



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012111326/10, 23.03.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.03.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.03.2012

(45) Опубликовано: 10.06.2013 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: FILIPPI SB et al. Allantoin has a limited role as nitrogen source in cultured coffee cells// *Journal of Plant Physiology*. - 2007, 164, 544-552. FEDOREYEV SA et al. Caffeic Acid Metabolites from *Eritrichum sericeum* Cell Cultures// *Planta Med.* - 2005, 71,446-451. АЗАРОВА О.В. и др. Фармакологическая активность полифенольного комплекса клеточных (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100-летия  
Владивостока, 159, каб.117, БПИ ДВО РАН,  
Отдел инноваций и изобретений, Т.М.  
Советкиной

(72) Автор(ы):

Булгаков Виктор Павлович (RU),  
Верещагина Юлия Витальевна (RU),  
Чернодед Галина Кирилловна (RU),  
Журавлев Юрий Николаевич (RU),  
Федореев Сергей Александрович (RU),  
Веселова Марина Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук (RU),  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (RU)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АЛЛАНТОИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ получения аллантаина, ценного биологически активного вещества для медицины и косметологии. Аллантаин получают из клеточной культуры *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray,

которую экстрагируют смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 3:1 в течение 4-6 ч при температуре 50°C, затем экстракт упаривают и хроматографируют на сорбенте с обращенной фазой. Изобретение позволяет получить оптически активный (-)-R-аллантаин с высоким выходом. 1 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

культур *Lithospermum erithrorhizon* (boraginaceae)// *Растительные ресурсы*. - 2007, выпуск 4, том 43. ALBERDAN SS et al. A dehydrotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*// *Revista Brasilia de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*. - 17(4), out/dez 538-541.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012111326/10, 23.03.2012**(24) Effective date for property rights:  
**23.03.2012**

Priority:

(22) Date of filing: **23.03.2012**(45) Date of publication: **10.06.2013 Bull. 16**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100-letija  
Vladivostoka, 159, kab.117, BPI DVO RAN, Otdel  
innovatsij i izobretenij, T.M. Sovetkinov**

(72) Inventor(s):

**Bulgakov Viktor Pavlovich (RU),  
Vereshchagina Julija Vital'evna (RU),  
Chernoded Galina Kirillovna (RU),  
Zhuravlev Jurij Nikolaevich (RU),  
Fedoreev Sergej Aleksandrovich (RU),  
Veselova Marina Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Biologo-pochvennyj institut  
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj akademii  
nauk (RU),  
Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova  
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj akademii  
nauk (RU)**

(54) **METHOD TO PRODUCE ALLANTOIN**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: allantoin is produced from cell culture *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray, which is extracted by a mixture of chloroform and ethyl alcohol at the ratio of 3:1 for 4-6 hours at the

temperature of 50°C, then the extract is evaporated and chromatographed on the sorbent with inverted phase.

EFFECT: invention makes it possible to produce an optically active allantoin with high yield.

1 tbl, 3 ex

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения аллантаина - ценного биологически активного вещества для медицины и косметологии.

Аллантаин относится к категории безопасных и эффективных защитных средств для кожи и входит в состав более чем 1300 различных косметических продуктов [1], а также входит в состав композиций, предназначенных для лечения заболеваний кожи, и в рецептуру косметических средств по уходу за кожей лица и тела. Аллантаин способствует заживлению язв и гнойных ран, обладает успокаивающим кожу действием, стимулирует регенерацию тканей, удаляет отмершие клетки эпителия и мозолистые образования, является противовоспалительным, антиоксидантным средством. Обладая регенерирующим действием, аллантаин способствует удалению рубцов, шрамов и келоидов [2]. В составе защитных кремов защищает кожу от солнечных ожогов, обветривания и растрескивания [3], обладает геронтологическим действием [4] и восстанавливает нормальную влажность и эластичность кожи [5]. При пероральном применении увеличивает содержание лейкоцитов и улучшает ток лимфы, защищает ткани желудка и кишечника, способствует репарации желудочно-кишечного тракта [3].

Аллантаин  $C_4H_6N_4O_3$  является конечным продуктом катаболизма пуринов. Большинство организмов, включая бактерии, растения и животные используют обычный путь метаболизма мочевой кислоты: в результате ее деградации в большинстве случаев образуется (+)-S-аллантаин. Далее аллантаин подвергается дальнейшему ферментативному расщеплению, являясь источником азота [6].

Впервые аллантаин был выделен из корней растения окопника лекарственного *Symphytum officinale* семейства бурачниковых, обнаружен в *Dioscorea* spp. семейства диоскорейных и *Coffea* spp. семейства мареновых. Также он был обнаружен в биотехнологическом источнике - в каллусах растения кофе *Coffea arabica* [7]. Однако как растения, так и каллусы продуцируют незначительные количества аллантаина. Так, виды *Coffea arabica* и *Coffea dewevrei* накапливают аллантаин в количестве 0,03-0,09% от сухого веса ткани [8], в бобах сои обнаружено до 0,03% аллантаина [9], в корнях диоскорей *Dioscorea* spp. - 0,41-0,71% [10]. Среди растительных источников максимальное количество аллантаина (0,7-2,6%) накапливают корни окопника лекарственного *Symphytum officinale* [7], однако и этого количества недостаточно для промышленного получения целевого продукта. В настоящее время как растения, так и каллусы не являются сырьем для получения аллантаина. По причине отсутствия высокопродуктивного сырьевого источника получают аллантаин в промышленных масштабах только путем химического синтеза.

Известны методы синтетического получения аллантаина, наиболее распространенный из них метод гидролитического расщепления мочевой кислоты [11]. Метод малозатратный и широко применяется для получения синтетического аллантаина. К недостаткам метода относится то, что при химическом синтезе конечным продуктом является рацемат - оптически неактивная смесь энантиомеров: (-)- и (+)-формы аллантаина. Известно, что биологическая активность оптических изомеров может различаться, также различия существуют между биологическим действием оптически активного вещества и рацемата [12].

Аллантаин, полученный из природных источников, в силу ферментативного синтеза, обладает более выраженным биологическим действием, поскольку представляет собой одну из оптически активных форм, а не смесь оптических изомеров [12]. Необходимо отметить, что в настоящее время растет спрос на лекарственные препараты природного происхождения. Известны научные данные,

подтверждающие тот факт, что природные вещества узнаются рецепторными системами организма с большей эффективностью, чем их аналоги, полученные в результате химического синтеза. Кроме того, натуральные соединения обладают более выраженным фармакологическим действием в отношении биологических мишеней [3, 13].

Сегодня нет альтернативного способа получения аллантаина, поэтому поиск новых подходов является актуальной проблемой. Один из потенциальных путей ее решения - использование современных методов биотехнологии, например, культивирование клеток с целью получения биологически активных веществ. Клеточные культуры растений могут стать перспективным воспроизводимым источником аллантаина для медицины и фармакологии. До настоящего времени аллантаин не удавалось получить в культурах клеток в больших количествах.

Известен способ получения аллантаина в культуре клеток *Coffea arabica*, однако недостатком этого способа является низкая продуктивность аллантаина. Каллусы этого растения накапливают аллантаин в незначительных количествах, что недостаточно для его промышленного получения [7]. Заявителю не известны другие аналоги получения аллантаина с использованием клеточных культур растений, поэтому данный способ был взят, как наиболее близкий, в качестве прототипа.

Культуру клеток *Coffea arabica* выращивают в жидкой среде по прописи Мурасига и Скуга. Затем сухую биомассу экстрагируют водным раствором метилового спирта и хлороформа 24 часа при температуре 4°C. Экстракт упаривают под вакуумом и аллантаин выделяют методом ВЭЖХ. Количество аллантаина в каллусах составляет 0,008% от сухой биомассы. Недостатком этого способа является низкий выход целевого продукта. Кроме того, авторами не указано, какие оптические активные формы аллантаина ими были получены.

Задачей изобретения является поиск нового биотехнологического источника (-)-R-аллантаина и разработка способа, позволяющего получить его из этого источника с наибольшим выходом.

Поставленная задача решена тем, что в способе получения аллантаина из клеточной культуры растения, включающем экстракцию органическим растворителем и хроматографическое выделение целевого продукта, согласно изобретению, в качестве клеточной культуры растения используют клеточную культуру *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray, которую экстрагируют смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 3:1 в течение 4-6 ч при температуре 50°C, далее экстракт упаривают, затем хроматографируют на сорбенте с обращенной фазой.

Способ получения аллантаина предусматривает использование клеточной культуры мертензии *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray, полученной авторами заявляемого способа. Каллусы растения *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray получают следующим образом. Экспланты листьев и апикальных побегов растения *Mertensia maritima* стерилизуют в растворе диоксида (этанолртути хлорид и цитилпиридиния хлорид) в течение 5-8 мин и помещают в колбы Эрленмейера объемом 100 мл, содержащие 30 мл агаризованной питательной среды  $W_{B/A}$  известного состава [14].

Затем экспланты культивируют в темноте при относительной влажности воздуха 50-70% и температуре 18-28°C. После образования на эксплантах первичных каллусов их пассируют на свежие питательные среды такого же состава и инкубируют не менее 10 пассажей при тех же условиях с циклом выращивания 25-35 суток для стабилизации ростовой и биосинтетической активности каллусов. После указанного периода каллусы извлекают из культуральных сосудов и высушивают.

Далее для получения аллантаина сухую каллусную ткань экстрагируют смесью хлороформа и этилового спирта и выделяют (-)-R-аллантаин методом хроматографии низкого давления, например, на колонке с сорбентом Toyopearl HW-50 или Toyopearl HW-40, или на колонке, заполненной силикагелем-С<sub>18</sub> (30-70 мк) в системе растворителей вода:этиловый спирт с градиентным увеличением содержания этилового спирта до 60%. Содержание аллантаина в каллусах растения *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray линия Mm-S1 составляет 3,5-3,9% от сухой массы клеток.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Получение культуры каллусов растения *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray линия Mm-S1.

Экспланты листьев и апикальных побегов растения стерилизуют в 0,2% растворе диоксида в течение 5-8 мин и помещают в колбы Эрленмейера объемом 100 мл, содержащие 30 мл агаризованной питательной среды следующего состава, мг/л воды:

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - 400

KNO<sub>3</sub> - 1900

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 170

CaCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O - 440

MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 370

H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> - 6,2

MnSO<sub>4</sub>×4H<sub>2</sub>O - 16,9

CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O - 0,025

CoCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O - 0,025

ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 8,6

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O - 0,25

KJ - 0,83

FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 27,8

Na<sub>2</sub>EDTA×2H<sub>2</sub>O - 37,3

Мезоинозит - 100

Тиамин гидрохлорид - 0,2

Никотиновая кислота - 0,5

Пиридоксин гидрохлорид - 0,5

Казеин гидролизат - 100

6-бензиламинопурин - 0,5

α-нафтилуксусная кислота - 2

Сахароза - 25000

Агар - 7000

Вода - до 1 л

pH среды 5,6-5,8 до автоклавирования.

Экспланты инкубируют в течение 30 суток в темноте при температуре 25°C и относительной влажности воздуха 50-70%. Образующиеся на эксплантах каллусы отделяют и культивируют на питательной среде такого же состава в течение десяти пассажей с 30-суточными интервалами для стабилизации ростовой и биосинтетической активности каллусов. Затем каллусы извлекают из культуральных сосудов и высушивают в токе горячего воздуха при температуре 50-55°C.

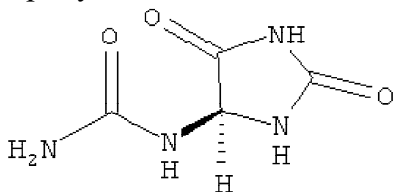
Пример 2. Получение аллантаина.

100 г сухой биомассы каллусов экстрагируют смесью хлороформа и этилового спирта (300 мл) в соотношении 3:1 в течение 4 ч при температуре 50°C в экстракторе Сокслета. Полученный экстракт упаривают под вакуумом до объема 3 мл и

хроматографируют на колонке с сорбентом Toyopearl HW-50, в системе растворителей вода:этиловый спирт с градиентным увеличением содержания этилового спирта от 0 до 60%. Хроматографическую фракцию, содержащую от 10 до 15% этилового спирта в воде, упаривают и перекристаллизовывают из этилового спирта. Выход (-)-R-аллантаина составляет 3,6 г.

Пример 3. Способ осуществляется, как описано в примере 2, но выделение целевого продукта в течение 6 ч при температуре 50°C осуществляют на колонке (3×40 см), заполненной силикагелем-С<sub>18</sub> (30-70 мк) в системе растворителей вода:этиловый спирт с градиентным увеличением содержания этилового спирта от 0 до 60%. Хроматографическую фракцию, содержащую от 10 до 15% этилового спирта в воде, упаривают и перекристаллизовывают из этилового спирта. Выход (-)-R-аллантаина составляет 3,8 г.

Полученный кристаллический порошок белого цвета представляет собой целевой продукт - оптически активный (-)-R-аллантаин следующей структуры:



Установлено, что культура каллусов мертензии продуцирует только оптически активную форму (-)-R-аллантаина и не синтезирует другие формы изомеров аллантаина. Структуру (-)-R-аллантаина определяют стандартными методами ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, рентгеноструктурного анализа и спектрами кругового дихроизма.

Количественное содержание (-)-R-аллантаина определяют методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent Technologies (серия 1100), снабженного системой насосов высокого давления QuatPump G 1311 A, дегазатором DEGASSER G1322A, инжектором G1328B и детектором VWD G1314A. Результаты анализов обрабатывались программой ChemStation® program var. 09.

Условия хроматографирования: колонка ZORBAX Eclipse XDB-C18 3.5 мкм (75×4,6 mm), градиентное элюирование: раствор 1% уксусной кислоты (А) и ацетонитрил, содержащий 1% уксусную кислоту (В): 0-12 мин (5-50% В), 12-15 мин (50-90% В), и 15-17 мин (90-95% В), скорость потока 1 мл/мин при λ-254 нм.

К образцу (100 мг) сухих каллусов добавляют 200 мкл 2/НСI в этиловом спирте и оставляют при комнатной температуре на 15 ч, затем экстрагируют 96% этанолом (3 мл) при нагревании (55°C) в течение 2 ч. Экстракт (450 мкл) смешивают с 50 мкл спиртового раствора кофейной кислоты (1 мг/мл), используемого в качестве внутреннего стандарта. В хроматограф вводят аликвоту 5 мкл испытуемого раствора. Содержание аллантаина в образцах определяют по соотношению площадей пиков аллантаина и стандартного образца кофейной кислоты.

Полученная культура каллусов растения *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray, обладающая повышенной продуктивностью, является воспроизводимым биотехнологическим источником природного оптически активного (-)-R-аллантаина. Это отличает используемую в заявляемом способе культуру каллусов растения *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray от большинства известных биологических объектов, синтезирующих в незначительных количествах, в основном, другой энантиомер аллантаина - (+)-S-аллантаин.

Заявляемым способом из каллусов растения *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray

получают аллантиина в 10 раз больше, чем его содержится в природном растении, и в 400 раз больше, чем его получают из культуры клеток *C.arabica* (прототип). В таблице представлено содержание аллантиина в природном растении *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray и биотехнологическом источнике - каллусах (линия Mm-S1).

5

Таблица	
Содержание аллантиина в природном растении <i>Mertensia maritima</i> (L.) S.F.Gray и биотехнологическом источнике - каллусах (линия Mm-S1)	
Ткань	(-)-R-аллантиин, % от сухой массы
Стебли <i>M.maritima</i>	0.30±0.06
Листья <i>M.maritima</i>	0.48±0.09
Корни <i>M.maritima</i>	0.50±0.11
Каллусы <i>M.maritima</i> (линия Mm-S1)	3.74±0.24

10

### Список литературы

15

1. Becker L.C, Bergfeld WF, Belsito DV, Klaassen CD, Marks JG Jr, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Alan Andersen F (2010) Final report of the safety assessment of allantoin and its related complexes. *Int J Toxicol* 29:84S-97S.

20

2. Thornfeldt C. (2005) Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future. *Dermatol Surg* 31:873-880.

3. Xu B, Sung C, Han B (2011) Crystal structure characterization of natural allantoin from edible lichen *Umbilicaria esculenta*. *Crystals* 1:128-135.

25

4. Патент 2162318 РФ, МПК А61К 7/00, А61К 7/48. Крем косметический / Чигарина К.М. и др. - №2000107064/14; заявлено 23.03.2000; опубл. 27.01.2001.

5. Патент 2178290 РФ, МПК А61К 7/40, А61К 7/48. Защитно-профилактический крем / Перламутров Ю.Н. - №2000129008/14; заявлено 22.11.2000; опубл. 20.01.2002.

6. Kim K, Park J, Rhee S (2007) Structural and functional basis for (S)-allantoin formation in the ureide pathway. *J Biol Chem* 282(32):23457-23464.

30

7. Filippi SB, Azevedo RA, Sodek L, Mazzafera P (2007) Allantoin has a limited role as nitrogen source in cultured coffee cells. *J Plant Physiol* 164:544-552.

8. Vitória AP, Mazzafera P (1999) Xanthine degradation and related enzymes activities in leaves and fruits of two coffee species differing in caffeine catabolism. *J Agric Food Chem* 47: 1851-1855.

35

9. Mosquim PR, Sodek L (1992) Partitioning of nitrogen in soybean fruit explants cultured with glutamine, asparagine or allantoin. *Plant Physiol Biochem* 30:451-457. the ureide pathway. *J.Biol. Chem.* 282 (32): 23457-23464.

10. Yoon KD, Yang M-H, Chin Y-W, Park JH, Kim J (2008) Determination of allantoin in *Dioscorea Rhizoma* by high performance liquid chromatography using cyano columns. *Natur Prod Sci* 14:254-259.

40

11. Патент 101328149 Китай, МПК C07D 233/76. Novel allantoin synthesis process / WENQIANG SANG. - №20081138689; заявлено 29.07.2008.

12. A.M.Posner (1958) Allantoin - its properties and uses. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 9 (1):58-61.

45

13. Feher, M. and Schmidt, J.M. (2003) Property distributions: differences between drugs, natural products and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43:218-227.

50

14. Bulgakov V.P., Tchomodod G.K., et.al. (2002). Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. *J. Biotechnol.* V.97. P.213-221.

## Формула изобретения

Способ получения аллантаина из клеточной культуры растения, включающий экстракцию органическим растворителем и хроматографическое выделение целевого продукта, отличающийся тем, что в качестве клеточной культуры растения  
5 используют клеточную культуру *Mertensia maritima* (L.) S.F.Gray, которую экстрагируют смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 3:1 в течение 4-6 ч при температуре 50°C, затем экстракт упаривают и хроматографируют на сорбенте с обращенной фазой.

10

15

20

25

30

35

40

45

50