

## 식물세포 *Taxus chinensis*의 대량 배양액으로부터의 Taxane 유도체 생산 및 정제

\*김진현·기은숙·민범찬·홍승서·이현수  
(주)삼양제넥스 생명공학연구소, <sup>1</sup>삼양사 중앙연구소  
(접수 : 2000. 6. 28., 게재승인 : 2000. 8. 21.)

## Production and Purification of Taxane Derivatives from the Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis* in Large-scale Process

Jin-Hyun Kim\*, Un-Sook Gi, Bumchan Min<sup>1</sup>, Seung-Suh Hong, and Hyun-Soo Lee  
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea  
<sup>1</sup>Samyang Central R&D Institute, Taejeon 305-348, Korea  
(Received : 2000. 6. 28., Accepted : 2000. 8. 21.)

Taxoids, inclusive paclitaxel, were produced, isolated, and purified from plant cell cultures of *Taxus chinensis* in large-scale process. Their structures were elucidated by spectroscopic analyses. These compounds were exactly identical as those in previous studies from the other biomasses of *Taxus chinensis* and also other species. Also the concentrations of these compounds were compared with the concentration of the paclitaxel in various batches of plant cell cultures. As paclitaxel concentration increased at the end of cell cultures, the concentrations of the other paclitaxel derivatives decreased. The profile of these taxoids production can provide information for better understanding of structure-activity relationships and biosynthesis. Importantly it can be utilized as an useful parameter for the quality control of paclitaxel production.

**Key Words** : plant cell culture, paclitaxel, taxane derivative, isolation

### 서론

Paclitaxel (Taxol)은 현재 가장 각광을 받고 있는 항암제로 이미 유방암과 난소암에 대해 FDA 허가를 받았다(1). 또한 paclitaxel은 독특한 작용기작 때문에 많은 사람들의 관심을 받아 왔다. Paclitaxel은 tubulin의 합성을 촉진하고 microtubule의 분해를 억제하여 세포의 기능과 세포분열을 멈추게 하는 것으로 알려져 있다(2). Paclitaxel은 원래 태평양 주목(*Taxus brevifolia*)의 껍질로부터 분리되었으며 수율은 0.02 % (w/w) 정도이다. 비록 여러종류의 주목 나무에 paclitaxel이 존재한다고 보고되고 있으나 함량은 매우 낮은 것으로 알려져 있다(3). 유기합성의 경우 paclitaxel의 구조가 복잡하고 분자량이 크기 때문에 전합성(total synthesis)에는 많은 어려움이 따르고 있으며 현재 주목 잎에서 얻은 10-deacetylbaecatin III에 side chain을 화학결합 시키는 반합성(semi-synthesis)에 의해

생산되고 있다. 반면 식물세포 배양에 의한 생산방법은 다른 방법에 비해 많은 장점을 가지고 있다. 장소와 시간에 제한되지 않고 일정한 질과 양을 대량으로 생산 가능하며 특히 환경의 영향을 받지 않고 원료의 공급과 수확시기 등의 제한 없이 지속적인 생산이 가능하므로 공급부족이나 생태계 파괴와 같은 문제가 없다(4). 따라서 식물세포 배양에 의한 생산 방법에 대한 관심이 매우 높다.

본 연구에서는 식물세포인 *Taxus chinensis* 대량 배양액으로부터 생산되는 여러가지 유도체들에 대한 분리와 동정으로 paclitaxel 이외의 여러가지 유도체 생산 경향을 파악하는데 그 목적이 있다. 이러한 연구는 결국 paclitaxel 이외의 새로운 유용성분 및 전구체 확인, 분리/정제 방법의 개발, paclitaxel 생산 품질관리에 유용하게 사용되어 질 수 있다.

### 재료 및 방법

#### *Taxus* 식물세포 배양

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 cell line을 이용하여 3000 L 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다(5). 배양액으로부터 식물세포 회수를 위하여

\*Corresponding Author : Samyang Genex Biotech Research Institute, 63-2 Hwaam-Dong, Yusung-Gu, Taejeon 305-348, Korea  
Tel : 82-42-865-8392, Fax : 82-42-865-8399  
E-mail : jhkim@genex.co.kr

Decanter (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter, Germany)를 이용하였으며, 식물세포조각의 회수를 위하여 고속 원심분리기 ( $\alpha$ -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)를 사용하였다. 회수한 식물세포와 세포조각 (debris)을 합하여 biomass라 하였다.

### Paclitaxel 함량 분석

HPLC 분석 방법에 의하여 paclitaxel 과 taxane derivative 함량을 분석하였으며(6) 모든 샘플은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다. 채취한 샘플 2 mL에 내부 표준 (internal standard) 용액 100  $\mu$ L (6.25 mg N-propyl paraben/5 mL methanol), CPC 용액 200  $\mu$ L (10 g cetyl pyridinium chloride/100 mL distilled water), methyl-t-butyl ether 2.5 mL를 첨가하고 밤새 교반하였다. 교반 후 상등액을 취하여 amino propyl SPE cartridges (Alltech, Cat. #211025)를 통과시킨 후 methyl-t-butyl ether/methanol (85/15, v/v) 용액 3 mL로 세척하고 여액을 건조한 후에 0.5 mL 메탄올에 녹여 분석하였다. 분석에 사용한 컬럼은 Capcell Pak C<sub>18</sub> UG 120 (250mm X 4.6mm, Shiseido, Japan), 컬럼 온도는 40°C, 이동상은 CH<sub>3</sub>CN/Water (20-100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, 샘플 주입량은 10  $\mu$ L이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다. Paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

### Crude extract 제조

메탄올을 이용하여 biomass내 paclitaxel을 4회 회분식으로 추출하였다. 메탄올과 biomass 혼합비는 1:1 (biomass kg/1 L methanol)로 하였으며 반응시간은 1회 10분으로 하였다. 4회 메탄올 추출 후 추출액의 농축은 rotary evaporator에서 수행하였으며 농축조건은 635 mmHg, 40°C에서 이루어 졌다. 메탄올 추출액을 농축하고 (1/5-1/8) 농축액에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 첨가하여 (MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=5:1) 액/액 추출을 실시하였으며 메탄올 농축액에 존재하는 극성불순물 (polar impurity)을 먼저 제거하였다. 액/액 추출은 회분식으로 3회에 걸쳐 실시하였으며 액/액 추출을 통하여 극성불순물이 제거된 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 용액을 rotary evaporator (450 mmHg, 30°C)에서 농축하고 건조하여 사용하였다(6).

### Crude extract로부터 taxane derivative의 단성분 분리/정제

Crude extract에 포함되어 있는 여러가지 taxane derivative 들은 Biocad Sprint (USA), Semi Prep LC에서 수 mg 단위로 분리/정제 되었다. Curosil PFP column (21X250 mm, Phenomenex, USA)이 사용되었으며, peak 확인을 위하여 흡광도 227 nm 에서 UV detector를 사용하였다. H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 공용매를 65/35에서 35/65로 40분간 2 mL/min 유속으로 gradient elution하였고 35/65에서 70분간 방치하여 컬럼을 세척하였다. 건조시료 8 mg을 200 (L에 녹인 것을 loading하여 여러가지 taxane derivative들을 분리한 후 용매를 제거하여 각각의 성분이 약 10 mg-100 mg이 되도록 위의 과정을 반복하였다. 위의 방법으로 분리된 각 성분은 구조분석에 필요한 정도의 순도 (>90%)로 만들기 위해 같은 기기를 사용하여 2차로 정제를 하였는데 이때는 정제하고자 하는 성분에 맞게 H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN의 비율이 70/30에서 20/80사이로 isocratic elution 방법으로 정제 하였다. HPLC를 사용하여 분석한 결

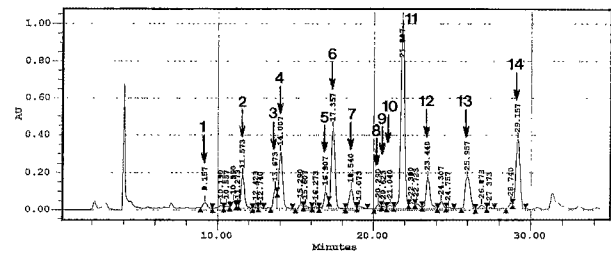


Figure 1. HPLC chromatogram of taxane derivatives in biomass from plant cell cultures of *Taxus chinensis* in large-scale process.

과 최종적으로 얻어진 taxane derivative의 순도는 90% 이상이었다.

### Taxane derivative의 화학구조 분석 및 동정

분리/정제된 taxane derivative는 NMR, MS 등을 사용하여 화학구조를 분석하였다(7). NMR 실험을 위해서는 Bruker, DRX-300 (Germany)를 사용하였으며, 시료 수 mg을 CDCl<sub>3</sub> 용매에 녹여 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 실험 및 DEPT, COSY, HETCOR 등의 실험을 통하여 각 성분의 분자구조를 분석하였다. 분자구조가 추정된 화합물의 대해서는 FAB mass spectrometry로 분자량을 확인하였는데 AMD Intectra (Harpstedt, Germany)를 사용하였다. Source temperature, 69(C; accelerating voltage, 6kV; scan range, m/z 100-1000; scan rate, 35s/cycle; resolution, 1000의 조건 하에서 Cs<sup>+</sup> 이온을 분자 이온 source로 사용하였다.

### 결과 및 고찰

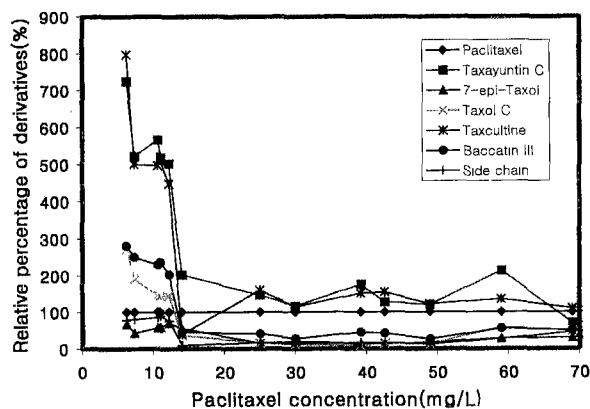
#### Biomass내 유도체 확인

Figure 1에서 보는 바와 같이 *Taxus chinensis* 식물세포 배양에 의한 paclitaxel대량 생산의 경우 biomass내 paclitaxel 이외에 대략 13개의 주요 peak들을 HPLC 분석으로부터 확인할 수 있었다. 이를 목표 물질로 선정하여 Prep-LC를 이용하여 분리/정제하고 NMR, MS 등으로 화학구조분석을 한 결과를 Table 1에 나타내었다. 10번 물질과 paclitaxel을 제외한 12개의 물질에 대해서 동정이 완료 되었으며 10번 물질은 현재 동정 중이다. 이들 12개의 물질들은 NMR, MS를 사용한 화학구조 분석 결과 이미 알려진 paclitaxel 유도체 또는 전구체와 동일한 물질로 밝혀 졌다(8-16). 7-Epi-10-deacetyltaxol, 10-deacetyltaxol, taxol C의 경우 가격면에서 paclitaxel에 비해 2.5-3배 정도로 상당히 고가이며 항암효과도 있는 것으로 알려져 있다(12). 10-Deacetyltaxol, taxcultine 과 taxol C는 *Taxus baccata* 세포배양으로부터 처음으로 분리 되었으며 그 함량은 0.02 %(w/w)정도로 paclitaxel 보다 현저하게 낮은 함량이 존재한다는 보고(12)는 식물세포 *Taxus chinensis*를 이용한 본 연구와도 일치하였다. Taxol C는 *Taxus media*로부터도 분리되었으며 항암 효과가 오히려 paclitaxel 보다 높고 또한 아드리아마이신 resistant cell에도 강한 효과를(17) 보이는 것으로 보고되어 관심이 높은 taxane derivative중의 하나이다. 7-Epi-10-deacetyltaxol은 McLaughlin 등에(14) 의해서 처음으로 보고 되었으며 *Taxus brevifolia*로부터 추출 및 column

**Table 1.** Taxane derivatives from biomass of *Taxus chinensis* in large-scale process.

Compound	Material name/ CAS No.	Formular	Molecular weight	Pricea (\$/g)	Ref.
1	CAS-142203-65-4P	C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	588	-	(8)
2	Baccatin III	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> O <sub>11</sub>	586	3,500	(9)
3	CAS-156168-98-8P	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub>	630	-	(8)
4	Internal standard (N-propyl paraben)	C <sub>45</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>13</sub>	811	6,500	(10)
5	10-Deacetyltaxol	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	570	-	(11)
6	13-Deoxybaccatin III	C <sub>44</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>14</sub>	820	-	(12)
7	Taxcultine	C <sub>45</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>14</sub>	831	4,000	(13)
8	Cephalomannine	C <sub>45</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>13</sub>	811	7,500	(14)
9	7-epi-10-Deacetyltaxol	-	-	-	-
10	Unknown	-	-	-	-
11	Paclitaxel	C <sub>47</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>14</sub>	854	2,500	-
12	Taxol C	C <sub>46</sub> H <sub>58</sub> NO <sub>14</sub>	848	6,000	(12)
13	Yunnanxane	C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub>	563	-	(15)
14	2 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 14 $\beta$ - Tetra-acetoxy-4(20),11- taxadiene	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>	505	-	(16)

<sup>a</sup>HAUSER Price(1998)



**Figure 2.** Effect of paclitaxel concentration on the production of taxane derivatives from plant cell cultures of *Taxus chinensis* in large-scale process.

chromatography 정제 후 crystallization에 의하여 순수 분리되었다. 또한 10-deacetyltaxol을 120°C로 가열하면 epimerization이 일어나 부분적으로 7-epi-10-deacetyltaxol로 전환된다. 7-Epi-10-deacetyltaxol은 microtubule assembly 실험에서 동일한 농도 하에서 paclitaxel과 비교시 90% 정도 항암 효과를 보여주는 물질이기도 하다(18). Cephalomannine 역시 Powell등(19)에 의해 처음으로 *Taxus manii*로부터 분리 및 구조분석이 이루어졌고 paclitaxel 주사제로서의 제품 품질관리시 7-epi-10-deacetyltaxol과 함께 normal 과 reverse-phase chromatography에서 paclitaxel로부터 분리하기 어려운 성분중의 하나이다. Yunnanxane과 2 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 14 $\beta$ -tetra-acetoxy-4(20), 11-taxadiene의 경우에는 항암효과가 확인되지 않았으며 이는 C-13번 위치에 tubulin binding에 필요한 side chain과 oxetane ring이 없기 때문으로 알려져 있다(15). 그러나 Hu등(16)에 의하면 이들 물질을 이용한 biotransformation에 의하여 새로운 용도에 사용될 수 있는 물질 생산에 많은 연구가 진행 중에 있다.

#### 유도체 생산 경향

*Taxus chinensis* 식물세포 배양에 의한 paclitaxel 대량 생산의 경우 paclitaxel 생산에 따른 여러가지 유도체들의 생산 경향을 Figure 2에 나타내었다. 배양이 끝난 후 발효조 내 Paclitaxel의 생산량이 증가할수록 유도체들의 생산량은 상대적으로 감소함을 알 수 있었다. 예를들면, taxcultine의 경우 배양이 끝난 시점에서의 발효조 내 paclitaxel 농도가 10 mg/L 일 때는 paclitaxel의 5배 정도로 많이 생산되는 반면 paclitaxel 농도가 50 mg/L 일 때는 paclitaxel과 거의 같은 생산량을 보였다. 또한 taxayuntin C, baccatin III, taxol C의 경우에도 paclitaxel 생산량이 증가할수록 이들 유도체의 생산량은

급격히 감소하였다. 이러한 현상은 대사경로 상에서의 여러 가지 효소들의 상호 역할에 기인하는 것으로 판단되며 현재 대사경로 상에서 paclitaxel과 유도체 생산에 관계하는 효소에 대해서 연구를 진행 중에 있다. 본 연구는 결국 paclitaxel 이외의 새로운 유용성분 및 전구체 확인, 분리/정제 방법의 개발, paclitaxel 생산 품질관리(quality control)에 유용하게 사용되어 질 수 있다.

#### 요약

*Taxus chinensis* 식물세포 배양에 의한 paclitaxel 대량 생산의 경우 biomass내 paclitaxel이외에 다른 많은 유도체들이 확인되었다. 이를 목표 물질로 선정하여 Prep-LC를 이용하여 분리/정제하고 NMR, MS 등으로 화학구조분석을 하여 이들 물질들에 대한 동정을 하였다. 또한 *Taxus chinensis* 식물세포 배양에 의한 paclitaxel 대량 생산의 경우 paclitaxel 생산량에 따른 여러가지 유도체들의 생산 경향을 조사하였으며, paclitaxel의 생산량이 증가할수록 유도체들의 생산량은 상대적으로 감소함을 알 수 있었다. 이러한 연구는 결국 paclitaxel 이외의 새로운 유용성분 및 전구체 확인, 분리/정제 방법의 개발, paclitaxel 생산에서의 품질관리에 유용하게 사

용되어 질 수 있다.

## REFERENCES

1. Woo, D.D.L., S.Y.P. Miao, J.C. Pelayo, and A.S. Woolf (1994), Taxol Inhibits Progression of Congenital Polycystic Kidney Disease, *Nature*, **368**, 750-753.
2. Schiff, P.B., J. Fant, and S.B. Horwitz (1979), Promotion of Microtubule Assembly in vitro by Taxol, *Nature*, **227**, 665-667.
3. Wani, M.C., H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, and A.T. McPhail (1971), The Isolation and Structure of Taxol, A Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325-2327.
4. Stull, D.P., T.A. Scales, R. Daughenbaugh, N.A. Jans, and D.T. Bailey (1995), Taxol (Paclitaxel); Strategies to Increase the Supply of A New Anticancer Drug, *Appl. Biochem. Biotech.*, **54**, 133-140.
5. Choi, H.K., T.L. Adams, R.W. Stahlhut, S.I. Kim, J.H. Yun, B.K. Song, J.H. Kim, S.S. Hong, and H.S. Lee (1999), Method for Mass Production of Taxol by Semi-Continuous Culture with *Taxus chinensis* Cell Culture, U.S. Patent, 5,871,979.
6. Hong, S.S., B.K. Song, J.H. Kim, C.B. Lim, H.S. Lee, K.W. Kim, I.S. Kang, and H.B. Park (1999), Method for Purifying Taxol from *Taxus* Biomass, U.S. Patent, 5,900,979.
7. Chmurny, G.N., B.D. Hilton, S. Brobst, S.A. Look, K.M. Witherup, and J.A. Beutler (1992), <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Assignments for Taxol, 7-Epi-taxol, and Cephalomannine, *J. Nat. Prod.*, **55**, 414-423.
8. Gunawardana, G.P., L.L. Klein, and J.B. McAlpine (1993), Taxol Derivatives, PCT Publication WO 93/21173.
9. Voegeléin, F.G., D. Guenard, and P. Potier (1987), Taxol and Derivatives : A Biogenetic Hypothesis, *J. Nat. Prod.*, **50**, 9-18.
10. Rao, K.V., J.B. Hanuman, C. Alvarez, M. Stoy, J. Juchum, R.M. Davies, and R. Baxley (1995), A New Large-Scale Process for Taxol and Related Taxanes from *Taxus brevifolia*, *Pharm. Res.*, **12**, 1003-1010.
11. Nicolaou, K.C., P.G. Nantermet, H. Ueno, and R.K. Guy (1994), Novel Chemistry of Taxol. Retrosynthetic and Synthetic Studies, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 295-296.
12. Ma, W., G.L. Park, G.A. Gomez, M.H. Nieder, T.L. Adams, J.S. Aynsley, O.P. Sahai, R.J. Smith, R.W. Stahlhut, and P.J. Hylands (1994), New Bioactive Taxoids from Cell Cultures of *Taxus baccata*. *J. Nat. Prod.*, **57**, 116-122.
13. Rao, K.V. (1993), Taxol and Related Taxanes. I. Taxanes of *Taxus brevifolia* Bark, *Pharm. Res.*, **10**, 521-524.
14. McLaughlin, J.L., R.W. Miller, G.R. Powell, and C.R. Smith (1981), 19-Hydroxybaccatin III, 10-Deacetylcephalomannine, and 10-Deacetyltaxol: New Antitumor Taxanes from *Taxus wallichiana*, *J. Nat. Prod.*, **44**, 312-319.
15. Ma, W., R.W. Stahlhut, T.L. Adams, G.L. Park, W.A. Evans, S.G. Blumenthal, G.A. Gomez, M.H. Nieder, and P.J. Hylands (1994), Yunnanxane and Its Homologous Esters from Cell Cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*, *J. Nat. Prod.*, **57**, 1320-1324.
16. Hu, S., X. Tian, W. Zhu, and Q. Fang (1996), Microbial Transformation of Taxoids : Selective Deacetylation and Hydroxylation of 2(, 5(, 10(, 14(-Tetra-acetoxy-4(20), 11-Taxadiene by the Fungus *Cunninghamella echinulata*, *Tetrahedron*, **52**, 8739-8746.
17. Kobayashi, J., A. Inubushi, H. Hosoyama, N. Yoshida, T. Sasaki, and H. Shigemori (1995), Taxuspines E-similar-to-H and J, New Taxoids from the Japanese Yew *Taxus cuspidate*, *Tetrahedron*, **51**, 5971-5975.
18. Ringel, I, and S.B. Horwitz (1987), Taxol is Converted to 7-Epitaxol, A Biologically Active Isomer, in Culture Medium, *J. Pharm. Exp. Therapeutics*, **242**, 692-698.
19. Powell, R.G., R.W. Miller, and C.S. Smith (1979), Cephalomannine; A New Antitumor Alkaloid from *Cephalotaxus mannii*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 102-104.