

Paclitaxel : 산업화 단계에서의 회수 및 정제

김진현

공주대학교 화학공학부

(접수 : 2005. 11. 9., 게재승인 : 2006. 2. 23.)

Paclitaxel : Recovery and Purification in Commercialization Step

Jin-Hyun Kim

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

(Received : 2005. 11. 9., Accepted : 2006. 2. 23.)

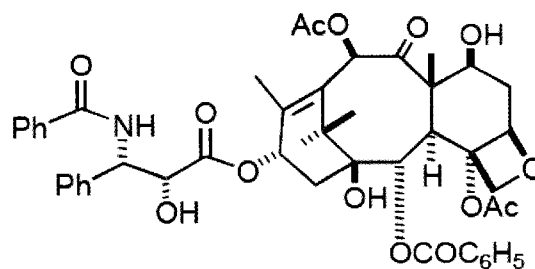
The recovery and purification of a paclitaxel from plant cell cultures is essential to commercial process. This review describes a large-scale recovery and purification method for producing paclitaxel, to guarantee high purity and yield from plant cell cultures. Also, the process of separation and purification is optimized in conjunction with a extraction step, pre-purification, purification, and polishing (drying) as an integrated process to meet final product quality requirements such as purity, residual solvents, product morphologies, impurities, bacterial endotoxin, etc. This information is very useful for production and quality control of pharmaceuticals in commercialization step.

Key Words : Paclitaxel, recovery, purification, quality requirement, commercialization

서론

Paclitaxel (Fig. 1)은 현재 가장 효과 있는 항암제 중의 하나로 1971년 Wani 등(1)에 의하여 paclitaxel의 화학적 구조가 규명되었으며 1979년 Schiff 등(2)에 의하여 항암 기작이 밝혀졌다. Paclitaxel은 그 독특한 항암기작으로 주목받았는데 기존의 항암제와는 다른 방식인 유사분열기의 암세포의 분열을 억제함으로써 비교적 낮은 독성과 강력한 항암활성으로 1990년대부터 가장 널리 사용되는 항암제이다(3). 1977년 paclitaxel에 대한 전임상 (preclinical) 시험, 1980년 paclitaxel에 대한 독성연구, 1983년 1상 임상시험, 1985년 2상 임상시험, 1990년 3상 임상시험이 각각 시작되었다(4-7). 1992년 난소암, 1994년 유방암, 1997년 Kaposi's Sarcoma에 대해 FDA (food and drug administration) 허가를 취득하여 현재 가장 중요한 항암제로 사용되고 있다. 세계 시장규모는 2조원 (2000년 기준), 국내 시장규모는 553억원 (2003년 기준) 정도이며 현재 항암제 중 시장규모 1위, 주요 항암화학치료제 시장의 22% 정도를 점유하고 있다. 폐암, 류마티스성 관절염, 알츠하이머 치료 등의 적용증이 계속 확대되고 있으며, 또한 여러 다른 치료 방법들과의 복합처방에 관한 임상시험이 진행 중에 있어 향후 paclitaxel 수요는 계속 늘어날 전망이다(6).

현재 paclitaxel은 Genexol (Samyang Genex), Taxol (Bristol-Myers Squibb), Taxotere (Sanofi-aventis) 등 여러 가지 상품명으로 판매되고 있다.



- General name : Paclitaxel (Anticancer drug)
- Chemical formula : $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (Mw : 853.9)
- CAS number : 33069-62-4
- Highly lipophilic
- Insoluble in water
- Melts at around 216-217°C

Figure 1. The chemical structure and property of paclitaxel.

Paclitaxel의 주요 생산 방법에는 세 가지가 있다. 첫째, 주목나무에서 직접 추출 (extraction)하는 방법이다(8). 주목나무에서 직접 추출하는 것으로 원료의 지속적인 공급이 어렵고 추출/정제에도 많은 어려움이 있으며 환경보호수인 주목나무 보호에도 적합하지 않은 방식이다. 둘째, 주목나무의 잎에서 전구체 (예,

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea
Tel : +82-41-850-8642, Fax : +82-41-858-2575
E-mail : jinhyun@kongju.ac.kr

baccatin III, 10-deacetylbaaccatin III, 10-deacetylpaclitaxel)를 얻어 side chain을 화학적으로 결합하는 반합성(semi-synthesis) 방법이다(9). 이 방법 역시 전구체를 주목나무에서 직접 얻어야 하므로 직접 추출의 경우와 마찬가지로 문제점들을 가지고 있다. 셋째, 주목나무에서 callus를 유도하고 종균배양(seed culture)을 거쳐 주배양기(main bioreactor)에서 식물세포를 배양하여 얻는 방법이다(10, 11). 기후, 환경 등의 외부인자에 의한 영향을 받지 않고 생물반응기 내에서 안정적으로 생산이 가능하기 때문에 일정한 품질의 paclitaxel을 대량 생산할 수 있다는 장점이 있다. 그의 방법으로 전합성(total synthesis) 방법(12)과 미생물 발효(microbial fermentation)에 의한 생산방법(13)이 있으나 paclitaxel의 수율이 낮아 상업화에는 아직 어려움이 많다.

식물세포배양으로부터 항암제 paclitaxel의 분리 및 정제는 여러 단계의 추출 및 정제 공정을 거쳐 고순도(>98%)의 제품을 생산하게 된다. 일반적으로 분리 및 정제 과정은 원료인 biomass (paclitaxel을 함유한 식물체 또는 식물세포)로부터 paclitaxel을 먼저 유기용매로 추출하고, 전 처리 공정을 거쳐 최종 정제를 통하여 제품을 생산하는 공정으로 이루어져 있다(14-21). 이 과정에서 특히 전 처리(pre-purification) 공정은 최종 정제 비용에 많은 영향을 미친다. 문헌에 보고(14, 18-20)된 공정 중에는 정제를 위한 전 처리 공정으로 고가의 크로마토그래피를 이용하거나 전 처리 없이 추출을 거친 crude 제품을 HPLC (high performance liquid chromatography)에 의해서 바로 최종 정제하여 경제적 측면에서 많은 문제가 있었으며 또한 scale-up 및 산업적 대량 생산에 많은 어려움이 따랐다. 대체로 biomass로부터 유기용매를 이용하여 paclitaxel을 추출하면 순도는 0.5% 정도이며, 간단한 전 처리 공정 후에도 10% 이하의 순도로 매우 낮다. 이러한 시료를 바로 HPLC에 의하여 최종 정제할 경우 많은 양의 유기용매 사용, column packing material (resin)의 수명 단축, 처리량 감소 등 상당히 비경제적이며 대량 생산을 위한 공정으로는 적합하지 않다. 전 처리 공정을 통하여 시료의 순도를 가능하면 높여(>50%) 주어야 최종 정제, 특히 HPLC를 이용한 정제에서의 비용을 줄일 수 있다. 본 총설에서는 식물세포 배양으로부터 생산되는 paclitaxel의 산업적 대량 생산을 위한 식물세포 회수, 추출, 전 처리, 정제 공정을 소개하고, 최종 정제 paclitaxel의 상업적 이용을 위하여 반드시 충족시켜야 할 여러 가지 specification과 증축 방법을 소개하며, 또한 최근 개발되고 있는 paclitaxel 정제 기술을 소개하고자 한다.

식물세포 및 세포배양여액으로부터 paclitaxel 회수

식물세포 회수

식물세포 (*Taxus chinensis*) 배양에 의한 paclitaxel은 식물세포와 세포분해에 의하여 생성된 식물 세포조각(cell debris)에 대부분 분포되어 있으며 여액(supernatant)에도 미량 존재하게 된다(22). 식물세포배양액으로부터 paclitaxel의 회수 및 정제 공정에서의 첫 번째 단계는 배양액으로부터 세포와 세포조각을 회수하는 것이다. 이러한 회수 공

정에서는 식물세포 회수율의 최대화와 동시에 추출공정에서의 용매 사용량을 최소화하기 위해서 회수할 세포 내의 수분함량을 최대한으로 줄여야 한다(22). 실험실 규모(<15 L 배양)에서는 주로 coarse paper (filter paper)를 이용하여 여과하는 방법으로 회수가 가능하다. 그러나 여과에 의한 세포 회수 방법은 미세한 세포조각 등에 의한 막힘 현상 때문에 scale-up에 많은 어려움이 따른다(23). 대량 생산 공정에서 세포 회수를 위하여 통상 원심분리기가 많이 이용되어져 왔다(24, 25). 특히 decanter 원심분리기의 경우 분리입자의 지름이 크고 유입 시료 내 고형물이 많으며 고/액의 비중차가 적은 난분리액용으로 적합하다(26). 식물세포의 경우 미생물, 동물 세포에 비하여 세포의 크기 분포가 다양하며(20~300 μm), 세포 배양액 내에 고형물인 식물세포의 비율이 높으며(>40%), 식물세포의 비중(<1.05)이 작기 때문에 decanter 원심분리기에 의하여 연속적으로 대용량 처리에 적합하다(27).

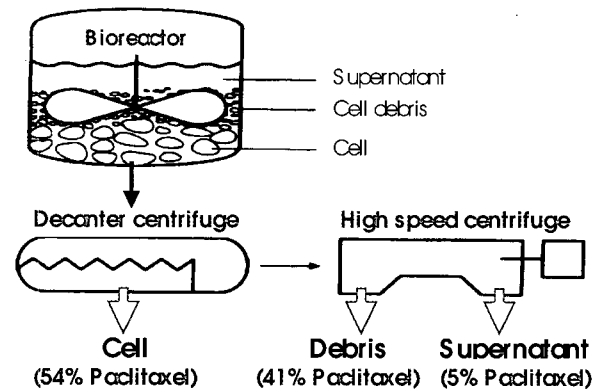


Figure 2. Schematic diagram of plant cell harvest process from culture broth for paclitaxel production in large-scale process.

Decanter 원심분리기의 최적 운전 조건에서의 식물세포 회수율은 94% 정도로 배양액에 존재하는 대부분의 세포와 일부 세포조각의 회수가 가능하며, 여액에는 대부분의 세포조각이 포함되어 있다(22). 따라서 세포조각에 포함되어 있는 paclitaxel 때문에 여액으로 상당한 paclitaxel 손실이 발생하게 된다. Paclitaxel 분포를 보면 회수 전 세포 배양액에서의 paclitaxel 생산량에 따라 차이는 있으나 대체로 세포에 56%, 세포조각 42%, 여액 2% 정도 분포되어 있다(22). 또한 생물반응기로부터 decanter 원심분리기 회수 결과를 보면 여액으로의 paclitaxel 손실은 46% 정도로 상당한 부분을 차지하고 있으며, 이러한 여액으로의 paclitaxel 손실에는 세포조각에 포함되어 있는 paclitaxel 뿐만 아니라 세포 배양액 배지에 녹아 있는 미량의 paclitaxel도 포함되어 있다. 따라서 decanter 원심분리기에 회수하지 못한 식물세포조각(debris)은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 고속원심분리기(>10,000g)를 이용하여 회수가 가능하며 decanter 원심분리기와 고속원심분리기를 연속적으로 이용하여 식물세포와 세포조각을 회수함으로써 대부분의 paclitaxel 회수(>95%)가 가능하다. 단지 세포배양 여액에 녹아 있는 미량의 paclitaxel (<5%)만이 고속원심분리기의 여액으로 배출된다. 또한 식물세포 회수공정에서는 추출공정에서의 유기용

매 사용량을 최소화하기 위해서 회수한 세포 내의 수분함량을 최대한으로 줄여야 한다. 특히 세포 내 수분 함량의 경우 식물세포 (90~97%)가 미생물 (50~80%)이나 동물세포 (80%)에 비하여 상대적으로 높다(26). 회수한 세포 내의 수분 함량은 decanter 원심분리기의 운전 조건 중 보울(bowl)과 스크류(screw)의 회전차가 감소함에 따라 회수된 세포 내의 수분함량도 감소하게 된다(22). 또한 decanter 원심분리기를 이용한 식물세포 회수 전에 세포배양액에 NaCl를 첨가하여 세척(brine washing)하여 줌으로 회수한 세포 내의 수분 함량을 줄일 수 있다. 실제 동일한 조건 하에서 식물세포를 회수하기 전에 세포배양액에 NaCl (~100 g/L)를 첨가하여 overnight시킨 후 회수하였을 경우 첨가하지 않았을 경우에 비하여 회수한 세포 내의 수분함량을 7% 정도 줄일 수 있다(22).

세포배양액으로부터 paclitaxel 회수

일반적으로 식물세포배양에 의해 생산되는 이차대사산물(secondary metabolite)의 경우 대부분 물에 잘 녹지 않아 세포 또는 세포조각 내에 존재한다(28). 식물세포인 *Taxus chinensis* 배양에 의한 paclitaxel 생산의 경우에도 생산된 paclitaxel은 대부분 식물세포나 세포조각에 포함되어 있으며 일부 세포배양액에 녹아 있다. 세포배양액에 녹을 수 있는 paclitaxel의 농도에 한계 (~7 mg/L 이하)가 있기 때문에 생산량이 증가할수록 여액에 잔존하는 paclitaxel 함량은 상대적으로 감소하게 된다. 따라서 생물반응기에서 paclitaxel 생산량이 증가할수록 decanter 원심분리기(식물세포 회수)와 고속원심분리기(식물세포조각, debris 회수)로부터 회수되는 paclitaxel 양은 증가하는 반면 여액에 잔존하는 paclitaxel 양은 감소한다(29). 그러나 생물반응기에서의 생산량이 적을 경우 여액에 잔존하는 paclitaxel의 상대적인 양이 증가하므로 수율 증가 측면에서 이를 반드시 회수하여야 한다. 예를 들면, 생물반응기에서의 paclitaxel 생산량이 20 mg/L인 경우 여액에 잔존하는 paclitaxel은 20% 정도로 상당히 많은 부분을 차지하게 된다. 이러한 상황에서 여액 내 존재하는 paclitaxel 회수는 전체 수율 향상 측면에서도 반드시 이루어져야 한다(29).

식물세포배양 여액에 잔존하는 paclitaxel 회수 방법으로 여액에 무기염(inorganic salt)인 $MgSO_4$ (7.8 mM)을 첨가하여 여액에 존재하는 paclitaxel을 침전시킨 후 원심 분리하여 회수하는 방법이 보고(30)되고 있으나 여액으로부터 paclitaxel 회수율 (<84%)이 낮아 흡착제를 이용하여 배양 여액에 존재하는 paclitaxel을 회수하는 방법이 가장 보편적이다(29). 식물세포배양액으로부터 식물세포 및 세포조각이 제거된 배양액에 여러 가지 종류의 흡착제(nonionic exchanger (Amberlite XAD-2,4,7,8,16), anion exchanger (Amberlite IRA-93, IRA-68, IRA-400, Dowex 1), cation exchanger (Amberlite IRC-50, 200, Dowex-50W))를 첨가하여 동일 첨가량에 대한 흡착 및 탈착 정도를 실험한 결과 XAD-7(non ionic aliphatic acrylic polymer, Rohm & Haas, USA)과 HP20(styrene, high porous polymer, Mitsubishi, Japan)의 경우 흡착 및 탈착이 매우 용이하여 다른 종류의 흡착제에 비하여 상당히 효과적임을 알 수 있다(29). 반면

XAD-4의 경우에는 탈착효율이 낮은 문제가 있으며 Forche 등(31)의 경우에도 *Thuja occidentalis* 배양액으로부터 XAD-4 흡착제를 이용한 terpenoid 회수시 탈착효율이 상당히 낮음을 보고한 바 있다. XAD-7은 주로 배양액으로부터 저해생산물을 제거하여 원하는 물질의 생산량을 증가시키는 역할을 하며, 수용액 상태에서 대체로 분자량이 작은 비극성물질(분자량<1,000)의 흡착에 이용되어져 왔다(32, 33). 흡착제의 가격 측면에서 XAD-7는 HP20의 1.5배 정도로 HP20이 더 저렴하여 흡착 및 탈착 효율이 좋고 가격 측면에서 경쟁력이 있는 HP20을 이용하여 여액 내 paclitaxel 회수(회수율>99%)하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있다(29).

HP20을 여러 가지 농도로 첨가하여 흡착제 첨가량에 따른 세포배양액, decanter 원심분리기 여액, 고속원심분리기 여액 내의 paclitaxel 흡착 정도는 식물세포와 세포조각이 포함되어 있는 배양액의 경우 흡착효율이 상당히 떨어져 흡착제 (10 g/L)로 3일 동안 반응시켜도 여액 내 paclitaxel은 여전히 잔존함을 알 수 있다. 이는 세포와 세포조각이 여액에 존재하는 paclitaxel이 흡착제에 흡착되는 것을 방해하기 때문으로 판단된다. Decanter 원심분리기 여액, 즉 식물세포만 제거되고 세포조각은 포함되어 있는 여액의 경우에는 흡착효율이 상대적으로 향상되어 흡착제 (5 g/L) 처리로 1일 정도면 여액 내 paclitaxel이 완전히 흡착되어 회수할 수 있음을 알 수 있다. 또한 고속원심분리기 여액, 즉 식물세포와 세포조각이 제거된 여액의 경우 흡착제 (3 g/L) 처리로 1일 정도면 여액 내 paclitaxel이 완전히 흡착되어 여액 내 paclitaxel을 완전히 회수할 수 있어 여액에 녹아 있는 paclitaxel 회수를 위하여 식물세포와 세포조각을 미리 제거한 여액, 즉 고체 함량을 줄인 여액이 더욱 효과적임을 알 수 있다. 배양액에 녹아 있는 paclitaxel 대량 회수의 경우 HP20 흡착제를 column에 충전하여 사용하면 효과적으로 배양액으로부터 paclitaxel을 연속적으로 회수할 수 있다(34). 결과적으로 식물세포 배양에 의한 paclitaxel 생산의 경우 배양액 내의 식물세포는 decanter 원심분리기를 이용하여 회수하고 여액에 포함된 세포조각은 고속원심분리기로 회수하며, 여액에 녹아있는 paclitaxel은 흡착제를 이용하여 회수하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

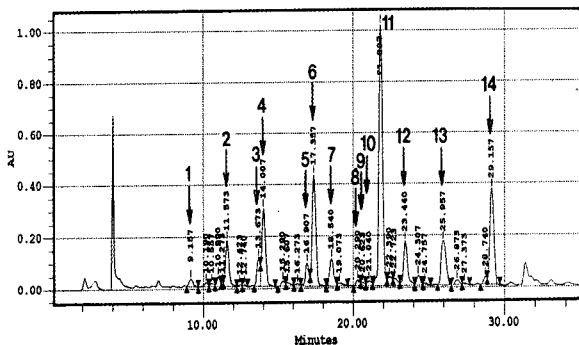
Biomass 내 paclitaxel 및 유도체 확인

Taxus chinensis 배양액으로부터 회수한 식물세포인 biomass 내 paclitaxel 외에 대략 13개의 주요 peak들을 HPLC 분석으로부터 확인 할 수 있으며 이들 물질들을 Prep-LC를 이용하여 분리 및 정제하고 NMR, MS 등으로 화학구조 분석을 한 결과를 Fig. 3에 나타내었다(35). 이들 물질들은 NMR, MS를 사용한 화학구조 분석 결과 이미 알려진 paclitaxel 유도체 또는 전구체와 동일한 물질로 밝혀졌다(36-44). Baccatin III, 10-deacetyl baccatin III, 10-deacetyl paclitaxel은 paclitaxel 반합성에 사용되는 대표적 전구체이다(9). Taxol C, 7-epi-10-deacetyl paclitaxel, 10-deacetyl paclitaxel의 경우 가격 면에서 paclitaxel에 비해 2.5-3배 정도로 상당히 고가이며 항암효과도

있는 것으로 알려져 있다(39). Taxol C와 taxcultine는 *Taxus baccata* 세포배양으로부터 처음으로 분리되었으며 paclitaxel 함량보다 현저히 낮은 함량으로 존재한다(39). Taxol C의 경우 항암효과가 오히려 paclitaxel 보다 높고 또한 아드리아마이신 resistant cell에도 강한 효과를 보이는 것으로 보고 되어 관심이 높은 taxane 유도체 중의 하나이다(45). 10-Deacetylpaclitaxel은 1981년에 처음 보고 되었으며(40), *Taxus wallichiana*로부터 추출 및 크로마토그래피 정제 후 결정화에 의하여 순수분리 되었다.

또한 10-deacetylpaclitaxel을 120°C로 가열하면 epimerization 이 일어나 부분적으로 7-epi-10-deacetylpaclitaxel로 전환된다. 7-Epi-10-deacetylpaclitaxel은 microtubule assembly 실험에서 동일한 농도 하에서 paclitaxel과 비교 시 90% 정도 항암 효과를 보여주는 물질이기도 하다(46). Cephalomannine 역시 1979년에 처음으로 *Cephalotaxus manii*로부터 분리 및 구조 분석이 이루어졌고(47) paclitaxel 주사제로서의 제품 품질관리 시 7-epi-10-deacetylpaclitaxel과 함께 normal-과 reverse-phase chromatography에서 paclitaxel로부터 분리하기 어려운 성분 중의 하나이다.

Yunnanxane과 2 α , 5 α , 10 β , 14 β -tetra-acetoxy-4(20), 11-taxadiene의 경우에는 항암효과가 확인되지 않았으며 이는 C-13번 위치에 tubulin binding에 필요한 side chain과 oxetane ring이 없기 때문에 알려져 있다(41). 그러나 이들 물질은 biotransformation 방법에 의하여 새로운 용도에 사용될 수 있는 물질 생산에 이용되기도 한다(42). 13-Deacetyl-taxchinin I는 *Taxus chinensis* 세포배양으로부터 처음으로 순수 분리되었으며 항암 활성은 아직 보고되지 않았다(44).



Compound	Material name/CAS number	Formula	Molecular weight
1	CAS-142203-66-4P	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	588
2	Baccatin III	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	586
3	CAS-156169-99-8P	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₂	630
4	Internal standard (N-Propyl paraben)	-	-
5	10-Deacetylpaclitaxel	C ₄₃ H ₆₆ NO ₃	811
6	13-Deoxybaccatin III	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	570
7	Taxocultine	C ₄₄ H ₇₀ NO ₄	820
8	Cephalomannine	C ₄₃ H ₆₆ NO ₄	831
9	7-Epi-10-deacetylpaclitaxel	C ₄₃ H ₆₆ NO ₃	811
10	13-Deacetyl-taxchinin I	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₂	692
11	Paclitaxel	C ₄₇ H ₆₇ NO ₁₄	854
12	Taxol C	C ₄₃ H ₆₆ NO ₁₄	848
13	Yunnanxane	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	563
14	2 α ,5 α ,10 β ,14 β -Tetra-acetoxy-4(20),11-Taxadiene	C ₂₈ H ₄₀ O ₈	505

Figure 3. HPLC chromatogram and characterization of taxane derivatives in biomass by NMR and mass spectrometry.

추출 및 전 처리 공정

Biomass 추출 (biomass extraction) 및 액/액 추출 (liquid-liquid extraction)

식물세포 배양에 의하여 생산된 paclitaxel은 대부분 식물 세포와 세포조각 (debris)에 포함되어 있으며(22), 회수율 증가 측면에서 세포 내에 포함되어 있는 paclitaxel을 효율적으로 추출하는 것이 매우 중요하다. Witherup 등(14)에 의하여 *Taxus brevifolia*의 잎으로부터 methylene chloride과 methanol을 이용한 paclitaxel 추출에 관하여 보고하였으며, Cardellina II(15)에 의하여 *Taxus brevifolia*의 껍질로부터 methanol로 paclitaxel 분리하는 공정에 관하여 보고하였으며, Vanhaelen-Fastre 등(48)도 유기용매를 이용한 추출에 관한 보고를 하였다. 이와 유사한 방법으로 Zhang 등(49), Castor 등(50), Rao 등(8)에 의하여도 건조된 식물체를 유기용매로 paclitaxel을 추출하는 방법을 보고하였다. 이와 같이 그 동안 많은 사람들에 의하여 유기용매를 이용하여 식물체로부터 paclitaxel을 추출하는 방법에 대해서 보고하였으나 산업적 대량 생산을 고려한 추출공정에 대한 깊이 있는 연구는 상당히 부족한 실정이다. 결국 이러한 추출공정에 대한 자세한 이해 없이는 식물체로부터 paclitaxel 대량 생산과 고수율 회수 공정의 개발에도 많은 어려움이 따른다.

여러 가지 유기용매 (methanol, methylene chloride, methylene chloride/methanol, methyl-t-butyl ether, ethanol, isopropyl alcohol, chloroform, chloroform/methanol, diethylether, acetone 등)를 이용하여 세포배양액으로부터 회수한 biomass로부터 paclitaxel의 추출 경향을 조사한 결과 methanol의 경우 가장 적은 양으로 가장 높은 paclitaxel 회수율을 얻어 biomass로부터 paclitaxel의 추출에 가장 효과적임을 알 수 있다(51, 52). Biomass 추출에서는 여러 가지 조업방법이 가능하나 크게 batch와 counter-current 형태로 나누어 작업이 가능하다. 이들 방법에 따른 paclitaxel 회수율은 거의 차이가 없음을 알 수 있으며, 다만 counter-current 형태를 사용할 경우 유기용매 사용량을 줄일 수 있다(51). 그러나 counter-current 형태의 경우 작업의 복잡성 때문에 대부분 batch 형태의 조업을 택하고 있다(8, 21). Batch 형태 조업으로 methanol을 이용한 biomass 추출에서 식물세포와 유기용매 내 paclitaxel 농도 사이의 평형은 추출시간 10분 정도이면 도달하며 평형과 추출시간에 미치는 온도의 영향은 5°C~50°C에서는 거의 없었다(21). 추출횟수와 biomass로부터 paclitaxel 추출 정도는 4회의 추출로 식물세포 내 paclitaxel은 대부분 회수 (99%) 가능하며(21), 또한 추출에 사용되는 methanol의 농도 변화에 따른 추출 효율은 methanol의 농도가 90% 이상이면 biomass로부터 대부분의 paclitaxel 회수 (>98%)가 가능하였다(51). 일반적으로 methanol 추출 후 추출액의 농축은 rotary evaporator에서 수행되며 농축조건은 635 mmHg, 40°C에서 이루어진다. 농축 시간은 농축 량에 따라 차이가 있으나 농축과정에서의 paclitaxel의 손실은 거의 발생되지 않는다. 그러나 과도하게 methanol 추출액이 농축될 경우 농축액 내 침전

물이 생성되어 다음 단계의 작업에 악영향을 미치게 된다(21). 농축 도중에 침전물이 형성될 경우에는 새로운 methanol에 다시 용해시켜 재 농축을 할 수 있다.

Methanol을 이용한 biomass 추출 후 추출액에 존재하는 다량의 극성불순물은 액/액 추출 (liquid-liquid extraction)에 의해 제거한다. 여러 가지 유기용매 (methylene chloride, chloroform, diethylether, hexane/methylene chloride 등)를 이용하여 액/액 추출 경향을 조사한 결과 methylene chloride의 경우 가장 높은 paclitaxel 순도 (~5%) 및 회수율 (~99%)을 얻어 액/액 추출에 가장 효과적임을 알 수 있다(21). 즉, methanol 추출액을 원액의 20% 정도로 농축하고 농축액에 methylene chloride를 첨가하여 (methanol 추출액/methylene chloride=5/1, v/v) 액/액 추출을 실시하면 methanol 농축액에 존재하는 다량의 극성불순물 (polar impurity)을 효율적으로 제거할 수 있다(Fig. 5). 액/액 추출은 batch 형태 조업으로 3회에 걸쳐 실시하여 대부분의 paclitaxel 회수 (~99%)가 가능하며 액/액 추출을 통하여 극성불순물이 제거된 methylene chloride 용액을 rotary evaporator (450 mmHg, 30 °C)에서 농축하고 건조하여 전 처리 공정에 이용한다.

전 처리 공정 (pre-purification process)

흡착제 처리 및 침전에 의한 전 처리로 고순도의 crude paclitaxel을 얻을 수 있는 방법이 보고 되어 있다(21, 53-57). 식물유래 타르 및 왁스 성분을 흡착제 처리로 제거한 후에 침전공정에 의하여 고순도 (>60%)의 crude paclitaxel을 얻을 수 있어 매우 간단하고 편리하게 전 처리할 수 있는 방법이다. 타르 및 왁스 성분은 paclitaxel의 분리/정제에 많은 악영향을 미치고 특히 HPLC 정제 공정에서 column의 packing material (resin) 수명에 악영향을 미치므로 반드시 전 처리 공정에서 제거되어야 한다. 짙은 색깔, 타르, 왁스 성분을 제거하기 위하여 여러 가지 흡착제 (active clay, activated carbon, charcoal, sylopute 등)를 사용하였으나 sylopute (main component: SiO₂, 10~50 μm)이 색깔 제거 뿐만 아니라 타르 및 왁스 성분 제거, 흡착제 처리 후 여과속도 면에서도 가장 효과가 우수하였다(56). 흡착제 처리 후 시료 내에 존재하는 비극성 불순물과 페놀 성분 (ex, catechin)을 제거하기 위하여 흡착제 처리 시료 (흡착제 처리 후 여과액, filtrate)를 hexane에 교반 (stirring) 상태에서 첨가하여 침전을 유도한다. Hexane 침전 과정을 통하여 시료 내 비극성불순물과 페놀성분을 효과적으로 제거할 수 있다(21). 이때 시료(흡착제 처리 여과액)와 hexane의 비, 즉 filtrate/hexane=1/10 (v/v)에서 최대 순도 (>20%)와 수율 (>95%)을 얻을 수 있으며 불순물 제거 정도를 크로마토그램 상으로 확인할 수 있다(Fig. 5). 추가 전 처리 공정으로 고순도의 crude paclitaxel을 얻기 위한 분별침전(fractional precipitation) 공정은 상당히 효과적이다. 분별침전은 저순도의 paclitaxel을 methanol에 용해시킨 후 distilled water를 조금씩 떨어뜨려 침전을 유도하는 것으로 결국 methanol 용액에 대한 용해도 차이를 이용한 침전 방법이다(54). 분별침전을 위한 최적 조건은 각각 methanol 농도 61.5%, 보관온도 0~4°C, 보관기간 3일로 분별침전 후 높은 순도 (>60%)의 paclitaxel을 얻을 수 있어 상당히 효과

적인 전 처리 방법이다. 단지, 분별침전에 소요되는 시간(3일)이 길어 공정 개선 측면에서 고려되어야 할 사항이다. 흡착제 처리와 침전에 의한 paclitaxel의 전 처리 공정의 개략도를 Fig. 4에 나타내었다. 분별침전 공정을 통하여 얻은 시료는 순도 (>60%) 면에서 HPLC 정제에 충분한 시료를 얻을 수 있으며 이는 HPLC 정제 공정에서 resin 사용량, 유기용매 사용량, column 크기, 복잡성 등을 최소화하여 결국 정제 비용을 최소화할 수 있다(21). 특히 전 처리공정에서의 흡착제 처리 및 침전은 여러 가지 다른 공정과 비교해 볼 때 paclitaxel로부터 불순물을 효율적으로 제거할 수 있어 고순도의 crude paclitaxel을 얻어 경제적 측면에서 산업적 대량생산에 적합한 공정으로 판단된다.

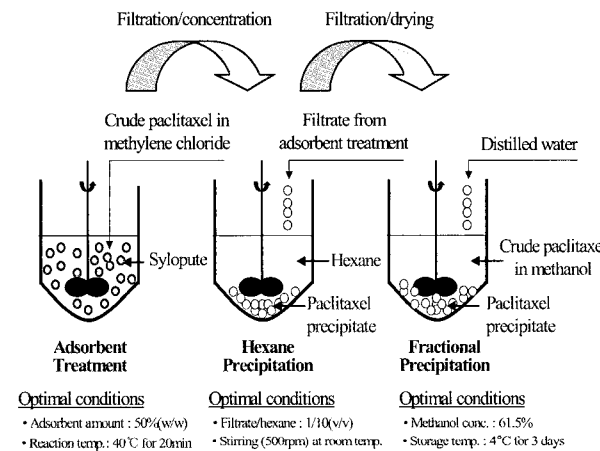


Figure 4. Schematic diagram of the pre-purification process, consisting of adsorbent treatment, hexane precipitation, and fractional precipitation for paclitaxel.

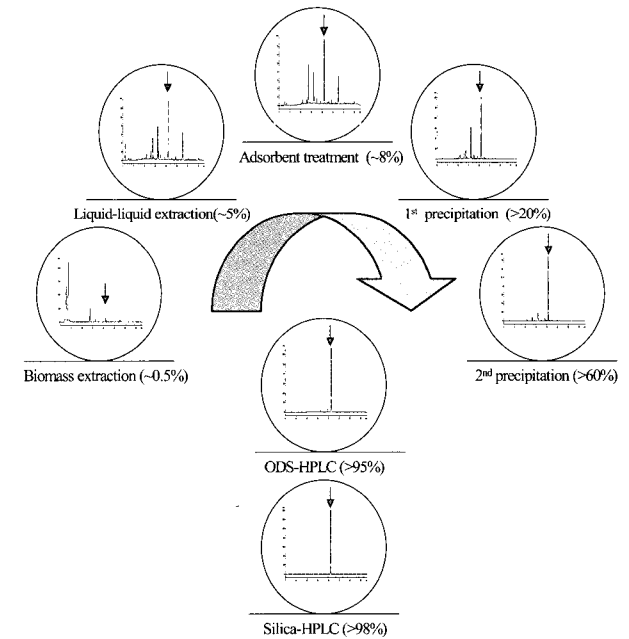


Figure 5. Chromatogram of purification steps analyzed by RP-HPLC: biomass extraction; liquid-liquid extraction; adsorbent treatment; first precipitation (hexane precipitation); second precipitation (fractional precipitation); ODS-HPLC and silica-HPLC, respectively. The arrow indicates the position of paclitaxel.

정제 공정 (purification process)

전 처리 공정을 거친 시료에는 여러 가지 taxane 유도체들 (10-deacetylpaclitaxel, baccatin III, cephalomannine, 10-deacetyl-7-epi-paclitaxel, 13-deacetyl-taxchimin I, 7-epi-paclitaxel, benzyl analogue to paclitaxel 등)이 포함되어 있다. 이들 유도체 중 baccatin III, 10-deacetyl baccatin III, 10-deacetylpaclitaxel 등은 paclitaxel 반합성을 위한 전구체 (precursor)로 이용되기도 한다(9, 56-61). 그러나 이들 유체들을 효과적으로 제거하여 고순도 (>98%)의 paclitaxel을 얻기는 상당히 어렵다. 효과적 제거를 위하여 보통의 경우 2단계의 HPLC 공정이 도입된다. 하나는 ODS column (octadecylsilylated, C18) HPLC이고 다른 하나는 silica column HPLC이다. 일반적으로 paclitaxel 분석을 위하여 ODS column에서 elution 용매로 acetonitrile/water 혼합액을 사용하여 gradient 조건으로 수행되지만(62-64), 생산용 공정에서는 elution 용매로 acetonitrile 대신 methanol을 사용하는 것은 공정의 경제성과 생산 공정을 단순화하는데 매우 중요한 역할을 한다. 비록 분리능 (resolution)에는 조금 차이는 있지만 acetonitrile 대신 추출 및 전 처리 공정에서 사용되는 methanol을 정제공정에서 사용함으로써 전체 분리 및 정제 공정에 사용되는 용매의 종류를 최소화시키는 것이 매우 중요하다. 사용 용매종류를 최소화함으로써 크로마토그래피 공정에서의 장치를 간소화하고 증류방법에 의한 용매 회수 및 재사용을 용이하게 하여 분리/정제 비용을 절감할 수 있다(21).

첫 번째 ODS column HPLC에서 높은 순도 (>95%) paclitaxel을 생산할 수 있지만 여전히 paclitaxel과 성질이 유사한 미량의 불순물이 포함되어 있으며 이들 미량의 불순물들은 silica column HPLC에 의해 제거되어 고순도 (>98%)의 paclitaxel을 얻을 수 있다. Paclitaxel 분리 및 정제 단계별 크로마토그램을 Fig. 5에 나타내었다. 크로마토그래피 공정에서 elution 조건으

로 gradient 조건에 비하여 긴 운전 시간과 많은 용매 사용에도 불구하고 장치 및 운전의 단순함, 용매회수의 간편성 등으로 산업용 대량 생산 공정에서는 isocratic 조건을 많이 채택하고 있다(56). 식물세포 배양에 의한 paclitaxel 생산이 아닌 주목나무로부터 직접 추출 및 정제할 경우 고순도의 paclitaxel을 얻기 위한 연구들이 많이 수행되었으나(8, 43, 65), cephalomannine, 7-epi-10-deacetylpaclitaxel과 같은 유도체는 paclitaxel과 성질이 매우 유사하여 HPLC 정제 과정에서 paclitaxel과 거의 같은 시간에 용출되어 분리하기가 상당히 어렵다(14, 66). 그래서 식물체로부터 직접 고순도의 paclitaxel 생산할 경우 별도의 추가 공정(crystallization)이 필요하다(8). 반면 식물세포배양에 의한 고순도 paclitaxel 대량 생산의 경우에는 상대적으로 이들 유도체의 함량이 적기 때문에 크로마토그래피 공정만으로도 이들 불순물을 효과적으로 제거 가능하다는 장점이 있다(21). 산업적 대량 생산에 적용 가능한 분리 및 정제 공정, 적용기술, 고려 사항 등을 종합하여 Table 1에 나타내었다. 의약품 원료의 경우 고순도의 제품으로 정제되어야 할 뿐만 아니라 최종 제품 내의 불순물 농도도 규정치 이하로 철저히 관리되어야 한다. 예를 들면, 미국 FDA 허가를 위한 원료 의약품, APIs (active pharmaceutical ingredients) guidance에 의하면, 최종 제품 내 잔존하는 각각의 불순물은 동정되고 정량되어야 한다. 즉, 전체 불순물의 함량 2%, 단일 불순물의 함량 0.5%를 각각 초과할 수 없으며 0.1% 이상의 모든 불순물들은 정체가 확인되어야 한다(67, 68).

최근에는 paclitaxel 정제를 위하여 SMB (simulated moving bed) 크로마토그래피 공정이 도입되고 있다(69, 70). Wu 등(69)은 paclitaxel과 cephalomannine의 분리 및 정제에 SMB 공정을 적용한 사례가 있으며 최근 보고(70)에 의하면 paclitaxel 정제 공정 중에 SMB 공정을 도입하여 paclitaxel과 아주 유사한 성질을 지닌 불순물 (paclitaxel 유

Table 1. Summary of recovery and purification process for paclitaxel from biomass

Process step	Application technology	Consideration
Biomass recovery from plant cell culture	<ul style="list-style-type: none"> Decanter centrifuge (22) High speed centrifuge (22) Filtration (23) 	<ul style="list-style-type: none"> Recovery of plant cell and debris Reduce water content of cell Recovery of extracellular paclitaxel in supernatant
Biomass extraction	<ul style="list-style-type: none"> Solvent extraction (51) Supercritical fluid extraction (77) Microwave extraction (78) 	<ul style="list-style-type: none"> Selection of solvent type Solvent amount Extraction time, number Solvent recovery and reuse Extraction purity, yield
Pre-purification	<ul style="list-style-type: none"> Adsorption (56) Precipitation (54) Low-pressure chromatography (57) 	<ul style="list-style-type: none"> Purity level of crude paclitaxel Select of solvent type Removal of deep color and interfering compounds (tar and waxy compounds)
Purification	<ul style="list-style-type: none"> Chromatography (79) Crystallization (8) SMB chromatography (70) 	<ul style="list-style-type: none"> Removal of taxane analogues, which have a similar property with paclitaxel (ex, 7-epi-10- deacetylaxol, cephalomannine) Yield, purity, throughput Solvent recovery and reuse Resin cleaning and reuse Impurity content
Polishing	<ul style="list-style-type: none"> Drying (80) 	<ul style="list-style-type: none"> Removal of residual solvents Control of morphologies Water content Endotoxin content

도체)을 분리 및 제거할 목적으로 사용하고 있다. 산업적 paclitaxel 대량 생산 공정에 적용한 사례(70)로 Bioxel Pharma Inc.에서 NovaSep (Pompey, France)의 SMB 장치를 Aerojet Fine Chemicals 사(Rancho Cordova, CA)에 설치하여 조업하고 있다. 이 생산 공정은 120 kg/yr의 paclitaxel 생산 규모로 현재 USP-grade CGMP paclitaxel을 생산하고 있다. SMB 크로마토그래피 공정은 기존의 회분식 크로마토그래피 공정과는 달리 연속 공정이며 초기 투자비는 많이 소요되지만 사용 용매와 흡착제의 양을 줄일 수 있으며 동일 순도 대비 높은 수율, 생산성 증대, 인건비 절감, 그리고 처리량 (throughput)의 증대로 최근 paclitaxel(69, 70)을 포함하여 chiral 물질 분리(71-73), insulin 정제(74-76) 등의 약품 생산에 적용하려는 시도가 늘고 있다.

최종제품의 Specification

원료의약품 (APIs; active pharmaceutical ingredients)의 경우 정제된 최종제품의 specification은 매우 중요하다. Paclitaxel의 품질 요구조건은 U. S. Pharmacopeial Convention (USP 27-NF22)에 정의되어 있다(Table 2). 최종 제품의 순도뿐만 아니라 최종 제품에 포함되어 있는 잔류용매 및 수분, 제품의 morphology, 불순물 함량, endotoxin 함량 등 여러 가지가 검토되어야 한다. 특히 원료의약품의 경우 잔류용매의 농도가 철저히 관리되어야 하며 이에 관련하여 ICH guidance(81)에 원료의약품에 포함되는 여러 가지 용매의 잔류 최대 농도를 엄격하게 규제하고 있다(Table 3). Paclitaxel의 경우 최종 제품 내 잔류용매로 methanol,

Table 2. The quality requirements for paclitaxel in the U.S. Pharmacopeial Convention (USP 27-NF22)

Item	Specification
Purity	98-102%
Impurities	Total NMT (not more than) 2.0% NMT 0.5% for each impurity
Residual solvents	
Methylene chloride	NMT 600 ppm
Methanol	NMT 3,000 ppm
Hexane	NMT 290 ppm
Chloroform	NMT 60 ppm
Bacterial endotoxin	NMT 0.4 EU (endotoxin unit)/mg
Water content	NMT 4.0%
Microbial limit	NMT 100 CFU (colony forming unit)/g
Appearance	White
Residual on ignition	NMT 0.2%
Heavy metals	NMT 0.002%
Identity	Conform (infrared, IR)

Table 3. List of solvents included in the Q3C guidance of ICH (International Conference on Harmonisation)

Class ¹		Class 2 ²		Class 3 ³
Solvents	Conc.Limit (ppm)	Solvents	Conc. Limit (ppm)	Solvents
Benzene	2	Acetonitrile	410	Acetic acid
Carbon tetrachloride	4	Chlorobenzene	360	Acetone
1,2-Dichloroethane	5	Chloroform	60	Anisole
1,1-Dichloroethene	8	Cyclohexane	3,880	1-Butanol
1,1,1-Trichloroethane	1,500	1,2-Dichloroethene	1,870	2-Butanol
		Dichloromethane	600	Butyl acetate
		1,2-Dimethoxyethane	100	tert-Butylmethyl ether
		N,N-Dimethylacetamide	1,090	Cumene
		N,N-Dimethylformamide	880	Dimethyl sulfoxide
		1,4-Dioxane	380	Ethanol
		2-Ethoxyethanol	160	Ethyl acetate
		Ethyleneglycol	620	Ethyl ether
		Formamide	220	Ethyl formate
		Hexane	290	Formic acid
		Methanol	3,000	Heptane
		2-Methoxyethanol	50	Isobutyl acetate
		Methylbutyl ketone	50	Isopropyl acetate
		Methylcyclohexane	1,180	Methyl acetate
		N-Methylpyrrolidone	530	3-Methyl-1-butanol
		Nitromethane	50	Methylethyl ketone
		Pyridine	200	Methylisobutyl ketone
		Sulfolane	160	2-Methyl-1-propanol
		Tetrahydrofuran	720	Pentane
		Tetralin	100	1-Pentanol
		Toluene	890	1-Propanol
		1,1,2-Trichloroethene	80	2-Propanol
		Xylene	2,170	Propyl acetate

¹ Solvents should be avoided in pharmaceutical products
² Solvents should be limited in pharmaceutical products
³ Solvents may be regarded as less toxic and of lower risk to human health

methylene chloride, hexane이 주로 문제가 되고 있다(57, 80). Table 3에서 보는 바와 같이 ICH guidance에 의하면 methanol, methylene chloride, hexane는 모두 Class 2에 해당되는 용매로 잔존 최대 농도가 각각 3,000, 600, 290 ppm으로 규정하고 있다. 이러한 최종 정제 제품 내 잔류용매의 규정을 충족시켜주기 위해서는 건조 방법이 매우 중요하다. 일반 진공건조기 (rotary evaporator, dry oven)에서 장시간 건조하여도 건조 중 잔류용매가 충분히 제거되기 전에 제품 표면이 딱딱하게 굳어버리는 표면경화 (casehardening) 현상 때문에 잔류용매의 농도를 규정치 이하로 제조하기가 상당히 어렵다(80, 82). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 보편적으로 분무건조 (spray drying) 방법으로 건조하여 최종 제품 내 잔류용매의 규정을 충족시킨다(57, 80). 분무건조의 경우 제품을 다공성 형태로 건조할 뿐만 아니라 열에 민감한 제품 건조에도 적합하여 원료의약품 건조에 가장 적합한 건조 방법으로 판단된다. 또한 분무건조의 경우 일반 진공건조 (rotary evaporation)에 비해 건조 후 제품의 크기가 상대적으로 훨씬 작게 건조되어 제품 내 잔류용매와 수분을 보다 효과적으로 제거할 수 있다(57).

또한 최종 제품의 morphology도 매우 중요한 specification 중의 하나이다. 일반적으로 원료의약품의 경우 solubility와 bioavailability 측면에서 crystalline 형태보다는 amorphous 형태의 paclitaxel이 보다 유용하게 사용되어 진다(83-85). 따라서 최종 solid-state paclitaxel의 morphology를 쉽게 조절할 수 있는 방법은 의약품 생산 공정에 매우 유용하게 활용될 수 있다. Liggins 등(86)에 의하여 solid-state paclitaxel의 morphology를 조절할 수 있는 방법이 개발되기는 하였으나 제조 조건이 매우 고온에서 이루어지므로 실용적이지 못한 단점이 있다. 예를 들면 amorphous paclitaxel 제조를 위하여 221℃의 고온에서 quench cooling하여야 하기 때문에 제조 환경이 매우 열악하다. Lee 등(87)에 의하여 최종 정제된 paclitaxel의 morphology를 용매처리 (solvent treatment)에 의하여 간단하게 조절할 수 있는 방법 (solvent-induced method)이 개발되었다. 예를 들면, amorphous paclitaxel은 methylene chloride 또는 chloroform에 녹인 후 농축/건조하여 제조 가능하며, anhydrous crystalline paclitaxel은 상대적으로 non-polar 용매인 acetone, diethyl ether, ethyl acetate에 녹인 후 농축/건조하여 제조가능하며, dihydrated crystalline paclitaxel은 methanol/water (8/2) 혼합액에 녹인 후 건조하여 제조 가능하며 용매처리에 의한 morphology 조절은 매우 간편하고 편리한 방법이다. 또한 이러한 morphology 차이는 최종 제품의 용해도 (solubility)에 많은 영향을 미치게 되는데, 실험 결과에 의하면 제품의 종류에 따라 차이는 있지만 amorphous 형태가 crystalline 형태에 비하여 1.1~24.0배 정도 용해도가 높으며 이러한 특성은 의약품의 제형 (formulation)에 매우 유용하게 이용된다(83). 최종 제품의 morphology 확인은 XRPD (X-ray powder diffraction)와 최소한 다른 여러 가지 방법 (microscopy, differential scanning calorimetry (DSC), infrared (IR), solid state NMR) 중의 하나로 검증되어야 한다(85). 용매처리에 의한 paclitaxel의 morphology 조절과 잔류용매

제거 방법에 대한 개념을 정리하여 Fig. 6에 나타내었다.

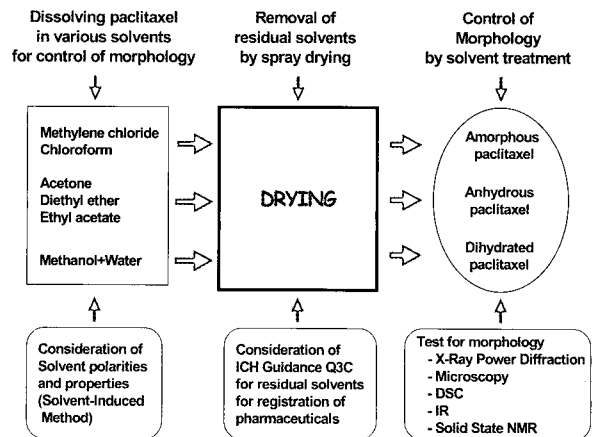


Figure 6. The concept of removal of residual solvents and control of paclitaxel morphologies.

요약

식물세포배양으로부터 항암제 paclitaxel의 생산을 위해 회수 및 정제는 산업적 공정에 있어서 필수적이다. 본 총설은 식물세포배양으로부터 고순도, 고수율의 paclitaxel 생산을 위한 대량 회수 및 정제 방법을 기술하고자 한다. 또한 이러한 분리 및 정제 공정은 추출, 전 처리, 정제, 제품화 단계를 총괄하여 최종 제품의 요구조건들 즉, 순도, 잔류용매, 제품형태, 불순물 함량, 엔도톡신 함량 등을 충족시킬 수 있도록 최적화되어야 한다. 이러한 관점에서 본 총설은 산업화 단계에서의 의약품 생산 및 품질관리에 상당히 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Wani, M. C., H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon and A. T. McPhail (1971), Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325-2327.
- Schiff, P. B., J. Fant and S. B. Horwitz (1979), Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol, *Nature* **277**, 665-667.
- Rowinsky, E. K., L. A. Cazenave, and R. C. Donehower (1990), Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent, *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1247-1259.
- Kingston, D. G. I., G. Samaranyake, and C. A. Ivey (1990), The chemistry of taxol, a clinically useful anticancer agent, *J. Nat. Prod.* **53**, 1-12.
- Arbuck, S. Q., M. C. Christian, J. S. Fisherman, L. A. Cazenave, Q. Sarosy, M. Suffness, J. Adams, R. Canetta, K. E. Cole, and M. A. Friedman (1993), Clinical development of taxol, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **15**, 11-24.
- McGuire, W. P., E. K. Rowinsky, N. B. Rosenheim, F. C. Grumbine, D. S. Ettinger, D. K. Armstrong, and R. C. Donehower (1989), Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms, *Ann. Intern. Med.* **111**, 273-279.
- Stull, D. P., T. A. Scales, R. Daughenbaugh, N. A. Jans, and D. T. Bailey (1995), Taxol (Paclitaxel), strategies to increase the supply of a

- new anticancer drug, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **54**, 133-140.
8. 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.
 9. Baloglu, E. and D. G. Kingston (1999), A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin III, *J. Nat. Prod.* **62**, 1068-1071.
 10. 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.
 11. Choi, H. K., S. J. Son, G. H. Na, S. S. Hong, Y. S. Park, and J. Y. Song (2002), Mass production of paclitaxel by plant cell culture, *Korean J. Plant Biotechnol.* **29**, 59-62.
 12. Nicolaou, K. C., Z. Yang, J. J. Liu, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claiborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan, and E. J. Sorensen (1994), Total synthesis of taxol, *Nature* **367**, 630-634.
 13. Stierle, A., G. Strobel, D. Stierle, P. Grothaus, and G. Bignami (1995), The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*, *J. Nat. Prod.* **58**, 1315-1324.
 14. Witherup, K. M., S. A. Look, M. W. Stasko, T. J. Ghiorzi, G. M. Muschik, and G. M. Cragg (1990), *Taxus* spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation, *J. Nat. Prod.* **53**, 1249-1255.
 15. Cardellina II, J. H. (1991), HPLC separation of taxol and cephalomannine, *J. Liq. Chromatogr.* **14**, 659-665.
 16. Nair, M. G. (1995), Process for the isolation and purification of taxol and taxanes from *Taxus* using methanol or acetone, U.S. Patent 5,478,736.
 17. Carver, D. R., T. R. Prout, C. T. Workman, and C. L. Hughes (1996), Reverse osmosis and ultrafiltration methods for solutions to isolate desired solutes including taxane, U.S. Patent 5,549,830.
 18. ElSohly, H. N., E. M. Jr. Croom, M. A. ElSohly, and J. D. McChesney (1997), Methods and compositions for isolating taxanes, U.S. Patent 5,618,538.
 19. Rao, K. V. (1997), Method for the isolation and purification of taxol and its natural analogues, U.S. Patent 5,670,673.
 20. Castor, T. P. (1998), Method and apparatus for isolating therapeutic compositions from source materials, U.S. Patent 5,750,709.
 21. Pyo, S. H., H. B. Park, B. K. Song, B. H. Han, and J. H. Kim (2004) A large-scale purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis*, *Process Biochem.* **39**, 1985-1991
 22. Kim, J. H., C. B. Lim, I. S. Kang, S. S. Hong, and H. S. Lee (2000), The use of a decanter for harvesting biomass from *Taxus* cell cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 337-341.
 23. McGregor, W. C. (1986), *Membrane separations in biotechnology*, 1st ed., p.61, Marcel Dekker, New York.
 24. Belter, P. A., E. L. Cussler and W.-S. Hu (1988), *Bioseparations*, 1st ed., p.47, John Wiley & Sons, New York.
 25. Sharpe, P. T. (1988), *Methods of cell separation*, 1st ed., p.18, Elsevier, Amsterdam.
 26. Krijgsman, I. J. (1992), *Product recovery in bioprocess technology*, 1st ed., p.14, Butterworth-Heinemann, Oxford.
 27. Payne, G., V. Bringi, C. Prince, and M. Shuler (1992), *Plant cell and tissue culture in liquid systems*, 1st ed., p.13, Hanser Publishers, New York.
 28. Kim, D. J. and H. N. Chang (1990), Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by in situ extraction and calcium alginate immobilization, *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 460-466.
 29. Kim, J. H. and S. S. Hong (2000), Recovery of paclitaxel from suspension culture medium with hydrophobic resin, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 366-369.
 30. Son, J. S., H. K. Choi, and S. S. Hong (2001), Recovery of extracellular paclitaxel from suspension culture of *Taxus chinensis* by adding inorganic salts, *Biotechnol. Lett.* **23**, 723-725.
 31. Forch, E., W. Schubert, W. Kohl, and G. Hofle (1984), Cell culture of *Thuja occidentalis* with continuous extraction of excreted terpenoids, Proceedings, 3rd *European Congr. Biotechnol.* **1**, 189-192.
 32. Robins, R. J. and M. J. C. Rhodes (1986), The stimulation of anthraquinone production by *Cinchona ledgeriana* cultures with polymeric adsorbents, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 35-41.
 33. Payne, G. F., N. N. Payne, M. L. Shuler, and M. Asada (1988), In situ adsorption for enhanced alkaloid production by *Catharanthus roseus*, *Biotechnol. Lett.* **10**, 187-192.
 34. Kim, J. H., Y. M. Ahn, I. S. Kang, S. S. Hong, and H. S. Lee (2000), A method for recovery of paclitaxel from *Taxus* genus plant cell culture, Korea Patent No. 0266447.
 35. Kim, J. H., U. S. Gi, B. C. Min, S. S. Hong, and H. S. Lee (2000), Production and purification of taxane derivative from the plant cell cultures of *Taxus chinensis* in large-scale process, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 398-402.
 36. Gunawardana, G. P., L. L. Klein, and J. B. McAlpine (1993), Taxol derivatives, PCT Publication WO 93/21173.
 37. Voegeléin, F. G., D. Guenard, and P. Poier (1987), Taxol and derivatives : A biogenetic hypothesis, *J. Nat. Prod.* **50**, 9-18.
 38. Nicolaou, K. C., P. G. Nantermet, H. Ueno, and R. K. Guy (1994), Novel chemistry of taxol. Retrosynthetic and synthetic studies, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 295-296.
 39. Ma, W., G. L. Park, G. A. Gomez, M. H. Nieder, T. L. Adams, J. S. Aynsley, O. P. Sahai, R. J. Smith, R. W. Stahlhut, and P. J. Hylands (1994), New bioactive taxoids from cell cultures of *Taxus baccata*, *J. Nat. Prod.* **57**, 116-122.
 40. McLaughlin, J. L., R. W. Miller, G. R. Powell, and C. R. Smith (1981), 19-Hydroxybaccatin III, 10-deacetylcephalomannine, and 10-deacetyltaxol: new antitumor taxanes from *Taxus wallichiana*, *J. Nat. Prod.* **44**, 312-319.
 41. 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. *mairii*, *J. Nat. Prod.* **57**, 1320-1324.
 42. Hu, S., X. Tian, W. Zhu and Q. Fang (1996), Microbial transformation of taxoids: Selective deacetylation and hydroxylation of 2 α ,5 α ,10 β ,14 β -tetra-acetoxy-4(20), 11-taxadiene by the fungus *Cunninghamella echinulata*, *Tetrahedron* **52**, 8739-8746.
 43. Rao, K. V. (1993), Taxol and related taxanes. I. Taxanes of *Taxus brevifolia*, *Pharm. Res.* **10**, 521-524.
 44. Kim, J. H., U. S. Gi, S. Y. Ryu, H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2000), Isolation and identification of 13-deacetyl-taxchinin I, a new taxoid from plant cell cultures of *Taxus chinensis*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 560-565.
 45. Kobayashi, J., A. Inubushi, H. Hosoyama, N. Yoshida, T. Sasaki, and H. Shigemori (1995), Taxuspines E- similar-to-H and J, new taxoids from the Japanese yew *Taxus cuspidate*, *Tetrahedron* **51**, 5971-5975.
 46. Ringel, I. and S. B. Horwitz (1987), Taxol is converted to 7-epitaxol, a biologically active isomer, in culture medium, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **242**, 692-698.
 47. Powell, R. G., R. W. Miller, and C. S. Smith (1979), Cephalomannine; a new antitumor alkaloid from *Cephalotaxus manii*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 102-104.
 48. Vanhaelen-Fastre, R., B. Diallo, M. Jaziri, M. L. Faes, J. Homes, and M. Vanhaelen (1992), High-speed countercurrent chromatography separation of taxol and related diterpenoids from *Taxus baccata*, *J. Liq. Chromatogr.* **15**, 697-706.
 49. Zhang, Z. and Z. Jia (1991), Taxanes from *Taxus chinensis*,

- Phytochem.* **30**, 2345-2348.
50. Castor, T. P. and T. A. Tyler (1993), Determination of taxol in *Taxus media* needles in the presence of interfering compounds, *J. Liq. Chromatogr.* **16**, 723-731.
 51. Kim, J. H. and S. S. Hong (2000), Optimization of extraction process for mass production of paclitaxel from plant cell cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 346-351.
 52. 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.
 53. Kim J. H., I. S. Kang, H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2002), A novel prepurification for paclitaxel from plant cell cultures, *Process Biochem.* **37**, 679-682.
 54. Kim, J. H., I. S. Kang, H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2000), Fractional precipitation for paclitaxel pre-purification from plant cell cultures of *Taxus chinensis*, *Biotechnol. Lett.* **22**, 1753-1756.
 55. Kim, J. H. (2004), Prepurification of paclitaxel by micelle and precipitation, *Process Biochem.* **39**, 1567-1571.
 56. Pyo, S. H., B. K. Song, C. H. Ju, B. H. Han and H. J. Choi (2005), Effects of adsorbent treatment on the purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis* and yew tree, *Process Biochem.* **40**, 1113-1117.
 57. Pyo, S. H., M. S. Kim, J. S. Cho, B. K. Song, B. H. Han, and H. J. Choi (2004), Efficient purification and morphology characterization of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 1162-1168.
 58. Patel R. N., A. Banerjee, and V. Nanduri (2000), Enzymatic acetylation of 10-deacetylbaccatin III to baccatin III by C-10 deacetylase from *Nocardioides luteus* SC 13913, *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 371-375.
 59. Rao K. V., R. S. Bhakuni, J. Johnson, and R. S. Oruganti (1995), Synthesis and evaluation of some 10-mono- and 2', 10-diester of 10-deacetylpaclitaxel, *J. Med. Chem.* **38**, 3411-3414.
 60. 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. Am. Chem. Soc.* **116**, 1597-1598.
 61. 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. Am. Chem. Soc.* **116**, 1599-1600.
 62. Kim, J.H., I.S. Kang and S.S. Hong (2000), Method of using hydrolysis to increase paclitaxel yield from plant cell culture, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 402-404.
 63. Kim, J. H., I. S. Kang, and S. S. Hong (2000), Recovery of plant cell and its debris by pH control, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 405-407.
 64. Gi, U. S., B. C. Min, S. S. Hong, H. S. Lee, and J. H. Kim (2000), Isolation and identification of nonpolar taxane derivatives from the plant cell culture of *Taxus chinensis*, *J. Kor. Agri. Chem. Biotechnol.* **43**, 176-179.
 65. Beckvermit, J. T., D. J. Anziano, and C. K. Murray (1996), An improved method for separating paclitaxel and cephalomannine using ozone and girard reagents, *J. Org. Chem.* **61**, 9038-9040.
 66. Liu, G. M., W. S. Fang, J. F. Qian, and H. Lan (2001), Distribution of paclitaxel and its congeners in *Taxus mairei*, *Fitoterapia* **72**, 743-746.
 67. Kim, J. H., U. S. Gi, B. C. Min, S. S. Hong, and H. S. Lee (2000), Purification and characterization of paclitaxel from plant cell cultures of *Taxus chinensis* in large-scale process, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 537-540.
 68. 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).
 69. Wu, D.-J., Z. Ma, and N.-H. L. Wang (1999), Optimization of throughput and desorbent consumption in simulated moving-bed chromatography for paclitaxel purification, *J. Chromatogr. A* **855**, 71-89.
 70. Metz, P. and O. Dapremont (2004), SMB takes on paclitaxel, *Pharma. Mfg.*, 3, Issue 9, p.27 (Nov/Dec 2004).
 71. Miller, L., C. Orihuela, R. Fronek, D. Honda, and O. Dapremont (1999), Chromatographic resolution of the enantiomers of a pharmaceutical intermediate from the milligram to the kilogram scale, *J. Chromatogr. A* **849**, 309-317.
 72. Francotte, E. R. (1997), Application of simulated moving bed chromatography to the separation of the enantiomers of chiral drugs, *J. Chromatogr. A* **796**, 101-107.
 73. Wang, X. and C. B. Ching (2004), Chiral separation and modeling of the three-chiral-center beta-blocker drug nadolol by simulated moving bed chromatography, *J. Chromatogr. A* **1035**, 167-176.
 74. Xie, Y., S. Mun, J. H. Kim, and N-H. L. Wang (2002), Standing wave design and experimental validation of a tandem simulated moving bed process for insulin purification, *Biotechnol. Prog.* **18**, 1332-1344.
 75. Mun, S., Y. Xie, J. H. Kim, and N-H. L. Wang (2003), Optimal design of a size-exclusion tandem simulated moving bed for insulin purification, *Ind. Eng. Chem. Res.* **42**, 1977-1993.
 76. Mun, S., Y. Xie, and N-H. L. Wang (2003), Residence time distribution in a size-exclusion SMB for insulin purification, *AIChE J.* **49**, 2039-2058.
 77. Gui, H. and F. Ge (2004), Studies on constituents from *Taxus mairei* bark, *Zhong Yao Cai.* **27**, 566-568.
 78. Talebi, M., A. Ghassempour, Z. Talebpour, A. Rassouli and L. Dolatyari (2004), Optimization of the extraction of paclitaxel from *Taxus baccata* L. by the use of microwave energy, *J. Sep. Sci.* **27**, 1130-1136.
 79. Kim, J. H., H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2001), Development of high performance liquid chromatography for paclitaxel purification from plant cell cultures, *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 204-210.
 80. Gi, U. S., B. Min, J. H. Lee, and J. H. Kim (2004), Preparation and characterization of paxclitaxel from plant cell culture, *Korean J. Chem. Eng.* **21**, 816-820.
 81. ICH guidance Q3C impurities: Residual solvents, Federal register, 62(247), 67378-67388 (1997).
 82. Kim, J. H., H. B. Park, U. S. Gi, I. S. Kang, H. K. Choi, and S. S. Hong (2001), Removal of residual solvents in paclitaxel by supercritical carbon dioxide, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 233-236.
 83. Hancock, B. C. and M. Parks (2000), What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals?, *Pharm. Res.* **17**, 397-404.
 84. Hancock, B. C. and G. Zografi (1997), Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems, *J. Pharm. Sci.* **86**, 1-12.
 85. Byrn, S., R. Pfeiffer, M. Ganey, C. Hoiberg, and G. Poochikian (1995), Pharmaceutical solids: A strategic approach to regulatory considerations, *Pharm. Res.* **12**, 945-954.
 86. Liggins, R. T., W. L. Hunter, and M. Burt (1997), Solid-state characterization of paclitaxel, *J. Pharm. Sci.* **86**, 1458-1463.
 87. Lee, J. H., U. S. Gi, J. H. Kim, Y. Kim, S. H. Kim, H. Oh and B. Min (2001), Preparation and characterization of solvent induced dihydrated, anhydrous, and amorphous paclitaxel, *Bull. Korean Chem. Soc.* **22**, 925-928.