

주목 세포배양에 의한 Taxol 생산 : 유럽 주목의 세포배양에서 추출한 Baccatin III로부터 Taxol의 반합성

전 정 욱 · 조 병 관 · 문 원 중 · *김 동 일 · **정 현 관 · †변 상 요

아주대학교 공과대학 화학 · 생물공학부

*인하대학교 공과대학 생물공학과, **임목육종연구소

Taxol Production in *Taxus* spp. Cell Culture : Semisynthesis of Taxol from Baccatin III in Cell Cultures of *Taxus baccata* Pendula

Jeong Wook Jeon, Byung Gwan Cho, Won Jong Moon, Dong Il Kim*,
Hun Gwan Chung**, and Sang Yo Byun†

School of Chemical Eng. and Biotechnology, College of Eng., Ajou Univ., Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

*Dept. of Biological Eng., College of Eng., Inha Univ., Incheon 402-751, Korea

**Institute of Forest Genetics, Forestry Administration, Korea

ABSTRACT

Anticancer agent taxol was synthesized from baccatin III which was extracted from cell cultures of European yew, *Taxus baccata* Pendula. Callus and suspension cultures of *T. baccata* Pendula showed the formation baccatin III. The content of baccatin III in cell cultures reached 0.015% (w/w) on dry weight basis. The semisynthetic approaches were made with baccatin III and taxol side chain. To prepare taxol side chain, (-)-N-((S)-2-hydroxy-1-phenylethyl) benzamide was synthesized first from (S)-(+)-phenylglycine. Then (-)-N-((1S,2S)-2-hydroxy-1-phenyl-3-butenyl) benzamide was synthesized with vinyl magnesium bromide. The synthesis of (2R,3S)-(-)-2-(1-ethoxyethoxy)-3-phenyl-3-(phenylmethanamido) propanoic acid with RuCl_3 catalyst was the final step to prepare taxol side chain. The semisynthetic reactions yielded 0.0002% taxol, 0.0005% 7-epi-10-deacetyltaxol, and unidentified taxanes on dry weight basis. It is suggested that the semisynthesis of taxol from baccatin III could be an alternative source of taxol and related taxanes.

서 론

주목으로부터 taxol을 직접 추출하지 않고 대량으로 공급할 수 있는 대체방안으로 크게 유기합성과 식물 세포배양에 의한 taxol의 생산이 있다. Taxol 합성의 접근 방법의 경우 다음과 같이 두 가지로 나

눌 수 있다. 첫째 taxol을 합성하는데 어려움 중의 하나는 tricyclic carbon frame인 pentadecene의 합성이다(1). 처음부터 tetracyclic taxane 기본 구조를 합성하는 방법으로 1984년 R. Holton에 의해 taxane A와 taxane B의 합성이 보고되었으며 1988년 taxol 유사체인 taxusin의 합성이 보고되었다(2). 즉 taxol 및 다른 생물학적 활성을 지닌 물질의 합성에서 주된 어려움은 고리계에서 1, 2, 4, 5,

† Corresponding Author

7, 9, 10 위치에 많은 산소 치환기를 만드는 과정이다(3). 그러나 taxol의 궁극적인 전합성(total synthesis)은 taxol의 구조가 복잡하고 분자량이 크기 때문에 많은 반응 과정을 필요로 하고 시간과 비용이 많이 드는 공정으로 추정된다. 최근에는 보다 활발한 연구로 전합성에 대한 획기적인 성공 사례가 발표되고 있으나 약 30개의 반응 과정을 거쳐야 하는 등 경제성에는 못 미치는 것으로 알려져 있다(4). 둘째 방법으로 taxol의 합성을 해결하는 실마리는 중요한 중간생성물을 발견하는 일로서 이 중간생성물을 이용하여 여러 위치에 다양한 치환기를 가진 pentadiene을 만들 수 있다(1). 결과적으로 taxol과 taxol 유도체를 합성할 수 있게 된다. 여기에는 1988년 Greene 등에 의해 보고된 합성 경로로 taxol 전구물질인 10-deacetylbaccatin III를 이용하는 경우이다(5). 10-deacetylbaccatin III를 이용하는 이유는 유럽 주목 등의 잎에서 taxol보다 풍부하게 얻을 수 있으며 Greene에 의해 보고된 방법에 의해 10-deacetylbaccatin III의 10번 탄소 위치에 acetyl group을 붙이고 13번 탄소 위치에 β -amido ester side chain을 결합시켜 taxol로 전환시키는 반합성 공정이 있다. Taxol의 side chain을 합성하는 방법과 baccatin III와 taxol side chain을 결합하는 방법에 대해 많은 보고가 있다(6). 이 방법은 β -amidocarboxylic acid를 합성하는 과정이 수율이 낮으며 많은 반응 단계를 가지지만 taxol로 전환하는 방법면에서는 전합성보다 상대적으로 적은 반응 단계를 가진다. 또한 β -amido ester side chain을 (10-deacetyl) baccatin III와 ester 결합시키는 반응도 느리게 진행되면서 수율도 낮다는 문제점을 가지지만 현재 실용화되고 있다. 이 coupling 반응은 taxol 또는 taxol 유도체의 모든 합성에 요구되는 중요한 반응이며 taxol 및 항암 활성을 가진 taxol 유도체를 합성하는데 가장 큰 어려움은 β -amido ester side chain을 제공하는 13번 탄소 위치의 산소에 쉽게 붙일 수 있는 β -amidocarboxylic acid의 공급 부족이다. 주목의 잎으로부터 baccatin III를 공급받는 과정은 어려움이 따르며 최근의 보고에 의하면 baccatin III의 함량이 이전에 보고된 함량보다 적다고 알려져 재평가가 이루어지고 있다.

오늘날 유럽 주목(*Taxus baccata*) 등의 잎으로부터 얻어지는 non-alkaloidal diterpenoid계통인 10-deacetylbaccatin III와 baccatin III에 대하여 많은 관심이 모아지고 있다(7). 이 baccatin계 화합물은 탁월한 항암 효과를 보이는 taxol과 Taxotere™의

합성에서 초기물질로서 이용되고 있다. 주목에는 독성을 나타내는 taxine계 alkaloid 화합물이 많이 함유되어 있다. 이 taxine 계통의 alkaloid 화합물이 주목의 독성에 관여하는 것으로 알려져 있으며 1958~1965년 동안에 Lythogoe와 Nakanishi의 연구팀에 의하여 광범위하게 조사되었다(8). 그 이후에도 taxine 계통의 alkaloid 화합물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 분리의 어려움과 물질 특성의 불안정성으로 인하여 지금까지 taxine A와 taxine B의 두 가지 성분만이 구조적으로 규명되어 있을 뿐이다. 또한 때로는 치명적일 수 있는 taxine 계통의 화합물에 대해 임상학적으로 알려진 바가 거의 없으므로 화학적 고찰 및 독성학 측면에서도 관심이 점점 증가하고 있다. 그리하여 주목의 부위에 따른 종자, 잎, 줄기 및 껍질로부터 지금까지 규명된 두 종류의 taxine과 유사한 구조의 alkaloid와 최근에 태평양 주목(*T. brevifolia* Nutt.)에서 알려진 brevifoliol의 유사구조를 가진 화합물에 대해 활발한 연구가 진행되고 있다(9). 이 taxine 계통의 alkaloid 화합물의 기본구조는 크게 tricyclic diterpenoid 고리계와 2-dimethylamino-2-phenylpropanoic acid의 ester 결합 형태로 존재하는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 구조의 taxane계 화합물에는 taxine-I, taxagifine, baccatin-I, baccatin-V, baccatin III, taxol 등 여러 가지가 알려져 있다. 이 중에서 taxol이 임상 실험 결과 유방암과 난소암에 대해 매우 탁월한 항암 효과를 발휘한다는 사실이 알려지게 되었다. 1980년대 중반에 taxol은 태평양 주목(*T. brevifolia*)의 껍질에서만 존재하는 것으로 잘못 생각되었다. 그 이후 주목과(Taxaceae) 주목속(Taxus)에 포함된 여러 종류의 주목을 광범위하게 채집하여 연구해 본 결과 다른 종류의 주목 부위에서도 taxol 및 여러 종류의 taxane이 검출되었으며 식물 세포배양과 주목으로부터 추출 가능한 taxol 전구물질인 10-deacetylbaccatin III를 얻어 taxol을 합성하는 반합성(semisynthesis)분야에서 이들의 분리 및 이용에 대한 관심이 증가하고 있다(10). Taxol에 관련된 화합물들은 여러면에서 적절한 화학적 전환(chemical transformation)을 통하여 taxol의 공급원의 역할을 수행할 수 있으며 또한 구조와 활성에 대한 연구로부터 taxol 유도체의 공급원으로 이용될 수 있다. 최근의 연구 보고에 의하면 100개 이상의 taxane diterpenoid(또는 taxoid)가 알려져 있으며 계속적으로 보고되고 있다(11).

식물체에서 taxol의 생합성은 taxane 고리계와

치환기의 합성, side chain의 합성, side chain과 diterpene 구조의 결합으로 크게 세 가지로 나눌 수 있다. Taxane 고리계는 diterpenoid이므로 mevalonate 경로를 통해 만들어진다. 많은 연구를 통하여 taxane 고리계는 isoprene 경로를 통하여 mevalonate로부터 만들어지며 taxol side chain은 phenylalanine으로부터 만들어지는 것으로 알려져 있다. 또한 주목의 수피로부터 taxol 생합성에 관여하는 효소를 분리, 정제하여 taxol 생합성에 관한 반응들이 연구되고 있으나 반응 수율과 taxane의 구조 입체성의 문제를 안고 있다. 그러나 taxol의 side chain인 phenylisoserine의 합성에 관해서는 많은 연구가 실행되어 있다.

Taxine- I 의 3-(dimethylamino)-3-phenylpropanoic acid와 taxol의 side chain이 phenylalanine으로부터 만들어진다는 사실이 알려졌으며 특히 자연계에 존재하는 β -phenyl alanine과 인위적으로 합성된 phenylisoserine, N-benzoylphenylisoserine이 taxol을 생합성하는데 쓰이는 것으로 밝혀졌다. 또한 taxol의 전구물질을 연구하는 과정에서 taxol의 side chain의 구조가, 활성을 지닌 것에 착안하여 화학적으로 유사체를 합성하여 baccatin 구조에 결합시켜 taxol보다 우수한 항암효과와 taxol이 지닌 문제점을 극복할 수 있는 새로운 항암제를 개발하려는 연구도 활발하게 진행되고 있다. 현재 주요 공급원인 주목으로부터 taxol을 추출 정제하여 생산하고 있다. 그러나 주목으로부터 직접 taxol을 추출 정제하는 방법은 비용이 많이 들고 공급이 제한되어 있다. 본 연구에서는 외부환경의 영향을 받지 않고 지속적이면서 안정적으로 taxol 및 baccatin III를 생산할 수 있는 방법으로 주목 세포배양을 이용하였으며 주목의 세포배양으로부터 얻어지는 baccatin III를 이용하여 taxol side chain의 합성에서 전구물질을 잘 선택한 β -amido ester side chain을 합성을 통해 결합 반응 수율을 높이며 taxol로의 화학적 전환에 대한 가능성을 알아 보았다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에 이용된 세포주는 1992년 미국 Rutgers 대학 부설 농업 시험장으로부터 분양받은 유럽 주목 (*T. baccata* Pendula)의 묘목의 줄기와 잎으로부터 캘러스를 유도한 후 현탁배양하여 25°C, 암조건에서 수년간의 계대 및 유지를 통하여 taxol 생성 능력을

지니고 있으며 세포생장이 우수한 세포주이다. 생장조절제로는 α -naphthalene acetic acid(NAA)와 6-benzyl aminopurine(BAP)를 이용하였고 탄소원으로 2% sucrose가 첨가된 기본 Schenk & Hildebrandt(SH) 배지를 이용하였다. 배지의 pH는 1N KOH와 1N HCl을 이용하여 5.8로 적정하였다. 배양 조건은 25°C, 암조건에서 약 45~50%의 습도의 조절하에서 200mL 액체 배양배지에 세포를 접종하여 약 120rpm으로 진탕배양하였다. 본 연구에서는 7~10일 간격으로 세포와 배양배지의 비율을 1:3 정도로 하여 계대 배양 중인 대수기(exponential growth phase) 중기의 현탁배양세포를 이용하여 taxol의 반합성을 시도하였다.

Taxol 및 Taxane 추출

Taxol 및 taxane의 함량은 세포내 함량과 배지에 존재하는 세포외 함량으로 구분이 가능하지만 본 연구에서는 cell viability와 향후 *in situ* extraction을 고려하여 배지내로 방출된 taxane을 이용한 taxol의 반합성을 시도하였다. 즉 세포외 함량은 주목 시료 추출과 동일한 방법인 배양배지에 methylene chloride(MC)를 가하고(1:1, v/v) 수 회 추출하여 수용액층을 제거한 후 MC를 진공 감압하여 제거하였다. 다시 시료를 methanol로 추출하여 0.45 μ m, 13mm membrane filter(Baxter Scientific Products, U.S.A.)로 여과하여 HPLC 분석하였다.

Taxol 및 Taxane 분석 방법

유럽 주목의 잎과 줄기로부터 유도된 callus의 현탁배양과 taxol의 반합성에서 만들어진 taxol 및 관련된 taxane을 알아 보기 위한 분석 방법으로 HPLC system을 이용하였으며(Spectra Physics 8800 pump, Waters 484 UV detector, GBC LC1210 UV/Vis Detector), 이때 분석용 column으로는 ES Industries(Marlton, NJ, U.S.A.)로부터 구입한 reversed phase pentafluorophenyl(PFP) HPLC column(4.6 \times 250mm, 5 μ , 60Å)과 Phenomenex(Torrance, CA, U.S.A.)로부터 구입한 Curosil G(3.2 \times 250mm, 5 μ)을 이용하였다. PFP column을 이용한 분석에서의 이동상은 H₂O와 acetonitrile을 62:38(v/v)로 25분간 일정한 비율로 유지하여 35분에서 57:43(v/v)으로 바꾸고 40분에서 55:45(v/v)로 linear gradient를 만들어 주었다. 유속은 1.2mL/min으로 유지하였고 또한 sample 주입량은 20 μ L로 유지하였다. 검색 과정은

228nm와 280nm를 이용하였다. Curosil G column을 이용한 분석에서의 이동상은 H₂O와 acetonitrile을 55:45(v/v)으로 isocratic 조건으로 0.7ml/min로 유지하였다. 지금까지 taxol을 함유한 crude extract와 biological sample을 시험하는데 silica와 C₁₈ column을 이용한 HPLC 분석 방법이 이용되어 왔다. 그러나 taxol의 대량 분리 정제 공정을 연구하는 과정에서 silica와 이외의 다른 흡착제를 이용한 HPLC 분석 방법과 다양한 형태의 TLC가 taxol과 taxol 유도체인 cephalomannine을 분리하는데 높은 해상력을 나타내었다. 그 후 계속되던 연구로 reversed phase mode에서 cyano 및 phenyl bonded silica gel phase를 이용한 주목의 HPLC 방법이 개발되었으며 본 연구에서는 최근에 새로이 알려진 HPLC column을 이용하여 isocratic 및 gradient elution 방법을 시험하였고 10-deacetylbaccatin III, baccatin III, 10-deacetyl taxol, 7-epi-10-deacetyl taxol, taxol의 표준 혼합물을 이용하여 분리능(column performance)을 평가하여 taxol의 정량 분석을 위한 기초로 삼았다.

¹H-NMR 분석 방법

Taxol의 반합성 과정에서 생성되는 중간물질들의 존재 확인을 위하여 NMR을 이용하였다. NMR 측정은 Varian-gemini 200 spectrometer를 사용하였고 proton NMR인 경우 chemical shift는 내부기준 물질인 TMS로 하여 Δ (ppm) 값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

세포배양 및 taxol 생성

Taxol 및 관련 taxane을 생성하는 능력이 뛰어난 세포주를 얻기위하여 국내에 서식하는 주목을 비롯하여 태평양 주목(*T. brevifolia*) 및 유럽 주목(*T. baccata*) 등을 대상으로 세포생장이 왕성하게 일어나는 어린 줄기와 잎으로부터 캘러스를 유도하여 주목 세포배양의 최적화 및 taxol 및 관련 taxane의 생성 능력이 우수한 세포주를 선별하고자 하였다. 그리하여 여러 종류의 세포주를 다양하게 확보할 수 있었으며 그 중에서 유럽 주목의 캘러스 배양과 현탁배양이 다른 세포주에 비하여 세포생장이 우수하였다. 또한 배양조건의 최적화의 노력에 의해 고유의 생장 특성을 갖게 되었다. 이후 본 연구에서는 식물 세포배양에서 가장 중요한 변수인 세포생장 속도가 우수한 유럽 주목으로부터 유도한 현탁배양 세포

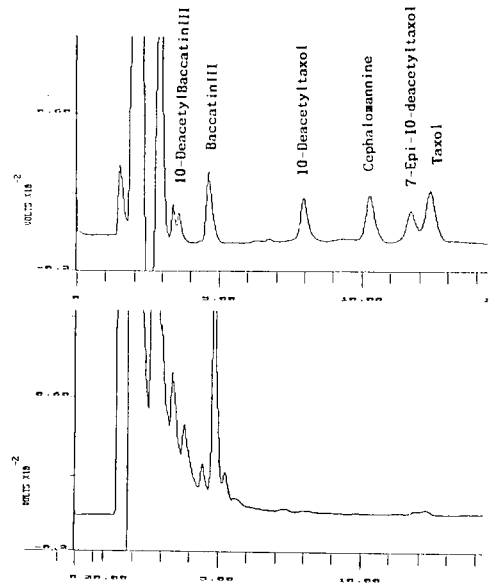


Fig. 1. Chromatogram of a crude methanolic extract of *T. baccata* suspension culture on Curosil G column. Chromatographic condition: Isocratic for 15 min at 0.7ml with MeCN/H₂O(45:55).

중에서 taxol의 전구물질 형태인 baccatin III를 많이 만드는 세포주를 이용하여 taxol의 반합성에 대한 실험을 수행하였다.

여러 종류의 주목으로부터 캘러스를 유도하여 그 중에서 세포생장이 우수한 세포주를 지속적으로 선별하여 얻은 세포배양의 taxol 함량 분석 결과 주목으로부터 직접 추출한 양보다 적은 것으로 나타났다. 주목의 배양 조건의 최적화에 관한 연구에 의하면 SH 배지와 B5 배지가 MS 배지에서 배양하는 경우보다 세포생장이 우수하였으며 탄소원으로는 2% sucrose가 가장 좋았고 세포생장을 저해하는 polyphenol 계통의 이차대사산물의 산화를 막아주는 항산화제로서 2% PVP와 아미노산 공급원으로서 0.5% casein hydrolysate가 세포생장을 촉진하였고 암조건에서 배양이 명조건에서 배양보다 훨씬 세포생장이 우수하였다. 특히 유럽 주목으로부터 유도된 세포배양의 경우 목본식물과 침엽수의 세포배양에서 주로 목격되는 느린 생장 속도를 극복할 수 있었다. 이러한 배양 조건하에서 유럽 주목을 세포배양하여 얻은 baccatin III의 함량은 세포 건조량의 0.015%

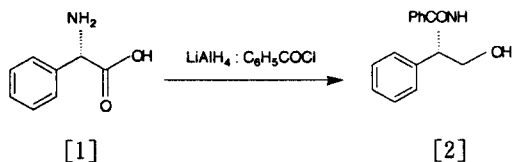


Fig. 2. The synthetic pathway of (-)-N-((S)-2-hydroxy-1-phenylethyl)benzamide.

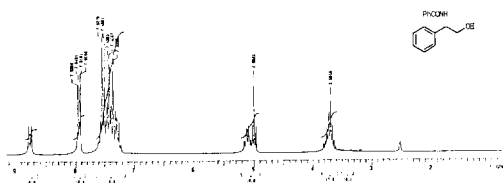


Fig. 3. 200MHz ¹H-NMR spectrum of (-)-N-((S)-2-hydroxy-1-phenylethyl)benzamide in CDCl₃.

를 차지하였다(Fig. 1). 그러나 이 실험에 사용된 세포주가 야생형(wild type)이라는 것과 taxol 및 baccatin III의 생성을 증기시키려는 어떠한 노력도 가해지지 않은 것을 고려한다면 세포배양에 의한 taxol 및 taxol 전구체의 생산은 매우 가능성이 크다고 할 수 있다.

(-)-N-((S)-2-hydroxy-1-phenylethyl)benzamide[2]의 합성 및 분석

Fig. 2는 taxol 반합성을 위한 side chain의 합성을 위한 첫단계인 (S)-(+)-phenylglycine[1]을 lithium aluminum hydride(LiAlH₄)로 keto group을 환원시킨 후 benzoyl chloride를 가하여 benzene ring을 만들어 (-)-N-((S)-2-hydroxy-1-phenylethyl)benzamide[2]를 합성하는 과정을 나타낸다. 화합물[2]의 존재는 ¹H-NMR과 TLC로 확인하였다(Fig. 3).

(-)-N-((1S,2S)-2-hydroxy-1-phenyl-3-butenyl)benzamide[3]의 합성 및 분석

Fig. 4는 화합물[2]에 vinyl magnesium bromide를 가하여 이중결합을 만들어 (-)-N-((1S,2S)-2-hydroxy-1-phenyl-3-butenyl)benzamide[3]을 합성하는 과정을 나타낸다. 여기서 TLC로 분석하여 3개의 spot을 얻었고 문헌(12)과 비교하여 반응물[2]과 두 종류의 생성물(anti product와 syn pro-



Fig. 4. The synthetic pathway of (-)-N-((1S,2S)-2-hydroxy-1-phenyl-3-butenyl)benzamide.

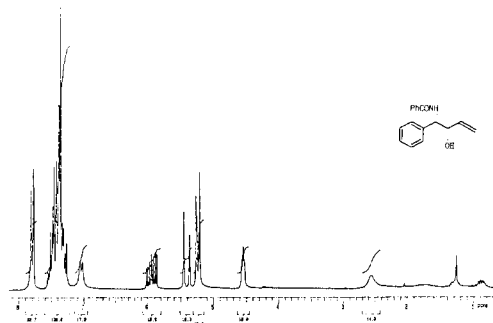


Fig. 5. 200MHz ¹H-NMR spectrum of (-)-N-((1S,2S)-2-hydroxy-1-phenyl-3-butenyl)benzamide in CDCl₃.

duct)을 확인할 수 있었고 또한 crude reaction mixture를 ¹H-NMR로 분석하여 화합물[2]에 이중결합이 생성되었음을 확인하였다. 다음 반응을 들어가기 위해 우리가 원하는 syn product[3]를 TLC로 전개용매 조건을 찾아 column chromatography하여 순수하게 분리하여 ¹H-NMR로 확인하였다(Fig. 5).

(2R,3S)-(-)-2-(1-ethoxyethoxy)-3-phenyl-3-(phenylmethanamido)propanoic acid[4]의 합성 및 분석

Fig. 6은 (2R,3S)-(-)-2-(1-ethoxyethoxy)-3-phenyl-3-(phenylmethanamido)propanoic acid를 합성하는 과정을 나타내는데 먼저 ethyl vinyl ether를 이용하여 화합물[3]의 2번 탄소 위치의 OH기에 ethoxyethoxy기를 붙여 OH기를 보호한다. 중간생성물인 N-((1S,2S)-2-(1-ethoxyethoxy)-1-phenyl-3-butenyl)benzamide[3']를 얻어 ¹H-NMR로 확인한뒤(Fig. 7) RuCl₃를 촉매로하여 산화반응을 거쳐 (2R,3S)-(-)-2-(1-ethoxyethoxy)-3-phenyl-3-(phenylmethanamido)propanoic acid[4]의 생

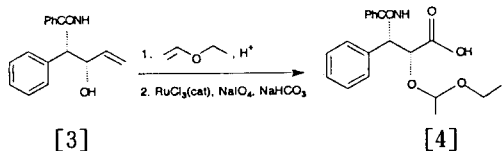


Fig. 6. The synthetic pathway of (2R,3S)-(-)-2-(1-ethoxyethoxy)-3-phenyl-3-(phenylmethan-amido)propanoic acid.

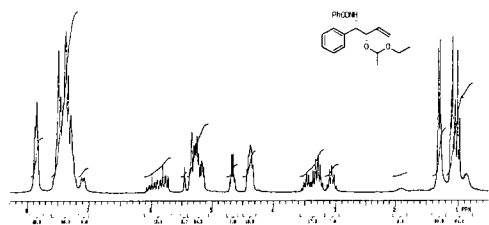


Fig. 7. 200MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum of N-((1S,2S)-2-(1-ethoxyethoxy)-1-phenyl-3-butenyl)benzamide in CDCl_3 .

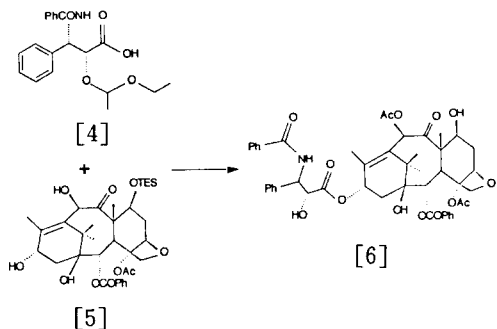


Fig. 8. Esterification and deprotection of (2R,3S)-(-)-2-(1-ethoxyethoxy)-3-phenyl-3-(phenylmethan-amino)propanoic acid and 7-triethylsilylbaccatin III.

성을 TLC와 $^1\text{H-NMR}$ 로 확인하였다.

반합성 반응

유럽 주목 (*Taxus baccata*)의 현탁배양으로부터 얻은 추출물을 column chromatography를 이용하여 baccatin III를 함유한 fraction을 분리 및 TLC로 확인하여 이들 추출물을 triethylsilylation시켜 baccatin III의 7번 탄소의 OH기가 triethylsilyl

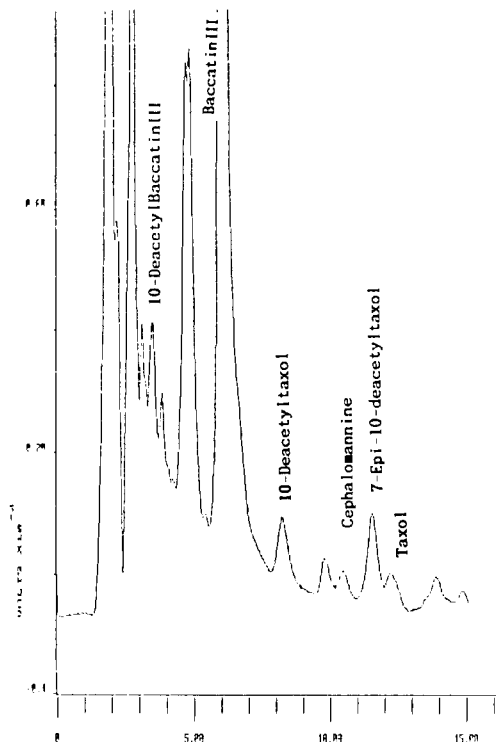


Fig. 9. HPLC Chromatogram of a reaction mixture showing taxol and related taxane from a crude methanolic extract of *T. baccata* suspension culture with taxol side chain on Curosil G column.

radical(TES)로 보호된 7-triethylsilylbaccatin III를 함유한 추출물을 얻었으며 여기에 taxol side chain의 C-2' 위치의 OH기가 보호된(2R,3S)-(-)-2-(1-ethoxyethoxy)-3-phenyl-3-(phenylmethan-amino)propanoic acid[4]를 ester 결합시켜 세포배양에서 얻어지는 taxol 전구물질인 baccatin III계 화합물을 taxol로 전환시키는 반합성에 대한 시도를 하였다(Fig. 8). 유럽 주목의 잎과 줄기로부터 유도된 callus의 현탁배양에서 taxol 및 관련된 taxane을 많이 만들 수 있는 세포주를 선별하는 과정도 중요하지만 taxol의 전구물질인 baccatin III를 많이 만드는 세포주의 이용도 중요하다고 본다. Taxol 및 관련된 taxane을 baccatin III로 만드는 공정이 연구되어 있으며 또한 주목의 잎과 줄기로부터 baccatin III를 분리하는 방법보다 세포배양을 이용한 방법에서는 우리가 원하지 않는 phenol계 화합

물의 생성을 억제하여 추출 및 분리 공정이 훨씬 용이하며 수율면에서도 뒤떨어지지 않는다는 장점을 갖고 있다. 반합성에 이용된 baccatin III의 80.8%가 taxol 및 taxane계 화합물로 전환되었으며 특히 세포 건조량의 0.0002%의 taxol과 0.0005%의 7-epi-10-deacetyltaxol 및 동정되지 않은 여러 종류의 taxoid가 합성되었다(Fig. 9). 이러한 실험 결과는 taxol의 새로운 공급원의 대체 가능성의 제시 및 기타 여러 종류의 taxol 유사체의 구조와 합성에 대한 연구로부터 제2세대 taxol 유사체와 제3세대 taxol 유사체를 합성하는데 baccatin III의 시작물질로서의 필요성을 더욱 증가시키며 효율적인 이용이 기대된다. 또한 지금까지 세포배양을 이용한 taxol의 반합성에 대한 연구 보고는 극히 드물게 언급되어 있으므로 여기에 대한 연구가 활발하게 진행되었으면 한다.

요 약

유럽 주목(*Taxus baccata* Pendula)의 세포배양에서 추출한 taxol 전구체 baccatin III를 이용하여 항암제 taxol을 반합성할 수 있었다. 유럽주목의 캘러스배양과 현탁배양 모두에서 baccatin III의 생성을 확인할 수 있었으며 함량은 건조중량 기준으로 평균 0.015% (w/w)에 달하였다. Taxol의 반합성은 세포배양에서 생성된 baccatin III에 taxol side chain을 합성시킴으로서 가능하였다. Taxol side chain을 합성하기 위하여 (S)-(+)-phenylglycine로부터 (-)-N-((S)-2-hydroxy-1-phenyl ethyl)benzamide를 합성하였고 다음 단계로 (-)-N-((1S,2S)-2-hydroxy-1-phenyl-3-butenyl) benzamide를 합성하였고 최종적으로 산화과정을 거쳐 taxol side chain인 (2R,3S)-(-)-2-(1-ethoxyethoxy)-3-phenyl-3-(phenylmethanamido) propanoic acid를 얻을 수 있었다. 이러한 반합성 과정을 통하여 0.0002% 수준의 taxol 및 0.0005%의 관련 taxane을 합성하였다. 이와 같이 주목 세포배양을 이용한 taxol 반합성 방법은 기존의 주목 잎에서 추출한 baccatin III를 이용하는 방법에 비하여 충분한 경제성이 있을 수 있으며 이에 따라 taxol의 새로운 공급원의 역할 및

기타 여러 종류의 taxol 유사체의 효율적인 이용 등 앞으로 기대 효과가 크다고 본다.

감 사

이 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비(생물 화학공학)에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

1. Robert A. Holton, Rouh-Roug Juo, and Richard Lowenthal(1989), *US Patent*, 4,876,399.
2. R. E. Holton, R. R. Juo, Hyeong B. Kim, A. D. Williams, Shinya Harusawa, R. E. Lowenthal, and Sadamu Yogai(1988), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6558.
3. Michel Colin, Daniel Guenard, and Gueritte-Voegelein(1989), *US Patent*, 4,814,470.
4. K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claiborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan, and E. J. Sorensen(1994), *Nature*, **367**, 630.
5. Jean-Noel Denis and A. E. Greene(1988), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5917.
6. Pamela Zurer(1988), *Chemists, C & EN*, 22.
7. F. Gueritte-Voegelein, V. Senilh, B. David, D. Guenard, and P. Potier(1986), *Tetrahedron*, **42**(16), 4451.
8. J. N. Baxter, B. Lythogoe, B. Scales, R. M. Scrowston, and S. Trippett(1962), *J. Chem. Soc.*, 2964.
9. A. Chu, L. B. David, J. Zajicek, N. G. Lewis, and R. Croteau(1993), *Phytochemistry*, **34**(2), 473.
10. Bringe(1992), *Venkataraman, WO* 9209589.
11. Ashok G. Chaudhary and David G. I. Kingston(1993), *Tetrahedron Letters*, **34**(31), 4921.
12. J. N. Denis, A. Correa, and A. E. Greene (1991), *J. Org. Chem.*, **56**, 6939.