном льду до добавления 150 мкл 0,5% СМС в дистиллированной воде и тщательно перемешивали. Планшет считывали на микропланшет-ридере Synergy HT (BioTek) при длине волны возбуждения/испускания 485/528 нм. Уровни инсулина измеряли с помощью сверхчувствительного ELISA для мышиногo инсулина (см.: 80-INDMSU-E10, лот: 06489, Alpco), следуя протоколу производителя, и определяли количественно на многоканальном ридере EnSpire 2300 (PerkinElmer).

Вскрытие проводили на 12-й неделе экспериментального протокола. Мышей подвергали голоданию с 7:15 утра $\pm$ 15 мин., и им вводили желудочный зонд в 10 часов утра. Эвтаназию проводили в чередующемся порядке. Мышей анестезировали изофлураном (3% в 65% N₂, 35% O₂, Fresenius Kabi). Первой и последней мыши из 3 в каждой клетке внутривенно вводили инсулин в дозе 2 мкл/г массы тела (Humulin 100 мЕд/мл, разведенный до 1,9 мЕд/мкл, Lilly) за 5 мин. до эвтаназии. Одной из трех (второй мыши) вводили 2 мкл/г массы тела солевого раствора (0,9% хлорида натрия, Hospira). Пункцию сердца проводили с использованием иглы 25G и шприца объемом 1 мл, покрытого EDTA. Кровь переносили в пробирки Эппендорфа, содержащие 1 мкл ингибитора DPP IV (Millipore) и 1 мкл смеси ингибиторов протеазы (P8340, Sigma). Образцы центрифугировали при 1000 rcf в течение 10 мин. и плазму крови разделяли на аликвоты в трех повторностях, помещали на сухой лед

и переносили на хранение при -80°C до дальнейшей обработки.

Сбор тканей. Массу печени, поджелудочной железы, eWAT, iWAT, rpWAT, iBAT, сердца, четырехглавой мышцы, икроножной мышцы, головного мозга и толстой кишки измеряли, а ткани немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Ткани препарировал один и тот же сотрудник и брал их в одинаковом порядке для всех мышей. Головной мозг замораживали в жидком азоте через < 60 сек. после смерти. Длину тонкой кишки (от желудка до слепой кишки) и толстой кишки (от слепой кишки до прямой кишки) измеряли и хранили их на пластине из оргстекла, охлажденной лежащим под ней влажным льдом, в течение всего времени обработки. Двенадцатиперстной кишкой считали первые 5 см тонкой кишки, а оставшуюся ткань тонкой кишки разделяли на 3 части равной длины. Первые 3 см отбрасывали, а оставшиеся проксимальные $2/3$ тонкой кишки классифицировали как тощую кишку. Первые 3 см дистальной $1/3$ тонкой кишки отбрасывали, а оставшуюся ткань классифицировали как подвздошную кишку. Наиболее проксимальный см двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки и толстой кишки сохраняли для гистологии в растворе Карнуа (для сохранения целостности слизистого слоя), состоящем из 60% метанола, 30% хлороформа и 10% ледяной уксусной кислоты, до опорожнения кишечных тканей. Содержимое тонкой кишки, слепой кишки и толстой кишки выделяли механическим давлением, замораживали на сухом льду и затем хранили при -80°C . Ткани из двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки, толстой кишки и слепой кишки быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Метаболические ткани для гистологии из печени, eWAT, iWAT и iBAT фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 72 часов с последующей консервацией в 70% этаноле. Ткань печени дополнительно консервировали в соединении Tissue-Tek O.C.T (Sakura Finetek), чтобы обеспечить гистологическое окрашивание липидов масляным красным O.

Результаты

Кормление HFD индуцировало тяжелое алиментарное ожирение со 2-й недели и в течение всего эксперимента. Обработка с помощью SEQ ID NO: 1 не обеспечивала защиту от увеличения массы тела (фигура 1A). Однако при анализе состава тела с помощью магнитно-резонансного сканирования у обработанных с помощью SEQ ID NO: 1 мышей обнаружили уменьшение массы жира на 12-й неделе, но не на какой-либо из предшествующих недель (фигура 1B), что позволяет

предположить, что обработка с помощью SEQ ID NO: 1 может обеспечивать улучшение в отношении накопления жира у мышей с вызванным рационом ожирением (фигура 1C) без влияния на рост массы тела (фигура 1A).

Нарушение регуляции глюкозы тесно связано с рядом заболеваний, обусловленных образом жизни. Поэтому авторы протестировали, будет ли обработка с помощью SEQ ID NO: 1 обеспечивать облегчение в отношении индуцированных HFD нарушений глюкорегуляции независимо от алиментарного ожирения. Повышенный уровень инсулина натощак (гиперинсулинемия) и уровень глюкозы крови натощак (гипергликемия) являются биологическими маркерами инсулинорезистентности, и оба параметра улучшались у обработанных с помощью SEQ ID NO: 1 мышей по сравнению с контрольными мышами, которых кормили HFD (фигуры 2A–B). Усиление регуляции глюкозы подтверждали при помощи теста толерантности к глюкозе, в котором у обработанных с помощью SEQ ID NO: 1 мышей введенная глюкоза выводилась более эффективно, чем у контрольных мышей, которых кормили HFD (фигура 2C). Улучшение в отношении толерантности к глюкозе не объяснялось повышенной способностью бета-клеток к секреции инсулина (фигура 2D), что свидетельствует о улучшении в отношении чувствительности к инсулину в метаболических тканях обработанных с помощью SEQ ID NO: 1 мышей. В совокупности эти данные указывают на то, что SEQ ID NO: 1 обеспечивает защиту от связанной с ожирением инсулинорезистентности – общего знаменателя сахарного диабета 2 типа и сердечно-сосудистых заболеваний.

Индуцированное HFD метаболическое воспаление чаще всего вызвано снижением барьерной функции кишечника (проницаемый кишечник), допускающим повышение уровней циркулирующего в кровотоке компонента бактериальной клеточной стенки, липополисахарида (LPS). Для тестирования барьерной функции кишечника авторы исследования вводили мышам перорально 150 мкл раствора 0,5% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (CMC) и 1% флуоресцеин-5(6)-сульфоновой кислоты и измеряли флуоресценцию в образцах плазмы крови, взятых из хвостовой вены через 0, 15, 30, 60 и 120 минут после введения. Обработанные с помощью SEQ ID NO: 1 мыши демонстрировали повышенную барьерную функцию, что указывает на то, что SEQ ID NO: 1 обеспечивает облегчение индуцированного HFD метаболического воспаления.

Пример 8. Способ определения лизоцимной активности в

отношении *Lactobacillus johnsonii* (A).

Экстракция PGN

Культивирование *Lactobacillus johnsonii*

Материалы

Бульон MRS, номер продукта BD 288130, pH 6,3-6,7.

Чашки с агаром MRS, BD 288130; агар Oxoid LP0011; pH 6,3-6,7.

0,9% NaCl, Merck 106404, Cas № 7647145

Сосуды, поставщик Merck 116387, анаэроостат Anaerocult объемом 2,5 л

Anaerogen 2,5 л, ThermoScientific, № по каталогу AN0025A

Lactobacillus johnsonii, DSM10533

Процедура

L. johnsonii высевали штрихом из замороженного материала на чашку с агаром MRS и инкубировали в анаэробных условиях в течение 2 дней в анаэроостате с Anaerogen 2,5 л, 30°C. Некоторые колонии инокулировали в 500 мл бульона MRS во флакон с синей крышкой объемом 500 мл и помещали в анаэроостат с Anaerogen 2,5 л на 72 часа при 30°C.

Культуру центрифугировали (6000 об./мин., 10 минут) и надосадочную жидкость сливали перед проведением еще одного цикла центрифугирования. Осадок промывали в 100 мл 0,9% NaCl и суспензию тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 об./мин. в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливали и процедуру промывания в 0,9% NaCl повторяли до трех промывок. Примерно 40 мл 0,9% NaCl добавляли к осадку и раствор переносили в пробирку Falcon объемом 50 мл. Раствор центрифугировали при 6000 об./мин. в течение 10 минут и надосадочную жидкость сливали. Осадок хранили при -18°C до проведения экстракции пептидогликана.

Процедура экстракции

Материалы

Протеаза из *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich P5147, CAS 9036-06-0

PBS pH 7,3:

- NaCl: 8 г, Sigma-Aldrich 31434, CAS 7647-14-5
- KCl: 0,2 г, Sigma-Aldrich P9333, CAS 7447-40-7
- KH₂PO₄: 0,24 г, Sigma-Aldrich P5655, CAS 7778-77-0
- Na₂HPO₄ · 2 H₂O: 1,44 г, Sigma-Aldrich 30412, CAS 10028-

- Добавление воды Milli-Q до 1000 мл

1% раствор Triton-X 100:

- 1 мл Triton X100, Sigma-Aldrich X100, CAS 9002-93-1

- Добавление воды Milli-Q до 100 мл

500 мМ буфер карбоната натрия, pH 9,3:

• 500 мМ карбоната натрия получают из 21 г Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich S7795, CAS 497-19-8) в 500 мл воды MQ, 500 мМ бикарбоната натрия получают из 72 г NaHCO_3 (Sigma-Aldrich S6014, CAS 144-55-8) в 500 мл воды MW

• Буфер с pH 9,3 получают из 320 мл NaHCO_3 и 80 мл Na_2CO_3 и доводят pH с помощью HCl

Раствор фенола с 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ EDTA, Sigma-Aldrich P4557, CAS 108-95-2

Ацетон, Sigma-Aldrich 32201-M, CAS 67-64-1

Этанол, 96%, CCS Healthcare 1680643, CAS 64-17-5

Процедура

Клеточный материал *L. johnsonii* был лиофилизирован. Лيوфилизированный материал (525 мг) суспендировали в PBS (40 мл) в пробирке Falcon объемом 50 мл. Суспензию встряхивали в течение 2 ч. при 700 об./мин. в термостатном встряхивателе при комнатной температуре. Затем добавляли протеазу *Streptomyces griseus* (55 мг) и суспензию инкубировали 6 ч. при 37°C в термостатном встряхивателе. Затем ее центрифугировали 20 мин. при 1900 g при комнатной температуре и надосадочную жидкость декантировали. Осадок повторно суспендировали в 1% Triton X-100 (40 мл) и встряхивали в течение ночи при 37°C. После еще одного центрифугирования и декантации осадок повторно суспендировали в PBS (40 мл) и снова добавляли протеазу (55 мг). Суспензию снова инкубировали 6 ч. при 37°C, центрифугировали и декантировали. Осадок повторно суспендировали в PBS (40 мл) и встряхивали в течение ночи при 37°C. Эту процедуру промывки повторяли еще раз с PBS (40 мл, встряхивание 30 мин.), затем с 50% этанолом/водой (40 мл, встряхивание 30 мин.). Затем осадок разделяли на две пробирки Falcon. В каждую пробирку добавляли раствор фенола (15 мл), предварительно нагретый до 40°C. Суспензии встряхивали 10 мин. при 40°C, а затем добавляли 96% этанол (25 мл в каждую пробирку), центрифугировали и декантировали. Осадок дополнительно промывали ацетоном (40 мл в каждую пробирку) и 96% этанолом (40 мл в каждую пробирку) перед лиофилизацией. Объединение осадка из двух пробирок давало 80 мг очищенного

пептидогликана в виде белого порошка.

Анализ восстанавливающих концов

Лизоцим разводили в фосфатном буфере для разведения (5 мМ цитрата, 5 мМ K_2HPO_4 , 0,01% TritonX-100, pH 5,0) до 50 мкг/мл в полипропиленовых пробирках, в зависимости от концентрации доступных исходных растворов. Разведенный лизоцим дополнительно разбавляли в 96-луночном полипропиленовом микротитровальном планшете путем приготовления серии двукратных разведений до концентрации 6,3 мкг/мл в фосфатном буфере для разведения (5 мМ цитрата, 5 мМ K_2HPO_4 , 0,01% TritonX-100, pH 5,0). Получали 50 мкг/мл исходного раствора субстрата *L. johnsonii* в MilliQ и разводили в фосфатном буфере (50 мМ цитрата, 50 мМ K_2HPO_4 , pH 5,0) до 250 мкг/мл. В полипропиленовом планшете с глубокими лунками 50 мкл разведения лизоцима смешивали с 450 мкл раствора *L. johnsonii* и инкубировали при 40°C при встряхивании (500 об./мин.) в течение 45 мин. После инкубации планшет с глубокими лунками центрифугировали (3200 об./мин., 7 мин.) для осаждения нерастворимого материала и 100 мкл надосадочной жидкости смешивали с 50 мкл 3,2 М HCl в 96-луночном планшете для ПЦР и инкубировали при 95°C в течение 80 мин. 50 мкл 3,5 М NaOH добавляли в каждую лунку планшета для ПЦР и 150 мкл каждого образца переносили в новый планшет для ПЦР, содержащий 75 мкл/лунка раствора 4-гидроксibenзгидразида (РАНВАН) в буфере K-Na тартрат/NaOH (50 г/л тартрата K-Na+20 г/л NaOH). Планшет инкубировали при 95°C в течение 10 мин., после чего 100 мкл/образец переносили в прозрачный плоскодонный микротитровальный планшет для измерения оптической плотности (OD) при 405 нм. Измерения OD проводили в отношении трехкратно разбавленных образцов (50 мкл образца, разведенного в 100 мкл воды Milli-Q). Значения измерения OD представляют разницу после вычитания исходного (фоновое) значения и представляют собой среднее из двух значений измерения OD.

Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Средние измерения OD405 (с коррекцией на фон) в анализе восстанавливающих концов

Лизоцим	Концентрация лизоцима в мкг/мл					
	20	10	5	2,5	1,25	0,63
SEQ ID NO: 18	1,10	0,98	0,86	0,53	0,40	0,20
SEQ ID NO: 24	1,20	0,84	0,70	0,53	0,34	0,22

SEQ ID NO: 30	1,23	1,05	0,84	0,75	0,59	0,27
SEQ ID NO: 21	ND	ND	1,14	0,96	0,69	0,56
SEQ ID NO: 27	ND	ND	1,62	0,98	0,57	0,39
SEQ ID NO: 1	1,21	1,09	0,90	0,72	0,49	0,32
SEQ ID NO: 5	-0,02	-0,02	0,00	-0,01	0,00	-0,02

ND: не определено по причине низкой концентрации исходного раствора фермента

Результаты показали, что лизоцимы под SEQ ID NO: 1, 18, 21, 24, 27 и 30 обладают превосходной лизоцимной активностью в отношении пептидогликанов, находящихся в клеточной стенке *Lactobacillus johnsonii*, в то время как никакой активности лизоцима под SEQ ID NO: 5 не продемонстрировано в отношении этого пептидогликана.

Пример 9. Способ определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii* (B).

Экстракция PGN

Культивирование *Lactobacillus johnsonii*

Материалы

Бульон MRS, номер продукта BD 288130, pH 6,3–6,7.

Чашки с агаром MRS, BD 288130; агар Oxoid LP0011; pH 6,3–6,7.

0,9% NaCl, Merck 106404, Cas № 7647145

сосуды, поставщик Merck 116387, анаэроостат Anaerocult объемом 2,5 л

Anaerogen 2,5 л, ThermoScientific, № по каталогу AN0025A

Lactobacillus johnsonii, DSM10533

Процедура

L. johnsonii высевали из замороженного материала на чашку с агаром MRS и инкубировали в анаэробных условиях в течение 2 дней в анаэроостате с Anaerogen 2,5 л, 30°C. Некоторые колонии инокулировали в 500 мл бульона MRS во флакон с синей крышкой объемом 500 мл и помещали в анаэроостат с Anaerogen 2,5 л на 72 часа при 30°C.

Культуру центрифугировали (6000 об./мин., 10 минут) и надосадочную жидкость сливали перед проведением еще одного цикла центрифугирования. Осадок промывали в 100 мл 0,9% NaCl и суспензию тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 об./мин. в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливали и процедуру промывания в 0,9% NaCl повторяли до трех промывок.

Примерно 40 мл 0,9% NaCl добавляли к осадку и раствор переносили в пробирку Falcon объемом 50 мл. Раствор центрифугировали при 6000 об./мин. в течение 10 минут и надосадочную жидкость сливали. Осадок хранили при -18°C до проведения экстракции пептидогликана.

Процедура экстракции

Материалы

Протеаза из *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich P5147, CAS 9036-06-0

PBS pH 7,3:

- NaCl: 8 г, Sigma-Aldrich 31434, CAS 7647-14-5
- KCl: 0,2 г, Sigma-Aldrich P9333, CAS 7447-40-7
- KH_2PO_4 : 0,24 г, Sigma-Aldrich P5655, CAS 7778-77-0
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 1,44 г, Sigma-Aldrich 30412, CAS 10028-24-

7

- Добавление воды Milli-Q до 1000 мл

1% раствор Triton-X 100:

- 1 мл Triton X100, Sigma-Aldrich X100, CAS 9002-93-1
- Добавление воды Milli-Q до 100 мл

500 mM буфер карбоната натрия, pH 9,3:

- 500 mM карбоната натрия получают из 21 г Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich S7795, CAS 497-19-8) в 500 мл воды MQ
- 500 mM бикарбоната натрия получают из 72 г NaHCO_3 (Sigma-Aldrich S6014, CAS 144-55-8) в 500 мл воды MW
- Буфер с pH 9,3 получают из 320 мл NaHCO_3 и 80 мл Na_2CO_3 и доводят pH с помощью HCl

Раствор фенола с 10 mM трис-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich P4557, CAS 108-95-2

Ацетон, Sigma-Aldrich 32201-M, CAS 67-64-1

Этанол, 96%, CCS Healthcare 1680643, CAS 64-17-5

Процедура

Клеточный материал *L. johnsonii* был лиофилизирован. Лيوфилизированный материал (525 мг) суспендировали в PBS (40 мл) в пробирке Falcon объемом 50 мл. Суспензию встряхивали в течение 2 ч. при 700 об./мин. в термостатном встряхивателе при комнатной температуре. Затем добавляли протеазу *Streptomyces griseus* (55 мг) и суспензию инкубировали 6 ч. при 37°C в термостатном встряхивателе. Затем ее центрифугировали 20 мин. при 1900 g при комнатной температуре и надосадочную жидкость декантировали. Осадок повторно суспендировали в 1% Triton X-100 (40 мл) и

встряхивали в течение ночи при 37°C. После еще одного центрифугирования и декантации осадок повторно суспендировали в PBS (40 мл) и снова добавляли протеазу (55 мг). Суспензию снова инкубировали 6 ч. при 37°C, центрифугировали и декантировали. Осадок повторно суспендировали в PBS (40 мл) и встряхивали в течение ночи при 37°C. Эту процедуру промывки повторяли еще раз с PBS (40 мл, встряхивание 30 мин.), затем с 50% этанолом/водой (40 мл, встряхивание 30 мин.). Затем осадок разделяли на две пробирки Falcon. В каждую пробирку добавляли раствор фенола (15 мл), предварительно нагретый до 40°C. Суспензии встряхивали 10 мин. при 40°C, а затем добавляли 96% этанол (25 мл в каждую пробирку), центрифугировали и декантировали. Осадок дополнительно промывали ацетоном (40 мл в каждую пробирку) и 96% этанолом (40 мл в каждую пробирку) перед лиофилизацией. Объединение осадка из двух пробирок давало 80 мг очищенного пептидогликана в виде белого порошка.

Анализ восстанавливающих концов

Лизоцим разводили в фосфатном буфере для разведения (5 мМ цитрата, 5 мМ K_2HPO_4 , 0,01% TritonX-100, pH 5,0) до 200 мкг/мл в полипропиленовых пробирках. Разведенный лизоцим дополнительно разбавляли в 96-луночном полипропиленовом микротитровальном планшете путем приготовления серии двукратных разведений до концентрации 6,3 мкг/мл в фосфатном буфере для разведения (5 мМ цитрата, 5 мМ K_2HPO_4 , 0,01% TritonX-100, pH 5,0). Получали 50 мкг/мл исходного раствора субстрата *L. johnsonii* в MillQ и разводили в фосфатном буфере (50 мМ цитрата, 50 мМ K_2HPO_4 , pH 5,0) до 250 мкг/мл. В полипропиленовом планшете с глубокими лунками 50 мкл разведения лизоцима смешивали с 450 мкл раствора *L. johnsonii* и инкубировали при 40°C при встряхивании (500 об./мин.) в течение 45 мин. После инкубации планшет с глубокими лунками центрифугировали (3200 об./мин., 7 мин.) для осаждения нерастворимого материала и 100 мкл надосадочной жидкости смешивали с 50 мкл 3,2 М HCl в 96-луночном планшете для ПЦР и инкубировали при 95°C в течение 80 мин. 50 мкл 3,5 М NaOH добавляли в каждую лунку планшета для ПЦР и 150 мкл каждого образца переносили в новый планшет для ПЦР, содержащий 75 мкл/лунка раствора 4-гидроксibenзгидразида (РАНВАН) в буфере K-Na тартрат/NaOH (50 г/л тартрата K-Na+20 г/л NaOH). Планшет инкубировали при 95°C в течение 10 мин., после чего 100 мкл/образец переносили в прозрачный плоскодонный

микротитровальный планшет для измерения оптической плотности (OD) при 405 нм. Измерения OD проводили в отношении трехкратно разбавленных образцов (50 мкл образца, разведенного в 100 мкл воды Milli-Q). Значения измерения OD представляют разницу после вычитания исходного (фоновое) значения и представляют собой среднее из двух значений измерения OD.

Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4. Средние измерения OD405 (с коррекцией на фон) в анализе восстанавливающих концов

Лизоцим	Концентрация лизоцима в мкг/мл					
	20	10	5	2,5	1,25	0,63
SEQ ID NO: 1	1,26	1,18	0,97	0,63	0,40	0,37
SEQ ID NO: 15	0,98	0,67	0,47	0,37	0,21	0,15
SEQ ID NO: 5	-0,01	-0,01	0,01	-0,00	0,01	-0,01

Результаты проиллюстрировали, что два лизоцима (SEQ ID NO: 1 и 15) обладают превосходной лизоцимной активностью в отношении пептидогликанов, находящихся в клеточной стенке *Lactobacillus johnsonii*, в то время как никакой активности лизоцима под SEQ ID NO: 5 не продемонстрировано в отношении этого пептидогликана.

Объем описанного и заявленного в данном документе изобретения не должен ограничиваться конкретными аспектами, раскрытыми в данном документе, поскольку эти аспекты предполагаются как иллюстрации некоторых аспектов настоящего изобретения. Предполагается, что любые эквивалентные аспекты находятся в пределах объема настоящего изобретения. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к продемонстрированным и описанным в данном документе станут очевидны специалистам в данной области из вышеприведенного описания. Предполагается, что такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения. В случае противоречия настоящее раскрытие, в том числе определения, будет иметь преобладающую силу.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Novozymes A/S

<120> КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА

<130> 14433-WO-РСТ

<160> 30

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 208

<212> БЕЛОК

<213> Acremonium alcalophilum

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(208)

<400> 1

Arg Ile Pro Gly Phe Asp Ile Ser Gly Trp Gln Pro Thr Thr Asp Phe
1 5 10 15

Ala Arg Ala Tyr Ala Asn Gly Asp Arg Phe Val Tyr Ile Lys Ala Thr
20 25 30

Glu Gly Thr Thr Phe Lys Ser Ser Ala Phe Ser Arg Gln Tyr Thr Gly
35 40 45

Ala Thr Gln Asn Gly Phe Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala Gln Pro
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Gln Ala Arg Tyr Phe Ala Ser Asn Gly
65 70 75 80

Gly Gly Trp Ser Lys Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Ala Leu Asp Ile
85 90 95

Glu Tyr Asn Pro Asn Gly Ala Thr Cys Tyr Gly Leu Ser Gln Ser Ala
100 105 110

Met Val Asn Trp Ile Glu Asp Phe Val Thr Thr Tyr His Gly Ile Thr
115 120 125

Ser Arg Trp Pro Val Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp Thr Gln Cys
130 135 140

Thr Gly Asn Ser Asn Arg Phe Ala Asn Arg Cys Pro Leu Trp Ile Ala
145 150 155 160

Arg Tyr Ala Ser Ser Val Gly Thr Leu Pro Asn Gly Trp Gly Phe Tyr
165 170 175

Thr Phe Trp Gln Tyr Asn Asp Lys Tyr Pro Gln Gly Gly Asp Ser Asn
180 185 190

Trp Phe Asn Gly Asp Ala Ser Arg Leu Arg Ala Leu Ala Asn Gly Asp
195 200 205

<210> 2
<211> 946
<212> ДНК
<213> Trichophaea saccata

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(347)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(51)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (52)..(943)

<220>
<221> CDS
<222> (401)..(615)

<220>
<221> CDS
<222> (668)..(772)

<220>
<221> CDS
<222> (825)..(943)

<400> 2
atg cac gct ctc acc ctt ctc acc gca acc ctc ttc ggt ctc gca gcg 48
Met His Ala Leu Thr Leu Leu Thr Ala Thr Leu Phe Gly Leu Ala Ala
-15 -10 -5

gcc tac cca gtg aag acc gac ctt cac tgc cgc tcc tct ccc agc act 96
Ala Tyr Pro Val Lys Thr Asp Leu His Cys Arg Ser Ser Pro Ser Thr
-1 1 5 10 15

tcc gcc agc atc gtc cgc acc tac tcc agt gga acg gaa gtc cag atc 144
Ser Ala Ser Ile Val Arg Thr Tyr Ser Ser Gly Thr Glu Val Gln Ile
20 25 30

cag tgc cag acc acg ggc act tcg gtc caa gga tcc aat gtc tgg gac 192
Gln Cys Gln Thr Thr Gly Thr Ser Val Gln Gly Ser Asn Val Trp Asp
35 40 45

aag acc cag cac ggt tgc tac gtc gca gac tac tac gtc aag acc ggg 240
Lys Thr Gln His Gly Cys Tyr Val Ala Asp Tyr Tyr Val Lys Thr Gly
50 55 60

cat tct ggg att ttc acc acc aag tgc ggt agc agc tcg ggt gga ggt 288

His Ser Gly Ile Phe Thr Thr Lys Cys Gly Ser Ser Ser Gly Gly Gly	
65 70 75	
tcc tgc aag cct ccc ccg atc aat gct gct act gtc gca ttg atc aag	336
Ser Cys Lys Pro Pro Pro Ile Asn Ala Ala Thr Val Ala Leu Ile Lys	
80 85 90 95	
gag ttt gag gg gtaagtgaca gctctgagtg aggtggatatg aggattaaga	387
Glu Phe Glu Gly	
ctgacgagga tag a ttc gtt cct aag ccc gcc ccg gat cct att gga ttg	437
Phe Val Pro Lys Pro Ala Pro Asp Pro Ile Gly Leu	
100 105 110	
ccg acc gtg gga tac ggg cat ctt tgc aag act aag ggc tgc aaa gaa	485
Pro Thr Val Gly Tyr Gly His Leu Cys Lys Thr Lys Gly Cys Lys Glu	
115 120 125	
gtg cct tac agc ttc cct ctc acc cag gag act gcc acc aag ttg ctt	533
Val Pro Tyr Ser Phe Pro Leu Thr Gln Glu Thr Ala Thr Lys Leu Leu	
130 135 140	
cag agc gat atc aag act ttc acc tct tgc gtt agc aac tac gtc aag	581
Gln Ser Asp Ile Lys Thr Phe Thr Ser Cys Val Ser Asn Tyr Val Lys	
145 150 155	
gac tct gtt aag ctc aac gat aac cag tac gga g gtgagttcca	625
Asp Ser Val Lys Leu Asn Asp Asn Gln Tyr Gly	
160 165 170	
gtgtaacagt gaatttattg atgatattct aagtaatttt ag ct ctg gcg tct	678
Ala Leu Ala Ser	
tgg gct ttc aac gtc ggc tgc gga aac gtc cag act tct tcg ctg atc	726
Trp Ala Phe Asn Val Gly Cys Gly Asn Val Gln Thr Ser Ser Leu Ile	
175 180 185 190	
aag aga ttg aac gct ggg gag aac cct aac act gtc gct gct cag g	772
Lys Arg Leu Asn Ala Gly Glu Asn Pro Asn Thr Val Ala Ala Gln	
195 200 205	
gtaagatatt tatcccgat ttgctcttga cacatggctg aaaaagttgc ag aa ctc	829
Glu Leu	
ccc aag tgg aag tac gct ggt gga aag gtt atg cct ggc ttg gtc cgc	877
Pro Lys Trp Lys Tyr Ala Gly Gly Lys Val Met Pro Gly Leu Val Arg	
210 215 220	
cgc cgc aat gct gag gtc gcg ctc ttc aag aag ccc agc agc gtt cag	925
Arg Arg Asn Ala Glu Val Ala Leu Phe Lys Lys Pro Ser Ser Val Gln	
225 230 235	
gcc cac cct ccc aag tgc taa	946
Ala His Pro Pro Lys Cys	
240 245	
<210> 3	
<211> 262	
<212> БЕЛОК	
<213> Trichophaea saccata	

<400> 3

Met His Ala Leu Thr Leu Leu Thr Ala Thr Leu Phe Gly Leu Ala Ala
-15 -10 -5

Ala Tyr Pro Val Lys Thr Asp Leu His Cys Arg Ser Ser Pro Ser Thr
-1 1 5 10 15

Ser Ala Ser Ile Val Arg Thr Tyr Ser Ser Gly Thr Glu Val Gln Ile
20 25 30

Gln Cys Gln Thr Thr Gly Thr Ser Val Gln Gly Ser Asn Val Trp Asp
35 40 45

Lys Thr Gln His Gly Cys Tyr Val Ala Asp Tyr Tyr Val Lys Thr Gly
50 55 60

His Ser Gly Ile Phe Thr Thr Lys Cys Gly Ser Ser Ser Gly Gly Gly
65 70 75

Ser Cys Lys Pro Pro Pro Ile Asn Ala Ala Thr Val Ala Leu Ile Lys
80 85 90 95

Glu Phe Glu Gly Phe Val Pro Lys Pro Ala Pro Asp Pro Ile Gly Leu
100 105 110

Pro Thr Val Gly Tyr Gly His Leu Cys Lys Thr Lys Gly Cys Lys Glu
115 120 125

Val Pro Tyr Ser Phe Pro Leu Thr Gln Glu Thr Ala Thr Lys Leu Leu
130 135 140

Gln Ser Asp Ile Lys Thr Phe Thr Ser Cys Val Ser Asn Tyr Val Lys
145 150 155

Asp Ser Val Lys Leu Asn Asp Asn Gln Tyr Gly Ala Leu Ala Ser Trp
160 165 170 175

Ala Phe Asn Val Gly Cys Gly Asn Val Gln Thr Ser Ser Leu Ile Lys
180 185 190

Arg Leu Asn Ala Gly Glu Asn Pro Asn Thr Val Ala Ala Gln Glu Leu
195 200 205

Pro Lys Trp Lys Tyr Ala Gly Gly Lys Val Met Pro Gly Leu Val Arg
210 215 220

Arg Arg Asn Ala Glu Val Ala Leu Phe Lys Lys Pro Ser Ser Val Gln

225

230

235

Ala His Pro Pro Lys Cys
240 245

<210> 4

<211> 245

<212> BEJOK

<213> Trichophaea saccata

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(245)

<400> 4

Tyr Pro Val Lys Thr Asp Leu His Cys Arg Ser Ser Pro Ser Thr Ser
1 5 10 15

Ala Ser Ile Val Arg Thr Tyr Ser Ser Gly Thr Glu Val Gln Ile Gln
20 25 30

Cys Gln Thr Thr Gly Thr Ser Val Gln Gly Ser Asn Val Trp Asp Lys
35 40 45

Thr Gln His Gly Cys Tyr Val Ala Asp Tyr Tyr Val Lys Thr Gly His
50 55 60

Ser Gly Ile Phe Thr Thr Lys Cys Gly Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser
65 70 75 80

Cys Lys Pro Pro Pro Ile Asn Ala Ala Thr Val Ala Leu Ile Lys Glu
85 90 95

Phe Glu Gly Phe Val Pro Lys Pro Ala Pro Asp Pro Ile Gly Leu Pro
100 105 110

Thr Val Gly Tyr Gly His Leu Cys Lys Thr Lys Gly Cys Lys Glu Val
115 120 125

Pro Tyr Ser Phe Pro Leu Thr Gln Glu Thr Ala Thr Lys Leu Leu Gln
130 135 140

Ser Asp Ile Lys Thr Phe Thr Ser Cys Val Ser Asn Tyr Val Lys Asp
145 150 155 160

Ser Val Lys Leu Asn Asp Asn Gln Tyr Gly Ala Leu Ala Ser Trp Ala
165 170 175

Phe Asn Val Gly Cys Gly Asn Val Gln Thr Ser Ser Leu Ile Lys Arg

180

185

190

Leu Asn Ala Gly Glu Asn Pro Asn Thr Val Ala Ala Gln Glu Leu Pro
 195 200 205

Lys Trp Lys Tyr Ala Gly Gly Lys Val Met Pro Gly Leu Val Arg Arg
 210 215 220

Arg Asn Ala Glu Val Ala Leu Phe Lys Lys Pro Ser Ser Val Gln Ala
 225 230 235 240

His Pro Pro Lys Cys
 245

<210> 5

<211> 129

<212> BEJOK

<213> Gallus gallus

<400> 5

Lys Val Phe Gly Arg Cys Glu Leu Ala Ala Ala Met Lys Arg His Gly
 1 5 10 15

Leu Asp Asn Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu Gly Asn Trp Val Cys Ala Ala
 20 25 30

Lys Phe Glu Ser Asn Phe Asn Thr Gln Ala Thr Asn Arg Asn Thr Asp
 35 40 45

Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg Trp Trp Cys
 50 55 60

Asn Asp Gly Arg Thr Pro Gly Ser Arg Asn Leu Cys Asn Ile Pro Cys
 65 70 75 80

Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Thr Ala Ser Val Asn Cys Ala Lys
 85 90 95

Lys Ile Val Ser Asp Gly Asn Gly Met Asn Ala Trp Val Ala Trp Arg
 100 105 110

Asn Arg Cys Lys Gly Thr Asp Val Gln Ala Trp Ile Arg Gly Cys Arg
 115 120 125

Leu

<210> 6

<211> 39

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер F-80470

 <400> 6
 асасаастgg ggatccacca tgcacgctct cacccttct 39

 <210> 7
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер R-80470.

 <400> 7
 ctagatctcg agaagctttt agcacttggg aggggtggg 38

 <210> 8
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер 8643.

 <400> 8
 gcaagggatg ccatgcttgg 20

 <210> 9
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер 8654.

 <400> 9
 catataacca attgccctc 19

 <210> 10
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Прямой праймер 27F.

 <400> 10
 agagtttgat cctggctcag 20

 <210> 11
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>

<223> Обратный праймер 534R.

<400> 11

attaccgcgg ctgctgg

17

<210> 12

<211> 1462

<212> ДНК

<213> *Faecalibacterium prausnitzii*

<400> 12

gatcctggct caggcgaacg ctggcgggcg gcctaacaca tgcaagtcga acgagcgaga 60

gagagcttgc tttctcaagc gagtggcgaa cgggtgagta acgcgtgagg aacctgcctc 120

aaagaggggg acaacagttg gaaacgactg ctaataccgc ataagcccac gaccggcat 180

cgggtagagg gaaaaggagc aatccgcttt gagatggcct cgcgtccgat tagctagttg 240

gtgaggtaac ggcccaccaa ggcgacgac ggtagccgga ctgagagggt gaacggccac 300

attgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa 360

tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tggaggaaga aggtcttcgg attgtaaact 420

cctgttggtg aggaagataa tgacggtact caacaaggaa gtgacggcta actacgtgcc 480

agcagccgcg gtaaaacgta ggtcacaagc gttgtccgga attactgggt gtaaaggag 540

cgcaggcggg aaggcaagtt ggaagtgaat tccatgggct caacccatga actgctttca 600

aaactgtttt tcttgagtag tgcagaggta ggcggaattc ccggtgtagc ggtggaatgc 660

gtagatatcg ggaggaacac cagtggcgaa ggcggcctac tgggcaccaa ctgacgctga 720

ggctcgaaag tgtgggtagc aaacaggatt agataccctg gtagtcaca ctgtggccga 780

tgtttactag gtgttgagg attgaccctc tcagtgccgc agttaacaca ataagtaatc 840

cacctgggga gtacgaccgc aagggtgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag 900

cagtggagta tgtggtttta ttcgacgcaa cgcaagaac cttaccaagt cttgacatcc 960

tgcgacgcac atagaaatat gtgtttcctt cgggacgcag agacagggtg tgcatgggtg 1020

tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttatggt 1080

cagttactac gcaagaggac tctggccaga ctgccgttga caaaacggag gaagggtggg 1140

atgacgtcaa atcatcatgc ctttatgac ttgggctaca cacgtactac aatggcggtta 1200

aacaaagaga agcaagaccg cgagggtggag caaaactcag aaacaacgtc ccagttcgga 1260

ctgcaggctg caactcgcct gcacgaagtc ggaattgcta gtaatcgag atcagcatgc 1320

tgcggtgaat acgttcccg gccttgtaga caccgcccgt cacaccatga gagccggggg 1380

gaccgaagt cggtagtcta accgcaagga ggacgccgcc gaaggtaaaa ctggtgattg 1440

gggtgaagtc gtaacaaggt ac 1462

<210> 13

<211> 909
 <212> ДНК
 <213> Myceliophthora fergusii

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(144)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(54)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (55)..(906)

<220>
 <221> CDS
 <222> (376)..(906)

<400> 13
 atg aaa gct gct ctc ctc gct acc gtc tcc gcc ctc gcg gcc ggc gtg 48
 Met Lys Ala Ala Leu Leu Ala Thr Val Ser Ala Leu Ala Ala Gly Val
 -15 -10 -5

caa gcc gcc gtc caa ggc ttt gac att tcc cac tgg cag tcc agc gtg 96
 Gln Ala Ala Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Trp Gln Ser Ser Val
 -1 1 5 10

gac ttt aag gcg gcc tac aac tcg ggc gcc cgc ttc gtc atc atc aag 144
 Asp Phe Lys Ala Ala Tyr Asn Ser Gly Ala Arg Phe Val Ile Ile Lys
 15 20 25 30

gtaggtatta aggcctctct gtcgagcgag gcggcgtggt tcaaccatca ttggattctc 204

ctgccttaaa tttgctccct ctgtccaaag aggaggaaag aggaggggag aataacggaa 264

gatgcataat gggcaaaaaa aaaaagaaaa ccaagaaaaa aaaaacactg ggaactactg 324

atgaatagtc tcgtgagaga gccgacgtgc taaccccaac acctctatta g gcg acc 381
 Ala Thr

gag gcc acg tcg ttc atc gac ccc aag ttc tcg tcg cac tac acg ggc 429
 Glu Gly Thr Ser Phe Ile Asp Pro Lys Phe Ser Ser His Tyr Thr Gly
 35 40 45

gcg acc aac gcc ggc ttc atc cgg ggc gcg tac cac ttc gcg cac ccg 477
 Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala His Pro
 50 55 60

ggc cag tcg tcg ggc gag gcg cag gcc gac tac ttc ctc gcg cac ggc 525
 Gly Gln Ser Ser Gly Glu Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Ala His Gly
 65 70 75 80

ggc gcc tgg acg ccc gac ggc atc acg ctg ccc ggc atg ctg gac ctc 573
 Gly Gly Trp Thr Pro Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Leu
 85 90 95

gag gcc tac aac gcg ggc gag tgc tgg ggc ctg tcc cag agc gcc atg 621
 Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Glu Cys Trp Gly Leu Ser Gln Ser Ala Met
 100 105 110

gtc gcg tgg atc aag gcc ttc agc gac cgc tac cac gcc cgc acc ggc	669
Val Ala Trp Ile Lys Ala Phe Ser Asp Arg Tyr His Ala Arg Thr Gly	
115 120 125	

gtg tac ccg atg ctc tac acc aac ctg tcg tgg tgg aag acc tgc acc	717
Val Tyr Pro Met Leu Tyr Thr Asn Leu Ser Trp Trp Lys Thr Cys Thr	
130 135 140	

ggc aac tcc aag gcc ttc gtc aac acc aac ccg ctc gtc ctc gcc cgc	765
Gly Asn Ser Lys Ala Phe Val Asn Thr Asn Pro Leu Val Leu Ala Arg	
145 150 155 160	

tgg gcc agc tcg ccc ggc gag atc ccc ggc ggc tgg ccg tgg cag acc	813
Trp Ala Ser Ser Pro Gly Glu Ile Pro Gly Gly Trp Pro Trp Gln Thr	
165 170 175	

atc tgg cag aac tcg gac tcg tac cgc tac ggc ggc gac tcg gac atc	861
Ile Trp Gln Asn Ser Asp Ser Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Ser Asp Ile	
180 185 190	

ttc aac ggc gac atg aac cag ctc agg agg ctg gcc acc gcc gcc taa	909
Phe Asn Gly Asp Met Asn Gln Leu Arg Arg Leu Ala Thr Ala Ala	
195 200 205	

<210> 14

<211> 225

<212> BEJOK

<213> Myceliophthora fergusii

<400> 14

Met Lys Ala Ala Leu Leu Ala Thr Val Ser Ala Leu Ala Ala Gly Val
-15 -10 -5

Gln Ala Ala Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Trp Gln Ser Ser Val
-1 1 5 10

Asp Phe Lys Ala Ala Tyr Asn Ser Gly Ala Arg Phe Val Ile Ile Lys
15 20 25 30

Ala Thr Glu Gly Thr Ser Phe Ile Asp Pro Lys Phe Ser Ser His Tyr
35 40 45

Thr Gly Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala
50 55 60

His Pro Gly Gln Ser Ser Gly Glu Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Ala
65 70 75

His Gly Gly Gly Trp Thr Pro Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu
80 85 90

Asp Leu Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Glu Cys Trp Gly Leu Ser Gln Ser
95 100 105 110

Ala Met Val Ala Trp Ile Lys Ala Phe Ser Asp Arg Tyr His Ala Arg
115 120 125

Thr Gly Val Tyr Pro Met Leu Tyr Thr Asn Leu Ser Trp Trp Lys Thr
130 135 140

Cys Thr Gly Asn Ser Lys Ala Phe Val Asn Thr Asn Pro Leu Val Leu
145 150 155

Ala Arg Trp Ala Ser Ser Pro Gly Glu Ile Pro Gly Gly Trp Pro Trp
160 165 170

Gln Thr Ile Trp Gln Asn Ser Asp Ser Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Ser
175 180 185 190

Asp Ile Phe Asn Gly Asp Met Asn Gln Leu Arg Arg Leu Ala Thr Ala
195 200 205

Ala

<210> 15
<211> 207
<212> БЕЖОК
<213> Myceliophthora fergusii

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(207)

<400> 15

Ala Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Trp Gln Ser Ser Val Asp Phe
1 5 10 15

Lys Ala Ala Tyr Asn Ser Gly Ala Arg Phe Val Ile Ile Lys Ala Thr
20 25 30

Glu Gly Thr Ser Phe Ile Asp Pro Lys Phe Ser Ser His Tyr Thr Gly
35 40 45

Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala His Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Ser Gly Glu Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Ala His Gly
65 70 75 80

Gly Gly Trp Thr Pro Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Leu
85 90 95

Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Glu Cys Trp Gly Leu Ser Gln Ser Ala Met
100 105 110

Val Ala Trp Ile Lys Ala Phe Ser Asp Arg Tyr His Ala Arg Thr Gly
115 120 125

Val Tyr Pro Met Leu Tyr Thr Asn Leu Ser Trp Trp Lys Thr Cys Thr
130 135 140

Gly Asn Ser Lys Ala Phe Val Asn Thr Asn Pro Leu Val Leu Ala Arg
145 150 155 160

Trp Ala Ser Ser Pro Gly Glu Ile Pro Gly Gly Trp Pro Trp Gln Thr
165 170 175

Ile Trp Gln Asn Ser Asp Ser Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Ser Asp Ile
180 185 190

Phe Asn Gly Asp Met Asn Gln Leu Arg Arg Leu Ala Thr Ala Ala
195 200 205

<210> 16
<211> 796
<212> ДНК
<213> Lecanicillium sp. WMM742

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(150)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(60)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (61)..(793)

<220>
<221> CDS
<222> (199)..(381)

<220>
<221> CDS
<222> (443)..(793)

<400> 16
atg aag tca ttc tca tcc att atc gcc ggc atc gcc ggc ctt gcc tct 48
Met Lys Ser Phe Ser Ser Ile Ile Ala Gly Ile Ala Gly Leu Ala Ser
-20 -15 -10 -5

gtc gct tct gcc acg gtg cag ggc ttc gat gtc tct ggc tac cag ccc 96
Val Ala Ser Ala Thr Val Gln Gly Phe Asp Val Ser Gly Tyr Gln Pro
-1 1 5 10

act gtc aac tgg ggt gcg gcc tac agc agc ggt gct cgc ttc gtc atg 144

Thr	Val	Asn	Trp	Gly	Ala	Ala	Tyr	Ser	Ser	Gly	Ala	Arg	Phe	Val	Met		
		15					20					25					
atc	aag	gtatgctgca	gcggacgggtt	cgaatcacag	atgatgctga	caggctag	gcc									201	
Ile	Lys						Ala										
		30															
acc	gag	gga	act	ggg	tac	atc	tcg	tcc	agc	ttc	ggc	tcg	cag	tac	cct		249
Thr	Glu	Gly	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Phe	Gly	Ser	Gln	Tyr	Pro		
			35					40					45				
ggg	gcc	acc	aat	gcg	ggc	ttt	atc	cgc	ggc	ggc	tac	cac	ttt	gcg	ctg		297
Gly	Ala	Thr	Asn	Ala	Gly	Phe	Ile	Arg	Gly	Gly	Tyr	His	Phe	Ala	Leu		
		50					55					60					
ccc	gac	cgg	tcc	tct	ggc	tcc	gca	cag	gcc	gac	tac	ttt	ctg	gcc	cac		345
Pro	Asp	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Gln	Ala	Asp	Tyr	Phe	Leu	Ala	His		
		65				70					75						
ggc	ggc	ggc	tgg	agc	ggc	gat	ggc	atc	act	cta	ccg	gtaagtccca					391
Gly	Gly	Gly	Trp	Ser	Gly	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Pro						
80					85					90							
tcaccttcct	tgaatcgaag	cgccatggta	gtgctagtct	gacgcatcca	g	ggc	atg										448
							Gly	Met									
ctg	gac	att	gag	tat	aac	ccg	tac	ggc	gcc	acc	tgc	tac	ggc	ctc	tcg		496
Leu	Asp	Ile	Glu	Tyr	Asn	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Cys	Tyr	Gly	Leu	Ser		
		95				100					105						
cag	ggc	gcc	atg	gtc	aac	tgg	atc	agc	gac	ttt	gtc	gag	cac	tac	aag		544
Gln	Gly	Ala	Met	Val	Asn	Trp	Ile	Ser	Asp	Phe	Val	Glu	His	Tyr	Lys		
110					115					120					125		
gcc	agg	acg	acg	cag	tac	ccc	atc	atc	tac	acg	acg	acc	gac	tgg	tgg		592
Ala	Arg	Thr	Thr	Gln	Tyr	Pro	Ile	Ile	Tyr	Thr	Thr	Thr	Asp	Trp	Trp		
				130					135					140			
aag	acg	tgc	acg	ggc	aac	agc	cct	ggc	ttt	ggc	caa	aag	tgc	ccg	ctg		640
Lys	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Ser	Pro	Ala	Phe	Gly	Gln	Lys	Cys	Pro	Leu		
			145					150					155				
agc	ctg	gcc	cgg	tac	tcg	agc	agc	gtg	ggc	gag	atc	ccc	aac	ggc	tgg		688
Ser	Leu	Ala	Arg	Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	Gly	Glu	Ile	Pro	Asn	Gly	Trp		
		160					165					170					
ccg	ttc	cag	act	ttc	tgg	cag	aac	agc	gac	aag	tat	gcg	tac	ggg	ggc		736
Pro	Phe	Gln	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Ser	Asp	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Gly		
		175				180					185						
gat	tcg	cag	att	ttc	aac	ggc	gcg	tac	tct	cag	ctg	cag	aag	att	gct		784
Asp	Ser	Gln	Ile	Phe	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Gln	Leu	Gln	Lys	Ile	Ala		
190					195					200					205		
cgc	ggg	ggg	tag														796
Arg	Gly	Gly															

<210> 17
 <211> 228
 <212> БЕЛЮК
 <213> Lecanicillium sp. WMM742

<400> 17

Met Lys Ser Phe Ser Ser Ile Ile Ala Gly Ile Ala Gly Leu Ala Ser
-20 -15 -10 -5

Val Ala Ser Ala Thr Val Gln Gly Phe Asp Val Ser Gly Tyr Gln Pro
-1 1 5 10

Thr Val Asn Trp Gly Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Ala Arg Phe Val Met
15 20 25

Ile Lys Ala Thr Glu Gly Thr Gly Tyr Ile Ser Ser Ser Phe Gly Ser
30 35 40

Gln Tyr Pro Gly Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Gly Tyr His
45 50 55 60

Phe Ala Leu Pro Asp Arg Ser Ser Gly Ser Ala Gln Ala Asp Tyr Phe
65 70 75

Leu Ala His Gly Gly Gly Trp Ser Gly Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly
80 85 90

Met Leu Asp Ile Glu Tyr Asn Pro Tyr Gly Ala Thr Cys Tyr Gly Leu
95 100 105

Ser Gln Gly Ala Met Val Asn Trp Ile Ser Asp Phe Val Glu His Tyr
110 115 120

Lys Ala Arg Thr Thr Gln Tyr Pro Ile Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp
125 130 135 140

Trp Lys Thr Cys Thr Gly Asn Ser Pro Ala Phe Gly Gln Lys Cys Pro
145 150 155

Leu Ser Leu Ala Arg Tyr Ser Ser Ser Val Gly Glu Ile Pro Asn Gly
160 165 170

Trp Pro Phe Gln Thr Phe Trp Gln Asn Ser Asp Lys Tyr Ala Tyr Gly
175 180 185

Gly Asp Ser Gln Ile Phe Asn Gly Ala Tyr Ser Gln Leu Gln Lys Ile
190 195 200

Ala Arg Gly Gly
205

<210> 18

<211> 208
<212> BEJOK
<213> Lecanicillium sp. WMM742

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(208)

<400> 18

Thr Val Gln Gly Phe Asp Val Ser Gly Tyr Gln Pro Thr Val Asn Trp
1 5 10 15

Gly Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Ala Arg Phe Val Met Ile Lys Ala Thr
20 25 30

Glu Gly Thr Gly Tyr Ile Ser Ser Ser Phe Gly Ser Gln Tyr Pro Gly
35 40 45

Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Gly Tyr His Phe Ala Leu Pro
50 55 60

Asp Arg Ser Ser Gly Ser Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Ala His Gly
65 70 75 80

Gly Gly Trp Ser Gly Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Ile
85 90 95

Glu Tyr Asn Pro Tyr Gly Ala Thr Cys Tyr Gly Leu Ser Gln Gly Ala
100 105 110

Met Val Asn Trp Ile Ser Asp Phe Val Glu His Tyr Lys Ala Arg Thr
115 120 125

Thr Gln Tyr Pro Ile Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp Lys Thr Cys
130 135 140

Thr Gly Asn Ser Pro Ala Phe Gly Gln Lys Cys Pro Leu Ser Leu Ala
145 150 155 160

Arg Tyr Ser Ser Ser Val Gly Glu Ile Pro Asn Gly Trp Pro Phe Gln
165 170 175

Thr Phe Trp Gln Asn Ser Asp Lys Tyr Ala Tyr Gly Gly Asp Ser Gln
180 185 190

Ile Phe Asn Gly Ala Tyr Ser Gln Leu Gln Lys Ile Ala Arg Gly Gly
195 200 205

<210> 19

<211> 684
 <212> ДНК
 <213> Zygomycetes sp. XZ2655

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(681)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (58)..(681)

<400> 19
 atg aaa gca atc gta aca gca tta gca tta tcc ttg tta tgg gcg ggt 48
 Met Lys Ala Ile Val Thr Ala Leu Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala Gly
 -15 -10 -5

gcc cat gca act ttg ccc ggc tta gac gtc agc agc tac caa ggt aac 96
 Ala His Ala Thr Leu Pro Gly Leu Asp Val Ser Ser Tyr Gln Gly Asn
 -1 1 5 10

gtc aat tgg gga aca gtg gcg agt caa gga gca aaa ttt gct tac gtc 144
 Val Asn Trp Gly Thr Val Ala Ser Gln Gly Ala Lys Phe Ala Tyr Val
 15 20 25

aag gct acc gag ggt acg acc tac acg aat ccc tat ttt gcg tcc caa 192
 Lys Ala Thr Glu Gly Thr Thr Tyr Thr Asn Pro Tyr Phe Ala Ser Gln
 30 35 40 45

tac gac gga tcc tac aac gcg ggc cta att cgc ggt gcc tat cac ttt 240
 Tyr Asp Gly Ser Tyr Asn Ala Gly Leu Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe
 50 55 60

gcc cat ccc gat tct tcc tct gga gct acc caa gca aac tat ttc ctt 288
 Ala His Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ala Thr Gln Ala Asn Tyr Phe Leu
 65 70 75

gct cat ggt ggc ggc tgg tcc gct gac gga aag acc tta cct ggt gcg 336
 Ala His Gly Gly Gly Trp Ser Ala Asp Gly Lys Thr Leu Pro Gly Ala
 80 85 90

cta gat att gag tac aat cct aac ggc gct gaa tgc tac ggc ttg tct 384
 Leu Asp Ile Glu Tyr Asn Pro Asn Gly Ala Glu Cys Tyr Gly Leu Ser
 95 100 105

caa ttg gcc atg att agc tgg att caa gac ttc agc aac acc tat cac 432
 Gln Leu Ala Met Ile Ser Trp Ile Gln Asp Phe Ser Asn Thr Tyr His
 110 115 120 125

tcc cac acg ggc aga tat ccg gtc att tac acg act acg gac tgg tgg 480
 Ser His Thr Gly Arg Tyr Pro Val Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp
 130 135 140

acc acc tgc acg ggt aac agc gca gcc ttt gga acc aac aac cct ctc 528
 Thr Thr Cys Thr Gly Asn Ser Ala Ala Phe Gly Thr Asn Asn Pro Leu
 145 150 155

tgg att gct cgg tat tcg tct tcg gtg ggc acc ctg cct gca ggt tgg 576
 Trp Ile Ala Arg Tyr Ser Ser Ser Val Gly Thr Leu Pro Ala Gly Trp

160	165	170	
ggc tac gag agc ttc tgg cag aag gca tct tcg ggt acg ttc cct gga			624
Gly Tyr Glu Ser Phe Trp Gln Lys Ala Ser Ser Gly Thr Phe Pro Gly			
175	180	185	
gac caa gat atc tgg aat ggc gat gct gct gga ctc tcc aga ttc gcc			672
Asp Gln Asp Ile Trp Asn Gly Asp Ala Ala Gly Leu Ser Arg Phe Ala			
190	195	200	205
acc ggc aaa tga			684
Thr Gly Lys			
<210> 20			
<211> 227			
<212> BEJOK			
<213> Zygomycetes sp. XZ2655			
<400> 20			
Met Lys Ala Ile Val Thr Ala Leu Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala Gly			
	-15	-10	-5
Ala His Ala Thr Leu Pro Gly Leu Asp Val Ser Ser Tyr Gln Gly Asn			
	-1 1	5	10
Val Asn Trp Gly Thr Val Ala Ser Gln Gly Ala Lys Phe Ala Tyr Val			
15	20	25	
Lys Ala Thr Glu Gly Thr Thr Tyr Thr Asn Pro Tyr Phe Ala Ser Gln			
30	35	40	45
Tyr Asp Gly Ser Tyr Asn Ala Gly Leu Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe			
	50	55	60
Ala His Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ala Thr Gln Ala Asn Tyr Phe Leu			
	65	70	75
Ala His Gly Gly Gly Trp Ser Ala Asp Gly Lys Thr Leu Pro Gly Ala			
80	85	90	
Leu Asp Ile Glu Tyr Asn Pro Asn Gly Ala Glu Cys Tyr Gly Leu Ser			
95	100	105	
Gln Leu Ala Met Ile Ser Trp Ile Gln Asp Phe Ser Asn Thr Tyr His			
110	115	120	125
Ser His Thr Gly Arg Tyr Pro Val Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp			
	130	135	140
Thr Thr Cys Thr Gly Asn Ser Ala Ala Phe Gly Thr Asn Asn Pro Leu			
145	150	155	

Trp Ile Ala Arg Tyr Ser Ser Ser Val Gly Thr Leu Pro Ala Gly Trp
160 165 170

Gly Tyr Glu Ser Phe Trp Gln Lys Ala Ser Ser Gly Thr Phe Pro Gly
175 180 185

Asp Gln Asp Ile Trp Asn Gly Asp Ala Ala Gly Leu Ser Arg Phe Ala
190 195 200 205

Thr Gly Lys

<210> 21
<211> 208
<212> BEJOK
<213> Zygomycetes sp. XZ2655

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(208)

<400> 21

Thr Leu Pro Gly Leu Asp Val Ser Ser Tyr Gln Gly Asn Val Asn Trp
1 5 10 15

Gly Thr Val Ala Ser Gln Gly Ala Lys Phe Ala Tyr Val Lys Ala Thr
20 25 30

Glu Gly Thr Thr Tyr Thr Asn Pro Tyr Phe Ala Ser Gln Tyr Asp Gly
35 40 45

Ser Tyr Asn Ala Gly Leu Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala His Pro
50 55 60

Asp Ser Ser Ser Gly Ala Thr Gln Ala Asn Tyr Phe Leu Ala His Gly
65 70 75 80

Gly Gly Trp Ser Ala Asp Gly Lys Thr Leu Pro Gly Ala Leu Asp Ile
85 90 95

Glu Tyr Asn Pro Asn Gly Ala Glu Cys Tyr Gly Leu Ser Gln Leu Ala
100 105 110

Met Ile Ser Trp Ile Gln Asp Phe Ser Asn Thr Tyr His Ser His Thr
115 120 125

Gly Arg Tyr Pro Val Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp Thr Thr Cys
130 135 140

Thr Gly Asn Ser Ala Ala Phe Gly Thr Asn Asn Pro Leu Trp Ile Ala
 145 150 155 160

Arg Tyr Ser Ser Ser Val Gly Thr Leu Pro Ala Gly Trp Gly Tyr Glu
 165 170 175

Ser Phe Trp Gln Lys Ala Ser Ser Gly Thr Phe Pro Gly Asp Gln Asp
 180 185 190

Ile Trp Asn Gly Asp Ala Ala Gly Leu Ser Arg Phe Ala Thr Gly Lys
 195 200 205

<210> 22
 <211> 767
 <212> ДНК
 <213> Malbranchea flava

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(174)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(54)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (55)..(764)

<220>
 <221> CDS
 <222> (234)..(764)

<400> 22
 atg aag ctg tct ctc ctc ctt att gtt gct gca tca ctg gcc gtg gcc 48
 Met Lys Leu Ser Leu Leu Leu Ile Val Ala Ala Ser Leu Ala Val Ala
 -15 -10 -5

agt gca ggc ccc aag gag ttc gag tca cgc gcg tcg ggc gtc cag ggc 96
 Ser Ala Gly Pro Lys Glu Phe Glu Ser Arg Ala Ser Gly Val Gln Gly
 -1 1 5 10

ttt gac atc tct ggt tgg cag tcc aac gtc aat ttt gca ggt gca tac 144
 Phe Asp Ile Ser Gly Trp Gln Ser Asn Val Asn Phe Ala Gly Ala Tyr
 15 20 25 30

aat tct ggc gca cgc ttc gtc atg atc aag gtacatttga gtgaattcgt 194
 Asn Ser Gly Ala Arg Phe Val Met Ile Lys
 35 40

ttctcctggg ataataccct gactaatgta aagatccag gct agc gag ggt acc 248
 Ala Ser Glu Gly Thr
 45

acc ttc aag gac cgt caa ttc agc aat cat tac att ggc gcc acc aag 296
 Thr Phe Lys Asp Arg Gln Phe Ser Asn His Tyr Ile Gly Ala Thr Lys
 50 55 60

gct ggc ttt atc cgt ggc ggc tac cac ttt gcg ttg cca gac gtc agc 344
 Ala Gly Phe Ile Arg Gly Gly Tyr His Phe Ala Leu Pro Asp Val Ser
 65 70 75

agc gcc act gcc caa gtg aac cat ttc ctg gcc agc ggt ggt ggc tgg 392
 Ser Ala Thr Ala Gln Val Asn His Phe Leu Ala Ser Gly Gly Gly Trp
 80 85 90

agc aga gac ggc atc acg ctg ccg ggc atg ctg gac atc gag agc aac 440
 Ser Arg Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Ile Glu Ser Asn
 95 100 105

ccg tat ggc gcc cag tgc tac ggc ctt gac gct ggt cgt atg gtt gcc 488
 Pro Tyr Gly Ala Gln Cys Tyr Gly Leu Asp Ala Gly Arg Met Val Ala
 110 115 120 125

tgg atc cgg gag ttt gtt gac gcg tac aag cgc gca act gga cgg tat 536
 Trp Ile Arg Glu Phe Val Asp Ala Tyr Lys Arg Ala Thr Gly Arg Tyr
 130 135 140

cct ctg atc tac acg tct ccc agc tgg tgg cag act tgc acg ggc aat 584
 Pro Leu Ile Tyr Thr Ser Pro Ser Trp Trp Gln Thr Cys Thr Gly Asn
 145 150 155

agc aat gcc ttt ata gac aag tgc ccg ctt gtg ttg gca cgg tgg gcg 632
 Ser Asn Ala Phe Ile Asp Lys Cys Pro Leu Val Leu Ala Arg Trp Ala
 160 165 170

agt agc cct ggc act ccg cct ggt ggg tgg ccg ttc cac agt ttt tgg 680
 Ser Ser Pro Gly Thr Pro Pro Gly Gly Trp Pro Phe His Ser Phe Trp
 175 180 185

cag tac gcc gat tcc tat caa ttc ggt ggt gac gcc cag gta ttc aat 728
 Gln Tyr Ala Asp Ser Tyr Gln Phe Gly Gly Asp Ala Gln Val Phe Asn
 190 195 200 205

ggc gat gag gct ggg ttg aag aga atg gcc cta ggt taa 767
 Gly Asp Glu Ala Gly Leu Lys Arg Met Ala Leu Gly
 210 215

<210> 23
 <211> 235
 <212> BEJIOK
 <213> Malbranchea flava

<400> 23

Met Lys Leu Ser Leu Leu Leu Ile Val Ala Ala Ser Leu Ala Val Ala
 -15 -10 -5

Ser Ala Gly Pro Lys Glu Phe Glu Ser Arg Ala Ser Gly Val Gln Gly
 -1 1 5 10

Phe Asp Ile Ser Gly Trp Gln Ser Asn Val Asn Phe Ala Gly Ala Tyr
 15 20 25 30

Asn Ser Gly Ala Arg Phe Val Met Ile Lys Ala Ser Glu Gly Thr Thr
 35 40 45

Phe Lys Asp Arg Gln Phe Ser Asn His Tyr Ile Gly Ala Thr Lys Ala
50 55 60

Gly Phe Ile Arg Gly Gly Tyr His Phe Ala Leu Pro Asp Val Ser Ser
65 70 75

Ala Thr Ala Gln Val Asn His Phe Leu Ala Ser Gly Gly Gly Trp Ser
80 85 90

Arg Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Ile Glu Ser Asn Pro
95 100 105 110

Tyr Gly Ala Gln Cys Tyr Gly Leu Asp Ala Gly Arg Met Val Ala Trp
115 120 125

Ile Arg Glu Phe Val Asp Ala Tyr Lys Arg Ala Thr Gly Arg Tyr Pro
130 135 140

Leu Ile Tyr Thr Ser Pro Ser Trp Trp Gln Thr Cys Thr Gly Asn Ser
145 150 155

Asn Ala Phe Ile Asp Lys Cys Pro Leu Val Leu Ala Arg Trp Ala Ser
160 165 170

Ser Pro Gly Thr Pro Pro Gly Gly Trp Pro Phe His Ser Phe Trp Gln
175 180 185 190

Tyr Ala Asp Ser Tyr Gln Phe Gly Gly Asp Ala Gln Val Phe Asn Gly
195 200 205

Asp Glu Ala Gly Leu Lys Arg Met Ala Leu Gly
210 215

<210> 24
<211> 217
<212> БЕЛОК
<213> Malbranchea flava

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(217)

<400> 24

Gly Pro Lys Glu Phe Glu Ser Arg Ala Ser Gly Val Gln Gly Phe Asp
1 5 10 15

Ile Ser Gly Trp Gln Ser Asn Val Asn Phe Ala Gly Ala Tyr Asn Ser
20 25 30

Gly Ala Arg Phe Val Met Ile Lys Ala Ser Glu Gly Thr Thr Phe Lys
35 40 45

Asp Arg Gln Phe Ser Asn His Tyr Ile Gly Ala Thr Lys Ala Gly Phe
50 55 60

Ile Arg Gly Gly Tyr His Phe Ala Leu Pro Asp Val Ser Ser Ala Thr
65 70 75 80

Ala Gln Val Asn His Phe Leu Ala Ser Gly Gly Gly Trp Ser Arg Asp
85 90 95

Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Ile Glu Ser Asn Pro Tyr Gly
100 105 110

Ala Gln Cys Tyr Gly Leu Asp Ala Gly Arg Met Val Ala Trp Ile Arg
115 120 125

Glu Phe Val Asp Ala Tyr Lys Arg Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Leu Ile
130 135 140

Tyr Thr Ser Pro Ser Trp Trp Gln Thr Cys Thr Gly Asn Ser Asn Ala
145 150 155 160

Phe Ile Asp Lys Cys Pro Leu Val Leu Ala Arg Trp Ala Ser Ser Pro
165 170 175

Gly Thr Pro Pro Gly Gly Trp Pro Phe His Ser Phe Trp Gln Tyr Ala
180 185 190

Asp Ser Tyr Gln Phe Gly Gly Asp Ala Gln Val Phe Asn Gly Asp Glu
195 200 205

Ala Gly Leu Lys Arg Met Ala Leu Gly
210 215

<210> 25
<211> 687
<212> ДНК
<213> Hypholoma polytrichi

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(684)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(60)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (61)..(684)

<400> 25

atg gca aag ctc ctc aag cag ttg gtg ttg ctc ccg ttc ctc gcg ttg	48
Met Ala Lys Leu Leu Lys Gln Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala Leu	
-20 -15 -10 -5	

gca gca cac gca ttg gtc tac gga gtc gat tcg tcc tcg ttg gtc cct	96
Ala Ala His Ala Leu Val Tyr Gly Val Asp Ser Ser Ser Leu Val Pro	
-1 1 5 10	

gtg gcg acg tat cag aag gca ttg gga gaa ggc ttc aca aag gcc gtc	144
Val Ala Thr Tyr Gln Lys Ala Leu Gly Glu Gly Phe Thr Lys Ala Val	
15 20 25	

att agg ggc tac gaa gag gcc tgt gga gtc gga gga gag gtc gat ccc	192
Ile Arg Gly Tyr Glu Glu Ala Cys Gly Val Gly Gly Glu Val Asp Pro	
30 35 40	

aac ttc gtc ccc tcc tac aaa aac gca cga gcg gca gga tac aca gac	240
Asn Phe Val Pro Ser Tyr Lys Asn Ala Arg Ala Ala Gly Tyr Thr Asp	
45 50 55 60	

atc gat atg tac tgg ttc ccc tgt aac ggc tcc act cat tcg tgt aaa	288
Ile Asp Met Tyr Trp Phe Pro Cys Asn Gly Ser Thr His Ser Cys Lys	
65 70 75	

tcg tat gcc gca cag ttg gca gcc att gcc gca gcc ttc tcg gcg aac	336
Ser Tyr Ala Ala Gln Leu Ala Ala Ile Ala Ala Ala Phe Ser Ala Asn	
80 85 90	

gcc atg aag atc ggt act att tgg atc gac atc gaa aaa gat gca gcc	384
Ala Met Lys Ile Gly Thr Ile Trp Ile Asp Ile Glu Lys Asp Ala Ala	
95 100 105	

atc tgt aac aac tgg gat tac ggc act gca ggt aac ttg gcc cag gcg	432
Ile Cys Asn Asn Trp Asp Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Leu Ala Gln Ala	
110 115 120	

aag gca ttg att gcc gca gcg aag gca tcc ggt ttc aac ttc ggc atc	480
Lys Ala Leu Ile Ala Ala Ala Lys Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gly Ile	
125 130 135 140	

tac tcg tcg cct gga gag tgg tcg acc atc ttc ggc tcg acc tcg gtc	528
Tyr Ser Ser Pro Gly Glu Trp Ser Thr Ile Phe Gly Ser Thr Ser Val	
145 150 155	

gtc gtc gac aac tcc gca ccg ctc tgg ttc gcg acc tat aac aac gtc	576
Val Val Asp Asn Ser Ala Pro Leu Trp Phe Ala Thr Tyr Asn Asn Val	
160 165 170	

cag acc ctc acg ctc ggc act cct ttc gga ggc tgg tcg aca gcc gtc	624
Gln Thr Leu Thr Leu Gly Thr Pro Phe Gly Gly Trp Ser Thr Ala Val	
175 180 185	

ggt cat cag tat acc gat gtg tcc gcc tcc gga ctc ttc gac ctc aac	672
Gly His Gln Tyr Thr Asp Val Ser Ala Ser Gly Leu Phe Asp Leu Asn	
190 195 200	

gtc ttc gcc cac taa	687
Val Phe Ala His	
205	

<210> 26
<211> 228
<212> БЕЖОК
<213> Hypholoma polytrichi

<400> 26

Met Ala Lys Leu Leu Lys Gln Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala Leu
-20 -15 -10 -5

Ala Ala His Ala Leu Val Tyr Gly Val Asp Ser Ser Ser Leu Val Pro
-1 1 5 10

Val Ala Thr Tyr Gln Lys Ala Leu Gly Glu Gly Phe Thr Lys Ala Val
15 20 25

Ile Arg Gly Tyr Glu Glu Ala Cys Gly Val Gly Gly Glu Val Asp Pro
30 35 40

Asn Phe Val Pro Ser Tyr Lys Asn Ala Arg Ala Ala Gly Tyr Thr Asp
45 50 55 60

Ile Asp Met Tyr Trp Phe Pro Cys Asn Gly Ser Thr His Ser Cys Lys
65 70 75

Ser Tyr Ala Ala Gln Leu Ala Ala Ile Ala Ala Ala Phe Ser Ala Asn
80 85 90

Ala Met Lys Ile Gly Thr Ile Trp Ile Asp Ile Glu Lys Asp Ala Ala
95 100 105

Ile Cys Asn Asn Trp Asp Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Leu Ala Gln Ala
110 115 120

Lys Ala Leu Ile Ala Ala Ala Lys Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gly Ile
125 130 135 140

Tyr Ser Ser Pro Gly Glu Trp Ser Thr Ile Phe Gly Ser Thr Ser Val
145 150 155

Val Val Asp Asn Ser Ala Pro Leu Trp Phe Ala Thr Tyr Asn Asn Val
160 165 170

Gln Thr Leu Thr Leu Gly Thr Pro Phe Gly Gly Trp Ser Thr Ala Val
175 180 185

Gly His Gln Tyr Thr Asp Val Ser Ala Ser Gly Leu Phe Asp Leu Asn
190 195 200

Val Phe Ala His
205

<210> 27
<211> 208
<212> БЕЖОК
<213> Hypholoma polytrichid

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(208)

<400> 27

Leu Val Tyr Gly Val Asp Ser Ser Ser Leu Val Pro Val Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Lys Ala Leu Gly Glu Gly Phe Thr Lys Ala Val Ile Arg Gly Tyr
20 25 30

Glu Glu Ala Cys Gly Val Gly Gly Glu Val Asp Pro Asn Phe Val Pro
35 40 45

Ser Tyr Lys Asn Ala Arg Ala Ala Gly Tyr Thr Asp Ile Asp Met Tyr
50 55 60

Trp Phe Pro Cys Asn Gly Ser Thr His Ser Cys Lys Ser Tyr Ala Ala
65 70 75 80

Gln Leu Ala Ala Ile Ala Ala Ala Phe Ser Ala Asn Ala Met Lys Ile
85 90 95

Gly Thr Ile Trp Ile Asp Ile Glu Lys Asp Ala Ala Ile Cys Asn Asn
100 105 110

Trp Asp Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Leu Ala Gln Ala Lys Ala Leu Ile
115 120 125

Ala Ala Ala Lys Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gly Ile Tyr Ser Ser Pro
130 135 140

Gly Glu Trp Ser Thr Ile Phe Gly Ser Thr Ser Val Val Val Asp Asn
145 150 155 160

Ser Ala Pro Leu Trp Phe Ala Thr Tyr Asn Asn Val Gln Thr Leu Thr
165 170 175

Leu Gly Thr Pro Phe Gly Gly Trp Ser Thr Ala Val Gly His Gln Tyr
180 185 190

Thr Asp Val Ser Ala Ser Gly Leu Phe Asp Leu Asn Val Phe Ala His
195 200 205

<210> 28
<211> 782
<212> ДНК
<213> Engyodontium album

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(150)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(60)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (61)..(779)

<220>
<221> CDS
<222> (200)..(383)

<220>
<221> CDS
<222> (433)..(779)

<400> 28
atg aag tct ttt ggt gtt att gct acc ggt ttg gcc acc ctt gtg ggt 48
Met Lys Ser Phe Gly Val Ile Ala Thr Gly Leu Ala Thr Leu Val Gly
-20 -15 -10 -5

gtt gcc tct gcc aga gtc caa ggt ttc gac atc tcc cac tat cag ccc 96
Val Ala Ser Ala Arg Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Tyr Gln Pro
-1 1 5 10

agc gtc gac ttc aat gcg gcc tat gct gac gga gct cgc ttt gtg atc 144
Ser Val Asp Phe Asn Ala Ala Tyr Ala Asp Gly Ala Arg Phe Val Ile
15 20 25

atc aag gtataacaaa ccataacttg gcttatgaac accatctaata gtattgcag gca 202
Ile Lys Ala
30

acc gag ggt acc acc tac aaa gat ccc aag ttc agc cag cac tac atc 250
Thr Glu Gly Thr Thr Tyr Lys Asp Pro Lys Phe Ser Gln His Tyr Ile
35 40 45

ggt gct acc aac gcc gga ttc atc cgc ggt ggc tac cac ttt gct cag 298
Gly Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Gly Tyr His Phe Ala Gln
50 55 60

cct gct tcc tct tct ggt gca gcg cag gca gac tat ttc ctc aag aac 346
Pro Ala Ser Ser Ser Gly Ala Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Lys Asn
65 70 75

gga ggt ggt tgg tct agc gat gga att act ctc cca g gtgagcaaag 393
Gly Gly Gly Trp Ser Ser Asp Gly Ile Thr Leu Pro
80 85 90

tcacaaacgt tcgagggcag ttcactaata tcgtggcag gt atg ctt gat atg 446

Gly Met Leu Asp Met
95

gag tac aac ccc aat ggc agt gct tgc tac ggt ctt tcc cag gct tcc 494
Glu Tyr Asn Pro Asn Gly Ser Ala Cys Tyr Gly Leu Ser Gln Ala Ser
100 105 110

atg cgc aac tgg atc aac gac ttt gtc aac acc tac cac tcc cgc acg 542
Met Arg Asn Trp Ile Asn Asp Phe Val Asn Thr Tyr His Ser Arg Thr
115 120 125

ggt gtc tac cct ctc ctt tac acc acc acc agc tgg tgg aaa acc tgc 590
Gly Val Tyr Pro Leu Leu Tyr Thr Thr Thr Ser Trp Trp Lys Thr Cys
130 135 140

acg ggt aac act gcc atg ttt gcc gac aag tgc cct ctc gtc atc gct 638
Thr Gly Asn Thr Ala Met Phe Ala Asp Lys Cys Pro Leu Val Ile Ala
145 150 155 160

cgc tac aac agc gta gtc gga gag ctc ccc gct ggt tgg tct ttc tgg 686
Arg Tyr Asn Ser Val Val Gly Glu Leu Pro Ala Gly Trp Ser Phe Trp
165 170 175

aca att tgg cag tac aac gac cac tac aag cat ggt ggt gac tca gac 734
Thr Ile Trp Gln Tyr Asn Asp His Tyr Lys His Gly Gly Asp Ser Asp
180 185 190

gct ttt aac gga gac tac tct cag ctt cag aga atc gcc aga ggc taa 782
Ala Phe Asn Gly Asp Tyr Ser Gln Leu Gln Arg Ile Ala Arg Gly
195 200 205

<210> 29

<211> 227

<212> БЕЛОР

<213> Engyodontium album

<400> 29

Met Lys Ser Phe Gly Val Ile Ala Thr Gly Leu Ala Thr Leu Val Gly
-20 -15 -10 -5

Val Ala Ser Ala Arg Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Tyr Gln Pro
-1 1 5 10

Ser Val Asp Phe Asn Ala Ala Tyr Ala Asp Gly Ala Arg Phe Val Ile
15 20 25

Ile Lys Ala Thr Glu Gly Thr Thr Tyr Lys Asp Pro Lys Phe Ser Gln
30 35 40

His Tyr Ile Gly Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Gly Tyr His
45 50 55 60

Phe Ala Gln Pro Ala Ser Ser Ser Gly Ala Ala Gln Ala Asp Tyr Phe
65 70 75

Leu Lys Asn Gly Gly Gly Trp Ser Ser Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly

80

85

90

Met Leu Asp Met Glu Tyr Asn Pro Asn Gly Ser Ala Cys Tyr Gly Leu
 95 100 105

Ser Gln Ala Ser Met Arg Asn Trp Ile Asn Asp Phe Val Asn Thr Tyr
 110 115 120

His Ser Arg Thr Gly Val Tyr Pro Leu Leu Tyr Thr Thr Thr Ser Trp
 125 130 135 140

Trp Lys Thr Cys Thr Gly Asn Thr Ala Met Phe Ala Asp Lys Cys Pro
 145 150 155

Leu Val Ile Ala Arg Tyr Asn Ser Val Val Gly Glu Leu Pro Ala Gly
 160 165 170

Trp Ser Phe Trp Thr Ile Trp Gln Tyr Asn Asp His Tyr Lys His Gly
 175 180 185

Gly Asp Ser Asp Ala Phe Asn Gly Asp Tyr Ser Gln Leu Gln Arg Ile
 190 195 200

Ala Arg Gly
 205

<210> 30
 <211> 207
 <212> BEJOK
 <213> Engyodontium album

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(207)

<400> 30

Arg Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Tyr Gln Pro Ser Val Asp Phe
 1 5 10 15

Asn Ala Ala Tyr Ala Asp Gly Ala Arg Phe Val Ile Ile Lys Ala Thr
 20 25 30

Glu Gly Thr Thr Tyr Lys Asp Pro Lys Phe Ser Gln His Tyr Ile Gly
 35 40 45

Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Gly Tyr His Phe Ala Gln Pro
 50 55 60

Ala Ser Ser Ser Gly Ala Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Lys Asn Gly

65					70					75				80		
Gly	Gly	Trp	Ser	Ser	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Pro	Gly	Met	Leu	Asp	Met	
				85					90					95		
Glu	Tyr	Asn	Pro	Asn	Gly	Ser	Ala	Cys	Tyr	Gly	Leu	Ser	Gln	Ala	Ser	
			100					105					110			
Met	Arg	Asn	Trp	Ile	Asn	Asp	Phe	Val	Asn	Thr	Tyr	His	Ser	Arg	Thr	
		115					120					125				
Gly	Val	Tyr	Pro	Leu	Leu	Tyr	Thr	Thr	Thr	Ser	Trp	Trp	Lys	Thr	Cys	
	130					135					140					
Thr	Gly	Asn	Thr	Ala	Met	Phe	Ala	Asp	Lys	Cys	Pro	Leu	Val	Ile	Ala	
145					150					155					160	
Arg	Tyr	Asn	Ser	Val	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Trp	Ser	Phe	Trp	
				165					170					175		
Thr	Ile	Trp	Gln	Tyr	Asn	Asp	His	Tyr	Lys	His	Gly	Gly	Asp	Ser	Asp	
			180					185					190			
Ala	Phe	Asn	Gly	Asp	Tyr	Ser	Gln	Leu	Gln	Arg	Ile	Ala	Arg	Gly		
		195					200					205				

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Микробный лизоцим или композиция, содержащая микробный лизоцим, для применения согласно способу предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) или воспалительного заболевания кишечника (IBD).

2. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, которые обеспечивают стабилизацию здоровой микробиоты в GI-тракте и подавление роста и/или колонизации кишечника бактериальными патогенами.

3. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по п. 1, где микробный лизоцим обеспечивает стабилизацию здоровой микробиоты в GI-тракте и подавление роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника.

4. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по любому из пп. 1-3, где микробный лизоцим обеспечивает предупреждение, уменьшение выраженности или лечение воспаления.

5. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по любому из пп. 1-4, где микробный лизоцим обеспечивает уменьшение эктопического отложения липидов, связанного с ожирением, таким как, например, алиментарное ожирение.

6. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по любому из пп. 1-5, где композиция, содержащая лизоцим, вводится на уровне от 0,1 до 1000 ppm ферментного белка на кг композиции.

7. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по любому из пп. 1-6, где микробный лизоцим содержит один или несколько доменов, выбранных из перечня, состоящего из GH24 и GH25.

8. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по любому из пп. 1-7, где микробный лизоцим выбран из группы, состоящей из:

(a) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1;

(b) варианта SEQ ID NO: 1, где вариант обладает лизоцимной

активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(с) фрагмента полипептида из (а) или (b), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот;

(d) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4;

(е) варианта SEQ ID NO: 4, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям;

(f) фрагмента полипептида из (d) или (е), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 210 аминокислот, например, по меньшей мере 215 аминокислот, по меньшей мере 220 аминокислот, по меньшей мере 225 аминокислот, по меньшей мере 230 аминокислот, по меньшей мере 235 аминокислот или по меньшей мере 240 аминокислот;

(g) полипептида, характеризующегося по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей

мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15;

(h) варианта SEQ ID NO: 15, где вариант обладает лизоцимной активностью и содержит одну или несколько аминокислотных замен, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одну или несколько аминокислотных вставок, или любую их комбинацию по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 положениям; и

(i) фрагмента полипептида из (g) или (h), который обладает лизоцимной активностью, где фрагмент содержит по меньшей мере 170 аминокислот, например, по меньшей мере 175 аминокислот, по меньшей мере 177 аминокислот, по меньшей мере 180 аминокислот, по меньшей мере 185 аминокислот, по меньшей мере 190 аминокислот, по меньшей мере 195 аминокислот или по меньшей мере 200 аминокислот.

9. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по любому из пп. 1–8 для применения в лечении человека.

10. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по любому из пп. 1–9, где композиция представляет собой пищевую или фармацевтическую композицию или медицинское устройство.

11. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по любому из пп. 1–10, где композиция представлена в форме порошка, таблетки, таблетки для рассасывания, шипучей таблетки, капсулы, эмульсии, пасты, индивидуального саше, жевательной резинки или масляных капель.

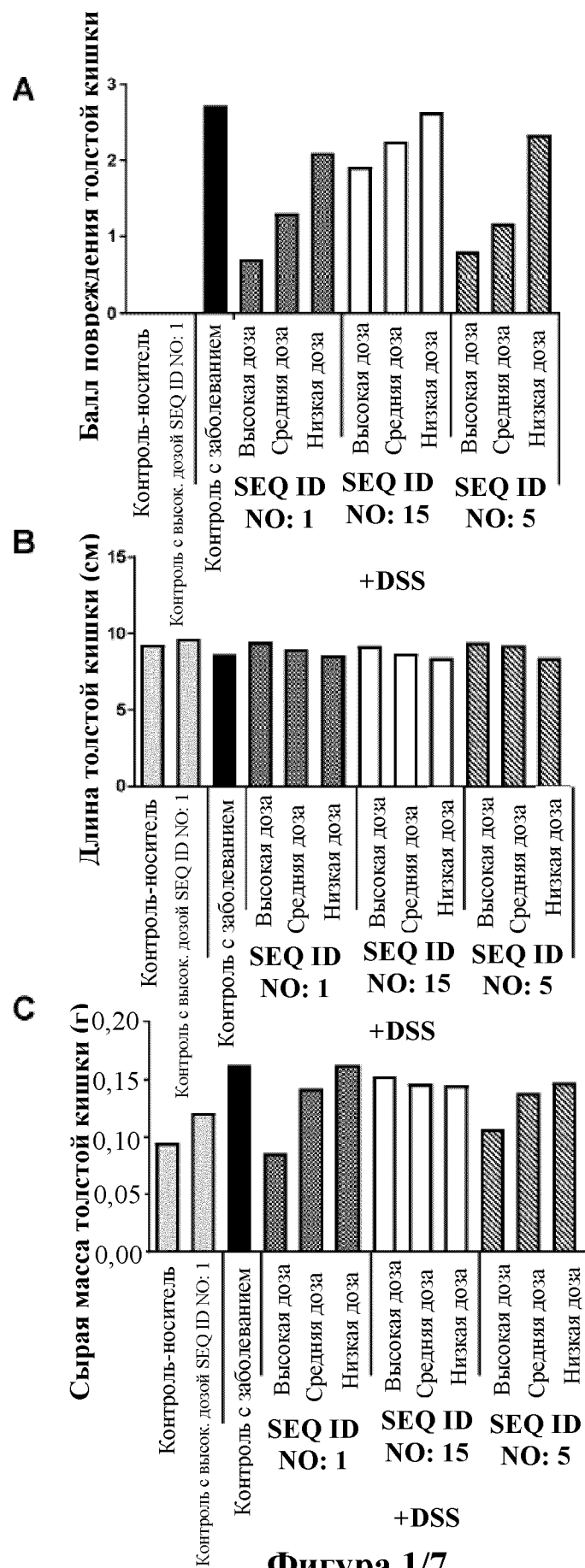
12. Микробный лизоцим или композиция, содержащая его, по любому из пп. 1–11, где микробный лизоцим или композиция, содержащая его, применяются при лечении болезни Крона и/или язвенного колита.

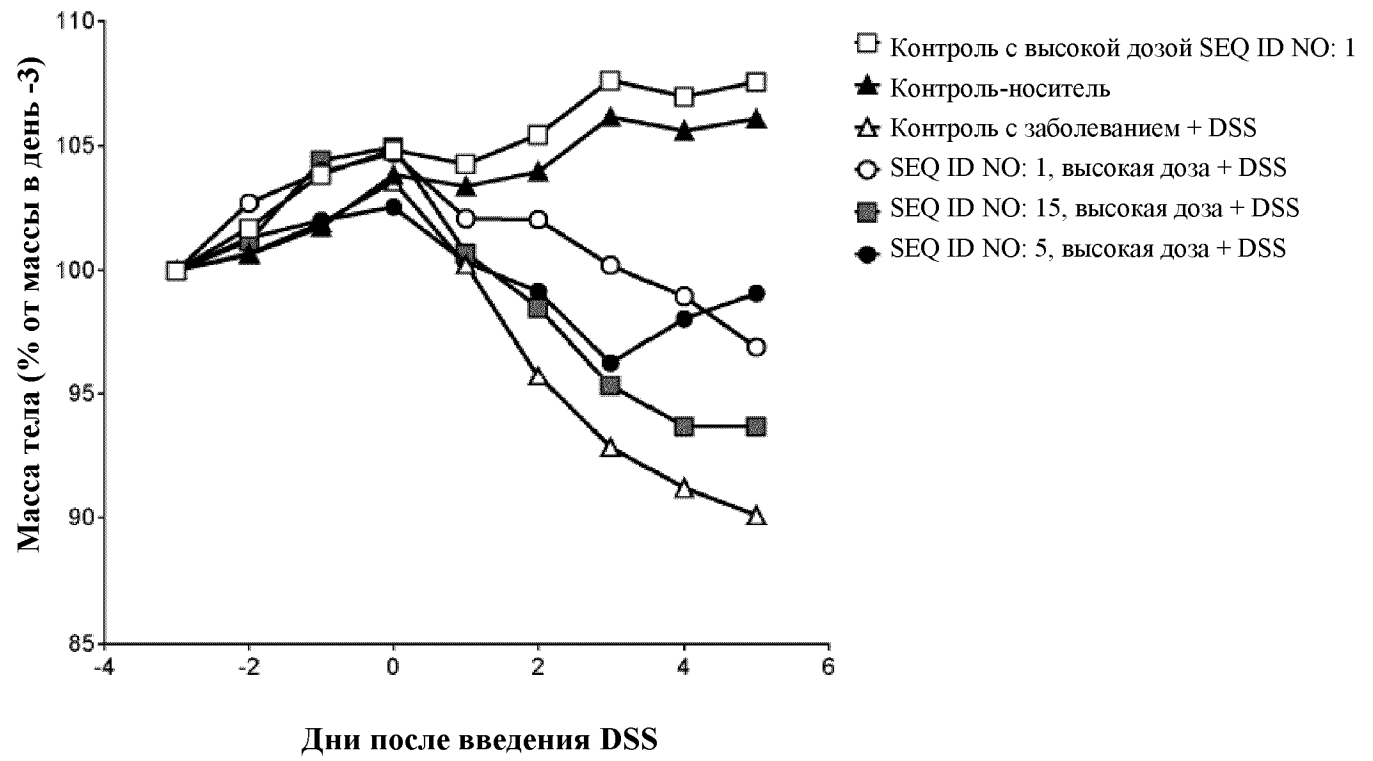
13. Способ предупреждения, уменьшения выраженности или лечения синдрома раздраженного кишечника (IBS) или воспалительного заболевания кишечника (IBD), включающий введение микробного лизоцима или композиции, содержащей микробный лизоцим.

14. Способ по п. 13, где микробный лизоцим обеспечивает стабилизацию здоровой микробиоты в GI-тракте и подавление роста бактериальных патогенов и/или колонизации ими кишечника.

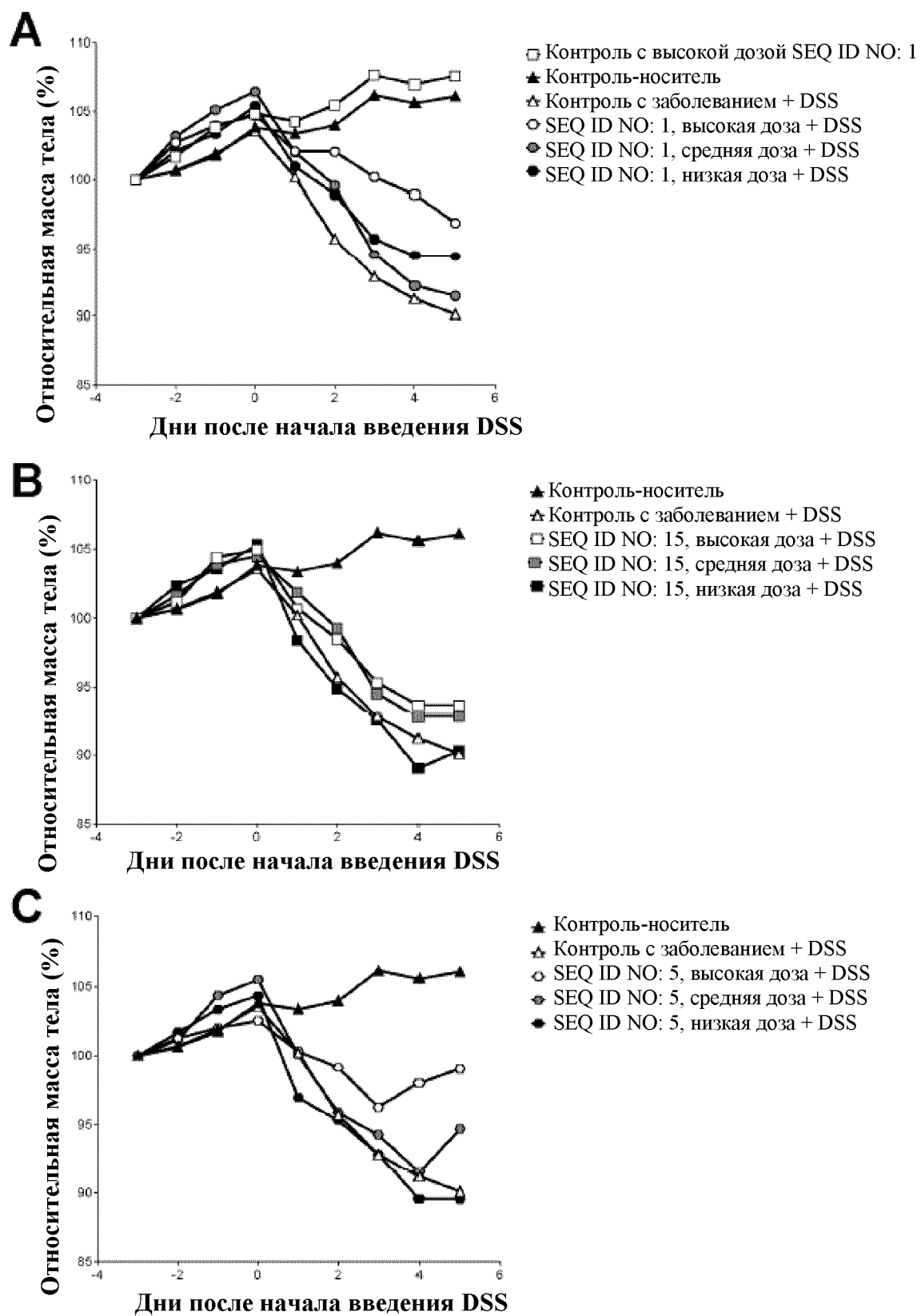
15. Способ улучшения здоровья кишечника у человека, предусматривающий уменьшение количества погибших клеток *Lactobacillus johnsonii* в пищеварительном тракте, который включает предоставление указанному человеку выделенного полипептида GH25, обладающего лизоцимной активностью в отношении *Lactobacillus johnsonii*, определенной с помощью способа определения лизоцимной активности в отношении *Lactobacillus johnsonii*.

По доверенности

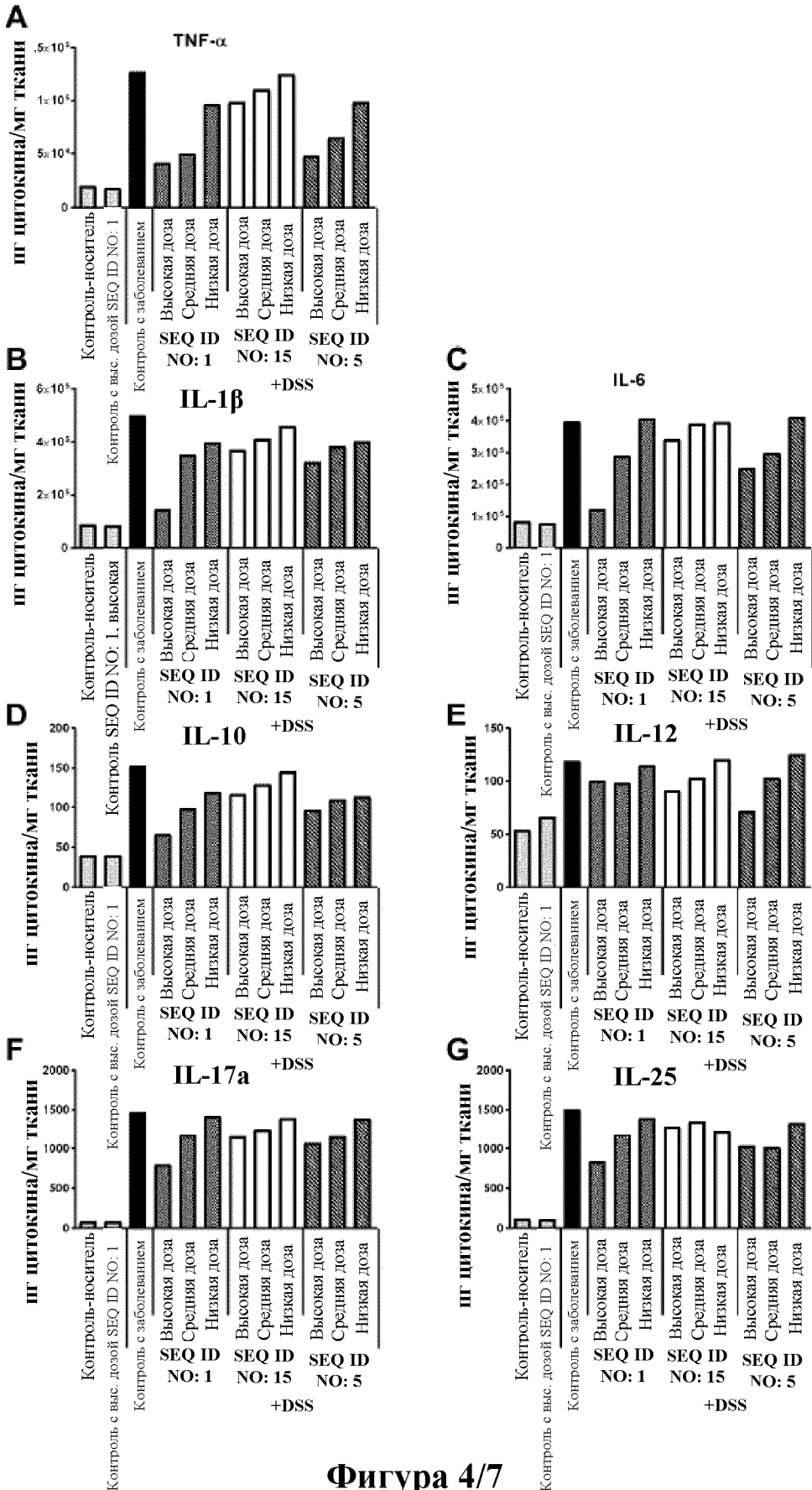




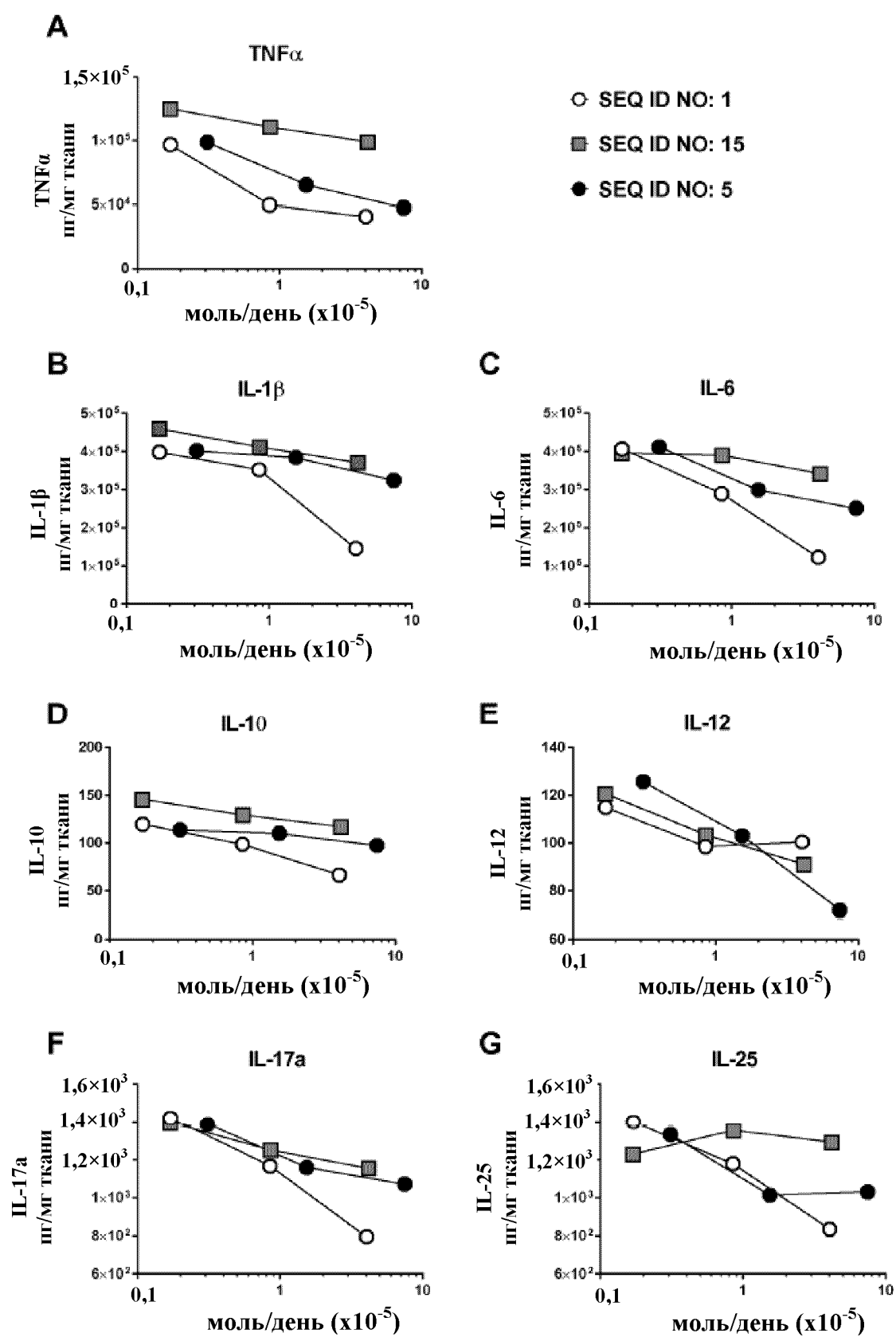
Фигура 2/7



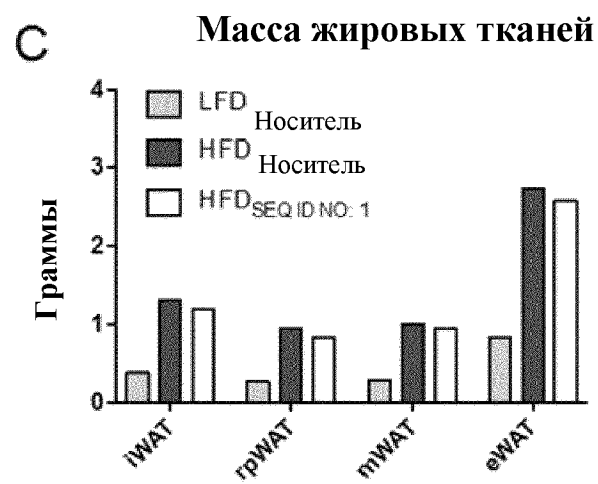
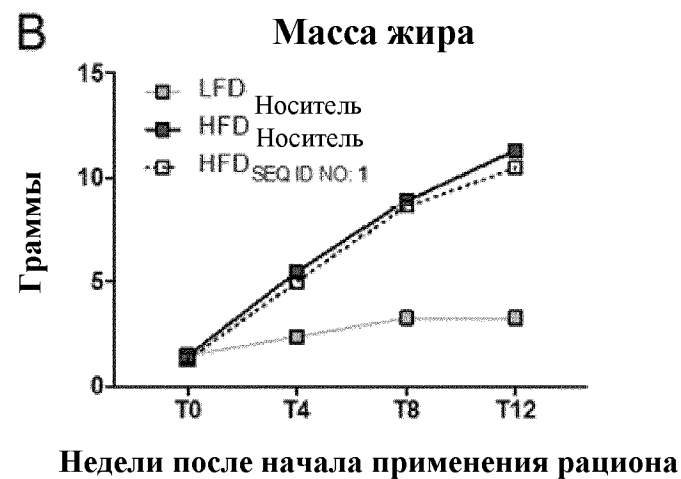
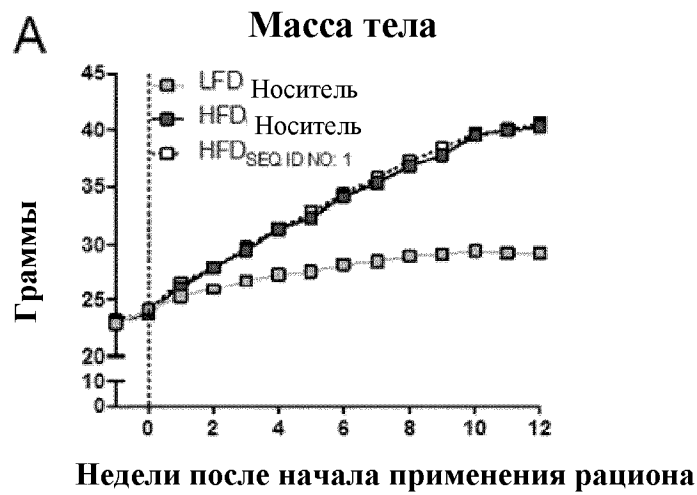
Фигура 3/7



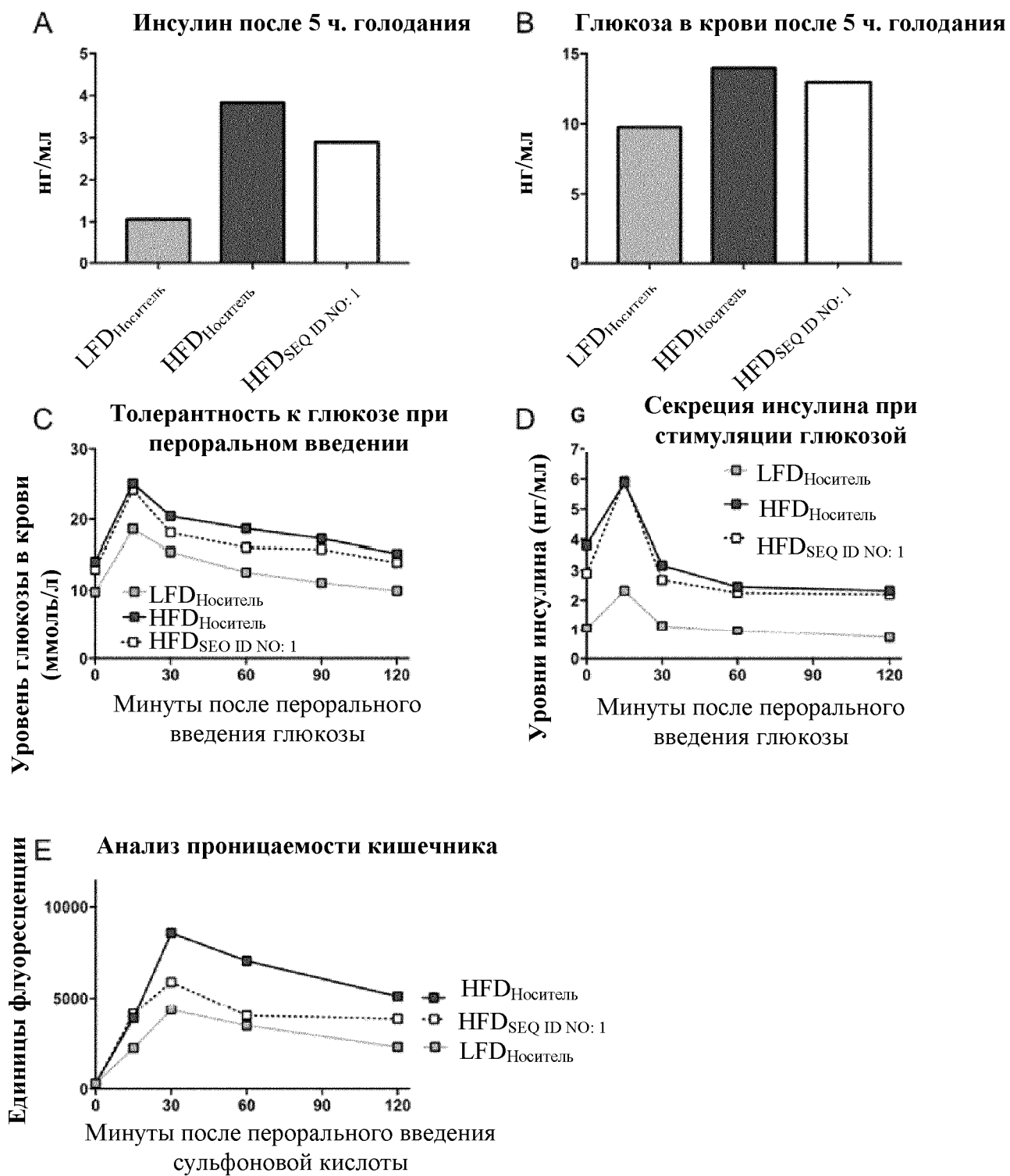
Фигура 4/7



Фигура 5/7



Фигура 6/7



Фигура 7/7