

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

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2013/100810 A3

(43) Дата международной публикации
04 июля 2013 (04.07.2013)

WIPO | РСТ

- (51) Международная патентная классификация:
C12Q 1/04 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
- (21) Номер международной заявки: РСТ/RU2012/001048
- (22) Дата международной подачи:
11 декабря 2012 (11.12.2012)
- (25) Язык подачи: Русский
- (26) Язык публикации: Русский
- (30) Данные о приоритете:
2011152586 23 декабря 2011 (23.12.2011) RU
- (71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US):
АВТОНОМНАЯ НЕКОММЕРЧЕСКАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ "НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
БИОТЕХНОЛОГИИ АНТИБИОТИКОВ И
ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ "БИОАН" (AVTONOMNAJA NEKOM-
MERCHESKAJA ORGANIZACIJA "NAUCH-
NO-ISSLEDOVATEL'SKIJJ CENTR BIOTEKHNO-
LOGII ANTIBIOTIKOV I DRUGIKH BIOLO-
GICHESKI AKTIVNYKH VESHNESTV "BIOAN")
[RU/RU]; ГСП-1, ул. Губкина, 3 Москва, 119991, Mosk-
va (RU).
- (72) Изобретатели; и
(71) Заявители (только для US): АЛЕКСЕЕВА, Мария
Георгиевна (ALEKSEEVA, Maria Georgievna)
[RU/RU]; ул. Никитинская, д. 31, к. 1, кв. 12, Москва,
105122, Moscow (RU). КЛИМИНА, Ксения
Михайловна (KLIMINA, Kseniaj Mikhjjlovna)
[RU/RU]; ул. Школьная, 21, кв. 31 Московская обл., г.
Сергиев Посад, 141304, Sergiev Posad (RU).
ДАНИЛЕНКО, Валерий Николаевич (DANILENKO,
Valerij Nikolaevich) [RU/RU]; Федеративный пр., 3, кв.
12 Москва, 111399, Moscow (RU).
- (74) Агент: МОХОВ, Евгений Валерьевич (MOKHOV,
Evgenij Valeryevich); Высоковольный проезд, д. 1,
корп. 3, кв. 192, Москва, 127566, Moscow (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, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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.

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: PROCEDURE FOR IDENTIFYING THE SPECIES AND STRAIN OF *LACTOBACILLUS* USING THE GENES OF
TYPE II TOXIN-ANTITOXIN SYSTEMS OF THE SUPERFAMILIES RelBE AND MazEF

(54) Название изобретения : МЕТОД ВИДОВОЙ И ШТАММОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛАКТОБАЦИЛЛ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОВ СИСТЕМ ТОКСИН-АНТИТОКСИН II ТИПА СУПЕРСЕМЕЙСТВ RelBE и MazEF

(57) Abstract: The invention relates to biological engineering, in particular to medical microbiology, and also to the pro-
duction of cultures for sour milk food products and can be used for identifying *Lactobacillus* strains in the human micro-
biota, in food products and in a production line for said products. The invention comprises a novel procedure for identi-
fying phylogenetic groups and individual species of *Lactobacillus*, *Lactobacillus* strains of the species *Lactobacillus rham-
nosus*, which procedure is based on a combination and polymorphism of genes of type II toxin-antitoxin (TA) systems of
the superfamilies MazEF and RelBE. Oligonucleotides matching such genes can be used for the characteristics of the
strain, for identifying the strain diversity in the ecological niche under investigation. Various polymerase chain reaction
procedures (multilocus polymerase chain reaction, polymerase chain reaction in real-time mode, etc.) with subsequent
sequencing, including using the MiSeq system (Illumina, USA) using proposed pairs of oligonucleotides can be present-
ed as a diagnostic procedural approach for determining a strain under investigation in clinical samples or for molecular
tracing of the strain in commercial preparations.

(57) Реферат: Изобретение относится к биотехнологии, в частности к медицинской микробио- логии, а также к
производству заквасок для кисломолочных продуктов питания и может быть использовано для идентификации
штаммов лактобацилл в микробиоте человека, продуктах питания и в цепочке их изготовления. Изобретение
включает новый метод идентификации филогенетических групп и отдельных видов лактобацилл, штаммов
лактобацилл вида *Lactobacillus rhamnosus*, основанный на комбинации и полиморфизме генов систем токсин-
антитоксин (ТА) II типа суперсемейств MazEF и RelBE. Олигонуклеотиды, подобранные к таким генам можно
использовать для характеристики штамма, для выявления штаммового разнообразия в исследуемой
экологической нише. Разнообразные методы ПЦР (мультилокусный, в ре- альном времени и др.) с
последующим секвенированием, в том числе в системе MiSeq (Illumina, США) с использованием предлагаемых
пар олигонуклеотидов можно пред- ставить как диагностический методический подход для определения
исследуемого штамма в клинических пробах или молекулярного отслеживания штамма в коммерческих
препаратах.



WO 2013/100810 A3



(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, SZ, TZ, 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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

(88) Дата публикации отчёта о международном поиске:
31 октября 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2012/001048

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/04 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/04, 1/68, C12N 1/20, C12R 1/225

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)

CIPO, DEPATISnet, DWPI, EAPATIS, EMBL, EPO-Internal, Esp@ce, Esp@cenet, Google, KIPRIS, PAJ, PabMed, RUPTO, SCIEDIRECT, SIPO, USPTO, WIPO, VINITI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANU TILSALA-TIMISJARVI et al. Strain-Specific Identification of Probiotic Lactobacillus rhamnosus with Randomly Amplified Polymorphic DNA-Derived PCR Primers. Applied and Environmental Microbiology, Dec. 1998, Vol. 64, No. 12, pp. 4816-4819	1-4
Y	PROZOROV A.A. et al. Sistemy «toksin-antitoksin» u bakterii: instrument apoptoza ili modulatory metabolizma?. Mikrobiologiya, 2010, volume 79, N° 2, p.147-159	1-4
Y	EP 1740726 A2 (DANISCO) 10.01.2007, examples, the claims	2, 4
Y	Metody, 02.10.06, p. 2, section 11 «Oligonukleotidy», section 12 «PTSR», [retrieved on 18.06.2013]. Retrieved from Internet: <URL: http://molbiol.ru/protocol/ >	2, 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“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
“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	“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 June 2013 (18.06.2013)

Date of mailing of the international search report

20 June 2013 (10.06.2013)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2012/001048

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ		<i>C12Q 1/04 (2006.01)</i> <i>C12Q 1/68 (2006.01)</i> <i>C12N 1/20 (2006.01)</i> <i>C12R 1/225 (2006.01)</i>	
Согласно Международной патентной классификации МПК			
B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА			
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)			
C12Q 1/04, 1/68, C12N 1/20, C12R 1/225			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки			
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)			
CIP0, DEPATISnet, DWPI, EAPATIS, EMBL, EPO-Internal, Esp@ce, Esp@cenet, Google, KIPRIS, PAJ, PabMed, RUPTO, SCIEDIRECT, SIPO, USPTO, WIPO, VINITI			
C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:			
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	
Y	ANU TILSALA-TIMISJARVI et al. Strain-Specific Identification of Probiotic Lactobacillus rhamnosus with Randomly Amplified Polymorphic DNA-Derived PCR Primers. Applied and Environmental Microbiology, Dec. 1998, Vol. 64, No. 12, pp. 4816-4819	1-4	
Y	ПРОЗОРОВ А.А. и др. Системы «токсин-антитоксин» у бактерий: инструмент апоптоза или модуляторы метаболизма?. Микробиология, 2010, т. 79, № 2, с.147-159	1-4	
Y	EP 1740726 A2 (DANISCO) 10.01.2007, примеры, формула	2, 4	
Y	Методы, 02.10.06, с.2, раздел 11 «Олигонуклеотиды», раздел 12 «ПЦР», [найдено 18.06.2013]. Найдено в Интернет: <URL: http://molbiol.ru/protocol/ >	2, 4	
☐ последующие документы указаны в продолжении графы C. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении			
* “А” “Е” “L” “O” “P”	Особые категории ссылочных документов: документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее 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) документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	“Т” “Х” “У” “&”	более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности 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 документ, являющийся патентом-аналогом
Дата действительного завершения международного поиска		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске	
18 июня 2013 (18.06.2013)		20 июня 2013 (20.06.2013)	
Наименование и адрес ISA/RU: ФИПС, РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30-1 Факс: (499) 243-33-37		Уполномоченное лицо: О. Федонова Телефон № (495) 531-65-15	