

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502744
(P2004-502744A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int.C1.⁷

C07B 57/00
C07C 27/02
C07C 29/19
C07C 35/12
C07C 37/16

F 1

C07B 57/00 343
C07C 27/02
C07C 29/19
C07C 35/12
C07C 37/16

テーマコード(参考)

4 B 0 6 4
4 H 0 0 6
4 H 0 3 9

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-509053 (P2002-509053)	(71) 出願人	303048824 シーエスアイアール 南アフリカ共和国O 1 8 4 プレトリア、メイリング・ノード・ロード、サイエンティア
(86) (22) 出願日	平成13年6月11日 (2001.6.11)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葵
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月6日 (2003.1.6)	(74) 代理人	100086405 弁理士 河宮 治
(86) 國際出願番号	PCT/IB2001/001008	(74) 代理人	100088801 弁理士 山本 宗雄
(87) 國際公開番号	W02002/004384	(72) 発明者	ジェニファー・アン・チャップリン アメリカ合衆国9 2 1 3 0 カリフォルニア 州サンディエゴ、エル・カミノ・レアル・ ナンバー・シー1 2 5 3 7番
(87) 國際公開日	平成14年1月17日 (2002.1.17)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	2000/3417		
(32) 優先日	平成12年7月7日 (2000.7.7)		
(33) 優先権主張國	南アフリカ (ZA)		

(54) 【発明の名称】 (一) メントールおよびその類似化合物の製造方法

(57) 【要約】

単一の所望の立体異性体を、下記式(I I I) (ここで、R₁は、イソプロパノール基、イソプロピル基またはイソプロピレン基を表す。)の化合物の8種の立体異性体のラセミ混合物から分離する方法は、ラセミ混合物を好適な有機溶媒中で、エステル化剤、および所望の立体異性体の-OH基を立体選択的にエステル化する立体特異性酵素と、所望の立体異性体の所望の割合(%)を下記式(I V) (ここで、R₁は、前記と同じ意味を表し、およびR₄は、アルキル基またはアリール基である。)で表される化合物に転化して、式(I V)の化合物、有機溶媒、下記式(I I I)の化合物の非転化立体異性体、過剰なエステル化剤および前記反応の副生物を包含する第1反応生成物を得るのに十分な時間接觸させる工程、および下記式(I V)の化合物を第1反応生成物から分離する工程を含む。前記方法は、特に(-)メントールの製造に利用される。

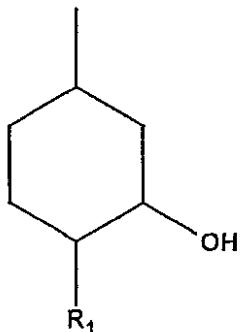
【化1】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単一の所望の立体異性体を、式 I I I :

【化 1】



10

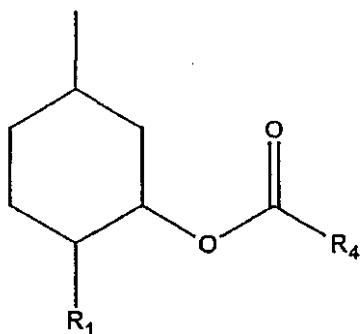
III

(ここで、R₁は、イソプロパノール基、イソプロピル基またはイソプロピレン基を表す。)

の化合物の8種の立体異性体のラセミ混合物から分離する方法であって、

(1) ラセミ混合物を好適な有機溶媒中、エステル化剤、および所望の立体異性体の-OH基を立体選択的にエステル化する立体特異性酵素と、所望の立体異性体の所望の割合(%)を式 I V :

【化 2】



30

IV

(ここで、R₁は、前記と同じ意味を表し、およびR₄は、アルキル基またはアリール基である。)

の化合物に転化するのに十分な時間接触させて、式 I V の化合物、有機溶媒、式 I I I の化合物の非転化の立体異性体、過剰なエステル化剤および前記反応の副生物を包含する第1反応生成物を得る工程、および

(2) 式 I V の化合物を第1反応生成物から分離する工程
を含む方法。

【請求項 2】

前記工程(2)が、以降の副工程:

(2)(a) 第1反応生成物を酵素から分離する工程、

(2)(b) 第1反応生成物から有機溶媒、過剰のエステル化剤および前記反応の副生物を除去して、式 I V の化合物と式 I I I の化合物の非転化の立体異性体とを包含する第2反応生成物を得る工程、および

(2)(c) 式 I V の化合物を第2反応生成物から分離して、式 I I I の化合物の非転化の立体異性体を含む第3反応生成物を残す工程

40

50

を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

工程(2)の後で、

(3) 第3反応生成物中の式I'I'Iの化合物の非転化の立体異性体をラセミ化して、式I'I'Iの化合物の8種の立体異性体の混合物を含有する第4反応生成物を生成し、そして該第4反応生成物を工程(1)に再循環させる工程

を含む請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

工程(3)の後で、

(4) 式IVの化合物を加水分解して、式I'I'Iの化合物の所望の立体異性体を得る工程 10
を含む請求項3記載の方法。

【請求項 5】

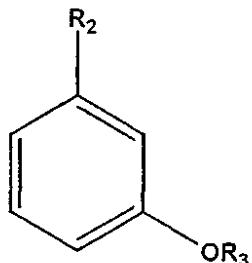
R₁がイソプロパノール基またはイソプロピレン基である場合に、工程(4)の前にまたは後で、式IVの化合物または式I'I'Iの化合物の所望の立体異性体を還元工程に付してR₁をイソプロピル基に転化する請求項4記載の方法。

【請求項 6】

工程(1)の前に、以下の工程：

(a) 式I：

【化3】

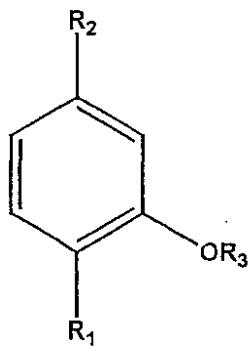


I

(ここで、R₂は、メチル基またはヒドロキシメチル基を表し、そしてR₃はH、塩基性 30
金属、ベンジル基またはアリル基を表す。)

の化合物を触媒存在下でアルキル化剤と反応させて式II：

【化4】



II

(ここで、R₁は請求項1で定義したものとおなじであり、そしてR₂およびR₃は前記 40
同じ意味を表す。)

の化合物を生成する工程、および

(b) 式IIの化合物を触媒存在下で水素化して、式IIIの化合物の8種の立体異性体のラセミ混合物を生成する工程

50

20

40

50

を含む請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

工程(1)において、溶媒が、イソオクタン、n-ヘプタン、デカン、メチルシクロヘキサン、t-ブチルメチルエーテル、キシレン、灯油、ペンタン、シクロヘキサン、ヘキサン、ベンゼン、ブタノール、トルエン、イソプロパノール、乳酸エチルおよびアセトンから成る群より選択される請求項1~6のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

工程(1)において、溶媒がn-ヘプタンである請求項7記載の方法。

【請求項 9】

工程(1)において、エステル化剤が、酢酸ビニル、酢酸ブチル、オクタン酸、酢酸イソプルペニル、酪酸ビニル、乳酸エチルおよび酢酸エチルから成る群より選択される請求項1~8のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 10】

工程(1)において、エステル化剤が酢酸ビニルである請求項9記載の方法。

【請求項 11】

工程(1)において、エステル化剤が、式IIIの化合物の所望の立体異性体とのモル比0.5:1~30:1(両端を含む)で使用される請求項1~10のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

工程(1)において、立体特異性酵素が、*Candida cylindracea*リバーゼ、ブタ臍臓リバーゼ、蛍光菌リバーゼ、コウジカビリバーゼ、*Rhizopus niveus*リバーゼ、*Rhizomucor miehei*リバーゼ、*Candida antarctica*リバーゼ、*Mucor javanicus*リバーゼ、*Rhizopus arrhizus*リバーゼ、*Penicillium roquefortii*リバーゼ、*Candida lipolytica*リバーゼ、*Pseudomonas* sp. B型リポタンパク質リバーゼ、*Pseudomonas cepacia*リポタンパク質リバーゼ、*Chromobacterium viscosum*リポタンパク質リバーゼ、*Bacillus thermoglucosidasi*usエステラーゼ、*Bacillus stearothermophilus*エステラーゼ、*Mucor miehei*エステラーゼ、ブタ肝臍エステラーゼ、*Candida rugosa*リバーゼ、*Mucor miehei*リバーゼ、*Candida antarctica B*リバーゼ、*Candida antarctica A*リバーゼ、*Chiro-CLEC-CR*、*Chiro-CLEC-CR*(スラリー)、ブタ肝臍エステラーゼ、ペニシリニアシラーーゼ、サブチリシン*Carlsberg*、*Chiro-CLEC-BL*(スラリー)、*Chiro-CLEC-PC*(スラリー)、*Chiro-CLEC-EC*(スラリー)、コウジカビプロテアーゼ、*PeptiCLEC-TR*(スラリー)、*ESL-001-01*、安定化剤含有*ESL-001-01*、*ESL-001-02*、*ESL-001-03*、*ESL-001-05*、*Chirazyme L4*(*Pseudomonas* sp.)、*Chirazyme L5*(*Candida antarctica*フラクションA)、*Chirazyme L1*(*Burkholderia*)、*Chirazyme L6*(ブタ臍臓)、*Chirazyme L7*、*Chirazyme L8*、*Naproxen*エステラーゼ、*Lipomax*、*Genzyme*、リポタンパク質リバーゼ、*Novozyme 868*、*Novozyme 435*、固定化*Candida antarctica*リバーゼ、*Nagase*酵素、リバーゼA-10FG(*Rhizopus javanicus*)、*Amano AYS*、*Amano OPS*、*Amano PSD*、*Amano AKD11*および*Amano AKD111*から成る群より選択される請求項1~11のいずれかに記載の方法。 30 40

【請求項 13】

工程(1)において、酵素が*Amano AK*リバーゼ酵素である請求項1~12のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

工程(1)において、立体特異性酵素が、式IIIの化合物の8種の立体異性体のラセミ混合物と、好適な有機溶媒とエステル化剤との混合物1の1g/L～60g/L(両端を含む)の量で使用される請求項1～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

工程(1)が20～100(両端を含む)までの温度において、大気圧下またはそれより高い圧力下で行われる請求項1～14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

工程(2)(a)の後で、立体特異性酵素が工程(1)に再循環される請求項2～15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】

工程(1)において、立体特異性酵素が、該立体特異性酵素を反応容器内に保持する連続システムで使用され、および工程(2)(a)において、第1反応生成物が、酵素を残したまま反応容器から出していく請求項2～15のいずれかに記載の方法。

【請求項18】

工程(4)において、加水分解が、塩基の存在下、好適溶媒中で、溶媒の沸点より低い温度または反応が行われる圧力下での反応混合物の還元温度よりも低い温度において行われる請求項4～17のいずれかに記載の方法。

【請求項19】

式IIIの化合物において、R₁がイソプロピル基を表す請求項1～18のいずれかに記載の方法。

10

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

本発明は、(-)メントールおよびその類似化合物の製造方法に関する。

【0002】

(-)メントールは、世界中で最もよく売れている香料化合物の一つであり、年間約11800トン生産されている。そのペパーミントの香りと冷たい感覚は、多くの製品、主にメントール系タバコや、練り歯磨き粉、マウスウォッシュおよびチューアンガムなどの口腔衛生製品に使用されている。医薬品およびヘルスケア製品は、咳止めトローチ、シェービングクリームおよび局所鎮痛剤(topical analgesics)などの種々の製品類にメントールを使用している。

30

【0003】

季節の変化や乏しい農業経験のために、最も供給量の多い国であるインドと中国からの天然メントールの性能は、時々不安定である。これに加えて、限られた量のペパーミントだけを植えて、天然メントールの供給を制限していることがある。メントールの残りの需要は、合成メントールに当たる。

【0004】

感覚刺激性の(organoleptically)天然および合成メントールは、完全に交換可能であり、僅かな違いは大抵、製品開発中に排除されている。さらに、合成メントールは、天然メントールに含まれる不純物を含まないため、より純粋で、しかもより一貫性のある味および香氣プロフィールを有する。

40

【0005】

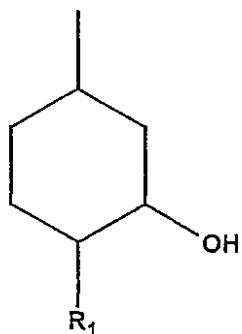
(-) - メントールおよびその類似化合物の製造では、新しい方法が常に必要とされている。

【0006】

発明の要旨

本発明によれば、単一の所望の立体異性体を、式III：

【化5】



10

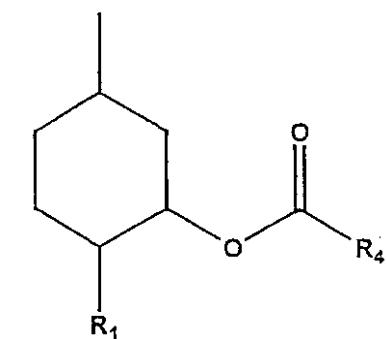
III

(ここで、R₁は、イソプロパノール基、イソプロピル基またはイソプロピレン基を表す。)

の化合物の8種の立体異性体のラセミ混合物から分離する方法であって、

(1) ラセミ混合物を、好適な有機溶媒中、エステル化剤および所望の立体異性体の-OH基を立体選択的にエステル化する立体特異性酵素と、所望の立体異性体の所望の割合(%)を式IV:

【化6】



20

IV

(ここで、R₁は、前記と同じ意味を表し、およびR₄は、アルキル基またはアリール基である。)

の化合物に転化するのに十分な時間接触させて、式IVの化合物、有機溶媒、式IIIの化合物の非転化立体異性体、過剰なエステル化剤および前記反応の副生物を包含する第1反応生成物を得る工程、および

(2) 式IVの化合物を第1反応生成物から分離する工程を含む方法が提供される。

【0007】

40

工程(2)は、好ましくは以下の副工程を含む。

(2)(a) 第1反応生成物を酵素から分離する工程、

(2)(b) 第1反応生成物から有機溶媒、過剰のエステル化剤および反応副生物を除去して、式IVの化合物と式IIIの化合物の非転化の立体異性体とを包含する第2反応生成物を得る工程、および

(2)(c) 式IVの化合物を第2反応生成物から分離して、式IIIの化合物の非転化の立体異性体を含む第3反応生成物を残す工程。

【0008】

50

本発明の方法は、好ましくは、

(3) 第3反応生成物中の式IIIの化合物の非転化の立体異性体をラセミ化して、式I

I I の化合物の 8 種の立体異性体の混合物を含有する第 4 反応生成物を生成し、そして第 4 反応生成物を工程(1)に再循環させる工程を更に含む。

【0009】

本発明の方法は、好ましくは、

(4) 式 I V の化合物を加水分解して、式 I I I の化合物の所望の立体異性体を得る工程を更に含む。

【0010】

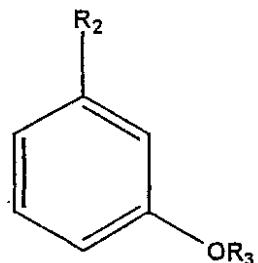
本発明の方法では、R₁ がイソプロパノール基またはイソプロピレン基である場合、工程(4)の前にまたは後で、式 I V の化合物または式 I I I の化合物の所望の立体異性体を還元工程に付して R₁ をイソプロピル基に転化してもよい。 10

【0011】

本発明の方法は、好ましくは、工程(1)の前に以降の工程を包含する。

(a) 式 I :

【化7】

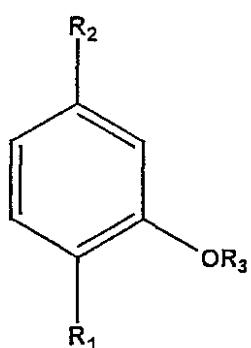


I

(ここで、R₂ は、メチル基またはヒドロキシメチル基を表し、そして R₃ は H、塩基性金属、ベンジル基またはアリル基を表す。)

の化合物を触媒存在下でアルキル化剤と反応させて式 I I :

【化8】



II

(ここで、R₁、R₂ および R₃ は前記と同じ意味を表す。)

の化合物を生成する工程、および

(b) 式 I I の化合物を触媒存在下で水素化して、式 I I I の化合物の 8 種の立体異性体のラセミ混合物を生成する工程。

【0012】

態様の説明

発明の要点は、式 I I I の化合物の単一の所望の立体異性体を、式 I I I の化合物の 8 種の立体異性体のラセミ混合物から、立体特異性酵素を用いたエステル化によって分離する方法である。

10

20

30

40

50

【0013】

本発明の方法は、以降に説明するようなより大規模なプロセスの一部を構成し得る。

【0014】

第1の工程である前記方法の工程(a)は、式Iの化合物を、プロピレン、イソプロパノールまたはアセトンなどのアルキル化剤を用いて触媒存在下でアルキル化して式IIの化合物を生成することである。

【0015】

前記触媒は、AlCl₃、SnCl₄、BF₃、ZnCl₂またはFeCl₃などのルイス酸触媒、HCl、HF、H₂SO₄またはH₃PO₄などのブレンステッド酸、担体上のポリリン酸であるEnvirocat EPICまたは担体上の塩化鉄(III)であるEnvirocat EPZ10などの好適な担持触媒、または固体のリン酸、あるいは好みの触媒である好適なゼオライト触媒であってよい。10

【0016】

工程(a)は、塩素化溶媒(例えば、ジクロロメタン、クロロホルムまたはジクロロエタン)などの溶媒の存在下で行われてよいが、溶媒の存在は必須ではない。

【0017】

工程(a)は、バッチ反応として、または連続気相もしくは液相反応として行われてよい。。

【0018】

工程(a)において、反応中および反応後の反応温度は450℃以下であってよい。20

【0019】

工程(a)は、空气中、あるいはアルゴンまたは窒素などの不活性雰囲気下で行われてよい。

【0020】

式Iの化合物は、好みのm-クレゾールであり、そのため、式IIの化合物は好みのチモールである。

【0021】

工程(a)の終点で、触媒を除去するかまたは不活性化し、そして含まれている溶媒を除去する。式IIの必要とされる化合物を、反応混合物から蒸留等によって単離する。非反応のアルキル化剤および反応副生物は、工程(a)に再循環させてよい。30

【0022】

第2の工程である前記方法の工程(b)は、式IIの化合物を、好適な触媒と水素ガスを用いた水素化によって式IIIの化合物の8種の立体異性体のラセミ混合物に還元することである。

【0023】

前記触媒は、一般に、均質反応水素化で使用されるPd(OAc)₂など、または均質触媒水素化で使用される担持パラジウム、白金、ロジウム、ルテニウム、ニッケル、スponジニッケルおよび2CuO·Cr₂O₃などであってよい。

【0024】

好みの触媒はニッケル触媒である。40

【0025】

触媒添加量は、0.01~20%、好みは0.5~5%であってよい。

【0026】

工程(b)は、溶媒を用いてまたは用いずに行われてよい。溶媒を使用する場合、それは、触媒的な水素化に用いられる溶媒であればよく、例えば、炭化水素または水性苛性アルカリが挙げられる。

【0027】

工程(b)は、好みは、800~3000まで(両端を含む)の高温、好みは1600~2000(両端を含む)で行われる。

【0028】

50

工程(b)は、50 bar 以下、好ましくは5～35 bar(両端を含む)の間の水素圧を用いて行われる。

【0029】

式IIの化合物がチモールであれば、メントールの4対のジアステレオ異性体のラセミ混合物、すなわち、(±)-メントール、(±)-イソメントール、(±)-ネオメントールおよび(±)-ネオイソメントール、そして2種の中間体(±)-メントンおよび(±)-イソメントンが形成される。

【0030】

工程(b)の終点において、触媒を、蒸留などによって除去するか、または不活性化し、そして溶媒を除去する。

10

【0031】

本発明の次の工程、工程(1)は、本発明の方法の鍵工程である。

【0032】

水素化工程(構成(b))からの式IIIの化合物の8種の立体異性体のラセミ混合物を、好適な有機溶媒中でエステル化剤、および式IIIの化合物の所望の立体異性体の-OH基を立体選択的にエステル化する立体特異性酵素と、所望の立体異性体の所望の割合を式IVの化合物に転化するのに十分な時間接触させて、式IVの化合物、有機溶媒、式IIの化合物の非転化の立体異性体、過剰のエステル化剤および前記反応の副生物を包含する第1反応生成物を生成する。

【0033】

前記反応は、式IIIの化合物の所望の立体異性体と、実質上未反応のまま残存する式IIの他の立体異性体との立体選択的なエステル化であるが、少量の他の立体異性体も酵素によってエステル化され得る。

20

【0034】

式IIIの化合物のR₁がイソプロピル基であれば、前記化合物は、8種の立体異性体から成るメントールに相当する。メントールの所望の立体異性体は、(-)-異性体であって、これは、好適な酵素を用いて(-)-メンチルエステルに選択的にエステル化され得る。

【0035】

好適な有機溶媒は、酵素触媒作用されたエステル化反応に一般に使用される溶媒であってよく、イソオクタン、n-ヘプタン、デカン、メチルシクロヘキサン、t-ブチルメチルエーテル、キシレン、灯油(C5-C6パラフィン、kerasol 60/115)、(C7-C8パラフィン、kerasol 94/125)、ペンタン、シクロヘキサン、ヘキサン、ベンゼン、ブタノール、トルエン、イソプロパノール、乳酸エチルおよびアセトンを包含する。

30

【0036】

好ましい有機溶媒はn-ヘプタンである。

【0037】

式IIIの化合物のラセミ混合物に対して用いられる有機溶媒の量は、好ましくは、体積基準で、5%～80%ラセミ混合物 対 有機溶媒 95%～20%の範囲である。

40

【0038】

有機溶媒がn-ヘプタンであるとき、ラセミ混合物は、n-ヘプタン中、20%の量で好ましく使用される。

【0039】

エステル化剤は、例えば、酢酸ビニル、酢酸ブチル、オクタン酸、酢酸イソブチルペニル、酢酸ビニル、乳酸エチルおよび酢酸エチルのような好適なエステル化剤であってよい。

【0040】

好ましいエステル化剤は酢酸ビニルである。

【0041】

エステル化剤は、式IIIの化合物の所望の立体異性体とのモル比0.5：1～30：1

50

で使用されてよい。エステル化剤と式IIIの化合物の所望の立体異性体との好ましいモル比は、酢酸ビニルをエステル化剤として使用する場合、約2:1である。

【0042】

酵素は、式IIIの化合物の-OH基を立体選択的にエステル化する立体特異性酵素である。

【0043】

酵素は、微生物に含まれているか、または微生物の成長に必要な媒体中に分泌され、あるいは半精製または精製された形態で市販されていることもある。微生物は、微生物の遺伝子工学のプロセスを通じて好適な酵素を生成する能力を備えていてもよい。

【0044】

前記エステル化プロセスを行うことができる酵素および微生物の例は、リパーゼ、エステラーゼまたはプロテアーゼ様の活性を示すものを包含する。

【0045】

好適な酵素としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。

フルカ(Fluka)製の酵素：Candida cylindraceaリパーゼ、ブタ臍臓リパーゼ、蛍光菌リパーゼ、コウジカビリパーゼ、Rhizopus niveusリパーゼ、Rhizomucor mieheiリパーゼ、Candida antarcticaリパーゼ、Mucor javanicusリパーゼ、Rhizopus arrhizusリパーゼ、Penicillium roquefortiリパーゼ、Candida lipolyticaリパーゼ、Pseudomonas sp. B型リポタンパク質リパーゼ、Pseudomonas cepaciaリポタンパク質リパーゼ、Chromobacterium viscosumリポタンパク質リパーゼ、Bacillus thermoglucosidasiusエステラーゼ、Bacillus stearothermophilusエステラーゼ、Mucor mieheiエステラーゼ、ブタ肝臓エステラーゼ、

アルタス(Altus)製の酵素：Candida rugosaリパーゼ、Mucor mieheiリパーゼ、Candida antarctica Bリパーゼ、Candida antarctica Aリパーゼ、Chiro-CLEC-CR、Chiro-CLEC-CR(スラリー)、ブタ肝臓エステラーゼ、ペニシリニアシラーーゼ(Penicillin acylase)、サブチリシン(Subtilisin) Carlsberg、Chiro-CLEC-BL(スラリー)、Chiro-CLEC-PC(スラリー)、Chiro-CLEC-EC(スラリー)、コウジカビプロテアーゼ、PeptiCLEC-TR(スラリー)、

リコンビナント・バイオカタリシス(Recombinant Biocatalysis)製の酵素：ESL-001-07、ESL-001-01、安定化剤含有ESL-001-01、ESL-001-02、ESL-001-03、ESL-001-05、ベーリンガー・マンハイム(Boehringer-Mannheim)製の酵素：Chirazyme L4(Pseudomonas sp.)、Chirazyme L5(Candida antarcticaフラクションA)、Chirazyme L1(Burkholderia)、Chirazyme L6(ブタ臍臓)、Chirazyme L7、Chirazyme L8、

ヒスト・プロカデス社(Gist-Brocades)製の酵素：Naproxenエステラーゼ、Lipomax、Genzyme、リポタンパク質リパーゼ、

ノヴォ(Novo)製の酵素：Novozyme 868、Novozyme 435、固定化Candida antarcticaリパーゼ、Nagase酵素、リパーゼA-10FG(Rhizopus javanicus)、

天野(Amano)製の酵素：AmanoAYS、AmanoPS、AmanoPSD、AmanoAKD11、AmanoAKD111。

【0046】

好ましい酵素は、日本国天野社製のAmanoAKリパーゼ酵素である。

【 0 0 4 7 】

酵素は、遊離形態で使用されても、または珪藻土などの好適な担体に固体されてもよい。

【 0 0 4 8 】

酵素は、好ましくは、反応混合物（すなわち、式 I II の化合物の 8 種の立体異性体のラセミ混合物、好適な有機溶媒およびエステル化剤を含むもの）の 1 g / L ~ 60 g / L の量で使用する。

【 0 0 4 9 】

前記分解（r e s o l u t i o n）工程は、好ましくは、20 ~ 100 までの温度において、大気圧下またはそれより高い圧力下で行われる。酵素が A m a o n o A K であるとき、好ましい反応温度は約 50 である。
10

【 0 0 5 0 】

前記分解反応は、式 I II の化合物の所望の立体異性体の所望の割合を式 I V の化合物に転化するのに十分な時間継続する。一般には、ラセミ混合物に含まれる他の立体異性体のエステル化に進行する反応を伴わずに、できるだけ多くの所望の立体異性体を式 I V の化合物に転化することが望ましい。

【 0 0 5 1 】

反応時間は、反応をバッチモードで行う場合、好ましくは約 24 時間以内である。

【 0 0 5 2 】

本発明の方法の次の工程、工程（2）（a）は、第 1 反応生成物を酵素から分離することであるので、酵素は再循環され得る。この工程は、遠心分離または濾過などによって達成できる。
20

【 0 0 5 3 】

本発明の方法の主な利点は、酵素を前記分解工程へ何回も再循環でき、それによって本発明の方法の経済性を向上できることである。

【 0 0 5 4 】

酵素再循環の必要性は、酵素を反応容器内に保持する連続システムでの酵素の使用によって排除されてもよい。前記の式 I II の化合物のラセミ混合物、有機溶媒およびエステル化剤を反応容器に供給し、ここで、式 I II の化合物の所望の立体異性体を式 I V の化合物にエステル化して、第 1 反応生成物を形成する。第 1 反応生成物は、一般に、導入供給速度と同じ速度で、更なる加工のために、反応容器から出していく。酵素は、一般には、メンプランの使用によって、または担体材料上に固定することにより、あるいは架橋による安定化によって反応容器内に保持され得る。
30

【 0 0 5 5 】

本発明の方法の次の工程、工程（2）（b）は、有機溶媒、過剰のエステル化剤および反応副生物を除去して、式 I V の化合物と式 I II の化合物の非転化の立体異性体を包含する第 2 反応生成物を得ることである。この工程は蒸留により行われてよい。蒸留では、n - ヘプタンなどのなどの有機溶媒や酢酸ビニルなどの過剰のエステル化剤をカラムの上部で單一流として取り除き、そして後続での再使用のために好適な貯蔵タンクに戻して再循環させる。
40

【 0 0 5 6 】

本発明の方法の次の工程（2）（c）は、式 I V の化合物を第 2 反応生成物から分離して、式 I II の化合物の非転化の立体異性体を含む第 3 反応生成物を残すことである。前記分離は、蒸留により達成され得る。

【 0 0 5 7 】

式 I V の化合物において、R₁ がイソプロピル基でない場合、R₁ 基は、この段階かまたは以降に説明するその後のエステル基の加水分解において、還元プロセスを通じてイソプロピル基に転化され得る。このことは、メンチルエステルの所望の立体異性体の製造、または後続の加水分解をもたらし、メントールの所望の立体異性体を製造する。

【 0 0 5 8 】

本発明の方法の次の工程である工程(3)は、第3反応生成物中の非転化の立体異性体をラセミ化して、式ⅠⅡの化合物の8種の立体異性体の混合物を含有する第4反応生成物を生成して、これを本発明の方法の前記分解工程に再循環させることである。

【0059】

ラセミ化は、好適な触媒により、水素ガスを用いてまたは用いずに、溶媒を用いてまたは用いずに、そして大気圧またはそれ以上の圧力で達成され得る。

【0060】

この工程は、溶媒を用いて行っても、または溶媒を用いずに行われてもよい。溶媒を使用する場合、溶媒は、触媒作用的水素化に通常使用される溶媒であればよく、大抵は炭化水素または水性苛性アルカリである。

10

【0061】

使用される触媒は、均質触媒作用的水素化に通常用いられるPd(OAc)₂およびRu(PPh₃)₃C₁₂などの触媒、または均質触媒的水素化に通常用いられる担持パラジウム、白金、ロジウム、ルテニウム、ニッケル、スピンジニッケルおよび2CuO·Cr₂O₃などの触媒、あるいはセライト、CuO、CrO₃、CoO、SiO₂、Al₂O₃、Ba(OH)₂、MnO、Al(iOPr)₃、LnO₂、ZrOおよびゼオライトなどの固体酸化物であってよい。

【0062】

反応は、80～300までの温度(両端を含む)、好ましくは180～220までの温度で行われてよい(両端を含む)。

20

【0063】

水素圧は、50bar以下の圧力、好ましくは5～35barの間(両端を含む)であってよい。

【0064】

触媒添加量は、0.01～20%の間、好ましくは0.05～5%の間であってよい。

【0065】

工程の終点で、触媒を除去または不活性化し、そして含まれている溶媒を除去する。

【0066】

このラセミ化工程は、適当な工程(b)(すなわち、水素化工程)と合わせて行われてよい。

30

【0067】

本発明の方法の次の工程、工程(4)は、式ⅠⅤの化合物を式ⅠⅡの化合物の所望の立体異性体へ加水分解することである。この反応は、塩基の存在下で行われてよく、前記塩基は、ナトリウムメトキシドまたはナトリウムエトキシドなどの低級脂肪族アルコールの塩、KOH、NaOHまたはMg(OH)₂などの金属水酸化物、あるいはNH₄OHなどのアミン塩基であってよい。

【0068】

反応は、加水分解反応で一般に使用される溶媒中で行われてよく、溶媒としては、例えば、低級脂肪族アルコールまたは水が挙げられる。前記溶媒の組み合わせを使用してもよい。

40

【0069】

反応温度は、選択される溶媒の沸点以下、または反応が行われる圧力下での混合物の還元温度よりも低い温度であってよい。

【0070】

式ⅠⅤの化合物において、R₁がイソプロピル基であれば、この化合物((-)-メンチルエステル)の加水分解によって(-)-メントールが生成される。

【0071】

最終工程として、式ⅠⅡの化合物の所望の異性体を所望の純度まで蒸留または再結晶などにより精製してよい。

【0072】

50

実験作業

本発明の方法に関連して行った種々の実験結果を以下に示す。

【0073】

実施例1

m-クレゾール(2.0g)およびo-リン酸(4モル、例えば、8.5g)を、丸底フラスコに入れて85℃に加熱した。イソプロパノール(1.11g)を30分かけて滴下した。次いで、反応を25℃まで冷却し、有機相をトルエン(20mL)に抽出した。濃厚な有機フラクションのNMR分析は、m-クレゾールのチモールへの10%転化を示した。

【0074】

実施例2

チモール(4.20g)、シクロヘキサン(50mL)および5%Pt/C(0.40g)を300mLパール(Parr)オートクレーブ反応室に入れた。密封した後、H₂(気体)(20bar)で満たす前に、この室にN₂(気体)を一気に流した。反応を180℃に加熱し、反応を2時間進行させた。次に、反応を室温まで冷却させて、反応容器内部の圧力を開放し、反応混合物を濾過してメントール立体異性体の混合物を得た(100%転化チモール、メントールへの80%選択性)。

【0075】

実施例3

2mLバイアルに、Pseudomonas cepaciaリバーゼ(フルカ製)、螢光菌リバーゼ(フルカ製)、ペニシリニアシラーゼ(アルタス製)、サブチリシンCarlsberg(アルタス製)、コウジカビプロテアーゼおよびPeptiCЛЕС-TRスラリー(アルタス)を10または10mg秤量した。これに、シクロヘキサン、ヘキサン、ペンタンまたはヘプタン(962.72μL)を加えた。異性体メントール(23μL)および酢酸ビニル(14.28μL)も加えた。これらのバイアルを30または37℃で2または48時間インキュベートした。次いで、酵素を遠心分離によって混合物から除去した。試料をガスクロマトグラフィー(GC)で分析した。各クロマトグラムについての個々のピークは、(-)-メンチルアセテートの標準試料の対応する保持時間との比較により、(-)-メンチルアセテートであると同定された。

【0076】

実施例4

凍結乾燥したAmanoAK(螢光菌リバーゼ酵素)は、天野製薬株式会社(Amano Pharmaceutical Co. (日本))から入手した。濃厚な液体メントールをチモールの水素化によって製造した。このメントールは、メントールの4対のジアステレオ異性体、すなわち(±)-メントール(51%)、(±)-イソメントール(14%)、(±)-ネオメントール(29%)および(±)-ネオイソメントール(2%)を含有していた。1mLの体積を密閉したバッチ反応容器に加えた。酢酸ビニル(54μL)を(-)-メントールとのモル比2:1で加えた。ヘプタンを溶媒として最終反応体積5mLに加えた。この反応容器をシリコンオイル浴中、50℃でインキュベートし、攪拌式ホットプレートで攪拌した。バッチ時間は、特に断りのない限り24時間であった。次いで、反応混合物を遠心分離して酵素から生成物を分離した。上澄みをGCで分析した(%m/m分析)。得られた(-)-メントールのうち、100%が、約98%で、(-)-メンチルアセテートに転化された。酵素は、ヘプタンで洗浄して、新しい基質(液体メントール、酢酸ビニルおよびヘプタン)を再循環後毎に加えることにより、合計150回再循環させた。(-)-メントール185gに相当するメンチルアセテートの量がこの方法で製造された。

【0077】

実施例5

AmanoAKリバーゼ酵素は、Celite535を(比1:2で)添加する前に、リン酸塩(phosphate)緩衝液(5mM、pH7)に溶解した。混合物を-80℃

10

20

30

40

50

で5分間凍結させ、次いで24時間凍結乾燥させて、固定化酵素を生成した。液体メントール15.5% (v/v) および酢酸ビニル5.5% (v/v) とn-ヘプタン79% (v/v) を含有する基質混合物を調製した。この混合物を、固定化酵素で充填して直列に配置した5本のカラムを介して供給した。反応温度は50℃に維持した。最終生成物は、(-)-メントールのうち、100%が、約98%で、(-)-メンチルアセテートに転化された。206日以内に、固定化酵素1gにつき(-)-メントール101gに相当する(-)-メンチルアセテートの量がこの固定化酵素系で製造された。

【0078】

実施例6

10

メタノール(50.1g)、水(50.21g)およびNaOH(6.03g、0.15モル)の溶液を反応容器に入れて60℃に加熱した。次に、(-)-メンチルアセテート(30.53g、15モル)を反応容器に加えて、反応を30分間激しく攪拌した。定性GC分析は、メンチルアセテート53面積%とメントール47面積%を示した。

【0079】

実施例7

20

(-)-メントール(100g)およびNi(1%)を丸底フラスコに入れて、還流温度で2時間加熱した。25℃まで冷却した後、反応混合物をサンプリングした。定性m/m分析は、チモール17%、メントール23%およびメントン54%と共に(+)-メントール/(±)-メントール22%を示した。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 January 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/04384 A2(51) International Patent Classification⁵: C07B 57/00.
C07C 35/12, 29/88, 67/08, 29/09

(21) International Application Number: PCT/IB01/01008

(22) International Filing Date: 11 June 2001 (11.06.2001)

(25) Filing Language: English

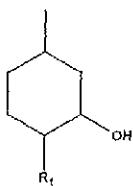
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
2000/3417 7 July 2000 (07.07.2000) ZA(71) Applicant (*for all designated States except US*): AECI
LIMITED [Za/ZA]; ABC Place, 1st Floor, 24 The Wood-
lands, Woodlands Drive, Woodmead, 2128 Sandton (ZA).

(72) Inventors and

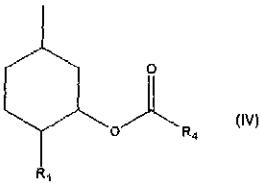
(73) Inventors/Applicants (*for US only*): CHAPLIN, Jen-
ifer, Ann [US/US]; 7954 Avenida Navidad, No. 95, SanDiego, CA 92122 (US). GARDNER, Neil, Stocken-
strom [ZA/ZA]; 186 Celliers Road, Glen Austin, 1685
Midrand (ZA). MITRA, Robin, Kumar [ZA/ZA]; 61A
Miller Road, Marister, 1501 Banoni (ZA). PARKINSON,
Christopher, John [ZA/ZA]; 15 Elm Avenue, Thornhill,
1643 Midderfontein (ZA). PORTWIG, Madrie [ZA/ZA];
77 Greenside Road, 1695 Greenside (ZA). BUTANA,
Andrew, Shoniswa [ZA/ZA]; 224 Pine Gardens, Lang
Street, 1619 Kempton Park (ZA). DICKSON, Melanie,
Daryl, Evan [ZA/ZA]; 37 Adelaide Place, Abel Street,
Tarentine, 1619 Kempton Park (ZA). BRADY, Dean
[ZA/ZA]; 19 Lichtenberg Road, Nondwytsh, 1685 Milnerton
(ZA). MARAIS, Stephanus, Francois [ZA/ZA]; 530
Jessie Collins Street, 00142 Garsfontein (ZA). REDDY,
Shavani [ZA/ZA]; 31 Geelhout Street, Manis Steyn Park,
1610 Ekukhahlwe (ZA).(74) Agents: DYER, Alison, Margaret et al.; Spoor and Fisher,
P.O. Box 41312, 2024 Craighall (ZA).*(Continued on next page)*

(54) Title: PROCESS FOR PREPARING (-)-MENTHOL AND SIMILAR COMPOUNDS



(57) Abstract: A process of separating a single desired stereoisomer from a racemic mixture of eight stereoisomers of a compound of formula (III), wherein R₁ represents an isopropenyl group, an isopropyl group or an isopropylene group, includes the steps of: contacting the racemic mixture in a suitable organic solvent with an esterifying agent and a stereospecific enzyme which stereoselectively esterifies the -OH group of the desired stereoisomer, for a time sufficient to convert a desired percentage of the desired stereoisomer to a compound of formula (IV), wherein R₁ is as defined above and R₄ is an silyl or an aryl group, to give a first reaction product including the compound of formula (IV), the organic solvent, the unconverted stereoisomers of the compound of formula (III), excess esterifying agent and by-products of the reaction, and separating the compound of formula (IV) from the first reaction product. The process is of particular application for the production of (-)-menthol.

WO 02/04384 A2



WO 02/04384 A2

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, L.C., LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report entirely in electronic form (except for this front page) and available upon request from the International Bureau

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, EL, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MG, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations," appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-1-

**PROCESS FOR PREPARING (-)MENTHOL
AND SIMILAR COMPOUNDS**

BACKGROUND TO THE INVENTION

THIS invention relates to a process for producing (-)-menthol and similar compounds.

(-)-Menthol is one of the world's largest selling flavour compounds, with a production of about 11800 tons per annum. Its peppermint flavour and cooling sensation are used in many products, primarily in mentholated cigarettes and oral hygiene products, such as toothpaste, mouthwash and chewing gum. Pharmaceutical and healthcare products use menthol in a variety of product types, such as cough lozenges, shaving cream and topical analgesics.

Owing to seasonal variations and poor farming practices, the availability of natural menthol from the largest supplying countries, India and China, is sometimes erratic. In addition to this, only a limited amount of peppermint can be planted, thus limiting the supply of natural menthol. The remainder of the demand for menthol is met by synthetic menthol.

CONFIRMATION COPY

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

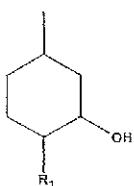
-2-

Organoleptically, natural and synthetic menthol are completely interchangeable; any slight differences have been largely eliminated through product development. Moreover, synthetic menthol has a purer and more consistent taste and odour profile since it does not contain the impurities present in natural menthol.

There is always a need for new processes for the production of (-)-menthol and similar compounds.

SUMMARY OF THE INVENTION

According to the invention there is provided a process of separating a single desired stereoisomer from a racemic mixture of eight stereoisomers of a compound of the formula III



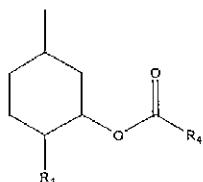
III

wherein R₁ represents an isopropanol group, an isopropyl group or an isopropylene group, including the steps of:

- (1) contacting the racemic mixture in a suitable organic solvent with an esterifying agent and a stereospecific enzyme which stereoselectively esterifies the -OH group of the desired stereoisomer, for a time sufficient

-3-

to convert a desired percentage of the desired stereoisomer to a compound of the formula IV

**IV**

wherein R₁ is as defined above and R₄ is an alkyl or an aryl group,
to give a first reaction product including the compound of the formula IV,
the organic solvent, the unconverted stereoisomers of the compound of
the formula III, excess esterifying agent and by-products of the reaction;
and

- (2) separating the compound of the formula IV from the first reaction product.

Step (2) preferably comprises the sub-steps of:

- (2)(a) separating the first reaction product from the enzyme;
- (2)(b) removing from the first reaction product the organic solvent, the excess esterifying agent, and the by-products of the reaction to give a second reaction product including the compound of the formula IV and the unconverted stereoisomers of the compound of formula III; and
- (2)(c) separating the compound of the formula IV from the second reaction product leaving a third reaction product containing the unconverted stereoisomers of the compound of formula III.

The process of the invention preferably includes a further step, step (3) of:

-4-

- (3) racemizing the unconverted stereoisomers of the compound of the formula III in the third reaction product to give a fourth reaction product containing a mixture of all eight stereoisomers of the compound of the formula III and recycling the fourth reaction product to step (1).

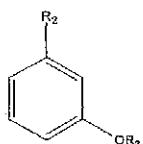
The process of the invention preferably includes a further step, step (4) of:

- (4) hydrolysing the compound of the formula IV to give the desired stereoisomer of the compound of the formula III.

In the process of the invention, when R₁ is an isopropanol group or an isopropylene group, before or after step (4), the compound of the formula IV or the desired stereoisomer of the compound of the formula III may be subjected to a reduction step to convert R₁ to an isopropyl group.

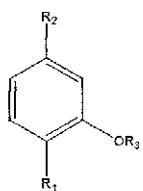
The process of the invention preferably includes the following steps, prior to step (1) of:

- (a) reacting a compound of the formula I



wherein R₂ represents a methyl or a hydroxymethyl group, and R₃ represents H, a base metal, a benzyl group or an allyl group,
with an alkylating agent in the presence of a catalyst to give a compound of the formula II

-5-



wherein R₁, R₂ and R₃ are as defined above; and

- (b) hydrogenating the compound of the formula II in the presence of a catalyst to give a racemic mixture of the eight stereoisomers of the compound of the formula III.

DESCRIPTION OF EMBODIMENTS

The crux of the invention is a process of separating a single desired stereoisomer of a compound of the formula III from a racemic mixture of the eight stereoisomers of the compound of the formula III, by esterification using a stereospecific enzyme.

This process step may form part of a larger process as described below.

The first step, step (a) of the process is to alkylate a compound of the formula I to yield a compound of the formula II, using an alkylating agent such as propylene, isopropanol or acetone, in the presence of a catalyst.

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-6-

The catalyst may be a Lewis acid catalyst such as AlCl₃, SnCl₄, BF₃, ZnCl₂ or FeCl₃; or a Brønsted acid such as HCl, HF, H₂SO₄ or H₃PO₄; or a suitable supported catalyst such as Envirocat EPIC which is a polyphosphoric acid on a support, or Envirocat EPZ 10 which is a ferric chloride on a support; or a solid phosphoric acid; or a suitable zeolite catalyst which is the preferred catalyst.

Step (a) may be carried out in the presence of a solvent such as a chlorinated solvent, e.g dichloromethane, chloroform or dichloroethane, but the presence of a solvent is not essential.

Step (a) may be carried out as a batch reaction or as a continuous gas or liquid phase reaction.

In step (a), the reaction temperature during and after the reaction may be any temperature below 450°C.

Step (a) may be carried out in air or under an inert atmosphere such as argon or nitrogen.

The compound of the formula I is preferably m-cresol, and thus the compound of the formula II is preferably thymol.

At the end of step (a), the catalyst is removed or deactivated, and any solvent present is removed. The required compound of the formula II is isolated from the reaction mixture, for example by distillation. The unreacted alkylating agent and reaction by-products may be recycled to step (a).

The second step, step (b) of the process is to reduce the compound of the formula II to a racemic mixture of the eight stereoisomers of the compound of the formula III, by hydrogenation using hydrogen gas over a suitable catalyst.

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-7-

The catalyst may be any catalyst typically used in homogeneous catalytic hydrogenations such as Pd(OAc)₂ or in heterogenous catalytic hydrogenations such as supported palladium, platinum, rhodium, ruthenium, nickel, sponge nickel and 2CuO.Cr₂O₃.

The preferred catalyst is a nickel catalyst.

The catalyst loading may be from 0,01 to 20%, preferably from 0,5 to 5%.

Step (b) may be carried out with or without a solvent. If a solvent is used, it may be any solvent typically used for catalytic hydrogenation, for example a hydrocarbon or aqueous caustic.

Step (b) is preferably carried out at an elevated temperature of from 80°C to 300°C inclusive, preferably from 160°C to 200°C inclusive.

Step (b) is carried out using a hydrogen pressure which is below 50 bar, preferably between 5 and 35 bar inclusive.

When the compound of the formula II is thymol, there is formed a racemic mixture of the four pairs of diastereomeric isomers of menthol, viz (±)-menthol, (±)-isomenthol, (±)-neomenthol and (±)-neoisomenthol, as well as two intermediates (±)-menthone and (±)-isomenthone.

At the end of step (b), the catalyst is removed, e.g by filtration, or is deactivated, and any solvent present is removed.

The next step of the process of the invention, step (1), is the key step of the process.

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-8-

The racemic mixture of the eight stereoisomers of the compound of the formula III from the hydrogenation step (step (b)) is contacted in a suitable organic solvent with an esterifying agent and with a stereospecific enzyme which stereoselectively esterifies the -OH group of the desired stereoisomer of the compound of the formula III, for a time sufficient to convert a desired percentage of the desired stereoisomer to a compound of the formula IV, to give a first reaction product including the compound of the formula IV, the organic solvent, the unconverted stereoisomers of the compound of the formula III, excess esterifying agent, and by-products of the reaction.

The reaction is a stereoselective esterification of a desired stereoisomer of the compound of the formula III, with the other stereoisomers of the compound of the formula III remaining substantially unchanged, although small amounts of the other stereoisomers may also be esterified by the enzyme.

When R₁ of the compound of the formula III is an isopropyl group, the compound corresponds to menthol which consists of eight stereoisomers. The desired stereoisomer of menthol is the (-)-isomer, which can be selectively esterified using a suitable enzyme to the (-)-menthyl ester.

The suitable organic solvent may be any solvent typically used for enzyme catalysed esterification reactions, including isoctane; n-heptane; decane; methyl cyclohexane; t-butyl methyl ether; xylene; kerosene (C5-C6 paraffins, kerasol 60/115), (C7-C8 paraffins, kerasol 94/125); pentane; cyclohexane; hexane; benzene; butanol; toluene; isopropanol; ethyl lactate; and acetone.

The preferred organic solvent is n-heptane.

The amount of the organic solvent used relative to the racemic mixture of the compound of the formula III is preferably in the range of from 5% to 80% racemic mixture to 95% to 20% organic solvent on a volume basis.

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-9-

When the organic solvent is n-heptane, the racemic mixture is preferably used in an amount of 20% v/v in the n-heptane.

The esterifying agent may be any suitable esterifying agent such as for example vinyl acetate, butyl acetate, octanoic acid, isopropenyl acetate, vinyl butyrate, ethyl lactate and ethyl acetate.

The preferred esterifying agent is vinyl acetate.

The esterifying agent may be used in an molar ratio to the desired stereoisomer of the compound of the formula III of 0.5:1 up to 30:1. The preferred molar ratio of the esterifying agent to the desired stereoisomer of the compound of the formula III is about 2:1 when vinyl acetate is used as the esterifying agent.

The enzyme is a stereospecific enzyme which stereoselectively esterifies the -OH group of the compound of the formula III.

The enzyme may be contained within a microorganism, or secreted into a medium required for microorganism growth, or may be available commercially in semi-purified or purified form. Microorganisms can also be provided with the ability to produce a suitable enzyme through the process of genetic engineering of the microorganism.

Examples of enzymes and microorganisms that are capable of performing this esterifying process include those exhibiting lipase, esterase or protease-like activity.

Suitable enzymes include, but are not limited to:

Enzymes supplied by Fluka: *Candida cylindracea* lipase, lipase Hog pancreas, lipase *Pseudomonas fluorescens*, lipase *Aspergillus oryzae*, lipase *Rhizopus*

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-10-

niveus, lipase Rhizomucor miehei, lipase Candida antarctica, lipase Mucor javanicus, lipase Rhizopus arrhizus, lipase Penicillium roqueforti, lipase Candida lipolytica, lipoprotein lipase Pseudomonas sp., type B, lipoprotein lipase Pseudomonas cepacia, lipoprotein lipase Chromobacterium viscosum, esterase Bacillus thermogluconidans, esterase Bacillus stearothermophilus, esterase Mucor miehei, esterase hog liver;

Enzymes supplied by Altus: Candida rugosa lipase, lipase Mucor miehei, Candida antarctica B lipase, Candida antarctica A lipase, Chiro-CLEC-CR, Chiro-CLEC-CR (slurry), porcine liver esterase, Penicillin acylase, Subtilisin Carlsberg, Chiro-CLEC-BL (slurry), Chiro-CLEC-PC (slurry), Chiro-CLEC-EC (slurry), Aspergillus oryzae protease, PeptiCLEC-TR (slurry);

Enzymes supplied by Recombinant Biocatalysis: ESL-001-07, ESL-001-01, ESL-001-01 with stabiliser, ESL-001-02, ESL-001-03, ESL-001-05;

Enzymes supplied by Boehringer-Mannheim: Chirazyme L4 (Pseudomonas sp.), Chirazyme L5 (Candida antarctica fraction A), Chirazyme L1 (Burkholderia), Chirazyme L6 (Porcine pancreas), Chirazyme L7, Chirazyme L8;

Enzymes supplied by Gist-Brocades: Naproxen esterase, Lipamax, Genzyme, Lipoprotein lipase;

Enzymes supplied by Novo: Novozyme 868, Novozyme 435, immobilised Candida antarctica lipase, Nagase enzyme, Lipase A-10FG (Rhizopus javanicus);

Enzymes supplied by Amano: Amano AYS, Amano PS, Amano PSD, Amano AKD11, Amano AKD111.

The preferred enzyme is Amano AK lipase enzyme supplied by Amano of Japan.

The enzyme may be used either in the free form or immobilized on a suitable support which may be diatomaceous earth.

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-11-

The enzyme is preferably used in an amount of from 1g/l to 60g/l of the reaction mixture, i.e the racemic mixture of the eight stereoisomers of the compound of the formula III, the suitable organic solvent and the esterifying agent.

The resolution step is preferably carried out at a temperature of from 20°C to 100°C inclusive and at atmospheric or higher pressure. When the enzyme is Amano AK, the preferred reaction temperature is about 50°C.

The resolution reaction is continued for a time sufficient to convert a desired percentage of the desired stereoisomer of the compound of the formula III to the compound of the formula IV. Generally, it is desirable that as much as possible of the desired stereoisomer is converted to the compound of the formula IV without the reaction proceeding to the esterification of the other stereoisomers present in the racemic mixture.

The reaction time is preferably about 24 hours or less when the reaction is performed in batch mode.

The next step, step (2)(a) of the process of the invention is to separate the first reaction product from the enzyme so that the enzyme can be recycled. This may be achieved for example by centrifugation or by filtration.

A major advantage of the process of the invention is that it is possible to recycle the enzyme a number of times to the resolution step, so as to improve the economics of the process.

The necessity for enzyme recycle may be eliminated by use of the enzyme in a continuous system wherein the enzyme is retained within a reactor. The racemic mixture of the compound of the formula III, the organic solvent and the esterifying agent as described above, are fed into the reactor, wherein the

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-12-

desired stereoisomer of the compound of the formula III is esterified to the compound of the formula IV to form the first reaction product. The first reaction product typically exits the reactor at a similar rate to the inlet feed, for further processing. The enzyme may typically be retained within the reactor through the use of membranes, or by immobilisation onto a support material, or through stabilisation by cross-linking.

The next step, step (2)(b) of the process of the invention is to remove the organic solvent, the excess esterifying agent and any by-products, to give a second reaction product including the compound of the formula IV and the unconverted stereoisomers of the compound of the formula III. This may be carried out by distillation in which the organic solvent, e.g the n-heptane and the excess esterifying agent, e.g the vinyl acetate, are taken off at the top of the column as a single stream and recycled back to suitable storage tanks for later re-use.

The next step, step (2)(c) of the process of the invention is to separate the compound of formula IV from the second reaction product leaving a third reaction product containing the unconverted stereoisomers of the compound of the formula III. This separation may be achieved by distillation.

In the compound of the formula IV, when R₁ is not an isopropyl group, the R₁ group can, through a reduction process, be converted to an isopropyl group, either at this stage, or subsequent to hydrolysis of the ester group as described below. This results in the production of the desired stereoisomer of menthol ester, or subsequent to hydrolysis, in the production of the desired stereoisomer of menthol.

The next step, step (3) of the process of the invention is to racemise the unconverted stereoisomers in the third reaction product to give a fourth reaction product containing a mixture of all eight stereoisomers of the

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-13-

compound of the formula III and recycling this to the resolution step of the process.

The racemisation may be achieved over a suitable catalyst with or without hydrogen gas, with or without a solvent, and at atmospheric or greater pressure.

The step may be carried out with or without a solvent. If a solvent is used, the solvent may be any solvent typically used for catalytic hydrogenation, most typically a hydrocarbon or aqueous caustic.

The catalyst used may be any catalyst typically used in homogeneous catalytic hydrogenations such as Pd(OAc)₂ and Ru(PPh₃)₃Cl₂, or in heterogeneous catalytic hydrogenations such as supported palladium, platinum, rhodium, ruthenium, nickel, sponge nickel and 2CuO·Cr₂O₃, or a solid oxide such as celite, CuO, CrO₃, CoO, SiO₂, Al₂O₃, Ba(OH)₂, MnO, Al(iOPr)₃, LnO₂, ZrO and the zeolites.

The reaction may be carried out at any temperature between 80°C and 300°C inclusive, preferably at a temperature between 180°C and 220°C inclusive.

The hydrogen pressure may be any pressure below 50 bar, preferably between 5 and 35 bar inclusive.

The catalyst loading may be between 0,01 and 20%, preferably between 0,05 and 5%.

At the end of the step, the catalyst is removed or deactivated, and any solvent present is removed.

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-14-

This racemisation step may be carried out in conjunction with step (b), i.e the hydrogenation step, where appropriate.

The next step, step (4) of the process of the invention is to hydrolyse the compound of the formula IV to the desired stereoisomer of the compound of the formula III. The reaction may be carried out in the presence of a base which may be a salt of a lower aliphatic alcohol such as sodium methoxide or sodium ethoxide, a metal hydroxide such as KOH, NaOH, or Mg(OH)₂, or amine bases such as NH₄OH.

The reaction may be carried out in any solvent typically used in hydrolysis reactions, such as for example a lower aliphatic alcohol or water. Combinations of the solvents may also be used.

The reaction temperature may be any temperature below the boiling point of the chosen solvent or the reflux temperature of the mixture at the pressure at which the reaction is carried out.

In the compound of the formula IV, where R₁ is an isopropyl group, hydrolysis of this compound ((-)-menthyl ester) results in the production of (-)-menthol.

As a final step, the desired isomer of the compound of the formula III may be purified to the desired purity by, for example, distillation or crystallisation.

Experimental Work

The results of various experiments carried out in relation to the process of the invention are set out below.

Example 1

m-Cresol (2,0 g) and o-phosphoric acid (4 mol e.g 8,5 g) were placed in a round bottom flask and heated to 85°C. Isopropanol (1,11 g) was added

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-15-

dropwise over 30 minutes. The reaction was then cooled to 25°C, and the organic phase extracted into toluene (20 ml). NMR analysis of the concentrated organic fraction indicated a 10% conversion of m-cresol to thymol.

Example 2

Thymol (4,20 g), cyclohexane (50 ml) and 5% Pt/C (0,40 g) were placed in a 300 ml Parr autoclave reaction chamber. Once sealed, the chamber was flushed with N₂ (g) before charging with H₂ (g) (20 bar). The reaction was heated to 180°C and the reaction was allowed to proceed for 2 hours. The reaction was then allowed to cool to room temperature, the pressure inside the reactor was released and the reaction mixture filtered to give a mixture of menthol stereoisomers (100% conversion thymol, 80% selectivity to menthol).

Example 3

In 2 ml vials, 10 or 100 mg of *Pseudomonas cepacia* lipase (Fluka), *Pseudomonas fluorescens* lipase (Fluka), penicillin acylase (Altus), subtilisin Carlsberg (Altus), *Aspergillus oryzae* protease and PeptiCLEC-TR slurry (Altus) were weighed. To this cyclohexane, hexane, pentane or heptane (962,72 µl) were added. Isomeric menthol (23 µl) and vinyl acetate (14,28 µl) were also added. These vials were incubated at 30°C or 37°C for 2 or 48 hours. Enzyme was then removed from the mixture by centrifugation. Samples were analysed by gas chromatography (GC). An individual peak found on each of the chromatograms was identified as that of (-)-menthyl acetate by comparison with the corresponding retention time of a standard sample of (-)-menthyl acetate.

Example 4

Lyophilised Amano AK (a *Pseudomonas fluorescens* lipase enzyme) was obtained from Amano Pharmaceutical Co. (Japan). Concentrated liquid

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-16-

menthol was produced by the hydrogenation of thymol. The menthol contained four diastereomeric pairs of menthols, namely (*S*)-menthol (51%), (*±*)-isomenthol (14%), (*S*)-neomenthol (29%) and (*S*)-neoisomenthol (2%). A volume of 1ml was added to sealed batch reactors. Vinyl acetate (54 µl) was added at a 2:1 molar ratio to (-)-menthol. Heptane was added as solvent to a final reaction volume of 5 ml. These reactors were incubated in silicon oil baths at 50°C and stirred on a stirring hot plate. Batch times, unless otherwise stated were 24 hours. The reaction mixture was then centrifuged to separate the products from the enzyme. The supernatant was analysed by GC (%m/m analysis). Of the available (-)-menthol, 100% was converted to (-)-mentyl acetate, at an ee of 98%. The enzyme was recycled a total of 150 times by washing with heptane and adding fresh substrate (liquid menthol, vinyl acetate and heptane) after every recycle. An amount of menthyl acetate equivalent to 185 g of (-)-menthol was produced by this process.

Example 5

Amano AK lipase enzyme was dissolved in phosphate buffer (5 mM, pH 7) before adding Celite 535 (in a ratio of 1:2). The mixture was frozen at -80°C for 5 minutes and then freeze-dried for 24 hours to produce immobilized enzyme. A substrate mixture containing 15.5% (v/v) of liquid menthol and 5.5% (v/v) vinyl acetate and 79% (v/v) of n-heptane was prepared. The mixture was pumped through 5 columns arranged in series packed with immobilised enzyme. The temperature of the reaction was maintained at 50°C. The end product was analysed for the formation of (-)-mentyl acetate by GC analysis. Of the available (-)-menthol, 100% was converted to (-)-mentyl acetate at an ee of 98%. In a 206 day period an amount of (-)-menthyl acetate equivalent to 101g of menthol per gram of immobilized enzyme was produced by this immobilized enzyme system.

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-17-

Example 6

A solution of methanol (50,1 g), water (50,21 g) and NaOH (6,03 g, 0,15 mol) was placed in a reactor and heated to 60°C. (-)-Methyl acetate (30,53 g, 15 mol) was then added to the reactor and the reaction was vigorously stirred for 30 minutes. Qualitative GC analysis indicated a 53 area % methyl acetate and a 47 area % menthol.

Example 7

(-)-Menthol (100 g) and Ni (1%) were placed in round bottom flask and heated at reflux for 2 hours. Once cooled to 25°C, the reaction mixture was sampled. Quantitative m/m analysis 17% thymol, 23% menthols and 54% menthones with a % (+)-menthol/(-)-menthol of 22%.

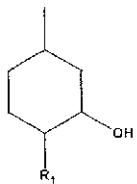
WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-18-

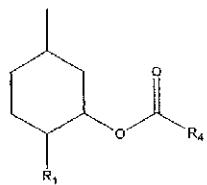
CLAIMS

- 1 A process of separating a single desired stereoisomer from a racemic mixture of eight stereoisomers of a compound of the formula III

**III**

wherein R₁ represents an isopropanol group, an isopropyl group or an isopropylene group, including the steps of:

- (1) contact the racemic mixture in a suitable organic solvent with an esterifying agent and a stereospecific enzyme which stereoselectively esterifies the -OH group of the desired stereoisomer, for a time sufficient to convert a desired percentage of the desired stereoisomer to a compound of the formula IV

**IV**

wherein R₁ is as defined above and R₄ is an alkyl or an aryl group.

-19-

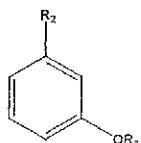
- to give a first reaction product including the compound of the formula IV, the organic solvent, the unconverted stereoisomers of the compound of the formula III, excess esterifying agent and by-products of the reaction; and
- (2) separating the compound of the formula IV from the first reaction product.
- 2 A process according to claim 1 wherein step (2) comprises the sub-steps of:
- (2)(a) separating the first reaction product from the enzyme;
- (2)(b) removing from the first reaction product the organic solvent, the excess esterifying agent, and the by-products of the reaction to give a second reaction product including the compound of the formula IV and the unconverted stereoisomers of the compound of formula III ; and
- (2)(c) separating the compound of the formula IV from the second reaction product leaving a third reaction product containing the unconverted stereoisomers of the compound of the formula III.
- 3 A process according to claim 1 or claim 2 including the step, after step (2) of:
- (3) racemizing the unconverted stereoisomers of the compound of the formula III in the third reaction product to give a fourth reaction product containing a mixture of all eight stereoisomers of the compound of the formula III and recycling the fourth reaction product to step (1).
- 4 A process according to claim 3 including the step, after step (3) of:
- (4) hydrolysing the compound of the formula IV to give the desired stereoisomer of the compound of the formula III.

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

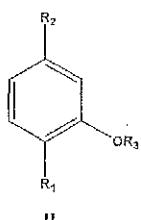
-20-

- 5 A process according to claim 4 wherein when R₁ is an isopropanol group or an isopropylene group, before or after step (4), the compound of the formula IV or the desired stereoisomer of the compound of the formula III is subjected to a reduction step to convert R₁ to an isopropyl group.
- 6 A process according to any one of claims 1 to 5 including the following steps, prior to step (1) of:
- (a) reacting a compound of the formula I



I

wherein R₂ represents a methyl or a hydroxymethyl group, and R₃ represents H, a base metal, a benzyl group or an allyl group,
with an alkylating agent in the presence of a catalyst to give a compound of the formula II



II

wherein R₁ is as defined in claim 1 and R₂ and R₃ are as defined above; and

-21-

- (b) hydrogenating the compound of the formula II in the presence of a catalyst to give a racemic mixture of the eight stereoisomers of the compound of the formula III.
- 7 A process according to any one of claims 1 to 6 wherein in step (1) the solvent is selected from the group consisting of isoctane; n-heptane; decane; methyl cyclohexane; t-butyl methyl ether; xylene; kerosene; pentane; cyclohexane; hexane; benzene; butanol; toluene; isopropanol; ethyl lactate; and acetone.
- 8 A process according to claim 7 wherein in step (1) the solvent is n-heptane.
- 9 A process according to any one of claims 1 to 8 wherein in step (1) the esterifying agent is selected from the group consisting of vinyl acetate, butyl acetate, octanoic acid, isopropenyl acetate, vinyl butyrate, ethyl lactate and ethyl acetate.
- 10 A process according to claim 9 wherein in step (1) the esterifying agent is vinyl acetate.
- 11 A process according to any one of claims 1 to 10 wherein in step (1) the esterifying agent is used in a molar ratio to the desired stereoisomer of the compound of the formula III of 0,5:1 to 30:1 inclusive.
- 12 A process according to any one of claims 1 to 11 wherein in step (1) the stereospecific enzyme is selected from the group consisting of *Candida cylindracea* lipase, lipase *Hog pancreas*, lipase *Pseudomonas fluorescens*, lipase *Aspergillus oryzae*, lipase *Rhizopus niveus*, lipase *Rhizomucor miehei*, lipase *Candida antarctica*, lipase *Mucor javanicus*, lipase *Rhizopus arrhizus*, lipase *Penicillium roqueforti*, lipase *Candida*

-22-

lipolytica, lipoprotein lipase *Pseudomonas* sp., type B, lipoprotein lipase *Pseudomonas cepacia*, lipoprotein lipase *Chromobacterium viscosum*, esterase *Bacillus thermoglucosidasius*, esterase *Bacillus stearothermophilus*, esterase *Mucor miehei*, esterase hog liver, *Candida rugosa* lipase, lipase *Mucor miehei*, *Candida antarctica* B lipase, *Candida antarctica* A lipase, Chiro-CLEC-CR, Chiro-CLEC-CR (slurry), porcine liver esterase, Penicillin acylase, Subtilisin Carlsberg, Chiro-CLEC-BL (slurry), Chiro-CLEC-PC (slurry), Chiro-CLEC-EC (slurry), Aspergillus oryzae protease, PeptiCLEC-TR (slurry), ESL-001-01, ESL-001-01 with stabiliser, ESL-001-02, ESL-001-03, ESL-001-05, Chirazyme L4 (*Pseudomonas* sp.), Chirazyme L5 (*Candida antarctica* fraction A), Chirazyme L1 (*Burkholderia*), Chirazyme L6 (Porcine pancreas), Chirazyme L7, Chirazyme L8, Naproxen esterase, Lipomax, Genzyme, Lipoprotein lipase, Novozyme 868, Novozyme 435, immobilised *Candida antarctica* lipase, Nagase enzyme, Lipase A-10FG (*Rhizopus javanicus*), Amano AYS, Amano PS, Amano PSD, Amano AKD11, and Amano AKD11.

- 13 A process according to any one of claims 1 to 12 wherein in step (1) the enzyme is Amano AK lipase enzyme.
- 14 A process according to any one of claims 1 to 13 wherein in step (1) the stereospecific enzyme is used in an amount of from 1g/l to 60g/l inclusive of the mixture of the racemic mixture of the eight stereoisomers of the compound of the formula III, the suitable organic solvent and the esterifying agent.
- 15 A process according to any one of claims 1 to 14 wherein step (1) is carried out at a temperature of from 20°C to 100°C inclusive and at atmospheric or higher pressure.

WO 02/04384

PCT/IB01/01008

-23-

- 18 A process according to any one of claims 2 to 15 wherein after step (2)(a) the stereospecific enzyme is recycled to step (1).
- 17 A process according to any one of claims 2 to 15 wherein in step (1) the stereospecific enzyme is used in a continuous system wherein the stereo specific enzyme is retained within a reactor and wherein in step (2)(a) the first reaction product exits the reactor leaving behind the enzyme.
- 18 A process according to any one of claims 4 to 17 wherein in step (4) the hydrolysis is carried out in the presence of a base, in a suitable solvent, and at a temperature below the boiling point of the solvent or the reflux temperature of the mixture of reactants at the pressure at which the reaction is carried out.
- 19 A process according to any one of claims 1 to 18 wherein in the compound the formula III, R₁ represents an isopropyl group.

WO 02/04384 A3

— entirely in electronic form (except for this front page) and available upon request from the International Bureau.

(88) Date of publication of the international search report:

20 June 2002

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No. PCT/IB 01/01008	
IPC 7 C07B57/00 C07C35/12 C12P41/00 C07C67/08 C07C29/09			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum document types searched (Administrative system followed by classification symbols) IPC 7 C07B C07C C12P			
Documentation searched other than mainпатент documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BEILSTEIN Data, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	E. CERNIA, ET AL.: "The role of the reaction medium in lipase-catalysed esterifications and transesterifications" CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS, vol. 93, no. 1-2, June 1998 (1998-06), pages 157-168, XP002195581 Elsevier Science Ireland, Limerick, IE ISSN: 0009-308X paragraph '02.2!; figure 8; table 4	1,2,7, 9-12,14, 15,19	
A	DE 538 376 C (O. HINSBERG) 14 November 1931 (1931-11-14) the whole document -----	6	
A	DE 568 671 C (RHEINISCHE KAMPFER FABRIK) 24 January 1933 (1933-01-24) the whole document -----	6	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of page 6. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex			
<small>* Special categories of cited documents</small> <small>*A* document defining the general state of the art which is not deemed to be of particular relevance</small> <small>*E* earlier document not published on or after the international filing date</small> <small>*L* document which may throw doubt on novelty claimed or which is cited to establish the publication date of another earlier special relevant document</small> <small>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other activity</small> <small>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</small> <small>*W* document member of the same patent family</small>			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
9 April 2002		18/04/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 8013, Postfach 2, 1020 Vienna, Austria Tel: (+43 1) 204 2650, Fax: (+43 1) 204 2610		Authorized officer English, R	

Form PCT/ISA/2000 (version 01.01.96)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/IB 01/0108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
DE 538376	C 14-11-1931	NONE	
DE 568671	C 24-01-1933	NONE	

Form PCT/ISA/21C (patent family members) (July 1999)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 C 39/06	C 0 7 C 39/06	
C 1 2 P 41/00	C 1 2 P 41/00	E
// C 0 7 B 53/00	C 0 7 B 53/00	F
C 0 7 B 61/00	C 0 7 B 61/00	3 0 0

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,S,D,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (72)発明者 ニール・スタッケンストロム・ガーディナー
南アフリカ共和国プレトリア、ティアポート、プロット129番
- (72)発明者 ロビン・クマー・ミトラ
南アフリカ共和国1501ベノニ、マリスター、ムラー・ロード61エイ番
- (72)発明者 クリストファー・ジョン・パーキンソン
南アフリカ共和国1645モダーフォンテイン、ソーンヒル、エルム・アベニュー15番
- (72)発明者 マドリー・ポートウィッグ
南アフリカ共和国1695グリーンサイド、グリーンサイド・ロード77番
- (72)発明者 ブタナ・アンドリュー・ムボニスワ
南アフリカ共和国1610エデンベール、マレ・ステイン・パーク、ギールホート・アベニュー19番
- (72)発明者 メラニー・ダリル・エバンズ - ディクソン
ザンビア、リビングストーン、ピー・オー・ボックス61160
- (72)発明者 ディーン・ブレイディ
南アフリカ共和国1685ミッドランド、ノードウィック、リーベンバーグ・ロード19番
- (72)発明者 ステファヌス・フランソワ・マレ
南アフリカ共和国0042ガーズフォンテイン、ジェシー・コリンズ・ストリート530番
- (72)発明者 シャヴァニ・レディ
南アフリカ共和国1610エデンベール、マレ・ステイン・パーク、ギールホート・ストリート31番

F ターム(参考) 4B064 AC12 CA21 CB25 CC04 CD30 DA20
 4H006 AA02 AC11 AC25 BA26 BA53 BA55 BA61 BA63 BB11 BB61
 BE20 FC22 FC52 FE12 FE13
 4H039 CA19 CA40 CB10 CG10

【要約の続き】

