

가수분해방법에 의한 식물세포배양액으로부터 Paclitaxel 수율 증가

†김진현·강인선·홍승서
(주)삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2000. 6. 28., 게재승인 : 2000. 8. 21.)

Method of Using Hydrolysis to Increase Paclitaxel Yield from Plant Cell Culture

Jin-Hyun Kim†, In-Seon Kang, and Seung-Suh Hong
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
(Received : 2000. 6. 28., Accepted : 2000. 8. 21.)

This work is a method that uses a hydrolysis for increasing yield of paclitaxel in plant cell cultures. The best pH is 3.0 to obtain a maximum yield at fixed reaction temperature and time. At pH 3.0, reaction temperature 80°C and reaction time 8 hr give the highest yield which is three times of control. This is very simple and efficient method to increase paclitaxel yield in plant cell cultures.

Key Words : paclitaxel, plant cell culture, hydrolysis, production yield

서론

1960년 미국 암 연구소 (National Cancer Institute, NCI)와 USDA가 35,000종의 식물을 대상으로 실시한 항암 활성물질 탐색을 위한 대규모 스크리닝 프로그램으로부터 paclitaxel (Taxol)에 대한 연구는 시작되었다. 1969년 NCI는 태평양 주목의 모든 부위에 대한 항암 효과를 조사하였으며 이로부터 paclitaxel 구조, 항암작용 기작 등에 대한 많은 연구결과를 얻었다(1). 1983년 1단계 임상시험, 1985년 2단계 임상시험이 시작되었으며 1988년 말기 난소암 환자에 대하여 30%, 1990년 유방암 환자에 대하여 48%의 치유효과가 있음을 확인하였다(2). 1992년 난소암에 대해 FDA허가를 취득하였으며 1994년 유방암에 대해 FDA 허가를 취득하였으며 항암제 paclitaxel은 복잡하고 독특한 구조를 갖고 있을 뿐 아니라 매우 새로운 방식의 항암기작 때문에 많은 사람들의 관심을 받아 왔다.

Paclitaxel의 공급방법은 다양하지만 주목으로부터 직접 추출하지 않고 paclitaxel을 대량으로 공급할 수 있는 대체 방안으로 크게 유기합성과 식물세포 배양에 의한 paclitaxel의 생산으로 나눌 수 있다(3-5). 유기합성의 경우 paclitaxel의 구조가 복잡하고 분자량 (MW=853)이 크기 때문에 전합성 (total synthesis)은 가능하지만 많은 어려움이 따르고

있으며 현재 실용화되고 있는 합성 방법에는 주목 외에 존재하는 paclitaxel의 전구체인 10-deacetylbaecatin III에 paclitaxel side chain을 화학 결합시켜 paclitaxel을 반합성 (semisynthesis)하는 공정이 있다. 최근 식물세포 배양의 경우 경제성 측면에서 paclitaxel을 대량 공급할 수 있는 방법으로 유력시 되고 있으며 특히 수율 증대를 위한 연구들이 많이 하고 있다(3-5). 본 연구는 택스스속 (*Taxus genus*) 식물세포 배양액으로부터 항암제인 paclitaxel을 산 가수분해에 의하여 간단하고 경제적으로 수율을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

재료 및 방법

택스스속 식물세포 배양 및 가수분해 방법

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주를 이용하여 3000 L 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다(6). 배양액으로부터 데칸터 (decanter)와 고속원심분리기 (high-speed centrifuge)를 이용하여 식물세포와 식물세포 조각 (debris)을 제거한 발효액 (paclitaxel 농도 : 2 mg/L)을 실험 재료로 사용하였다. 식물세포 배양 후 배지의 pH는 6.0-6.4 정도이며, 배지에 HCl 용액으로 산 처리하여 실험에 이용하였다. 실험 온도는 60°C, 70°C, 80°C, 90°C이며 온도 조절은 water bath에서 하였다. 온도 변화, 반응시간, pH 등의 산처리 조건 변화에 따른 발효배양액 내 paclitaxel의 수율 증감을 확인하였다.

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

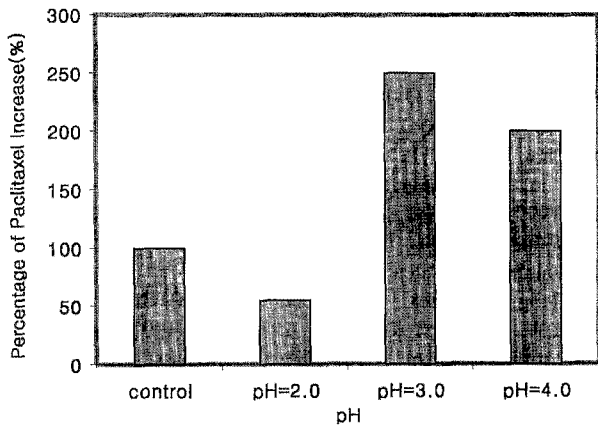


Figure 1. Effect of pH on paclitaxel yield (reaction temperature=80°C, reaction time=6hr).

배양액과 여액내의 Paclitaxel 함량 분석

발효여액 2 mL을 취하여 HPLC (Waters) 분석 방법에 의하여 paclitaxel 함량을 분석하였으며 모든 샘플은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다. 채취한 샘플 2 mL에 내부 표준 (internal standard) 용액 100 µL (6.25 mg N-propyl paraben/5 mL methanol), CPC 용액 200 µL (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 C18 UG 120 (250 mm X 4.6 mm, Shiseido), 컬럼 온도는 40°C, 이동상은 CH3CN/Water (20-100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, 샘플 주입량은 10 µL 이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다(7). Paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

반응 pH의 영향

발효배양액으로부터 데칸터와 원심분리기를 이용하여 식물세포와 식물세포조각을 제거한 발효여액 (paclitaxel 농도 : 2 mg/L)을 실험 재료로 사용하였다. 식물세포 배양 후 배지의 pH는 6.0-6.4 정도이며, 배지에 HCl 용액으로 산처리하여 실험에 이용하였다. 산처리 조건인 pH변화 (pH=2.0, 3.0, 4.0)에 따른 발효배양여액내 paclitaxel의 수율 증감을 Figure 1에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 반응온도 80°C와 반응시간 6 hr 인 경우, pH 3.0에서 250% paclitaxel 수율이 증가하여 최적임을 알 수 있었으며 pH 2.0에서는 오히려 수율이 감소하였고 pH 4.0에서는 200% 수율이 증가함을 알 수 있었다. pH 2.0과 4.0에서는 pH 3.0에 비하여 산 가수분해 효과가 떨어짐을 알 수 있었다.

반응온도와 시간의 영향

최적의 pH 3.0에서 온도변화와 반응시간에 따른 paclitaxel

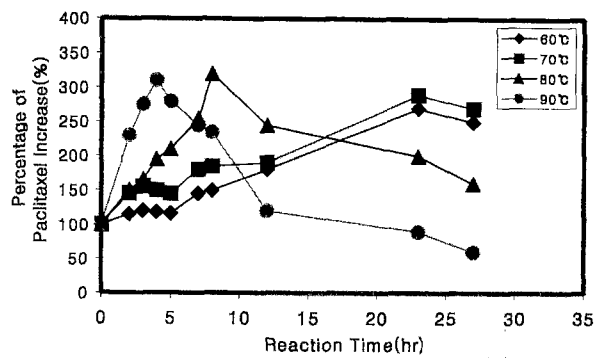


Figure 2. Effect of reaction temperature and time on paclitaxel yield (pH=3.0).

의 수율 증감을 Figure 2에 나타내었다. 전체적으로 산가수분해 방법에 의하여 발효여액으로부터 paclitaxel의 수율 증가를 확인할 수 있었으며, 반응온도가 증가할 수록 최적의 반응시간은 감소함을 알 수 있었다. 반응온도가 90°C일 경우 반응시간이 증가할수록 paclitaxel의 수율도 증가하다가 반응시간 4 hr 에 310% paclitaxel 수율 증가를 보여 최대치를 나타내었으며 그 이후에는 수율이 오히려 감소하였다. 이러한 감소현상은 높은 온도와 반응시간의 지속에 따른 paclitaxel의 분해에 의한 것으로 판단된다. 반응온도가 80°C인 경우에도 유사한 결과를 얻었으며 단지 최적의 반응시간이 8 hr, 320% paclitaxel 수율 증가를 보였으며 90°C에 비하여 최적의 반응시간이 2배로 길어짐을 알 수 있었다. 반응온도가 60°C와 70°C인 경우에는 반응시간 증가에 따라 계속하여 paclitaxel 수율이 증가하였으며 반응시간 23 hr에 거의 최대치에 도달하였다. 60°C의 경우 270%, 70°C의 경우 290% paclitaxel 수율이 증가하여 최대치를 보였으며 이러한 결과로부터 산가수분해 반응에서 반응시간, 반응온도, pH는 서로 상관관계가 있는 것으로 판단된다. 이러한 산가수분해 반응에 의한 발효배양여액내의 paclitaxel 수율의 증가는 당결합 paclitaxel인 7-xylosyl taxol, 7-xylosyl-10-deacetyltaxol 등(8)의 분해 (당과 paclitaxel 사이의 glycosidic bond의 분해)에 의하여 발효여액내 paclitaxel 수율이 증가하는 것으로 사료된다.

요약

본 연구는 식물세포 배양액의 pH를 산성으로 조절한 산가수분해방법에 의하여 배양액에 존재하는 paclitaxel의 양을 증가시켰다. 일정한 반응온도 80°C와 반응시간 6 hr 인 경우, pH 3.0에서 250% paclitaxel 수율이 증가하여 최적임을 알 수 있었다. 또한 일정한 pH 3.0에서는 반응온도가 80°C일 경우 반응시간이 증가할수록 paclitaxel의 수율도 증가하다가 반응시간 8 hr 에 320% paclitaxel 수율 증가를 보여 최대치를 나타내었다.

REFERENCES

1. Rowinsky, E.K., L.A. Cazenave, and R.C. Donehower

- (1990), Review ; Taxol : A Novel Investigational Antimicrotubule Agent, *J. of the National Cancer Institute*, **82**, 1247-1257.
- Kingston, D.G.I., G. Samaranyake, and C.A. Ivey (1990), The Chemistry of Taxol, A Clinically Useful Anticancer Agent, *J. Nat. Prod.*, **53**, 1-12.
 - Nicolaou, K.C., Z. Yang, J.J. Llu, H. Ueno, P.G. Nantermet, R.K. Guy, C.F. Clalborne, J. Renaud, E.A. Couladouros, K. Paulvannan, and E.J. Sorensen (1994), Total Synthesis of Taxol, *Nature*, **367**, 630-633.
 - Holton, R.A., C. Somoza, H.B. Kim, F. Liang, R.J. Biediger, P.D. Boatman, M. Shindo, C.C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K.K. Murthi, L.N. Gentile, and J.H. Liu (1994), First Total Synthesis of Taxol. 1.Functionalization of the B Ring, *J. of American Chemical Society*, **116**, 1597-1598.
 - Holton, R.A., H.B. Kim, C. Somoza, F. Liang, R.J. Biediger, R.J. Biediger, P.D. Boatman, M. Shindo, C.C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K.K. Murthi, L.N. Gentile, and J.H. Liu (1994), First Total Synthesis of Taxol. 2.Completion of the C and D Ring, *J. of American Chemical Society*, **116**, 1599-1600.
 - 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.
 - 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.
 - Carver, D.R., T.R. Prout, C.T. Workman, D.L. Henderson, and C.L. Hughes (1994), Method of Using Ion Exchange Media to Increase Taxane Yields, U.S.Patent, 5,281,727.