

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 100**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2018** **PCT/EP2018/050189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018** **WO18127532**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2018** **E 18701104 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2022** **EP 3565582**

54 Título: **Lisozima microbiana para su uso en el tratamiento del síndrome del intestino irritable o de la enfermedad inflamatoria intestinal**

30 Prioridad:

04.01.2017 EP 17150258

08.02.2017 EP 17155110

21.12.2017 EP 17209209

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

20.06.2022

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshoejvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

KJAERULFF, SOEREN;

COHN, MARIANNE THORUP y

KRISTENSEN, NANNA NY

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 915 100 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lisozima microbiana para su uso en el tratamiento del síndrome del intestino irritable o de la enfermedad inflamatoria intestinal

Referencia a la lista de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene una lista de secuencias en formato legible por ordenador.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se refiere a la lisozima microbiana y a composiciones que la comprenden para estabilizar la microbiota y suprimir el crecimiento y/o la colonización intestinal de patógenos bacterianos en el tubo digestivo(TD) para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento del síndrome del intestino irritable (SII) o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] La flora intestinal de los seres humanos contiene una gran cantidad de bacterias que juegan un papel importante en la salud intestinal de los seres humanos. El íleon distal contiene 10e7 a 10e8 bacterias principalmente anaeróbicas/gramo de contenido luminal, mientras que el colon tiene 10e11 a 10e12 colonias bacterianas/gramo, con predominio de las especies *Bacteroides*, *Clostridium* y *Bifidobacterium*. La inflamación intestinal crónica es la consecuencia de una respuesta inmune mediada por células demasiado agresivas a las bacterias entéricas comensales (endógeno normal) en un huésped genéticamente susceptible. La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad debilitante caracterizada por una inflamación intestinal crónica que a menudo muestra un curso intermitente con ataques agudos seguidos de periodos de remisión. Los síntomas clínicos durante los ataques agudos incluyen diarrea, sangrado, dolor abdominal, fiebre, dolor articular y pérdida de peso. La EII puede manifestarse en una variedad de formas, donde la más común es la enfermedad de Crohn (una inflamación transmural crónica del intestino, que puede afectar a todo el tubo digestivo) y la colitis ulcerosa (una enfermedad inflamatoria intestinal crónica que afecta al colon). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn se producen en áreas del tubo digestivo con las concentraciones más altas de bacterias lumbales.

[0004] La lisozima es un o-glicosil hidrolasa producida como mecanismo defensivo contra las bacterias por muchos organismos. La enzima provoca la hidrólisis de las paredes celulares bacterianas al romper los enlaces glicosídicos del peptidoglicano. Después de que sus paredes celulares se debiliten por la acción de la lisozima, las células bacterianas se lisan como resultado de una presión osmótica desequilibrada. Además, la lisozima puede degradar el peptidoglicano extracelular en fragmentos solubles, lo que parece limitar la inflamación. La lisozima se ha clasificado en cinco familias diferentes de glicosidos hidrolasas (GH) (CAZy, www.cazy.org): lisozima de clara de huevo de gallina (GH22), lisozima de clara de huevo de ganso (GH23), lisozima de bacteriófago T4 (GH24), proteína flagelar de *Sphingomonas* (GH73) y lisozimas de *Chalaropsis* (GH25). Las lisozimas de las familias GH23 y GH24 se conocen principalmente a partir de bacteriófagos y solo recientemente se han identificado en hongos. Se ha descubierto que la familia de lisozimas GH25 no está estructuralmente relacionada con las otras familias de lisozimas.

[0005] La lisozima se ha extraído tradicionalmente de la clara de huevo de gallina debido a su abundancia natural. La lisozima extraída de la clara de huevo de gallina es el principal producto disponible en el mercado comercial, pero no adhiere el ácido N,6-O-diacetilmurámico, por ejemplo, en las paredes celulares de *Staphylococcus aureus* son incapaces de lisar este importante patógeno humano, entre otros (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).

[0006] La WO2000/21381, la GB2379166 y la WO2004/026334 divulgan cada una una composición que comprende una lisozima GH22 de clara de huevo de gallina. La secuencia de aminoácidos madura de una lisozima GH25 de tipo salvaje de *Acremonium alcalophilum* se describe en la WO 2013/076253. La WO 2017/001703 divulga un alimento para animales o un aditivo de alimentos para animales, que comprende una lisozima GH25 de *Acremonium alcalophilum* o una lisozima GH24 de *Trichophaea saccata* para mejorar la producción del factor de eficiencia de producción europeo (EPEF) y/o la tasa de conversión alimenticia (FCR) de un animal monogástrico.

[0007] La US 2010/003235 A1 describe el uso de lisozima humana producida de forma recombinante contra la enfermedad inflamatoria intestinal. Maggie Lee *et al.* divulga en *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (vol. 57(6), 2009, págs. 2233-2240) suplementos de lisozima de clara de huevo de gallina en un modelo porcino que prueba la colitis inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS) en la inflamación intestinal. Existe la necesidad de una composición que, tras la administración, cambie la microbiota en beneficio de los seres humanos que tienen una microbiota indeseable, como los pacientes que padecen, por ejemplo, EII y/o SII. La presente invención proporciona un método para obtener dichos cambios.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 [0008] La invención proporciona lisozimas microbianas y composiciones que las comprenden para su uso en un método para prevenir, aliviar o tratar el síndrome del intestino irritable (SII) o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

10 [0009] En un aspecto, la lisozima microbiana o la composición que la comprende estabiliza la microbiota sana en el tubo digestivo(TD) y suprime el crecimiento y/o la colonización intestinal de patógenos bacterianos. En otro o más aspectos, la lisozima microbiana o la composición que la comprende previene, alivia o trata la inflamación y, en otro o aspecto adicional, la lisozima microbiana o la composición que la comprende reduce la deposición de lípidos ectópicos asociada con la obesidad, como, por ejemplo, obesidad inducida por la dieta.

15 [0010] En otro o más aspectos adicionales, la lisozima microbiana reduce la cantidad de células muertas de *Lactobacillus johnsonii*, o restos de pared celular de las mismas en el tubo digestivo.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA LISTA DE SECUENCIAS

20 [0011]

SEQ ID N.º: 1 es la secuencia de aminoácidos madura de una lisozima GH25 de tipo salvaje de *Acremonium alcalophilum*, como se describe en la WO 2013/076253.

25 SEQ ID N.º: 2 es la secuencia genética de la lisozima GH24 aislada de *Trichophaea saccata*.

SEQ ID N.º: 3 es la secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ ID N.º: 2.

30 SEQ ID N.º: 4 es la secuencia de aminoácidos madura de una lisozima GH24 de tipo salvaje de *Trichophaea saccata*.

SEQ ID N.º: 5 es la secuencia de aminoácido madura de una lisozima GH22 de tipo salvaje de *Gallus gallus* (lisozima de clara de huevo de gallina).

35 SEQ ID N.º: 6 es el cebador F-80470.

SEQ ID N.º: 7 es el cebador R-80470.

SEQ ID N.º: 8 es el cebador 8643.

40 SEQ ID N.º: 9 es el cebador 8654.

SEQ ID N.º: 10 es el cebador directo 27F.

45 SEQ ID N.º: 11 es el cebador inverso 534R.

SEQ ID N.º: 12 es una secuencia que representa el gen 16S ARNr clasificado como *Faecalibacterium prausnitzii*, como se describe en Duncan, S.H. *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (PT 6), 2141-2146 (2002) y presentado el 19 de septiembre de 2021 por Hold G.L. a *Gut Microbiology and Immunology*.

50 SEQ ID N.º: 13 es la secuencia de ADN genómico de una lisozima GH25 aislada de *Myceliophthora fergusii*.

SEQ ID N.º: 14 es la secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ ID N.º: 13.

55 SEQ ID N.º: 15 es la secuencia de aminoácido de la lisozima GH25 madura de *Myceliophthora fergusii*.

SEQ ID N.º: 16 es la secuencia de ADNc de una lisozima GH25 aislada de la especie *Lecanicillium WMM742*.

SEQ ID N.º: 17 es la secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ ID N.º: 16.

60 SEQ ID N.º: 18 es la secuencia de aminoácido de la lisozima GH25 madura de la especie *Lecanicillium WMM742*.

SEQ ID N.º: 19 es la secuencia de ADNc de una lisozima GH25 aislada de la especie *Zygomycetes XZ2655*.

65 SEQ ID N.º: 20 es la secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ ID N.º: 19.

SEQ ID N.º: 21 es la secuencia de aminoácidos de la lisozima GH25 madura de la especie *Zygomycetes* XZ2655.

5 SEQ ID N.º: 22 es la secuencia de ADNc de una lisozima GH25 aislada de *Malbranchea flava*.

SEQ ID N.º: 23 es la secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ ID N.º: 22.

SEQ ID N.º: 24 es la secuencia de aminoácidos de la lisozima GH25 madura de *Malbranchea flava*.

10 SEQ ID N.º: 25 es el ADN de codones optimizados de la lisozima GH25 aislada de *Hypholoma politrichi*.

SEQ ID N.º: 26 es la secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ ID N.º: 25.

15 SEQ ID N.º: 27 es la secuencia de aminoácido de la lisozima GH25 madura de *Hypholoma politrichi*.

SEQ ID N.º: 28 es la secuencia de ADNc de una lisozima GH25 aislada de *Engyodontium album*.

SEQ ID N.º: 29 es la secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ ID N.º: 28.

20 SEQ ID N.º: 30 es la secuencia de aminoácido de la lisozima GH25 madura de *Engyodontium album*.

FIGURAS

25 [0012]

La figura 1 muestra, por ejemplo 6, las puntuaciones brutas del daño colónico (A), la longitud del colon (B) y el peso húmedo del colon (C) de ratones tratados con dosis alta, media o baja de la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 15 o la SEQ ID N.º: 5, seguido de un tratamiento con dextrano sulfato de sodio (DSS, 3 %), en comparación con el control de vehículos, un tratamiento con la SEQ ID N.º: 1 sin DSS y un control de la enfermedad (tratamiento con DSS sin tratamiento con lisozima). Cada columna representa la media de n=10-12.

30 La Figura 2 muestra una comparación del desarrollo de peso del ejemplo 6 después del tratamiento con una dosis alta de la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 15 y la SEQ ID N.º: 5 en comparación con los controles. El gráfico de líneas que representa los cambios en el peso corporal de cada grupo en relación con el peso en el día -3 (cuando comenzó el tratamiento profiláctico). La exposición a DSS se inició el día 0. Cada línea corresponde a cada uno de los tratamientos indicados a lo largo del experimento (n=10-12).

40 La figura 3 muestra, para el ejemplo 6, una comparación del desarrollo del peso después del tratamiento con dosis alta, media y baja de la SEQ ID N.º: 1 (A), la SEQ ID N.º: 15 (B) o la SEQ ID N.º: 5 (C) en comparación con los controles. El gráfico de líneas representa los cambios en el peso corporal de cada grupo con respecto al peso en el día 3. Cada línea corresponde a cada uno de los tratamientos indicados a lo largo del experimento (n=10-12).

45 La figura 4 muestra, para el ejemplo 6, el efecto de la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 15 y la SEQ ID N.º: 5 sobre los niveles de citoquinas en el tejido de colon en el día 5 después del inicio de la exposición a DSS. Las concentraciones de TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-12 (E), IL-17a (F) & IL-25 (G) pr. mg de tejido de colon se muestran en respuesta a cada compuesto de prueba dosificado en concentración alta, media o baja en comparación con los controles. Cada columna representa la medida de n=10-12 ratones.

50 La figura 5 muestra, para el ejemplo 6, el efecto de la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 15 y la SEQ ID N.º: 5 sobre los niveles de citoquinas en el tejido del colon el día 5 después del inicio de la exposición a DSS. Las concentraciones de TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-12 (E), IL-17a (F) y IL-25 (G) pr. mg de tejido de colon se muestran en respuesta a cada compuesto de prueba dosificado en mol/día. Cada punto representa la medida de n=10-12.

55 La Figura 6 muestra el desarrollo del peso de los ratones del ejemplo 7 desde una semana antes del inicio de la dieta y durante todo el estudio (A), la masa grasa analizada en los puntos de tiempo indicados (B) y el peso del tejido al final (C). Cada columna/punto representa la media de n = 10-12.

60 La figura 7 muestra los ratones tratados, como se describe en el ejemplo 7: 5h de glucosa en sangre en ayunas (A), 5h de insulina en ayunas (B), niveles de glucosa en sangre en los puntos de tiempo indicados después de la exposición oral con 2 gramos de glucosa por kilo de masa magra (C), niveles plasmáticos de la respuesta de insulina endógena a la exposición de glucosa (D) y permeabilidad intestinal (E). Todas las medidas se realizaron después de 10 semanas de alimentación con dieta alta en grasas (HFD) y tratamientos de alimentación forzada diarios. Cada columna/punto representa la media de n = 10-12.

DEFINICIONES

5 [0013] **Obesidad inducida por la dieta:** la obesidad inducida por la dieta (DIO) es la obesidad causada por comer (seres humanos) o ser alimentados (modelo animal) con dietas ricas en grasa y/o de alta densidad.

10 [0014] **Deposición de lípidos ectópicos:** El término "deposición de lípidos" se usa para la deposición de grasa corporal. La grasa ectópica es el almacenamiento de triglicéridos dentro de las células del tejido no adiposo que contienen normalmente solo cantidades pequeñas de grasa, como el hígado, el músculo esquelético, el corazón y el páncreas. Por lo tanto, el término "deposición de lípidos ectópicos" significa grasa almacenada en tejidos, como el hígado, el músculo esquelético, el corazón y el páncreas.

15 [0015] **Faecalibacterium:** se conoce (Větrovský, 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) que la identidad de la secuencia genética 16S ARNr varía dentro de un género. Se ha demostrado que la identidad media es 95,56 con una desviación típica de 3,68. También se descubrió que el 12,2 % de los géneros contienen especies con una similitud media del gen 16S rRNA por pares inferior al 90 %.

20 [0016] La SEQ ID N.º: 12 contiene secuencias genéticas 16S ARNr clasificadas como género *Faecalibacterium prausnitzii*, como se describe en Duncan, S.H. *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (PT 6), 2141-2146 (2002) y presentado el 19 de diciembre de 2001 por Hold G.L. a *Gut Microbiology and Immunology*. Por lo tanto, las cepas se definen aquí como *Faecalibacterium*, en las que la identidad de secuencia de la región V1-V3 del gen 16S ARNr de dicha cepa tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % por ejemplo, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 12.

25 [0017] **Composición alimenticia:** una "composición alimenticia" es cualquier composición que se pueda administrar a un ser humano como alimento. Como se utiliza en este caso, una composición alimenticia es lo mismo que una "composición dietética".

30 [0018] **Fragmento:** el término "fragmento" significa un polipéptido o un dominio catalítico, que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del extremo amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido o dominio maduro; donde el fragmento tiene lisozima. En un aspecto, un fragmento comprende al menos 170 aminoácidos, como al menos 175 aminoácidos, al menos 177 aminoácidos, al menos 180 aminoácidos, al menos 185 aminoácidos, al menos 190 aminoácidos, al menos 195 aminoácidos o al menos 200 aminoácidos de la SEQ ID N.º: 1 y tiene actividad de lisozima.

35 [0019] En otro aspecto, un fragmento comprende al menos 210 aminoácidos, como al menos 215 aminoácidos, al menos 220 aminoácidos, al menos 225 aminoácidos, al menos 230 aminoácidos, al menos 235 aminoácidos o al menos 240 aminoácidos de la SEQ ID N.º: 4 y tiene actividad de lisozima.

40 [0020] En otro aspecto, un fragmento comprende al menos 170 aminoácidos, como al menos 175 aminoácidos, al menos 177 aminoácidos, al menos 180 aminoácidos, al menos 185 aminoácidos, al menos 190 aminoácidos, al menos 195 aminoácidos o al menos 200 aminoácidos de la SEQ ID N.º: 15 y tiene actividad de lisozima.

45 [0021] **Desregulación de glucosa:** el término "desregulación de glucosa" es un trastorno en el metabolismo y la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Los ejemplos de afecciones causadas principalmente por la desregulación de la glucosa incluyen hipoglucemia, hiperglucemia, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, síndrome X, síndrome metabólico y diabetes.

50 [0022] **Aumenta la proporción de bacterias de x en la microbiota del tubo digestivo:** el término "aumenta la proporción de bacterias de x en la microbiota del tubo digestivo" significa que la cantidad de bacterias de un taxonómico específico (por ejemplo, orden o género) ha aumentado en comparación con una muestra de control. Las muestras de microbiota se pueden tomar del intestino (es decir, el tubo digestivo) y analizar examinando las secuencias (lecturas) de los genes 16S ARNr en la muestra. Las lecturas de los genes 16S ARNr se pueden reagrupar según la identidad de la secuencia y cada clúster se puede comparar con una base de datos de secuencias conocidas del gen 16S ARNr para identificar el tipo de bacterias en ese clúster. Los clústeres se pueden mezclar diferentes niveles taxonómicos (filo, clase, orden, familia, género o especie) para brindar un análisis cuantitativo de la cantidad de bacterias dentro de cada nivel de taxonomía en toda la muestra.

55 [0023] Al comparar los clústeres a partir de una persona de control a una persona a la que se le administró una lisozima de la invención, se pueden determinar diferencias en la microbiota. Los ejemplos de dicha determinación incluyen diferencias, por ejemplo, en la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbiota extraída de animales o seres humanos administrada con una lisozima en comparación con un control no

administrado con una lisozima o la proporción de bacterias del orden *Clostridiales* en la microbiota extraída de animales o seres humanos administrada con una lisozima en comparación con el control.

[0024] **Aislado:** el término "aislado" significa una sustancia en una forma o un entorno que no se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia de origen no natural, (2) cualquier sustancia que incluya, pero no de forma limitada, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se elimina al menos parcialmente de uno o más o todos los componentes de origen natural con los que se asocia en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre con respecto a la sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada al aumentar la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los que se asocia naturalmente (por ejemplo, copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

[0025] **Actividad de lisozima:** el término "actividad de lisozima" significa la hidrólisis enzimática de los enlaces 1,4-beta entre el ácido *N*-acetilmurámico y los residuos de *N*-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano o entre los residuos de *N*-acetil-D-glucosamina en quitodextrinas, lo que da como resultado bacteriólisis debido a la presión osmótica. La lisozima pertenece a la clase de enzima EC 3.2.1.17. La actividad de lisozima se mide típicamente mediante determinación turbidimétrica. El método se basa en los cambios en turbidez de una suspensión de *Micrococcus luteus* ATCC 4698 inducidos por la acción lítica de la lisozima. En condiciones experimentales apropiadas, estos cambios son proporcionales a la cantidad de lisozima en el medio (c.f. SNI 1105 del compendio combinado de especificaciones de aditivos de alimentos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (www.fao.org)). Para los fines de la presente invención, la actividad de lisozima se determina según el ensayo de turbidez descrito en el ejemplo 5 ("Determinación de la actividad de lisozima"). En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención tienen una actividad de lisozima de al menos 20 %, como al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 100 % de la SEQ ID N.º: 1. En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención tienen una actividad de lisozima de al menos 20 %, por ejemplo, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 100 % de la SEQ ID N.º: 4. En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención tienen una actividad de lisozima de al menos 20 %, por ejemplo, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 100 % de la SEQ ID N.º: 15. **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación posterior a la traducción, como procesamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc.

[0026] **Dispositivo médico:** un dispositivo médico se entiende aquí como un producto que cumple con la definición de un dispositivo médico en la sección 201 (h) de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de Estados Unidos (FD&C), que incluye un instrumento, un aparato, un implemento, una máquina, un artificio, un implante, un reactivo *in vitro*, u otro artículo similar o relacionado, que incluye una parte de componente o un accesorio que esté reconocido en el Formulario Nacional Oficial, o en la Farmacopea de los Estados Unidos, o cualquier suplemento de los mismos, destinado a la cura, la mitigación, al tratamiento o la prevención de enfermedades, en el hombre o en otros animales, o destinado a afectar a la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre u otros animales, que no logra sus propósitos primarios previstos a través de la acción química dentro o sobre el cuerpo del hombre o de otros animales y que no depende de ser metabolizado para el logro de cualquiera de sus propósitos primarios previstos".

[0027] **Lisozima microbiana:** El término "lisozima microbiana" significa un polipéptido que tiene actividad de lisozima que se obtiene o puede obtenerse a partir de una fuente microbiana. Los ejemplos de fuentes microbianas son los hongos; es decir, la lisozima se obtiene o se puede obtener del reino *Fungi*, donde el término reino es el rango taxonómico. En particular, la lisozima microbiana se obtiene o se puede obtener del phylum *Ascomycota*, como el sub-phylum *Pezizomycotina*, donde los términos phylum y sub-phylum son los rangos taxonómicos.

[0028] Si no se conoce el rango taxonómico de un polipéptido, un experto en la técnica puede determinarlo fácilmente realizando una búsqueda BLASTP del polipéptido (por ejemplo, usando la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y comparándolo con los homólogos más cercanos. Un polipéptido desconocido, que es un fragmento de un polipéptido conocido, se considera que pertenece a la misma especie taxonómica. Un polipéptido natural desconocido o una variante artificial que comprende una sustitución, delección y/o inserción en hasta 10 posiciones se considera que pertenece a la misma especie taxonómica que el polipéptido conocido.

[0029] **Se obtiene o se puede obtener de:** el término "se obtiene o se puede obtener de" significa que el polipéptido se puede encontrar en un organismo de un rango taxonómico específico. En una forma de realización, el polipéptido se obtiene o puede obtenerse del reino *Fungi*, donde el término reino es el rango taxonómico. En una forma de realización preferida, el polipéptido se obtiene o se puede obtener del phylum *Ascomycota*, donde el término phylum es el rango taxonómico. En otra forma de realización preferida, el polipéptido se obtiene o se puede obtener del subphylum *Pezizomycotina*, donde el término subphylum es el

rango taxonómico. En otra forma de realización preferida, el polipéptido se obtiene o se puede obtener de la clase *Eurotiomycetes*, donde el término clase es el rango taxonómico.

[0030] Si no se conoce el rango taxonómico de un polipéptido, un experto en la técnica puede determinarlo fácilmente realizando una búsqueda BLASTP del polipéptido (usando, por ejemplo, la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y comparándolo con los homólogos más cercanos. Un polipéptido desconocido, que es un fragmento de un polipéptido conocido, se considera que pertenece a la misma especie taxonómica. Un polipéptido natural desconocido o una variante artificial que comprende una sustitución, delección y/o inserción en hasta 10 posiciones se considera que pertenece a la misma especie taxonómica que el polipéptido conocido.

[0031] **Unidad taxonómica operativa (OTU):** el término "unidad taxonómica operativa" significa un clúster de secuencias con un cierto grado de similitud. En este caso, se elige el 97 por ciento como el umbral para asignar secuencias del gen 16S ARNr a diferentes OTUs, lo que significa que todas secuencias dentro de una única OTU tienen una identidad de secuencia de al menos 97 por ciento. En este nivel de identidad, a menudo se considera (o asume) que cada OTU representa una única especie bacteriana.

[0032] **Brote posquirúrgico:** significa la intensificación de una enfermedad o afección después de la cirugía. Por lo tanto, con la expresión "prevenir, aliviar o tratar los brotes de SII y/o EII postquirúrgicos" se entiende que se previene, alivia o trata el riesgo de que aparezca SII y/o EII tras la cirugía.

[0033] **Prevención:** significa detener o dificultar una enfermedad, un trastorno o síntoma de una enfermedad o afección a través de alguna acción.

[0034] **Remisión** (de una afección): significa un periodo en el curso de una enfermedad en el que los síntomas se vuelven menos severos. Por lo tanto, con la expresión "mantener la remisión de SII y/o EII" se entiende que se previene o alivia el riesgo de reaparición de SII y/o EII.

[0035] **Identidad de secuencia:** La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia".

[0036] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453), como se implementa en el programa de agujas del paquete EMBOSS (EMBOSS: *The European Molecular Biology Open Software Suite*, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son la penalización de 10 por apertura de huecos, la penalización de 0,5 por extensión de huecos de y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de aguja etiquetada como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de la alineación} - \text{Número total de huecos en la alineación})$$

[0037] **Polipéptido sustancialmente puro:** el término "polipéptido sustancialmente puro" significa una preparación que contiene como mucho el 10 %, como mucho el 8 %, como mucho el 6 %, como mucho el 5 %, como mucho el 4 %, como mucho el 3 %, como mucho el 2 %, como mucho el 1 %, y como mucho el 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el que se asocia de forma nativa o recombinante. Preferiblemente, el polipéptido es al menos 92 % puro, por ejemplo, al menos 94 % puro, al menos 95 % puro, al menos 96 % puro, al menos 97 % puro, al menos 98 % puro, al menos 99 %, al menos 99,5 % puro y 100 % puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o mediante métodos de purificación clásicos.

[0038] **Composición terapéutica:** Una "composición terapéutica" es cualquier composición no alimenticia que comprende un ingrediente farmacéuticamente activo para la administración a un ser humano, que se usa para prevenir, aliviar o tratar una enfermedad. Los ejemplos de las composiciones terapéuticas incluyen, pero de forma no limitativa, un polvo, una pastilla, como una gragea o una pastilla efervescente, una cápsula, un componente de una emulsión o una pasta, una bolsita individual, goma de mascar o, en composiciones más generales, como gotas de aceite o en cualquier otro vehículo adecuado determinado por los expertos en la técnica como un vehículo eficaz para microorganismos.

[0039] **Variante:** el término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad de lisozima, que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección de uno o más (varios) residuos de aminoácidos en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir 1, 2 o 3 aminoácidos adyacentes e inmediatamente después del aminoácido que ocupa la posición.

[0040] En un aspecto, una variante de lisozima según la invención puede comprender de 1 a 5; de 1 a 10; de 1 a 15; de 1 a 20; de 1 a 25; de 1 a 30; de 1 a 35; de 1 a 40; de 1 a 45; o de 1 a 50, es decir, 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 o 50 alteraciones y tienen una actividad de lisozima de al menos 20 %, por ejemplo, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 100 % de la lisozima protegitora, como la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 4 o la SEQ ID N.º: 15.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0041] Se ha descubierto que una composición, como una composición alimenticia o farmacéutica o un dispositivo médico, que comprende una lisozima microbiana, cuando se proporciona a un ser humano, da como resultado un cambio en la microbiota, lo que puede ser beneficioso para mejorar la salud de los seres humanos.

[0042] En una forma de realización, una lisozima microbiana o una composición que comprende una lisozima microbiana se describe aquí para su uso en un método para prevenir, aliviar o tratar el síndrome del intestino irritable de (SII) y/o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). En una forma de realización, el método comprende proporcionar y administrar una composición, como, por ejemplo, una composición alimenticia o farmacéutica, que comprende una o más lisozimas microbianas. En una forma de realización, la lisozima microbiana se obtiene o se puede obtener del reino *Fungi*.

[0043] Por lo tanto, los inventores han descubierto que la lisozima microbiana es adecuada para administrar a pacientes que padecen el síndrome del intestino irritable (SII) y/o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

[0044] En una forma de realización, el método es prevenir, aliviar o tratar a pacientes que padecen el síndrome del intestino irritable (SII) y/o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) durante un periodo de remisión, donde el periodo de remisión es un periodo en el que la gravedad de los síntomas del SII y/o de la EII disminuye temporalmente. Una forma de realización es para prevenir, aliviar o tratar a pacientes que padecen la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa durante un periodo de remisión, donde el periodo de remisión es un periodo en el que la gravedad de los síntomas del SII y/o de la EII disminuye temporalmente.

[0045] La lisozima microbiana descrita aquí también se puede administrar para obtener un aumento de peso de, por ejemplo, personas, como ancianos hospitalizados. En una forma de realización, el método comprende administrar una o más lisozimas microbianas a pacientes después de la operación. En una forma de realización, el método sirve para controlar el peso, como, por ejemplo, para retener el peso a un nivel deseado. En una forma de realización, el método sirve para controlar el peso de pacientes hospitalizados con riesgo de pérdida de peso después de la cirugía o durante la hospitalización en general.

[0046] En una forma de realización, la invención se refiere a la una composición que comprende lisozima microbiana para su uso en la obtención del aumento de peso de una persona, donde el alimento o el aditivo alimentario comprende una o más lisozimas microbianas.

[0047] En una forma de realización, el peso aumenta al menos un 1 %, por ejemplo, al menos un 1,5 %, al menos un 2,0 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3 %, al menos un 3,5 %, al menos un 4 % o al menos un 5 % en comparación con un control que no recibió una composición que comprendiera lisozima microbiana. En otra forma de realización, el peso aumenta entre un 1 % y un 15 %, por ejemplo, entre un 1 % y un 12 %, entre un 1 % y un 10 %, un 1,5 % y un 8 %, un 2,0 % y un 7 % en comparación con el control, o cualquier combinación de estos intervalos. La invención, además, se refiere a polipéptidos que tienen actividad de lisozima para su uso contra *Lactobacillus johnsonii*. *Lactobacillus johnsonii* es una bacteria importante de la flora intestinal de los seres humanos. Sin estar ligado a una teoría particular, se cree que la eliminación de células muertas de *Lactobacillus johnsonii* de la flora intestinal, por medio de lisis enzimática de la pared celular bacteriana parcialmente degradada, es un contribuyente importante a la salud intestinal de un ser humano.

[0048] En una forma de realización de la invención, los polipéptidos para su uso según la invención tienen una actividad de lisozima mejorada en comparación con la actividad de lisozima de la lisozima de clara de huevo de gallina (SEQ ID N.º: 5) según lo determinado por el método para la determinación de la actividad de lisozima contra *Lactobacillus johnsonii*.

[0049] Z Se divulga un método para mejorar la salud intestinal en seres humanos, que comprende reducir la cantidad de células muertas de *Lactobacillus johnsonii*, o restos de la pared celular de las mismas, en el tubo digestivo, que comprende proporcionar un polipéptido, como se define por la invención a un ser humano.

[0050] Se describe un método para mejorar la salud intestinal en seres humanos, que comprende reducir la cantidad de células muertas de *Lactobacillus johnsonii*, o restos de la pared celular de las mismas, en el tubo digestivo, que comprende proporcionar un polipéptido seleccionado del grupo que consta de un polipéptido, que

tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 1.

5

[0051] Se describe un método para promover la eliminación de células muertas de *Lactobacillus johnsonii*, o restos de la pared celular de las mismas, del tubo digestivo que comprende proporcionar a un ser humano un polipéptido o una fuente de un polipéptido seleccionado del grupo que consta de un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 15, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 18, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 21, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 24, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 27 y un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 30 o un polipéptido o una fuente de un polipéptido seleccionado del grupo que consta de un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 1.

10

15

20

[0052] En los últimos años, un número cada vez mayor de estudios ha descrito claramente la importancia de *Faecalibacterium*, como un componente de la microbiota humana saludable. Por ejemplo, F. Prausnitzii, tiene una baja prevalencia en muchos trastornos intestinales, particularmente en pacientes con EII (*Current Opinion in Microbiology* 16(3), págs 1-7, julio 2013).

25

[0053] También se describen aquí composiciones, métodos y usos que son muy eficientes en el tratamiento o la prevención de afecciones asociadas con una baja abundancia de *Faecalibacterium* en el tubo digestivo. Además, se describen composiciones, métodos y usos que proporcionan un aumento de *Faecalibacterium* en el tubo digestivo.

30

[0054] En un aspecto, la lisozima microbiana es de la familia glicosil hidrolasa 24 (GH24) o de la familia glicosil hidrolasa 25 (GH25) y se obtiene o se puede obtener del reino *Fungi*.

35

[0055] En una forma de realización, la composición para su uso según la invención, como, por ejemplo, una composición alimenticia o farmacéutica, que comprende una o más lisozimas microbianas, puede usarse, por ejemplo, para estabilizar la microbiota saludable de los seres humanos mediante la supresión del crecimiento/la colonización intestinal de patógenos bacterianos, tales como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*, especies *Yersinia*, especies *Shigella* y especies *Salmonella*, tales como *Salmonella enterica* y *salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, especies *Enterococcus* y *Helicobacter pylori*. En otra forma de realización, una lisozima de la presente invención proporciona un efecto positivo sobre el equilibrio microbiano del tubo digestivo.

40

45

[0056] En una forma de realización, la composición para su uso según la invención aumenta la proporción de bacterias del orden *Clostridiales* en la microbiota del tubo digestivo. En una forma de realización, la proporción de bacterias del orden *Clostridiales* se incrementa en al menos un 1 %, por ejemplo, al menos un 1,5 %, al menos un 2 %, al menos un 2,5 %, al menos un 5 % o al menos un 7,5 %. En una forma de realización alternativa, la proporción de bacterias del orden *Clostridiales* se incrementa en un factor de al menos 1,25, como al menos 1,50, al menos 1,75, al menos 2,0, al menos 2,5 o al menos 3,0.

50

[0057] En una forma de realización, la lisozima microbiana es de origen fúngico. En una forma de realización, la lisozima microbiana se obtiene o se puede obtener del reino *Fungi*. En una forma de realización, la lisozima microbiana se obtiene o se puede obtener del phylum *Ascomycota*, como el sub-phylum *Pezizomycotina*. En una forma de realización, la lisozima microbiana se obtiene o se puede obtener de la clase *Eurotiomycetes*. En otra forma de realización, la lisozima microbiana se obtiene o se puede obtener del orden *Eurotiales*. En otra forma de realización más, la lisozima microbiana se obtiene o se puede obtener de la familia *Aspergillaceae*. En otra forma de realización mas, la lisozima microbiana se obtiene o se puede obtener del género *Aspergillus*.

55

60

[0058] En una forma de realización, la lisozima microbiana comprende uno o más dominios seleccionados de la lista que consta de GH24 y GH25. En una forma de realización, la lisozima microbiana comprende uno o más dominios de GH24. En una forma de realización, la lisozima microbiana comprende uno o más dominios de GH25.

[0059] También se describe aquí un método para aumentar la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbiota del tubo digestivo, donde el método comprende la administración de una composición, como una composición alimenticia o farmacéutica o un dispositivo médico, que comprende una lisozima microbiana. En una forma de realización, la lisozima microbiana se administra a un nivel de 8 a 250 ppm de proteína enzimática por kg de composición. En una forma de realización, la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* se incrementa en al menos un 1 %, por ejemplo, al menos un 2 %, al menos un 3 %, al

65

menos un 4 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 % o al menos un 20 %. En una forma de realización alternativa, la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* aumenta en un factor de al menos 1,25, por ejemplo, al menos 1,50, al menos 1,75, al menos 2,0, al menos 2,5 o al menos 3,0.

[0060] En una forma de realización, el método aumenta la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbiota del tubo digestivo, donde las bacterias del género *Faecalibacterium* comprenden 16S ARNr, que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, por ejemplo, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 12. En una forma de realización, la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* se incrementa en al menos un 1 %, por ejemplo, al menos un 2 %, al menos un 3 %, al menos un 4 % o al menos un 5 %. En una forma de realización alternativa, la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* se incrementa en un factor de al menos 1,25, por ejemplo, de al menos 1,50, al menos 1,75, al menos 2,0, al menos 2,5 o al menos 3,0.

[0061] En una forma de realización preferida, la invención se refiere a una lisozima microbiana o una composición que la comprende para su uso en un método para prevenir, aliviar o tratar el síndrome del intestino irritable (SII) y/o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que comprende administrar una composición, como, por ejemplo, una composición alimenticia o farmacéutica, que comprende una o más lisozimas microbianas para un paciente, donde:

(a) la lisozima microbiana es una lisozima microbiana que comprende uno o más dominios seleccionados de la lista que consta de GH24 y GH25; y

(b) opcionalmente, la lisozima microbiana se administra a diario durante al menos 5 días.

[0062] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a una lisozima microbiana o una composición, que la comprende para su uso en un método para prevenir, aliviar o tratar el síndrome del intestino irritable (SII) y/o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que comprende administrar una composición, como, por ejemplo, una composición alimenticia o farmacéutica, que comprende una o más lisozimas microbianas para un paciente, donde:

(a) la lisozima microbiana es una lisozima microbiana que comprende uno o más dominios seleccionados de la lista que consta de GH24 y GH25; y

(b) la lisozima microbiana se administra durante un periodo de remisión

(c) opcionalmente, la lisozima microbiana se administra a diario durante al menos 5 días, donde el periodo de remisión es un periodo en el que la gravedad de los síntomas del SII y/o de la EII disminuye temporalmente.

[0063] También se describe un método para aumentar la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbiota del tubo digestivo, que comprende administrar una composición, como, por ejemplo una composición alimenticia o farmacéutica o un dispositivo médico, que comprende una o más lisozimas microbianas, donde:

(a) la lisozima microbiana es una lisozima GH24, que se obtiene o se puede obtener del phylum *Ascomycota*, preferiblemente del sub-phylum *Pezizomycotina*; y

(b) la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbiota del tubo digestivo de un animal se incrementa en al menos un 1 %.

[0064] En otra forma de realización preferida, la divulgación se refiere a un método para aumentar la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbiota del tubo digestivo, que comprende administrar una composición, como, por ejemplo, una composición alimenticia o farmacéutica o un dispositivo médico que comprende una o más lisozimas microbianas, donde:

(a) la lisozima microbiana es una lisozima GH25 que se obtiene o se puede obtener del phylum *Ascomycota*, preferiblemente del sub-phylum *Pezizomycotina*;

(b) la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbiota del tubo digestivo de un animal se incrementa en al menos 1 %.

[0065] En otra forma de realización preferida, la divulgación se refiere a un método para aumentar la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbiota del tubo digestivo, que comprende administrar una composición, como, por ejemplo, una composición alimenticia o farmacéutica o un dispositivo médico, que comprende una o más lisozimas microbianas, donde:

(a) la lisozima microbiana es una lisozima GH24, que se obtiene o se puede obtener del phylum *Ascomycota*, preferiblemente del sub-phylum *Pezizomycotina*;

(b) la proporción de bacterias de género *Faecalibacterium* en la microbiota del tubo digestivo de un animal se incrementa en al menos un 1 %; y

(c) las bacterias de género *Faecalibacterium* comprenden 16S ARNr, que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, por ejemplo, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % con la SEQ ID N.º: 12.

[0066] En otra forma de realización preferida, la divulgación se refiere a un método para aumentar la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbioma del tubo digestivo, que comprende administrar una composición, como, por ejemplo, una composición alimenticia o farmacéutica o un dispositivo médico que comprende una o más lisozimas microbianas, donde:

(a) la lisozima microbiana es una lisozima GH25, que se obtiene o se puede obtener del phylum *Ascomycota*, preferiblemente del sub-phylum *Pezizomycotina*;

(b) la proporción de bacterias del género *Faecalibacterium* en la microbiota del tubo digestivo de un animal se incrementa en al menos 1 %; y

(c) las bacterias del género *Faecalibacterium* comprenden 16S ARNr, que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, por ejemplo, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 12.

[0067] En una forma de realización, la lisozima microbiana para su uso según la invención se dosifica a un nivel de 0,1 a 1000 ppm de proteína enzimática por kg de alimento, como de 1 a 1000 ppm o de 0,1 a 500 ppm, de 1 a 500 ppm, de 10 a 500 ppm, de 10 a 300 ppm o de 10 a 200 ppm de proteína enzimática por kg de alimento, o cualquier combinación de estos intervalos. En una forma de realización, la lisozima microbiana se dosifica a un nivel de 11 a 125 ppm de proteína enzimática por kg de alimento, como de 12 a 100 ppm, de 13 a 75 ppm, de 15 a 50 ppm, de 17,5 a 40 ppm, de 25 a 75 ppm o de 30 a 60 ppm de proteína enzimática por kg de alimento, o cualquier combinación de estos intervalos.

[0068] En una forma de realización, la lisozima microbiana es de origen fúngico. En una forma de realización, la lisozima microbiana se obtiene o se puede obtener del phylum *Ascomycota*, como el sub-phylum *Pezizomycotina*.

[0069] En una forma de realización, la lisozima microbiana tiene una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 1.

[0070] En una forma de realización, la lisozima microbiana comprende o consta la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 1 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma que tiene actividad de lisozima, donde el fragmento comprende al menos 170 aminoácidos, por ejemplo, al menos 175 aminoácidos, al menos 177 aminoácidos, al menos 180 aminoácidos, al menos 185 aminoácidos, al menos 190 aminoácidos, al menos 195 aminoácidos o al menos 200 aminoácidos. En otra forma de realización, la lisozima microbiana comprende o consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 1 o una variante alélica de la misma y una etiqueta His y/o etiqueta HQ N-terminal y/o C-terminal. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consta de aminoácidos de 1 a 208 de la SEQ ID N.º: 1.

[0071] En otra forma de realización, la lisozima microbiana es una variante de la SEQ ID N.º: 1, donde la variante tiene actividad de lisozima y comprende una o más sustituciones y/o una o más delecciones y/o una o más inserciones o cualquier combinación de las mismas en 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 o 50 posiciones. En otra forma de realización, el número de posiciones que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos y/o una o más delecciones de aminoácido y/o una o más inserciones de aminoácidos o cualquier combinación de las mismas en la SEQ ID N.º: 1 está entre 1 y 45, como 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 posiciones. En una forma de realización, el número de posiciones que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos y/o una o más delecciones de aminoácidos y/o una o más inserciones de aminoácidos o cualquier combinación de las mismas en la SEQ ID N.º: 1 no es más de 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra forma de realización, el número de sustituciones, delecciones y/o inserciones en la SEQ ID N.º: 1 no es más de 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra forma de realización, el número de sustituciones, delecciones y/o inserciones en la SEQ ID N.º: 1 no es más de 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra forma de realización, el número de sustituciones conservadoras en la SEQ ID N.º: 1 no es más de 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

[0072] Los cambios de aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservativas que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; pequeñas delecciones, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino- o carboxilo terminales, como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

- [0073] Los ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones comunes son 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 y Asp/Gly. Otros ejemplos de sustituciones conservadoras son G a A; A a G, S; V a I, L, A, T, S; I a V, L, M; L a I, M, V; M a L, I, V; P a A, S, N; F a Y, W, H; Y a F, W, H; W a Y, F, H; R a K, E, D; K a R, E, D; H a Q, N, S; D a N, E, K, R, Q; E a Q, D, K, R, N; S a T, A; T a S, V, A; C a S, T, A; N a D, Q, H, S; Q a E, N, H, K, R.
- [0074] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según los procedimientos conocidos en la técnica, como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la técnica anterior, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se analizan en cuanto a la actividad de lisozima para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar mediante análisis físico de la estructura, determinado por técnicas, tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones, o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, 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. La identidad de los aminoácidos esenciales también se puede deducir de un alineamiento con un polipéptido relacionado.
- [0075] La estructura cristalina de la lisozima de *Acremonium alcalophilum* CBS114.92 se resolvió en una resolución de 1.3 Å, como se describe en la WO 2013/076253. Estas coordenadas atómicas se pueden usar para generar un modelo tridimensional que represente la estructura de la lisozima de *Acremonium alcalophilum* CBS114.92 o estructuras homólogas (como las variantes de la presente invención). Usando la estructura de rayos X, los residuos de aminoácidos D95 y E97 (usando la SEQ ID N.º: 1 para la numeración) se identificaron como residuos catalíticos.
- [0076] En una forma de realización, la lisozima microbiana tiene una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 4.
- [0077] En una forma de realización, la lisozima microbiana usada en la invención comprende o consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 4 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma, que tiene actividad de lisozima, donde el fragmento comprende al menos 210 aminoácidos, por ejemplo, al menos 215 aminoácidos, al menos 220 aminoácidos, al menos 225 aminoácidos, al menos 230 aminoácidos, al menos 235 aminoácidos o al menos 240 aminoácidos. En otra forma de realización, la lisozima microbiana comprende o consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 4 o una variante alélica de la misma y una etiqueta His y/o etiqueta HQ N-terminal y/o C-terminal. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consta de los aminoácidos 1 a 245 de la SEQ ID N.º: 4.
- [0078] En otra forma de realización, la lisozima microbiana es una variante de la SEQ ID N.º: 4, donde la variante tiene actividad de lisozima y comprende una o más sustituciones y/o una o más delecciones y/o una o más inserciones o cualquier combinación de las mismas en 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 o 50 posiciones. En otra forma de realización, el número de posiciones que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos y/o una o más delecciones de aminoácidos y/o una o más inserciones de aminoácidos o cualquier combinación de las mismas en la SEQ ID N.º: 4 está entre 1 y 45, como 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 posiciones. En una forma de realización, el número de posiciones que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos y/o una o más delecciones de aminoácidos y/o una o más inserciones de aminoácidos o cualquier combinación de las mismas en la SEQ ID N.º: 4 no es más de 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra realización, el número de sustituciones, delecciones y/o inserciones en la SEQ ID N.º: 4 no es más de 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra forma de realización, el número de sustituciones, preferiblemente sustituciones conservadoras, en la SEQ ID N.º: 4 no es más de 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra forma de realización más, el número de sustituciones conservadoras en la SEQ ID N.º: 4 no es más de 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.
- [0079] Los cambios de aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservativas, que no afectan significativamente al plegamiento y/o a la actividad de la proteína; pequeñas delecciones, típicamente de 1-30 aminoácidos; extensiones amino- o carboxi terminales pequeñas,

como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido conector pequeño hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

5

[0080] Los ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y están descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones comunes son 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 y Asp/Gly. Otros ejemplos de sustituciones conservadoras son G a A; A a G, S; V a I, L, A, T, S; I a V, L, M; L a I, M, V; M a L, I, V; P a A, S, N; F a Y, W, H; Y a F, W, H; W a Y, F, H; R a K, E, D; K a R, E, D; H a Q, N, S; D a N, E, K, R, Q; E a Q, D, K, R, N; S a T, A; T a S, V, A; C a S, T, A; N a D, Q, H, S; Q a E, N, H, K, R.

10

15

20

25

[0081] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según los procedimientos conocidos en la técnica, como mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la técnica anterior, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se analizan en cuanto a la actividad de lisozima para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar mediante análisis físico de la estructura, determinado por técnicas, tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones, o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, 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. La identidad de los aminoácidos esenciales también se puede deducir de un alineamiento con un polipéptido relacionado.

30

35

[0082] La estructura cristalina de la lisozima de *Acremonium alcalophilum* CBS114.92 se resolvió en una resolución de 1.3 Å, como se describe en la WO 2013/076253. Estas coordenadas atómicas se pueden usar para generar un modelo tridimensional que represente la estructura de la lisozima de *Acremonium alcalophilum* CBS114.92 o estructuras homólogas (como las variantes de la presente invención). Uso la estructura de rayos X, los residuos de aminoácidos D95 y E97 (usando la SEQ ID N.º: 1 para la numeración) se identificaron como residuos catalíticos.

40

[0083] En una forma de realización, los polipéptidos que tienen actividad de lisozima tienen una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 15.

45

[0084] En una forma de realización, los polipéptidos que tienen actividad de lisozima tienen una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 18.

50

[0085] En una forma de realización, los polipéptidos que tienen actividad de lisozima tienen una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 21.

55

[0086] En una forma de realización, los polipéptidos que tienen actividad de lisozima tienen una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 24.

60

[0087] En una forma de realización, los polipéptidos que tienen actividad de lisozima tienen una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 27.

65

[0088] En una forma de realización, los polipéptidos que tienen actividad de lisozima tienen una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 30.

[0089] Anteriormente se describen ejemplos de cambios de aminoácidos, sustituciones conservadoras y conectores N- y/o C-terminales.

[0090] La administración de probióticos, definidos por la Organización Mundial de la Salud como "organismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al huésped", es una intervención nutricional segura en la población generalmente sana. Los probióticos se encuentran en el tracto intestinal humano y comúnmente están presentes en el yogur y otros artículos dietéticos y/o alimenticios (por ejemplo, bebidas, cereales y barritas de dulces).

Composición:

[0091] Las composiciones para su uso según la invención se pueden administrar en forma de alimentos o de suplementos dietéticos y pueden estar en cualquier forma líquida, sólida o semisólida. Pueden ser, por ejemplo, productos lácteos, tales como, por ejemplo, productos lácteos fermentados, que comprenden al menos dicha lisozima microbiana, opcionalmente combinada con otras bacterias, por ejemplo, con fermentos de yogur o queso, u otros productos alimenticios, tales como una barrita de *snack*, chocolate, o bebidas, como el zumo. Los ejemplos no limitativos de las composiciones alimenticias incluyen leche entera, desnatada, con sabor, yogur, que incluye yogur natural, con sabor, congelado o bebible, tónicos y bebidas deportivas, otros productos lácteos, tales como natillas, formulaciones de queso y requesón y helados.

[0092] Las composiciones alimenticias semisólidas se pueden seleccionar de pastas y productos para untar. Las composiciones sólidas pueden incluir barras alimenticias, galletas, cereales, fibras alimenticias, o cualquier otro alimento.

[0093] La lisozima microbiana también se puede proporcionar como un suplemento dietético en forma de un polvo, pastilla, como una gragea o pastilla efervescente, en forma capsular, como un componente de una emulsión o pasta, o en cualquier otro vehículo adecuado determinado por los expertos en la técnica como un vehículo eficaz para microorganismos vivos. Las composiciones que comprenden una lisozima microbiana pueden estar en sobres individuales, cápsulas, goma de mascar, o en composiciones más generales, como gotas de aceite.

[0094] En una forma de realización, la composición alimenticia es un producto final, que está listo ser consumido por parte de un consumidor. Por lo tanto, el consumidor puede comprarlo u obtenerlo de otro modo. Sin embargo, la composición alimenticia también puede ser un componente básico para la producción de otros alimentos.

[0095] La composición alimenticia, como se describe en este caso, puede comprender un vehículo. El término "vehículo" sugiere que la lisozima microbiana se distribuya por todo el vehículo y es conocida por el experto en la técnica. Los vehículos para su uso en la invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, harina natural, harina predesidratada, almidón, almidón modificado, proteínas vegetales, proteínas de leche, proteínas desnaturalizadas y alcohol de azúcar, como, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, dulcitol, xilitol o arabitól. Por lo tanto, el vehículo es el componente principal de la composición alimenticia. Preferiblemente, la cantidad total de lisozima microbiana en el vehículo es inferior al 5 % (p/p), más preferiblemente inferior al 2 % (p/p) o inferior al 0,5 % (p/p), en base a la cantidad combinada de vehículo y lisozima microbiana. En una forma de realización específica, la composición alimenticia consta de la lisozima microbiana y el vehículo. Sin embargo, la composición puede comprender aditivos. Preferiblemente, dichos aditivos también se distribuyen por todo el vehículo.

EJEMPLOS

Cepas

[0096] *Trichophaea saccata* CBS804.70 se adquirió de Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Países Bajos). Según la Oficina Central de Cultivos de Hongos (Central Bureau vor Schnimmelkulture), *Trichophaea saccata* CBS804.70 se aisló del suelo de la punta de residuos de carbón de Staffordshire, Inglaterra, en mayo de 1968.

[0097] Según la Oficina Central de Cultivos de Hongos, *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92 fue aislado por A. Yoneda en 1984 del lodo de compost de heces de cerdo cerca del lago Tsukui, Japón.

Medios y soluciones

5 [0098] El medio YP + glucosa al 2 % estaba compuesto por extracto de levadura al 1 %, peptona al 2 % y glucosa al 2 %

[0099] El medio YP + maltodextrina al 2 % estaba compuesto por extracto de levadura al 1 %, peptona al 2 % y maltodextrina al 2 %.

10 [0100] Las placas de agar PDA estaban compuestas por infusión de patata (la infusión de patata se hizo hirviendo 300 g de patatas en rodajas (lavadas, pero sin pelar) en agua durante 30 minutos y luego decantando o filtrando el caldo a través de una estopilla. Luego se añadió agua destilada hasta que el volumen total de la suspensión fue de un litro, seguido de 20 g de dextrosa y 20 g de agar en polvo. El medio se esterilizó en autoclave a 15 psi durante 15 minutos (*Bacteriological Analytical Manual*, 8ª edición, Revisión A, 1998).

15 [0101] Las placas LB estaban compuestas por 10 g de triptona Bacto, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio, 15 g de agar Bacto y agua desionizada hasta 1 litro.

20 [0102] El medio LB estaba compuesto por 10 g de triptona Bacto, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio y agua desionizada hasta 1 litro.

25 [0103] Las placas de sacarosa de COVE estaban compuestas por 342 g de sacarosa, 20 g de polvo de agar, 20 ml de solución de sales de COVE y agua desionizada hasta 1 litro. El medio se esterilizó en autoclave a 15 psi durante 15 minutos (*Bacteriological Analytical Manual*, 8ª edición, Revisión A, 1998). El medio se enfrió a 60 °C y se añadieron 10 mM de acetamida, 15 mM de CsCl, TRITON® X-100 (50 µl/500 ml).

[0104] La solución de sales de COVE estaba compuesta por 26 g de MgSO₄·7H₂O, 26 g de KCL, 26 g de KH₂PO₄, 50 ml de solución de metales traza de COVE y agua desionizada hasta 1 litro.

30 [0105] La solución de metales traza de COVE estaba compuesta por 0,04 g de Na₂B₄O₇·10H₂O, 0,4 g de CuSO₄·5H₂O, 1,2 g de FeSO₄·7H₂O, 0,7 g de MnSO₄·H₂O, 0,8 g de Na₂MoO₄·2H₂O, 10 g de ZnSO₄·7H₂O y agua desionizada hasta 1 litro.

35 **Ejemplo 1: Clonación, Expresión y Purificación de la lisozima GH25 de *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92**

[0106] La lisozima GH25 de *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92 (SEQ ID N.º: 1) se clonó y expresó como se describe en el ejemplo 2 y se purificó, como se describe en el ejemplo 5 de la WO 2013/076253.

40 **Ejemplo 2: Expresión de la lisozima GH24 de *Trichophaea saccata***

45 [0107] La cepa fúngica se cultivó en 100 ml de medio de glucosa YP + glucosa al 2 % en matraces de agitación Erlenmeyer de 1000 ml durante 5 días a 20 °C. Los micelios se recogieron de los matraces mediante filtración del medio a través de un embudo de vacío Buchner revestido con MIRACLOTH® (EMD Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Los micelios se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso. El ADN genómico se aisló usando un kit DNEASY® Plant Maxi (QIAGEN GMBH, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 [0108] La información de la secuencia genómica fue generada por Illumina MySeq (Illumina Inc., San Diego, CA). Se usaron 5 µgs del ADN genómico de *Trichophaea saccata* aislado para la preparación y el análisis de la biblioteca según las instrucciones del fabricante. Se empleó una estrategia de extremos emparejados de 100 pb con un tamaño de inserto de biblioteca de 200-500 pb. Se utilizó una mitad de una ejecución de HiSeq para obtener un total de 95.744.298, lecturas sin procesar de 100 pb. Posteriormente, las lecturas se fraccionaron al 25 % y luego se recortaron (se extrajeron las subsecuencias más largas con puntuaciones de Phred de 10 o más). Estas lecturas se ensamblaron usando la versión 0,19 de Idb. Se descartaron los contigs de menos de 400 pb, lo que dio como resultado 8.954.791.030 pb de bases con un N-50 de 10.035. Los genes se llamaron usando GeneMark.hmm ES versión 2.3c y la identificación del dominio catalítico se realizó usando el modelo oculto de Márkov "Phage lysozyme PF00959" proporcionado por Pfam. La secuencia de codificación del polipéptido para toda la región de codificación se clonó a partir de ADN genómico de *Trichophaea saccata* CBS804.70 mediante PCR usando los cebadores F-80470 y R-80470 (SEQ ID N.º: 6 y SEQ ID N.º: 7 respectivamente), como se describe a continuación.

5'- ACACAACCTGGGGATCCACCATGCACGCTCTCACCTTCT -3 (SEQ ID N.º: 6)

65 5'- CTAGATCTCGAGAAGCTTTTAGCACTTGGGAGGGTGGG -3 (SEQ ID N.º: 7)

[0109] Las letras en negrita representan la secuencia codificante de la enzima *Trichophaea saccata*. Los sitios de restricción están subrayados. La secuencia a la izquierda de los sitios de restricción es homóloga a los sitios de inserción de pDau109 (WO 2005/042735).

[0110] Se utilizó una mezcla de PCR extensora HIFI, concentración 2x (Thermo Scientific, n.º de catálogo AB-0795) para el experimento.

[0111] La reacción de amplificación (25 µl) se realizó según las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific n.º de catálogo AB-0795) con las siguientes concentraciones finales:
Mezcla de PCR:

0,5 µM de cebador F-80470

0,5 µM de cebador R-80470

12, 5 µl de mezcla de PCR extensora HIFI, concentración 2x

11, 0 µl de H₂O

10 ng de ADN genómico de *Trichophaea saccata* CBS804.70.

[0112] La reacción de PCR se incubó en un ciclador térmico de bloque dual DYAD® (BioRad, EE. UU.) programado para 1 ciclo a 94 °C durante 30 segundos; 30 ciclos cada a 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 60 segundos seguidos de 1 ciclo a 68 °C durante 6 minutos. Las muestras se enfriaron a 10° C antes de retirarlas y procesarlas más.

[0113] Tres µl de la reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% usando 40 mM de Tris base, 20 de mM acetato de sodio, 1 mM de tampón EDTA disódico (TAE). La reacción de PCR restante se purificó directamente con un kit de purificación de bandas de gel y ADN de PCR ILLUSTRATE™ GFX™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0114] Dos µg del plásmido pDau109 se digirieron con Bam HI y Hind III y el plásmido digerido discurrió en un gel de agarosa al 1%, tampón 50 mM de Tris base, 50 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA disódico (TBE) para eliminar el fragmento de relleno del plásmido restringido. Las bandas se visualizaron mediante la adición de tinción de gel de ADN seguro de SYBR® (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, EE. UU.) y el uso de un transiluminador de longitud de onda de 470 nm. La banda correspondiente al plásmido restringido se sacó y purificó usando un kit de purificación de bandas de gel y ADN de PCR ILLUSTRATE™ GFX™. El plásmido se eluyó en 10 mM de Tris, pH 8,0 y su concentración se ajustó a 20 ng por µl. Se usó un kit de clonación de PCR IN-FUSION® (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EE. UU.) para clonar el fragmento de PCR de 983 pb en pDau109 digerido con Bam HI y Hind III (20 ng). El volumen de reacción total de IN-FUSION® fue de 10 µl. El volumen de reacción total de IN-FUSION® fue de 10 µl. La reacción de IN-FUSION® se transformó en células de *E. coli* FUSION-BLUE™ (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se colocó en placas de agar LB suplementadas con 50 µg de ampicilina por ml. Tras la incubación durante toda la noche a 37 °C, se observó el crecimiento de colonias transformantes bajo selección en las placas LB suplementadas con 50 µg de ampicilina por ml.

[0115] Se seleccionaron varias colonias para el análisis mediante PCR de colonias usando los cebadores del vector pDau109, que se describen a continuación. Se transfirieron cuatro colonias de las placas LB suplementadas con 50 µg de ampicilina por ml con un alfiler de inoculación amarillo (Nunc A/S, Dinamarca) a nuevas placas LB suplementadas con 50 µg de ampicilina por ml y se incubaron durante la noche a 37 °C

Cebador 8653: 5'-GCAAGGGATGCCATGCTTGG-3' (SEQ ID N.º: 8)

Cebador 8654: 5'-CATATAACCAATTGCCCTC-3' (SEQ ID N.º: 9)

[0116] Cada una de las tres colonias se transfirió directamente a tubos de PCR de 200 µl compuestos por 5 µl de mezcla de PCR extensora HIFI 2X (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE. UU.), 0,5 µl de cebador 8653 (10 pm/µl), 0,5 µl de cebador 8654 (10 pm/µl) y 4 µl de agua desionizada. Cada PCR de colonia se incubó en un termociclador de bloque dual DYAD® programado para 1 ciclo a 94 °C durante 60 segundos; 30 ciclos cada uno a 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 60 segundos, 68 °C durante 10 minutos y 10 °C durante 10 minutos.

[0117] Tres µl de cada reacción de PCR completada se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % usando tampón TAE. Los cuatro transformantes de *E. Coli* mostraron una banda de PCR de aproximadamente 980 pb. El ADN del plásmido se aisló de cada una de las cuatro colonias usando un kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN GMBH, Hilden, Alemania). El ADN del plásmido resultante se secuenció con los cebadores 8653 y

8654 (SEQ ID N.º: 8 y 9) usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 3730 de Applied Biosystems usando la química de terminación BIG-DYE™ versión 3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE. UU). Se eligió un plásmido, denominado pKKSC0312-2, para transformar *Aspergillus oryzae* MT3568. *A. oryzae* MT3568 es un derivado del gen alterado amdS (acetamidasa) de *Aspergillus oryzae* JaL355 (WO 2002/40694), en el que se restauró la auxotrofia de pyrG inactivando el gen amdS de *A. oryzae*. Se prepararon rotoplastos de *A. oryzae* MT3568 según el método descrito en la patente europea EP0238023, páginas 14-15.

[0118] Se cultivó *E. coli* 3701, que contiene pKKSC0312-2, durante toda la noche según las instrucciones del fabricante (Genomed) y ADN del plásmido de pKKSC0312-2 usando un kit Plasmid Midi (Genomed JETquick kit, n.º de catálogo 400250, GENOMED GmbH, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El ADN del plásmido purificado se transformó en *Aspergillus oryzae* MT3568. Se prepararon rotoplastos de *A. oryzae* MT3568 de acuerdo con el método de Christensen *et al.*, 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Las placas de selección consistían en sacarosa de COVE con + 10 mM de acetamida +15 mM de CsCl + TRITON® X-100 (50 µl/500 ml). Las placas se incubaron a 37 °C. Brevemente, se añadieron 8 µl de ADN de plásmido que representaban 3 µg de ADN a 100 µl de rotoplastos MT3568. Se añadieron 250 µl de solución de PEG al 60 % y los tubos se mezclaron suavemente y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La mezcla se añadió a 10 ml de agarosa superior de Cove profundida (la agarosa superior se fundió y luego la temperatura se equilibró a 40 °C en un baño de agua caliente antes de añadirse a la mezcla de rotoplastos). A continuación, la mezcla combinada se sembró en dos placas de Petri de selección de sacarosa de Cove con 10 mM de acetamida. Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 días. Se identificaron colonias individuales transformadas de *Aspergillus* mediante crecimiento en placas utilizando la selección Acetamida como fuente de carbono. Cada uno de los cuatro transformantes de *A. oryzae* se inoculó en 750 µl de medio YP suplementado con glucosa al 2 % y también 750 µl de maltodextrina al 2 % y también DAP4C en placas profundas de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C estacionarios durante 4 días. Al mismo tiempo, los cuatro transformantes se volvieron a sembrar en medio de agar sacarosa de COVE-2.

[0119] Luego se analizó el caldo de cultivo de los transformantes de *Aspergillus oryzae* para la producción del polipéptido GH24 mediante SDS-PAGE usando geles NUPAGE® al 10 % Bis-Tris SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se observó una banda de proteína de aproximadamente 27 kDa para cada uno de los transformantes de *Aspergillus oryzae*. Se cultivó un transformante de *A. oryzae* en matraces de agitación Erlenmeyer de 1000 ml que contenían 100 ml del medio DAP4C a 26 °C durante 4 días con agitación a 85 rpm.

Ejemplo 3: Purificación de la lisozima GH24 de *Trichophaea saccata*

[0120] El sobrenadante de fermentación con la lisozima GH24 del ejemplo 3 se filtró a través de un filtro superior de botella de Fast PES con un corte de 0,22 µm. La solución resultante se diafiltró con 5 mM de acetato de sodio, pH 4,5 y se concentró (volumen reducido por un factor de 10) en una unidad de ultrafiltración (Sartorius) con una membrana de corte de 10 kDa.

[0121] Después del pretratamiento, se purificaron aproximadamente 275 mL de la solución que contenía lisozima mediante cromatografía en SP Sepharose (aproximadamente 60 ml) en una columna XK26, eluyendo la lisozima unida con un gradiente de 0 a 100 % de tampón A (50 mM de acetato de Na, pH 4,5) y tampón B (50 mM de acetato de sodio + 1 M de NaCl y pH 4,5) en 10 volúmenes de columna. Las fracciones de la columna se combinaron según el cromatograma (absorción a 280 y 254 nm) y el análisis SDS-PAGE.

[0122] El peso molecular, estimado a partir de SDS-PAGE, fue de aproximadamente 27 kDa y la pureza fue > 90 %.

Ejemplo 4: Otras características para la lisozima GH24 de *Trichophaea saccata*

[0123] La determinación de la secuencia N-terminal fue: YPVKTDL.

[0124] El peso molecular calculado a partir de esta secuencia madura es de 26205,5 Da (M+H)⁺.

[0125] El peso molecular determinado por análisis de peso molecular intacto fue de 26205,3 Da. (M+H)⁺.

[0126] La secuencia madura (a partir de datos de secuenciación N-terminal EDMAN, análisis de peso molecular intacto y análisis proteómico):

YPVKTDLHCRSSPSTSASIVRTYSSGTEVQIQCQTT-
GTSVQGSNVWDKTQHGCYVADYYVKTGHSGIFTTKCGSSSGGGCKPPPINAAT-
VALIKEFEFVFPKPAPDPIGLPTVGYGHLCKTKGCKEVPYSFPLTQETATKLLQSDIK-

TFTSCVSNYVKDSVKLNDNQYGALASWAFNVGCGNVQTSS-

LIKRLNAGENPNTVAAQELPKWKYAGGKVMPLVRRRNAEVALFKKPSSVQAHPPKC (SEQ ID NO: 4).

Ejemplo 5: Determinación de la actividad de lisozima

[0127] La actividad de lisozima se determinó midiendo la disminución (caída) en la densidad de absorbencia/óptica de una solución de *Micrococcus lysodeikticus* ATTC nº 4698 (Sigma-Aldrich M3770) o *Exiguobacterium undea* (DSM14481) resuspendidos medidos en un espectrofotómetro a 540 nm.

Preparación de sustrato de *Micrococcus lysodeikticus*

[0128] Antes de su uso, las células se resuspendieron en ácido cítrico - tampón de fosfato pH 6,5 a una concentración de 0,5 mg de células/ml y se midió la densidad óptica (DO) a 540 nm. A continuación, la suspensión celular se ajustó de forma que la concentración celular fuera igual a una DO₅₄₀ = 1,0. A continuación, la suspensión celular ajustada se almacenó en frío antes de su uso. Las células resuspendidas se usaron dentro de las 4 horas.

Preparación de células secas del sustrato *Exiguobacterium undae*

[0129] Se cultivó un cultivo de *E. undae* (DSM14481) en 100 mL de medio LB (Fluka 51208,25 g/L) en un matraz de agitación de 500 ml a 30 °C, 250 rpm durante la noche. A continuación, el cultivo durante toda la noche se centrifugó a 20 °C y 5000 g durante 10 minutos, y el sedimento se lavó dos veces con agua MilliQ estéril y se resuspendió en agua Milli-Q. Las células lavadas se centrifugaron durante 1 minuto a 13000 rpm y se decantó la mayor cantidad posible de sobrenadante. Las células lavadas se secaron en una centrífuga de vacío durante 1 hora. El sedimento celular se resuspendió en ácido cítrico - tampón de fosfato pH 4, 5 o 6 para que la densidad óptica (DO) a 540nm = 1.

Medición de la actividad antimicrobiana de la lisozima en el ensayo de turbidez

[0130] La muestra de lisozima que se va a medir se diluyó a una concentración de 100-200 mg de proteína enzimática/L en ácido cítrico - tampón de fosfato pH 4, 5 o 6, y se mantuvo en hielo hasta su uso. En una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) se añadieron 200 µL del sustrato a cada pocillo, y la placa se incubó a 37 °C durante 5 minutos en un lector de microplacas VERSAmax (Molecular Devices). Después de la incubación, la absorbancia de cada pocillo se midió a 540 nm (valor inicial). Para iniciar la medición de la actividad, se añadieron 20 µL de la muestra de lisozima diluida a cada sustrato (200 µL) y se inició la medición cinética de la absorbancia a 540 nm durante un mínimo de 30 minutos hasta 24 horas a 37 °C. La absorbancia medida a 540 nm se monitoreó para cada pocillo y a lo largo del tiempo se observa una caída en la absorbancia si la lisozima tiene actividad de lisozima. Los resultados se presentan en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Actividad de lisozima contra *Micrococcus lysodeikticus* y *Exiguobacterium undea* medida por la caída de densidad óptica

Lisozima	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ¹	<i>Exiguobacterium undae</i> ¹
Lisozima GH22 de <i>Gallus gallus</i> (SEQ ID N.º: 5)	+++ (pH 6)	+ (pH 6)
Lisozima GH24 de <i>Trichophaea saccata</i> (SEQ ID N.º: 4)	++ (pH 6)	++ (pH 6)
Lisozima GH25 de <i>A. Alcalophilum</i> (SEQ ID N.º: 1)	+ (pH 4)	+ (pH 5)
¹ - significa sin efecto; + significa efecto pequeño; ++ significa efecto medio; +++ significa gran efecto. El valor de pH entre paréntesis enumera el pH de ensayo basado en la combinación de sustrato y lisozima.		

[0131] Los datos confirman que la lisozima GH22 de *Gallus gallus*, la lisozima GH24 de *Trichophaea saccata* y la lisozima GH25 de *A. Alcalophilum* tienen actividad de lisozima.

Ejemplo 6 Ensayo *in vivo* en ratones: propiedades inmunomoduladoras en el modelo de ratón con colitis

Animales y alojamiento

[0132] Se alojaron aleatoriamente ratones hembra BalbC (6 semanas de edad al llegar, Charles Rivers UK Limited) en jaulas de 3 al llegar en función del peso con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas.

[0133] Se permitió un periodo de aclimatación de 14 días antes del inicio de los procedimientos experimentales.

5 Alimentación y tratamiento

[0134] Los ratones tenían acceso a comida estándar (dieta de mantenimiento RM1P, Special Diet Services, Reino Unido) *ad libitum*. El agua estaba disponible en botellas *ad libitum*.

10 [0135] Los ratones se reagruparon en números de 12. Los animales fueron tratados con alimentación forzada oral (< 20 mL/Kg) una vez al día con compuestos de prueba o vehículo según la tabla 2. La primera administración fue 2 días antes del tratamiento con dextrano sulfato de sodio (DSS) y continuó hasta el día anterior a la finalización del estudio (un total de 7 días de tratamiento).

15 Tabla 2: Diseño del estudio

Grupo	Tratamiento	DSS (+/-)	Dosis diaria (alimentación forzada oral)	
			[mg]	[mmol]
1	Vehículo	-	-	-
2	Vehículo	+	-	-
3	SEQ ID N.º: 1 (Alto)	-	0,93	4,05E-05
4	SEQ ID N.º: 1 (Alto)	+	0,93	4,05E-05
5	SEQ ID N.º: 1 (Medio)	+	0,20	0,85E-05
6	SEQ ID N.º: 1 (Bajo)	+	0,04	0,17E-05
7	SEQ ID N.º: 15 (Alto)	+	1,00	4,8E-05
8	SEQ ID N.º: 15 (Medio)	+	0,21	0,86E-05
9	SEQ ID N.º: 15 (Bajo)	+	0,04	0,17E-05
10	SEQ ID N.º: 5 (Alto)	+	1,07	7,47E-05
11	SEQ ID N.º: 5 (Medio)	+	0,22	1,54E-05
12	SEQ ID N.º: 5 (Bajo)	+	0,04	0,31E-05

Inducción de colitis con dextrano sulfato de sodio (DSS)

20 [0136] Para inducir la colitis, se añadió dextrano sulfato de sodio (DSS) al agua potable (3 % p/v). 5 días después de la administración de DSS, los animales se sacrificaron y se realizó un análisis de punto final, como se detalla a continuación. Se añadió DSS al agua potable inmediatamente después de la dosificación con los compuestos de prueba el día 0.

Parámetros y análisis experimentales

25 [0137] Se llevaron a cabo exámenes clínicos cuidadosos diariamente y se incluyeron observaciones de cambios en la piel, el pelaje, los ojos, las membranas mucosas, la aparición de secreciones y excreciones (por ejemplo, diarrea) y la actividad autónoma (por ejemplo, lacrimo, salivación, piloerección, tamaño de la pupila, patrón respiratorio inusual). También se observaron cambios en la marcha, la postura y la respuesta al manejo, así como la presencia de comportamientos extraños, temblores, convulsiones, sueño y coma. Además, se registró diariamente el peso de cada animal.

30 [0138] Se tomaron muestras de heces de todos los ratones el día -3 (antes del primer tratamiento con los compuestos de prueba) y el día 0 (justo antes de añadir DSS al agua potable). Las muestras se recogieron recientemente a través de la defecación natural de ratones individuales. Estas se recogieron en tubos Eppendorf estériles/sin ADNasa y se almacenaron a -80 °C.

35 [0139] 5 días después de añadir DSS al agua potable, los animales fueron sacrificados y se llevaron a cabo procedimientos de punto final descritos a continuación.

40 [0140] El colon se extrajo, lavó y abrió. La clasificación de la inflamación del colon se realizó de forma macroscópica usando un microscopio ligero y fue realizada por 2 observadores ciegos basados en el método de puntuación de Wallace. Los criterios para la puntuación del daño colónico fueron:

45 0 - Sin daños.

1 - Hiperemia. Sin úlceras.

2 - Hiperemia y engrosamiento de la pared intestinal. Sin úlceras.

3 - Una úlcera sin engrosamiento de la pared intestinal.

4 - Dos o más sitios de ulceración o inflamación.

5 - Dos o más sitios importantes de ulceración e inflamación o un sitio de ulceración/inflamación que se extiende > 1 cm a lo largo de la longitud del colon.

6-10 - Si el daño cubre > 2 cm a lo largo de la longitud del colon, la puntuación se incrementó en 1 para cada centímetro adicional.

[0141] El contenido del intestino ciego y el colon se extrajo en el momento del sacrificio, se congeló instantáneamente en tubos separados y se almacenó a -80 °C hasta su envío.

[0142] La mitad proximal del colon se extrajo siguiendo la puntuación de Wallace y se pesó. Cada muestra se colocó en un tubo Eppendorf y se congeló instantáneamente antes de almacenarse a -80 °C hasta que se usara para el análisis de citoquinas.

[0143] Se colocó una sección del colon proximal en un tubo de lisis que contenía solución de lisis (inhibidor de proteasa y reactivo de extracción de proteínas tisulares en una proporción de 1g de tejido de colon hasta 5 mL de solución de lisis). El tejido se homogeneizó 3 veces a 6800 rpm durante 30 s. Las muestras homogeneizadas luego se centrifugaron (1000 rpm durante 5 min a 4 °C) para extraer la proteína y el sobrenadante resultante se dividió en partes alícuotas para el análisis de citoquinas.

[0144] Se evaluó el sobrenadante de secciones de colon homogeneizadas para determinar los niveles de citoquinas usando un ensayo multiplex (Merck Millipore) para un rango de citoquinas específicas de Th1 y Th17 (IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17a, IL-25) utilizando un sistema Magpix (Luminex).

Resultados:

[0145] El tratamiento con DSS (3 % p/v) en el agua potable durante 5 días provocó un efecto inflamatorio en el colon de ratones en comparación con los animales de control expuestos a agua potable normal, como lo indica un aumento en la puntuación media de Wallace (figura 1A).

[0146] El tratamiento con la SEQ ID N.º: 1 inhibió de forma dependiente el efecto inflamatorio inducido por DSS. Se observó un efecto similar en la puntuación de Wallace después del tratamiento con la SEQ ID N.º: 5. La SEQ ID N.º: 15 también inhibió la inflamación inducida por DSS, aunque no tan eficaz como la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID N.º: 5 (Figura 1A).

[0147] La longitud del colon es un indicador de la gravedad de la lesión, ya que la colitis aumenta el edema y acorta la longitud total del colon. En el estudio actual, la longitud del colon en todos los grupos fue comparable, lo que confirma que solo se indujo una inflamación leve con DSS (figura 1B).

[0148] Debido a la inflamación, los pesos del colon en animales expuestos a DSS (3 % p/v) y tratados con tampón de vehículo aumentaron en comparación con los animales de control expuestos a agua potable normal. Sin embargo, el tratamiento con la SEQ ID N.º: 1 en animales expuestos a DSS provocó una reducción dependiente de la dosis en el aumento del peso del colon, que se observó en el grupo de control de la enfermedad. También se observó una tendencia dependiente de la dosis para reducir el peso del colon después del tratamiento con la SEQ ID N.º: 5; sin embargo, esto no fue tan pronunciado como para la SEQ ID N.º: 1, lo que indica un mejor rendimiento de la SEQ ID N.º: 1 en comparación con la SEQ ID N.º: 5. El tratamiento con la SEQ ID N.º: 15 no afectó al aumento de peso húmedo del colon inducido por DSS (figura 1C).

[0149] El peso de los ratones se monitoreó desde el día -3 cuando se inició el tratamiento profiláctico con controles o la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 15 o la SEQ ID N.º: 5. La ganancia de peso (día -3 - 0) fue comparable entre los grupos (figuras 2 y 3), el peso corporal continuó aumentando en todos los grupos durante este periodo, como se esperaba de ratones de esta edad. Desde el día 0, cuando se inició la exposición a DSS, hubo una aparente reducción leve en el peso corporal en todos los grupos de animales que recibieron DSS en su agua potable de aproximadamente 2 o 3 g de peso corporal para el día 4 (figuras 2 y 3). Se puede observar una inhibición dependiente de la dosis de esta pérdida de peso asociada con la colitis después del tratamiento con la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 15 o la SEQ ID N.º: 5 (figura 3), donde la SEQ ID N.º: 1 es la más eficaz de todas a la dosis más alta evaluada (figura 5).

[0150] El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es una citoquina proinflamatoria multifuncional secretada por una amplia variedad de células que incluyen monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos T.

[0151] Como era de esperar, el grupo de control de la enfermedad expresa un alto nivel de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17a e IL-25) en el colon en comparación con los animales de control sanos. Además, la citoquina proinflamatoria IL-12, así como la citocina reguladora IL-10, se inducen, aunque en menor grado, después de la exposición a DSS (figura 4).

[0152] El tratamiento con la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 15 y la SEQ ID N.º: 5 reduce los niveles de citoquinas inducidos por DSS de una manera dependiente de la dosis. La SEQ ID N.º: 15 solo tuvo un pequeño efecto sobre los niveles de citoquinas en el colon en comparación con la SEQ ID N.º: 1 y la SEQ ID N.º: 5. Sorprendentemente, la SEQ ID N.º: 1 fue generalmente más eficaz para reducir los niveles de citoquinas. En particular, para los impulsores claves de la inflamación TNF- α , IL-1b e IL-6 (figura 4).

[0153] La superioridad de la SEQ ID N.º: 1 sobre la SEQ ID N.º: 5 se ve aun más claramente cuando se tiene en cuenta el tamaño diferente de las proteínas, por lo tanto, la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 15 y la SEQ ID N.º: 5 tienen un tamaño de molécula de 23,0, 24,0 y 14,3 kDa, respectivamente. En la figura 5 se muestran los niveles de citoquinas en el colon como una función de mol de compuestos de prueba/ratón/día. Se puede ver claramente que la SEQ ID N.º: 1 en general no reduce los niveles de citoquinas de manera más efectiva que la SEQ ID N.º: 5.

[0154] En el estudio actual, a los ratones se les administro una concentración similar (mg/ratón/día) de cada uno de los compuestos de prueba; sin embargo, debido al diferente tamaño de las moléculas, esto significa que aproximadamente un 40 % menos de moléculas se dosificaron con la SEQ ID N.º: 1 y la SEQ ID N.º: 15 en comparación con la SEQ ID N.º: 5; sorprendentemente, a pesar de esto, el rendimiento inmunomodulador de la SEQ ID N.º: 1 fue mejor que el de la SEQ ID N.º: 5.

[0155] En resumen, el DSS (3 % p/v.) añadido al agua potable durante 5 días provocó un efecto inflamatorio en el colon, como se esperaba. Esto fue evidente con respecto a la puntuación de Wallace como índice de inflamación y el aumento del peso del colon. Las citoquinas Th1 y Th17 evaluadas también respaldaron un efecto inflamatorio inducido por DSS.

[0156] El tratamiento (del día 3 al día 5) con la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 15 o la SEQ ID N.º: 5 provocó un efecto inhibitor consistente en la reducción del efecto inflamatorio inducido por DSS en el colon. Esto se observó tanto con una reducción en los niveles de citoquinas proinflamatorias como la inflamación resultante observada (según lo indicado por la puntuación de Wallace). La SEQ ID N.º: 1 fue el compuesto más eficaz para reducir la inflamación y mejorar la salud de los animales, lo que indica que el tratamiento con la SEQ ID N.º: 1 tiene un efecto protector potencial para prevenir la colitis en el hombre.

Ejemplo 7 Ensayo *in vivo* en ratones: Eficacia de la modulación microbiana intestinal sobre la obesidad inducida por la dieta y la tolerancia a la glucosa

Animales y alojamiento

[0157] 36 ratones macho C57BL/6J (Jackson Lab, Bar Harbor, Maine, EE. UU.), de 6 semanas de edad al llegar, se asignaron aleatoriamente a grupos experimentales en función de su peso corporal en el momento de la inscripción, lo que garantiza la misma desviación estándar y peso corporal promedio en todos los grupos. Se alojaron 3 ratones por jaula con 12 ratones/4 jaulas por grupo y se aclimataron a una dieta de referencia baja en grasas (LFD) durante 12 días antes del comienzo del experimento.

Alimentación y tratamiento

[0158] Los ratones fueron alimentados con alimento peletizado sin teñir *ad libitum* cambiado tres veces por semana con medición del consumo de alimentos. Los ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasas y sacarosa (HFD, D12451, Research Diet) o una dieta de referencia baja en grasas (LFD, D12450H, Research Diet). El alimento fue almacenado a 4 °C hasta su uso (según las instrucciones del fabricante).

[0159] El agua estéril estaba disponible en botellas *ad libitum* y se cambiaba semanalmente.

Parámetros y análisis experimentales

[0160] Los compuestos de prueba o el vehículo (PBS pH 7,4, Ref: 10010-023, Gibco) se administraron por alimentación forzada oral diaria (aguja 25G) de 100 μ L a las 10:00. La SEQ ID N.º: 1 de ~5 mg/mL se almacenó a -20 grados hasta su uso.

[0161] La composición corporal de los ratones individuales se evaluó mediante el promedio de tres medidas de exploraciones de resonancia magnética (RM) (Minispec LF90, Bruker, calibrado diariamente cuando está en uso) en las semanas 0, 4, 8, y 12 del protocolo experimental. Las heces frescas se recolectaron al mismo tiempo que

las exploraciones por RM al comienzo del ciclo de luz (8 :00 $\pm$ 1 hora) antes de la alimentación forzada diaria. Las muestras se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

[0162] Se evaluó una prueba de tolerancia oral a la glucosa junto con la secreción de insulina estimulada por glucosa y la permeabilidad intestinal en la semana 10 del protocolo experimental. Los ratones se mantuvieron en ayunas a las 8:00 durante 5 h y fueron alimentados de manera forzada a las 10:00. Se realizaron mediciones de glucosa en sangre en ayunas durante 5 h (OneTouch Vario Flex, LifeScan) y muestras de sangre de la vena caudal antes de la alimentación forzada oral con 4 μ L/g de masa magra de solución de dextrosa al 50 % y 150 μ L de solución de ácido sulfónico. La solución de ácido sulfónico consistió en 1,5 mg de fluoresceína-5 y (6)-ácido sulfónico (Invitrogen) disuelto en 150 μ L de suspensión de sal de sodio de carboximetilcelulosas (CMC) al 0,5 % (viscosidad media, Sigma) en agua destilada. La glucosa en sangre se midió a partir de la punción de la vena caudal en los puntos de tiempo 0, 15, 30, 60, 90, y 120 min después de la exposición a la dextrosa y se tomaron muestras de sangre para la insulina y la permeabilidad intestinal en tubos capilares preparados con EDTA (Microvette CB300, Sarstedt) en puntos de tiempo 0, 15, 30, 60 y 120 min después de la exposición. Los ratones recibieron 0,5 mL de solución salina (cloruro de sodio al 0,9 %, Hospira) después del procedimiento, lo que les permitió a los ratones rehidratarse. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 min a 1000 rcf a temperatura ambiente. Para las mediciones de insulina, los primeros 5 μ L de plasma se transfirieron a placas de PCR de 96 pocillos en hielo seco y se mantuvieron a -80 °C hasta el posterior procesamiento. Los siguientes 5 μ L de plasma, usados para la prueba de permeabilidad intestinal, se transfirieron a placas negras de botón óptico de 96 pocillos (Nunc) y se mantuvieron en hielo húmedo hasta que se añadieron 150 μ L de CMC al 0,5 % en agua destilada y se mezclaron íntegramente. La placa se leyó en un lector de microplacas Synergy HT (BioTek) a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/528 nm. Los niveles de insulina se midieron mediante ELISA de insulina ultrasensible de ratón (Ref: 80-INDMSU-E10, Lote: 06489, Alpco) siguiendo el protocolo del fabricante y se cuantificaron en el lector de etiquetas múltiples EnSpire 2300 (PerkinElmer).

[0163] La necropsia se realizó en la semana 12 del protocolo experimental. Los ratones se mantuvieron en ayunas desde las 7:15 $\pm$ 15 min y fueron alimentados de manera forzada a las 10:00. La eutanasia se realizó en orden alterno. Los ratones se anestesiaron con isoflurano (3 % en 65 % N₂, 35 % O₂, Fresenius Kabi). Al primer y último ratón de cada jaula de 3 se les inyectó por vía intravenosa 2 μ L/g de insulina de peso corporal (Humulin 100 mU/mL diluida a 1,9 mU/ μ L, Lilly) 5 min antes de la eutanasia. A uno de los tres (segundo ratón) se le inyectó una solución salina de 2 μ L/g de peso corporal (cloruro de sodio al 0,9 %, Hospira). La punción cardíaca se realizó usando una aguja 25G y una jeringa de 1 mL recubierta con EDTA. La sangre se transfirió a tubos Eppendorf que contenían 1 μ L de inhibidor DPP IV (Millipore) y 1 μ L de un cóctel inhibidor de proteasa (P8340, Sigma). Las muestras se centrifugaron a 1000 rcf durante 10 min y el plasma se dividió en partes alícuotas por triplicado, se colocó en hielo seco y se transfirió a almacenamiento a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

[0164] Recolección de tejido: Se midió el peso del hígado, páncreas, TABe, TABi, TABr, TAMI, corazón, cuádriceps, gastrocnemio, cerebro y colon y los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Los tejidos fueron seccionados por el mismo operador y tomados en el mismo orden para todos los ratones. El cerebro se congeló en nitrógeno líquido < 60 seg. *post mortem*. Se midió la longitud del intestino delgado (desde el estómago hasta el intestino ciego) y el colon (desde el intestino ciego hasta el recto) y se mantuvo en una placa de plexiglás enfriada con hielo húmedo subyacente durante todo el tiempo de manipulación. El duodeno se consideró los primeros 5 cm del intestino delgado y el resto del tejido del intestino delgado se dividió en 3 partes de igual longitud. Se descartaron los primeros 3 y los restantes 2/3 proximales del intestino delgado se categorizaron como yeyuno. Se descartaron los primeros 3 cm del 1/3 distal del intestino delgado y el tejido restante se categorizó como íleon. El cm más proximal de duodeno, yeyuno, íleon y colon se guardó para histología en solución de Carnoy (para preservar la integridad de la capa mucosa), que constaba de 60 % de metanol, 30 % de cloroformo y 10 % de ácido acético glacial antes de vaciar los tejidos intestinales. El contenido del intestino delgado, intestino ciego y colon se aisló mediante presión mecánica, se congeló en hielo seco y posteriormente se almacenó a -80 °C. El tejido del duodeno, yeyuno, íleon, colon e intestino ciego se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Los tejidos metabólicos para histología de hígado, TABe, TABi, y TAMI se conservaron en una solución de paraformaldehído al 4 % durante 72 horas, seguido de conservación en etanol al 70 %. El tejido hepático se conservó adicionalmente en Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek) para permitir la tinción histológica de lípidos Oil Red O.

Resultados

[0165] La alimentación con HFD indujo obesidad severa inducida por dieta desde la semana 2 y durante todo el experimento. El tratamiento con la SEQ ID N.º: 1 no protegió contra el aumento del peso corporal (figura 1A). Sin embargo, cuando se analizó la composición corporal mediante exploración por resonancia magnética, los ratones tratados con la SEQ ID N.º: 1 parecían haber disminuido la masa grasa en la semana 12, pero no en ninguna de las semanas anteriores (figura 1B), lo que sugiere que el tratamiento con la SEQ ID N.º: 1 puede mejorar la acumulación de grasa en ratones obesos inducidos por dieta (figura 1C) sin afectar al desarrollo del peso corporal (figura 1A).

[0166] La alteración de la regulación de la glucosa está estrechamente relacionada con una variedad de enfermedades mediadas por el estilo de vida. Por lo tanto, probamos si el tratamiento con la SEQ ID N.º: 1 podría mejorar las anomalías glucorregulatorias inducidas por HFD independientemente de la obesidad inducida por la dieta. El aumento de la insulina en ayunas (hiperinsulinemia) y la glucosa en sangre en ayunas (hiperglucemia) son marcadores biológicos de la resistencia a la insulina y ambos parámetros mejoraron en los ratones tratados con la SEQ ID N.º: 1 en comparación con los ratones de control alimentados con HFD (figura 2A-B). La regulación de la glucosa mejorada se vio reforzada por la prueba de tolerancia a la glucosa, donde los ratones tratados con la SEQ ID N.º: 1 eliminaron la exposición a la glucosa de manera más eficiente que los ratones de control alimentados con HFD (figura 2C). La tolerancia a la glucosa mejorada no se explicó por la mayor capacidad de secreción de insulina de las células beta (figura 2D), lo que sugiere una sensibilidad a la insulina mejorada en los tejidos metabólicos de los ratones tratados con la SEQ ID N.º: 1. Combinados, estos datos indican que la SEQ ID N.º: 1 protege contra la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad; un denominador común de la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares.

[0167] La inflamación metabólica inducida por HFD es causada con mayor frecuencia por una función de barrera intestinal disminuida (intestino permeable), que permite un aumento de los niveles circulantes del componente de la pared celular bacteriana, el lipopolisacárido (LPS). Para probar la función de barrera intestinal, exponemos a los ratones por vía oral con 150µl de sal de sodio de carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5 %, solución de ácido (6)-sulfónico de fluoresceína-5 al 1 % y medimos la fluorescencia en muestras de plasma extraídas de la vena caudal en 0, 15, 30, 60 y 120 minutos después de la exposición. Los ratones tratados con la SEQ ID N.º: 1 mostraron una mayor función de barrera, lo que indica que la SEQ ID N.º: 1 alivia la inflamación metabólica inducida por HFD.

Ejemplo 8 Método para la determinación de la actividad de lisozima contra *Lactobacillus johnsonii* (A).

Extracción de PGN:

[0168] Cultivo de *Lactobacillus johnsonii*:

Materiales

[0169]

Caldo MRS, número de producto BD 288130, pH 6,3-6,7.

Placas de agar MRS, BD 288130; Agar Oxoid LP0011; pH 6,3-6,7.

NaCl al 0,9 %, Merck 106404, Cas n.º: 7647145

Jars, proveedor Merck 116387, frasco anaeróbico Anaerocult 2,5 L

Anaerogen 2,5 L, ThermoScientific, catálogo n.º: AN0025A

Lactobacillus johnsonii, DSM10533

Procedimiento

[0170] *L. johnsonii* se sembró a partir de stock congelado a una placa de agar MRS y se incubó en condiciones anaeróbicas durante 2 días, frasco anaeróbico con Anaerogen 2,5 L, 30 °C. Algunas colonias se inocularon de 500 ml de caldo MRS en una botella de tapa azul de 500 ml y se colocaron en un frasco anaeróbico con Anaerogen 2,5 L durante 72 horas a 30 °C.

[0171] Se centrifugó el cultivo (6000 rpm, 10 minutos) y el se vertió el sobrenadante antes de realizar otra ronda de centrifugación. El sedimento se lavó en 100 ml de NaCl al 0,9 % y la suspensión se mezcló bien y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos. Se vertió el sobrenadante y se repitió el procedimiento de lavado en NaCl al 0,9 % hasta un total de tres lavados. Se añadieron al sedimento aproximadamente 40 ml de NaCl al 0,9 % y la solución se transfirió a un tubo falcon de 50 ml. La solución se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos y se vertió el sobrenadante. El sedimento se almacenó a -18 °C hasta que se realizó la extracción del peptidoglicano.

Procedimiento de extracción:

Materiales

[0172] Proteasa de *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich P5147, CAS 9036-06-0

PBS pH 7,3:

- NaCl: 8 g, Sigma-Aldrich 31434, CAS 7647-14-5
- KCl: 0,2 g, Sigma-Aldrich P9333, CAS 7447-40-7
- KH_2PO_4 : 0,24 g, Sigma-Aldrich P5655, CAS 7778-77-0
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 1,44 g, Sigma-Aldrich 30412, CAS 10028-24-7
- Añadir agua Milli-Q a 1000 mL

Solución Triton-X 100 al 1%:

- 1 mL de Tritón X100, Sigma-Aldrich X100, CAS 9002-93-1
- Añadir agua Milli Q a 100 mL

500 mM de tampón de carbonato de sodio, pH 9,3:

- 500 mM de carbonato de sodio se elabora a partir de 21 g de Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich S7795, CAS 497-19-8). Los 500 mM de bicarbonato de sodio de agua MQ se elaboran a partir de 72 g de NaHCO_3 (Sigma-Aldrich S6014, CAS 144-55-8) en 500 mL de agua PM
- El tampón de pH 9,3 se elabora a partir de 320 mL de NaHCO_3 y 80 mL de Na_2CO_3 y ajustando el pH con HCl

Solución de fenol con 10 mM de Tris HCl, pH 8,0, 1 mM de EDTA, Sigma-Aldrich P4557, CAS 108-95-2

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

Etanol, 96%, CCS cuidado de la salud 1680643, CAS 64-17-5

Procedimiento

[0173] El material celular de *L. Johnsonii* se liofilizó. El material liofilizado (525 mg) se suspendió en PBS (40 mL) en un tubo falcon de 50 mL. La suspensión se agitó durante 2 h a 700 rpm en un termoagitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadió proteasa de *Streptomyces griseus* (55 mg) y la suspensión se incubó 6 h a 37 °C en el termoagitador. Luego se centrifugó 20 min a 1900 g a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en Tritón X-100 al 1 % (40 mL) y se agitó durante toda la noche a 37 °C. Después de otra centrifugación y decantación, el sedimento se resuspendió en PBS (40 mL) y se añadió nuevamente proteasa (55 mg). La suspensión se incubó de nuevo 6 h a 37 °C, se centrifugó y se decantó. El sedimento se resuspendió en PBS (40 mL) y se agitó durante toda la noche a 37 °C. Este procedimiento de lavado se repitió una vez más con PBS (40 mL, 30 min de agitación), luego con etanol/agua al 50 % (40 mL, 30 min de agitación). A continuación, el sedimento se dividió en dos tubos Falcon. A cada tubo se le añadió solución de fenol (15 mL) precalentada a 40 °C. Las suspensiones se agitaron 10 min a 40 °C y luego se añadió etanol al 96 % (25 mL a cada tubo), se centrifugaron y se decantaron. Los sedimentos se lavaron adicionalmente con acetona (40 mL en cada tubo) y etanol al 96 % (40 mL en cada tubo), antes de liofilizarse. La combinación de los sedimentos de dos tubos produjo 80 mg de peptidoglicano purificado como un polvo blanco.

Ensayo final reductor

[0174] La lisozima se diluyó en tampón de dilución de fosfato (5 mM de citrato, 5 mM de K_2HPO_4 , TritonX-100 al 0,01%, pH 5,0) hasta 50 µg/mL en tubos de polipropileno, dependiendo de la fuerza de las soluciones madre disponibles. La lisozima diluida se diluyó aun más en una placa de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos mediante la preparación de una serie de diluciones dobles hasta una concentración de 6,3 µg/mL en tampón de dilución de fosfato (5 mM de citrato, 5 mM de K_2HPO_4 , TritonX-100 al 0,01 %, pH 5,0). Se preparó una solución madre de 50 mg/ml de sustrato de *L. Johnsonii* en MilliQ y se diluyó en tampón de fosfato (50 mM de citrato, 50 mM de K_2HPO_4 , pH 5,0) hasta 250 µg/ml. En una placa deepwell de polipropileno se mezclaron 50 µL de la dilución de lisozima con 450 µL de solución de *L. Johnsonii* y se incubaron a 40 °C con agitación (500 rpm) durante 45 min. Tras la incubación, la placa deepwell se centrifugó (3200 rpm, 7 min) para sedimentar el material insoluble y se mezclaron 100 µL del sobrenadante con 50 µL de 3,2 M de HCl en una placa PCR de 96 pocillos y se incubó a 95 °C durante 80 min. Se añadieron 50 µL de 3,5 M de NaO a cada pocillo de la placa PCR y se transfirieron 150 µL de cada muestra a una nueva placa PCR que contenía 75 µL/pocillo de solución 4-

hidroxibenzhidrazida (PAHBAH) en tampón K-Na tartrato/NaOH (50 g/L de K-Na tartrato + 20 g/L de NaOH). La placa se incubó a 95 °C durante 10 min antes de transferir 100 µL/muestra a una placa de microtitulación transparente de fondo plano para medir la densidad óptica (DO) a 405 nm. Las mediciones de DO se realizaron en muestras diluidas de tres veces (50 µL de muestra diluida en 100 µL en agua Milli-Q). Los valores de medición de DO representan la diferencia después de restar la lectura original (de fondo) y representan el promedio de dos valores de medición de DO.

[0175] Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Mediciones promedio de DO405 (fondo corregido) en el ensayo final reductor

Lisozima	Concentración de lisozima en µg/mL					
	20	10	5	2,5	1,25	0,63
SEQ ID N.º: 18	1,10	0,98	0,86	0,53	0,40	0,20
SEQ ID N.º: 24	1,20	0,84	0,70	0,53	0,34	0,22
SEQ ID N.º: 30	1,23	1,05	0,84	0,75	0,59	0,27
SEQ ID N.º: 21	ND	ND	1,14	0,96	0,69	0,56
SEQ ID N.º: 27	ND	ND	1,62	0,98	0,57	0,39
SEQ ID N.º: 1	1,21	1,09	0,90	0,72	0,49	0,32
SEQ ID N.º: 5	-0,02	-0,02	0,00	-0,01	0,00	-0,02
ND: no determinado debido a la baja concentración de solución madre de enzima						

[0176] Los resultados muestran que las lisozimas con la SEQ ID N.º: 1, 18, 21, 24, 27 y 30 tienen una actividad de lisozima excelente contra los peptidoglicanos que se encuentran en las paredes celulares de *Lactobacillus johnsonii*, mientras que no se mostró actividad de la lisozima con la SEQ ID N.º: 5 hacia este peptidoglicano.

Ejemplo 9 método para la determinación de la actividad de lisozima contra *Lactobacillus johnsonii* (B).

Extracción de PGN:

[0177] Cultivo de *Lactobacillus johnsonii*:

Materiales

[0178]

Caldo MRS, número de producto BD 288130, pH 6,3-6,7.

Placas de agar MRS, BD 288130; Agar Oxoid LP0011; pH 6,3-6,7.

NaCl al 0,9 %, Merck 106404, Cas n.º: 7647145

Jars, proveedor Merck 116387, frasco anaeróbico Anaerocult 2,5 L

Anaerogen 2,5 L, ThermoScientific, catálogo n.º: AN0025A

Lactobacillus johnsonii, DSM10533

Procedimiento

[0179] *L. johnsonii* se sembró a partir de stock congelado a una placa de agar MRS y se incubó en condiciones anaeróbicas durante 2 días, frasco anaeróbico con Anaerogen 2,5 L, 30 °C. Algunas colonias se inocularon en 500 mL de caldo MRS en una botella de tapa azul de 500 mL y se colocaron en un frasco anaeróbico con Anaerogen 2,5 L durante 72 horas a 30 °C.

[0180] Se centrifugó el cultivo (6000 rpm, 10 minutos) y se vertió el sobrenadante antes de realizar otra ronda de centrifugación. El sedimento se lavó en 100 mL de NaCl al 0,9 % y la suspensión se mezcló bien y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos. Se vertió el sobrenadante y se repitió el procedimiento de lavado en NaCl al 0,9 % hasta un total de tres lavados. Se añadieron aproximadamente 40 mL de NaCl al 0,9 % al sedimento y la solución se transfirió a un tubo falcon de 50 mL. La solución se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos y se vertió el sobrenadante. El sedimento se almacenó a -18 °C hasta que se realizó la extracción del peptidoglicano.

Procedimiento de extracción:

Materiales

[0181] Proteasa de *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich P5147, CAS 9036-06-0

PBS pH 7,3:

- NaCl: 8 g, Sigma-Aldrich 31434, CAS 7647-14-5
- KCl: 0,2 g, Sigma-Aldrich P9333, CAS 7447-40-7
- KH_2PO_4 : 0,24 g, Sigma-Aldrich P5655, CAS 7778-77-0
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 1,44 g, Sigma-Aldrich 30412, CAS 10028-24-7
- Añadir agua Milli-Q a 1000 mL

Solución Triton-X 100 al 1%:

- 1 mL de Tritón X100, Sigma-Aldrich X100, CAS 9002-93-1
- Añadir agua Milli Q a 100 mL

500 mM de tampón de carbonato de sodio, pH 9,3:

- 500 mM de carbonato de sodio se elabora a partir de 21 g de Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich S7795, CAS 497-19-8) en 500 mL de agua MQ
- 500 mM de bicarbonato de sodio se elabora a partir de 72 g NaHCO_3 (Sigma-Aldrich S6014, CAS 144-55-8) en 500 mL de agua PM
- El tampón de pH 9,3 se elabora a partir de 320 mL de NaHCO_3 y 80 mL de Na_2CO_3 y ajustando el pH con HCl

Solución de fenol con 10 mM de Tris HCl, pH 8,0, 1 mM de EDTA, Sigma-Aldrich P4557, CAS 108-95-2

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

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

Procedimiento

[0182] El material celular de *L. Johnsonii* se liofilizó. El material liofilizado (525 mg) se suspendió en PBS (40 mL) en un tubo Falcon de 50 mL. La suspensión se agitó durante 2 h a 700 rpm en un termoagitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la proteasa de *Streptomyces griseus* (55 mg) y la suspensión se incubó 6 h a 37 °C en el termoagitador. Luego se centrifugó 20 min a 1900 g a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en Tritón X-100 al 1 % (40 mL) y se agitó durante toda la noche a 37 °C. Después de otra centrifugación y decantación, el sedimento se resuspendió en PBS (40 mL) y se añadió nuevamente proteasa (55 mg). La suspensión se incubó de nuevo 6 h a 37 °C, se centrifugó y se decantó. El sedimento se resuspendió en PBS (40 mL) y se agitó durante toda la noche a 37 °C. Este procedimiento de lavado se repitió una vez más con PBS (40 mL, 30 min de agitación), luego con etanol/agua al 50 % (40 mL, 30 min de agitación). A continuación, el sedimento se dividió en dos tubos Falcon. A cada tubo se le añadió solución de fenol (15 mL) precalentada a 40 °C. Las suspensiones se agitaron 10 min a 40 °C y luego se añadió etanol al 96 % (25 mL a cada tubo), se centrifugaron y se decantaron. Los sedimentos se lavaron adicionalmente con acetona (40 mL en cada tubo) y etanol al 96 % (40 mL en cada tubo), antes de liofilizarse. La combinación de los sedimentos de dos tubos produjo 80 mg de peptidoglicano purificado como un polvo blanco.

Ensayo final reductor

[0183] La lisozima se diluyó en tampón de dilución de fosfato (5 mM de citrato, 5 mM de K_2HPO_4 , TritonX-100 al 0,01 %, pH 5,0) hasta 200 µg/mL en tubos de polipropileno. La lisozima diluida se diluyó aun más en una placa de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos mediante la preparación de una serie de diluciones dobles hasta una concentración de 6,3 µg/mL en tampón de dilución de fosfato (5 mM de citrato, 5 mM de K_2HPO_4 , TritonX-100 al 0,01 %, pH 5,0). Se preparó una solución madre de 50 mg/ml de sustrato de *L. Johnsonii* en MillQ y se diluyó en tampón de fosfato (50 mM de citrato, 50 mM de K_2HPO_4 , pH 5,0) hasta 250 µg/ml. En una placa deepwell de polipropileno, se mezclaron 50 µL de la dilución de lisozima con 450 µL de solución de *L. Johnsonii* y

se incubaron a 40 °C con agitación (500 rpm) durante 45 min. Tras la incubación, la placa deepwell se centrifugó (3200 rpm, 7 min) para sedimentar el material insoluble y se mezclaron 100 µL del sobrenadante con 50 µL de 3,2 M de HCl en una placa PCR de 96 pocillos y se incubó a 95 °C durante 80 min. Se añadieron 50 µL de 3,5 M de NaOH a cada pocillo de la placa PCR y se transfirieron 150 µL de cada muestra a una nueva placa PCR que contenía 75 µL/pocillo de solución de 4-hidroxibenzhidrazida (PAHBAH) en tampón K-Na tartrato/NaOH (50 g/L de K-Na tartrato + 20 g/L de NaOH). La placa se incubó a 95°C durante 10 min antes de transferir 100 µL/muestra a una placa de microtitulación transparente de fondo plano para medir la densidad óptica (DO) a 405 nm. Las mediciones de DO se realizaron en muestras diluidas tres veces (50 µL de muestra diluida en 100 µL en agua Milli-Q). Los valores de medición de DO representan la diferencia después de restar la lectura original (de fondo) y representan el promedio de dos valores de medición de DO.

[0184] Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Mediciones promedio de OD405 (fondo corregido) en el ensayo final reductor

Lisozima	Concentración de lisozima en µg/mL					
	20	10	5	2,5	1,25	0,63
SEQ ID N.º: 1	1,26	1,18	0,97	0,63	0,40	0,37
SEQ ID N.º: 15	0,98	0,67	0,47	0,37	0,21	0,15
SEQ ID N.º: 5	-0,01	-0,01	0,01	-0,00	0,01	-0,01

[0185] Los resultados ilustran que dos lisozimas (SEQ ID N.º: 1 y 15) tienen una actividad de lisozima excelente contra los peptidoglicanos que se encuentran en las paredes celulares de *Lactobacillus johnsonii*, mientras que la lisozima con la SEQ ID N.º: 5 no mostró ninguna actividad hacia este peptidoglicano.

LISTA DE SECUENCIAS

[0186]

<110> Novozymes A/S

<120> COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO HUMANO

<130> 14433-WO-PCT

<160> 30

<170> versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 208

<212> PRT

<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

ES 2 915 100 T3

5 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
 10 Glu Tyr Asn Pro Asn Gly Ala Thr Cys Tyr Gly Leu Ser Gln Ser Ala
 100 105 110

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

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

 25 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
 30 Thr Phe Trp Gln Tyr Asn Asp Lys Tyr Pro Gln Gly Gly Asp Ser Asn
 180 185 190

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

 40 <210> 2
 <211> 946
 <212> ADN
 <213> Trichophaea saccata

 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(347)

 50 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(51)

 55 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (52)..(943)

 60 <220>
 <221> CDS
 <222> (401)..(615)

 65 <220>
 <221> CDS
 <222> (668)..(772)

 70 <220>
 <221> CDS
 <222> (825)..(943)

ES 2 915 100 T3

	<400>	2																			
	atg	cac	gct	ctc	acc	ctt	ctc	acc	gca	acc	ctc	ttc	ggg	ctc	gca	gcg					48
5	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					
10	-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						
15	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							
20	aag	acc	cag	cac	ggg	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	ggg	agc	agc	tcg	ggg	gga	ggg					288
25	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					
30	80					85					90					95					
	gag	ttt	gag	gg	gtaagt	gaca	gctctg	agtg	agg	tggtatg	aggattaaga										387
	Glu	Phe	Glu	Gly																	
35	ctgacgagga	tag	a	ttc	ggt	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
40	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
45	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							

ES 2 915 100 T3

	ccc	aag	tgg	aag	tac	gct	ggt	gga	aag	gtt	atg	cct	ggc	ttg	gtc	cgc	877
5	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
10	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
15	Ala	His	Pro	Pro	Lys	Cys											
	240					245											
	<210>	3															
	<211>	262															
	<212>	PRT															
20	<213>	Trichophaea	saccata														
	<400>	3															
	Met	His	Ala	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala	Thr	Leu	Phe	Gly	Leu	Ala	Ala	
25			-15					-10					-5				
	Ala	Tyr	Pro	Val	Lys	Thr	Asp	Leu	His	Cys	Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	
30	-1	1				5					10					15	
	Ser	Ala	Ser	Ile	Val	Arg	Thr	Tyr	Ser	Ser	Gly	Thr	Glu	Val	Gln	Ile	
				20						25					30		
35	Gln	Cys	Gln	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	Val	Gln	Gly	Ser	Asn	Val	Trp	Asp	
				35					40					45			
40	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	
45		65					70					75					
	Ser	Cys	Lys	Pro	Pro	Pro	Ile	Asn	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Leu	Ile	Lys	
50	80					85					90					95	
	Glu	Phe	Glu	Gly	Phe	Val	Pro	Lys	Pro	Ala	Pro	Asp	Pro	Ile	Gly	Leu	
					100					105					110		
55	Pro	Thr	Val	Gly	Tyr	Gly	His	Leu	Cys	Lys	Thr	Lys	Gly	Cys	Lys	Glu	
				115					120					125			
60	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	
65		145					150					155					
	Asp	Ser	Val	Lys	Leu	Asn	Asp	Asn	Gln	Tyr	Gly	Ala	Leu	Ala	Ser	Trp	

ES 2 915 100 T3

	160		165		170		175
5	Ala Phe Asn Val	Gly Cys Gly Asn Val	Gln Thr Ser Ser	Leu Ile Lys			
		180	185	190			
10	Arg Leu Asn Ala	Gly Glu Asn Pro	Asn Thr Val Ala	Ala Gln Glu Leu			
		195	200	205			
15	Pro Lys Trp Lys	Tyr Ala Gly Gly	Lys Val Met Pro	Gly Leu Val Arg			
		210	215	220			
20	Arg Arg Asn Ala	Glu Val Ala Leu Phe	Lys Lys Pro Ser	Ser Val Gln			
		225	230	235			
25	Ala His Pro Pro	Lys Cys					
		240	245				
30	<210>	4					
	<211>	245					
	<212>	PRT					
	<213>	Trichophaea saccata					
35	<400>	4					
	Tyr Pro Val Lys	Thr Asp Leu His	Cys Arg Ser Ser	Pro Ser Thr Ser			
	1	5	10	15			
40	Ala Ser Ile Val	Arg Thr Tyr Ser	Ser Gly Thr Glu	Val Gln Ile Gln			
		20	25	30			
45	Cys Gln Thr Thr	Gly Thr Ser Val	Gln Gly Ser Asn	Val Trp Asp Lys			
		35	40	45			
50	Thr Gln His Gly	Cys Tyr Val Ala	Asp Tyr Tyr Val	Lys Thr Gly His			
		50	55	60			
55	Ser Gly Ile Phe	Thr Thr Lys Cys	Gly Ser Ser Ser	Gly Gly Gly Ser			
		65	70	75	80		
60	Cys Lys Pro Pro	Pro Ile Asn Ala	Ala Thr Val Ala	Leu Ile Lys Glu			
		85	90	95			
65	Phe Glu Gly Phe	Val Pro Lys Pro	Ala Pro Asp Pro	Ile Gly Leu Pro			
		100	105	110			
70	Thr Val Gly Tyr	Gly His Leu Cys	Lys Thr Lys Gly	Cys Lys Glu Val			
		115	120	125			

ES 2 915 100 T3

Pro Tyr Ser Phe Pro Leu Thr Gln Glu Thr Ala Thr Lys Leu Leu Gln
 130 135 140
 5
 Ser Asp Ile Lys Thr Phe Thr Ser Cys Val Ser Asn Tyr Val Lys Asp
 145 150 155 160
 10 Ser Val Lys Leu Asn Asp Asn Gln Tyr Gly Ala Leu Ala Ser Trp Ala
 165 170 175
 15 Phe Asn Val Gly Cys Gly Asn Val Gln Thr Ser Ser Leu Ile Lys Arg
 180 185 190
 20 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
 25 Arg Asn Ala Glu Val Ala Leu Phe Lys Lys Pro Ser Ser Val Gln Ala
 225 230 235 240
 30 His Pro Pro Lys Cys
 245
 35 <210> 5
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <400> 5
 40 Lys Val Phe Gly Arg Cys Glu Leu Ala Ala Ala Met Lys Arg His Gly
 1 5 10 15
 45 Leu Asp Asn Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu Gly Asn Trp Val Cys Ala Ala
 20 25 30
 50 Lys Phe Glu Ser Asn Phe Asn Thr Gln Ala Thr Asn Arg Asn Thr Asp
 35 40 45
 55 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
 60 Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Thr Ala Ser Val Asn Cys Ala Lys
 85 90 95
 65 Lys Ile Val Ser Asp Gly Asn Gly Met Asn Ala Trp Val Ala Trp Arg
 100 105 110

ES 2 915 100 T3

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

5
Leu

10
<210> 6
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Cebador F-80470

20
<400> 6
acacaactgg ggatccacca tgcacgctct cacccttct 39

25
<210> 7
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Cebador R-80470.

35
<400> 7
ctagatctcg agaagctttt agcacttggg aggggtggg 38

40
<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> Cebador 8643.

50
<400> 8
gcaagggatg ccatgcttgg 20

55
<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> Cebador 8654.

65
<400> 9
catataacca attgccctc 19

70
<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

75
<220>
<223> Cebador directo 27F.

80
<400> 10
agagtttgat cctggctcag 20

ES 2 915 100 T3

5	<210> 11		
	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador inverso 534R.		
	<400> 11		
	attaccgcgg ctgctgg		17
15	<210> 12		
	<211> 1462		
	<212> ADN		
	<213> Faecalibacterium prausnitzii		
20	<400> 12		
	gatcctggct caggcgaacg ctggcggcgc gcctaacaca tgcaagtcga acgagcgaga		60
	gagagcttgc tttctcaagc gagtggcgaa cgggtgagta acgcgtgagg aacctgcctc		120
25	aaagaggggg acaacagttg gaaacgactg ctaataccgc ataagccac gaccggcat		180
	cgggtagagg gaaaaggagc aatccgcttt gagatggcct cgcgtccgat tagctagttg		240
30	gtgaggtaac ggccaccaa ggcgacgac ggtagccgga ctgagagggt gaacggccac		300
	attgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa		360
	tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tggaggaaga aggtcttcgg attgtaaact		420
35	cctgttggtg aggaagataa tgacggtact caacaaggaa gtgacggcta actacgtgcc		480
	agcagccgcg gtaaacgta ggtcacaagc gttgtccgga attactgggt gtaaaggag		540
	cgcaggcggg aaggcaagtt ggaagtgaat tccatgggct caacccatga actgctttca		600
40	aaactgtttt tcttgagtag tgacagagta ggcggaattc ccggtgtagc ggtggaatgc		660
	gtagatatcg ggaggaacac cagtggcgaa ggcgccctac tgggcaccaa ctgacgtga		720
45	ggctcgaaag tgtgggtagc aaacaggatt agataccctg gtagtccaca ctgtggccga		780
	tgtttactag gtgttgagg attgaccctc tcagtccgc agttaacaca ataagtaatc		840
	cacctgggga gtacgaccgc aaggttgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag		900
50	cagtggagta tgtggtttaa ttcgacgcaa cgcaagaac cttaccaagt cttgacatcc		960
	tgcgacgcac atagaaatat gtgtttcctt cgggacgcag agacagggtg tgcattggtg		1020
55	tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttggtt aagtcgccga acgagcgcaa cccttatggt		1080
	cagttactac gcaagaggac tctggccaga ctgccgttga caaacggag gaagggtggg		1140
	atgacgtcaa atcatcatgc cttttatgac ttgggctaca cacgtactac aatggcggtta		1200
60	aacaaagaga agcaagaccg cgagggtggag caaaactcag aaacaacgtc ccagttcgga		1260
	ctgcaggctg caactcgcct gcacgaagtc ggaattgcta gtaatcgag atcagcatgc		1320
65	tgcggtgaat acgttcccgg gccttgatca caccgccgt cacaccatga gagccggggg		1380
	gacccgaagt cggtagtcta accgcaagga ggacgccgc gaaggtaaaa ctggtgattg		1440

ES 2 915 100 T3

	gggtgaagtc gtaacaaggt ac	1462
5	<210> 13 <211> 909 <212> ADN <213> Myceliophthora fergusii	
10	<220> <221> CDS <222> (1)..(144)	
15	<220> <221> sig_peptide <222> (1)..(54)	
20	<220> <221> mat_peptide <222> (55)..(906)	
25	<220> <221> CDS <222> (376)..(906)	
30	<400> 13 atg aaa gct gct ctc ctc gct acc gtc tcc gcc ctc gcg gcc ggc gtg Met Lys Ala Ala Leu Leu Ala Thr Val Ser Ala Leu Ala Ala Gly Val -15 -10 -5	48
35	caa gcc gcc gtc caa ggc ttt gac att tcc cac tgg cag tcc agc gtg Gln Ala Ala Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Trp Gln Ser Ser Val -1 1 5 10	96
40	gag ttt aag gcg gcc tac aac tcg ggc gcc cgc ttc gtc atc atc aag Asp Phe Lys Ala Ala Tyr Asn Ser Gly Ala Arg Phe Val Ile Ile Lys 15 20 25 30	144
45	gtaggtatta aggcctctct gtcgagcgag gcggcgtggt tcaaccatca ttggattctc ctgccttaaa tttgtccct ctgtccaaag aggaggaaag aggaggggag aataacggaa gatgcataat gggcaaaaaa aaaaagaaaa ccaagaaaaa aaaaacactg ggaactactg atgaatagtc tcgtgagaga gccgacgtgc taaccccaac acctctatta g gcg acc Ala Thr	204 264 324 381
50	gag ggc acg tcg ttc atc gac ccc aag ttc tcg tcg cac tac acg ggc Glu Gly Thr Ser Phe Ile Asp Pro Lys Phe Ser Ser His Tyr Thr Gly 35 40 45	429
55	gcg acc aac gcc ggc ttc atc cgg ggc gcg tac cac ttc gcg cac ccg Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala His Pro 50 55 60	477
60	ggc cag tcg tcg ggc gag gcg cag gcc gac tac ttc ctc gcg cac ggc Gly Gln Ser Ser Gly Glu Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Ala His Gly 65 70 75 80	525
65	ggc ggc tgg acg ccc gac ggc atc acg ctg ccc ggc atg ctg gac ctc Gly Gly Trp Thr Pro Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Leu 85 90 95	573
	gag gcc tac aac gcg ggc gag tgc tgg ggc ctg tcc cag agc gcc atg Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Glu Cys Trp Gly Leu Ser Gln Ser Ala Met 100 105 110	621

ES 2 915 100 T3

5	gtc gcg tgg atc aag gcc ttc agc gac cgc tac cac gcc cgc acc ggc Val Ala Trp Ile Lys Ala Phe Ser Asp Arg Tyr His Ala Arg Thr Gly 115 120 125	669
10	gtg tac ccg atg ctc tac acc aac ctg tcg tgg tgg aag acc tgc acc Val Tyr Pro Met Leu Tyr Thr Asn Leu Ser Trp Trp Lys Thr Cys Thr 130 135 140	717
15	ggc aac tcc aag gcc ttc gtc aac acc aac ccg ctc gtc ctc gcc cgc Gly Asn Ser Lys Ala Phe Val Asn Thr Asn Pro Leu Val Leu Ala Arg 145 150 155 160	765
20	tgg gcc agc tcg ccc gcc gag atc ccc gcc gcc tgg ccg tgg cag acc Trp Ala Ser Ser Pro Gly Glu Ile Pro Gly Gly Trp Pro Trp Gln Thr 165 170 175	813
25	atc tgg cag aac tcg gac tcg tac cgc tac gcc gcc gac tcg gac atc Ile Trp Gln Asn Ser Asp Ser Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Ser Asp Ile 180 185 190	861
30	ttc aac gcc gac atg aac cag ctc agg agg ctg gcc acc gcc gcc taa Phe Asn Gly Asp Met Asn Gln Leu Arg Arg Leu Ala Thr Ala Ala 195 200 205	909
35	<210> 14 <211> 225 <212> PRT <213> Myceliophthora fergusii <400> 14	
40	Met Lys Ala Ala Leu Leu Ala Thr Val Ser Ala Leu Ala Ala Gly Val -15 -10 -5	
45	Gln Ala Ala Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Trp Gln Ser Ser Val -1 1 5 10	
50	Asp Phe Lys Ala Ala Tyr Asn Ser Gly Ala Arg Phe Val Ile Ile Lys 15 20 25 30	
55	Ala Thr Glu Gly Thr Ser Phe Ile Asp Pro Lys Phe Ser Ser His Tyr 35 40 45	
60	Thr Gly Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala 50 55 60	
65	His Pro Gly Gln Ser Ser Gly Glu Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Ala 65 70 75	
70	His Gly Gly Gly Trp Thr Pro Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu 80 85 90	
75	Asp Leu Glu Ala Tyr Asn Ala Gly Glu Cys Trp Gly Leu Ser Gln Ser 95 100 105 110	
80	Ala Met Val Ala Trp Ile Lys Ala Phe Ser Asp Arg Tyr His Ala Arg 115 120 125	

ES 2 915 100 T3

5 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
 10 145 150 155
 Ala Arg Trp Ala Ser Ser Pro Gly Glu Ile Pro Gly Gly Trp Pro Trp
 160 165 170
 15 Gln Thr Ile Trp Gln Asn Ser Asp Ser Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Ser
 175 180 185 190
 20 Asp Ile Phe Asn Gly Asp Met Asn Gln Leu Arg Arg Leu Ala Thr Ala
 195 200 205
 25 Ala
 30 <210> 15
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora fergusii
 35 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(207)
 <400> 15
 40 Ala Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Trp Gln Ser Ser Val Asp Phe
 1 5 10 15
 45 Lys Ala Ala Tyr Asn Ser Gly Ala Arg Phe Val Ile Ile Lys Ala Thr
 20 25 30
 50 Glu Gly Thr Ser Phe Ile Asp Pro Lys Phe Ser Ser His Tyr Thr Gly
 35 40 45
 55 Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala His Pro
 50 55 60
 60 Gly Gln Ser Ser Gly Glu Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Ala His Gly
 65 70 75 80
 65 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

ES 2 915 100 T3

	115	120	125	
5	Val Tyr Pro Met Leu Tyr Thr Asn Leu Ser Trp Trp Lys Thr Cys Thr			
	130	135	140	
10	Gly Asn Ser Lys Ala Phe Val Asn Thr Asn Pro Leu Val Leu Ala Arg			
	145	150	155	160
15	Trp Ala Ser Ser Pro Gly Glu Ile Pro Gly Gly Trp Pro Trp Gln Thr			
		165	170	175
20	Ile Trp Gln Asn Ser Asp Ser Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Ser Asp Ile			
		180	185	190
25	Phe Asn Gly Asp Met Asn Gln Leu Arg Arg Leu Ala Thr Ala Ala			
	195	200	205	
30	<210> 16			
	<211> 796			
	<212> ADN			
	<213> Lecanicillium sp. WMM742			
35	<220>			
	<221> sig_peptide			
	<222> (1)..(60)			
40	<220>			
	<221> mat_peptide			
	<222> (61)..(793)			
45	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (199)..(381)			
50	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (443)..(793)			
55	<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			
60	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			
65	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			
70	atc aag gtatgctgca gcggacgggt cgaatcacag atgatgctga caggctag gcc			201
	Ile Lys Ala			
	30			
75	acc gag gga act ggt tac atc tcg tcc agc ttc ggc tcg cag tac cct			249

ES 2 915 100 T3

	Thr	Glu	Gly	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Phe	Gly	Ser	Gln	Tyr	Pro	
				35				40					45				
5	ggt	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					
10	ccc	gac	cgg	tcc	tct	ggc	tcc	gca	cag	ggc	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						
15	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	
20	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					
25	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	
30	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		
35	aag	acg	tgc	acg	ggc	aac	agc	cct	gcc	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			
40	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					
45	ccg	ttc	cag	act	ttc	tgg	cag	aac	agc	gac	aag	tat	gcg	tac	ggc	ggc	736
	Pro	Phe	Gln	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Ser	Asp	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Gly	
		175				180						185					
50	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	
55	cgc	ggt	ggt	tag													796
	Arg	Gly	Gly														
60	<210>	17															
	<211>	228															
	<212>	PRT															
	<213>	Lecanicillium sp. WMM742															
65	<400>	17															
	Met	Lys	Ser	Phe	Ser	Ser	Ile	Ile	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	Leu	Ala	Ser	
	-20					-15					-10					-5	
65	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Gln	Gly	Phe	Asp	Val	Ser	Gly	Tyr	Gln	Pro	
			-1	1				5						10			

ES 2 915 100 T3

	Thr	Val	Asn	Trp	Gly	Ala	Ala	Tyr	Ser	Ser	Gly	Ala	Arg	Phe	Val	Met	
			15					20					25				
5	Ile	Lys	Ala	Thr	Glu	Gly	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Phe	Gly	Ser	
		30					35					40					
10	Gln	Tyr	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Ala	Gly	Phe	Ile	Arg	Gly	Gly	Tyr	His	
	45					50					55					60	
15	Phe	Ala	Leu	Pro	Asp	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Gln	Ala	Asp	Tyr	Phe	
					65					70					75		
20	Leu	Ala	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Ser	Gly	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Pro	Gly	
				80					85					90			
25	Met	Leu	Asp	Ile	Glu	Tyr	Asn	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Cys	Tyr	Gly	Leu	
			95					100					105				
30	Ser	Gln	Gly	Ala	Met	Val	Asn	Trp	Ile	Ser	Asp	Phe	Val	Glu	His	Tyr	
		110					115					120					
35	Lys	Ala	Arg	Thr	Thr	Gln	Tyr	Pro	Ile	Ile	Tyr	Thr	Thr	Thr	Asp	Trp	
	125					130					135					140	
40	Trp	Lys	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Ser	Pro	Ala	Phe	Gly	Gln	Lys	Cys	Pro	
				145						150					155		
45	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	Gly	Glu	Ile	Pro	Asn	Gly	
				160					165					170			
50	Trp	Pro	Phe	Gln	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Ser	Asp	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Gly	
			175					180					185				
55	Gly	Asp	Ser	Gln	Ile	Phe	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Gln	Leu	Gln	Lys	Ile	
		190					195					200					
60	Ala	Arg	Gly	Gly													
	205																
65	<210>	18															
	<211>	208															
	<212>	PRT															
	<213>	Lecanicillium sp. WMM742															
70	<220>																
	<221>	mat_peptide															
	<222>	(1)..(208)															
75	<400>	18															
80	Thr	Val	Gln	Gly	Phe	Asp	Val	Ser	Gly	Tyr	Gln	Pro	Thr	Val	Asn	Trp	
	1				5					10					15		

ES 2 915 100 T3

Gly Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Ala Arg Phe Val Met Ile Lys Ala Thr
 20 25 30
 5
 Glu Gly Thr Gly Tyr Ile Ser Ser Ser Phe Gly Ser Gln Tyr Pro Gly
 35 40 45
 10
 Ala Thr Asn Ala Gly Phe Ile Arg Gly Gly Tyr His Phe Ala Leu Pro
 50 55 60
 15
 Asp Arg Ser Ser Gly Ser Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Leu Ala His Gly
 65 70 75 80
 20
 Gly Gly Trp Ser Gly Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Ile
 85 90 95
 25
 Glu Tyr Asn Pro Tyr Gly Ala Thr Cys Tyr Gly Leu Ser Gln Gly Ala
 100 105 110
 30
 Met Val Asn Trp Ile Ser Asp Phe Val Glu His Tyr Lys Ala Arg Thr
 115 120 125
 35
 Thr Gln Tyr Pro Ile Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp Lys Thr Cys
 130 135 140
 40
 Thr Gly Asn Ser Pro Ala Phe Gly Gln Lys Cys Pro Leu Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 45
 Arg Tyr Ser Ser Ser Val Gly Glu Ile Pro Asn Gly Trp Pro Phe Gln
 165 170 175
 50
 Thr Phe Trp Gln Asn Ser Asp Lys Tyr Ala Tyr Gly Gly Asp Ser Gln
 180 185 190
 55
 Ile Phe Asn Gly Ala Tyr Ser Gln Leu Gln Lys Ile Ala Arg Gly Gly
 195 200 205
 60
 <210> 19
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Zygomycetes sp. XZ2655
 65
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(681)
 70
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)
 75
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (58)..(681)

ES 2 915 100 T3

5	<400> 19																48
	atg	aaa	gca	atc	gta	aca	gca	tta	gca	tta	tcc	ttg	tta	tgg	gcg	ggg	
10	Met	Lys	Ala	Ile	Val	Thr	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Trp	Ala	Gly	
	-15 -10 -5																
15	gcc	cat	gca	act	ttg	ccc	ggc	tta	gac	gtc	agc	agc	tac	caa	ggg	aac	
	Ala	His	Ala	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Asn	
20	-1 1 5 10																
	gtc	aat	tgg	gga	aca	gtg	gcg	agt	caa	gga	gca	aaa	ttt	gct	tac	gtc	
25	Val	Asn	Trp	Gly	Thr	Val	Ala	Ser	Gln	Gly	Ala	Lys	Phe	Ala	Tyr	Val	
	15 20 25																
30	aag	gct	acc	gag	ggg	acg	acc	tac	acg	aat	ccc	tat	ttt	gcg	tcc	caa	
	Lys	Ala	Thr	Glu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Thr	Asn	Pro	Tyr	Phe	Ala	Ser	Gln	
35	30 35 40 45																
	tac	gac	gga	tcc	tac	aac	gcg	ggc	cta	att	cgc	ggg	gcc	tat	cac	ttt	
40	Tyr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Asn	Ala	Gly	Leu	Ile	Arg	Gly	Ala	Tyr	His	Phe	
	50 55 60																
45	gcc	cat	ccc	gat	tct	tcc	tct	gga	gct	acc	caa	gca	aac	tat	ttc	ctt	
	Ala	His	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Thr	Gln	Ala	Asn	Tyr	Phe	Leu	
50	65 70 75																
	gct	cat	ggg	ggc	ggc	tgg	tcc	gct	gac	gga	aag	acc	tta	cct	ggg	gcg	
55	Ala	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Ser	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Gly	Ala	
	80 85 90																
60	cta	gat	att	gag	tac	aat	cct	aac	ggc	gct	gaa	tgc	tac	ggc	ttg	tct	
	Leu	Asp	Ile	Glu	Tyr	Asn	Pro	Asn	Gly	Ala	Glu	Cys	Tyr	Gly	Leu	Ser	
65	95 100 105																
	caa	ttg	gcc	atg	att	agc	tgg	att	caa	gac	ttc	agc	aac	acc	tat	cac	
70	Gln	Leu	Ala	Met	Ile	Ser	Trp	Ile	Gln	Asp	Phe	Ser	Asn	Thr	Tyr	His	
	110 115 120 125																
75	tcc	cac	acg	ggc	aga	tat	ccg	gtc	att	tac	acg	act	acg	gac	tgg	tgg	
	Ser	His	Thr	Gly	Arg	Tyr	Pro	Val	Ile	Tyr	Thr	Thr	Thr	Asp	Trp	Trp	
80	130 135 140																
	acc	acc	tgc	acg	ggg	aac	agc	gca	gcc	ttt	gga	acc	aac	aac	cct	ctc	
85	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Thr	Asn	Asn	Pro	Leu	
	145 150 155																
90	tgg	att	gct	cgg	tat	tcg	tct	tcg	gtg	ggc	acc	ctg	cct	gca	ggg	tgg	
	Trp	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	Gly	Thr	Leu	Pro	Ala	Gly	Trp	
95	160 165 170																
	ggc	tac	gag	agc	ttc	tgg	cag	aag	gca	tct	tcg	ggg	acg	ttc	cct	gga	
100	Gly	Tyr	Glu	Ser	Phe	Trp	Gln	Lys	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Phe	Pro	Gly	
	175 180 185																
105	gac	caa	gat	atc	tgg	aat	ggc	gat	gct	gct	gga	ctc	tcc	aga	ttc	gcc	
	Asp	Gln	Asp	Ile	Trp	Asn	Gly	Asp	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Arg	Phe	Ala	
110	190 195 200 205																
	acc	ggc	aaa	tga													
115	Thr	Gly	Lys														
120																	
125																	
130																	
135																	
140																	
145																	
150																	
155																	
160																	
165																	
170																	
175																	
180																	

ES 2 915 100 T3

<400> 20

5	Met Lys Ala Ile Val Thr Ala Leu Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala Gly	-15	-10	-5
10	Ala His Ala Thr Leu Pro Gly Leu Asp Val Ser Ser Tyr Gln Gly Asn	-1 1	5	10
15	Val Asn Trp Gly Thr Val Ala Ser Gln Gly Ala Lys Phe Ala Tyr Val	15	20	25
20	Lys Ala Thr Glu Gly Thr Thr Tyr Thr Asn Pro Tyr Phe Ala Ser Gln	30	35	40
25	Tyr Asp Gly Ser Tyr Asn Ala Gly Leu Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe	50	55	60
30	Ala His Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ala Thr Gln Ala Asn Tyr Phe Leu	65	70	75
35	Ala His Gly Gly Gly Trp Ser Ala Asp Gly Lys Thr Leu Pro Gly Ala	80	85	90
40	Leu Asp Ile Glu Tyr Asn Pro Asn Gly Ala Glu Cys Tyr Gly Leu Ser	95	100	105
45	Gln Leu Ala Met Ile Ser Trp Ile Gln Asp Phe Ser Asn Thr Tyr His	110	115	120
50	Ser His Thr Gly Arg Tyr Pro Val Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp	130	135	140
55	Thr Thr Cys Thr Gly Asn Ser Ala Ala Phe Gly Thr Asn Asn Pro Leu	145	150	155
60	Trp Ile Ala Arg Tyr Ser Ser Ser Val Gly Thr Leu Pro Ala Gly Trp	160	165	170
65	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
	Thr Gly Lys			205
	<210> 21			
	<211> 208			
	<212> PRT			
	<213> Zygomycetes sp. XZ2655			

ES 2 915 100 T3

```

5    <220>
    <221>  mat_peptide
    <222>  (1)..(208)

    <400>  21

10   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

15   Glu Gly Thr Thr Tyr Thr Asn Pro Tyr Phe Ala Ser Gln Tyr Asp Gly
    35          40          45

20   Ser Tyr Asn Ala Gly Leu Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala His Pro
    50          55          60

25   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

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

35   Met Ile Ser Trp Ile Gln Asp Phe Ser Asn Thr Tyr His Ser His Thr
    115        120        125

40   Gly Arg Tyr Pro Val Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp Thr Thr Cys
    130        135        140

45   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

50   Ser Phe Trp Gln Lys Ala Ser Ser Gly Thr Phe Pro Gly Asp Gln Asp
    180        185        190

55   Ile Trp Asn Gly Asp Ala Ala Gly Leu Ser Arg Phe Ala Thr Gly Lys
    195        200        205

60   <210>  22
    <211>  767
    <212>  ADN
    <213>  Malbranchea flava

65   <220>
    <221>  CDS

```

ES 2 915 100 T3

```

<222> (1)..(174)

<220>
5 <221> sig_peptide
  <222> (1)..(54)

<220>
10 <221> mat_peptide
   <222> (55)..(764)

<220>
15 <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

20 agt gca ggc ccc aag gag ttc gag tca cgc gcg tgc 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

25 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

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

   ttctcctggt ataataccct gactaatgta aagatccag gct agc gag ggt acc      248
                              Ala Ser Glu Gly Thr
35                                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

40 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

45 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

50 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
55 110                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

60 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

65 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

```

ES 2 915 100 T3

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
 5
 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
 10
 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
 15
 <210> 23
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Malbranchea flava
 20
 <400> 23
 Met Lys Leu Ser Leu Leu Leu Ile Val Ala Ala Ser Leu Ala Val Ala
 -15 -10 -5
 25
 Ser Ala Gly Pro Lys Glu Phe Glu Ser Arg Ala Ser Gly Val Gln Gly
 -1 1 5 10
 30
 Phe Asp Ile Ser Gly Trp Gln Ser Asn Val Asn Phe Ala Gly Ala Tyr
 15 20 25 30
 35
 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
 40
 Gly Phe Ile Arg Gly Gly Tyr His Phe Ala Leu Pro Asp Val Ser Ser
 65 70 75
 45
 Ala Thr Ala Gln Val Asn His Phe Leu Ala Ser Gly Gly Gly Trp Ser
 80 85 90
 50
 Arg Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Ile Glu Ser Asn Pro
 95 100 105 110
 55
 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
 60
 Leu Ile Tyr Thr Ser Pro Ser Trp Trp Gln Thr Cys Thr Gly Asn Ser
 145 150 155
 65
 Asn Ala Phe Ile Asp Lys Cys Pro Leu Val Leu Ala Arg Trp Ala Ser
 160 165 170

ES 2 915 100 T3

5 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
 10 Asp Glu Ala Gly Leu Lys Arg Met Ala Leu Gly
 210 215
 15 <210> 24
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Malbranchea flava
 20 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(217)
 25 <400> 24
 Gly Pro Lys Glu Phe Glu Ser Arg Ala Ser Gly Val Gln Gly Phe Asp
 1 5 10 15
 30 Ile Ser Gly Trp Gln Ser Asn Val Asn Phe Ala Gly Ala Tyr Asn Ser
 20 25 30
 35 Gly Ala Arg Phe Val Met Ile Lys Ala Ser Glu Gly Thr Thr Phe Lys
 35 40 45
 40 Asp Arg Gln Phe Ser Asn His Tyr Ile Gly Ala Thr Lys Ala Gly Phe
 50 55 60
 45 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
 50 Gly Ile Thr Leu Pro Gly Met Leu Asp Ile Glu Ser Asn Pro Tyr Gly
 100 105 110
 55 Ala Gln Cys Tyr Gly Leu Asp Ala Gly Arg Met Val Ala Trp Ile Arg
 115 120 125
 60 Glu Phe Val Asp Ala Tyr Lys Arg Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Leu Ile
 130 135 140
 65 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

ES 2 915 100 T3

5 Gly Thr Pro Pro Gly Gly Trp Pro Phe His Ser Phe Trp Gln Tyr Ala
180 185 190

10 Asp Ser Tyr Gln Phe Gly Gly Asp Ala Gln Val Phe Asn Gly Asp Glu
195 200 205

15 Ala Gly Leu Lys Arg Met Ala Leu Gly
210 215

<210> 25
<211> 687
<212> ADN
<213> Hypholoma polytrichi

20 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(684)

25 <220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(60)

30 <220>
<221> mat_peptide
<222> (61)..(684)

35 <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

40 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

45 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

50 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

55 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

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

65 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

ES 2 915 100 T3

	110	115	120	
5	aag gca ttg att gcc gca gcg aag gca tcc ggt ttc aac ttc ggc atc Lys Ala Leu Ile Ala Ala Ala Lys Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gly Ile 125 130 135 140			480
10	tac tcg tcg cct gga gag tgg tcg acc atc ttc ggc tcg acc tcg gtc Tyr Ser Ser Pro Gly Glu Trp Ser Thr Ile Phe Gly Ser Thr Ser Val 145 150 155			528
15	gtc gtc gac aac tcc gca ccg ctc tgg ttc gcg acc tat aac aac gtc Val Val Asp Asn Ser Ala Pro Leu Trp Phe Ala Thr Tyr Asn Asn Val 160 165 170			576
20	cag acc ctc acg ctc ggc act cct ttc gga ggc tgg tcg aca gcc gtc Gln Thr Leu Thr Leu Gly Thr Pro Phe Gly Gly Trp Ser Thr Ala Val 175 180 185			624
25	ggt cat cag tat acc gat gtg tcc gcc tcc gga ctc ttc gac ctc aac Gly His Gln Tyr Thr Asp Val Ser Ala Ser Gly Leu Phe Asp Leu Asn 190 195 200			672
30	gtc ttc gcc cac taa Val Phe Ala His 205			687
35	<210> 26 <211> 228 <212> PRT <213> Hypholoma polytrichi <400> 26			
40	Met Ala Lys Leu Leu Lys Gln Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala Leu -20 -15 -10 -5			
45	Ala Ala His Ala Leu Val Tyr Gly Val Asp Ser Ser Ser Leu Val Pro -1 1 5 10			
50	Val Ala Thr Tyr Gln Lys Ala Leu Gly Glu Gly Phe Thr Lys Ala Val 15 20 25			
55	Ile Arg Gly Tyr Glu Glu Ala Cys Gly Val Gly Gly Glu Val Asp Pro 30 35 40			
60	Asn Phe Val Pro Ser Tyr Lys Asn Ala Arg Ala Ala Gly Tyr Thr Asp 45 50 55 60			
65	Ile Asp Met Tyr Trp Phe Pro Cys Asn Gly Ser Thr His Ser Cys Lys 65 70 75			
70	Ser Tyr Ala Ala Gln Leu Ala Ala Ile Ala Ala Ala Phe Ser Ala Asn 80 85 90			
75	Ala Met Lys Ile Gly Thr Ile Trp Ile Asp Ile Glu Lys Asp Ala Ala 95 100 105			
80	Ile Cys Asn Asn Trp Asp Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Leu Ala Gln Ala			

ES 2 915 100 T3

	110	115	120
5	Lys Ala Leu Ile Ala Ala Lys Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gly Ile 125 130 135 140		
10	Tyr Ser Ser Pro Gly Glu Trp Ser Thr Ile Phe Gly Ser Thr Ser Val 145 150 155		
15	Val Val Asp Asn Ser Ala Pro Leu Trp Phe Ala Thr Tyr Asn Asn Val 160 165 170		
20	Gln Thr Leu Thr Leu Gly Thr Pro Phe Gly Gly Trp Ser Thr Ala Val 175 180 185		
25	Gly His Gln Tyr Thr Asp Val Ser Ala Ser Gly Leu Phe Asp Leu Asn 190 195 200		
30	Val Phe Ala His 205		
35	<210> 27 <211> 208 <212> PRT <213> Hypholoma polytrichid		
40	<220> <221> mat_peptide <222> (1)..(208) <400> 27		
45	Leu Val Tyr Gly Val Asp Ser Ser Ser Leu Val Pro Val Ala Thr Tyr 1 5 10 15		
50	Gln Lys Ala Leu Gly Glu Gly Phe Thr Lys Ala Val Ile Arg Gly Tyr 20 25 30		
55	Glu Glu Ala Cys Gly Val Gly Gly Glu Val Asp Pro Asn Phe Val Pro 35 40 45		
60	Ser Tyr Lys Asn Ala Arg Ala Ala Gly Tyr Thr Asp Ile Asp Met Tyr 50 55 60		
65	Trp Phe Pro Cys Asn Gly Ser Thr His Ser Cys Lys Ser Tyr Ala Ala 65 70 75 80		
70	Gln Leu Ala Ala Ile Ala Ala Ala Phe Ser Ala Asn Ala Met Lys Ile 85 90 95		
75	Gly Thr Ile Trp Ile Asp Ile Glu Lys Asp Ala Ala Ile Cys Asn Asn 100 105 110		

ES 2 915 100 T3

	Trp Asp Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Leu Ala Gln Ala Lys Ala Leu Ile	
	115 120 125	
5	Ala Ala Ala Lys Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gly Ile Tyr Ser Ser Pro	
	130 135 140	
10	Gly Glu Trp Ser Thr Ile Phe Gly Ser Thr Ser Val Val Val Asp Asn	
	145 150 155 160	
15	Ser Ala Pro Leu Trp Phe Ala Thr Tyr Asn Asn Val Gln Thr Leu Thr	
	165 170 175	
20	Leu Gly Thr Pro Phe Gly Gly Trp Ser Thr Ala Val Gly His Gln Tyr	
	180 185 190	
25	Thr Asp Val Ser Ala Ser Gly Leu Phe Asp Leu Asn Val Phe Ala His	
	195 200 205	
30	<210> 28	
	<211> 782	
	<212> ADN	
	<213> Engyodontium album	
35	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(150)	
40	<220>	
	<221> sig_peptide	
	<222> (1)..(60)	
45	<220>	
	<221> mat_peptide	
	<222> (61)..(779)	
50	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (433)..(779)	
55	<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	
60	ggt 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	
65	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	
70	atc aag gtataacaaa ccataacttg gcttatgaac accatctaata gtattgcag gca	202
	Ile Lys Ala	
	30	

ES 2 915 100 T3

	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	
5	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	
10	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	
15	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
20	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	
25	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	
30	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	
35	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
40	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	
45	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	
50	<210> 29	
	<211> 227	
	<212> PRT	
	<213> Engyodontium album	
55	<400> 29	
	Met Lys Ser Phe Gly Val Ile Ala Thr Gly Leu Ala Thr Leu Val Gly	
60	-20 -15 -10 -5	
	Val Ala Ser Ala Arg Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Tyr Gln Pro	
	-1 1 5 10	
65	Ser Val Asp Phe Asn Ala Ala Tyr Ala Asp Gly Ala Arg Phe Val Ile	
	15 20 25	

ES 2 915 100 T3

5 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
 10 Phe Ala Gln Pro Ala Ser Ser Ser Gly Ala Ala Gln Ala Asp Tyr Phe
 65 70 75
 15 Leu Lys Asn Gly Gly Gly Trp Ser Ser Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly
 80 85 90
 20 Met Leu Asp Met Glu Tyr Asn Pro Asn Gly Ser Ala Cys Tyr Gly Leu
 95 100 105
 25 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
 30 Trp Lys Thr Cys Thr Gly Asn Thr Ala Met Phe Ala Asp Lys Cys Pro
 145 150 155
 35 Leu Val Ile Ala Arg Tyr Asn Ser Val Val Gly Glu Leu Pro Ala Gly
 160 165 170
 40 Trp Ser Phe Trp Thr Ile Trp Gln Tyr Asn Asp His Tyr Lys His Gly
 175 180 185
 45 Gly Asp Ser Asp Ala Phe Asn Gly Asp Tyr Ser Gln Leu Gln Arg Ile
 190 195 200
 Ala Arg Gly
 205
 50 <210> 30
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Engyodontium album
 55
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(207)
 60
 <400> 30
 Arg Val Gln Gly Phe Asp Ile Ser His Tyr Gln Pro Ser Val Asp Phe
 1 5 10 15
 65 Asn Ala Ala Tyr Ala Asp Gly Ala Arg Phe Val Ile Ile Lys Ala Thr
 20 25 30

ES 2 915 100 T3

5	Glu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Ser	Gln	His	Tyr	Ile	Gly
			35					40					45			
10	Ala	Thr	Asn	Ala	Gly	Phe	Ile	Arg	Gly	Gly	Tyr	His	Phe	Ala	Gln	Pro
		50					55					60				
15	Ala	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Ala	Gln	Ala	Asp	Tyr	Phe	Leu	Lys	Asn	Gly
	65					70					75					80
20	Gly	Gly	Trp	Ser	Ser	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Pro	Gly	Met	Leu	Asp	Met
					85					90					95	
25	Glu	Tyr	Asn	Pro	Asn	Gly	Ser	Ala	Cys	Tyr	Gly	Leu	Ser	Gln	Ala	Ser
				100					105					110		
30	Met	Arg	Asn	Trp	Ile	Asn	Asp	Phe	Val	Asn	Thr	Tyr	His	Ser	Arg	Thr
			115					120					125			
35	Gly	Val	Tyr	Pro	Leu	Leu	Tyr	Thr	Thr	Thr	Ser	Trp	Trp	Lys	Thr	Cys
		130					135					140				
40	Thr	Gly	Asn	Thr	Ala	Met	Phe	Ala	Asp	Lys	Cys	Pro	Leu	Val	Ile	Ala
	145					150					155					160
45	Arg	Tyr	Asn	Ser	Val	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Trp	Ser	Phe	Trp
					165					170					175	
50	Thr	Ile	Trp	Gln	Tyr	Asn	Asp	His	Tyr	Lys	His	Gly	Gly	Asp	Ser	Asp
				180					185					190		
55	Ala	Phe	Asn	Gly	Asp	Tyr	Ser	Gln	Leu	Gln	Arg	Ile	Ala	Arg	Gly	
			195					200					205			

REIVINDICACIONES

- 5 1. Lisozima microbiana o una composición que comprende lisozima microbiana para su uso en un método para prevenir, aliviar o tratar el síndrome del intestino irritable (SII) o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).
- 10 2. Lisozima o composición microbiana que la comprende para su uso según la reivindicación 1, donde la lisozima microbiana estabiliza la microbiota sana en el tubo digestivo y suprime el crecimiento y/o la colonización intestinal de patógenos bacterianos.
- 15 3. Lisozima o composición microbiana que la comprende para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde la lisozima microbiana previene, alivia o trata la inflamación.
- 20 4. Lisozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la lisozima microbiana reduce la deposición de lípidos ectópicos asociada con la obesidad, como, por ejemplo, la obesidad inducida por la dieta.
- 25 5. Lisozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde una composición que comprende una lisozima se administra a un nivel de 0,1 a 1000 ppm de proteína enzimática por kg de composición.
- 30 6. Lisozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la lisozima microbiana comprende uno o más dominios seleccionados de la lista que consta de GH24 y GH25.
- 35 7. Lisozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la lisozima microbiana se selecciona del grupo que consta de:
 - (a) un polipéptido, que tiene una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 1;
 - (b) una variante de la SEQ ID N.º: 1, donde la variante tiene actividad de lisozima y comprende una o más sustituciones de aminoácidos y/o una o más delecciones de aminoácidos y/o una o más inserciones de aminoácidos o cualquier combinación de las mismas en 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 o 50 posiciones;
 - (c) un fragmento del polipéptido de (a) o (b), que tiene actividad de lisozima, donde el fragmento comprende al menos 170 aminoácidos, como al menos 175 aminoácidos, al menos 177 aminoácidos, al menos 180 aminoácidos, al menos 185 aminoácidos, al menos 190 aminoácidos, al menos 195 aminoácidos o al menos 200 aminoácidos;
 - (d) un polipéptido, que tiene una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 4;
 - (e) una variante de la SEQ ID N.º: 4, donde la variante tiene actividad de lisozima y comprende una o más sustituciones de aminoácidos y/o una o más delecciones de aminoácidos y/o una o más inserciones de aminoácidos o cualquier combinación de las mismas en 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 o 50 posiciones;
 - (f) un fragmento del polipéptido de (d) o (e), que tiene actividad de lisozima, donde el fragmento comprende al menos 210 aminoácidos, como al menos 215 aminoácidos, al menos 220 aminoácidos, al menos 225 aminoácidos, al menos 230 aminoácidos, al menos 235 aminoácidos o al menos 240 aminoácidos;
 - (g) un polipéptido, que tiene una identidad de secuencia de al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % con la SEQ ID N.º: 15;
 - (h) una variante de la SEQ ID N.º: 15, donde la variante tiene actividad de lisozima y comprende una o más sustituciones de aminoácidos y/o una o más delecciones de aminoácidos y/o una o más inserciones de aminoácidos o cualquier combinación de las mismas en 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 o 50 posiciones; y
 - (i) un fragmento del polipéptido de (g) o (h), que tiene actividad de lisozima, donde el fragmento comprende al menos 170 aminoácidos, como al menos 175 aminoácidos, al menos 177 aminoácidos, al menos 180 aminoácidos, al menos 185 aminoácidos, al menos 190 aminoácidos, al menos 195 aminoácidos o al menos 200 aminoácidos.

8. Lizozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para usarse en el tratamiento de un ser humano.
- 5 9. Lizozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la composición es una composición alimenticia o farmacéutica.
- 10 10. Lizozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la composición se encuentra en forma de polvo, pastilla, gragea, pastilla efervescente, cápsula, emulsión, pasta, bolsita individual, goma de mascar o gotas de aceite.
- 15 11. Lizozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la lizozima o la composición microbiana que la comprende se usa en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y/o la colitis ulcerosa.
- 20 12. Lizozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la lizozima microbiana reduce la cantidad de células muertas de *Lactobacillus johnsonii* o los restos de la pared celular de las mismas, en el tubo digestivo.
- 25 13. Lizozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la lizozima microbiana promueve la eliminación de células muertas de *Lactobacillus johnsonii*, o los restos de la pared celular de las mismas, del tubo digestivo de los seres humanos.
- 30 14. Lizozima o composición microbiana que la comprende para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la lizozima microbiana tiene actividad de lizozima contra *Lactobacillus johnsonii* determinada por el método para la determinación de la actividad de lizozima contra *Lactobacillus johnsonii*.
- 35 15. Lizozima o composición microbiana que la comprende para su uso según la reivindicación 14, donde la lizozima microbiana se selecciona del grupo que consta de un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 1, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 15, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 18, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 21, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 24, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 27 y un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 30, seleccionada preferiblemente del grupo que consta de un polipéptido que tiene al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 1, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 15, un polipéptido que tiene al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 18, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 21, un polipéptido que tiene al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 27 y un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 30, seleccionada más preferiblemente del grupo que consta de un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 18, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 21, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 27 y un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 30, aun más preferiblemente un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 21 o un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 27.

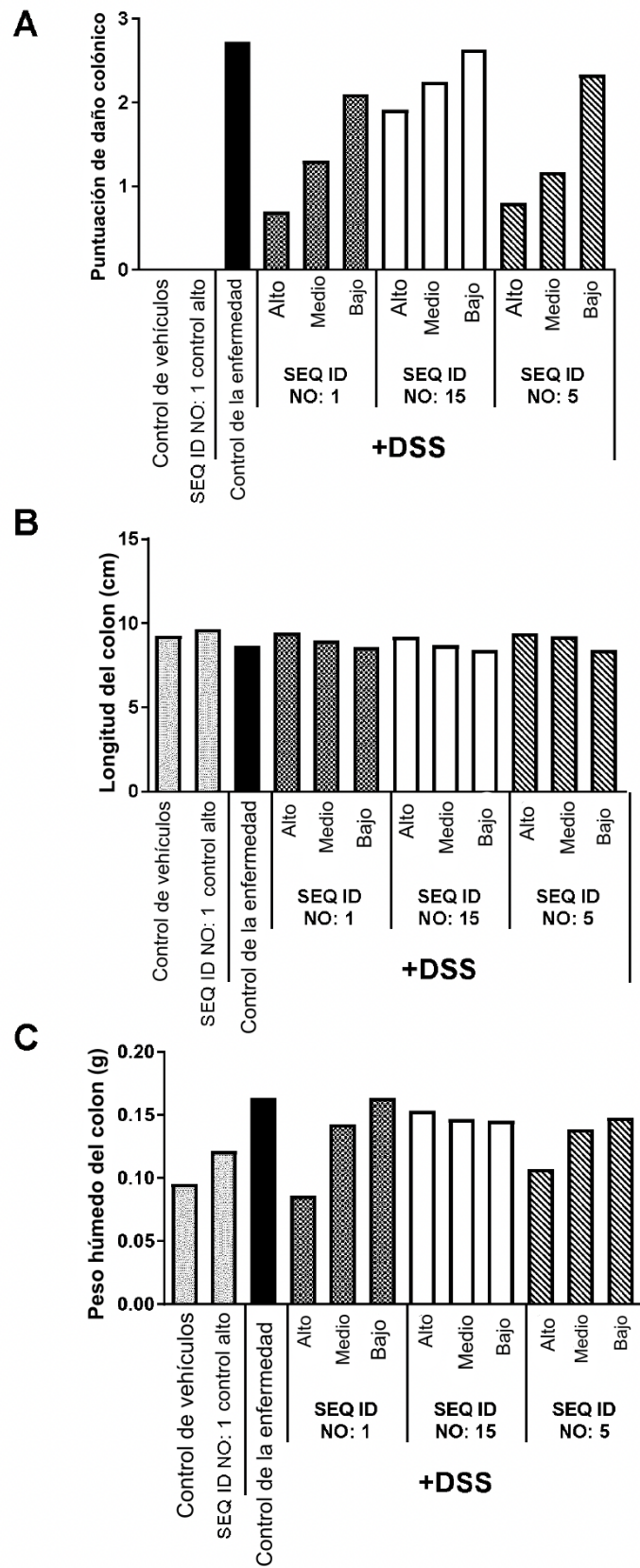


Figura 1/7

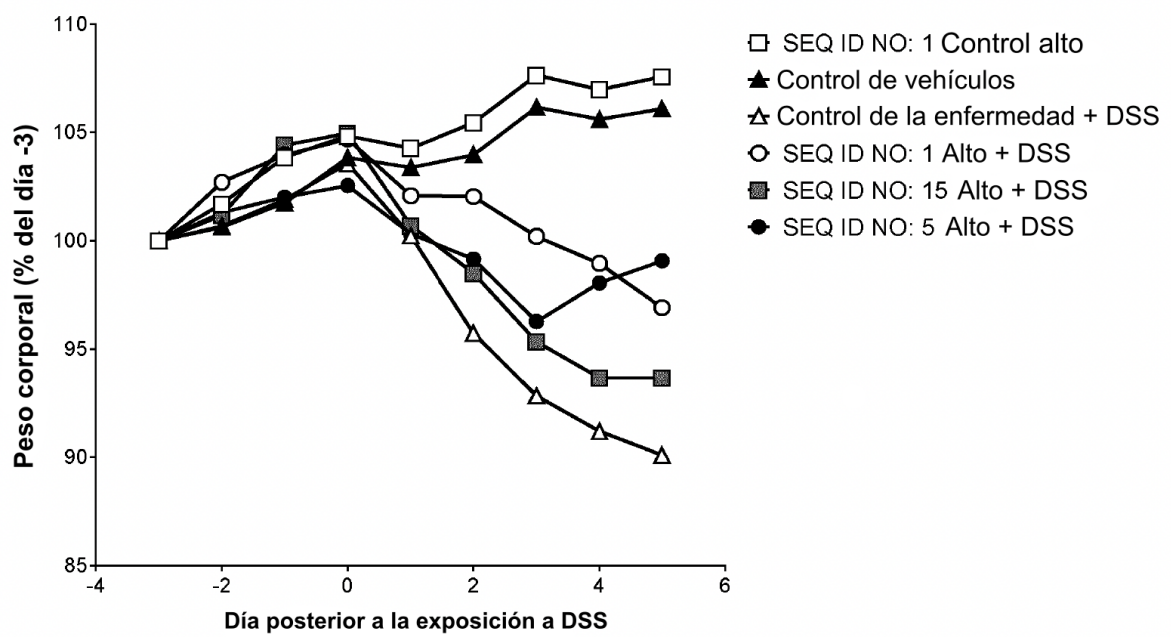


Figura 2/7

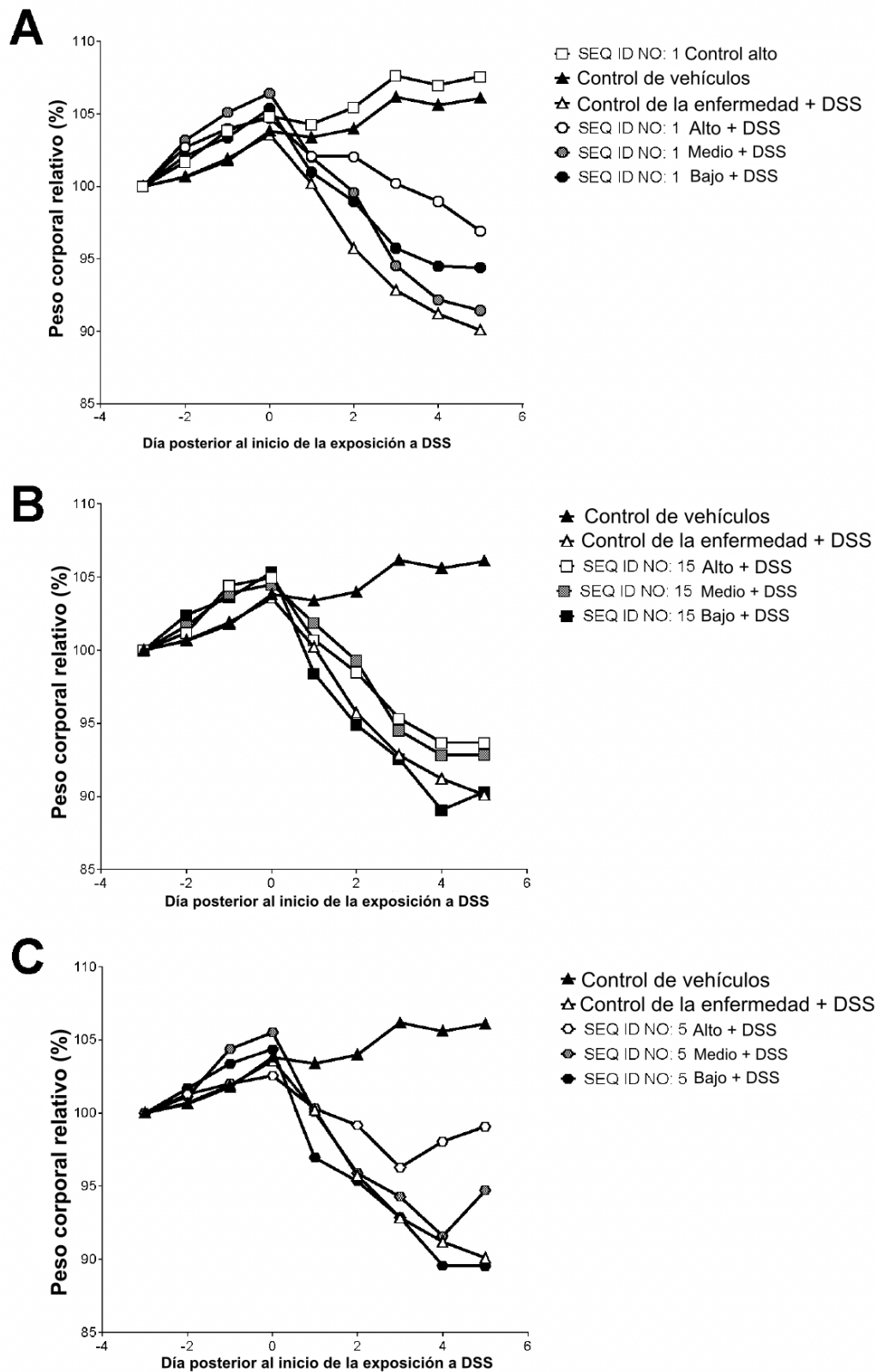


Figura 3/7

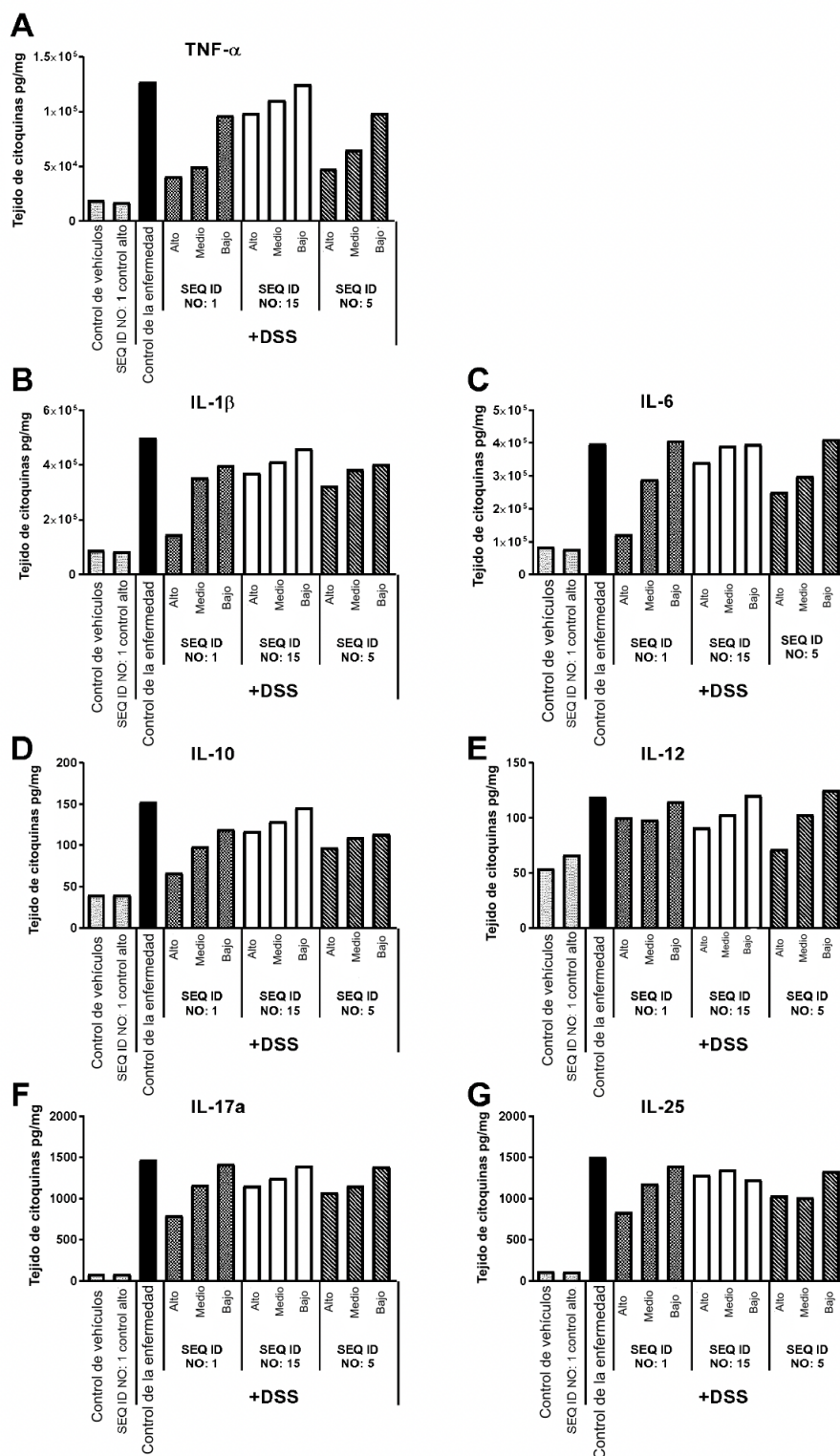


Figura 4/7

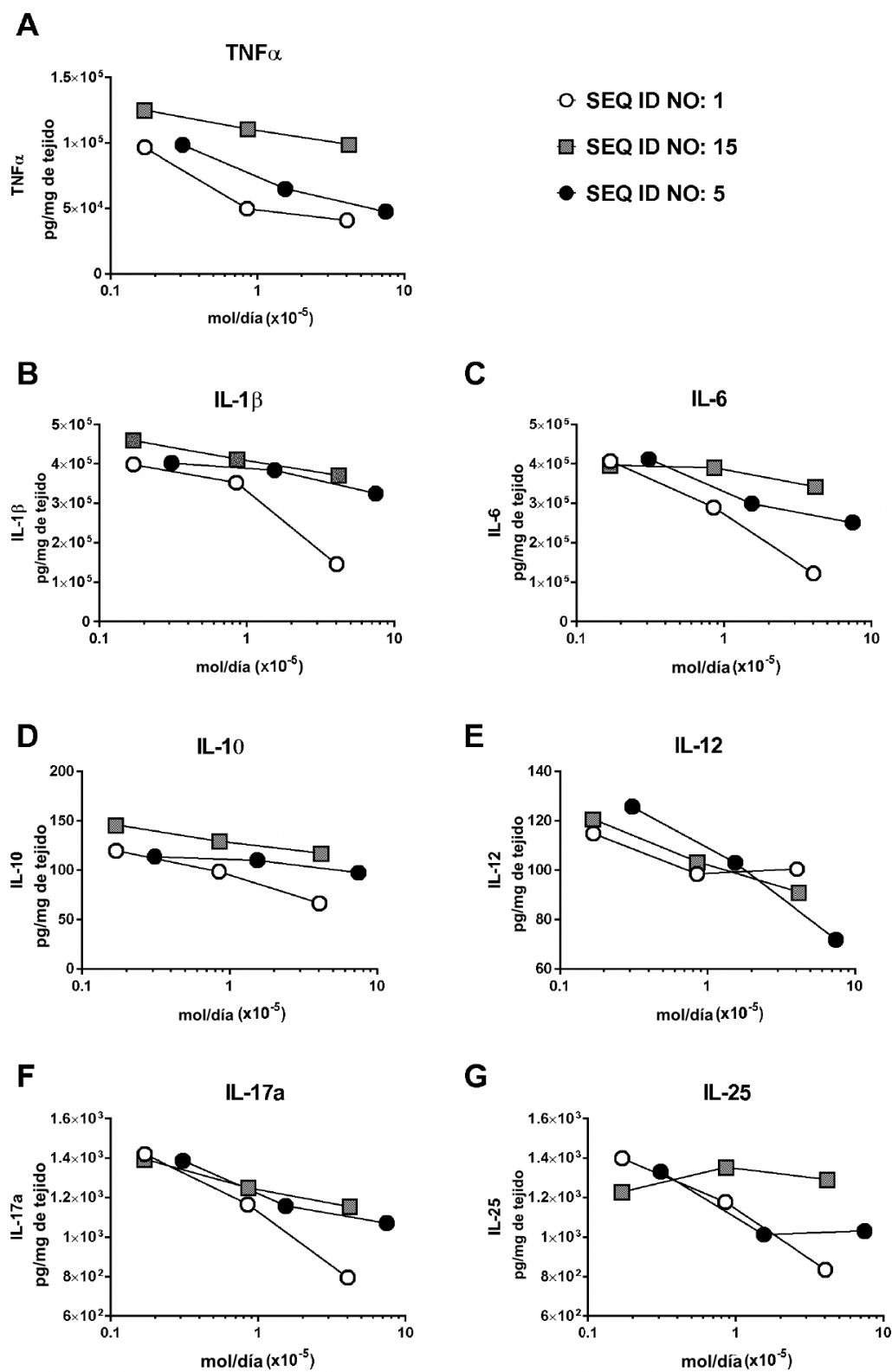


Figura 5/7

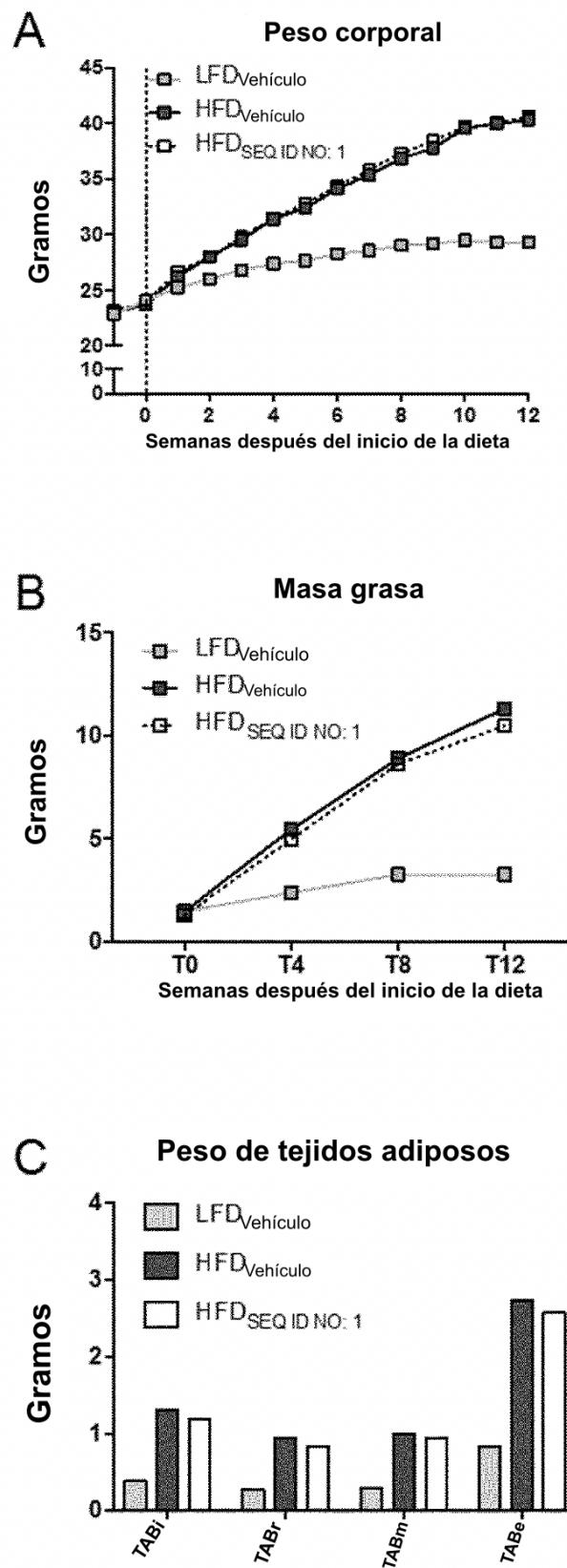


Figura 6/7

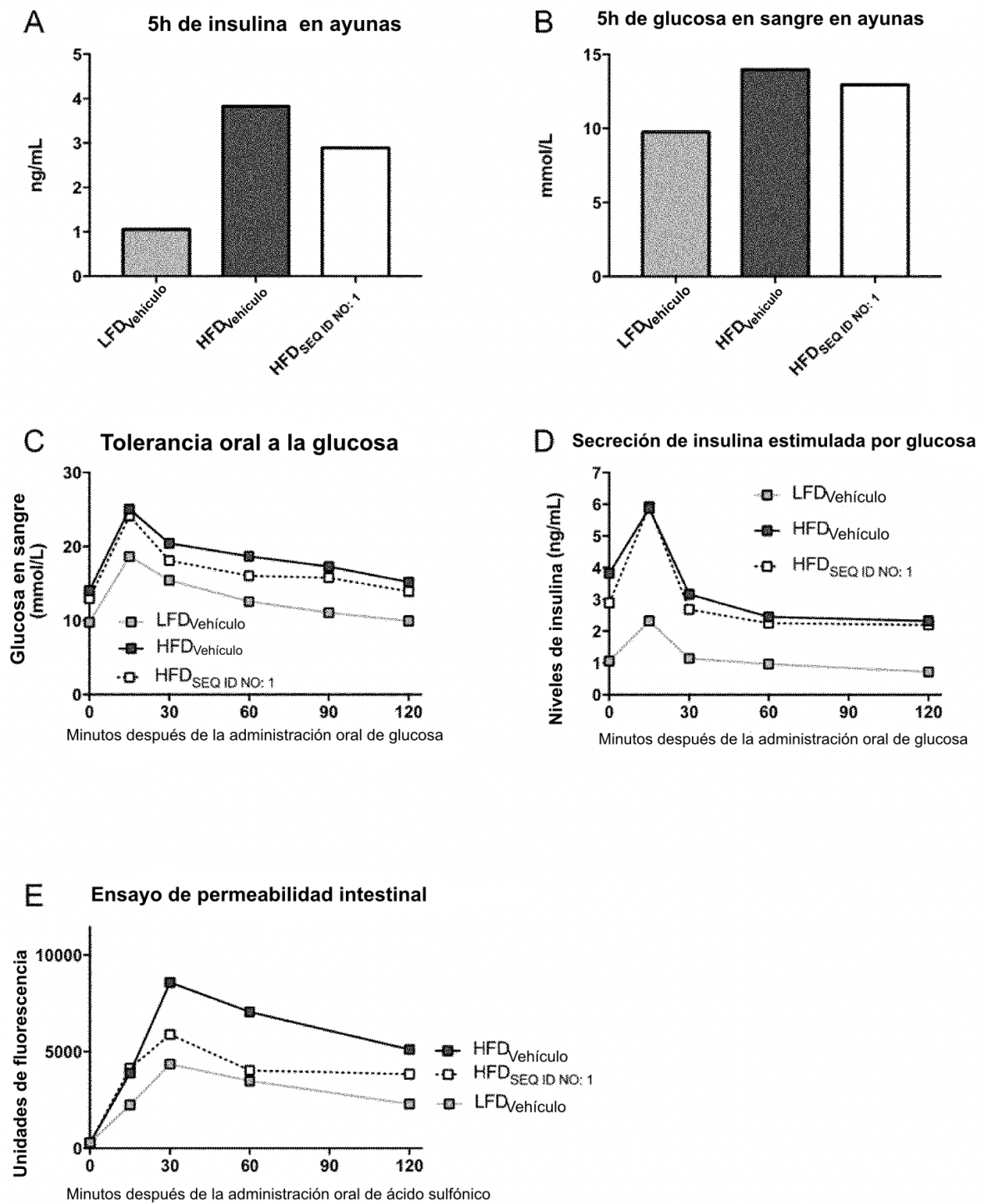


Figura 7/7