



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0070389
(43) 공개일자 2010년06월25일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.
C12N 5/02 (2006.01) C12P 17/02 (2006.01)
C12P 15/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-7012491(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 1997년05월27일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2008-7030132
원출원일자(국제출원일자) 1997년05월27일
심사청구일자 2008년12월10일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2010년06월07일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US1997/008907</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 1997/44476
국제공개일자 1997년11월27일</p> <p>(30) 우선권주장
08/653,036 1996년05월24일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
디에프비 바이오테크 인코포레이티드
미국 텍사스주 76107 포트 워스 홀렌 스트리트 3909</p> <p>(72) 발명자
브링기 벤카타라만
미국 뉴욕주 14850 이타카 트리파메스 테라스 15 아파트먼트 #3
카크레이드 프라카시 쉼
미국 매사추세츠주 01752 말보로 램버트 서클 45
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김영, 주성민</p> |
|---|--|

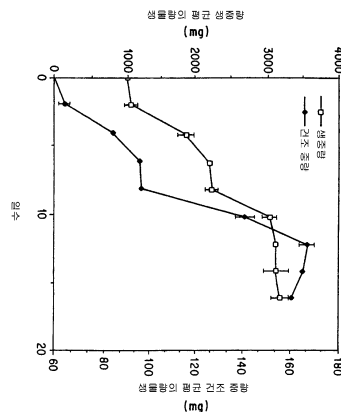
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 탁수스종의 세포 배양에 의한 탁산의 생산 증진 방법

(57) 요약

본 발명은 모든 공지의 탁수스 종, 예를 들면, 브레비폴리아(brevifolia), 카나덴시스(canadensis), 쿠스피다타(cuspidata), 바카타(baccata), 글로보사(globosa), 플로리다나(floridana), 왈리치아나(wallichiana), 미디어(media) 및 키넨시스(chinensis)로부터 매우 고수율로 탁솔, 바카틴 III 및 기타 탁솔 유사 화합물을 생산할 수 있는 방법을 제공한다. 배양 조건(즉, 배지 조성 및 조작 방식)의 특성의 변형은 모든 탁수스종의 세포 배양으로부터 다양한 탁산의 수율을 증가시키는 것으로 발견되었다. 특히 바람직한 증강제로는 은 이온 또는 은 착물, 자스몬산(특히 그 메틸 에스테르), 옥신 관련 성장 조절제 및 페닐프로파노이드 경로의 억제제(예; 3,4-메틸렌디옥시-6-니트로신남산)가 있다. 이들 증강제는 단독으로 사용하거나 서로 또는 다른 수율 증가 조건을 조합하여 사용할 수 있다. 탁수스 키넨시스의 식물 세포 배양으로부터의 탁산의 수율이 이들 조건의 하나 이상을 사용하여 특히 증가되는 반면에, 탁수스종에 대한 탁산의 수율은 이들 조건의 사용으로부터 이점을 얻을 수 있는 것으로 확인되었다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

프린스 크리스토퍼 엘

미국 뉴욕주 14882 랜싱 랜싱 스테이션 로드 615
디14

로치 브래든 엘

미국 뉴욕주 14847 인터라켄 스테이트 루트 96
9205

특허청구의 범위

청구항 1

탁산을 고수율로 생산하기 위한 탁수스종 세포의 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 탁수스(*Taxus*) 종의 세포 배양에 의한 탁술, 바카틴 III 및 기타 탁산의 생산 증진 방법 및 그 회수 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] **탁산 공급 연구**

[0003] 탁술은 태평양의 주목인 탁수스 브레비폴리아(*Taxus brevifolia*)의 껍질로부터 최초로 분리된 디테르페노이드 알칼로이드이다(Wani 등, 1971, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2325-2327). 탁술에 대한 관심은 미국 국립 암 연구소(NCI)가 대규모 검색 프로그램에서 천연 껍질 추출물이 항종양 활성을 나타낸다는 것을 확인하였을 때 시작되었다. 그 이후로, 탁술이 치료 저항성의 난소암에 매우 효과적이며 유방암 및 기타 암에도 효과적임이 임상 실험으로 확인되었다. 탁술은 그 근본적으로 상이한 세포독성 메카니즘으로 인해, 즉 마이크로튜블의 탈중합화를 억제함으로써 화학요법에서 눈부신 발견으로 대두되었다(Rowinsky 등, 1990, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1247-1259).

[0004] 탁술 방정식에서 위압적인 변수는 공급이었다. 목피 유래 탁술은 시판 약제의 1차 공급원으로서 중단되었다. 대규모 생산은 반합성, 즉 식물 유래 전구체인 10-데아세틸바카틴 III에 측쇄를 화학적으로 부착하는 합성법에 의해 달성되었다. 전합성은 실험실에서는 성공하였으나 탁술에 대한 실행가능한 판로로서는 거의 전망이 없다. 그러므로, 탁술에 대한 수요의 증가에 맞추어 저렴하고 환경친화적인 지속적인 공급원을 개발하여야 할 필요성이 시급한 것이다.

[0005] 탁술 외에도, 관련 탁산 분자의 상업적 생산 방법을 개발하는 것이 시급하게 요구되었다. 탁소티어(Taxotere)와 같은 탁술 유도체가 이미 세계 시장에 소개되어 있다. 또한, 유용한 활성을 가진 신규의 탁산 유도체의 발견 및 개발에 엄청난 연구 활동이 집중되고 있다. 이러한 진보는 임의의 주어진 유도체가 효과적으로 합성될 수 있는 대량의 적합한 출발 "골격" 분자에 대한 점증하는 수요를 창출하는 것 같다.

[0006] 그러한 분자의 한가지 예가 전술한 전구체인 10-데아세틸바카틴 III인데, 이것은 반합성 탁술의 출발점으로 사용된다. 탁술 및 기타 유도체의 반합성 생산을 위한 또 다른 바람직한 출발 분자는 바카틴 III이다. 바카틴 III은 정상적으로는 식물에서 주요 탁산으로서 축적되지 않으므로, 이 분자에 대한 간편한 대규모 천연 공급원은 없다. 그러나, 그것은 탁술과의 화학적 유사성으로 인해 반합성의 매우 바람직한 출발점이 된다. 예를 들면, 10-데아세틸바카틴 III의 10 위치의 아세틸화에 필요한 단계는, 10-데아세틸바카틴 III이 아니라 바카틴 III이 출발점이라면 방해된다.

[0007] 본 발명은 탁술, 바카틴 III 및 기타 탁산의 상업적 생산을 위한 식물 세포 배양에 기초한 방법의 개발에 관한 것이다.

[0008] **식물 유래 화학물질원으로서의 조직 배양**

[0009] 식물 세포가 다양한 상이한 배양 방식하에 분화, 성장하고 2차 대사산물을 생산하는 능력은 다수의 연구 그룹에 의해 광범위하게 입증되어 왔다. 최근에는, 두 개의 화합물, 즉 쉬코닌(적색 염료, 항염증성) 및 진세코사이드(동양약에서의 강장약)가 일본에서 조직배양 방법에 의해 생산되었다. 다수의 기타 방법에 의해 바닐린, 베르베린 및 로즈마린산 등의 상업화가 가까운 것으로 보고되었다(Payne 등, 1991, "Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems", Hanser Publishers, Munich).

[0010] 탁술, 바카틴 III 및 탁산의 식물 세포 배양 방법의 장점은 다음과 같이 다양하다:

[0011] (i) 세포배양 방법은 무제한적이고 연속적이며 일정한 제품 공급을 보장하며, 해충, 재난 및 계절적 영향을 받

지 않으며, (ii) 세포 배양은 대형 생물반응기에서 배양할 수 있고, 환경 조건을 조작함으로써 목적 화합물을 대량생산하도록 유도될 수 있으며, (iii) 세포 배양은 목피 또는 침엽과 비교하여 보다 단순한 범위의 화합물을 생산하여 분리 및 정제를 상당히 단순화하며, (iv) 세포 배양 방법은 농업적 방법보다 더 요구되는 신속한 변화에 빠르게 적응할 수 있으며, (v) 탁솔, 바카틴 III 또는 기타 전구체의 제공외에도, 세포 배양 방법은 또한 유익한 생물 활성 양상을 나타내거나 또는 다른 생물 활성 유도체로 전환될 수 있는 탁산 화합물을 생산할 수 있다.

[0012] 무균의 대규모 식물 세포 배양은 본래 비용이 많이 들기 때문에, 세포 배양 방법은 이들 비용이 높은 생산성에 의해 상쇄될 경우에만 상업적으로 고려된다. 모든 식물종 및 표적 대사산물이 상이하며, 구체적인 매 시스템에 상이한 연구가 필요하다. 본 발명은 탁솔, 바카틴 III 및 탁산 생산을 위한 고생산성의 식물 세포 배양을 얻기 위한 독창적이고 전문적인 연구에 집중한 것이다.

[0013] **수목 식물 및 침엽수의 조직 배양의 문제점**

[0014] 과거의 문헌을 조사한 결과, 초본 식물은 배양시 비교적 용이하게 조작되는 반면, 수목 식물 및 침엽수 생산 배양은 난점을 안고서만 달성되어 왔음을 알 수 있다.

[0015] 2차 대사산물 생산 나자식물 배양물 및 침엽수 배양물의 성장은 일반적으로 낮았다. 예를 들면, 베를린 (Berlin) 및 비테(Witte)(1988, *Phytochemistry*, 27, 127-132)는 투자 옥시덴탈리스(*Thuja occidentalis*)의 배양은 그 생물량을 18일째에 단지 약 30%만큼 증가시켰음을 보고하였다. 반 우덴(Van Uden) 등(1990, *Plant Cell Reports*, 9, 257-260)은 칼리트리스 드러몬드(*Callitris drummondii*)의 현탁액의 경우 21일째에 생물량이 20% 내지 50% 증가함을 보고하였다. 웨스트게이트(Westgate) 등(1991, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 798-803)은 나자식물인 세팔로탁수스 해링토니아(*Cephalotaxus harringtonia*)의 현탁액의 경우 약 10일의 배가 시간을 보고하였다. 본맨(Bornman)에 의해 요약된 바(1983, *Physiol. Plant.* 57, 5-16)와 같이, 교목 현탁액 (피세아 아비즈(*Picea abies*))에 대한 배지 개발을 위해 엄청난 노력이 경주되어 왔다. 이 총괄적인 연구는 나자식물 현탁액이 실제로 신속한 성장 할 수 있으나, 일반 원칙으로 이용될 수는 없으며, 상이한 세포주에 대한 배지 제형이 독립적으로 최적화되어야 함을 나타내고 있다.

[0016] 나자식물 배양중의 2차 대사산물 생산성 조사는 또한 초본종과 비교하여 신속한 생합성을 유도하는 데 있어서의 난점을 지적하고 있다. 예를 들면, 세팔로탁수스 해링토니아의 배양물은 모식물에서 발견되는 것의 단 1% 내지 3%의 수준으로 테르펜 알칼로이드를 생산하였다(Delfel and Rothfus, 1977, *Phytochemistry*, 16, 1595-1598). 성공적인 유도시에 조차도, 헤인스타인(1985, *Journal of Natural Products*, 48, 1-9)은 모식물에서 생산된 수준까지만 근접할 수 있었다(총 알칼로이드 건조 중량의 약 0.04%). 반 우덴 등(1990)은 침엽수 칼리트리스 드러몬드의 현탁 배양물을 유도하여 포도필로톡신을 생산할 수 있었으나, 침엽(needle)에 의해 생산된 것의 10분의 1의 수준일 뿐이었다. 투자 옥시덴탈리스가 상당한 수준의 모노테르펜(10mg/L 내지 20mg/L) 및 디테르페노이드 테하이드로페루기놀(2mg/L 내지 8mg/L)을 생산할 수 있는 능력은 베를린 등(1988)에 의해 명확하게 입증되었다. 그러나, 이러한 결과는 느린 성장률(18일에 30%의 생물량 증가) 및 낮은 세포 밀도(1 리터당 건조 중량 5g 내지 7g)으로 수득되었다.

[0017] **탁산 생산을 위한 세포 배양**

[0018] 나자식물 현탁액에서 나타나는 신속한 성장 및 고생산성의 달성에 있어서의 난점은 지금까지 탁수스 세포 배양물에서의 탁산 생산에 관한 보고에서 일반적으로 반영되어 왔다.

[0019] 자지리(Jaziri) 등(1991, *J. Pharm. Belg.*, 46, 93-99)은 최근에 탁수스 바카타(*Taxus baccata*)의 칼루스 배양을 개시하였으나, 면역 흡착 분석법을 사용하여 어떠한 탁솔도 검출할 수는 없었다. 위크레메신헤 및 아르테카(1991, *Plant Physiol.*, 96, (증보판) p.97)는 탁수스 메디아(*Taxus media*)(cv. hicksii)의 칼루스 배양물에서 0.009 건조 중량%의 탁솔의 존재를 보고하였으나, 보고된 탁솔이 생산된 배가 시간, 세포 밀도 및 시간 규모는 나타나있지 않았다.

[0020] 미국 특허 제5,019,504호(크리스텐(Christen) 등, 1991)는 탁수스 브레비폴리아의 세포 배양물에 의한 탁산 및 탁산 유사 화합물의 생산 및 회수 방법에 대해 기재하고 있다. 이 연구자들은 탁솔 생산이 2주 내지 4주의 시간 단위 내에 1mg/L 내지 3mg/L의 수준으로 이루어지는 것으로 보고하였다. 이들은 또한 세포 중량이 약 7일 내지 12일의 배가 시간에 상응하는 "3주 내지 4주에 5배 내지 10배"의 증가하는 것으로 보고하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 탁산 생산을 위한 경제적으로 실행가능한 식물 세포 배양 방법이 1년에 수백 kg의 계획된 연간 수요량을 제공할 수 있기 위해서는, 탁산 역가 및 부피 생산성의 상당한 증가가 필요하다.

과제의 해결 수단

[0022] 본 발명의 목적은 신속한 성장, 높은 세포 밀도 및 높은 세포 생존능을 촉진하는 특이적 환경 조건을 구성하는 것을 포함한다(본 연구에서 보고된 성장 특성은 상당한 요소에 의해 종래의 결과를 능가하는 것이다).

발명의 효과

[0023] 본 발명의 식물 세포 배양 방법으로 높은 생산량의 탁산 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 배지 A내 전형적인 배치식 성장 주기에 걸쳐 탁수스 키넨시스 현탁 배양물 세포주 K-1에서의 생물량 증가를 도시한 것이다. 착오 막대는 중복 플라스크로부터 측정된 표준편차를 나타낸다.

도 2는 15일 실험에서 9일 및 12일째의 배지 교환이 탁솔(A) 및 총 탁산(B) 생산성에 미치는 효과를 도시한 것이다. 각각의 상자의 숫자는 생성물이 생산된 시간 간격(일)을 나타낸다. 세포내 상자의 검은색 부분은 실험 개시시에 세포 접종물에 존재하는 탁솔 또는 총 탁산을 나타낸다. 모든 처리는 이중으로 실시하였다. 탁수스 키넨시스 현탁 세포주 K-1은 표 2에 상세히 나타낸 바와 같이 배지 A와 함께 사용하였다.

도 3은 실시예 7.3에 사용된 표준 Gro-Lux 램프(GTE 실바니아, 매사추세츠주 덴버스)의 분광학적 특성을 도시한 것이다.

도 4는 탁수스 키넨시스 현탁 세포주 K-1에서의 탁산 생산 결과를 나타낸 것이다. 10분 내지 40분의 크로마토그램 부분이 나타나 있다. 선택된 탁산 피크의 다이오드 배열 스캔은 227nm에서의 피크와 함께 특징적인 탁산 UV 흡수 스펙트럼을 나타낸다.

도 5는 탁수스 키넨시스 세포주 K-1에 의한 배지 C에서의 지속적인 배양후에 탁솔 및 탁산 생산의 결과를 나타낸 것이다. 도 5A는 공기 및 미공기의 탁산에 대한 데이터를 표로 나타낸 반면, 도 5B는 25분 내지 42분의 시간 간격에서 탁솔 및 탁산 생산량의 증가를 나타낸다.

도 6은 세포 배양 상청액에서의 탁솔의 MS/MS 확인 결과를 나타낸 것이다. 도 6A는 진정한 탁솔의 이온 분무 APCI 질량 스펙트럼을 나타낸 것이고 도 6B는 모피크의 딸 이온 스펙트럼을 나타낸 것이다(m/z 871 = 탁솔 + NH_4^+). 도 6C는 미정체세포 배양 추출물의 이온 분무 APCI 스펙트럼을 나타내며 탁솔의 특징인 m/z 854 및 871을 나타낸다. 도 6D는 m/z 871의 상응하는 딸 스펙트럼을 나타내며, 세포 배양 상청액에서 탁솔의 존재에 대한 명확한 증거를 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명의 목적은 세포주의 세심한 선별, 배지 조건의 세심한 선택 및 조작, 증강제의 혼입 및 공정 조작 방식의 세심한 선택에 의해 탁산을 고비율로 생산하는 것이다.

[0026] 본 발명의 목적은 배지 제형 및 환경 조건의 변화에 의해 생산된 탁산의 프로필을 조절하는 능력을 포함한다. 구체적으로, 세포가 우세한 탁산 생성물로서 탁솔 또는 바카틴 III을 생산할 수 있게 하고(하거나), 부산물인 세팔로만닌의 생산을 억제함으로써 이후의 비용이 많이 드는 중요한 분리 및 정제 문제에 대한 훌륭한 생물학적 해법을 제공하는 것이 한 가지 목적이다. 이들 및 기타 목적은 본 발명의 하나 이상의 양태에 의해 충족된다.

[0027] 본원 발명자들은 탁솔, 바카틴 및 기타 탁솔 유사 화합물, 즉 탁산이 모든 공지된 탁수스종, 예를 들면 브레비폴리아, 카나덴시스(*canadensis*), 쿠스피다타(*cuspidata*), 바카타, 글로보사(*globosa*), 플로리다나(*floridana*), 왈리치아나(*wallichiana*), 메디아 및 키넨시스(*chinensis*)로부터 매우 고수율로 생산될 수 있음을 발견하였다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 탁솔, 바카틴 III 및 기타 탁산을 종래 보고된 것보다 훨씬 더 짧은 시간에 수득할 수 있다. 구체적으로, 본원 발명자들은 탁수스 키넨시스종이 신속하게 성장할 수 있으며,

매우 높은 수준의 탁솔, 바카틴 III 및 탁산을 단시간내에 생산할 수 있음을 확인하였다. 탁수스 키넨시스종을 사용하여, 본원 발명자들은 세포가 탁솔, 바카틴 III 및 탁산을 기타 탁수스종의 조직 배양으로부터 수득되는 양을 훨씬 초과하는 양으로 생산할 수 있도록 조작할 수 있었다.

[0028] 배양 조건의 구체적인 변형(즉, 배지 조성 및 조작 방식)은 탁수스의 모든 종의 세포 배양으로부터 다양한 탁산의 수율을 증가시키는 것으로 발견되었다. 특히 바람직한 증강제로는 은이온 또는 착물, 자스몬산(특히 메틸 에스테르), 옥신-관련 성장 조절제 및 페닐프로파노이드 경로의 억제제, 예를 들면 3,4-메틸렌디옥시 6-니트로신남산이 있다. 이러한 증강제는 단독으로 또는 서로 조합하여 또는 기타 수율 증강 조건으로 사용할 수 있다. 탁수스 키넨시스의 식물 세포 배양으로부터 탁산의 수율은 특히 이들 조건 중 하나 이상을 사용하는 것에 의해 증진되며, 모든 탁수스종의 경우 탁산의 수율은 이들 조건을 사용하면 잇점이 있는 것으로 확인되었다.

[0029] 한 가지 양태로, 칼루스 또는 현탁 배양물 유래의 탁수스종 세포를 성장 및 생성물 형성 조건하에서 페닐프로파노이드 대사 억제제를 함유하는 하나 이상의 영양 배지 중에서 현탁 배양으로 배양하는 단계; 및 상기 세포, 세포 배양 배지, 또는 그 둘다로부터 1종 이상의 탁산을 회수하는 단계를 포함하는, 탁수스(*Taxus*) 종의 세포 배양에서 탁산을 고수율로 생산하는 방법에 관한 것이다. 페닐프로파노이드 대사의 적합한 억제제로는 3,4-메틸렌디옥시-6-니트로신남산, 3,4-메틸렌디옥시신남산, 3,4-메틸렌디옥시-페닐프로피온산, 3,4-메틸렌디옥시페닐아세트산, 3,4-메틸렌디옥시벤조산, 3,4-트랜스-디메톡시신남산, 4-히드록시신남산, 페닐프로피올산, 플루오로페닐알라닌, 1-아미노벤조트리아졸, 2-히드록시-4,6-디메톡시벤조산, SKF-525A, 옥살산암모늄, 비닐이미다졸, 디에틸디티오카르바민 및 시남산이 있다.

[0030] 바람직한 양태로, 본 발명의 방법에 사용된 하나 이상의 영양 배지중 1종 이상은 에틸렌 작용의 억제제, 자스몬산 또는 그 에스테르 또는 옥신 관련 성장 조절제일 수 있는 기타 증강제를 포함할 수도 있다. 특히 바람직한 양태에서, 기타 증강제는 은 함유 화합물 또는 은 착물 또는 은 이온인 에틸렌 작용의 억제제이다. 또 다른 특히 바람직한 양태에서, 기타 증강제는 자스몬산 또는 그 알킬 에스테르이고, 보다 바람직하게는 자스몬산에 에스테르화된 알킬기는 1개 내지 6개의 탄소 원자를 가진다. 보다 바람직한 또 다른 양태에서, 증강제는 자스몬산 또는 그 알킬 에스테르이고, 배지는 또한 은 함유 화합물, 은 착물 또는 은 이온을 함유한다. 또 다른 특히 바람직한 양태에서, 기타 증강제는 옥신 관련 성장 조절제, 예를 들면, 인돌아세트산, 피클로람, α-나프탈렌아세트산, 인돌부티르산, 2,4-디클로로페녹시아세트산, 3,7-디클로로-8-퀴놀린카르복실산 또는 3,6-디클로로-ο-아니스산이다.

[0031] 또 하나의 양태로, 칼루스 또는 현탁 배양물 유래의 탁수스종 세포를 성장 및 생성물 형성 조건하에서 하나 이상의 영양 배지 중에서 현탁 배양으로 배양하는 단계; 및 상기 세포, 세포 배양 배지, 또는 그 둘다로부터 1종 이상의 탁산을 회수하는 단계를 포함하며, 여기서, 영양 배지는 자스몬산 또는 그 에스테르 또는 옥신 관련 성장 조절제일 수 있는 1종 이상의 증강제와 함께, 은을 은 함유 화합물, 은 착물 또는 은 이온의 형태로 900 μM 이하의 농도를 함유하는 것인, 탁수스종의 세포 배양에서 탁산을 고수율로 생산하는 방법을 제공한다. 한 가지 바람직한 양태에서, 증강제는 자스몬산 또는 그 에스테르이고, 은 대 증강제의 몰비가 9.5 미만이다. 또 하나의 바람직한 양태에서, 증강제는 옥신 관련 성장 조절제이고 은 대 증강제의 몰비는 0.011 이상이다.

[0032] 상기 양태중 하나에서, 하나 이상의 영양 배지는 또한 탁산 전구체를 포함할 수 있는데, 이는 α-페닐알라닌, β-페닐알라닌 또는 그 혼합물일 수 있다. 상기 양태중 하나에서, 하나 이상의 영양 배지는 또한 글루타민, 클루탐산, 아스파르트산 또는 이들 아미노산의 혼합물을 포함할 수 있거나, 또는 세포의 배양에 사용된 하나 이상의 영양 배지는 말토스, 슈크로스, 글루코스 및(또는) 프럭토스를 탄소원으로서, 바람직하게는 1차 탄소원으로서 포함할 수 있다. 한 가지 양태에서, 영양 배지는 세포 배양 성장용과 탁솔 및 탁산 생산용이 동일하다. 또 다른 양태에서, 1종 이상의 탁산의 생산은 영양 배지의 조성을 변화시킴으로써 배양물에서 유도된다. 바람직한 양태에서, 배양물 배지는 주기적으로 교환하며, 통상 배지교환은 배양물로부터 탁산의 주기적 제거를 수행한다. 상기 탁수스종의 세포는 공급-배치(fed-batch) 공정에 의해 배양하는 것이 바람직하다.

[0033] 통상, 탁솔 또는 바카틴 III 및(또는) 기타 탁산은 상기 세포, 세포 배양 배지, 또는 그 둘다로부터 회수된다. 일반적으로, 본 발명에 따른 탁수스종의 배양은 탁산 생산 기간중에 평균 15mg/L/일 이상인 탁산의 평균 부피 생산성을 제공한다. 탁솔의 평균 부피 생산성은 통상 탁솔 생산기간 중에 계산하여 10mg/L/일 이상이다. 바카틴 III의 평균 부피 생산성은 통상 탁산 생산 기간중에 계산하여 15mg/L/일이다.

[0034] 바람직하게는, 본 발명의 방법에 따라 배양된 세포는 탁수스종의 세포이고, 그 종의 예로는 탁수스 브레비폴리아, 탁수스 카나덴시스, 탁수스 키넨시스, 탁수스 쿠스피다타, 탁수스 바카타, 탁수스 글로보사, 탁수스 플로리다나, 탁수스 왈리치아나 또는 탁수스 메디아가 있다. 바람직하게는 본 발명의 방법에 사용된 탁수스종의 세포

는 증강제를 함유하지 않은 배지 중에서 현탁 배양 또는 칼루스 배양하여 ELISA에 의해 측정된 배경 수준 이상의 탁솔을 생산하는 세포이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 방법에 사용된 탁수스종의 세포는 티오황산은, 메틸 자스모네이트 및 옥신을 함유하는 배지 중에서 현탁배양시 10mg/L의 평균 부피 생산성으로 탁산을 생산하는 세포이다.

[0035] 식물은 오랫동안 약제 및 특수 화학물질의 중요한 공급원으로 제공되어 왔다. 이들 생성물은 통상적으로 수확된 식물 재료의 추출을 통해서 또는 화학적 합성에 의해 얻어졌다. 탁솔 및 탁산은 항암제의 가장 중요한 종류가 되어 최근에는 천연 생성물의 검색으로부터 나타난다.

[0036] 본원에 사용된 탁솔 유사 화합물, 즉 탁산이라는 용어는 탁산 고리를 가진 디테르페노이드 화합물을 기술하기 위해 상호 교환적으로 사용된다. 탁산은 스스로 항종양 활성을 보유하거나 또는 생물 활성 화합물을 산출하기 위해 변형될 수 있다. 총 탁산이라는 용어는 하기 실시예 5에 기재한 특징적인 UV 흡광도를 나타내는 모든 탁산을 지칭한다.

[0037] 본원에 사용된 "칼루스"란 용어는 구조적으로 미분화되고 고체화된 배지 상에서 배양되는 배양된 식물 세포의 덩어리를 기술하기 위해 사용된다. 본원에 사용된 "현탁 배양"은 액체 영양 배지에 분산되어 있는 구조적으로 미분화된 세포를 기술하기 위해 사용된다. 현탁 배양은 다양한 응집 단계에서 세포를 포함하는 것으로 이해된다. 응집체의 크기 범위는 본 발명에 기술한 현탁액에서 나타나며, 그 크기 범위는 직경 수십 마이크로미터로부터(단일 세포 또는 극소수의 응집된 세포) 수천개의 세포로 구성되는 직경 수 mm의 응집체까지이다.

[0038] 본 발명에 사용된 식물 재료는 모든 공지된 탁수스 종, 예를 들면, 브레비폴리아, 카나덴시스, 쿠스피다타, 바카타, 글로보사, 플로리다나, 왈리치아나(유나넨시스(*yunnanensis*))로도 지칭됨), 메디아, 패스티지아타(*fastigiata*) 및 키넨시스(동종의 종, 예를 들면, 수마트라마(*sumatrama*), 셀레비카(*celebica*) 및 스페시오사(*speciosa*) 및 아종인 키넨시스 변종 메이레이(*chinensis var. mairei.*))를 포함)으로부터 수득할 수 있다. 구체적으로, 본원 발명자들은 상당량의 탁솔, 바카틴 III 및 탁산을 고 부피 생산성으로 생산할 수 있는 종으로서 탁수스 키넨시스종을 동정하였다.

[0039] 본원 발명자들은 구체적인 탁산 함량이 식물 종 및, 조직 및 특정 나부로부터 얻은 식물 종에 따라 다양하다는 것을 발견하였다. 탁산 생산을 위한 고수율 공급원 및 배양물의 선택이 치료적 용도를 위해 충분한 탁산을 제공하기 위한 중요한 제1 단계이다.

[0040] **상업적 관련을 위한 기준**

[0041] 다수의 기준점을 사용하여 탁산 생산을 위한 주어진 식물 세포 배양에 기초한 공정의 상업적 이용가능성 및 실행가능성을 평가할 수 있다. 기준점은 발효 비용, 이후 과정에서의 회수의 용이성 및 생산능을 비롯하여 공정의 중요한 실행 매개변수를 특성화하고 지지하여야 한다. 본원에 기술하는 기준점은 브로스 역가 및 부피 생산성이다.

[0042] 브로스 역가는 전체 브로스에서의 생성물의 농도로 정의되고, 통상 브로스의 리터당 생성물의 밀리그램(mg/L)으로 표현된다. 정의에 의하면, 전체 브로스 역가는 생성물의 세포내 부분과 세포외 부분을 구별하지 않는 것이다. 브로스 역가는 통상 배치식 공정 또는 공급 배치 공정의 실행성을 특성분석하는 데에 사용된다. 브로스의 역가가 보다 높다는 것은 주어진 반응부피에 대해 생산능이 보다 높다는 것과 부수적으로 단위 생산 비용이 보다 낮다는 것을 의미한다. 유사하게, 고역가의 생성물은 통상 고수율로 회수하기가 보다 용이하여 단위 생산 비용의 추가의 개선을 가져 온다.

[0043] 부피 생산성은 단위 시간당 단위 반응 부피당 생산된 생성물의 양으로 정의되고, 통상 mg/L/일의 단위로 표현된다. 탁산 생산 목적으로, 시간 척도는 생산이 수확 및 회수 직전의 생산 척도에서 일어나는 시간 구조로 정의된다. 부피 생산성은 배치식 공정 및 공급-배치 공정에 대한 기준점으로서 그 역가를 보충하며, 특히 생성물이 생산중에, 예를 들면 주기적 배지 교환 또는 또 다른 제거 방법에 의해 제거되는 공정의 특성화에 유용하다. 고 부피 생산성은 주어진 시간에 걸쳐 주어진 반응기 부피에 대해 보다 큰 생산능과, 부수하여 보다 적은 단위 생산 비용 및 보다 큰 전체 공정 실행성을 의미한다.

[0044] 어떤 경우에는, 부피 생산성을 사용하여 생물학적 공정의 고유의 능력을, 예를 들면 공정 진행의 초기 단계에서 평가하며, 생산 주기의 가장 생산적인 부분에 대해, 즉 생합성물이 최대인 단시간에 걸쳐 생산성을 측정하는 것

이 유용하다. 이것은 통상 최대 순간 부피 생산성으로 지칭된다. 그러나, 공정의 실행성 평가에서 보다 적합한 기준점은 생산성이 전체 생산 단계에 걸쳐 측정되는 평균 부피 생산성이다. 명백히, 최고의 평균 부피 생산성을 달성하기 위해서는, 최대의 순간 생산성이 생산 단계의 대부분을 통해 유지되어야 한다. 달리 언급하지 않으면, 부피 생산성이란 용어는 전체 생산 단계에 대해 결정된 평균 부피 생산성을 지칭한다. 통상적으로, 생산 단계는 영양 배지 조성의 변화에 의해, 성장 배지를 생산 배지로 대체하거나 또는 탁산 생산에서 상당한 증가를 유도하는 증강제를 첨가함으로써 개시된다.

[0045] 탁수스 세포주의 창시

[0046] 탁수스 식물 재료는 북아메리카 전지역 및 기타 대륙으로부터 얻을 수 있다. 배양은 성장에 적합한 탁수스 조직을 선택하는 것으로부터 시작된다. 칼루스를 유도하기 위해 목피, 형성층, 침엽, 줄기, 종자, 구과 및 뿌리와 같은 식물의 임의의 부분에서 유래한 조직을 선택할 수 있다. 그러나, 탁술의 최적 수율을 위해서는, 식물의 침엽 및 분열 조직 부분이 바람직하다. 일반적으로 보다 연녹색으로 확인될 수 있는 새로운 성장 침엽(예; 1개월 내지 3개월령)이 가장 바람직하다. "새로운 성장"이란 용어는 1년 중의 성장 계절대에 일어나는 식물의 침엽 생산을 의미하는데 광범위하게 사용된다.

[0047] 배양물의 오염을 방지하기 위해, 조직은 배양 배지로 도입되기 전에 표면을 멸균하여야 한다. 클로록스 (CLOROX)(클로록스 컴파니가 소유하는 표백제 상표) 처리와 같은 임의의 통상의 멸균 기술이 효과적이다. 또한, 세폭시틴, 벤레이트, 클록사실린, 암피실린, 젠타마이신 설페이트 및 포스포마이신과 같은 항미생물제를 식물 재료의 표면 멸균에 사용할 수 있다.

[0048] 칼루스 성장

[0049] 배양물은 통상 성장 형태, 생산성, 생성물 프로필 및 기타 특성에서 변이성을 나타낸다. 각각의 세포주는 성장 배지 성분에 대해 그 선호도가 상이하기 때문에, 칼루스의 유도 및 번식에 다수의 상이한 성장 배지를 사용할 수 있다.

[0050] 적합한 배지 조성은 배양되는 종에 따라 달라진다. 상이한 종에 대한 바람직한 배지는 표 3에 나열하였다. 예를 들면, 다른 것을 사용할 수도 있지만, 탁수스 키넨시스에 대한 바람직한 성장 영양 배지는 A, D, I, J, K, L, M, O, P이다. 이들 배지는 표 2에 나열한 성분들을 함유한다. 배양은 표 2에 나타난 수준으로 혼합된 배지 성분을 사용하여 수행하는 것이 바람직하지만, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 수준에서의 약간의 변이가 세포의 성장에 악영향을 끼치지 않을 것임을 이해할 것이다. 예를 들면, 배지 A를 사용할 경우에, 성장 호르몬 또는 조절제가 1 ppb 내지 10 ppm, 바람직하게는 2 ppb 내지 1 ppm의 양으로 배지중에 혼합된다. 배지 D를 사용할 경우에는, 성장 호르몬 또는 조절제가 1 ppb 내지 10 ppm, 바람직하게는 2 ppb 내지 2 ppm의 양으로 배지중에 혼합된다. 기타 배지 성분의 양은 표 2에 나타난 농도의 1/10의 농도로부터 3배의 농도까지의 수준으로 혼합될 수 있다.

[0051] 탁산의 대량 생산은 현탁 배양물에서 탁수스 세포의 배양에 의해 촉진된다. 일반적으로, 현탁 배양은 칼루스 배양에서 성공적이었던 배양 배지를 사용하여 개시할 수 있다. 그러나, 현탁 배양 및 특히 탁산의 매우 효율적인 생산을 위한 요건은 배지의 수정에 의해 보다 양호하게 충족될 수 있다. 탁수스 세포가 본 발명의 방법에 따라 조작된 처리 매개변수 및 수정된 배양 배지에서 배양되는 경우에, 배양물로부터의 1종 이상의 탁산의 수율이 상당히 증가한다는 것이 확인되었다.

[0052] 본원에서 "영양 배지"란 용어는 식물 세포 칼루스 및 현탁 배양물의 배양에 적합한 배지를 기술하기 위해 사용한다. "영양 배지"란 용어는 일반적인 용어로서 "성장 배지" 및 "생산 배지"를 포함하는 개념이다. "성장 배지"는 배양된 세포의 신속한 성장을 가능하게 하는 영양 배지를 기술하기 위해 사용한다. "생산 배지"란 용어는 배양된 세포에서 탁술, 바카틴 III 및 탁산의 생합성을 가능하게 하는 영양 배지를 말한다. 성장은 생산 배지에서 일어날 수 있고, 생산은 성장 배지에서 일어날 수 있으며, 최적 성장 및 생산은 둘다 단일의 영양 배지에서 일어날 수 있음을 이해하여야 한다.

[0053] 현탁 성장

- [0054] 탁수스 현탁 배양은 다른 식물 세포 배양과 마찬가지로 신속한 성장 속도 및 높은 세포 밀도를 나타낼 수 있다. 그러나, 최적 조건은 세포주마다 달라지며, 따라서, 임의의 주어진 세포주의 신속한 최적화를 위한 방법을 고려하여야 한다.
- [0055] 다양한 탁수스 종의 배양은 다량 영양물염, 미량 영양물염, 탄소원, 질소원, 비타민, 유기산 및 천연 및 합성 식물 성장 조절제를 함유하는 영양 배지로 전이시켜 배양한다. 구체적으로, 탁수스 세포의 현탁 배양을 위한 영양 배지는 통상 다량 영양물인 칼슘, 마그네슘, 나트륨, 칼륨, 인산염, 황산염, 염화물, 질산염 및 암모늄과 미량 영양물인 구리, 철, 망간, 몰리브덴, 아연, 붕소, 코발트, 요오드 및 니켈을 제공하는 무기염을 함유한다. 이 배지는 통상 미오이노시톨, 티아민, 아스코르빈산, 니코틴산, 폴산, 피리독신 및 선택적으로 비오틴, 판토텐네이트, 니아신 등을 함유하기도 한다. 이들 성분들은 표 2에 나열한 농도의 1/30 내지 30배의 농도 범위로 존재할 수 있으며, 표 2에 나열한 농도의 1/20 내지 20배가 바람직하고, 표 2에 나열한 농도의 1/3 내지 3배가 보다 바람직하고, 표 2에 나열한 농도가 가장 바람직하다.
- [0056] 영양 배지는 또한 하나 이상의 탄소원을 함유하며, 통상 1차 탄소원을 함유하는데, 여기서, 1차 탄소원이란 영양 배지의 총 탄소의 50% 이상을 제공하는 탄소원으로 정의된다. 1차 탄소원으로는 락토스, 갈락토스, 라피노스, 만노스, 셀로비오스, 아라비노스, 크실로스, 소르비톨이 바람직하거나, 또는 글루코스, 프럭토스, 슈크로스 또는 말토스가 바람직하다. 1차 탄소원의 농도는 0.05%(w/v) 내지 10%(w/v), 바람직하게는 0.1%(w/v) 내지 8%(w/v)의 범위를 가질 수 있다.
- [0057] 영양 배지는 또한 질소원을 함유하는데, 다량 영양물염 형태로 첨가된 임의의 질소외에도, 바람직하게는 적어도 일부는 유기 질소원(예; 글루타민, 클루탐산 및 아스파르트산과 같은 하나 이상의 아미노산 또는 단백질 가수분해물)이 제공될 수 있다. 이들 유기 질소원은 0.1 mM 내지 60 mM, 바람직하게는 1 mM 내지 30 mM의 농도로 질소를 공급할 수 있다. 배지는 또한 아세테이트, 피루베이트, 시트레이트, 옥소글루타레이트, 숙시네이트, 푸마레이트, 말레이트 등과 같은 하나 이상의 유기산을 함유할 수 있다. 이들 성분은 배지에 0.1 mM 내지 30 mM, 바람직하게는 0.5 mM 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있다.
- [0058] 상기 배지는 통상 피클로람, 인돌아세트산, 1-나프탈렌아세트산, 인돌부티르산, 2,4-디클로로페녹시아세트산, 3,7-디클로로-8-퀴놀린카르복실산, 3,6-디클로로-*o*-아니스산 등과 같은 옥신 관련 성장 조절제, N⁶-벤질아데닌, 6-[γ , γ -디메틸알릴아미노]퓨린, 키네티ن, 제아틴, N-페닐-N'-1,2,3-티디아졸-5-일우레아(티디아주론) 및 관련 페닐우레아 유도체 등과 같은 시토키닌-관련 성장 조절제 및 GA₃, GA₄, GA₇ 및 GA 유도체와 같은 지베렐린, 엡시스산 및 그 유도체, 브라시노스테로이드 및 에틸렌 관련 성장 조절제를 비롯한 1종 이상의 천연 또는 합성 식물 성장 조절제를 함유하기도 한다. 추가의 적합한 옥신 관련 식물 성장 조절제는 하기에 나열한다. 영양 배지는 단일 종류에 속하는 1종 이상의 성장 조절제, 예를 들면, 1종 이상의 단일의 옥신 관련 조절제 또는 1종 이상의 시토키닌 관련 조절제를 함유할 수 있음을 주목하여야 한다. 성장 조절제는 배지내에 10⁻¹⁰ M 내지 10⁻³ M, 바람직하게는 10⁻⁸ M 내지 3×10⁻⁵ M의 농도로, 보다 바람직하게는 표 2에 나열한 농도로 혼입되는 것이 바람직하다.
- [0059] 달리 나타내지 않으면, 본원에 명시된 성장 배지는 칼루스 배양 배지 및 생산 배지의 통상의 최적화에 대한 적합한 출발점을 제공한다. 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 구체적인 종류의 성분 및 주어진 종류내의 성분을 혼입, 수정 및 조작하여 최적의 실행성을 달성하는 것은 통상적인 일이며, 구체적인 배지 변형의 예가 하기 표 및 실시예에 제시되어 있다.
- [0060] 액체 배양물은 공기와 같은 기체 환경에 노출시켜, 바람직하게는 진탕 또는 교반하여 배양 성분을 적절히 혼합한다. 적합한 조건 및(또는) 상황하에서 온도는 0°C 내지 33°C의 범위를 가질 수 있지만, 배양은 23°C 내지 27°C의 온도에서 유지한다. pH는 약 3 내지 7, 바람직하게는 4 내지 6일 수 있다. 배양물은 완전 암실로부터 완전 광(좁은 밴드 및(또는) 넓은 스펙트럼)까지의 광 조건하에서 다양한 시간 동안 성장시킬 수 있다.
- [0061] 배가 시간은 시간에 따른 생물량의 증가를 모니터함으로써, 그리고 통상의 계대배양중의 성장 지수를 간단히 모니터함으로써 측정하였다. 리터당 15g 내지 24g의 최대 건조 중량 밀도를 얻었다. 다양한 탁수스종 현탁액의 성장 특성은 실시예 4에 상세히 기재되어 있다.
- [0062] **탁산 생산 조건**
- [0063] 현탁 배양물중의 2차 대사산물 형성이 성장과 동시에 일어나는 경우, 대사산물은 성장 관련성으로 언급되고, 단

일 배지 제제는 양호한 성장 및 고수준 생산을 달성하기에 충분할 수 있다. 다수의 기타 시스템에서, 신속한 성장 및 다량의 생성물 형성이 동시에 일어나지 않는 것으로 확인되었다. 그러한 경우에, 성장 및 생산 단계는 분리되고, 각 단계의 배지는 독립적으로 개발된다(Payne 등, 1991, *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Hanser publishers, 문헌). 탁수스에서 탁산 제조의 경우에, 성장 및 생성물 형성은 분리될 수 있고, 독립 배지가 각각에 대해 개발되었다.

[0064] 본 발명의 바람직한 양태에서, 세포 성장 단계 중의 배지의 조성은 탁산 생산 단계중의 배지의 조성보다 상이하다. 예를 들면, 탄소원, 특히 1차 탄소원의 동일성 및 수준은 성장 단계와 생산 단계 사이에서 변화될 수 있다. 생산 배지가 성장 배지의 것보다 고수준으로 당을 함유하는 것이 바람직하다. 생산 배지내 초기 당 수준은 성장 단계보다 생산 단계에서 2배 내지 20배 더 높다. 1차 탄소원으로는 락토스, 갈락토스, 라피노스, 만노스, 셀로비오스, 아라비노스, 크실로스, 소르비톨이 바람직하거나, 또는 글루코스, 프럭토스, 슈크로스 또는 말토스가 바람직하다. 1차 탄소원의 농도는 0.05%(w/v) 내지 10%(w/v), 바람직하게는 0.1%(w/v) 내지 8%(w/v)의 범위를 가질 수 있다. 탁술 또는 바카틴의 생산에 특히 바람직한 탄소원은 말토스, 슈크로스, 글루코스 및(또는) 프럭토스이다. 특히 바람직한 양태에서, 이들 당은 초기 영양 배지에 3.5% 이상의 농도로 혼입된다.

[0065] 비타민, 아미노산과 같은 유기 질소원을 포함할 수 있는 유기 보충물의 동일성 및 수준, 또한 후술하는 증강제의 존재 또는 레벨은 배지에서 변화되거나 상이할 수 있다. 천연 또는 합성 식물 성장 조절제의 동일성 및 수준은 배지 간에 상이할 수 있다. 유사하게 다량 영양물염 및 미량 영양물염의 수준 및 동일성 역시 성장 배지와 생산 배지 사이에서 상이할 수 있다. 염 함량이 성장 배지에 대해 상대적으로 생산 배지에서 감소되고, 선택적으로 질산염 및 황산염이 불균형적으로 감소되는 것이 바람직하며, 감소의 정도가 2배 내지 20배 만큼의 감소인 것이 보다 더 바람직하다. 그러나, 단일의 성장/생산 배지가 상기 배양에 대해 제제화될 수 있음을 이해할 수 있다.

[0066] 본원에서 개발된 생산 배지는 탁산 형성을 증가시킬 뿐만 아니라, 탁술 또는 바카틴 III과 같은 구체적인 탁산의 생산에 대해서 세포 생합성을 유도한다. 또한, 세팔로만닌과 같은 방해성 부산물의 생산은 목피 조직에 비해 최소이다. 본원에서 개발된 생산 배지는 또한 지속적인 세포 생존능 및 생합성을 촉진하고, 또한 상당한 수준의 생성물이 세포의 배지내로 분비되게 한다. 이러한 특성은 탁산 생산을 위한 효율적인 상업적 규모의 공정의 조작에 매우 중요하다.

[0067] 세포 및 배지로부터 탁술 및 탁산의 추출 및 회수 방법은 통상의 기술을 따른다(예를 들면, 실시예 5 참조). 면역 분석(ELISA) 기술은 주로 시판 키트에서 하와이 바이오테크놀로지에 의해 공급되는 프로토콜을 따랐다(본원에 참고로 인용한 Grothaus 등, 1995, *Journal of Natural Products*, 58, 1003-1014 참조). 항체는 탁술 또는 바카틴 III과 같은 임의의 탁산에 특이적이거나, 탁산 골격에 대해서는 덜 특이적일 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피법은 실시예 5에 상세히 설명한 바와 같은 기존의 프로토콜로부터 약간 변형시켰다. 본 발명에 사용된 조건하에서, 탁산 피크의 명백한 분리가 이루어졌고, 그 결과 정밀한 검출 및 정량 분석이 달성되었다. 비탁산 성분이 함께 용리될 가능성으로 인해, 탁산 피크의 분광학적 순도는 피크 면적을 통합하기 전에 다이오드 배열에 의해 검사하는 것이 통상적이다. 탁산 표준의 보유 시간은 실시예 5에 나열하며, 샘플의 크로마토그램은 도 4에 포함되어 있다.

[0068] 고등 식물의 경우, 광이 세포 배양에서 뿐만 아니라, 천연 식물에서 2차 대사의 유력한 인자이다. 광의 강도 및 파장이 중요하다(Seibert and Kadkade 1980, "Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals." E.J. Staba(편집), CRC Press, 플로리다주 보카 라톤, 123-141면). 예를 들면, 플라바노이드 및 안토시아닌 생합성은 통상 고강도의 연속광에 의해 용이해지는 반면, 기타 대사산물에 대해서는 암실에서 배양된 배양물이 바람직할 수 있다. 배양된 세포의 녹화 또는 광합성능의 증가는 생성물 형성 또는 생성물 스펙트럼을 증가시킬 수도 있다. 본원 발명자들의 연구는 특이적 좁은 밴드 광원 뿐만 아니라 넓은 밴드의 사용과 관계되었다. 실시예 7.3에 나타낸 바와 같이, 광 노출은 탁술 축적의 증가 및 배지내로의 분비를 야기할 수 있다. 광이 탁술 생산에 미치는 자극적 효과는 탁산의 생합성에 대한 특이적 제어 메카니즘의 존재를 암시하는 것이다. 광수용체의 성질과 광 유도 자극의 생화학적 특성은 아직 명확하지 않다. 그러나, 본 발명의 개시사항에 따라 증강제의 혼입은 광의 역할을 최적 실행에 대해 덜 중요하게 만든다.

[0069] 비휘발성의 용해된 영양물 외에도, 주로 산소, 이산화탄소 및 에틸렌(식물 호르몬) 등의 기체성 성분은 성장 및 생성물 형성에 중요한 역할을 한다. 두 가지 매개변수가 중요하다. 성장 및 탁술 형성을 가능하게 하는 용해된 기체 농도는 그것이 반응기의 조작 조건을 강제하기 때문에 매우 중요하다. 또한, 소비 또는 생산 속도는

반응기 설계에 관련시킬 필요가 있는데, 그 결과 최적으로 지정된 농도를 유지할 수 있다.

- [0070] 호흡에서의 그 중요성 외에도, 산소는 2차 대사산물 생합성 속도에 심각한 영향을 끼칠 수도 있다. 2차 생합성 경로에서의 산소 요구 단계에 대한 높은 포화상수는 세포들을 반응기내에서 산소 수준을 높게할 필요가 있게 한다. 높은 성장 속도의 유지에 있어 CO₂ 보상의 중요성은 연구되어 있다. 식물 호르몬인 에틸렌은 2차 대사를 비롯하여 식물 성장 및 발육의 모든 면에서 다형질 발현적인 역할을 한다(Payne 등, 1991 문헌 참조).
- [0071] 본원 발명자들은 특정 기체 농도 조건이 세포 배양에서 성장 및 2차 대사를 가능하게 할 수 있다는 것을 확인하였다. 예를 들면, 산소의 농도 범위는 배양물 배양에서 공기 포화도 1%로부터 공기 포화도 200%까지, 바람직하게는 10% 내지 100%, 가장 바람직하게는 25% 내지 95%의 범위일 수 있다. 이산화탄소 농도의 범위는 배양물 배양에서 0.03%(v/v, 배양 배지와 평형 상태의 기체상에서) 내지 15%(v/v), 바람직하게는 0.3% 내지 8%(v/v)의 범위일 수 있다. 용해된 기체의 최적 농도는 세포 대사와 관련하여 상이할 수 있는데, 예를 들면, 신속한 성장을 하는 세포는 탄산 생합성을 하는 세포와는 상이한 최적 농도를 가질 수 있으며, 이 때, 탄산 생합성은 통상 보다 고수준의 산소를 필요로 하고 보다 고수준의 이산화탄소에는 덜 민감하다. 최적 농도는 배양의 역학에 따라 달라질 수도 있는데, 예를 들면, 지체기의 세포는 대수증식기의 세포와는 상이한 용해된 기체 농도를 선호할 수 있다.
- [0072] 용해된 기체는 기타 배양 성분, 및 증강제의 작용과 여러 가지 방법으로 상호작용할 수 있다. 예를 들면, 산소 요구도는 생합성의 유발 또는 자극시 변화될 수 있다. 상처 반응으로서의 호흡률의 증가는 식물 세포 배양이 유도될 경우에 통상 관찰된다. 유발제 또는 자극제는 에틸렌을 통해 그 작용을 매개하거나 또는 2차 대사를 자극하는 것과는 무관하게 에틸렌 생산에 영향을 미칠 수 있다. 그러한 경우에, 미생물 유발제 제제를 에틸렌으로 대체하는 것이 바람직할 수 있고, 아마도 유발제 제제내 기타 미생물 성분과 관련된 독성을 예방할 것이다. 한편, 에틸렌의 작용을 억제하여 유발제 또는 자극제가 보다 배타적이고 따라서 보다 효과적인 방법으로 2차 대사를 촉진하는 것이 유리할 수 있다. 후술하는 바와 같이, 에틸렌 작용에 영향을 미치는 것으로 알려진 성분인 이온은 탄산 생합성을 유리하게 변형시킨다.
- [0073] **증강제**
- [0074] 2차 대사산물의 생산은 복잡한 과정으로서, 궁극적으로 2차 대사산물로 전환되는 전구체를 생산하고 이어서 변형시키는 다수의 상이한 효소의 협동 작용을 요한다. 동시에 2차 대사산물 생산은 기타 효소가 목적 대사산물의 전구체를 대사하는 경우에는 감소되어 2차 대사산물을 형성하는 데 필요한 전구체 풀을 고갈시킨다.
- [0075] 생산 또는 후속 전환이 적게 일어남으로 인해 이용가능한 전구체의 양의 제한, 또는 전구체 또는 중간체의 이후 과정에서의 중간체로의 전환의 제한 또는 주어진 효소의 활성의 제한은 2차 대사산물의 생산을 제한할 수 있다. 임의의 구체적인 배양 시스템에서, 2차 대사산물이 생산되는 속도는 상기 제한중 하나에 의해 제어되며, 전구체(들)가 2차 대사산물로 전환되는 경로에서 병목을 형성할 수 있다. 병목 현상을 일으키는 제한을 제거하면 경로의 또 다른 단계가 제한되는 지점까지 그 배양 시스템에서 2차 대사산물 생산 속도를 증가시킨다. 전체 생산 속도를 제한하는 구체적인 단계는 제한을 제거하는 단계와 마찬가지로 상이한 배양에 따라 달라질 수 있다.
- [0076] 탄산은 일련의 다수의 효소 단계를 통해 생산되는 2차 대사산물이며, 본원 발명자들은 탄산 생합성에서 하나 이상의 속도결정 단계를 제거하는 몇가지 종류의 증강제를 결정하였다. 이들 증강제를 탄산 생산 세포 배양물에 첨가하면 탄산 생산속도가 증가될 수 있다. 또한, 본원 발명자들은 본원에 논의된 증강제의 사용이 대부분의 탄산 생산 배양물에서 적어도 일부의 증강 효과를 가질 수 있다는 것을 측정하였는데, 이것은 전체 생산 속도가 단일의 속도 결정 단계에 의해서가 아니라 다수의 제한 요소중에서 복잡한 상호작용에 의해 결정된다는 것을 암시하는 것이다. 제한 요소중 어느 하나를 제거하면, 탄산 생산이 증가될 수 있지만, 증가의 크기는 일단 구체적인 제한이 제거되면 탄산 생합성의 다른 단계의 상대적 제한 효과를 결정하는 구체적인 배양 조건에 따라 달라질 수 있다. 다양한 제한 요소 사이의 상호작용에 영향을 끼치는 배양 조건으로는 세포의 유전자 구성, 배양 배지 및 기체 환경의 조성, 온도, 조명 및 공정 프로토콜이 있으며, 구체적인 배양에 첨가되는 증강제(들)는 보통 본원에 제시된 각각의 증강제의 효과를 비교하여 경험적으로 결정될 수 있는 그 배양물의 제한 요소를 고려하여 선택할 수 있다. 또한, 탄산 생산의 추가의 증가는 하나 이상의 증강제가 배양에 존재하는 경우에 달성될 수 있다.
- [0077] 본 발명에 고려되는 대표적인 증강제는 표 1에 예시되어 있다. 본 발명의 증강제는 몇가지 일반적인 종류로 논의될 것이다. 이들 종류로는 갈변방지제, 노화방지제, 항에틸렌제, 식물 성장 조절제(예; 옥신 관련 성장 조절

제), 전구체, 억제제, 유발제, 자극제 및 자스모네이트 관련 화합물이 있다.

- [0078] 본 발명에 의해 고려되는 증강제의 한가지 종류는 갈변방지제이다. 본원에서 "갈변방지제"라는 용어는 영양 배지에 첨가되어 세포 배양중에 색소의 형성을 방지하는 성분을 의미한다. 이들 색소로는 세포 성장, 생존능 및 생성물 형성에 유해한 효과를 가지는 것으로 일반적으로 관찰되는 페놀계 화합물 및 관련 화합물이 있다. 본 발명에 따른 영양 배지에 사용되는 대표적인 갈변방지제는 아스코르빈산이다. 갈변방지제는 통상 10 ppb 내지 1000 ppm의 농도 범위로 배지에 혼입될 수 있다.
- [0079] 증강제의 또 다른 종류는 노화방지제이다. 노화방지제는 노화로부터 세포를 보호하는 생물학적 또는 비생물학적 기원의 화합물이다. 그러한 작용제는 예를 들면, 노화를 촉진하는 화합물의 생산을 차단하거나, 노화 촉진 인자의 작용을 차단하거나, 라디칼 포집 활성 또는 산화방지 활성을 제공하거나 또는 다른 메커니즘에 의해 작용할 수 있다. 그러한 작용제로는 에틸렌 작용의 길항물질; 스펜트린, 스펜트미딘, 디아미노프로판 등과 같은 폴리아민 및 그 대사산물; 갈변방지제, 페놀계 화합물의 생산 억제제 및 라디칼 포집제(예; 환원된 글루타치온, 프로필 갈레이트 및 β -메르캅토에탄올아민과 같은 설프하이드릴 화합물)가 있다.
- [0080] 항에틸렌제는 에틸렌 생산 또는 에틸렌 작용을 방해하는 물질로 정의된다. 에틸렌 대사를 방해하는 항에틸렌제는 에틸렌 생합성 길항물질 및 에틸렌 작용 길항물질로서 추가로 분류할 수 있다. 에틸렌 생합성 길항물질은 에틸렌으로 이르는 생합성 경로를 방해하는 화합물인데, 억제되는 이러한 생합성 경로를 따른 효소의 예로는 ACC 합성효소, ACC 옥시다제 및 에틸렌 옥시다제가 있다. 에틸렌 생합성 길항물질의 예로는 α -아미노이소부티르산, 아세틸살리실산, 메톡시비닐글리신, 아미노옥시아세트산 등이 있다.
- [0081] 에틸렌 작용 길항물질의 예로는 은 함유 화합물, 은 착물 또는 은 이온, 이산화탄소, 1-메틸시클로프로펜, 2,5-노르보르나디엔, 트란스-시클로옥텐, 시스-부텐, 디아조-시클로펜타디엔 등이 있다. 적합한 은염으로는 질산은, 티오황산은, 인산은, 벤조산은, 황산은, 톨루엔설폰산의 은염, 염화은, 산화은, 아세트산은, 펜타플루오로프로피온산은, 시안산은, 락트산의 은염, 헥사플루오로인산은, 아질산은 및 시트르산의 3은염이 있다. 다양한 은염에 의한 탁산 생합성의 증강의 예는 실시예 10에 제시되어 있다.
- [0082] 항에틸렌제는 10 ppb 내지 1000 ppm의 수준으로 배지에 혼입시킬 수 있다. 은이 배지에 혼입되는 경우에, 그것은 900 μ M 미만, 바람직하게는 500 μ M 미만, 보다 바람직하게는 200 μ M 미만의 농도로 첨가될 수 있다. 은이 배지에 혼입되는 경우에, 그것은 10nM 이상, 바람직하게는 100nM, 보다 바람직하게는 1 μ M 및 통상은 10 μ M의 농도로 첨가된다.
- [0083] 본 발명에서 고려되는 증강제로는 식물 성장 조절제, 특히 옥신 관련 성장 조절제가 있는데, 후자의 예로는 옥신, 옥신 유사 활성을 가진 화합물 및 옥신 길항물질이 있다. 옥신 관련 성장 조절제는 통상 배지에 10^{-10} M 내지 10^{-3} M, 바람직하게는 10^{-8} M 내지 10^{-5} M의 농도로 혼입될 수 있다. 옥신 관련 성장 조절제의 가장 바람직한 예로는 1-나프탈렌아세트산, 2-나프탈렌아세트산, 1-나프탈렌아세트아미드/나프탈렌아세트아미드, N-(1-나프틸)프탈아민산, 1-나프톡시아세트산, 2-나프톡시아세트산, 베타-나프톡시아세트산, 1-나프톡시아세트아미드, 3-클로로페녹시아세트산, 4-클로로페녹시아세트산, 3-요오도페녹시아세트산, 인돌아세트아미드, 인돌아세트산, 인도일아세테이트, 인돌아세틸 로이신, 감마-(3-인돌)부티르산, 4-아미노-3,5,6-트리클로로피콜린산, 4-아미노-3,5,6-트리클로로피콜린산 메틸 에스테르, 3,6-디클로로-o-아니스산, 3,7-디클로로-8-퀴놀린카르복실산, 페닐아세트산, 2-요오도페닐아세트산, 3-요오도페닐아세트산, 2-메톡시페닐아세트산, 클로르프로팜, 4-클로로인돌-3-아세트산, 5-클로로인돌-3-아세트산, 5-브로모-4-클로로-3-인도일 부티레이트, 인돌아세틸 페닐알라닌, 인돌아세틸 글리신, 인돌아세틸 알라닌, 4-클로로인돌, p-클로로페녹시이소부티르산, 1-피레녹시벤조산, 리소포스파티드산, 1-나프틸-N-메틸카르바메이트 및 에틸-5-클로로-1H-인다졸-3-일아세테이트-3-인돌부타논산이 있다. 옥신 관련 성장 조절제의 기타 예로는 나프탈렌-2,6-디카르복실산, 나프탈렌-1,4,5,8-테트라카르복실산 2무수물, 나프탈렌-2-설폰아미드, 4-아미노-3,6-디설폰-1,8-나프탈 무수물, 3,5-디메틸페녹시아세트산, 1,8-나프탈아미드, 2,4-디클로로페녹시아세트산, 2,3-디클로로페녹시아세트산, 2,3,5-트리클로로페녹시아세트산, 2-메틸-4-클로로페녹시아세트산, 니트로페녹시아세트산, DL-알파-(2,4-디클로로페녹시)프로피온산, D-알파-(2,4-디클로로페녹시)프로피온산, 4-브로모페녹시아세트산, 4-플로오로페녹시아세트산, 2-히드록시페녹시아세트산, 5-클로로인돌, 6-클로로-3-인도일아세테이트, 5-플로오로인돌, 5-클로로인돌-2-카르복실산, 3-클로로인돌-2-카르복실산, 인돌-3-피루브산, 5-브로모-4-클로로-3-인도일부티레이트, 6-클로로-3-인도일부티레이트, 퀴놀린-2-티오글리콜산, 아미노페닐아세트산, 3-니트로페닐아세트산, 3-클로로-4-히드록시벤조산, 클로르플루레놀, 6-클로로-3-인도일 아세테이트, N-(6-아미노헥실)-5-클로로-1-나프탈렌설폰아미드 염산염, 2-클로로-3-(2,3-디클로로페닐)프로피오니트릴, o-클로로페녹시아세트산, 6,7-디메톡시-1,2-벤즈이속사졸-3-아세트산, 3-옥소-1,2-벤즈이소티아졸린-2-일아세트

산, 마스토파란, 2,3,5-트리요오도벤조산, 2-(3-클로로페녹시)프로파논산 및 메코프롭이 있다. 적합한 옥신 관련 성장 조절제의 기타 예로는 나프토인산 히드라지드, 2,4-디브로모페녹시아세트산, 3-트리플루오로메틸페녹시아세트산, 옥스인돌, 인돌-2-카르복실산, 인돌-3-락트산, 베타-(3-인돌)프로피온산, 2-브로모페닐아세트산, 3-브로모페닐아세트산, 2-클로로페닐아세트산, 3-클로로페닐아세트산, 2-메틸페닐아세트산, 3-메틸페닐아세트산, 3-트리플루오로메틸페닐아세트산, 3-메틸티오펜아세트산, 페닐프로피온산, 4-클로로-2-메틸페닐티오아세트산, 2-클로로벤조산, 3-클로로벤조산, 2,3-디클로로벤조산, 3,4-디클로로벤조산, 2,3,5-트리클로로벤조산, 2,4,6-트리클로로벤조산, 2-벤조티아졸옥시아세트산, 2-클로로-3-(2,3-디클로로페닐)프로피오니트릴, 2,4-디아미노-s-트리아진, 나프탈산 무수물, 디케굴락, 클로르플루로메틸 에스테르, 2-(p-클로로페녹시)-2-메틸프로피온산, 2-클로로-9-히드록시플루오렌-9-카르복실산, 2,4,6-트리클로로페녹시아세트산, 2-(p-클로로페녹시)-2-메틸 프로피온산, 에틸 4-(클로로-o-톨릴옥시)부티레이트, [N-(1,3-디메틸-1H-피라졸-5-일)-2-(3,5,6-트리클로로-2-피리디닐)옥시]아세트아미드, 4-클로로-2-옥소벤조티아졸린-3-일-아세트산, 2-(2,4-디클로로페녹시)프로파논산, 2-(2,4,5-트리클로로페녹시)프로파논산, 4-플루오로페닐아세트산, 3-히드록시페닐아세트산, 오르토닐, 3,4,5-트리메톡시신남산, 2-(3,4-디클로로페녹시)트리에틸아민, 인돌-3-프로피온산, 나트륨 이옥시닐, 2-벤조티아졸아세트산 및 (3-페닐-1,2,4-티아디아졸-5-일)티오아세트산이 있다.

[0084] 식물 성장 조절제의 기타 종류가 증강제로서 영양 배지에 혼입될 수도 있다. 그 예로는 N⁶-벤질아데닌, 6-[γ , γ -디메틸알릴아미노]퓨린, 키네티ن, 제아틴, N-페닐-N'-1,2,3-티디아졸-5-일우레아(티디아주론) 및 관련 페닐우레아 유도체 등과 같은 시토키닌-관련 성장 조절제 및 GA3, GA4, GA7 및 GA 유도체와 같은 지베렐린, 엽시스산 및 그 유도체, 브라시노스테로이드 및 에틸렌 관련 성장 조절제가 있다. 그러한 성장 조절제는 10⁻¹⁰M 내지 10⁻³M, 바람직하게는 10⁻⁸M 내지 10⁻⁵M의 농도로 배지에 혼입된다.

[0085] 또 다른 종류의 증강제는 전구체 또는 생합성 전구체이다. 본원에서 전구체란 용어는 세포에 의해 대사되고 혼입되어 탁솔 및 탁산으로 되는 영양 배지에 첨가되는 화합물을 기술하기 위해 사용된다. 적합한 전구체의 예로는 아세테이트, 피루베이트 등과 같은 이소프레노이드 화합물의 전구체; α -페닐알라닌, β -페닐알라닌(3-아미노-3-페닐프로피온산), 페닐이소세린, N-벤조일페닐이소세린, 벤조산, 시키미산, 글루타민, 신남산 등이 있다. 전술한 분자의 유도체 역시 전구체로서 적합하다.

[0086] 또 다른 종류의 증강제는 억제제이다. 억제제는 효소 활성 또는 기타 세포 활성을 억제하는 화합물이다. 본원에서 "대사 억제인자"란 용어는 영양 배지에 첨가되어 특이적 생합성 경로를 방해하는 화합물을 기술하기 위해 사용된다. 예를 들면, 대사 억제제는 초기 생합성 전구체에 대해 경쟁하는 상이한 경로를 차단함으로써 탁솔, 바카틴 III 또는 기타 탁산 생합성을 증강시키는데 사용될 수 있다. 이러한 종류의 특히 효과적인 증강제로는 페닐프로파노이드 대사의 억제제가 있는데, 이것은 신남산 또는 그 유도체의 합성 또는 대사를 억제할 수 있는 화합물이다. 이러한 화합물의 예로는 p-쿠마린산, 4-플루오로-DL-티로신, 4-메톡시벤조산, 3-디메틸아미노벤조산, 4-메톡시신남산, 4-니트로신남산 에틸 에스테르, 4-니트로신남알데히드, 메르캅토에탄올, 4-히드록시쿠마린, 신나밀플루오렌, 2-시아노-4-히드록시신남산, 신나밀리덴말론산, 4-디메틸아미노신남산, N-신나밀피레라진, N-트랜스-신나모일이미다졸, 2-아미노인단-2-포스폰산, 벤질히드록실아민, 프로카인, 모넨신, N-(4-히드록시페닐)글리신, 3-(4-히드록시페닐)프로피온산, 3-(2-히드록시페닐)프로피온산이 바람직하고, D-페닐알라닌, N-(2-메르캅토프로피오닐)글리신 및 그 아세트산염 착물, DL-메타플루오로페닐알라닌, p-플루오로-이-페닐알라닌, 디티오프레이톨, 4-플루오로신남산, 트랜스-3,4-디클루오로신남산, 3,4-디플루오로-D-페닐알라닌, 디에틸디티오카르바산, 4-플루오로-(1-아미노-2-페닐에틸)포스폰산, 3,4-메틸렌디옥시벤조산이 보다 더 바람직하고, 3,4-메틸렌디옥시-6-니트로신남산, 3,4-메틸렌디옥시신남산, 3-[3,4-메틸렌디옥시페닐]프로피온산, 3,4-메틸렌디옥시페닐아세트산, 4-플루오로-L-페닐알라닌, 4-히드록시페닐피루브산, 4-플루오로-DL-티로신, 트랜스 3,4-디메톡시신남산, 페닐프로피올산, L-2-히드록시-3-페닐프로피온산, 2-히드록시-4,6-디메톡시벤조산, SKF-525A (α -페닐- α -프로필벤젠아세트산의 2-(디에틸아미노)에틸 에스테르), 비닐이미다졸, 옥살산암모늄, 시남산 및 1-아미노벤조트리아졸 및 관련 유사물이 가장 바람직하다. 배지내에 혼입될 때, 억제제는 10 ppb 내지 1000 ppm, 바람직하게는 100 ppb 내지 100 ppm, 보다 더 바람직하게는 1 ppm 내지 50 ppm의 농도로 첨가된다.

[0087] 세포 배양에서 탁솔, 바카틴 III 및 기타 관련 탁산의 수율을 향상시키기 위해서, 본원 발명자들은 다수의 연구를 수행하였다. 생산성 증가에 사용된 방법중 한 가지는 소위 유발제를 사용한 것이다. 본원에서 유발제란 식물 또는 식물 세포 배양에 첨가될 때 2차 대사산물 생산의 증가를 일으키는 생물학적 및 비생물학적 기원의 화합물에 대해 사용된다(Eilert 1987, "Cell Culture and Somatic Genetics of Plants," 제4권, F. Constabel and I.K. Vasil(편집), Academic Press, New York, 153-196면; Ebel, 1984, Bioregulators: Chemistry and

Uses. 257-271; and Darvill 등, 1984, Ann. Rev. Plant Physiol., 35, 243-275). 다수의 상이한 화합물이 그 기원의 성질 및 세포 대사와의 그 작용 방식에 따라 유발제로서 작용할 수 있다. 이러한 연구에서, 본원 발명자들은 두 가지의 주요한 종류의 유발제를 사용하였다: 1) 진균류, 박테리아 및 효모 중에서 선택된 그룹에서 유래한 세포벽 추출물 또는 여과물을 통상 함유하는 생물 유발제, 2) 생물학적 기원의 일부 화합물 뿐만 아니라 화학적 자극제를 포함한 비생물 유발제(표 1에 나열한 유발제 참조). 또한, 중금속을 함유하는 염 및 복합체는 효과적인 비생물 유발제로 간주될 수도 있다. 그 예로는 코발트, 니켈, 란탄, 셀레늄, 바나듐, 납, 카드뮴, 크롬, 알루미늄, 요오드, 바륨, 비스무트, 리튬, 루비듐, 스트론튬 및 금이 있다. 유도를 매개하는 특정 화합물, 예를 들면, 후술하는 자스모네이트 관련 화합물 역시 유발제로 간주될 수 있음을 주목하여야 한다.

[0088] 크리스텐 등(1991)은 탁수스 브레비폴리아의 현탁액에 의한 탁솔 생산을 위해 진균류 유발제 및 선택된 화합물의 사용에 대해 보고하고 있으나, 유발제 처리로 인한 탁솔 축적 레벨의 증가가 명시되어 있지 않다.

[0089] 일반적으로 생물 및 비생물 유발제 둘다 효과적이지만, 유도(세포 배양에서의 탁산 축적 및 배지내로의 그 분비)가 일어난 정도는 유발제마다, 그리고 종마다 상이하였다. 최고의 생산량 증가는 키토산 글루타메이트, 리케난, 페룰산 및 벤조산을 사용한 경우에 얻어졌다. 키토산 및 리케난은 미생물의 세포벽에서 유래한 복합 다당류이다. 단독으로 사용할 때 키토산은 배지에 불용성이며 독성이 있고 영구적인 세포 손상을 일으킨다. 한편, 키토산 글루타메이트는 배지에 용이하게 용해될 수 있고, 세포 생존성에 영향을 끼치지 않는다. 페룰산 및 벤조산은 생물학적 기원의 합성 화합물이며, 일반적으로 생물계에서 산화방지제로서 사용된다.

[0090] 유발제 및 대사 자극제는 본 발명에 따라 이용하여 배양 기간 및 배지 조성의 함수로서 유발제의 특이성 및 농도, 시기 선택 및 지속시간을 평가함으로써 탁솔, 바카틴 III 및 총 탁산 생산 및 조직 배양에서의 분비를 최대화할 수 있다.

[0091] 본 발명에서 고려되는 또 다른 종류의 증강제는 자극제이다. 본원에서 자극제란 영양 배지에 첨가되어 특이적 생합성 경로를 자극 또는 활성화하는 화합물, 예를 들면, 생합성을 유도하는 화합물을 기술하는데 사용된다.

[0092] 자스모네이트 관련 화합물은 유도 반응을 매개하여 2차 대사산물 생합성을 자극하는 화합물의 종류이다. 자스모네이트 관련 화합물의 예로는 자스몬산과 메틸 자스모네이트, 에틸 자스모네이트, 프로필 자스모네이트, 부틸 자스모네이트, 펜틸 자스모네이트, 헥실 자스모네이트와 같은 자스몬산의 알킬 에스테르; 디히드로자스몬산과 메틸 디히드로자스모네이트, 에틸 디히드로자스모네이트, n-프로필 디히드로자스모네이트, 부틸 디히드로자스모네이트, 펜틸 디히드로자스모네이트, 헥실 디히드로자스모네이트와 같은 디히드로자스몬산의 알킬 에스테르; 에피메틸 자스모네이트, 플루오로메틸 자스모네이트, 시스-자스모네이트, 이소자스몬, 테트라히드로자스몬, 12-옥소피토티에논산, 디히드로자스몬, 자스모닐 아세테이트, 아프리톤, 아밀시클로펜테논, 헥실시클로펜테논, 헥실시클로펜타논 및 관련 유도체 및 유사물이 있다. 자스모네이트 관련 화합물은 $10^{-9}M$ 내지 $10^{-3}M$, 바람직하게는 $10^{-6}M$ 내지 $5 \times 10^{-4}M$, 보다 더 바람직하게는 $10^{-5}M$ 내지 $2 \times 10^{-4}M$ 의 농도로 배지에 혼입된다. 1종 이상의 자스모네이트 관련 화합물이 영양 배지에 혼입될 수 있음을 주목하여야 한다. 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자스모네이트 관련 화합물, 옥신 관련 성장 조절제, 전구체 및 기타 영양물과 같은 증강제의 농도는 이들 화합물이 배양물에서 대사됨에 따라 변화할 것임이 인지될 것이다. 달리 나타내지 않으면, 본원에 인용된 농도는 영양 배지중의 초기 농도를 의미한다.

[0093] 다음 종류의 증강제의 2종 이상의 증강제를 배합하면, 단독으로 사용하는 임의의 작용제에 대해 관찰된 최대 증강도를 초과하여 탁수스 세포에 의한 탁산 생산을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 종류의 증강제는 유발제, 자스모네이트 관련 화합물, 에틸렌 작용 억제제, 페닐프로파노이드 대사의 억제제, 노화방지제, 전구체 및 옥신 관련 성장 조절제다. 그러므로, 바람직한 양태로 본 발명은 2종 이상의 상기 작용제로부터 선택된 증강제의 존재하에 탁수스종의 세포를 배양하여 1종 이상의 탁산의 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0094] 탁산 생산을 위한 바람직한 방법은 1종 이상의 다른 증강제와 함께 에틸렌 작용의 기본형 억제제와 은을 사용하며, 특히 바람직한 방법에서 기타 작용제는 메틸 자스모네이트 또는 페닐프로파노이드 대사의 억제제(예; 3,4-메틸렌디옥시니트로신남산)이다.

[0095] 서로 조합하여 사용할 경우에, 자스모네이트 관련 화합물 및 에틸렌 작용 억제제는 서로에 대해 특정의 비율로 영양 배지에 혼입될 수 있다. 예를 들면, 메틸 자스모네이트 및 티오황산은 함께 사용할 경우에, 은 이온에 대한 메틸 자스모네이트의 몰비는 0.0001 내지 9.5, 바람직하게는 0.001 내지 8, 보다 더 바람직하게는 0.1 내지 7, 가장 바람직하게는 1 내지 5의 범위를 가질 수 있다.

- [0096] 서로 조합하여 사용할 경우에, 옥신 관련 성장 조절제와 에틸렌 작용 억제제는 서로에 대해 특정의 비율로 영양 배지에 혼입시킬 수 있다. 예를 들면, 옥신 관련 성장 조절제와 티오황산은을 함께 사용할 경우에, 은 이온에 대한 옥신 관련 성장 조절제의 몰비는 0.011 내지 1000, 바람직하게는 0.015 내지 100, 보다 더 바람직하게는 0.02 내지 50, 가장 바람직하게는 0.05 내지 30의 범위를 가질 수 있다.
- [0097] 일반적으로, 탁산 생산을 위해 탁수스 세포를 배양할 경우에, 1종 이상의 옥신 관련 성장 조절제를 배양 배지에 첨가한다. 옥신 관련 성장 조절제(들)의 존재는 세포 성장을 촉진하나, 보다 더 중요하게는 배양에 의한 탁산의 생산을 증가시킨다. 추가의 증가는 옥신 관련 성장인자와 동시에 1종 이상의 기타 증강제를 첨가하여 얻을 수 있다.
- [0098] 본 발명의 바람직한 일 양태에서는, 1종 이상의 탁산 생산을 증강제(들)의 부재하의 생산 레벨과 비교하여 3배 이상, 바람직하게는 5배 이상, 보다 더 바람직하게는 10배 이상, 더욱 더 바람직하게는 30배 이상 증가시키기에 충분한 양으로 1종 이상의 증강제를 배양물에 첨가한다. 본 발명의 또 한 가지 바람직한 양태에서는, 탁솔의 부피 생산성을 10mg/L/일 이상, 보다 바람직하게는 15mg/L/일 이상, 보다 더 바람직하게는 22mg/L/일 이상으로 증가시키기에 충분한 양으로 1종 이상의 증강제를 배양물에 첨가한다. 본 발명의 또 다른 바람직한 양태에서는, 탁솔의 전체 브로스 역가를 150mg/L 이상, 보다 바람직하게는 200mg/L 이상, 보다 더 바람직하게는 350mg/L 이상으로 증가시키기에 충분한 양으로 1종 이상의 증강제를 배양물에 첨가한다. 본 발명의 또 한 가지 바람직한 양태에서는, 바카틴 III의 부피 생산성을 15mg/L/일 이상, 보다 바람직하게는 20mg/L/일 이상, 보다 더 바람직하게는 25mg/L/일 이상으로 증가시키기에 충분한 양으로 1종 이상의 증강제를 배양물에 첨가한다. 본 발명의 또 다른 한 가지 바람직한 양태에서는, 바카틴 III의 전체 브로스 역가를 100mg/L 이상, 보다 바람직하게는 150mg/L 이상, 보다 더 바람직하게는 250mg/L 이상으로 증가시키기에 충분한 양으로 1종 이상의 증강제를 배양물에 첨가한다. 본 발명의 또 한 가지 바람직한 양태에서는, 탁산의 부피 생산성을 15mg/L/일 이상, 보다 바람직하게는 25mg/L/일 이상, 보다 더 바람직하게는 40mg/L/일 이상으로 증가시키기에 충분한 양으로 1종 이상의 증강제를 배양물에 첨가한다. 본 발명의 또 다른 바람직한 양태에서는, 탁산의 전체 역가를 200mg/L 이상, 보다 바람직하게는 300mg/L 이상, 보다 더 바람직하게는 400mg/L 이상으로 증가시키기에 충분한 양으로 1종 이상의 증강제를 배양물에 첨가한다.
- [0099] 상기에 증강제로 기술한 다수의 화합물은 다른 식물 시스템에도 사용되었다. 이들 비탁수스 시스템에서의 제형화, 투여 및 적합한 생리적 농도 레벨은 본 발명에 따라 이들 작용제를 이용하는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 지침을 제공한다.
- [0100] **세포 재료**
- [0101] 본 발명의 방법에서 배양에 적합한 세포는 모든 탁수스 종으로부터 유래할 수 있다. 이들 세포는 본래 비교적 고수율로 탁산을 생산하는 세포주로부터 유래한 것이 바람직하다. 통상, 그러한 세포는 표준 조건하에서 1종 이상의 고수준의 탁산을 생산하거나 또는 표준 조건하에서 탁산의 높은 평균 부피 생산성을 나타내는 능력을 가진다. 적합한 세포주는 표준 탁산 생산 조건하에서 세포주의 세포를 배양하고, 배양물에 생산된 1종 이상의 탁산 레벨을 관찰하거나 또는 다음과 같은 절차에 의해 배양물에서 1종 이상의 평균 부피 생산성을 측정함으로써 동정될 수 있다.
- [0102] 생산 배양 시험 절차에 사용하기 위한 세포는 특정 세포주에 적용되는 적합한 배지에서 증식된다. 대수 증식기의 완료후, 세포의 분취물을 탁산의 시험 생산을 위해 배양한다. 생산 배양은 일반적으로 액체 배지에서 실시할 수 있지만, 고체 배지상의 칼루스 배양물을 사용할 수도 있다. 생산 배양에서, 세포는 표 2의 배지에서, 슈크로스를 7%(w/v) 말토스로 대체한 표 2의 배지 N에서, 또는 특정 세포주의 성장 및 유지에 대해 최적화된 영양 배지에서 배양한다. 생산 배양에서, 세포밀도는 습윤 중량을 기준으로 15% 내지 20%(w/v)의 범위를 가져야 한다. 세포는 암실 조건하에서 25°C ± 2°C에서 10일 내지 20일 동안 배양한다. 액체 배양물은 예를 들면 120 rpm 내지 180 rpm의 회전식 진탕기상에서 적당히 교반 및 통기시켜야 한다.
- [0103] 세포주 특성을 평가하기 위한 생산 배양물은 적합한 증강제를 포함한다. 일반적으로, 6개의 또 다른 증강 각테일(5개의 증강제까지의 조합물)이 각 세포주에 대해 시험된다. 이 조합물은 하기 표 A에 제시한다.
- [0104] 배양의 말기에, 배양물의 각각의 탁산의 역가는 본원에 기술한 대로 실시되는 ELISA 분석법으로 측정하거나, 배양물에서 생산된 탁산 프로필은 실시예 5에 기술한 바와 같이, HPLC 분석에 의해 측정할 수 있다. 바람직한 세포주는 1종 이상의 증강 각테일내 최소 표적 탁산 레벨 이상으로 1종 이상의 탁산을 생산할 수 있다. 바람직한

세포주는 하나 이상의 증강 각테일 및 보다 더 바람직하게는 두 개 이상의 증강 각테일에 대한 역가 및 생산성 둘다에 대한 표적 레벨을 초과할 수 있다. 적합한 세포주에 대한 생산 배양의 말기에서의 최소 표적 탁산 역가는 100mg/L 탁산 이상이 될 것이다. 한편, 생산 배양의 과정에 걸쳐서 최소 평균 부피 생산성은 10mg/L/일의 탁산이 될 수 있다. 보다 더 바람직한 세포주는 생산 배양의 말기에 100mg/L의 탁솔 또는 200mg/L의 바카틴 II의 최소 탁산 역가를 얻거나 또는 생산 배양의 과정에 걸쳐 10mg/L/일의 탁솔 또는 15mg/L/일의 바카틴 III의 평균 부피 생산성을 얻을 수 있다.

[0105] [표 A]

[0106] 증강 각테일

[0107] 증강제의 조합

[0108] 1. 20 μM Naa + 30 μM Mdna

[0109] 2. 20 μM Naa + 30 μM Mdna + 50 μM Slts

[0110] 3. 20 μM Naa + 30 μM Mdna + 89 μM Mjs

[0111] 4. 20 μM Naa + 30 μM Mdna + 89 μM Mjs + 50 μM Slts

[0112] 5. 20 μM Naa + 30 μM Mdna + 89 μM Mjs + 50 μM Slts + 5mM Gln

[0113] 6. 20 μM Naa + 89 μM Mjs + 50 μM Slts

[0114] Gln= 글루타민, Naa= 1-타프탈렌아세트산 Mdna= 3,4-메틸렌디옥시-6-니트로신남산, Mjs=메틸 자스모네이트, Slts= 티오황산은.

[0115] 다양한 종에 대한 적합한 생산 배지를 표 5에 나열하였지만, 다른 것을 사용할 수도 있다. 예를 들면, 표 2의 배지 B, C 및 N이 탁수스 키넨시스에 대해 특히 적합한 생산 배지이다. 배지는 표 2에 나열한 성분들을 함유하는 것이 바람직하다. 이들 배지는 주요 및 소량 무기염, 유기 화합물 및 성장 호르몬 또는 성장 조절제를 일반적으로 표 2에 나타난 각각의 배지 성분의 농도의 1/10 내지 3배 농도의 양으로 함유하는 것이 바람직하다. 배지 B 또는 N을 사용하는 경우에, 성장 조절제는 배지에 통상 0.1 ppm 내지 20 ppm, 바람직하게는 1 ppm 내지 10 ppm의 양으로 혼입된다. 배지 C 또는 N을 사용하는 경우에, 성장 조절제는 0.1 ppm 내지 5 ppm의 수준으로 혼입되는 것이 바람직하다.

[0116] 본 발명의 범위내에서 본원에 기술한 배지에 변형을 가할 수 있는데, 그 예로는 다른 통상의 조성물(예; 유기 화합물, 비타민, 아미노산, 전구체, 활성화제 및 억제제)의 치환, 다양한 성분(예; 성장 조절제)의 첨가 또는 결실 또는 비율의 변경이 있으며, 그러한 변형으로 인해 표 2의 배지에 대해 관찰된 것과 동일하거나 더 양호한 성장 및 탁산 생산을 달성할 수 있다는 것은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 이해될 것이다.

[0117] **공정 조작 방식**

[0118] 식물 세포 배양 공정의 조작 방식은 영양물, 세포 및 생성물을 시간에 따라 첨가하거나 제거하는 방식을 의미한다(Payne 등, 1991 문헌 참조). 모든 영양물을 초기에 공급하고, 세포 및 생성물을 함유하는 배양 내용물을 배양 기간의 말기에 수집하는 경우에 조작 방식은 "일단계 배치식 공정"이라 지칭한다. 배치식 공정을 두 단계 사이에서 배지가 교환되는 두 개의 연속 단계, 즉 성장 단계와 생산 단계로 나누는 경우, 조작 방식은 "이단계 배치식 공정"이라 지칭한다. 본발명의 범위내에서, 성장 배지로부터 생산 배지로의 전환은 갑작스런 단계적 변화에 의해 또는 일련의 연속 단계에 의해 점진적으로 또는 점진적인 변화에 의해 발생할 수 있다. 한 가지 극단적인 경우에, 점진적인 변화는 조성을 일정량씩 변화시키면서 배지를 점진적으로 대체함으로써 이루어진다. 또 다른 경우에, 점진적인 변화는 1종 이상의 생산 배지 성분을 성장 단계 배양으로 공급함으로써 이루어진다. 이것이 공급 배치 공정의 일례이다.

[0119] "공급 배치" 조작 방식에서, 영양물 및(또는) 1종 이상의 증강제와 같은 구체적인 배지 성분은 배양 과정중에 주기적으로 또는 연속적으로 공급된다. 특정 성분은 배치식 방식에서 초기에 영양 배지에 혼입될 수 있고, 그 다음 공급 배치 방식으로 첨가되거나 또는 공급 배치 방식으로만 영양 배지에 첨가될 수도 있다는 것을 주목하

여야 한다.

- [0120] 공급 배치 방식을 사용하여, 세포를 지속적인 기간 동안 생산적인 상태로 유지될 수 있고, 실제로 세포의 생산성이 증가될 수 있음을 확인하였다. 실시예 15 및 17, 표 16 및 18에 예시한 바와 같이, 특정의 영양물 및 증강제를 공급 배치 방식으로 첨가하여 일반적으로 탁산에 대해서, 및 탁술 및 바카틴 III과 같은 특이적인 탁산에 대한 전체 실행도의 상당한 향상을 얻었다. 또한, 이 조작 방식은 다수의 상이한 배치 조건하에 다양한 상이한 세포주에 적합한 것으로 확인되었다.
- [0121] 성분들의 공급 배치식 첨가는 특정 성분의 농도가 배양물에서 저수준으로 유지되어야 할 경우에, 예를 들면 기질 억제계의 효과를 방해하여야 할 경우에 특히 유리하다. 유사하게, 공급 배치식 첨가는 초기에 배양 배지에 첨가하거나 또는 화학량론적 양의 성분을 용해도 또는 독성 제한으로 인해 첨가할 수 없는 경우, 세포가 성분에 부정적으로 반응할 경우에 유리하다. 또한, 임의의 성분을 함유하는 공급 용액의 연속적인 또는 계속적인(주기적인) 공급 배치식 첨가는 펄스 첨가와 같은 보다 신속한 방법으로 첨가되는 경우에 세포가 성분에 부정적으로 반응할 경우에 특히 바람직하다. 공급 배치식으로 첨가될 때 세포가 양호하게 반응하는 특정 성분으로는 알파-페닐알라닌 및 베타-페닐알라닌과 같은 탁산 전구체; 말토스, 프럭토스 및 글루코스와 같은 탄소원; 글루타민, 클루탐산, 아스파르트산과 같은 아미노산; 인산염, 칼슘 및 마그네슘과 같은 다량 영양물; 육신 관련 성장 조절제 및 자스모네이트 관련 화합물과 같은 증강제가 있다.
- [0122] 공급물의 조성은 탁산 수율을 증가시키기 위한 생산 단계의 연장 또는 보다 높은 생물량 밀도를 얻기 위한 성장 단계의 연장과 같은 목적하는 결과를 얻기 위해 변화될 수 있음은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 사항이다. 최적 생산성 및 실행성을 얻기 위한 적합한 조건의 선택은 본원에 기술한 개시 사항을 고려하면 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 용이한 일이다. 유사하게, 목적하는 결과를 얻기 위한 공급 배치 성분의 첨가의 시기 및 기간과 첨가의 속도와 같은 다른 조작 매개변수의 변형은 본원에 기술한 개시사항을 고려하면 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 용이한 일이다.
- [0123] 본원에 기술한 배지의 교환은 배양물로부터 소모된 배지를 제거하고 새로운 배지를 배양물에 첨가하는 것을 의미하는데, 세포들은 주로 조작중에 배양물에 보유된다. 본 발명의 방법에서, 배지 교환 작업은 고 부피 생산성의 탁산 생산을 얻고 유지하여 배치식 공정에 비해 우수한 공정 실행성 및 전체 생산 수준을 얻는 유익한 방법이다. 그러한 작업으로부터 생성되는 세포의 생성물은 다른 공정 방식보다 더 용이한 다운스트림 회수 및 정제에 적합할 수 있다.
- [0124] 실시예 14 및 표 15에 예시한 바와 같이, 배지 교환은 일반적으로는 탁산에 대해서, 및 탁술, 바카틴 III 및 10-데아세틸바카틴 III와 같은 특이적 탁산에 대해 고생산성을 유지하는데 성공적이다. 또한, 이러한 조작 방식은 일반적으로는 탁산에 대해서, 및 탁술 및 바카틴 III와 같은 특이적 탁산에 대해서 배치식 조작에 비해 부피 생산성의 증가를 가져왔다. 또한, 이러한 조작 방식은 다양한 상이한 배치 조건하에서 다양한 상이한 세포주에 적합하다. 실시예 7.3에 더 상세히 예시하는 바와 같이, 3일 마다의 소모된 배지의 제거 및 새로운 배지의 보충은 성장 조건에서 탁산 및 탁술 생산의 상당한 증가, 및 세포의 생성물의 양의 증가를 가져왔다.
- [0125] 배지 교환의 자극적인 효과는 동일계 생성물의 제거로 인한 것일 수 있는데, 그 제거는 피드백 억제 및 생성물 분해를 방지할 것이다. 현탁 배양에서 동일계 생성물의 제거가 2차 대사산물 생산 및 분비에 미치는 그러한 양의 효과는 로빈스 및 로데스(Robins and Rhodes, 1986, Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 35-41) 및 아사다 및 쉐러(Asada and Shuler, 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 475-481)에 의해 보고되었다. 소모된 배지의 주기적인 제거는 상기의 장점을 포함하며, 또한 다른 비탁산 억제 성분(예; 페놀계 화합물)을 배지로부터 제거함으로써 2차 생산성의 억제를 해제하는 작용을 할 수 있다.
- [0126] 활발한 생합성을 하고 있는 세포에 새로운 배지를 보충하면 고갈된 필수 영양물을 제공함으로써 생산을 증가시킬 수도 있다. 예를 들면, 미야사카 등(Miyasaka 등, 1986, Phytochemistry, 25, 637-640)은 슈크로스를 배지에 단순히 첨가함으로써 살비아 밀티오리자(*Salvia miltiorhiza*)의 정지상 세포를 자극하여 디테르펜 대사산물, 크립토탄닌 및 페루기놀을 생산할 수 있었다. 아마도, 생합성은 정지상에서 탄소 제한으로 인해 중단되었다. 본 연구에서 사용된 주기적 배지 교환 프로토콜은 상기 요소중 임의의 요소의 결과로서 유익할 수 있었다. 교환된 배지의 양, 교환의 빈도 및 보충되는 배지의 조성을 변화시킬 수 있음이 이해될 수 있다. 배지 교환에 의해 생합성 및 분비를 자극하는 능력은 연속적, 반연속적 또는 공급 배치 방식으로 효율적인 상업적 공정의 설계 및 조작에 중요한 의미를 가진다.
- [0127] 계속된 세포 성장 및 생산을 위해 새로운 배지를 첨가하여 배치식 배양의 내용물의 실질적인 부분(그러나 모든

부분은 아님)을 수집할 경우, 공정은 "반복적인 배출 및 충전" 조작과 유사하여 "반연속적 공정"으로 지칭된다. 새로운 배지를 연속적으로 공급하고 유출 배지를 연속적으로 제거할 경우에, 공정은 "연속적"으로 지칭된다. 세포가 반응기내에 보유되는 경우, 공정은 "관류 방식"으로 지칭된다. 세포가 유출 배지와 함께 동시에 제거되면 연속 공정은 "케모스타트"로 지칭된다.

[0128] 이러한 다양한 공정 조작 방식은 본원에 기술한 탁산 생산 시스템에 적합하다는 것을 이해하여야 한다.

[0129] [실시예]

[0130] 다음 실시예는 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있는 재료 및 방법을 상세히 설명하기 위해 제시하는 것이다. 이들 실시예는 예시를 목적으로 하며 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0131] **실시예 1: 칼루스 창시**

[0132] 다수의 야생 및 경작 식물로부터 탁수스 식물 재료 샘플을 채집하였다. 샘플을 실험실에 도착하자마자 처리하거나 또는 사용할 수 있을 때까지 4°C에서 보관하였다.

[0133] 재료를 희석 비누 용액에서 세척하고, 물에 행구고 표면을 클로록스(CLOROX) 용액(1% 차아염소산염, pH 7)에서 10분 동안 멸균하였다. 멸균 조건하에서, 재료를 멸균수로 3회 행구었다. 침엽을 100mg/1의 아스코르빈산을 함유한 1% 폴리비닐피롤리돈(PVP)에서 절단하였다. 침엽의 절단된 단부를 배지 E(표 2)에 넣었다. 배지 평판 당 30개 내지 40개의 이식 조직을 배양하였다. 이식 조직을 함유하는 평판을 암실에서 25°C±1°C로 향한 배양하였다. 평판을 매일 오염성 미생물의 출현에 대해 모니터링하고, 그 미생물이 존재하는 경우에는 비오염된 침엽을 떼어내서 배지 E의 새로운 평판에 넣었다. 상당한 칼루스 형성이 관찰되었고, 칼루스를 20일째에 이식 조직으로부터 분리하여 표 3에 나열한 다양한 칼루스 증식 배지에 넣었다. 예를 들면, 탁수스 키넨시스의 칼루스는 배지 D(표 2 참조)로 옮겨졌다. 이러한 개시 과정은 매우 효율적이었고, 낮은 오염률 및 90% 이상의 개시된 이식 조직에서 높은 칼루스 유도 횟수를 나타내었다. 동일한 절차를 사용하여 탁수스 브레비폴리아, 탁수스 카나덴시스, 탁수스 쿠스피다타, 탁수스 마카타, 탁수스 글로보사, 탁수스 플로리다나, 탁수스 왈리치아나, 탁수스 미디어 및 탁수스 키넨시스의 배양을 개시하였다.

[0134] **실시예 2: 칼루스 증식**

[0135] 칼루스를 일단 이식 조직으로부터 제거하면, 그것을 암실내 25°C±1°C에서 배양하였다. 칼루스의 건강한 부분은 7일 내지 10일마다 새로운 배지로 옮겨졌고, 이 이동 횟수는 갈변을 예방하고 칼루스를 오래 유지하는데 매우 중요한 것으로 확인되었다. 다양한 종의 칼루스에 대한 바람직한 성장 및 발육 배지는 표 3에 요약하였다.

[0136] **실시예 3: 현탁물 창시**

[0137] 습윤 중량 1g의 칼루스 재료를 각각의 종에 적합한 액체 배지(표3 참조) 25ml을 함유하는 125ml 들이의 얼렌마이어 플라스크내로 무균 접종하였다. 예를 들면, 탁수스 키넨시스에는 배지 D를 사용하였다. 플라스크는 실리콘 발포 캡(뉴저지주 벨코)으로 덮고, 어둠 속에서 24°C±1°C에서 120 rpm으로 회전 진탕기에 넣었다. 현탁 배양물이 약 3일 내지 10일내에 형성되었다. 초기에, 미라클로스 필터(칼바이오캡)를 포함하는 부호너 깔때기를 통해 플라스크 내용물을 흡입 여과하여 배지를 교환하고, 모든 생물량을 새로운 배지에 재현탁하였다. 세포 성장시에, 1g 내지 2g(습윤 중량)의 세포는 일반적으로 새로운 배지 25ml을 함유하는 새로운 125ml의 플라스크에 옮겨지고, 일주일마다 계대배양하였다.

[0138] **실시예 4: 현탁 세포의 성장**

[0139] 대표적인 종의 현탁 배양에서 얻어진 대표적인 성장률 및 세포 밀도는 표 4에 나열한다.

[0140] 상세한 예로서, 탁수스 키넨시스 세포주 K-1에 대한 시간에 따른 생물량(습윤 중량 및 건조 중량)의 증가는 도 1에 도시되어 있다. 성장 곡선상에서 가장 신속한 생물량 증가 지점에서의 기울기를 취하여 최대 성장률을 측정하였다. 탁수스 키넨시스의 세포 배양물은 2.5일의 최대 배가 시간에서 성장하였다. 이 성장률은 탁수스종의 현탁 배양에 대해 종래 보고된 값보다 상당히 더 높은 값이다. 예를 들면, 크리스텐 등(Christen 등, 199

1)은 3주 내지 4주 동안 배양한 후 5배 내지 10배의 생물량이 증가한 것으로 보고하고 있는데, 이는 탁수스 브레비폴리아 현탁에 대한 평균 배가 시간이 7일 내지 12일인 것으로 바꾸어 말할 수 있다.

[0141] 세포를 고밀도로 배양하는 능력은 세포 배양 공정의 부피 생산성을 최대화하는데 중요하다. 탁수스 브레비폴리아의 배양물이 리터당 1g 미만의 건조중량(크리스텐 등의 상기 문헌(1991)에 제시된 데이터로부터 계산)의 세포 밀도를 나타낸 반면, 탁수스 키넨시스의 현탁액은 18일간의 성장후에 리터당 8g 내지 20g의 건조 중량의 밀도에 도달할 수 있었다. 세포의 생존율은 아세트산중의 0.05% 플루오레세인 디아세테이트 용액으로 세포를 염색하고 (Widholm, 1972, Stain Technol., 47, 189-194), 역상 형광현미경(올림푸스 IMT-2, 일본)에서 청색광으로 여기시킬 때 녹색의 형광을 내는 세포수를 계수함으로써 측정하였다. 세포 생존율은 성장기 전체를 통해 90% 이상이었다.

[0142] 높은 생존율을 유지하면서 신속한 성장 조건하에서 세포를 고밀도로 배양하는 능력은 탁솔, 바카틴 III 및 탁산의 생산을 위한 식물 세포 배양 방법의 경제적인 조건의 중요한 선결 조건이다.

[0143] **실시예 5: 탁솔, 바카틴 III 및 기타 탁산**

[0144] **5.1 ELISA 방법**

[0145] 세포 배양 추출물내 탁솔의 검출에는 ELISA 분석법(하와이 바이오텍 #TA-01)을 사용하였다(Grothaus 등, 1995 참조). 이 방법은 높은 감도(0.1 ng/ml)를 제공하지만, 다클론 항체를 사용하기 때문에 다른 탁산과의 교차 반응성이 관찰된다. 분획 집합물을 예비(분석용 규모) HPLC한 결과 10-테아세틸탁솔, 7-크실로실-1-테아세틸탁솔, 세팔로만닌, 10-테아세틸-7-에피탁솔, 7 에피탁솔, 및 기타 미확인 탁산과의 교차 반응성이 나타났다. 이러한 교차 반응성에도 불구하고, 이 방법은 탁산 생산의 검출에 매우 유용하고, 다수의 세포주에 신속하게 검색할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 상당한 탁산 생산을 나타내는 세포 추출물은 하기에 요약하는 HPLC 절차를 사용하여 상세히 분석하였다.

[0146] 세포 배양 추출물에서의 탁솔의 검출에는 단일클론 ELISA 분석법(하와이 바이오텍 #TA-02)을 사용하기도 하였다. 이러한 방법은 높은 감도(0.1ng/ml) 및 상당히 더 낮은 교차 반응성을 제공한다.

[0147] **5.2. 탁솔, 바카틴 III 및 기타 탁산의 추출**

[0148] 상청액으로부터 탁산을 추출하는 것은 존재하는 농도에 따라 여러 가지 방법으로 실시하였다. 충분한 양의 탁산(대략 1mg/L 내지 5mg/L)이 액체 배지에 존재하는 경우에, 샘플은 신속하고 효과적으로 준비되었다. 배지(2 ml)는 완전히 건조되었고(진공에서), 일정량의 메탄올(0.5ml 내지 2.0ml)을 첨가하였다. 이 혼합물을 초음파로 교반하여 샘플이 완전히 용해 또는 분산되도록 하였다. HPLC 분석전에 원심분리하여 고체를 제거하였다. 0.1 mg/L 이하의 검출 레벨로 1mg/L의 수준으로 정량적 회수가 이루어졌다.

[0149] 배양 상청액중의 탁산의 농도가 매우 낮은 경우(1mg/L 미만)에, 배지를 동일한 부피의 염화메틸렌과 이소프로필 알코올(IPA)의 혼합물(9:1 부피비)의 혼합물로 3회 추출하였다. 유기층을 건조시켜 감소시키고, 일정량의 메탄올(50ml 내지 250ml) 중에서 재구성하였다. 다회 추출은 통상 0.6mg/L 수준의 탁솔, 세팔로만닌 및 바카틴 III 의 90% 내지 95%를 회수하였다.

[0150] 상청액내 탁산의 농도가 5mg/L을 초과하는 경우에, 보다 신속히 샘플을 제조하였다. 1부(부피)의 상청액을 0.1% 아세트산을 함유하는 3부(부피)의 메탄올과 혼합하였다. 이 혼합물을 30분 동안 음파처리하고, 여과하고, HPLC에 의해 분석하였다.

[0151] 전체 브로스(세포를 함유하는 배양 상청액)의 샘플을 전술한 것과 유사한 방법을 사용하여 제조하였다. 전체 브로스 1부(부피)를 0.1% 아세트산을 함유하는 3부(부피)의 메탄올과 혼합하였다. 이 혼합물을 30분 동안 음파처리하고, 추가 30분 동안 정지시키고, 여과하고, HPLC로 분석하였다.

[0152] 새로이 수확된 세포를 동결시키고(-5°C), 진공 건조시키고, 메탄올로 50회 속슬레법을 수행하여 세포 재료를 추출하였다. 메탄올의 부피를 회전 증발에 의해 감소되었고(100배까지), 생성된 샘플은 HPLC로 분석하였다. 70% 내지 80%의 탁산이 일반적으로 10% 내지 15%의 측정가능한 분해율로 회수되었다. 속슬레 처리전 샘플을 배기성 건조하는 것은 5% 미만의 탁솔 분해를 초래하는 것으로 추후에 확인되었다.

[0153] 고체 배지 및 칼루스의 추출은 탁산 레벨이 낮은 경우의 세포의 추출과 동일하게 수행하였으나, 최종 메탄올 추출물의 염화메틸렌/IPA 대 물의 분배는 항상 실시하였다. 탁산 수준이 5mg/L을 초과하는 경우에, 전체 브로스

추출 방법을 이용하여 고형화된 배지상에 칼루스 샘플을 제조하였다.

[0154] 5.3. 고성능 액체 크로마토그래피 방법

[0155] 분석용 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 LDC 분석 2중 구배 고압 혼합 시스템을 사용하여 다량의 탄소가 적재된 디페닐칼럼(슈펠코, 5mm, 4.6mm×25cm)상에서 수행하였는데, 여기서, 상기 혼합 시스템은 CM3500/CM3200 펌프, CM4100 가변 부피 자동 샘플분류기 및 SM5000 포토 다이오드 배열 검출기(개인용 컴퓨터에 연결되어 있음)로 구성되어 있다. 칼럼 온도는 엘텍스 CH150 칼럼 오븐으로 35℃로 조절되었다. 탄산의 정량적 HPLC 분석은 2중 구배 용출 방식을 사용하여 다음과 같이 수행하였다:

[0156]

시간	용출제 A(%)	용출제 B	유속
0	75	25	1ml/분
40	35	65	1ml/분
42	25	75	1ml/분
47	25	75	1ml/분
50	75	25	1ml/분

[0157] 용출제 A = 0.015mM KH₂PO₄, 트리플루오로아세트산으로 pH 3.5로 설정됨.

[0158] 용출제 B = 아세트ونی트릴

[0159] 사용된 크로마토그래피 방법은 트리플루오로아세트산을 함유하는 인산염 완충액을 사용하고 보다 긴 구배를 이용한 것을 제외하면, 공지된 방법(Witherup 등, 1989, *J. Liq. Chromatog.*, 12, 2117-2132)과 유사하였다. 이러한 차이는 혼합물로부터 탁술 및 기타 탄산의 분리를 상당히 향상시킨다. 탄산에 대해 관찰된 상대 보유 시간은 아래와 같다. 사용된 칼럼 및 하드웨어에 따라 31분과 33분 사이에서 탁술이 용출한다.

[0160]

화합물	상대 보유 시간
10-데아세틸바카틴 III	0.38
바카틴 III	0.56
7-크실로실-10-데아세틸탁술	0.80
10-데아세틸탁술	0.87
세팔로만닌	0.94
10-데아세틸-7-에피탁술	0.98
탁술	1.00
7-에피탁술	1.12

[0161] 탁술, 세팔로만닌 및 바카틴 III의 보유 시간은 국립 암 연구소에서 수득한 공인 샘플을 사용하여 측정하였다. 상기에 나열한 다른 탄산의 보유 시간은 하우스 케미컬(코네티컷주 보울더)에서 제공되는 분석 표준과 비교하였다. 공지의 탄산의 확인은 보유 시간 및 자외선 분광 비교에 기초하였다. 탁술 및 바카틴 III의 것과 유사한 UV 스펙트럼을 나타내지만 이들 탄산의 상대 보유 시간과 상관 관계가 없는 화합물은 탄산으로 간주하였다. 탁술, 세팔로만닌 및 바카틴 III의 정량분석은 공인 재료로부터 측정된 반응 인자에 근거하였다. 10-데아세틸바카틴 III의 정량분석은 바카틴 III에 대해 측정된 반응 인자를 사용하여 실시하였다. 적당한 경우, 잔존 탄산의 정량분석은 탁술 및 바카틴 III에 대해 측정된 반응 인자에 기초하였다. 총 탄산이란 용어는 탁술 및 바카틴 III와 유사한 특징적 UV를 나타낸 탄산의 합계를 나타낸다. 탁수스 배양에서 확인된 총 탄산으로는 10-데아세틸바카틴 III, 9-디히드로바카틴 III, 7-에피-10-데아세틸바카틴 III, 바카틴 III, 9-디히드로-13-아세틸바카틴 III, 7-크실로실-10-데아세틸세팔로만닌, 7-크실로실-10-데아세틸탁술, 7-에피바카틴 III, 10-데아세틸탁술, 7-크실로실탁술, 세팔로만닌, 7-에피-10-데아세틸탁술, 탁술, 2-벤조일-2-데아세틸-1-히드록시바카틴 I, 탁술 C, 7-에피탁술 및 2-벤조일-2-데아세틸바카틴 I이 있다.

[0162] 특징적인 UV 흡광도를 나타내지 않지만, 질량 분광분석시에 특징적인 탄산 질량 단편화 특성을 나타내는 탄산 역시 탁수스 세포 배양에서 관찰되었다. 탁수스 세포 배양에서 생산되는 그러한 탄산의 예로는 탁수유나닌 C 및 그 유사체 및 유도체가 있다.

[0163] 각각의 표준 샘플(10μl)을 통상적으로 주입하고(처음에, 그 다음 3개 또는 4개 샘플 다음에), 227nm 크로마토그램에서의 3개 성분 각각에 대한 면적을 적분하였다. 각각의 성분에 대한 반응 인자는 데이터의 선형 최소 자승 방법으로 얻었다. 각 샘플 10μl를 주입하고, 표준 데이터 회귀법에 기초하여 주입당 양을 계산하였다. 이러한

결과는 리터당 양 또는 건조 중량%로 전환하였다. 도 4는 상청액 샘플의 대표적인 크로마토그램을 예시한 것이다.

[0164] **5.4. 고속 고성능 액체 크로마토그래피 방법**

[0165] 상기 방법 외에도, 보다 많은 샘플 처리량의 분석을 위해 몇 가지 신속한 HPLC 방법이 개발되었다. 이들 방법 중 두 가지를 아래에서 상세히 설명한다.

[0166] 방법 1). 상기 하드웨어를 사용하여 주위 온도에서 페노메닉스 쿠로실-G 칼럼(5 μM, 4.6mm×3cm 가드를 가진 4.6mm×25cm)상에서 고속 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 수행하였다. 탁산의 정량적 HPLC 분석은 다음과 같은 2중 구배 용출 방식을 사용하여 수행하였다:

시간	용출제 A(%)	용출제 B(%)	유속
0	60	40	1.5ml/분
10	25	75	1.5ml/분
11	25	75	1.5ml/분

[0167]

[0168] 용출제 A = 0.01mM KH₂PO₄, 트리플루오로아세트산으로 pH 3.5로 설정됨.

[0169] 용출제 B = 아세토니트릴

[0170] 탁산에 대해 관찰된 상대 보유 시간은 아래에 나타낸다. 사용된 칼럼 및 하드웨어에 따라 약 8분에서 탁솔이 용출된다.

화합물	상대 보유 시간
10-데아세틸바카틴 III	0.42
바카틴 III	0.61
탁솔	1.00

[0171]

[0172] 탁솔, 바카틴 III 및 10-데아세틸바카틴 III을 함유하는 표준 샘플을 50mg/L, 10mg/L 및 1mg/L 수준으로 제조하였다. 표준 샘플은 처음에 주입한 다음, 9번째 샘플마다 주입하고, 227nm 크로마토그램에서의 3개 성분 각각의 면적을 적분하였다. 각각의 성분에 대한 반응 인자는 데이터의 선형 최소 평방 자승법으로 획득하였다. 각 샘플 10 μl를 주입하고, 동일한 희석 및 표준 데이터 회귀법에 기초하여 피크 영역으로부터 리터당 양을 계산하였다.

[0173] 방법 2). 상기 하드웨어를 사용하여 주위 온도에서 페노메닉스 IB-SIL 페닐 칼럼(3 μM, 4.6mm×3cm 가드를 가진 4.6mm×15cm)상에서 고속 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 수행하였다. 탁산의 정량적 HPLC 분석은 다음과 같은 2중 구배 용출 방식을 사용하여 수행하였다:

시간	용출제 A(%)	용출제 B(%)	유속
0	65	35	1.0ml/분
10	30	70	1.0ml/분
12	30	70	1.0ml/분

[0174]

[0175] 용출제 A = 0.015mM KH₂PO₄, 트리플루오로아세트산으로 pH 3.5로 설정됨.

[0176] 용출제 B = 아세토니트릴

[0177] 탁산에 대해 관찰된 상대 보유 시간은 아래에 나타낸다. 사용된 칼럼 및 하드웨어에 따라 약 9.5분에서 탁솔이 용출된다.

화합물	상대 보유 시간
10-데아세틸바카틴 III	0.42
바카틴 III	0.61
탁솔	1.00

[0178]

[0179] 정량 분석은 전술한 바와 같이 실시하였다.

[0180] 유속 및 구배 길이 및 시간과 관련하여 상기 방법의 변형은 또한 식물 세포 배양 분석에 적합한 크로마토그래피를 수행하는 것으로 확인되었다.

[0181] **5.4. 탁솔의 MS/MS 확인**

[0182] 세포 배양 상청액중의 탁솔은 유동 주입을 이온 분무 대기압 화학 이온화와 연계시킨 MS/MS 방법(도 6에 도시함)을 사용하여 확인하였다. 도 6에 제시한 데이터를 얻는데 사용된 절차의 상세한 사항은 다음과 같다: 질량 분광계: 대기압 이온화원을 가진 시엑스(Sciex) API 3 삼중의 4중극자(triple quadrupole). 차단 기체로 질소를 사용하고, 아르곤은 CID 스펙트럼의 충돌 가스로서 사용하였다. 인터페이스: 이온 증발 이온화(일렉트로스프레이)에 의해 이온을 생성시키는 이온 분무 인터페이스. 분무기 기체로서 제로(Zero) 공기를 사용하였다. LC 펌프: 5 μ l/분으로 작동되는 ABI 140B 이중 시린지 펌프. 용매: 50/50 아세트니트릴/H₂O 2mM NH₄OAc + 0.1% 포름산. 주입 부피: 5 μ l, 유동 주입 분석에 의해 취한 모든 스펙트럼. 이 방법은 세포 배양 샘플내 탁솔의 존재에 대해 명확한 확인을 제공하며, 또한 HPLC 결과와 양호한 일치성을 나타내는 정량 분석 결과를 제공한다.

[0183] **실시예 6: 다양한 종에 의한 탁솔 생산**

[0184] 다양한 탁수스종의 세포 배양에 의해 생산된 탁솔은 표 5에 요약되어 있다. 칼루스는 각각의 종에 대해 지시된 고형화 배지상에서 암실에서 20일 동안 배양하였다. 세포 및 배지를 건조시키고, 함께 메탄올 추출하고, 지시대로 ELISA 또는 HPLC로 분석하였다.

[0185] **7.1. 성장 배지에서의 생산**

[0186] 탁솔 및 탁산의 생산은 탁수스 키네틱스 세포주 K-1의 성장물을 배지 A로 전이시킨 후 최초 2일내에 개시되었다. 최대량의 탁솔은 15일째에 8.81 μ g/플라스크에서 관찰되었는데, 이 양은 0.44mg/l의 탁솔에 해당한다. 이중에서, 세포의 배지에 46.1%가 존재하였다. 15일째에, 총 탁산 농도는 72.87 μ g/플라스크, 즉 3.6mg/l 였는데, 이중 58.6%가 세포의 배지에 존재하였다. 세포의 생존율은 형광 염색법(실시예 4)으로 측정할 때 항상 90% 이상이었는데, 이것은 세포의 탁솔 및 탁산이 세포 분해로 인한 것이라기 보다는 분비로 인한 것임을 시사하는 것이다.

[0187] 탁솔, 바카틴 III 및 관련 탁산의 생산 레벨은 탁산 생합성이 증가되지 않는 다수의 상이한 성장 조건(표 2 및 기타 다른 실시예에 상세히 설명함)하에 다수의 상이한 세포주에 대해 특성분석되었다. 이러한 총괄적인 데이터는 배양물이 탁산 생합성에 대한 것이 아니라 성장에 최적화된 조건하에 배양할 때, 탁솔 생산 수준은 통상 0.5mg/L 이하이고, 항상 2mg/L 이하이며, 탁솔의 부피 생산성은 통상 0.03mg/L/일 내지 0.07mg/L/일의 범위이고, 항상 0.3mg/L/일 미만이다. 유사하게, 바카틴 III 생산 레벨은 통상 0.5mg/L이고, 항상 1mg/L 이하이며; 바카틴 III의 부피 생산성은 통상 0.03mg/L/일 이하이고, 항상 0.15mg/L/일 미만이다. 유사하게, 총 탁산 역가는 통상 5mg/L 미만이고, 항상 20mg/L 이하이다; 총 탁산 부피 생산성은 통상 1mg/L/일 미만이고, 항상 3mg/L/일 미만이다.

[0188] **7.2. 생산성 증가를 위한 배지 교환**

[0189] 9일째에 성장 배지 A를 무균적으로 흡입하고, 새로운 배지로 대체하고 12일째에 과정을 반복함으로써 탁솔 및 총 탁산 생산성의 상당한 향상을 얻었다. 실험은 15일째에 종결하였고 결과는 도 2에 제시한다. 배지 교환으로 인한 생산성의 유의한 증가는 표 6에 요약하였다. 생산된 탁솔 및 탁산의 총량은 처리하지 않은 대조군과 비교하여 배지 교환의 경우 약 4.6배 더 높았다. 중요한 것은 배지 교환 처리를 하지 않은 대조군과 비교하여

세포의 배지에서는 약 4.9배 더 높은 탁솔 및 약 5.9배 더 높은 총 탁산을 회수하였다는 것이다

[0190] 탁솔 및 총 탁산 생산성을 현저하게 증가시키고, 더욱이 세포의 생성물 축적을 야기하는 능력은 생물량을 재사용하고 이후의 정제를 간단히 하는 효율적이고 연속적인 공정의 조작성에 중요하다.

[0191] **7.3. 성장 배지에서 광이 탁산 생산에 미치는 효과**

[0192] 광은 식물 세포 배양에서 광합성에서 뿐만 아니라 다양한 측면의 2차 대사에서 중요한 역할을 하는 것으로 공지되어 있다(Seibert and Kadkade 1980). 실시예 4, 실시예 7.1 및 실시예 7.2에 설명한 실험들은 암실에서 수행한 반면, 본 실시예에서는 탁수스 키네틱스 배양물의 광에의 노출 반응을 설명한다.

[0193] 습윤 중량 1g의 7일령의 탁수스 키네틱스 세포주 K-1 세포를 125ml의 얼렌마이어 플라스크내 성장 배지 A(표 2 참조) 25ml에 접종하고, 120 rpm의 회전 진탕기에서 24°C ± 1°C로 항온 배양하였다. 동일하게 배양한 플라스크를 하나는 암실에 스탠다드 GroLux 램프 아래에 3 피트의 거리로 위치시켰다. 램프의 분광학적 특성은 도 3에 도시한다. 그 결과는 표 7에 제시한다.

[0194] 배양물의 광에의 노출은 총 탁산 레벨 또는 세포의 축적 정도에 영향을 끼치지 않았다. 그러나, 탁산 프로파일은 두 처리에서 상당히 변화되었다. 예를 들면, 광에서 배양된 세포는 암실에서 배양된 세포보다 2.8배 더 많은 탁솔을 생산하였다. 세포의 탁솔의 비율 역시 암실 처리에서보다 상당히 더 높았다(76% 대 56%). 광 처리법의 사용, 특히 특이적 분광 특성의 사용은 탁솔 생산을 위한 세포 배양 공정에 유용할 수 있다.

[0195] **실시예 8: 유발제**

[0196] 유발제란 용어는 식물 세포 배양에 첨가될 때 2차 대사의 증가를 일으키는 생물학적 및 비생물학적 기원의 화합물에 대해 사용된다.

[0197] 다수의 유발제가 유용한 것으로 확인되었지만, 대표적으로 예를 들어 키토산 글루타메이트의 사용이 본원에 상세히 기술되어 있다. 키토산은 종래 일부 식물 세포 배양 시스템에서 유발제로서 시도되어 왔지만, 갈변 현상 및 생존능의 상실과 같은 독성 반응의 수반으로 인해 실제로는 사용되지 못하였다(Beaumont and Knorr 1987, Biotechnol. Lett. 9, 377-382). 실제로 그러한 독성 부반응은 종래 문헌에 보고된 다수의 유발제의 공통된 결점이다. 독성 부작용을 방지하면서 탁솔 및 탁산 생합성을 특이적으로 유도하는 키토산 글루타메이트와 같은 화학적으로 변형된 키토산을 사용하는 것은 신규한 방법인 것이다.

[0198] 배지 D에서 7일 내지 8일 동안 성장한 탁수스 키네틱스의 현탁액은 미라클로스(칼바이오켄) 필터가 장착된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과하였다. 습윤 중량 2g의 세포를 125ml의 얼렌마이어 플라스크내 배지 C(표 2 참조) 25ml로 무균적으로 옮겼다. 0.05% 키토산 글루타메이트 용액은 새로이 제조하고, 0.22 마이크로미터 카트리지 필터를 통해 멸균 여과하였다. 이 용액 825µl를 실험 개시시에 플라스크에 첨가하였는데, 그 양은 건조 중량 세포 1g당 유발제 165mg의 수준에 해당하는 것이다. 그 플라스크를 암실에서 110 rpm의 회전 진탕기에서 24°C ± 1°C로 항온 배양하였다. 플라스크를 15일째에 분해 샘플링하여, 성장, 세포 및 배지의 색깔 및 세포 생존율을 관찰하여 기록하였다. 샘플들은 실시예 5에 설명한 대로 탁산에 대해 분석하였다. 이 실험의 결과는 표 8에 제시한다.

[0199] 유발제 처리에 의해 비처리된 대조군에 비해 세포당 총 탁산 생산성이 최적으로 개선(탁산 건조 중량 0.53% 대 0.42%)되었다. 유발제의 무독성 특성은 양 처리에서 관찰된 높은 생존율(75% 내지 80%)로부터 명백하다. 실제로, 대조군에 비해 유발제 처리에서 증가된 건조 중량은 재현적으로 관찰되었다(건조 중량 14.2g/l 대 10.1g/l). 세포 밀도가 보다 높으면 유발제 처리에서 총 탁산의 역가는 1.8배 더 높았다. 즉 대조군의 경우 42.4mg/L에 대해 75.8mg/L이었다.

[0200] 유발제 처리는 탁솔 생합성을 세포당 기준(탁솔의 건조 중량 0.098% 대 0.054%, 1.8배 증가) 및 역가 비교(13.9 mg/L 대 5.4mg/L, 2.6배 증가) 기준으로 증가시켰다. 분비도는 대조군에 비해 유발제 처리의 경우에 더 높았다(세포의 생성물 85% 대 72%).

[0201] 본 실시예에 기술한 유발제 처리는 탁솔 생산의 증가, 보다 양호한 생성물 프로파일, 생성물 분비의 증가 및 고 세포 생존능의 보유를 가져왔다. 이러한 생산 특성은 탁솔 생산을 위한 세포 배양 공정의 상당한 개선을 나타내는 것이다.

[0202] **실시예 9: 생산 배지 개발**

[0203] 실시예 6에서 설명한 레벨 이상으로 탁술 생산성을 증가시키기 위한 시도에서, 영양물 레벨을 조작하여 특이적인 "생산 배지"를 제형화하였다. 7일 내지 8일령의 배지 D에서 성장한 탁수스 키넨시스 세포주 K-1의 현탁액을 미라클로스(아크릴 결합제를 가진 레이온 폴리에스테르 친) 필터(칼마이오켄)가 장착된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과하였다. 습윤 중량 500mg의 세포를 생산 배지 B 및 C(표 2 참조) 5ml로 무균적으로 옮겼다. 용기를 암실에서 110 rpm의 회전 진탕기상에서 18일, 25일 및 42일의 다양한 기간 동안 24°C ± 1°C로 항온 배양하였다. 처리물을 분해 샘플링하여, 성장, 세포 및 배지의 색깔 및 세포 생존율을 관찰하여 기록하였다. 샘플들은 실시예 5에 설명한 대로 탁산에 대해 분석하였다. 이 실험의 결과는 표 8에 제시한다.

[0204] **9.1. 18일 배양의 결과**

[0205] 탁수스 키넨시스 세포 배양물은 상당한 레벨의 탁산 및 탁술을 생산함으로써 변형된 배지 조성에 반응하였다. 이러한 데이터는 표 9에 요약하며, 샘플의 크로마토그램은 도 4에 도시하였다. 배지 B에서, 총 탁산 99.8mg/l와 탁술 24.1mg/l가 생산되었다. 배지 C에서는, 총 탁산 110mg/l와 탁술 21.3mg/l가 생산되었다. 건조 중량 기준으로, 세포들은 배지 B에서 건조 중량 0.18%의 탁술을 생산하였고, 배지 C에서는 건조 중량 0.065%의 탁술을 생산하였다.

[0206] **9.2 연장된 배양**

[0207] 배지 C에서 탁수스 키넨시스 세포(세포주 K-1)를 25일 및 42일 동안 연장 배양한 후의 탁술 및 탁산의 생산을 연구하고, 그 결과를 도 5에 요약하였다. 다음과 같은 중요한 관찰 결과를 요약할 수 있다:

[0208] (i) 탁수스 현탁 배양은 상당한 레벨의 탁술 및 기타 탁산을 생산할 수 있다. 42일 후에 0.32 건조 중량%의 탁술 및 0.62 건조 중량%의 총 탁산을 함유하는 최대 축적이 발생하였고, 이것은 최종 배지 부피를 기준으로 153 mg/L의 탁술 및 295mg/L의 총 탁산 역가에 해당한다. 직렬식 질량 분광 분석법에 의한 이 샘플의 분석으로부터 도 6에 도시한 바와 같이 탁술의 존재를 확인하였다. MS/MS에 의한 정량 분석은 HPLC와 양호하게 일치하였다.

[0209] (ii) 25일과 42일 사이의 탁술 생합성률은 17일 동안의 선형 생산량으로 추정할 때 약 7.6mg/L/일의 탁술이었다. 이 합성률은 처음 25일에서의 생산율보다 상당히 더 높은 것이다. 25일과 42일 사이의 총 탁산 생합성률은 12.3mg/L/일이었다. 탁술, 바카틴 및 총 탁산의 평균 부피 생산성은 각각 3.6mg/L/일, 0.5mg/L/일 및 7.0mg/L/일이었다.

[0210] (iii) 생산 배지 제형물은 실시예 7에 설명한 것과 같은 고속 성장 조건(탁산 생합성이 증가하지 않음)에 비해 특이적인 탁술 함량의 45배까지의 증가를 유도할 수 있다.

[0211] (iv) 생성물 스펙트럼을 조작하여 바람직하지 않은 탁산의 생산을 최소화하면서 목적하는 최종 생성물 탁술의 생합성을 집중시킬 수 있다. 예를 들면, 총 탁산의 17.2%를 구성한 탁술이 있는 성장 배지(실시예 7.1 참조)와 대조적으로 25일째에 탁술이 총 탁산의 28%를 구성하고, 42일째에 탁술이 총 탁산의 12.2%를 구성하였다. 생성물의 프로필을 조작하는 능력은 다운스트림 정제 및 생성물 순도 관련 조절 문제에 대해 중요한 영향을 가질 수 있다. 예를 들면, 탁산 부산물인 세팔로만닌의 생산을 억제하는 능력은 목피 조직으로부터 탁술을 정제하는 것과 비교해 이후의 정제를 크게 단순화할 수 있다.

[0212] (v) 탁수스 세포 배양은 상당량의 탁술(42일째에 87%) 및 기타 탁산의 분비를 유도하였다. 세포의 탁술 및 탁산의 존재가 세포 분해로 인한 것이라기보다는 분비로 인한 것이라는 사실은 여러 가지 독립적인 관찰에 의해 입증된다: (a) 25일과 42일 사이에 연속된 생합성이 일어났는데, 이것은 세포들이 생존성이고 활성이 있음을 시사한다. 독립적인 관찰로부터 생산 배지에서 18일 후에 70%를 초과하는 생존율이 관찰되었음을 알 수 있다. (b) 상이한 비율의 상이한 탁산이 분비되었다. 세포가 분해되면 배지의 비율은 상이한 탁산에 대해 유사할 것으로 예상되었다.

[0213] (vi) 상기 탁수스 세포주가 생성물이 풍부한 세포외 환경에서 고비율로 탁술을 증가시키고 생산하는 능력이 특히 주목할 만하다.

[0214] (vii) 이러한 결과가 얻어지는 탁수스 세포주는 또한 고속 성장하여 높은 세포 밀도를 이룰 수 있고, 고속 성장 조건후 20 세대후 보고된 생산성을 나타냈는데, 이것은 그 안정성과 상업적인 가능성을 증명하는 것이다.

[0215] 탁수스 키넨시스 세포주에 의해 본 실시예에 기술한 조건하에서 생산한 탁술 및 탁산의 레벨은 종래 보고된 결과보다 35배 내지 150배 더 높다. 예를 들면, 크리스텐 등(1991)은 2주 내지 4주의 배양후 탁수스 브레비폴리

아의 현탁 배양에 의해 1mg/l 내지 3mg/l의 탁솔 생산을 보고하였다. 위커라메시네 및 아크테카(1991)는 탁수스 메디아의 세포 배양에서 0.009 건조 중량%의 탁솔 생산을 보고하였다.

[0216] 요약하면, 본 연구의 데이터는 탁수스 키넨시스 배양물의 주의 깊은 개시 및 선별, 특이적으로 제형화된 성장 배지 조건을 사용하여 세포를 높은 세포 밀도로 신속히 성장하도록 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. 이들 세포를 생산 배지 조건으로 옮기면, 세포들이 높은 생존율을 유지하면서 지속된 기간 동안 상당한 수준의 탁솔 및 기타 탁산을 생합성하고 분비할 수 있다. 생산 배지와 함께 주기적인 배지 교환, 광 및 유발제를 결합함으로써 보다 더 상승적인 생산성 증가를 얻는다. 이러한 성질은 조직 배양 기술을 사용하는 탁솔 및 탁산 생산을 위한 효율적인 상업적 방법의 중요한 선결 요건이 된다.

[0217] **10.1 은을 이용한 탁산 생성물의 증가**

[0218] 은 함유 화합물, 은 착물 또는 은 이온 형태의 은은 탁수스 종의 세포 배양물중 탁솔, 바카틴 III 및 탁산 생합성의 유용한 증강제로 밝혀졌다. 또한 은과 기타 증강제의 배합물은 탁산 생성물을 고비율로 수득하고 지속하는 데 유용한 것으로 확인되었다.

[0219] 배지 L(표 2)에서 배양한 탁수스 키넨시스(*Taxus chinensis*)의 7일된 세포 현탁액 KS1A는 미라클로스(칼바이옴) 필터가 구비된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과시켰다. 약 0.75 g 내지 1 g의 습윤 중량 세포를 표 10에 제시된 조성물을 가지는 4 ml 내지 5 ml의 배양 배지에 접종하여 15% 내지 20%(w/v) 범위의 습윤 중량 세포 밀도를 얻었다. 용기는 암실의 회전 진탕기(1" 동작반경)에서 120 RPM, 25±1℃의 온도에서 항온 배양하였다. 멸균 증류수를 첨가하여 증발분을 보충하였다. 전체 브로스(즉 세포의 탁산과 세포내 탁산) 샘플을 주기적으로 모으고, 실시예 5에 제시된 방법에 따라 처리하고 HPLC에 의해 분석하였다.

[0220] 표 10에 요약된 데이터는 탁솔, 바카틴 III 및 기타 탁산의 생산은 각종 은 함유 화합물에 의해 성공적으로 증진될 수 있다는 것을 보여준다. 이러한 증가는 1차적으로 배지중 은의 존재에 기인하는 것이며, 표 10에서 입증되는 바와 같이, 각종 상이한 은 함유 화합물과 상이한 짝 이온에 대한 증가를 보여준다. 생성물의 농도는 증가시키지 않은 배양물(실시예 7에서 만든 생성물 농도)에서 관찰되는 것보다 상당히 높다.

[0221] **10.2 티오황산은을 이용한 탁산 생성물의 증가**

[0222] 독성 및 제조와 저장의 용이성을 고려하여, 티오황산은을 다음 실험에서 사용하였다. 티오황산은을 제조하는데 사용한 방법은 하기와 같다: 1.98 g의 티오황산 나트륨(5수화물)을 80 ml의 물에 용해시켰다. 20 ml의 0.1 M 질산은 용액을 격렬히 교반하면서 첨가하여, 100 ml의 20 mM 티오황산은 모액을 형성하였다. 티오황산칼륨을 티오황산나트륨 대신에 사용하여 동일한 효과를 얻을 수 있다. 모액은 0.22 μM 카트리지 필터를 사용하여 실험 초기에 세포 배양물내로 여과 멸균시켰다. 유사한 티오황산은 용액을 제조하는 또 다른 방법도 적합하다. 세포 배양 프로토콜은 표 10에 기재한 실험에 대해 기술한 것과 유사하다.

[0223] 표 11은 탁수스 키넨시스의 여러 세포 배양물에 대한 증강제로서 은을 사용하여 얻은 데이터를 요약한 것이다. 이들 데이터는 은이 일반적으로 탁산 생합성의 기본적인 증가에 영향을 준다는 것을 보여준다. 각 경우에 관찰되는 특정 생성물 프로파일은 세포주와 배양 배지의 특성을 반영한 것이다. 은 이온/착물은, 생합성에 유리한 배지에 성장 조절제, 탄소원, 염, 미량양분 등의 여러 인자와 함께 사용되는 경우 탁산 생성물을 증가시키는 데 특히 효과적일 수 있다.

[0224] **실시예 11: 메틸 자스모네이트 및 자스모네이트 관련 화합물을 이용한 탁산 생성물의 증가**

[0225] 자스몬산의 메틸 에스테르(메틸 자스모네이트) 뿐만 아니라 자스몬산 및 관련 화합물은 탁수스 종의 세포 배양물중 탁산 생합성의 증강제로서 유용한 것으로 밝혀졌다. 메틸 자스모네이트 및 기타 증강제의 배합물은 고비율의 탁산 생성물을 얻고 유지하는 데 유용한 것으로 확인되었다.

[0226] 배지 M(표 2)에서 배양한 탁수스 키넨시스의 7일된 세포 현탁액은 미라클로스(칼바이옴) 필터가 구비된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과시켰다. 세포는 표 12에 제시된 조성의 배양 배지내로 접종시켜, 15% 내지 20%(w/v) 범위의 습윤 중량 세포 밀도를 얻었다. 배양물은 암실의 회전 진탕기(1" 동작반경)에서 120 RPM 또는 180 RPM(용기의 크기에 따라), 24±1℃의 온도에서 항온 배양하였다. 멸균 증류수를 첨가하여 증발분을 보충하였다. 전체 브로스(즉 세포의 탁산과 세포내 탁산) 시료를 주기적으로 모으고, 실시예 5에 제시

된 방법에 따라 처리하고 HPLC에 의해 분석하였다.

[0227] 표 12에는 몇가지 대표적인 탁수스 키넨시스 세포주에 대한 증강제로서 자스몬산과 이의 메틸 에스테르를 사용하여 얻은 데이터가 요약되어 있다. 이들 데이터는 자스몬산과 이의 메틸 에스테르가 일반적으로 탁산 생합성의 기본적인 증가에 영향을 준다는 것을 보여준다. 각 경우에 관찰되는 특정 생성물 프로파일은 세포주와 배양 배지의 특성을 반영한 것이다. 이들 증강제의 존재하에 얻은 생성물의 농도는 증가시키지 않은 배양물(실시에 7에서 생성된 생성물 농도)에서 관찰되는 것보다 상당히 높다.

[0228] 자스몬산, 이의 메틸 에스테르, 및 관련 화합물은, 생합성에 유리한 배지내 기타 증강제, 성장 조절제, 탄소원, 염, 미량양분 등의 여러 인자와 함께 사용되는 경우 탁산 생합성의 효과적인 증강제이다.

[0229] **실시예 12: 3,4-메틸렌디옥시-6-니트로신남산을 이용한 탁산 생성물의 증가**

[0230] 신남산 유사체인 3-4-메틸렌 디옥시-6-니트로신남산(MDNA) 및 관련 화합물은 탁수스 종의 세포 배양물중 탁산 생합성의 증강제로서 유용한 것으로 밝혀졌다. MDNA와 기타 증강제의 배합물은 고비율의 탁산 생성물을 얻고 유지하는 데 유용한 것으로 확인되었다.

[0231] 배지 M(표 2)에서 배양한 탁수스 키넨시스의 7일된 세포 현탁액 배양물 SS122-42는 미라클로스(칼바이오크) 필터가 구비된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과시켰다. 세포는 15% 내지 20%(w/v) 범위의 습윤 중량 세포 밀도로 배양 배지내에 접종시켰다. 용기는 암실의 회전 진탕기(1" 동작반경)에서 180 RPM, 24 ± 1°C의 온도에서 항온 배양하였다. 각종 시점에서 실시예 5에서 설명한 방법을 사용하여 처리된 배양물의 샘플을 채취하고 분석하였다. 멸균 증류수를 주기적으로 첨가하여 증발분을 보충하였다. 전체 브로스(즉 세포의 탁산과 세포내 탁산) 시료를 주기적으로 모으고, 실시예 5에 제시된 방법에 따라 처리하고 HPLC에 의해 분석하였다.

[0232] 표 13은 탁수스 키넨시스 세포 배양물중 탁산 생합성에 대한 증강제로서 3,4-메틸렌디옥시니트로신남산을 사용하여 얻은 데이터가 요약되어 있다. 이들 데이터는 MDNA가 일반적으로 탁산 생합성의 기본적인 증가에 영향을 준다는 것을 보여준다. 배지 II, 즉 MDNA 및 은의 존재하에서의 배양은 탁산 생성을 더 증가시킨다. 각 경우에 관찰되는 특정 생성물 프로파일은 세포주와 배양 배지의 특성을 반영한 것이다. 이들 증강제의 존재하에 얻은 생성물의 농도는 증가시키지 않은 배양물(실시에 7에서 생성된 생성물 농도)에서 관찰되는 것보다 상당히 높다.

[0233] **실시예 13: 증강제 배합물을 사용한 탁산 생합성의 증가**

[0234] 배합물에 사용된 각종 증강제는 탁산 생산에 현저하고 상승적인 개선 효과를 제공하였다.

[0235] 배지 P(SS64-412), 배지 O(SS64-561, SS64-571), 배지 I(SS124-77, SS85-26), 배지 M(SS122-29)(이들 배지의 조성은 표 2에 나열되어 있음)에서 배양한 탁수스 키넨시스의 7일된 세포 현탁 배양물을 미라클로스(칼바이오크) 필터가 구비된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과시켰다. 세포는 20%(w/v)의 습윤 중량 세포 밀도로 배양 배지(표 14에 제시)내에 접종시켰다. 배양물은 암실의 회전 진탕기(1" 동작반경)에서 180 RPM, 24 ± 1°C의 온도에서 항온 배양하였다. 멸균 증류수를 주기적으로 첨가하여 증발분을 보충하였다. 전체 브로스(즉 세포의 탁산과 세포내 탁산) 시료를 주기적으로 모으고, 실시예 5에 제시된 방법에 따라 처리하고 HPLC에 의해 시료를 분석하였다.

[0236] 표 14는 탁수스 키넨시스 세포 배양물중 탁솔, 바카틴 III 및 탁산 생합성에 대한 증강제로서 각종 배합물을 사용하여 얻은 데이터가 요약되어 있다. 이들 데이터는 증강제를 배합하면 각각의 증강제에 대해 나타나는 것보다, 그리고 증가시키지 않은 조건(실시에 7에서 생성된 생성물 농도)에서의 생성물 농도에서 관찰되는 것 보다 탁산 생성물이 실질적으로 더 증가된다는 것을 보여준다.

[0237] **실시예 14: 배지 교환에 의한 탁산 생성물의 증가**

[0238] 이 실시예는 배지 성분을 보충하고 소모된 배지를 제거하므로써 배양물에서 높은 생산성을 유지할 수 있다는 것을 입증한다.

[0239] 세포주는 초기에 배지 0(Paella), 배지 I(SS29-3A5) 및 배지 I(SS45-146)에서 배양하였다. 이들 배양 배지의 상세한 조성은 표 2에 기재되어 있다. 이들 세포주의 7일된 세포를 미라클로스(칼바이오크) 필터가 구비된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과시켰다. 약 1.5 g의 습윤 중량 세포를 표 15에 제시된 각각의 배양 배지 4.25 ml내에 접종시켰다. 용기는 암실의 회전 진탕기(1" 동작반경)에서 120 RPM, 24±1℃의 온도에서 항온 배양하였다. 멸균 증류수를 주기적으로 첨가하여 증발분을 보충하였다. 배지 교환 처리를 위해, 소모된 생성물 배지는 멸균 피펫을 사용하여 배치식으로 배양한 지 10일 내지 11일 후에 흡입시켜 제거하며, 이때 세포는 용기중에 남겨두었다. 소모된 상청액은 실시예 5에서 설명한 방법을 사용하여 세포의 탁산에 대해 분석하였다. 제1 배치식 배양물로서 동일한 조성의 새 배양 배지를 생성 세포를 함유하는 용기에 첨가하였다. 진술한 바와 동일한 환경 조건하에서 세포를 배양하였다. 배지 교환 주기는 추가의 배양 10일 내지 11일 후에 반복하였다. 배치식 생성물에 대한 총 세포의 탁산을 표 15의 배지 교환 생성물의 총 세포의 탁산과 비교한다. 배지 교환 농도 값은 세포의 배지에서 생성된 탁산의 총량을 세포 현탁 배양물의 부피(즉, 5.75 ml)로 나누어 나타낸다.

[0240] 표 15는 세포가 장기간 동안 생산적인 상태를 유지할 수 있으며, 실제로 세포의 생산성은 반복되는 배지 교환에 의해 증가될 수 있다는 것을 보여준다. 각종 세포 배양물과 여러 증가 조건을 이용하면 반복적인 배지 교환에 의한 증가가 용이하다.

[0241] 이들 데이터는 증가시키지 않은 조건(실시예 7에서 생성된 생성물 농도)에서의 생성물 농도에서 관찰되는 것 보다 탁산 생성물이 실질적으로 더 증가된다는 것을 보여준다.

[0242] **실시예 15: 공급 배지 조작에 의한 탁산 생산의 증가**

[0243] 배지 I(CR-128, SS36-245), 배지 L(SS36-359)(이들 배지의 조성은 표 2에 기재되어 있음)에서 배양한 세포주의 7일된 세포를 미라클로스(칼바이오크) 필터가 구비된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과시켰다. 약 1g의 습윤 중량 약 1 g을 표 16 a에 제시된 조성의 배양 배지 4 ml내에 접종시켰다. 용기는 암실의 회전 진탕기(1" 동작반경)에서 120 RPM, 24±1℃의 온도에서 항온 배양하였다. 멸균 증류수를 주기적으로 첨가하여 증발분을 보충하였다. 공급 배지 조작을 위해, 소정의 조성물의 멸균 공급 용액을 예정된 공급 속도(예컨대 1일 배양물 1 l 당 10 ml의 공급 용액)로 배양 용기내에 연속적으로 공급하였다. 공급 용액의 조성은 공급 프로토콜을 비롯하여, 공급 배지 조작의 상세한 설명은 표 16 b에 제시되어 있다. 실시예 5에서 설명한 방법을 사용하여 처리된 배양물의 샘플을 채취하고 분석하였다.

[0244] 표 16a는 세포가 장기간 동안 생산적인 상태를 유지할 수 있고, 실제로 세포의 생산성은 공급 배지 조작에 의해 증가될 수 있으며, 그 결과 바카틴 III, 탁술 및 기타 탁산을 고 농도로 축적시킨다는 것을 보여준다. 특정 탁산의 상대적인 양은 공급 프로토콜 및 공급 조성물과 세포주 및 배양 조건의 상호 작용을 반영한다. 또한 이 표는 페닐알라닌을 공급하면 기타 탁산에 비해 탁술의 생성량을 증가시킨다는 것을 제시한다.

[0245] 이들 데이터는 증가시키지 않은 조건(실시예 7에서 생성된 생성물 농도)에서의 생성물 농도에서 관찰되는 것 보다 탁산 생성물이 실질적으로 더 증가된다는 것을 보여준다.

[0246] **실시예 16: 증강제의 배합물을 이용한 탁산 생합성의 증가**

[0247] 배합물에 사용된 각종 증강제는 탁술, 바카틴 III, 탁산 생성에 현저하고 상승적인 개선 효과를 제공하였다.

[0248] 배지 M(배지의 조성은 표 2에 나열되어 있음)에서 배양한 탁수스 키넨시스 7일된 세포 현탁액 배양물(SS122-41, cr427, SS122-30, cr857, cr452)를 미라클로스(칼바이오크) 필터가 구비된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과시켰다. 세포는 표 17에 달리 기재되어 있지 않으면 20%(w/v)의 습윤 중량 세포 밀도로 배양 배지(표 17에 제시)내에 접종시켰다. 배양물은 암실의 회전 진탕기(1" 동작반경)에서 180 RPM, 24±1℃의 온도에서 항온 배양하였다. 필요에 따라 멸균 증류수를 주기적으로 첨가하여 증발분을 보충하였다. 전체 브로스(즉 세포의 탁산과 세포내 탁산) 시료를 주기적으로 모으고, 실시예 5에 제시된 방법에 따라 처리하고 HPLC에 의해 분석하였다.

[0249] 표 17은 탁수스 키넨시스 세포 배양물중 탁술 및 탁산 생합성에 대한 증강제로서 각종 배합물을 사용하여 얻은 데이터가 요약되어 있다. 이들 데이터는 증강제를 배합하면 각각의 증강제에 대해 나타나는 것보다, 그리고 증가시키지 않은 조건(상세한 설명은 실시예 7에 개시되어 있음)에서 관찰되는 것 보다 탁산 생성물이 실질적으로

더 증가된다는 것을 보여준다.

- [0250] 실시예 17: 공급 배치 조작에 의한 탁산 생산의 증가
- [0251] 배지 M(SS122-41)(배지의 조성은 표 2에 기재되어 있음)에서 배양한 세포주의 7일된 세포를 미라클로스(칼바이 오캠) 필터가 구비된 멸균 부호너 깔때기를 사용하여 무균적으로 흡입 여과시켰다. 습윤 중량 약 1 g의 세포를 표 18 a에 제시된 각각의 배양 배지 4 ml내에 접종시켰다. 용기는 암실의 회전 진탕기(1" 동작반경)에서 120 RPM, 24±2℃의 온도에서 항온 배양하였다. 멸균 증류수를 주기적으로 첨가하여 증발분을 보충하였다. 공급 배치 조작을 위해, 소정의 조성물의 멸균 공급 용액을 배양 용기내에 연속적으로 공급하였다. 공급 용액의 조성과 공급 프로토콜을 비롯하여, 공급 배치 조작의 상세한 사항은 표 18b에 기재되어 있다. 실시예 5에서 설명한 방법을 사용하여 처리된 배양물의 샘플을 채취하고 분석하였다.
- [0252] 표 18a는 세포가 장기간 동안 생산적인 상태를 유지할 수 있고, 실제로 세포의 부피 생산성은 공급 배치 조작에 의해 증가될 수 있으며, 그 결과 바카틴 III, 탁솔 및 기타 탁산을 고 농도로 축적시킨다는 것을 보여준다. 특정 탁산의 상대적인 양은 공급 프로토콜 및 공급 조성물과 세포주 및 배양 조건의 상호 작용을 반영한다.
- [0253] 이들 데이터는 증가시키지 않은 조건(실시예 7에서 생성된 생성물 농도)의 생성물 농도에서 관찰되는 것 보다 탁산 생성물이 실질적으로 더 증가된다는 것을 보여준다.
- [0254] 명확한 이해를 위해서, 특정 양태들과 관련하여 예시 및 실시예로 상세히 설명하였지만, 본 발명에 속하는 기타의 양태, 장점 및 변형이 당업자에게는 자명할 것이다. 전술한 상세한 설명과 실시예는 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다. 당업자에게는 자명한 본 발명을 수행하기 위한 전술한 방식의 변형도 본 발명의 범위내에 있으며, 본 발명은 단지 첨부된 청구항에 의해서만 한정된다.
- [0255] 본원에서 언급한 모든 공보 및 특허 출원은 본 발명이 속하는 당해분야의 기술 정도를 시사하는 것이다. 모든 공보 및 특허는, 각각의 공보 또는 특허가 특별히 그리고 개별적으로 참고로 인용되었다고 한 것과 동일한 범위에서 참고로 인용하였다.
- [0256] [표 1aa]
- 탁수스 중 세포 배양물의 유도에 사용되는 유발제 목록
- I. 생물 유발제 (미생물)
- 보트리피스 시네레아(Botrytis cinerea)
- 피넬라스 스트립티쿰(Pinellas stripticum)
- 피티움 마밀라툼(Pythium mamillatum)
- 버티실리움 달리에(Verticillium dahliae)
- 페니실리움 미니올루테움(Penicillium minioluteum)
- [0257]

[0258] [표 1ab]

- 시토스포라 신크타(*Cytospora cincta*)
- 알터나리아 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*)
- 알터나리아 쿠쿠메리나(*Alternaria cucumerina*)
- 코크리오볼루스 헤테로스트로퍼스(*Cochliobolus heterostrophus*)
- 콜레토티리움 오르비쿨라레(*Colletotrichum orbiculare*)
- 콜레토티리움 글로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*)
- 푸자리움 크루크웰렌세(*Fusarium crookwellense*)
- 푸자리움 헤테로스포리움(*Fusarium heterosporium*)
- 푸자리움 옥시스포룸 에프. 종 콩글루티난스(*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*)
- 푸자리움 옥시스포룸 에프. 종 리코퍼시시(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)
- 푸자리움 옥시스포룸 에프. 종 피시(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi*)
- 지베랄라 제애(*Gibberella zeae*)
- 개우만노마이시스 그라미니스 변종 트리티시(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)
- 게오트리움 종(*Geotrichum* sp.)
- 렙토스페리아 코태(*Leptosphaeria korrae*)
- 넥트리아 해마토코카 MPVI(*Nectria haematococca* MPVI)
- 미코스페레라 피노메스(*Mycosphaerella pinodes*)

[0259]

[0260] [표 1ac]

오피오스토마 울미(*Ophiostoma ulmi*)
 포마 린감(*Phoma lingam*)
 포마 피노델라(*Phoma pinodella*)
 피토프토라 인페스탄스(*Phytophthora infestans*)
 피티움 아리스토스포룸(*Pythium aristosporum*)
 피티움 그라미니콜라(*Pythium graminicola*)
 피티움 울티뎀(*Pythium ultimum*)
 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)
 스크레로티니아 종(*Sclerotinia* sp.)
 에스. 노도룸 D-45(*S. nodorum* D-45)
 트라메테스 버시칼라(*Trametes versicolor*)
 우스틸라고 메이디스(*Ustilago maydis*)
 벤투리아 인애쿠아리스(*Venturia inaequalis*)
 피토프토라 메가스퍼마(*Phytophthora megasperma*)
 올리고스포러스 종(*Oligosporus* sp.)
 피티움 실바티컴(*Pythium sylvaticum*)
 버티실리움 종(*Verticillium* sp.)
 피토프토라 라테라리스(*Phytophthora lateralis*)
 시토스포라 류코스토타(*Cytospora leucosloma*)
 알터나리아 솔라니(*Alternaria solani*)

[0261]

[0262] [표 1ad]

보트리티스 스쿠아모사(Botrytis squamosa)
 콜레토티리움 트리폴리(Colletotrichum trifolii)
 콜레토티리움 그라미니콜라(Colletotrichum graminicola)
 실린드로클라디움 플로리다눔(Cylindrocladium floridanum)

II. 생물 유발제(미생물 분획물 또는 생성물)

키토산	셀룰리신
리케난	멀티펙트 XL
글루코만난	멀티펙트 CL
플루란	레시나제
글루칸	펠프크심
카르복시메틸글루칸	SP431
히드록시메틸글루칸	펙티놀
설포에틸글루칸	라피다제
만난	클레자임
크실란	키티나제
만노비오스	
만노트리오스	
만노펜타오스	
만노테트라오스	

[0263]

[0264] [표 1ae]

III. 비생물 유발제

(화학적 자극제 및 일부 자연 발생적 생화학 물질)

아라키돈산	엘라이드산
시클릭 AMP	디부틸릴 시클릭 AMP
메틸 자스모네이트	시스-자스몬
미코나졸	페루르산
AMO-1618	트리톤 X-100
벤조산 및 유도체	살리실산 및 유도체
프로필 갈레이트	세사몰
클로로콜린 클로라이드	3,4-디클로로페녹시 트리에틸 (아민)
클로로에틸포스폰산	디에틸디티오카르밤산
노르디히드로구아이어레트산	
디티오프레이틀	나트륨 메타비설페이트
칼륨 메타비설페이트	b-아미노-DL-페닐알라닌
바나딜 설페이트	유니코나졸
파클로부타졸	스페르민
스페르미딘	푸트레신
카다바린	
프로타민 설페이트	

[0265]

[0266] [표 1af]

SKF-7997

MER 29

안시미들

트리아디메폰

포스폰 D

티오우레아

텍스트란 설페이트

히드로퀴논

키토산 글루타메이트

펜프로페모르프

프로클로라즈

나프티핀

EDU

HTA

MPTA

글루타치온

EGTA

지베렐린

엡시스산

[0267] 1,3-디페닐 우레아

[0268] [표 1ag]

디아졸리디닐 우레아

플루로글루시놀

나트륨 알기베이트

[0269] 카라기난

[0270] [표 1b]

탁수스 종의 세포 배양에서 탁솔 및 탁산의 생합성의 조절에 사용되는 전구체, 억제제 및 자극제 또는 활성화제의 목록

전구체	억제제	자극제
페닐알라닌	클로로콜린 클로라이드	시클릭 AMP
리신	유니코나졸	디부티릴 시클릭 AMP
티로신	파클로부트라졸	메틸 자스모네이트
트립토판	SKF-7997	시스-자스몬
메티오닌	MER 29	클로로에틸포스폰산
티라민	안시미들	스페르민
아세트산	트리아미메폰	스페르미딘
아세트산염	포스폰 D	푸트레신
	펜프로페모르프	카다바린
메발론산	프로클로라즈	MPTA
파네실 아세테이트	나프티핀	DCPTA
제라닐 아세테이트	미코나졸	DIPTA
제라닐게라니올 아세테이트	질산은	ACC
트립타민	노르보르나디엔	HTA
멘톨	AMO 1618	브라시노스테로이드
a-피넨	알라	BHA
트란스-신남산	4-아미노-5-헥시논산	BHT
캄브렌 A	페닐에탄올아민	OTA
베르티실렌	펜에틸아민	
베르티실롤	글리포세이트	
캄퍼	디히드로시클로유칼레놀	
퀘르세틴	메티오닌 설폭시드	
레블린산	β -히드록시펜에틸아민	
아비에트산	5-메틸-DL-트립토판	
보르네올	a-플루오로페닐알라닌	
	5-2 아미노에틸-L-시스테인 염산염	

[0271]

[0272] [표 1ca]

유발제	
크실라나제	부타클로레
키토올리고사카라이드	부틸이소티오시네이트
스페르민 비스 니트릭 옥사이드 부가물	클로람벤
N,N'-디아세틸키토비오스 이소프로필아민	에틸 카르바메이트
비스 니트릭 옥사이드 부가물	2-히드록시에틸히드라진
디에틸아민 비스 (니트릭 옥사이드) 부가물	히드록시글루타르산 이나트륨
벤질 N,N'-디아세틸-β-키토비오스	트립토파
시린지산	티오우레아
벤조티아디아졸	티오아세트아미드
비피리딜	2,4,6-트리클로로페놀
고시폴 및 유도체	피리딘-2-알독심 메토클로라이드
2-클로르-4-메틸이소니코틴산	칼륨 옥살레이트 일수화물
인도메타신	폴리-L-리신 히드로브로마이드
N,N',N'-트리아세틸키토트리오스	네롤
N,N'-디아세틸키토비오스	N-(1-나프틸) 프탈람산
디아모늄 옥살레이트	옥살레이트
니게란	옥타포민 히드로클로라이드
p-히드록시아세토페논	옥시자미드
펙트산	2-메틸피라진
리소자임	메톡시아세트산
니트릭 옥사이드	N-에톡시카르보닐-2-에톡시-1,2-디히드로
글루타치온 (환원)	퀴놀린
1,2-디아미노프로판	란타넘 아시테이트
1,3-디아미노프로판	리놀렌산
β-메르캅토에틸아민	리파제
히드록시아민	인도아세트아미드
데옥시글루코스	2-히드록시에틸렌히드라진
2-클로로벤조산	디노캡
2-메틸-1,2-DL (3-피리딜) 1-프로판	1,3-디페닐우레아
5-브로모우라실	과산화수소
7-니트론다졸	우레아 히드로퍼옥사이드
8-히드록시퀴놀린	세바스산
아세도아미도신남산	벤조일 퍼옥사이드
2-아미노안트라퀴논	N-메틸말레이미드
N-아세틸-L-글루탐산	쿠멘 퍼옥사이드
아그마틴	N-아세틸-D-글루코사민
3-아세틸 피리딘	옥틸-β-D-글루코피라노시드
부티릴 부티릴 락테이트	히드록시에틸-β-1,3-글루칸
7-브로모-5-클로로-8-히드록시퀴놀린	디이소프로필 플루오로포스페이트
벤질벤조에이트	텍스트란
브로모크시닐	루시퍼 멜로우

[0273]

[0274] [표 1cb]

유발제	
시린지알데히드	과산화수소
키티나제	베스타틴
바시트라신	부틸화 히드록시아니솔
칼슘 시아니드	부틸화 히드록시톨루엔
글루칸	젤란 검
글루타르산	셀룰라제
모르폴린	피멜산
옥타메틸시클로테트라실록산	디이소프로필 포스포클로리데이트
트리코벨린 히드로클로라이드	니트라피린
안트라닐산	t-부틸 히드로퍼옥사이드
폴리스틴 메탄 설포네이트	DL-포스포노트리신 암모늄
콜히친	메틸 시린게이트
2,4-디클로로페놀	트리플루랄린
L-페닐알라닌-2-나프틸아민	트리메카논
히드록시글루타르산, 및 이의 염	미모신
DL-2-히드록시-3-메틸부티르산	나리게닌
1-10-페난트롤린 일수화물	디메틸아미노피리딘
N-설포숙신이미딜-3-(4-히드록시페닐)프로	1-벤질이미다졸
피오네이트	DL-o-클로로페닐알라닌
트란스-1,6-디페닐헥사트리엔	세틸피리디늄 클로라이드
아라키돈산	히드로퀴논
우레아 과산화수소	시린고마이신

[0275]

[0276] [표 1d]

전구체	
디메틸페닐알라닌	D-프럭토스-1,6-디포스페이트
제라닐 클로라이드	β-히드록시피루브산
제라닐게라니올	4-히드록시페닐피루브산
트란스-신남산	메틸 아세테이트
피루브산	메틸 라우레이트
페닐피루브산	옥살로아세트산
오르토숙시닐벤조산	피네페스
2,3-디히드로벤조산	제라닐 아세테이트
o-히드록시페닐피루브산	넬름
칼슘 아세테이트	멜란드렌
글루탐산	벤조일 클로라이드
아스파르트산	R(-)시트라말산
DL-β-페닐세린	아스파라긴
히푸르산	2,3-디클로로벤조산
p-히드록시신남산	이소류신
벤질 아세테이트	류신
페닐아세트산	포스포글리세르산
3-벤조일프로피온산	세린
시트르산	2-히드록시신남산
칼슘 벤조에이트	3-히드록시신남산
아르기닌	4-히드록시신남산
N-벤질-DL-페닐알라닌	보르네올
3,4-디히드록시신남산	포스포글리세레이트 칼슘염
포스포에놀피루브산	글리세르알데히드-3-포스페이트
페닐이소세린	디히드록시아세톤 포스페이트
4-히드록시쿠마린	글리신
글루타민	에틸 아세테이트
오르니틴	메틸 신나메이트
메티오닌	칼슘 아세테이트
쉬키미산	DL-글리세르알데히드-포스페이트 유리산
옥소글루탐산	칼슘 벤조에이트
DL-3-아미노-3-페닐프로피온산	옥소글루탐산
α-페닐알라닌	포스포에놀피루브산
β-페닐알라닌	넬름
N-벤조일페닐이소세린	캄브렌 A
제라니올	베르티시톨
리나롤	베르시셀렌
제라닐 리나롤	아비에트산
이소보리닐 이소발레이트	숙신산
신나밀 아세테이트	푸마르산
신나밀 프로피오네이트	아세토아세테이트 칼슘염
신나밀 클로라이드	

[0277]

[0278] [표 1ea]

억제제	
리조비톡신	트란스-3,4-디플루오로신남산
a-카나린	메르캅토에탄올
a-아미노이소부티르산	4-히드록시쿠마린
시스-프로페닐포스폰산	신나물플루오렌
플루프리미돌	2-시아노-4-히드록시신남산
클로로메틸 시클로프로판	신나밀리덴말론산
디아조시클로펜타디엔	4-디메틸아미노신남산
디아모늄 숙시네이트	N-신나밀피페라진
g-글루타밀메틸아미드	N-트란스-신나모일이미다졸
2,3-디메르캅토숙신산	신나밀리덴아세트페논
p-니트로페닐포스페이트	3,4-메틸렌디옥시 신남산
페르바나메이트	3,4-메틸렌디옥시-6-니트로신남산
오르토바나메이트	3-(3,4-메틸렌디옥시페닐) 프로피온산
N-아세틸-DL-호모시스테인 티오락톤	3,4-메틸렌디옥시페닐아세트산
2,3-디포스포글리세르산 염	3,4-트란스-디메톡시신남산
p-히드록시머큐릴벤조에이트	4-메톡시신남산
메틸머큐리 클로라이드	2-메톡시신남산
메틸시클로프로판	4-니트로신남산 에틸 에스테르
메틸시클로프로판 카복실레이트	메톡시신남산
시클로옥도인	4-니트로신남알데히드
메톡시비닐 글리신	3-니트로신남산
이부프로펜	2-니트로신남산
피페로닐산	3,4-디메톡시-6-니트로신남산
페닐프로피올산	암모늄 옥살레이트
L-2-히드록시-3-페닐프로판산	시남산
아미노 옥시아세트산	2-히드록시-4,6-디메톡시벤조산
D-페닐알라닌	3-디메틸아미노벤조산
페닐피루브산	3,4-디메톡시벤조산
L-티로신	4-메톡시벤조산
4-플루오로-(1-아미노-2-페닐에틸)	N(G)-니트로-D-아르기닌
포스폰산	N(G)-니트로-L-아르기닌
4-히드록시페닐피루브산	말론산
m-플루오로-DL-페닐알라닌	말레산 히드로지드
p-플루오로-DL-페닐알라닌	오카다산
m-플루오로-DL-티로신	1,4-시클로헥산디온
3,4-디플루오로-D-페닐알라닌	디이소프로필 플루오로포스페이트
1-아미노벤조트리아졸	옥삼산
4-플루오로신남산	옥삼산 유도체
SKF-525A	설파닐아미드
디에틸디티오카르바민, 나트륨염	N-아세틸-S-파네실-L-시스테인
디티오트라이올	캐토멜산 A, 나트륨염
p-쿠마르산	
비닐이미다졸	

[0279]

[0280] [표 1eb]

억제제	
a-히드록시파네실포스폰산	이소니코틴산 히드라지드
N6-모노메틸-L-아르기닌	2,3-디메르캅토프로파놀
7-니트로온다졸	살리실히드록시아민산
노르플루라존	3-아미노-4-히드록시벤젠술폰산
시클로옥토디엔-a-플루오로페닐알라닌	히드록시우레아
디에틸디티오카르밤산	6,7-디메톡시-1,2-벤즈이속사졸-3-아세트산
SKF-7997[트리스-(2-디에틸아미노에틸)-포스페이트 트리클로라이드]	3-옥소-1,2-벤즈이소티아졸린-2-일아세트산
트리아디메폰	2,3,5-트리아도벤조산
2,3,4-트리메톡시신남산	2-(p-클로로페녹시)-2-메틸프로피온산
2,4-디메톡시신남산	N-(1-나프틸)프탈아민산
3-히드록시페닐아세트산	1-피레녹시벤조산
4-아미노트리아졸	2-클로로-9-히드록시플루오렌-9-카르복실산
4-플루오로신남산	클로로콜린 클로라이드
4-클로로-2-메틸페녹시아세트산	2'-이소프로필-4'-(트리메틸암모늄 클로라이드)-5-메틸 페닐페페리돈 카르복실레이트
1,3-디클로로프로판	세사몰
N-에틸말레이미드	안시미돌
세미카르바지드	다미노지드
4-클로로레스르시놀	로바스타틴
1,2-디클로로프로판	심바스타틴
이도아세트아미드	카페인산
페닐히드라진	페롤산
티오황산은	2,5-디히드록시신남산
티오세미카르바지드	2,5-디히드로메톡시신남산
N-(포스포노메틸)-글리신	4-핵실레스르시놀
p-클로로페녹시이소부티르산	세틸피리뎀 클로라이드
트리톤 x-100	스토우로스포린
트리파라놀	디메틸티오우레아
클로로포늄 클로라이드	페닐프로피올산
메피쿠아트	암모늄 옥살레이트
프로헡사딘 칼슘염	1-아미노벤조트리아졸
클로로메쿠아트	1-비닐이미다졸
테트시클라시스	메르캅토포탄올
2-아자-2,3-디히드로스쿠알렌	3,5-다이도-4-히드록시벤조산
디노코나졸	5-메틸-7-클로로-4-에톡시카르바닐메톡시-2,1,3-벤조티아디아졸
트리데모르프	브로모크시닐
2,3-이미노스쿠알렌	3,4,5-트리클로로페놀
클리포신	N-메틸말레이미드
이소프로필-N-페닐 카르바메이트	4-플루오로-DL-티로신
오리자린	에틸-3-니트로신나메이트
카페인	
D-아르기닌	
a-메틸오르니틴	
코나바닌	
엡시스산	
3-아미노-1,2,4-트리아졸	

[0281]

[0282] [표 1ec]

억제제	
4-니트로신남산	N-(4-히드록시페닐)글리신
3,4-디메톡시페닐아세트산	3-(4-히드록시페닐)프로피온산
N-신나밀피페라진	3-(2-히드록시페닐)프로피온산
히드록실아민	4-시클로헥산디온
2,4-디니트로페닐히드라진	N-(6-아미노헥실)-5-클로로-1-나프탈렌설풀
테트라메틸암모늄 브로마이드	폰아미드 히드로클로라이드
클로트리아졸	엔도탈
발리노신	포스판
프로카인	시아나미드
모넨신	α -(1-메틸에틸)- α -(4-트리플루오로메톡시)페닐-5-피리딘메탄올
유니코나졸	2-아미노이소부티르산
파클루부타졸	D-아르기닌
4-아미노부리아졸	n-부틸아민
벤질 이소티오시아네이트	p-클로로머큐리벤젠 설풀산
셀레노메티오닌	메틸글리옥살 비스(구아닐 히드라존)
1-아세틸-2-티오우레아	α -메틸 오르니틴
3,4-데히드로-DL-프롤린	코나바닌
2-에틸나프탈렌	메틸아세틸렌 푸트레신
3-니트로벤조산	메틸피루브산
염화은, 질산은 등과 같은 은염	α -히드록시-2-피리딘메탄-설풀산
나트륨 히드로설파이트	아세토헬드록삼산
7-니트로나도졸	이소프로필-N-페닐 카르바메이트
에티오닌	DI-페닐렌 요오도함
아자시티딘	2-아미노인단-2-포스폰산
에톡시-카르보닐-피리미딘	칼륨 아르세네이트
미코나졸	α -아미노옥시- β -페닐프로피온산
2,3:4,6-디-O-이소프로필리덴-2-케토-L-G-글루콘산	벤질 히드록실아민
	피페로닐 부톡사이드

[0283]

[0284] [표 1fa]

자극제	
칼륨 피로포스페이트	p-아미노히푸르산
나트륨 피로포스페이트	벤질신나메이트
우라실	자스몬산
멜라토닌	메틸 자스모네이트
히드록실아민 히드로클로라이드	디히드로이소자스몬
티오니코틴아미드	이소자스몬
S-아데노실-L-메티오닌	시스-자스몬
이노신 트리포스페이트	테트라히드로자스몬
인돌-3-락트산	시스-자스몬의 락톤
인돌-3-피루브산	디히드로자스몬
인돌-2-카복실산	자스미노락톤
인돌-3-알데히드	자스모락톤
N-인돌릴 아세틸 발린	12-옥소피토티에논산
퍼리독살 포스페이트	자스모놀
메틸 디히드로자스모네이트	g-메틸테카라톤
비피리딜	시트로넬릴 티글레이트
4-아세타미도페놀	자스모닐 아세테이트
이미다졸	마스토파란
옥틸-β-D-글루코피라노시드	리소포스파티드산
3-아미노피리딘	시페메트린
구아닐산	칸타리딘
시티딜산	아세틸살리실산
이소프로필-β-d-티오갈락토피라노시드	살리실산 및 유도체
3-(4-히드록시페닐)프로피온산	2,6-디클로로이소니코틴산
3-(2-히드록시페닐)프로피온산	니트릭 옥사이드
인돌-3-피루브산	트라우마트산
티오벤조산	시트르산
디메틸아미노페닐알라닌	시티딜산
p-히드록시페닐피루브산	말산 또는 말산염
2,3-디히드록시벤조산	칼륨 말레이트
에틸 벤조에이트	시트르산염 및 유도체
3,4-디히드록시신남산	플라빈 아데닌 모노뉴클레오티드
4-히드록시신남산	플라빈 모노클레오티드
N-아세틸-L-페닐알라닌	디부틸릴 시클릭 AMP
3-벤조일프로피온산	스페르민
p-히드록시신남산	스페르미딘
5',5'-디티오비스(2-니트로벤조산)	푸트레신
β-히드록시피루브산	카다바린
4-히드록시페닐피루브산	S-아데노실메티오닌
메틸 신나메이트	퍼리독살 포스페이트
메틸 살리실레이트	6-아미노니코틴아미드
2-나프틸벤조에이트	4-디메틸아미노피리딘
페닐살리실레이트	N-(2-히드록시에틸)숙신이미드
티오살리실산	2-옥소글루타르산

[0285]

[0286] [표 1fb]

자극제	
프로파클로르	이소글루타민
티아민	트레오닌
비닐 프로피오네이트	칼륨 피로포스페이트
트리에틸아민 히드로클로라이드	나트륨 피로포스페이트
3,5-디이소프로필살리실산	L-2-아미노아디프산
아데닌 설페이트	N-메틸-N-프로파절벤질아민 히드로클로라이드
p-아미노-L-페닐알라닌	아미노구아니딘 헤미설페이트
벤질 살리실레이트	L-(+)-2-아미노-7-포스포노헵타논산
1,2-벤즈이속사졸	암모늄 설페이트
2,4-카르보닐디벤조산	스페르민 비스 니트릭 옥사이드 부가물
L-시트룰린	디에틸아민 비스 니트릭 옥사이드 부가물
D-에리트로스-4-포스페이트	갈락토오스
프럭토스 1,6-디포스페이트	발린
이노신 트리포스페이트	비타민 B-12
N-메틸푸트레신 디히드로클로라이드	아스코르산 및 유도체
β-페닐에틸아민 히드로클로라이드	코로나틴
리신	페노바르비탈
이미다졸	프레그네놀론
구아닐산	24-에피-브라시놀리드
멜라토닌	n-프로필 디히드로자스모네이트
아미노시클로프로판-카복실산	프로필 자스모네이트
이소펜틸피로포스페이트	에피메틸 자스모네이트
N-아세틸-L-글루타민	

[0287]

[0288] [표 2a]

표2: 텍수스 중 배양물의 배양에 사용되는 배지의 조성

배지	A	B	C	D	E	F	G
화학 성분	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
결산암모늄						400.0	600.0
황산암모늄	134.0		33.5	134.0	67.0		134.0
붕소	3.0	1.5	0.75	3.0	1.5	0.75	1.5
염화칼슘 (무수물)	113.24		28.31	113.24	56.62	172.5	113.24
염화칼슘 2-H ₂ O		20.0	50.0				
염화칼슘 4-H ₂ O		208.4				386.0	
염화칼슘 6-H ₂ O	0.026		0.006	0.025	0.0125		0.025
염화구리 H ₂ O		0.01	0.006	0.025	0.0125	0.25	0.025
황산구리 6-H ₂ O	0.025	0.01	0.006	0.025	0.0125	0.25	0.025
N _a 2 EDTA 2-H ₂ O	37.3		19.32	37.3	18.65	37.3	37.3
황산제2철		2.5					
황산제1철 7-H ₂ O	27.85		6.95	27.85	13.9	27.85	27.85
황산미그네슘 (무수물)	122.09	366.2	30.5	122.09	61.04	180.7	122.09
황산망간 H ₂ O	10.0	23.788	2.5	10.0	5.0	22.3	10.0
삼산화물리브렌		0.001					
몰리브덴산 (나트륨염) 2-H ₂ O	0.25		0.062	0.25	0.125	0.25	0.25
염화칼슘		65.0					
요오드화칼슘	0.75	0.75	0.175	0.75	0.375		0.75
황산칼륨	2500.0	80.0	625.0	2500.0	1250.0		2500.0
아시칼륨 (1염기)			10.0			170.0	
황산칼륨						990.0	
인산나트륨 (1염기 무수물)	130.5	16.5	32.62	130.5	65.25		130.5
황산나트륨		200.0					
황산이연 7-H ₂ O	2.0	3.0	0.5	2.0	1.0	8.6	2.0
미오-이노시톨	100.0	100.0	125.0	100.0	50.0	100.0	100.0
니코틴산	1.0		0.75	1.0	0.5	1.0	1.0
피리독신 HCL	1.0		0.25	1.0	0.5	1.0	1.0
티아민 HCL	10.0	5.0	3.5	10.0	5.0	10.0	10.0
*글루타민	292.8	146.4		292.8	292.8	1756.8	
*트립토판							
*페닐알라닌		30.0					
*리신		20.0					
*메티오닌			10.0				
*이세트산나트륨			10.0				
슈크로스	10000.0	60000.0	40000.0	10000.0	10000.0	10000.0	20000.0
N6 배질아데닌	0.002	2.0	2.0	0.002	0.002		
ε-니코틴아미네트산	0.931	10.0					1.862
*아스코르빈산	60.0	100.0	50.0	100.0	100.0	100.0	100.0
피클로람				1.2	2.4	1.2	
키세인 가수분해물			500.0				1000.0
6(g.g-디메틸알리미노)퓨린						10.02	
키네틴							
티아디아주론							
민토스							
*글루탐산							
*아스파르트산							
*글리신							
*세린							
*알산							
배지 pH	5.6	5.8	5.8	5.6	5.6	5.6	5.6

* 그 성분이 배지내로 밀균 여과되어야 함을 나타냄

[0289]

[0290] [표 2b]

H	I	J	K	L	M	N	O	P
mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
400.0								
	134.0	134.0	134.0	134.0	134.0	33.50	134.0	134.0
1.5	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	0.75	3.0	3.0
72.5	113.24	113.24	113.24	113.24	113.24	28.31	113.24	113.24
						50.0		
388.0								
	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.01	0.025	0.025
						0.01		
0.25	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.01	0.025	0.025
37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	8.33	37.3	37.3
27.85	27.85	27.85	27.85	27.85	27.85	6.96	27.85	27.85
180.7	122.09	122.09	122.09	122.09	122.09	30.52	122.09	122.09
22.3	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	27.50	10.0	10.0
0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.08	0.25	0.25
	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.19	0.75	0.75
	2500.0	2500.0	2500.0	2500.0	2500.0	625.00	2500.0	2500.0
170.0								
990.0								
	130.5	130.6	130.6	130.5	130.5	32.63	130.5	130.5
8.6	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.50	2.0	2.0
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	25.00	100.0	100.0
1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.25	1.0	1.0
1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.25	1.0	1.0
10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	2.50	10.0	10.0
292.8	292.8		292.8		292.8		292.8	292.8
10000.0	10000.0	10000.0	10000.0	10000.0		50000.0	10000.0	10000.0
	0.002	0.002	0.02	0.02			0.002	0.02
	0.931	0.931	1.862	1.862			0.931	1.862
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		100.0	100.0
1.2					2.4			
0.02								
					0.022			
					10000.0			
	1850.0	1850.0	1850.0	1850.0				
					1710.0			
						5.0		
						5.0		
						1.0		
5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	3.8	5.6	5.6

[0291]

[0292] [표 3]

여러가지 탁수종의 칼루스 증식을 위해 바람직한 조건
(기본 배지 중의 성분은 표 2에 나타냄)

종	기본 배지 (표 2)	성장 조절제 ^a			
		종류	옥신 농도(M)	종류	사이토키닌 농도(M)
탁수스 브레비폴리아 (<i>T. brevifolia</i>)	F	P	5X10 ⁻⁶	2iP	10 ⁻⁷
	D	P	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸
탁수스 카나덴시스 (<i>T. canadensis</i>)	H	P	5X10 ⁻⁶	K	10 ⁻⁷
	D	P	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸
탁수스 키넨시스 (<i>T. chinensis</i>)	D	P	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸
	A	N	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸
탁수스 글로보사 (<i>T. globosa</i>)	D	P	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸
탁수스 플로리다나 (<i>T. floridana</i>)	D	P	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸
탁수스 바카타 (<i>T. baccata</i>)	D	P	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸
탁수스 쿠스피다타 (<i>T. cuspidata</i>)	D	P	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸
탁수스 메디아 (<i>T. media</i>)	D	P	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸
탁수스 월리치아나 (<i>T. wallichiana</i>)	D	P	5X10 ⁻⁶	BA	10 ⁻⁸

^a 약어: 피클로람 (P), 나프탈렌아세트산 (N), 벤질아데닌 (BA)

디메틸알릴아미노푸린 (2iP), 키네티(K)

[0293]

[0294] [표 4]

탁수스종 현탁 배양의 전형적인 성장 특성

종	건조 중량	습윤중량	건조 중량	습윤중량
	배양 시간	배양 시간	밀도	밀도
탁수스 브레비폴리아	2.0일	3.5일	20g/L	400g/L
탁수스 바카타	2.0	6.0	15	220
탁수스 키넨시스	2.5	4.5	20	285
탁수스 카나덴시스	nd*	8.5	13	260

* 미결정

[0295]

[0296] [표 5]

다양한 탁수스 종에서의 탁술 생성

종	탁술 합량 (건조 중량%)	배지 (표 2 및 3참조)	분석
티. 브래비폴리아	0.006	F	ELISA
티. 카나덴시스	0.004	H	ELISA
티. 바카타	0.0014	D	HPLC
티. 글로보사	0.0003	G	ELISA
티. 쿠스피데이타	0.0025	G	HPLC
티. 플로리다나	0.001	G	ELISA
티. 메디아	0.02	F	ELISA
티. 키넨시스	0.18	B	HPLC

[0297]

[0298] [표 6]

배지 교환 처리로 인한 생산성의 향상

숫자는 15일의 배지 간격으로 얻어진 농도에 대한 X배 증진으로서 표현되었다.
탁수스 키넨시스 세포주 K-1은 어두운 곳의 배지 A에서 배양하였다

	총 농도*	세포의 농도
탁술	4.6	4.89
총 탁산	4.55	5.94

* 세포 및 혼합 배지에서의 총 농도

[0299]

[0300] [표 7]

배지A에서 배양한 탁수스 키넨시스 세포주 K-1의 10일 배양물 중의 탁술 및 탁산 함량에 미치는 표준 GroLux 명소 처리의 효과. 나타낸 양은 현탁액 20ml로부터 추출된 μg 으로 표시하였다. 세포 성장은 두 처리 방법 모두 동일하였다(플라스크 당 건조 중량으로 164mg)

	명소	암소
총 탁술: 세포 및 배지:	8.8 μg	3.13 μg
세포 외 탁술:	76.40%	56.20%
총 탁산: 세포 및 배지:	61.55 μg	62.17 μg
세포 외 탁산:	89%	84%

[0301]

[0302] [표 8]

배지 C에서 15일간 배양한 후 탁수스 키넨시스 세포주 K-1의 비유발 현탁액과 키토산-글루타메이트 처리물의 비교
(기록된 탁산 농도는 세포와 배지를 합친 것으로부터 얻은 값이다. % Extra는 세포의 생성물의 백분율을 의미한다.)

	대조군			유발물		
	세포밀도 10.1 g/L 세포생존율 70-80% 생존			세포밀도 14.2 g/L 세포생존율 75-80% 생존		
탁산	% 건조중량	mg/L	% Extra	% 건조중량	mg/L	% Extra
탁솔	0.054	5.4	7.2	0.098	13.9	85.0
바카틴 III	0.507	5.8	69.9	0.055	7.8	76.6
7-크실로실-10-테아세틸탁솔	0.040	4.0	63.0	0.048	6.9	77.0
10-테아세틸탁솔	0.004	0.4	71.1	0.0	1.0	75.3
세팔로만닌						
10-테아세틸바카틴 III						
10-테아세틸-7-에피탁솔	0.054	5.4	74.2	0.076	10.8	85.7
7-에피탁솔	0.009	0.9	74.6	0.009	1.3	86.2
미지 탁산	0.203	20.5	79.7	0.240	34.1	90.2
총 탁산	0.421	42.4		0.533	75.8	

[0303]

[0304] [표 9]

탁수스 키넨시스 현탁액 세포주 K-1에서 탁산 및 탁솔의 생합성을 향상시키기 위한 영양 배지 조작. 배지 5 ml 당 습윤 중량 500 mg의 세포를 접종하고 암실에서 18일간 배양하였다. (세포 및 배지에서) 생산된 총 탁산을 기록하였다. 배지 B와 C 중의 성분들은 상기 표 2에 나타내었다.

탁산 농도	배지 B (mg/l)	배지 C (mg/l)
바카틴 III	4.3	3.9
7-크실로실 10-테아세틸 탁솔	8.3	12.9
세팔로만닌	1.1	미량
10-테아세틸 7-에피 탁솔	4.6	5.4
탁솔	24.1	21.3
7-에피 탁솔	1.3	2.8
기타 미지 탁산*	56.1	63.7
총 탁산	99.8 mg/l	110 mg/l

[0305]

[0306] [표 10]

은에 의한 탁수스 키넨시스 세포주 KSIA의 탁산 생합성 증진

은 화합물	용량 (μM)	mg/L 세포의 생성물**		
		바카틴 III	탁솔	총 탁산
배양 배지만 존재		16	5	21
* 티오황산은	50	71	15	86
인산은	100	48	7	55
베조산은	20	40	7	47
황산은	20	61	7	68
플루엔퀴산은염	20	39	6	45
연화은	10	22	18	40
산화은	50	43	18	61
아세트산은	10	52	10	62
질산은	20	63	6	69

* 배양 배지는 표 2에 나타난 배지 N이었으며, 다음 성장 조절제를 첨가하였다: 10 μM α-나프탈렌아세트산, 및 1 μM 티디아주론
** 모든 시료는 배양한 지 14일 후에 취하였다.

[0307]

[0308] [표 11]

몇가지 탁수스 키넨시스 세포주에서의 은에 의한 탁술 및 탁산의 생합성 증진 (역가는 전체 브로스, 즉 세포 및 세포의 배지에서 측정된 농도를 나타냄)

세포 배양물	은 ^a 농도	배양 배지	지속기간 (일)	바카틴 III mg/L	탁술 mg/L	기타 탁산 mg/L	총 탁산 mg/L
SS6A-1224	0	I ^b	30	10	48	23	81
SS6A-1224	50 μM	I	30	172	86	126	384
SS122-13	0	II ^c	14	2	21	10	33
SS122-13	50 μM	II	14	12	103	60	173
SS122-42	0	II	14	3	80	26	109
SS122-42	50 μM	II	14	4	146	38	188

^a 티오황산은으로 첨가
^b 배양 배지는 표 2의 배지 N이었으며, 성장 조절제인 α-나프탈렌아세트산을 10 μM의 농도로 첨가하였다.
^c 배양 배지는 표 2의 배지 N이었으며, 성장 조절제인 α-나프탈렌아세트산을 10 μM의 농도로, 티디아주론을 1 μM의 농도로 첨가하였다.

[0309]

[0310] [표 12]

자스몬산 및 이의 메틸 에스테르에 의한 탁술 및 탁산의 생합성 증진 (탁산 역가는 배양한 지 14 일 후에 전체 브로스에서 측정하였고, 배양 배지는 성장 조절제인 α-나프탈렌아세트산을 10 μM의 농도로 첨가한 표 2의 배지 N임)

세포 배양물	자스모네이트 농도	바카틴 III mg/L	탁술 mg/L	기타 탁산 mg/L	총 탁산 mg/L
SS122-42	0	3	80	26	109
SS122-42	200 μM JMA	4	120	87	211
SS122-42	89 μM MJS	3	121	109	233
SS122-13	0	2	21	10	33
SS122-13	89 μM MJS	9	73	63	124

^a JMA는 유리산을 나타내며, MJS는 메틸 자스모네이트를 나타낸다.

[0311]

[0312] [표 13]

3,4-메틸렌디옥시-니트로신남산(MDNA)에 의한 탁술 및 탁산의 생합성 증진 (탁산 농도는 배양한 지 14일 후에 전체 브로스에서 측정하였고, 사용한 세포주는 탁수스 키넨시스 SS122-42임)

MDNA 농도	배양 배지 ^a	바카틴 III mg/L	탁술 mg/L	기타 탁산 mg/L	총 탁산 (mg/L)
0	I	3	80	26	109
50 μM	I	5	163	45	213
50 μM	II	34	311	89	434

^a 배양 배지 I는 성장 조절제인 α-나프탈렌아세트산을 10 μM 농도로 첨가한 표 2의 배지 N이다. 배양 배지 II는 배양 배지 I과 동일하나, 티오황산은 50 μM이 더 존재한다.

[0313]

[0314] [표 14]

다양한 증강제 배합물을 이용한 탁수스 키네틱스의 세포 배양에서의 탁솔 및 탁산의 증진 (모든 탁산 농도는 전체 브로스, 즉 세포 및 배지 중 농도를 합한 것으로 나타내고, 값은 배양한 지 11일 후에 얻었다)

세포 배양물	배양 배지 ^a	바카틴 III mg/L	탁솔 mg/L	기타 탁산 mg/L	총 탁산 (mg/L)
SS64-412	I	41	464	101	606
SS64-561	II	590	182	388	1160
SS64-571	III	596	158	261	1015
SS124-77	IV	72	39	576	687
SS122-29	V	18	306	152	476
SS85-26	VI	586	100	416	1102

^a 모든 배합물에 대한 배양 배지는 표 2의 배지 N이었다. 배양 배지 I은 배지 N이외에 10 μM α-나프탈렌아세트산(NAA), 3 μM 티아디아주론(TDZ), 50 μM 3,4-메틸렌디옥시-6-니트로신남산(MDNA), 89 μM 메틸 자스모네이트(MJS), 및 50 μM 티오황산은(SLTS)을 함유하였다. 배양 배지 II는 배지 N이외에 10 μM NAA, 1 μM TDZ, 50 μM MDNA, 89 μM MJS, 10 μM SLTS 및 추가 98.5 mg/L의 인산나트륨(1염기)을 함유하였다. 배양 배지 III은 배지 N이외에 10 μM 인돌부티르산, 3 μM TDZ, 30 μM 3,4-메틸렌디옥시-6-신남산, 89 μM MJS, 및 50 μM SLTS를 함유하였다. 배양 배지 IV는 배지 N이외에 10 μM NAA, 89 μM MJS, 100 μM SLTS 및 5 mM 글루타민을 함유하였다. 배양 배지 V는 배지 N이외에 10 μM NAA, 89 μM MJS 및 50 μM SLTS를 함유하였다. 배양 배지 VI은 배지 N이외에 10 μM NAA, 1 μM TDZ, 50 μM MDNA, 18 μM MJS, 50 μM SLTS 및 5 mM 글루타민을 함유하였다.

[0315]

[0316] [표 15]

배지 교환에 의한 탁산의 생산 증진

세포주	배양 배지 ^a	조작 유형 ^b	지속 기간 (일)	생성물 ^c	생성물 농도 ^d (mg/L)	평균 부피 생산성 ^e (mg/L/일)
펠라(Paella)	I	배치식 배지 교환	11	탁솔	185	13
	I		20	탁솔	265	17
SS29-3A5	II	배치식 배지 교환	14	바카틴 III	260	18
	II		28	바카틴 III	580	21
SS29-3A5	II	배치식 배지 교환	22	10-데아세틸-바카틴	300	14
	II		28	III	400	14
SS45-146	III	배치식 배지 교환	11	III	700	64
	III		28	총 탁산	2500	89

^a 이들 배양 조건에 대한 배양 배지는 표2의 배지 N이었다. 배양 배지 I은 배지 N이외에 10 μM α-나프탈렌아세트산(NAA), 1 μM 티디아주론(TDZ), 50 μM 3,4-메틸렌디옥시니트로신남산(MDNA), 18 μM 메틸 자스모네이트(MJS) 및 10 μM 티오황산은(SLTS)을 함유하였다. 배양 배지 II는 배지 N이외에 10 μM NAA, 1 μM TDZ, 50 μM MDNA, 89 μM MJS, 10 μM SLTS 및 5 mM 글루타민(일칼륨염)을 함유하였다. 배양 배지 III은 배지 N이외에 10 μM NAA, 2.5 μM 제아틴, 30 μM MDNA, 89 μM MJS 및 50 μM SLTS를 함유하였다.

^b 실시예 14에서 설명한 바와 같이, 배지 교환에 의해 반복적인 증진이 이루어졌다.

^c 특정 배양 배지하에서 주어진 세포주가 생성하는 주요 생성물을 나열하였다: 세포주 SS45-146을 제외하고 각 경우에 주요 생성물 이외의 탁산이 생성되었으며, 총 탁산 생성을 표시하였다.

^d 배치식 배양에 대한 생성 농도는 세포의 농도, 즉 세포의 배지에서 측정되는 탁산의 양을 세포의 배지의 부피로 나눈 값을 의미한다. 배지 교환에 의한 반복적인 증진의 경우, 생성물 농도는 각 배지 교환 후에 세포의 배지에서 측정되는 탁산의 총량의 현탁액 부피로 나눈 값을 의미한다.

^e 평균 부피 생산성은 생합성 능력의 지표이며, 이는 총 생성량을 현탁액 부피로 나누고, 배양 지속 기간으로 다시 나눈 값이다.

[0317]

[0318] [표 16a]

공급 배치 조작에 의한 탁솔 및 탁산의 생산 증진

세포주	배양 배치 ^a	조작 유형	공급 배치 성분 ^b	총 배양 지속기간 (일)	바카틴 III (mg/L) [*]	탁솔 (mg/L)	기타 탁산 (mg/L)	총 탁산 (mg/L)
CR-128	A	배치식	---	24	152	134	203	489
	A	공급 배치	F1	24	257	200	295	752
	A	공급 배치	F2	24	254	316	427	997
SS36-245	B	배치식	---	31	170	80	190	440
	B	공급 배치	F3	31	50	212	198	460
	B	공급 배치	F4	31	56	412	348	816
SS36-359	C	배치식	---	21	220	155	163	538
	C	공급 배치	F5	21	439	182	304	925

^a 모든 세포주에 대한 배양 배치는 배치 N (표 2)이었다. 또한, 배양 배치 I은 10 μM α-나프탈렌아세트산(NAA), 30 μM 3,4-메틸렌디옥시-6-시트로신남산(MDNA), 18 μM 메틸 자스모네이트(MJS), 및 50 μM 티오황산은(SLTS)을 함유하였다. 배양 배치 II는 배치 N이외에 10 μM NAA, 50 μM MDNA, 50 μM SLTS 및 1 μM 티디아주론(TDZ)을 함유하였다. 배양 배치 III은 배치 N이외에 10 μM NAA, 1 μM TDZ, 50 μM MDNA, 50 μM SLTS, 89 μM MJS를 함유하였다.

^b 모든 탁산 값은 전체 브로스 역가를 의미한다: (세포 중 mg 탁산+세포외 배지중 mg 탁산)/총 배양물 부피(L)

[0319]

[0320] [표 16b]

표 16a에 게시된 공급 배치 조작의 상세한 사항

공급 용액	조성	공급 속도 (mg/L/일)	공급 개시 (일)	공급 지속기간 (일)
F1	25%(중량/부피)(w/v) 프럭토스, 25 mM 글루타민, 50 μM NAA, 250 μM SLTS, 89 μM MJS, 1.48 mM 염화칼슘, 0.63 mM 황산마그네슘, 0.68 mM 인산나트륨(1염기)	10	7	17
F2	F1, 75 mM α-페닐알라닌, 25 mM β-페닐알라닌	10	7	17
F3	25%(w/v) 프럭토스, 150 mM α-페닐알라닌, 25 mM β-페닐알라닌	10	6	25
F4	50%(w/v) 글루코스, 5.92 mM 염화칼슘, 2.52 mM 황산마그네슘, 2.72 mM 인산나트륨(1염기), 500 μM SLTS, 10 μM TDZ, 100 μM NAA, 150 mM α-페닐알라닌, 50 mM β-페닐알라닌	5	9	22
F5	50%(w/v) 글루코스, 100 μM NAA, 10 μM TDZ, 500 μM SLTS, 89 μM MJS, 0.68 mM 인산나트륨(1염기), 50 mM α-페닐알라닌	5	12	9

[0321]

[0322] [표 17]

다양한 증강제 배합물을 사용한 탁수스 키넨시스 세포 배양에서의 탁솔 및 탁산의 증진 (모든 탁산 농도는 전체 브로스 역가(즉, 세포내 농도와 배지 농도를 합함)로서 나타냄)

세포 배양물	배양 배지 ^a	지속기간 (일)	바카틴 III (mg/L)	탁솔 (mg/L)	기타 탁산 (mg/L)	총 탁산 (mg/L)
SS122-41	I	20	106	374	158	638
SS122-41	J ^b	20	7	507	148	662
SS122-30	II	14	27	279	226	532
cr427	III	14	13	302	125	440
cr452	IV	14	11	190	95	296
cr452	V	14	4	172	67	243
cr857	I	24	116	531	258	905
cr914	VI	14	260	436	312	1008

^a 모든 배양물에 대한 배양 배지는 1차 탄소원이 하기에 기재된 바와 같이 다른 공급원에 의해 치환된 표 2의 배지 N이었다. 배양 배지 I은 슈크로스 대신에 100 g/L 말토스를 포함하며, 또한 20 μM α-나프탈렌아세트산(NAA), 40 μM 3,4-메틸렌디옥시니트로신남산(MDNA), 45 μM 메틸 자스모네이트(MJS), 100 μM 티오황산은(SLTS), 및 5 mM 글루타민을 함유하였다. 배양 배지 II는 슈크로스 대신에 50 g/L의 말토스를 포함하며, 또한 10 μM NAA, 40 μM MDNA, 100 μM MJS 및 75 μM SLTS를 함유하였다. 배양 배지 III은 슈크로스 대신에 50 g/L 말토스를 포함하며 또한 20 μM NAA, 40 μM MDNA, 45 μM MJS, 100 μM SLTS 및 5 mM 글루타민을 함유하였다. 배양 배지 IV는 슈크로스 대신에 50 g/L의 락토스를 포함하며, 또한 20 μM NAA, 40 μM MDNA, 45 μM MJS, 100 μM SLTS 및 5 mM 글루타민을 함유하였다. 배양 배지 V는 슈크로스 대신에 40 g/L의 갈락토스를 포함하며, 또한 20 μM NAA, 40 μM MDNA, 45 μM MJS, 100 μM SLTS 및 5 mM 글루타민을 함유하였다. 배양 배지 VI은 슈크로스 대신에 70 g/L의 말토스를 포함하며, 또한 20 μM NAA, 40 μM MDNA, 45 μM MJS, 100 μM SLTS 및 5 mM 글루타민을 함유하였다.

^b 습윤 중량 밀도는 26% (w/v)였다.

[0323]

[0324] [표 18a]

공급 배지 조작에 의한 탁솔 및 탁산의 생산 증진

세포 배양물	배양 배지 ^c	조작 유형	공급 배치	바카틴 III (mg/L) ^d	탁솔 (mg/L)	기타 탁산 (mg/L)	총 탁산 (mg/L)
SS122-41 ^a	A	배치식	—	120	225	123	468
	A	공급 배치	F1	32	476	171	679
	A	공급 배치	F2	27	501	180	708
SS122-41 ^b	B	배치식	--	7	507	148	662
	B	공급 배치	F3	66	902	251	1219

^a 접종 밀도는 20%(w/v)였다.

^b 접종 밀도는 26% (w/v)였다.

^c 모든 세포주에 대한 배양 배지는 표 2의 배지 N이었다. 여기서, 대체하지 않으면 1차 탄소원은 슈크로스였다. 또한, 배양 배지 A는 20 μM α-나프탈렌아세트산(NAA), 40 μM 3,4-메틸렌디옥시니트로신남산(MDNA), 45 μM 메틸 자스모네이트(MJS) 및 100 μM 티오황산은(SLTS)과 5 mM 글루타민을 함유하였다. 배양 배지 B는 슈크로스 대신에 100 mg/L의 말토스를 포함하며, 또한 20 μM NAA, 40 μM MDNA, 45 μM MJS, 100 μM SLTS 및 5 mM의 글루타민을 함유하였다.

^d 표 18b에서 언급

^e 모든 탁산 값은 전체 브로스 역가를 의미한다: (세포중 탁산 mg+세포외 배지 중 탁산 mg)/총 배양 부피(L)

[0325]

[0326] [표 18b]

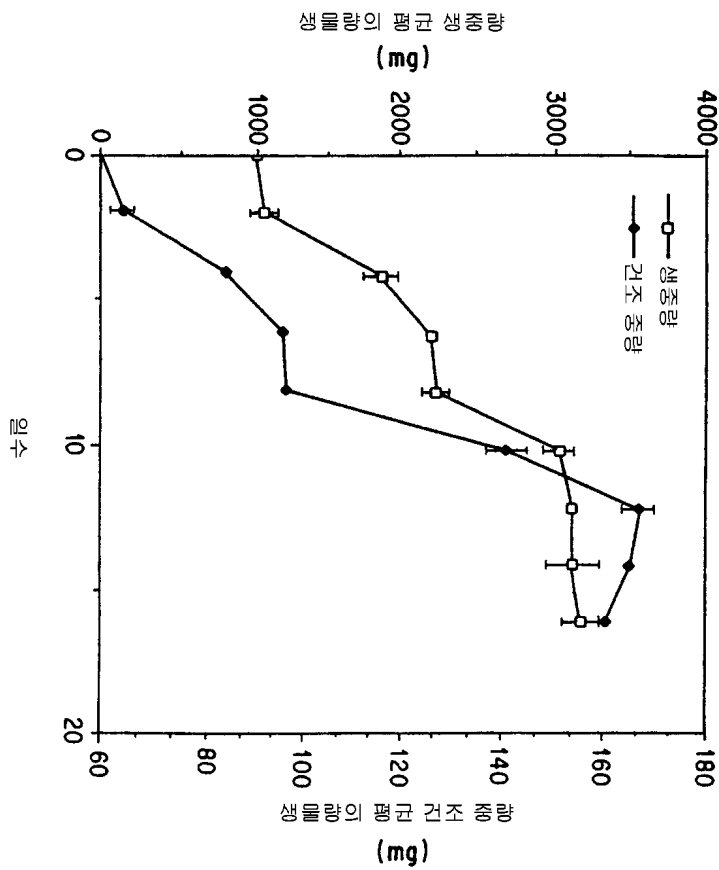
표 18a에 기재된 공급 배치 조작의 상세한 사항

공급 용액	조성	공급 속도 (mL/L/일)	공급 개시 (일)	공급 배치 지속 기간 (일)
F1	50%(중량/부피)(w/v) 프 럭토스, 50 mM 글루타민	8	10	11-21
F2	50%(w/v) 말토스, 50 mM 글루타민	8	10	11-21
F3	50%(w/v) 말토스, 200 μ M NAA, 450 μ M MJS, 50 mM 글루타민	8	10	10-20

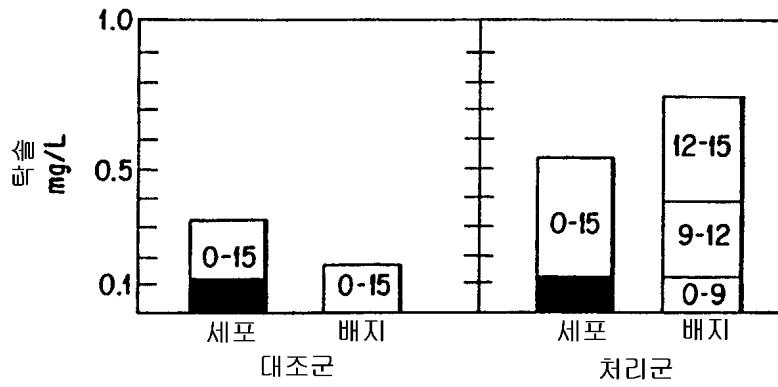
[0327]

도면

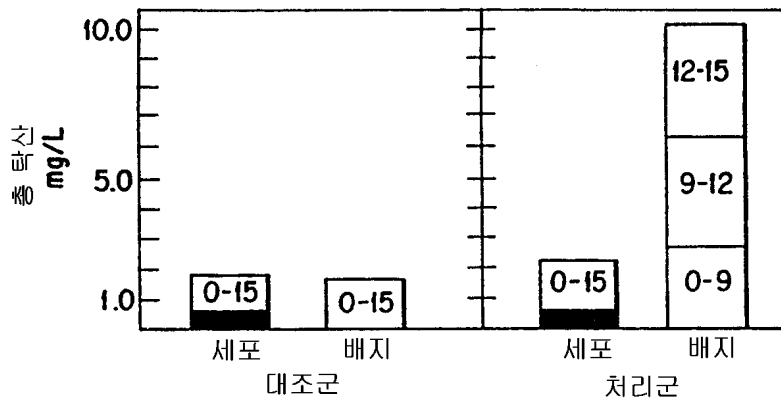
도면1



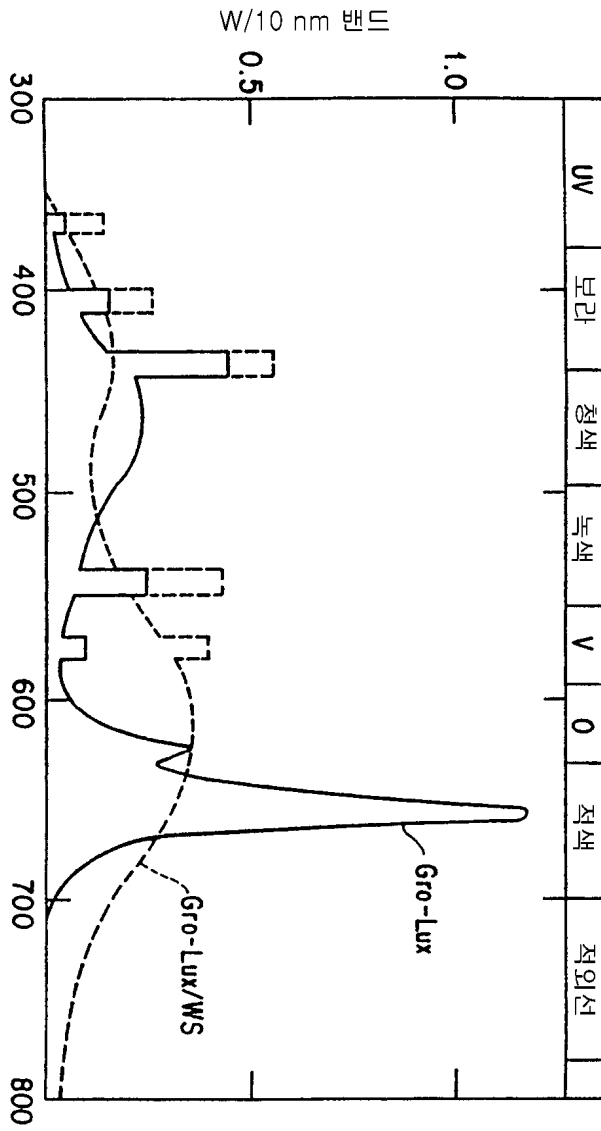
도면2a



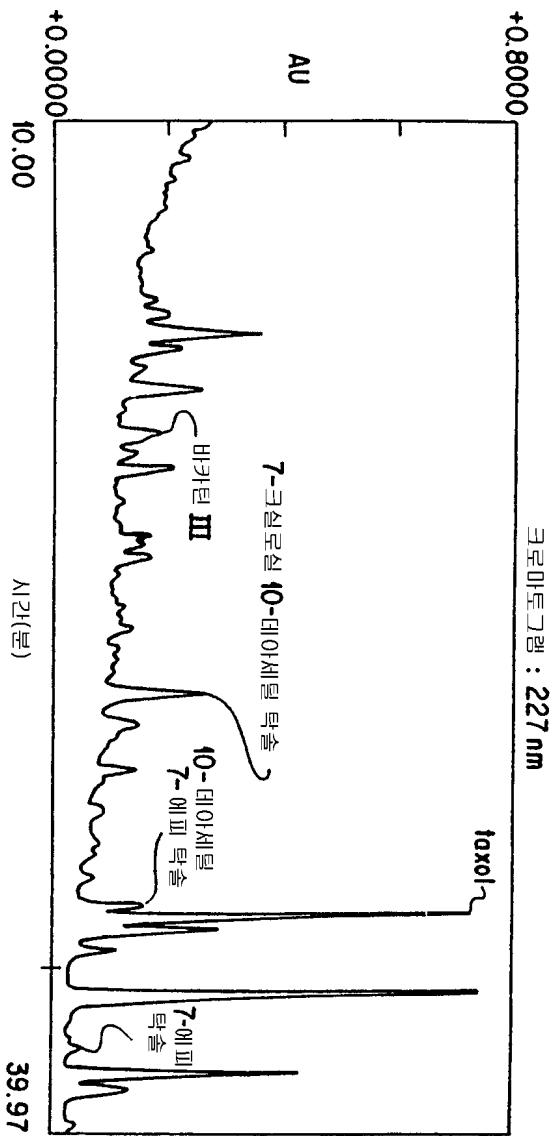
도면2b



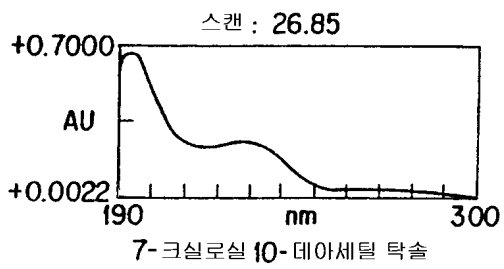
도면3



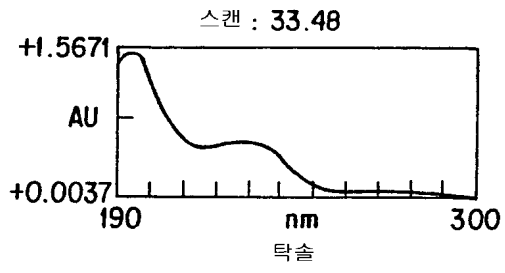
도면4a



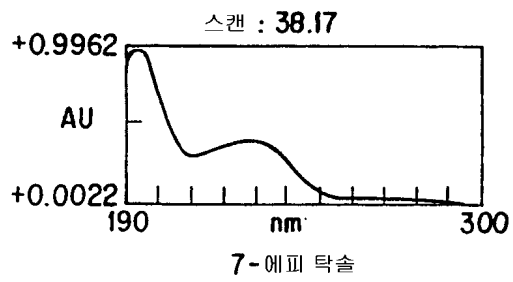
도면4b



도면4c



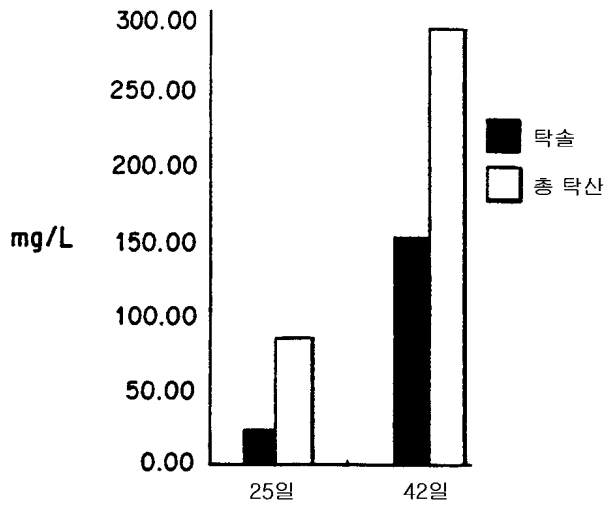
도면4d



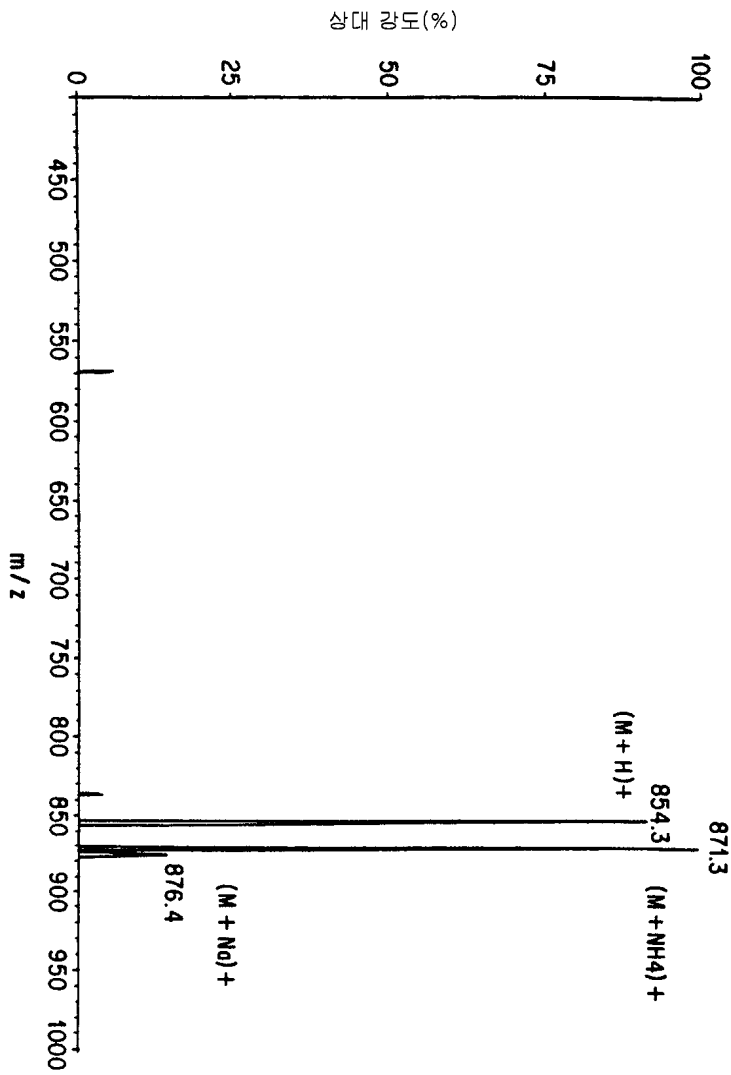
도면5a

		25일		42일		
회합물	% D. W.	mg/L	세포외 (%)	% D. W.	mg/L	세포외 (%)
10-테아세틸바카틴 III	0.0000	0.00		0.0000	0.00	
바카틴 III	0.0184	10.43	10.57	0.0420	19.83	14.72
7-크실로실-10-테아세틸 탁솔	0.0127	7.19	24.62	0.0283	13.38	45.81
10-테아세틸 탁솔	0.0122	6.95	17.37	0.0127	5.99	0.00
세벨로 안닌	0.0000	0.00		0.0119	5.60	86.02
10-테아세틸-7-에피탁솔	0.0081	4.61	62.42	0.0275	12.99	72.59
탁솔	0.0427	24.25	70.95	0.3244	153.34	87.52
7-에피탁솔	0.0122	6.92	84.61	0.0154	7.26	85.28
총계-미공지 확산	0.0452	25.67		0.1625	76.83	
총 탁산	0.1515	86.84		0.6245	295.23	

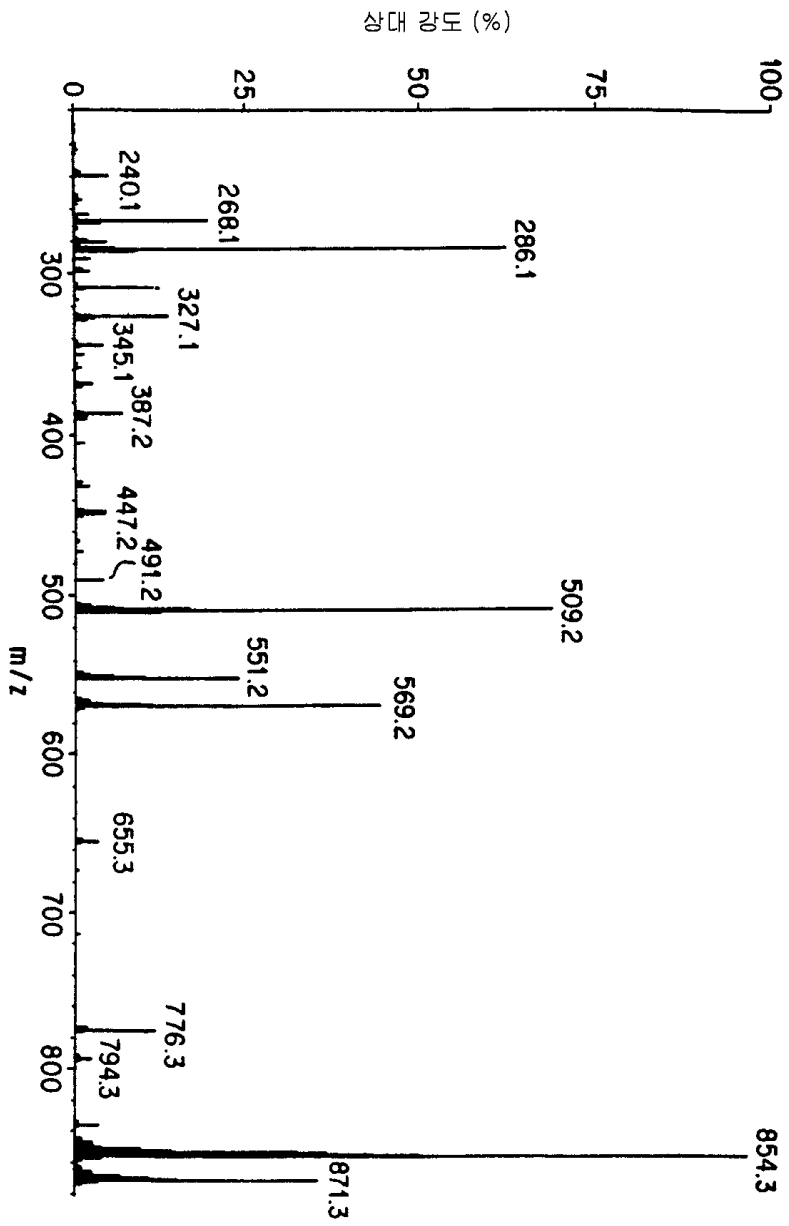
도면5b



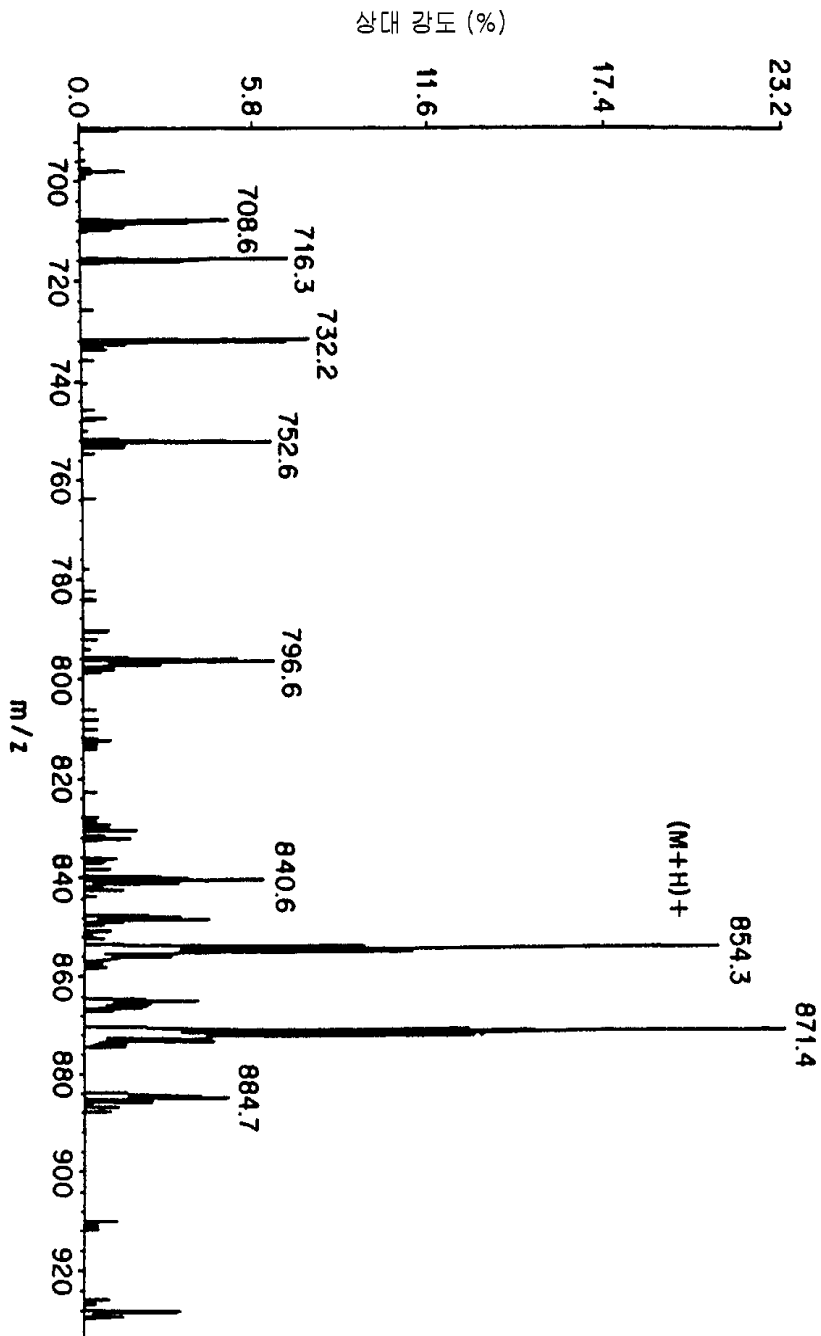
도면6a



도면6b



도면6c



도면6d

