

식물세포 *Taxus chinensis* 배양으로부터의 Paclitaxel 대량 정제 및 특성

†김진현·기은숙·¹민범찬·최형균·홍승서·이현수
(주) 삼양제넥스 생명공학연구소, ¹삼양사 중앙연구소
(접수 : 2000. 8. 2., 게재승인 : 2000. 10. 6.)

Purification and Characterization of Paclitaxel from Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis* in Large-Scale Process

Jin-Hyun Kim†, Un-Sook Gi, Bumchan Min¹, Hyung-Kyoon Choi, Seung-Suh Hong, and Hyun-Soo Lee
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
¹Samyang Central R&D Institute, Taejeon 305-348, Korea
(Received : 2000. 8. 2., Accepted : 2000. 10. 6.)

In developing a HPLC purification process, it was hoped that a single chromatographic system would be sufficient to obtain pure paclitaxel in high yield. However, no such system was found, due in part to the complex taxoid profile of crude paclitaxel and to the rigorous nature of the product specification. A two step HPLC purification was adopted using reverse-phase separation on C₁₈ as a first step, and normal-phase separation on silica as the final polishing step. Impurity profiles were established and maintained for paclitaxel, which identified and quantified each impurity observed in purified paclitaxel from these two steps, all impurities at or above 0.1% were identified. Results provide information for improving the quality control of paclitaxel production.

Key Words : plant cell culture, paclitaxel, impurity, purification, identification

서론

1990년 Witherup 등(1)에 의하여 *Taxus brevifolia*의 잎으로부터 paclitaxel 분리/정제 공정에 관하여 보고하였다. 건조된 잎을 methylene chloride와 methanol (1:1)로 먼저 추출한 다음 건조물을 methylene chloride와 물로 partition 하고 celite 545와 silica gel chromatography를 연속적으로 처리하여 crude paclitaxel를 제조하였다. 최종적으로 reverse-phase HPLC column에 의하여 paclitaxel (>98%)를 정제하였다. 1991년 Cardellina II(2)에 의하여 *Taxus brevifolia*의 껍질로부터 paclitaxel 분리/정제 공정에 관하여 보고하였다. 건조된 껍질을 methanol로 먼저 추출한 다음 건조물을 hexane으로 partition하여 왁스성분 등을 제거하였다. Aqueous phase에 carbon tetrachloride를 첨가하여 추출하고 chromatography (Sephadex LH-20, eluant : methanol/methylene chloride)로 전처리하고 최종 normal-phase chromatography(CN-bonded phase column, eluant : hexane/isopropyl alcohol)에 의하여 최종 정제를 하였다. Paclitaxel의 분리/정제에 대한 다른 접근 방법이 1992년 Vanhaelen-Fastr

등(3)에 의하여 보고되었다. 유기용매를 이용하여 추출한 후에 partition (methanol, water/methylene chloride) 단계를 거쳐 전처리 단계로 column chromatography (silica gel, eluant : hexane/acetone)를 사용하였다. 최종 정제 단계로 high speed countercurrent chromatography (HSCCC)를 사용 하였으며 최종 제품 내 cephalomannine과 paclitaxel는 preparative HPLC를 이용하여 분리하였다. 이와 유사한 방법으로 1991년 Zhang 등(4), 1993년 Castor 등(5), 1995년 Rao 등(6)에 의하여도 paclitaxel를 분리/정제 하였다. 이들의 정제 단계를 보면 건조된 식물체를 유기용매로 추출하고 partition에 의하여 비극성 불순물 (왁스성분 등) 또는 극성 불순물을 제거하였다. 전처리 단계는 고가의 chromatography (silica gel, Sephadex LH-20, celite)를 이용하였으며 최종 정제 단계로 open column chromatography/HPLC chromatography를 이용하여 정제하였다. 이러한 공정에서의 문제점은 많은 유기용매 사용과 전처리 단계에서의 column chromatography 사용으로 인한 비경제적인 공정이라는 것이다. 또한 제품의 품질관리와 허가를 위한 정제된 최종 제품 내에 존재하는 불순물의 profile, 함량, 동정 (identification) 등에 대해서는 전혀 언급이 없다. 이러한 관점에서 볼 때 본 연구는 두 가지 측면에서 그 의미가 있다. 첫째, 고순도와 고수율의 대량 정제방법을 개발하였다. 둘째, 최종 정제된 paclitaxel 내에 포함되어 있는 불순물 profile 확인, 함량 분석, 그리고 이들 물질들에 대한 분리, 정

†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

제 및 동정을 실시하였다.

재료 및 방법

Taxus 식물세포 배양

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주를 이용하여 3000 L 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다(7). 배양액으로부터 식물세포 회수를 위하여 데칸터 (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)를 이용하였으며, 식물세포조각 (cell debris) 회수를 위하여 고속 원심분리기 (α -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)를 사용하였다. 회수한 식물세포와 세포조각을 합하여 biomass라 하였다.

Paclitaxel 및 유도체 함량분석

HPLC (Waters) 분석 방법에 의하여 paclitaxel 과 taxane derivative 함량을 분석하였으며(8) 모든 sample은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다. 분석에 사용한 column은 Capcell Pak C₁₈ UG 120(250 mm × 4.6 mm, Shiseido, Japan), column 온도는 40°C, 이동상은 CH₃CN/Water (20-100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, sample 주입량은 10 μ L 이며, UV(227 nm) detector를 사용하였다. Paclitaxel 표준물질은 Sigma, 각종 유도체는 Hauser 제품을 사용하였다.

Crude extract 제조

Methanol을 이용하여 biomass내 paclitaxel을 4회 회분식으로 추출하였다. Methanol과 biomass 혼합비는 1:1(1 kg biomass/1 L methanol)로 하였으며 반응시간은 1회 10분으로 하였다. 4회 methanol 추출 후 추출액의 농축은 rotary evaporator에서 수행되었으며 농축조건은 635 mmHg, 40°C에서 이루어 졌다. Methanol 추출액을 농축하고 (1/5-1/8) 농축액에 methylene chloride를 첨가하여 (methanol:methylene chloride=5:1) 액/액 추출을 실시하여 methanol 농축액에 존재하는 극성불순물 (polar impurity)을 먼저 제거하였다. 액/액 추출은 회분식으로 3회에 걸쳐 실시하였으며 액/액 추출을 통하여 극성불순물이 제거된 methylene chloride 용액을 rotary evaporator (450 mmHg, 30°C)에서 농축하고 건조하여 사용하였다. 건조물에 포함되어 있는 타르성분은 흡착제 (active clay)를 이용하여 제거하고, hexane 침전과 분별침전 공정으로 각각 비극성불순물과 극성 불순물들을 제거하여 순도 70% crude paclitaxel을 HPLC 정제 공정에 이용하였다(8).

Crude extract로부터 taxane derivative의 단성분 분리/정제

최종제품에 포함되어 있는 여러가지 taxane derivative들은 Biocad Sprint (USA), Semi Prep LC에서 수 mg 단위로 분리/정제 하였다. Curosil PFP column (21 × 250 mm)이 사용되었으며, peak 확인을 위하여 흡광도 227 nm에서 UV detector를 사용하였다. H₂O/CH₃CN 공용매를 65/35에서 35/65로 40 분간 2 mL/min 유속으로 gradient elution 하였고 35/65에서 70분간 방치하여 column을 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 H₂O/CH₃CN의 비율이 70/30에서 20/80 사이의 isocratic elution 방법으로 정제 하였다.

Taxane derivative의 화학구조 분석 및 동정

분리/정제된 taxane derivative는 NMR과 MS 등을 사용하여 화학구조를 분석하였다(9). NMR 실험을 위해서는 Bruker, DRX-300 (Germany)를 사용하였으며, 시료 수 mg을 CDCl₃ 용매에 녹여 ¹H, ¹³C NMR 실험 및 DEPT, COSY, HETCOR 등의 실험을 통하여 각 성분의 분자구조를 분석하였다. 분자구조가 추정된 화합물의 대해서는 FAB mass spectrometry로 분자량을 확인하였는데 AMD Intetra (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⁺ 이온을 분자 이온 source로 사용하였다.

결과 및 고찰

Paclitaxel 정제

분별침전공정에서 수득한 paclitaxel 분말 (순도:70%) 299 mg을 methanol 3 mL에 용해시켜 ODS C₁₈ HPLC column (500 × 500 mm)에 주입시킨 다음, methanol과 물의 65:35(v/v) 혼합용액을 용리액으로 사용하고, Table 1의 조건에서 용출시키면서 자외선 검출기로 paclitaxel의 존재 여부를 검출한 결과, 체류시간 40-47분의 분획에서 paclitaxel이 검출되어 이들 분획을 분취하였다. Reverse-phase column (C₁₈)을 통하여 주로 paclitaxel보다 비극성인 불순물을 효과적으로 제거하게 된다. 분취한 paclitaxel 함유 분획중의 paclitaxel 순도는 90% 이고, 회수율은 90% 이었다.

Table 1. Conditions of stage 1 and stage 2 for HPLC purification.

System	Condition
HPLC system 1	
System	Waters Delta Prep 4000 HPLC(Waters, USA)
Column	ODS C ₁₈ column(50 × 500 mm, Shiseido, Japan)
Flow rate	80 mL/min
Loading	299 mg/3 mL methanol
Detector	UV (227 nm)
HPLC system 2	
System	Waters Delta Prep 4000 HPLC(Waters, USA)
Column	Silica column(50 × 500 mm, Shiseido, Japan)
Flow rate	80 mL/min
Loading	209.3 mg/2 mL methylene chloride
Detector	UV (227 nm)

ODS HPLC column에서 분취한 paclitaxel 함유 분획을 10 mmHg의 진공 및 35°C 온도에서 감압 건조시키고, 수득한 건조물 중 209.3 mg을 취하여 methylene chloride 2 mL에 용해시켜 다시 silica HPLC column에 주입시킨 다음, methylene chloride:methanol (98:2, v/v) 혼합용액을 용리액으로 사용하

Table 2. The characterization of impurity in paclitaxel by NMR and Mass spectrometry.

Compound	Material name	Formular	Molecular weight	Conc. (%)	Ref.
1	Side chain derivative ^a	C ₁₇ H ₁₇ NO ₄	299	>0.1	(10)
2	Baccatin III	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	586	>0.1	(11)
3	10-Deacetyltaxol	C ₄₅ H ₄₉ NO ₁₃	811	>0.1	(6)
4	Taxcultine	C ₄₄ H ₅₄ NO ₁₄	820	<0.1	(12)
5	Cephalomannine	C ₄₅ H ₅₃ NO ₁₄	831	>0.1	(13)
6	Unknown	-	-	<0.1	-
7	Taxane derivative ^b	C ₄₈ H ₅₃ NO ₁₄	867	>0.1	(14)
8	Taxol C	C ₄₆ H ₅₈ NO ₁₄	848	<0.1	(12)
9	7-Epitaxol	C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄	853	>0.1	(12)

^a N-Benzoyl-(2R,3S)-3-phenylisoserine methyl ester

^b CAS registry number : CAS 173101-56-9

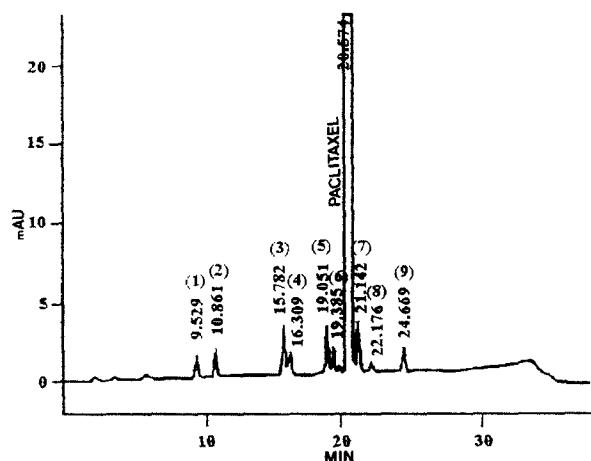


Figure 1. HPLC chromatogram of paclitaxel and taxane derivatives in purified product.

고, Table 1의 조건에서 용출 시키면서 자외선 검출기로 paclitaxel의 존재 여부를 검출한 결과, 체류시간 40-70분의 분획에서 paclitaxel이 검출되어 이들 분획을 분취하였다. Normal-phase column (silica)을 통하여 주로 paclitaxel보다 극성인 불순물을 효과적으로 제거하게 된다. 분취액을 rotary evaporator 및 진공건조기를 사용하여 진공건조시켜 paclitaxel 결정 170.5 mg을 90%의 회수율로 수득하였다. 얻어진 paclitaxel을 HPLC를 사용하여 정량 분석한 결과 순도는 98.7% 이었다.

Paclitaxel 특성

최종 정제된 paclitaxel 내에 포함되어 있는 불순물 profile 확인, 함량 분석, 그리고 이들 물질들에 대한 분리, 정제 및 동정을 실시하여 Figure 1 과 Table 2에 나타내었다. 이들 불순물들 중에서 0.1% 이상되는 것은 모두 6종(side chain derivative, baccatin III, 10-deacetyltaxol, cephalomannine, taxane derivative, 7-epitaxol)이며 NMR과 MS를 사용하여 화학구조를 분석한 결과 이미 알려진 paclitaxel 유도체 또는 전구체와 동일한 물질로 밝혀 졌다(10-14). 의약품 원료의 경우 고수율과 고순도의 제품으로 정제 해야 할 뿐만 아니라 최종 제품 내의 불순물 농도도 규정치 이하로 철저히 관리되어야 한다. 예를 들면, 미국 FDA 허가를 위한 원료 의약품, API(active

pharmaceutical ingredients) guide에 의하면, 최종 제품 내 관찰된 각각의 불순물의 정체를 확인하거나 정량 한 각각의 원료 의약품에 대하여 불순물 profile은 확립되고 유지되어야 한다. 일반적으로, 0.1% 이거나 그 이상의 모든 불순물들은 정체가 확인 되어야 한다(15).

요 약

일반적으로 paclitaxel과 유사한 구조를 가진 복잡한 유도체의 분리나 최종 제품에서의 엄격한 규정 등으로 인하여 한 단계의 HPLC system으로 정제하는 것은 상당히 어렵다. 이러한 이유로 두 단계 HPLC system으로 식물세포 배양액으로부터 paclitaxel의 대량 정제를 수행하였다. 즉, 첫번째 단계에서 reverse-phase HPLC column, 두번째 단계에서 normal-phase HPLC column을 사용하여 최종 제품을 얻었다. 또한 최종 정제된 paclitaxel 내에 포함되어 있는 불순물 profile 확인, 함량 분석, 그리고 이들 물질들에 대한 분리, 정제 및 동정을 실시하였다. 이들 불순물들 중에서 0.1% 이상되는 것은 모두 6종 (side chain derivative, baccatin III, 10-deacetyltaxol, cephalomannine, taxane derivative, 7-epitaxol)이며 NMR과 MS를 사용하여 화학구조를 분석한 결과 이미 알려진 paclitaxel 유도체 또는 전구체와 동일한 물질로 밝혀 졌다. 본 연구 결과는 결국 paclitaxel 생산을 위한 품질관리 (quality control)와 허가를 위한 자료로 유용하게 사용되어 진다.

REFERENCES

- Witherup, K. M., S. A. Look, M. W. Stasko, T. J. Ghiorzi, and G. M. Muschik (1990), *Taxus spp.* Needles Contain Amounts of Taxol Comparable to the Bark of *Taxus brevifolia*: Analysis and Isolation, *J. Nat. Prod.* **53**, 1249-1255.
- Cardellina II, J. H. (1991), HPLC Separation of Taxol and Cephalomannine, *J. Liq. Chromatogr.* **14**, 659-665.
- Vanhaelen-Fastre, R., B. Diallo, M. Jaziri, M. L. Faes, J. Homes, and M. Vanhaelen (1992), High-Speed Counter-current Chromatography Separation of Taxol and Related Diterpenoids from *Taxus baccata*, *J. Liq. Chromatogr.* **15**, 697-706.
- Zhang, Z., Z. Jia (1991), Taxanes from *Taxus chinensis*,

- Phytochem.* **30**, 2345-2348.
- Castor, T. P., T. A. Tyler (1993), Determination of Taxol in *Taxus Media* Needles in the Presence of Interfering Compounds, *J. Liq. Chromatogr.* **16**, 723-731.
 - 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.
 - 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.
 - Chmurny, G. N., B. D. Hilton, S. Brobst, S. A. Look, K. M. Witherup, and J. A. Beutler (1992), ¹H- and ¹³C-NMR assignments for taxol, 7-epi-taxol, and cephalomannine, *J. Nat. Prod.* **55**, 414-423.
 - 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.
 - Voegelien, F. G., D. Guenard, and P. Potier (1987), Taxol and derivatives : a biogenetic hypothesis, *J. Nat. Prod.* **50**, 9-18.
 - 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.
 - 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.
 - 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.
 - Guidance for industry - Manufacturing, processing, or holding active pharmaceutical ingredients (1998), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Center for Veterinary Medicine (CVM).