

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2017/209651 A1

(43) Дата международной публикации
07 декабря 2017 (07.12.2017)

(51) Международная патентная классификация:
C12N 1/20 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
C07K 7/66 (2006.01) *C12R 1/08* (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)

СЫРОВ, Кирилл Константинович (SYROV, Kirill Konstantinovich); ул. Крылатская, 45, к. 1, кв. 131, Москва, 121609, Moscow (RU).

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2017/000326

(74) Агент: **ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ ПАТЕНТНО-ПРАВОВАЯ ФИРМА "ЮС" (PATENT & LAW FIRM "YUS", LIMITED LIABILITY COMPANY)**; Проспект Мира, 6, Москва, 129090, Moscow (RU).

(22) Дата международной подачи:
19 мая 2017 (19.05.2017)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2016121667 01 июня 2016 (01.06.2016) RU

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

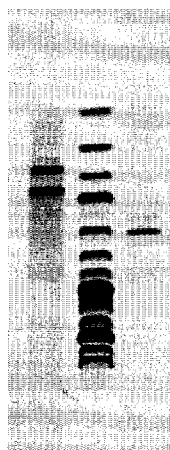
(71) Заявитель: **ПУБЛИЧНОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "ВАЛЕНТА ФАРМАЦЕВТИКА" (JOINT STOCK COMPANY "VALENTA PHARMACEUTICALS")** [RU/RU]; ул. Фабричная, 2, Щелково, Московская обл., 141101, Shchyolkovo, Moskovskaya obl. (RU).

(72) Изобретатели: **НЕСТЕРУК, Владимир Викторович (NESTERUK, Vladimir Viktorovich)**; 4-ый Войковский пр., 3, кв. 15, Москва, 125171, Moscow (RU).

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ,

(54) Title: *ANEURINIBACILLUS MIGULANUS* STRAIN AND USE THEREOF

(54) Название изобретения: ШТАММ *ANEURINIBACILLUS MIGULANUS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ



1 2 3

Фиг. 1

(57) Abstract: The invention relates to biotechnology and may be used for producing a gramicidin S active substance by using a producing strain of *Aneurinibacillus migulanus*, VKPMV-10212. The obtained mutant strain enables high-yield production of a gramicidin substance.

(57) Реферат: Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения действующего вещества грамицидина С с помощью штамма продуцента *Aneurinibacillus migulanus* ВКПМВ-10212. Полученный мутантный штамм позволяет продуцировать вещество грамицидин с высоким выходом.



WO 2017/209651 A1

UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), ОАПИ (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- со сведениями относительно депонированного биологического материала, представленными в соответствии с правилом 13bis отдельно от описания (правила 13bis4(d)(i) и 48.2(a)(viii))

Штамм *Aneurinibacillus migulanus* и его применение

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения действующего вещества грамицидина С с помощью штамма продуцента

5 *Aneurinibacillus migulanus* ВКПМВ-10212. Полученный мутантный штамм позволяет продуцировать грамицидин с высоким выходом.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Известны способы получения грамицидина С при глубинном выращивании

10 продуцента *Bacillus brevis* на синтетических средах [Коршунов В.В. Физиология обмена веществ *Bacillus brevis* subsp. G.-В. в связи с биосинтезом грамицидина С. - Канд. дисс., 1962, М., МГУ, Коршунов В.В., Егоров Н.С. Синтетическая среда для развития *Bacillus brevis* и образование граммидина. Микробиология, 1962; 31:3, 515-519, . Шапошников В.Н., Работнова И.Л., Силаев А.Б. и др. Способ получения

15 кристаллического грамицидина С. - Авторское свидетельство на изобретение №187243, 1963, Куплетская М.Б. Влияние аэрации на развитие и образование граммидина культурой *Bacillus brevis* var. G.-В. Микробиология, 1965; 34:5, 905-909, Жарикова Г.Г. Естественная изменчивость споровых бактерий и биосинтез полипептидных антибиотиков. - Докт. дисс., 1972, М., МГУ, Березовская А.И.,

20 Выпяч А.Н., Егоров Н.С. и др. Штамм *Bacillus brevis* 101 - продуцент грамицидина С. - Авторское свидетельство на изобретение №686463, 1978, Способ глубинного культивирования *Bacillus brevis* штамм 101 для получения грамицидина С, - РФ2447143, 24.11.2008].

Известен периодический процесс получения грамицидина С при выращивании

25 наиболее продуктивных штаммов *Bacillus brevis*. [Удалова Т.П. Особенности роста и развития *Bacillus brevis* var. G.-В в связи с биосинтезом грамицидина S. - Канд. дисс., 1979, М., МГУ], который использовали для синтеза продукта при выращивании *Bacillus brevis* штамма 101 [Юдина Т.П. Физиолого-биохимические особенности продуцентов граммидина *Bacillus brevis* subsp. G.-В. и их вариантов. - Канд. дисс.,

30 2002, М., МГУ.], характеризуется тем, что производится одноразовая загрузка питательной среды в ферментер, инокуляция посевным материалом, культивирование

при аэрации и перемешивании в течение 27 часов до достижения величины pH 6,0 и ниже.

В основу изобретения поставлена задача, создать более эффективный способ
5 продукции грамицидина с высоким, с промышленной точки зрения, выходом и
предложить микроорганизмы, которые могут быть использованы в этом способе.
Поставленная задача решается путем получения нового штамма *Aneurinibacillus
migularus* ВКПМВ-10212.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 В одном варианте изобретение относится к штамму бактерий *Aneurinibacillus
migularus* ВКПМВ-10212.

В предпочтительном варианте изобретение относится к штамму бактерий
Aneurinibacillus migularus ВКПМВ-10212, продуценту грамицидина.

15 В другом варианте изобретение относится к применению штамма бактерий
Aneurinibacillus migularus ВКПМВ-10212 для получения грамицидина.

Родовое и видовое название культуры – *Aneurinibacillus migularus*.

Номер, полученный при регистрации – ВКПМВ-10212.

Способ получения штамма – получен как мутант.

Идентифицирована культура ВКПМ ФГУП «ГосНИИГенетика» (г.Москва),
20 отчет об идентификации штамма №101 методом анализа 16S РНК от 16 марта 2009 г.
Справка о депонировании прилагается. Дата депонирования – 03.03.2009 г.

Культурально-морфологические особенности штамма – палочки длиной 4-8
мкм, шириной 0,6-0,7 мкм, образует споры с овальными краями размером 0,8-1,0 мкм.
Аэроб. Не разжижает желатину. Не гидролизует крахмал. Потребляет азот в аминной
25 и аммонийной форме. На агаризованной питательной среде Гаузе-Бражниковой при
культивировании в течение 40-48 часов при температуре 40±1°C образует колонии
округлой формы, приподнятые над поверхностью агара, с отчетливо выраженным
кратерообразным или точечным центром. Цвет колоний – бежевый, колонии
непрозрачные, пастообразной консистенции. Легко снимаются с поверхности агара
30 петлей. Форма и размер колоний сильно варьируют в зависимости от состава среды,
густоты посева и других факторов. В процессе культивирования может расщепляться
на варианты с отличающейся морфологией и сниженной продукцией антибиотика.

Область применения штамма: промышленное производство антибиотиков.

Продукт, синтезируемый штаммом: грамицидина С гидрохлорид (кристаллический).

Активность (продуктивность) штамма, другие производственные показатели – при культивировании в качалочных колбах на «лабораторной регламентной» жидкой питательной среде в течение 72 часов продуцирует $2 \pm 0,3$ г/л грамицидина С, что соответствует $0,2 \pm 0,02$ г_{грамицидина С}/г_{биомассы}. При выращивании в ферментерах при оптимальных условиях удельная продукция грамицидина С может составлять до $0,4$ г_{грамицидина С}/г_{биомассы}. Средняя продуктивность линий, поддерживаемых в активном состоянии на агаризованных средах на 27.01.2009 г., составляет 2,073 г/л грамицидина С; содержание близкородственных примесей – 15,3%.

Способ определения активности штамма с указанием метода – экстракция грамицидина С из культуральной жидкости этиловым спиртом с последующим определением концентрации грамицидина С методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Способ, условия и состав сред для длительного хранения штамма - хранение спор на пшене, хранение вегетативных клеток и спор в лиофильно высушенном состоянии (на молоке 10-20%).

Способ, условия и состав сред для размножения штамма – выращивание на агаризованной среде Гаузе-Бражниковой (дрожжевая вода 50% по объему или 28 мг% по аминному азоту; пептон 1%; NaCl 0,5%; агар-агар 3%; pH 7,0) в течение 48-72 часов при 40°C. Выращивание на жидкой полусинтетической среде «лабораторная регламентная» (на 1 л среды: глицерин дистиллированный – 20 мл, молочная кислота пищевая 40% – 8 мл; K₂HPO₄ – 9,9 г, NaCl – 5 г; MgSO₄·7H₂O – 0,2 г; аммоний щавелевокислый – 8,12 г; дрожжевой автолизат – до 5 мг%) в качалочных колбах вместимостью 0,75 л (0,1 л среды) на круговой качалке (частота вращения 220 об/мин, амплитуда 1 м) при 40 °С в течение 48-72 часов.

Оптимальные условия и состав среды для ферментации - среда «ферментационная регламентная» (глицерин – 30 мл, молочная кислота 40% – 24,6 мл, K₂HPO₄ – 2 г, NaCl – 5 г; MgSO₄·7H₂O – 0,2 г; аммоний щавелевокислый – 12 г; дрожжевой автолизат – до 10 мг%; гидролизат казеина – до 20 мг%; лапрол – 2 мл; pH после стерилизации 7,02-7,2). Аэрация 1,25 м³ O₂/ м³ среды·час, давление – 0,5 ати, интенсивность перемешивания должна обеспечивать массообмен по кислороду на уровне от 0,2-0,3 ммоль O₂/л·мин в начале ферментации до 0,4-1,0 ммоль O₂/л·мин в

конце ферментации в зависимости от достигнутой биомассы (0,035-0,045 ммоль O₂/г_{биомассы}·мин). Хемостатирование на уровне pH 6,4-7,2. Культивирование в течение 16-48 часов в зависимости от способа ведения ферментации.

ДНК штамма содержит рестракторный сайт HindIII.

5 Штамм не является зоопатогенным, фитопатогенным.

Фиг. 1. Рестрикторный анализ фрагмента ДНК, кодирующего ген 16S РНК исследуемого штамма 101.

1. Фрагмент ДНК, кодирующий ген 16S РНК исследуемого штамма 101, обработанный рестриктазой HindIII

10 2. Маркер 1 kb DNA Ladder (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 п.н., снизу вверх)

3. Фрагмент ДНК, кодирующий ген 16S РНК исследуемого штамма 101, не обработанный рестриктазой HindIII.

15 **Пример 1. Идентификация штамма 101 до вида с помощью анализа 16S РНК**

Этапы работ

I. Рассев культуры до отдельной колонии и получение биомассы для анализа 16S РНК

II. Выделение ДНК

20 **III. Выбор праймеров и режимы ПЦР**

Консервативные праймеры для наработки 16S rDNA –

8f – aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r - ccg tca att cct ttr agt tt

1492r - ggt tac cct tgt tac gac tt

25 с режимами реакции:

1. 95°C – 3 мин.

2. 35 циклов

95°C – 30 сек.

57°C – 30 сек.

30 72°C – 1 мин. 30 сек.

3. 72°C – 5 мин.

IV. Секвенирование 16S rDNA, сравнение секвенсов и построение деревьев родства

Секвенирование проводится на автоматическом секвенаторе AE3000.

Для анализа секвенсов используются специализированные филогенетические компьютерные программы.

Стабильность воспроизведения результатов. Проводится не менее трех повторов ПЦР-реакций.

Условия электрофореза ПЦР исследуемых образцов.

1,0% агарозный гель, электрофорез при напряженности электрического поля 5 В/см.

V. Рестрикционный анализ фрагмента ДНК, кодирующего ген 16S РНК

а) Секвенирование переменных участков 16S rDNA.

При секвенировании переменных участков 16S rDNA получена следующая собранная нуклеотидная последовательность для штамма 101:

atgaaggttttcgatcgtaaagttctgtttagggaagaaccgccgggatgacctccc
cggctctgacggttncctaaacgagaaaagccccggctaactctacggtgccagcagccgc
ggtaatacgtagggggcaagcgtgtccggaattattgggcgtaaagcgcgcagggcg
cttcttaagtcaggtgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggccacttgaaactggga
agcttgagtgcaggagaggagagcgggaattccacgtgtagcgggtgaaatgcgtagagatg
tggaggaacacccgtggcgaaggcggctctctggcctgtaactgacgctgagggcgcgaaa
gcgtggggagcgaacaggattagatacccctggtagtccacgccgtaaacgttgagtgct
aggtgtggggactccaatcctcagtgctcgcagctaacgcaat
aagcactccgcctggg

б) Анализ результатов секвенирования и построение дерева родства

Первичный скрининг по базе данных GenBank и RDP-II показал, что исследуемый штамм принадлежит к следующим систематическим группам Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Paenibacillaceae; Aneurinibacillus group; Aneurinibacillus, причем гомология с видами *Aneurinibacillus migulanus* и *Aneurinibacillus aneurinilyticus* составляет 98%.

Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий, доступными из базы данных GenBank.

Результаты обработки секвенсов при помощи компьютерной программы находящейся на сайте RDB II (Ribosomal Database Project II), предназначенной для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев, представляются в графическом виде.

5 Таблица 1. Матрица расстояний

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
101.txt	1	---	0,980	0,987	0,958	0,991	0,892	0,907	0,989	0,958	0,989
Ab.anurly3	2	0,020	---	0,985	0,955	0,989	0,895	0,909	0,991	0,955	0,991
Ab.migulan	3	0,013	0,015	---	0,962	0,996	0,902	0,912	0,994	0,962	0,994
Ab.thaerph	4	0,042	0,045	0,038	---	0,967	0,903	0,912	0,965	1	0,965
Ab.migula2	5	0,009	0,011	0,004	0,033	---	0,902	0,917	0,998	0,967	0,998
B.badius2	6	0,108	0,105	0,098	0,097	0,098	---	0,889	0,905	0,903	0,905
Oxl.oxali2	7	0,093	0,091	0,088	0,088	0,083	0,111	---	0,919	0,912	0,919
Ab.anurly2	8	0,011	0,009	0,006	0,035	0,002	0,095	0,081	---	0,965	1
Ab.thaerp2	9	0,042	0,045	0,038	0,000	0,033	0,097	0,088	0,035	---	0,965
Ab.anurlyt	10	0,011	0,009	0,006	0,035	0,002	0,095	0,081	0,000	0,035	---

Таблица 2. Описание последовательностей

<u>Ab.migula2</u>	<i>Aneurinibacillus migulanus</i> DSM 2895 (T)
<u>Ab.anurly2</u>	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> DSM 5562 (T)
<u>Ab.migulan</u>	<i>Aneurinibacillus migulanus</i> ATCC 9999 (T)
<u>Ab.anurlyt</u>	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> NCIMB 10056
<u>Ab.anurly3</u>	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> ATCC 12856 (T)
<u>Ab.thaerph</u>	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> str. L420-91 DSM 10154 (T)
<u>Ab.thaerp2</u>	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> DSM 10155
<u>Oxl.oxali2</u>	<i>Oxalophagus oxalicus</i> str. Alt Ox1 DSM 5503 (T)
<u>B.badius2</u>	<i>Bacillus badius</i> ATCC 14574 (T)
<u>101.txt</u>	Исследуемый штамм 101

Дальнейший анализ по RDP II 16S рРНК базе данных показал гомологию с теми же видами бактерий, и наиболее близкими видами являются *Aneurinibacillus migulanus* и *Aneurinibacillus aneurinilyticus*.

По данным анализа было построено филогенетическое дерево с гомологичными штаммами (Фиг. 2).

Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97%. По этому критерию исследуемый штамм можно отнести к видам *Aneurinibacillus migulanus* и *Aneurinibacillus aneurinilyticus*.

Для более точной идентификации воспользовались методы рестрикционного анализа фрагмента ДНК, кодирующего ген 16S РНК.

По литературным данным известно, что данный фрагмент ДНК *Aneurinibacillus migulanus* содержит рестрикционный сайт HindIII, тогда как у *Aneurinibacillus aneurinilyticus* данный рестрикционный сайт отсутствует.

Проведен рестрикционный анализ фрагмента ДНК, кодирующего ген 16S РНК исследуемого штамма 101. Результаты работы показаны на фиг. 1.

Наличие фрагментов 620 п.н. и 870 п.н. при обработке фрагмента ДНК рестриктазой HindIII говорит о том, что сайт HindIII присутствует в составе фрагмента ДНК исследуемого штамма 101. Этот критерий позволяет отнести исследуемый штамм 101 к виду *Aneurinibacillus migulanus*.

Пример 2. Способ получения грамицидина С

Грамицидин С получают методом ферментации. Процесс состоит из четырех этапов: обработка продуктивного штамма *Aneurinibacillus migulanus* ВКПМВ-10212 в лаборатории, подготовка прививочного материала, культивирование прививочного материала в лабораторном ферментере, биосинтез грамицидина С в основном ферментере.

Основные параметры ферментации подобраны с учетом морфологии и стабильности продуктивного штамма *Aneurinibacillus migulanus* ВКПМВ-10212. Время выращивания продуктивного штамма на среде агара в термостате варьирует в диапазоне от 48 до 120 часов и позволяет семенной объем в большем объеме, чем при культивировании на чашках Петри. Бактериальную суспензию хранят в 15% защитном растворе глицерина при температуре от -20°C до -80°C.

Предварительную подготовку посевного материала проводят в лабораторном ферментере в среде агаре и отсутствии других микроорганизмов.

Затем инокулят перемещают в следующий ферментер в количестве 1-2,5% от объема среды ферментации, состоящей из цитрата натрия, хлорида аммония, калия дигидрофосфата, D- и L-молочной кислоты в соотношении 1:1, порошка экстракта дрожжей, порошка казеина, пеногасителя Struktol J 647. Оптимальные параметры процесса ферментации: оптическая плотность от 10 до 20, pH от 5,5 до 7,5, отсутствие других микроорганизмов. Процесс ферментации продолжается от 48 до 120 часов.

Следующий этап производства заключается в брожении посевного материала в основном ферментере. Объем посевного материала составляет 8-17% от среды ферментации, состоящей из цитрата натрия, хлорида аммония, калия дигидрофосфата, D- и L-молочной кислоты в соотношении 1:1, порошка экстракта дрожжей, порошка казеина, пеногасителя Struktol J 647. Оптимальное значение pH в диапазоне от 6,5 до 7,0 контролируется добавлением раствора аммиака. Оптимальную концентрацию питательных веществ поддерживают добавлением растворов глицерина, сульфата аммония и кукурузного крахмала. Процесс ферментации продолжается от 48 до 120 часов.

Полученную биомассу фильтруют на керамическом фильтрующем модуле способом ультрафильтрации, промывая биомассу деионизированной водой для удаления примесей из биомассы. Концентрированную биомассу сушат в распылительной сушилке при температуре 180°C. Высушенную биомассу промывают ацетоном при температуре 40°C для удаления окрашенных примесей. Ацетон удаляют при помощи продувки азотом, затем повторно промывают ацетоном и сушат в вакууме при температуре 45°C

Далее грамицидин С экстрагируют этанолом, корректируя pH до 3,0-4,0 разбавленной хлористоводородной кислотой (HCl : этанол = 1 : 2). Экстракцию проводят несколько раз, удаляя экстракты с помощью сжатого азота. После отделения этанола биомассу сушат в вакууме при температуре около 47°C.

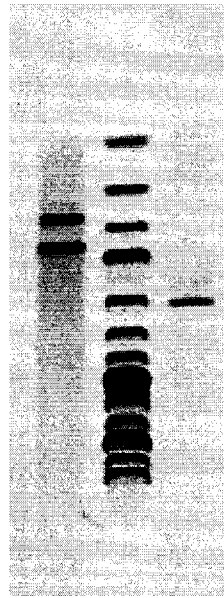
Высушенную биомассу растворяют в воде и обесцвечивают активированным углем, затем фильтруют на фильтр-прессе, промывая этанолом для уменьшения потерь продукта из-за сорбции на угле.

Полученный экстракт перемещают в кристаллизатор, разбавляют деионизированной водой, добавляют концентрированный раствор хлорида натрия и

нагревают до температуры 55-65°C. После осветления раствор охлаждают до температуры не выше 5 °С. Полученные кристаллы отделяют на центрифуге и сушат в вакууме при температуре не более 65°C, затем измельчают на штырьковой мельнице, просеивают через сита с диаметром ячеек 400 и 200 мкм и упаковывают в 5 полиэтиленовые мешки, помещенные в алюминиевые контейнеры.

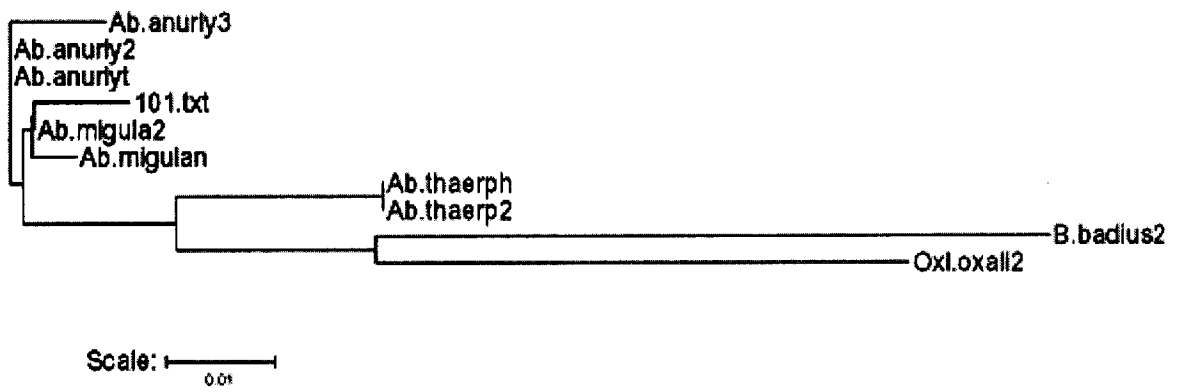
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм бактерий *Aneurinibacillus migulanus* ВКПМВ-10212, продуцент грамицидина.
- 5 2. Применение штамма бактерий *Aneurinibacillus migulanus* ВКПМВ-10212 для получения грамицидина.



1 2 3

Фиг. 1



Фиг. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2017/000326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		<i>C12N 1/20 (2006.01)</i>	<i>A61K 35/74 (2015.01)</i>
		<i>C07K 7/66 (2006.01)</i>	<i>A61P 31/04 (2006.01)</i>
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			<i>C12R1/08 (2006.01)</i>
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)			
C12N 1/20, C07K 7/66, A61K 35/74, A61P 31/04, 1/04, C12R 1/08			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)			
NCBI, PubMed, RUPTO, USPTO, WIPO, PAJ, Esp@cenet, PCTonline, USPTO DB, CIPO(Canada PO), SIPO DB, CA, K-PION, KIPRIS, PabMed, (Chem.Abstr.), GoogleScholar, PatSearch			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
A	BERDITSCH M. et al. The ability of Aneurinibacillus migulanus (Bacillus brevis) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. Applied and Environmental Microbiology, 2007, Vol.73, no.20, p.6620-6628		1-2
A	RU 2447143 C2 (DERBGPGEV VIKTOR VIKTOROVICH et al.) 10.04.2012, abstract, the claims		1-2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.			
* Special categories of cited documents:		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"&" document member of the same patent family	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
04 July 2017 (04.07.2017)		24 August 2017 (24.08.2017)	
Name and mailing address of the ISA/		Authorized officer	
Facsimile No.		Telephone No.	

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2017/000326

<p>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p style="text-align: right;"><i>C12N 1/20 (2006.01)</i> <i>C07K 7/66 (2006.01)</i> <i>A61K 35/74 (2015.01)</i> <i>A61P 31/04 (2006.01)</i> <i>C12R1/08 (2006.01)</i></p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>												
<p>B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">C12N 1/20, C07K 7/66, A61K 35/74, A61P 31/04, 1/04, C12R 1/08</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">NCBI, PubMed, RUPTO, USPTO, WIPO, PAJ, Esp@cenet, PCTonline, USPTO DB, CIPO(Canada PO), SIPO DB, CA, K- PION, KIPRIS, PabMed, (Chem.Abstr.), GoogleScholar, PatSearch</p>												
<p>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Категория*</th> <th style="width: 70%;">Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th style="width: 20%;">Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>BERDITSCH M. et al. The ability of <i>Aneurinibacillus migulanus</i> (<i>Bacillus brevis</i>) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. Applied and Environmental Microbiology, 2007, Vol.73, no.20, p.6620-6628</td> <td style="text-align: center;">1-2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>RU 2447143 C2 (ДЕРБЫШЕВ ВИКТОР ВИКТОРОВИЧ и др.) 10.04.2012, реферат, формула</td> <td style="text-align: center;">1-2</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</p> </td> </tr> </table>		Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	A	BERDITSCH M. et al. The ability of <i>Aneurinibacillus migulanus</i> (<i>Bacillus brevis</i>) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. Applied and Environmental Microbiology, 2007, Vol.73, no.20, p.6620-6628	1-2	A	RU 2447143 C2 (ДЕРБЫШЕВ ВИКТОР ВИКТОРОВИЧ и др.) 10.04.2012, реферат, формула	1-2	<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>	<p>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</p>
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №										
A	BERDITSCH M. et al. The ability of <i>Aneurinibacillus migulanus</i> (<i>Bacillus brevis</i>) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. Applied and Environmental Microbiology, 2007, Vol.73, no.20, p.6620-6628	1-2										
A	RU 2447143 C2 (ДЕРБЫШЕВ ВИКТОР ВИКТОРОВИЧ и др.) 10.04.2012, реферат, формула	1-2										
<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>	<p>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</p>											
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">04 июля 2017 (04.07.2017)</p>	<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">24 августа 2017 (24.08.2017)</p>											
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>	<p>Уполномоченное лицо: Л.Таратунина</p> <p>Телефон № 495 531 65 15</p>											