

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491456 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.25

(22) Дата подачи заявки
2022.12.12

(51) Int. Cl. C07F 9/30 (2006.01)
C07F 9/6506 (2006.01)
A01N 43/28 (2006.01)
A01N 57/00 (2006.01)
A01N 57/20 (2006.01)
A01P 13/00 (2006.01)

(54) ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ДЕКАРБАМОИЛИРОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛЮФОСИНАТА

(31) 21213752.5

(32) 2021.12.10

(33) EP

(86) PCT/EP2022/085314

(87) WO 2023/105079 2023.06.15

(71) Заявитель:
БАСФ СЕ (DE)

(72) Изобретатель:

Циммерман Гунтер, Потт Мориц
Штефан, Бройер Михаэль, Дитрих
Клаус, Земайер Штефан (DE)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения глюфосината, который включает стадию ферментативного отщепления карбамоильного фрагмента соединения карбамоиламинокислоты.

202491456
A1

202491456

A1

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ДЕКАРБАМОИЛИРОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛЮФОСИНАТА

5

Данная заявка направлена на способ получения глюфосината, который включает стадию ферментативного отщепления карбамоильного фрагмента соединения N-карбамоиламинокислоты.

10 Гербицид глюфосинат является неселективным гербицидом, наносимым на листья, который считается одним из самых безопасных гербицидов с токсикологической и экологической точки зрения. Современные коммерческие способы химического синтеза глюфосината дают рацемическую смесь L- и D-глюфосината (Duke et al. 2010 Toxins 2:1943-1962).



15

Схема 1. Синтез гидантоина через соответствующий альдегид (где R представляет собой, например, H или алкил).

Известно, что гидантоины могут быть промежуточными продуктами при синтезе рацемического глюфосината. Их можно получить из соответствующих альдегидов (Схема 1) путем реакции Бюхерера-Бергса. Дополнительный путь синтеза описан, например, в CN 111662325.

20

CN 113045604 раскрывает способ синтеза глюфосината, исходя из гидантоина. Реакцию необходимо проводить при высоком давлении и при температуре от 130 до 180 °С. Следовательно, условия реакции довольно жесткие. Однако использование автоклава и/или температур выше 120 °С в промышленных масштабах также связано с риском для безопасности сотрудников. В CN 111662325 также описан гидролиз гидантоина с получением

25

глюфосината, однако для реакции необходимы сильные кислоты или основания, а также условия нагревания с обратным холодильником в воде.

Известно, что L-глюфосинат (также известный как фосфинотрицин или (S)-2-амино-4-(гидрокси(метил)фосфоноил)бутановая кислота) более эффективен, чем D-глюфосинат (Ruhland et al. (2002) Environ. Biosafety Res. 1:29–37).
5 Следовательно, дополнительный интерес представляют способы получения более активной формы L-глюфосината в избытке.

Учитывая вышеизложенное, задачей настоящего изобретения было обеспечение мягкого способа получения глюфосината.

10 Кроме того, задачей настоящего изобретения было обеспечение безопасного способа получения глюфосината.

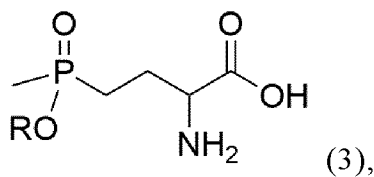
Кроме того, задачей настоящего изобретения было обеспечение мягкого способа получения L-глюфосината в энантиомерном избытке.

15 Кроме того, задачей настоящего изобретения было обеспечение композиции, содержащей L-глюфосинат.

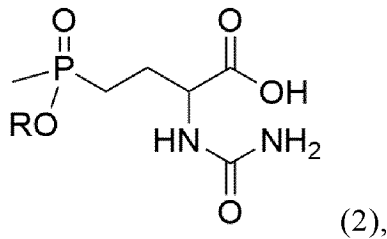
Кроме того, задачей настоящего изобретения было обеспечение способа селективной борьбы с сорняками с использованием композиции, полученной в соответствии со способом получения согласно настоящему изобретению.

Изобретателями настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что по меньшей мере одна из вышеперечисленных задач может быть решена с помощью описанного в данной заявке способа на основе N-карбамоиламинокислоты. Кроме того, изобретателями настоящего изобретения было обнаружено, что заявленный способ обеспечивает композицию, содержащую глюфосинат в достаточном количестве для использования в качестве гербицида.
20
25

Следовательно, в первом аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, который включает стадию ферментативного отщепления карбамоильного фрагмента N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2)

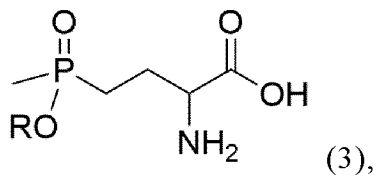


5 где R представляет собой H или C1-C8алкил.

Далее более подробно описаны предпочтительные варианты осуществления компонентов способа получения, композиции, и способа селективной борьбы с сорняками. Следует понимать, что каждый предпочтительный вариант осуществления актуален сам по себе, а также в сочетании с другими

10 предпочтительными вариантами осуществления.

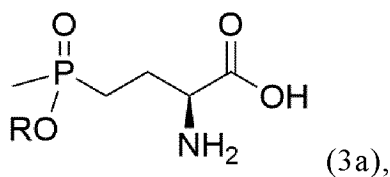
В предпочтительном варианте осуществления A1 первого аспекта, стадия отщепления обеспечивает глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3)



15 где R представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C1-C8алкил, более предпочтительно H или C2-C4алкил, даже более предпочтительно H, этил, или бутил, и в частности H.

В предпочтительном варианте осуществления A2 первого аспекта, стадия отщепления обеспечивает глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3), в форме рацемической смеси или в форме

20 энантиомерного избытка L-глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3a)



25 где R представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C1-C8алкил, более предпочтительно H или C2-C4алкил, даже более

предпочтительно Н, этил, или бутил, и в частности Н; предпочтительно в форме энантиомерного избытка L-глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3а).

5 В предпочтительном варианте осуществления А3 первого аспекта, по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, и в частности по меньшей мере 80%, N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2), превращают в L-глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3а), где формула (3а) имеет значения, указанные в варианте осуществления А2.

10 В предпочтительном варианте осуществления А4 первого аспекта, отщепление осуществляют с помощью фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, предпочтительно фермента гидролазы L-N-карбамоиламинокислоты.

15 В предпочтительном варианте осуществления А5 первого аспекта, отщепление осуществляют с помощью фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, выбранного из группы, состоящей из Uniprot ID: A0A1Y4GC62_9BACT (SEQ ID NO:2), Uniprot ID: A0A6P2ISL4_BURL3 (SEQ ID NO:3), и их смесей.

20 В предпочтительном варианте осуществления А6 первого аспекта, R в формулах (2) и (3) представляет собой Н или С1-Сбалкил, предпочтительно Н или С2-С4алкил, более предпочтительно Н, этил, или бутил, и в частности Н.

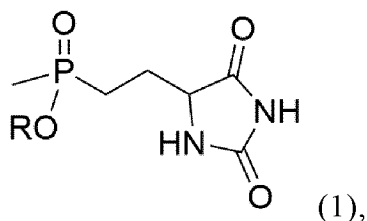
25 В предпочтительном варианте осуществления А7 первого аспекта, стадию отщепления осуществляют при значении рН 6 - 11, предпочтительно 6.5 - 10, более предпочтительно 7 - 9.5, и в частности 7.5 - 9 и/или при температуре 20 - 50 °С, предпочтительно 25 - 45 °С, более предпочтительно 30 - 42 °С, и в частности 32 - 40 °С.

30 В предпочтительном варианте осуществления А8 первого аспекта, R в формулах (2) и (3) представляет собой С1-С8алкил, предпочтительно С1-Сбалкил, более предпочтительно С2-С4алкил, даже более предпочтительно этил или бутил, и в частности этил, и способ дополнительно включает стадию

с) снятия защиты в кислотных условиях, предпочтительно с использованием соляной кислоты или серной кислоты.

В предпочтительном варианте осуществления А9 первого аспекта, способ дополнительно включает добавление фермента рацемазы N-карбамоиламинокислоты.

В предпочтительном варианте осуществления А10 первого аспекта, N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2), обеспечивают с помощью предшествующей стадии гидролиза, которая включает гидролиз гидантоина, который имеет формулу (1)



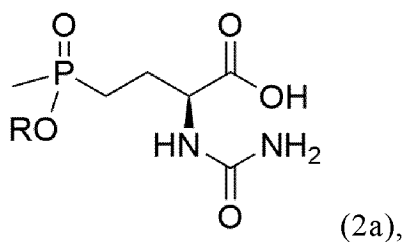
где R представляет собой H или C1-C8алкил, с образованием N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2), который предпочтительно осуществляют в ферментативных условиях.

В предпочтительном варианте осуществления А11 первого аспекта, N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2), обеспечивают с помощью предшествующей стадии гидролиза, где гидролиз гидантоина, который имеет формулу (1), осуществляют с помощью фермента гидантоиназы.

В предпочтительном варианте осуществления А12 первого аспекта, способ дополнительно включает добавление фермента гидантоин рацемазы.

В предпочтительном варианте осуществления А13 первого аспекта, стадию гидролиза и стадию отщепления осуществляют в одной емкости, предпочтительно где все реагенты в основном добавляют в начале реакции, или где реагенты для стадии гидролиза и реагенты для стадии отщепления добавляют в одну емкость в разное время.

Во втором аспекте, настоящее изобретение относится к композиции, которая содержит N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2a)

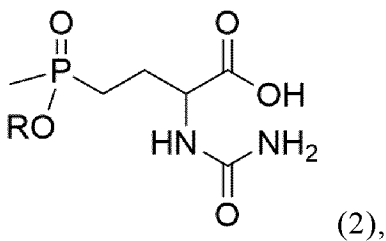


где R представляет собой H или C1-C8алкил, и L-глюфосинат или его соли.

В третьем аспекте, настоящее изобретение относится к способу селективной борьбы с сорняками на участке, предпочтительно содержащем урожай высеянных семян или сельскохозяйственных культур, устойчивых к глюфосинату, который включает:

- 5 нанесение на участок эффективного количества композиции, которая содержит L-глюфосинат или его соли в процентном энантиомерном отношении по меньшей мере 80% относительно D-глюфосината или его солей, и от более чем 0.01 масс.% до менее чем 10 масс.%, в пересчете на общее количество композиции, N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2)

10



где R представляет собой H или C1-C8алкил.

Подробное описание

- 15 Прежде чем подробно описать в качестве примеров варианты осуществления настоящего изобретения, даны определения, важные для понимания настоящего изобретения.

Используемые в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также включают соответствующие формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. В контексте настоящего изобретения термины «приблизительно» и «около» обозначают интервал точности, который будет понятен специалисту в данной области техники, чтобы обеспечить технический эффект рассматриваемого признака. Термин, как правило, указывает на отклонение от указанного числового значения $\pm 20\%$, предпочтительно $\pm 15\%$, более предпочтительно $\pm 10\%$, и даже более предпочтительно $\pm 5\%$. Следует понимать, что термин «содержащий» не является ограничивающим. Для целей настоящего изобретения термин «которая состоит из» считается предпочтительным вариантом осуществления термина «которая включает». Если в дальнейшем группа определяется как включающая по меньшей мере определенное количество вариантов осуществления, это

20

25

30

означает также, что она охватывает группу, которая предпочтительно состоит только из этих вариантов осуществления. Кроме того, термины «первый», «второй», «третий» или «(a)», «(b)», «(c)», «(d)» и т. д., в описании и в формуле изобретения используются для различения похожих элементов и не обязательно для описания последовательного или хронологического порядка. Следует 5 понимать, что используемые таким образом термины являются взаимозаменяемыми при соответствующих обстоятельствах, и что варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в других последовательностях, чем описанные или 10 проиллюстрированные в настоящем документе. В случае, если термины «первый», «второй», «третий» или «(a)», «(b)», «(c)», «(d)», «i», «ii» и т. д. относятся к стадиям способа, применения или анализа, то нет согласованности по времени или временным интервалам между стадиями, т. е. стадии могут выполняться одновременно или между такими стадиями могут быть временные 15 интервалы в секунды, минуты, часы, дни, недели, месяцы или даже годы, если не указано иначе в заявке выше или ниже. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами, реагентами и т. д., описанными в данном документе, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в 20 настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют те же значения, которые 25 обычно понятны специалисту в данной области техники.

Термин «масс.%», используемый в данном документе, означает «массовый процент».

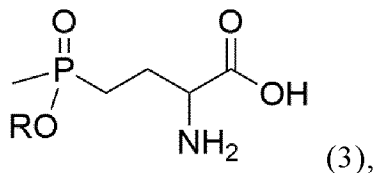
Термин «алкил», используемый в данном документе, означает в каждом случае алкильную группу с прямой или разветвленной цепью, имеющую обычно 30 от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно от 1 до 8 атомов углерода, часто от 1 до 6 атомов углерода, более предпочтительно от 1 до 4 атомов углерода, например 2 или 4 атома углерода. Примерами алкильных групп являются метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, 2-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, 1-

метилбутил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил и н-гексил.

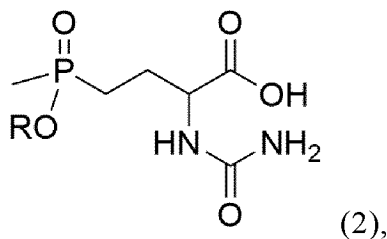
В зависимости от схемы замещения соединения в соответствии с изобретением могут иметь один или более стереоцентров. Если явно не указано
5 иначе (например, посредством химической формулы), то изобретение предпочтительно охватывает все стереоизомеры, т.е. чистые энантиомеры, чистые диастереомеры, соединений в соответствии с изобретением и их смеси, включая рацемические смеси.

Предпочтительные варианты осуществления относительно способа
10 получения глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3), композиции, которая содержат N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2а), и L-глюфосинат или его соли, и способа селективной борьбы с сорняками подробно описаны далее. Следует понимать, что предпочтительные варианты осуществления изобретения являются
15 предпочтительными отдельно или в сочетании друг с другом.

Как указано выше, настоящее изобретение относится в одном аспекте к способу получения глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3)

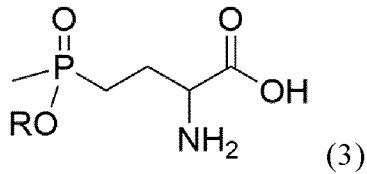


20 где R представляет собой H или C1-C8алкил, который включает стадию ферментативного отщепления карбамоильного фрагмента N-карбамоиламинокислоты, который имеет формулу (2)



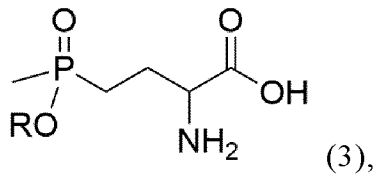
где R представляет собой H или C1-C8алкил.

Следует понимать, что глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3)



охватывает все стереоизомеры, подходящие соли соответствующего глюфосината или его сложного алкилового эфира. Кроме того, соответствующие цвиттер-ионы охватываются формулой (3). Примерами подходящих солей являются, например, соль соляной кислоты, соли аммония и соли изопропиламмония. В этом отношении соединение формулы (3), в частности, охватывает два стереоцентра, где один стереоцентр расположен на атоме фосфора, а один стереоцентр расположен на атоме альфа-углерода. Соединение формулы (3) в частности охватывает все стереоизомеры, полученные из стереоцентра на атоме фосфора.

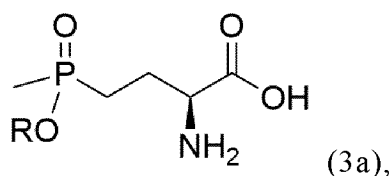
В предпочтительном варианте осуществления, стадия отщепления обеспечивает глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C1-C8алкил, более предпочтительно H или C2-C4алкил, даже более предпочтительно H, этил, или бутил, и в частности H.

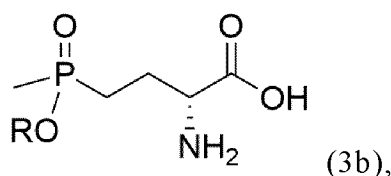
В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадия отщепления обеспечивает глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3) в форме рацемической смеси.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадия отщепления обеспечивает глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3) в форме энантиомерного избытка L-глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3a)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C1-C8алкил, более предпочтительно H или C2-C4алкил, даже более предпочтительно H, этил, или бутил, и в частности H.

5 В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадия отщепления обеспечивает глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3) в форме энантиомерного избытка D-глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3b)



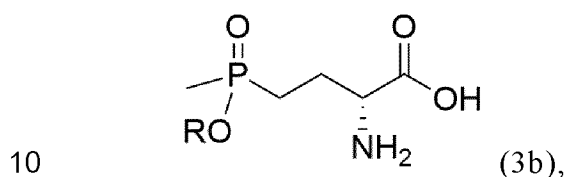
10 где R представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C1-C8алкил, более предпочтительно H или C2-C4алкил, даже более предпочтительно H, этил или бутил, и в частности H.

15 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, даже более предпочтительно по меньшей мере 90%, и в частности по меньшей мере 95%, N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2), превращают в L-глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет
20 формулу (3a), где R формулы (3a) представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C1-C8алкил, более предпочтительно H или C2-C4алкил, даже более предпочтительно H, этил, или бутил, и в частности H.

25 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, 50 - 99.9%, предпочтительно 60 - 99.8%, более предпочтительно 80 - 99.5, даже более предпочтительно 90 - 99.2%, и в частности 95 - 99%, N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2) превращают в L-глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3a), где R формулы (3a) представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C1-C8алкил,

более предпочтительно Н или С2-С4алкил, даже более предпочтительно Н, этил, или бутил, и в частности Н.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%,
 5 более предпочтительно по меньшей мере 80%, даже более предпочтительно по меньшей мере 90%, и в частности по меньшей мере 95%, N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2) превращают в L-глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3b)



где R представляет собой Н или С1-С8алкил, предпочтительно Н или С1-Сбалкил, более предпочтительно Н или С2-С4алкил, даже более предпочтительно Н, этил, или бутил, и в частности Н.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, 50 - 99.9%, предпочтительно 60 - 99.8%, более предпочтительно 80 - 99.5, даже более предпочтительно 90 - 99.2%, и в частности 95 - 99%, N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2) превращают в L-глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3b), где R формулы (3b) представляет собой Н или С1-С8алкил,
 20 предпочтительно Н или С1-Сбалкил, более предпочтительно Н или С2-С4алкил, даже более предпочтительно Н, этил, или бутил, и в частности Н.

Энантиомерный избыток L-глюфосината является предпочтительным.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, отщепление осуществляют с помощью фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, предпочтительно фермента гидролазы L-N-карбамоиламинокислоты. Альтернативно, отщепление может быть осуществлено с помощью фермента гидролазы D-N-карбамоиламинокислоты. Подходящие ферменты гидролазы N-карбамоиламинокислоты выбирают из группы, состоящей из следующих: ЕС 3.5.1 Гидролазы, действующие на линейные
 25 амиды, ЕС 3.5.1.87 N-карбамоил-L-аминокислоты гидролаза, 3.5.1.77 N-карбамоил-D-аминокислоты гидролаза, и их смеси. Подходящие ферменты
 30

гидролазы N-карбамоиламинокислоты, которые можно использовать в способе, включают те, которые из *Cloacibacillus sp. An23*, *Burkholderia lata*, и т.п.

Подходящие ферменты гидролазы N-карбамоиламинокислоты, которые можно использовать в способе, включают выбранные из группы, состоящей из

5 следующих: A0A7Y0T4N7_9RHIZ и его варианты, Q88FQ3_PSEPK и его варианты, Q88Q81_PSEPK и его варианты, A0A126S6J4_PSEPU и его варианты, Q8VUL6_9PSED и его варианты, H9B8T5_9PSED и его варианты, Q9FB05_9PSED и его варианты, C0ZCM8_BREBN и его варианты, C0Z7R5_BREB и его варианты, A0A0K9YX84_9BACL и его варианты,

10 E3HUL6_ACHXA и его варианты, A0A1V9BSS3_9BACI и его варианты, A0A1V9BSS3_9BACI и его варианты, Q9F464 и его варианты, A0A4D7Q548_GEOKU и его варианты, Q9F464 и его варианты, A0A2S9D976_9MICC и его варианты, A0A1I6VZZ4_9RHIZ и его варианты, A0A1L6RE91_9LACT и его варианты, A0A3E0C996_9BURK и его варианты,

15 A0A3M7BGJ4_HORWE и его варианты, A0A2D7YQN7_9GAMM и его варианты, A0A535Y1H2_9CHLR и его варианты, A0A223E4I5_9BACI и его варианты, M2VSE9_GALSU и его варианты, A0A3T0K6C0_9GAMM и его варианты, A0A416FGE1_9CLOT и его варианты, и его варианты, D1P143_9GAMM и его варианты, A0A6P2ISL4_BURL3 (SEQ ID NO:3) и его варианты,

20 A0A3S6Z2M9_9FIRM и его варианты, A0A0C1US49_9BACT и его варианты, A0A1Y4GC62_9BACT (SEQ ID NO:2) и его варианты, A0A3D3VMN7_9BACT и его варианты, A0A2K8L549_9PROT и его варианты, A0A1G0MC89_9BACT и его варианты, A0A1M6WYS1_SELRU и его варианты, A0A2K2BYI3_POPTR и его варианты, A0A510DYR5_9CREN и его варианты, A0A5Y3XFN7_SALER и его варианты,

25 варианты, A0A381IB54_CLODI и его варианты, A0A2V3IQW6_9FLOR и его варианты, *WP_035255878.1 и его варианты, *WP_012685058.1 и его варианты, *WP_056530217.1 и его варианты, *WP_075270569.1 и его варианты, и их смеси, где варианты определены как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95%,

30 идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, отщепление осуществляют с помощью фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, выбранного из группы, состоящей из следующих

Uniprot ID: A0A1Y4GC62_9BACT (SEQ ID NO:2) и его варианты, Uniprot ID: A0A6P2ISL4_BURL3 (SEQ ID NO:3) и его вариант, Uniprot ID:

A0A535Y1H2_9CHLR и его варианты, Uniprot ID: A0A3E0C996_9BURK и его варианты, и их смеси, где варианты определены как полипептидные

5 последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95%, идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности.

10 Следует понимать, что вышеизложенные ферменты гидролазы N-карбамоиламинокислоты указаны в номенклатуре идентификатора базы данных в соответствии с базой данных Uniprot (www.UniProt.org).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, R в формулах (2) и (3) представляет собой H или C1-Сбалкил, предпочтительно H или C2-С4алкил, более предпочтительно H, этил, или бутил, и в частности H.

15 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадию отщепления осуществляют при значении pH 6 - 11, предпочтительно 6.5 - 10, более предпочтительно 7 - 9.5, и в частности 7.5 - 9.

20 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадию отщепления осуществляют при температуре от 20 до 50 °C, предпочтительно от 25 до 45 °C, более предпочтительно от 30 до 42 °C, и в частности от 32 до 40 °C.

Кроме того, давление реакции представляет собой предпочтительно давление окружающей среды. Предпочтительно, давление реакции на стадии отщепления находится в диапазоне от 0.995 до 1.030 мбар, более предпочтительно от 1.005 до 1.020 мбар, и в частности приблизительно 1.013 мбар.

25 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадию отщепления осуществляют во время перемешивания, предпочтительно при 50 - 1000 об/мин, более предпочтительно при 100 - 800 об/мин, даже более предпочтительно при 150 - 600 об/мин, еще более предпочтительно при 180 - 400 об/мин, и в частности при 200 - 300 об/мин.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, R в формулах (2) и (3) представляет собой C1-С8алкил, предпочтительно C1-Сбалкил, более предпочтительно C2-С4алкил, даже более предпочтительно этил или бутил, и в частности этил, и способ дополнительно содержит стадию

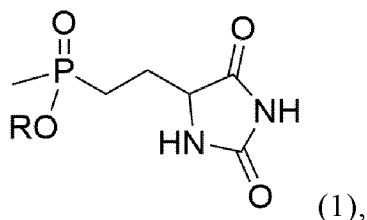
с) снятия защиты в кислотных условиях, предпочтительно с использованием соляной кислоты или серной кислоты.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно включает добавление фермента рацемазы N-карбамоиламинокислоты. Возможен любой подходящий фермент рацемаза N-карбамоиламинокислоты.

N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2), можно получить с помощью любого подходящего способа получения.

В предпочтительном варианте осуществления, N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2), обеспечивают с помощью химического синтеза. Подходящий химический подход может начинаться с глюфосината (или его алкильного производного) и добавления цианата, такого как цианат калия. Такая реакция предпочтительно предполагает повышенную температуру в диапазоне от 35 до 80 °С, предпочтительно от 40 до 60 °С и/или пониженное давление, предпочтительно в диапазоне от 50 до 400 мбар, предпочтительно от 100 до 300 мбар.

В предпочтительном варианте осуществления, N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2), обеспечивают с помощью предшествующей стадии гидролиза, которая включает гидролиз гидантоина, который имеет формулу (1)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, с образованием N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2). Гидролиз гидантоина, который имеет формулу (1), может быть осуществлен химически или ферментативно. В предпочтительном варианте осуществления, гидролиз гидантоина, который имеет формулу (1), осуществляют в ферментативных условиях.

В предпочтительном варианте осуществления, N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2), обеспечивают с помощью предшествующей стадии гидролиза, где гидролиз гидантоина, который имеет формулу (1), осуществляют с помощью фермента гидантоиназы.

Гидантоин, который имеет формулу (1), может быть получен любым подходящим способом получения. DE 3142036 в качестве примера раскрывает несколько способов синтеза.

5 Гидантоин, который имеет формулу (1), может быть, например, химически синтезирован, исходя из алкил-3-циано-3-гидроксипропил(метил)фосфината, такого как бутил-3-циано-3-гидроксипропил(метил)фосфинат, который может
10 быть обработан концентрированной серной кислотой в метаноле с последующим нагреванием смеси до температуры выше приблизительно 25°C, например приблизительно 40°C. Полученная реакционная смесь может быть охлаждена приблизительно до 25°C и затем обработана метоксидом натрия в метаноле и сульфатом натрия. Сырой алкил-3-циано-3-гидроксипропил(метил)фосфинат может быть добавлен, например, к раствору карбоната диаммония в воде, и реакционная смесь может быть нагрета до температуры приблизительно 70°C. После стандартной обработки можно получить желаемый алкилгидантоин
15 (например, бутилгидантоин). В этом отношении алкил может, например, представлять собой метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил или октил, предпочтительно этил или бутил.

Гидантоин, который имеет формулу (1), может быть, например, дополнительно химически синтезирован, исходя из раствора глюфосината
20 аммония в воде и цианата калия. После нагревания реакционной смеси приблизительно до 50°C, реакционная смесь может быть охлаждена до приблизительно 25°C с последующим добавлением концентрированного хлористого водорода в воде. После стандартной обработки можно получить желаемый гидантоин. Кроме того, можно алкилировать полученный гидантоин,
25 используя, например, триэтилортоацетат, с получением соответствующего алкилгидантоина (например, этилгидантоина).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадию гидролиза осуществляют при значении pH 6 - 11, предпочтительно 6.5 -
30 10, более предпочтительно 7 - 9.5 и в частности 7.5 - 9. Значение pH предпочтительно устанавливают с использованием гидроксида щелочного металла, более предпочтительно гидроксида натрия или гидроксида калия и, в частности, гидроксида калия.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадию гидролиза осуществляют при температуре 20 - 50 °С, предпочтительно 25 - 45 °С, более предпочтительно 30 - 42 °С, и в частности 32 - 40 °С.

5 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадию гидролиза осуществляют в водных условиях, предпочтительно в дегазированном водно-фосфатном буфере, более предпочтительно в дегазированном водном калий-фосфатном буфере.

10 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадию гидролиза осуществляют во время перемешивания, предпочтительно при 50 - 1000 об/мин, более предпочтительно при 100 - 800 об/мин, даже более предпочтительно при 150 - 600 об/мин, еще более предпочтительно при 180 - 400 об/мин, и в частности при 200 - 300 об/мин.

15 В другом предпочтительном варианте осуществления, N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2), обеспечивают с помощью предшествующей стадии гидролиза, где гидролиз гидантоина, который имеет формулу (1), осуществляют химически.

20 Следует понимать, что термин «химическая» относится к реакции, которую осуществляют в химических условиях, то есть не в ферментативных условиях. Следовательно, химическую стадию гидролиза осуществляют в химических условиях, то есть не в ферментативных условиях. В целом, возможен любой подходящий химический подход.

25 Подходящую химическую стадию гидролиза можно осуществлять в щелочных условиях, предпочтительно используя гидроксид натрия, гидроксид калия или т.п.

Можно использовать любые подходящие ферменты гидантоиназы.

Такие ферменты гидантоиназы, которые можно использовать в способе, включают те, которые из: *Defluviimonas alba*, *Rhodococcus erythropolis*, *Streptomyces coelicolor*, *Brevibacillus agri*, *Paenarthrobacter aureus*, *Arthrobacter crystallopoietes*, *Bacillus sp. TS-23*, *Bacillus fordii*, *Jannaschia sp.*, *Pseudomonas putida*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermus sp.*, *Dictyostelium discoideum*, *Rhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens*, *Glycine max*, *Robinia pseudoacacia*, *Bacillus licheniformis*, *Aedes aegypti*, *Agrobacterium fabrum*, *Arthrobacter sp.*, и т.п.,
30 предпочтительно *Defluviimonas alba*.

Подходящие ферменты гидантоиназы представляют собой ЕС 3.5.2 Гидролазу, действующая на циклические амиды.

Также, подходящие ферменты гидантоиназы могут быть выбраны из группы, состоящей из следующих: Q8RSQ2 и его варианты, O69809 и его варианты, Q846U5_9BACL и его варианты, P81006 и его варианты, Q84FR6_9MICC и его варианты, Q56S49_9BACI и его варианты, A1E351_9BAC и его варианты, Q28SA7 и его варианты, Q59699 и его варианты, Q45515 и его варианты, A0A399DRQ3_9DEIN и его варианты, Q55DL0 и его варианты, F7X5M8_SINMM и его варианты, Q9I676 и его варианты, Q44184 и его варианты, B5L363 и его варианты, I1MEH3 и его варианты, Q6S4R9 и его варианты, Q65LN0 и его варианты, Q171F8 и его варианты, Q8U8Z6 и его варианты, P42084 и его варианты, Q88NW7 и его варианты, P25995 и его варианты, Q3Z354 и его варианты, B1XEG2 и его варианты, Q9F465_PAEAU и его варианты, Q01262.1 и его варианты, A0A250DXG4_GEOSE и его варианты, A1SPN2 и его варианты, Q9WYH0 и его варианты, P58329 и его варианты, A1SGT4 и его варианты, E3JD18 и его варианты, HUTI_BDEBA и его варианты, A0A161KD37_9CHLR и его варианты, I0GL27_CALEA и его варианты, A0A068WGW0_ECHGR и его варианты, A0A1J4XHR4_9BACT и его варианты, A0A1C4QIY5_9ACTN и его варианты, A0A0K2UMP4_LEPSM и его варианты, A0A0F5Q0A2_9RHIZ и его варианты, A0A024KHS5_9RHIZ и его варианты, A0A060UM69_9PROT и его варианты, A3DKS9_STAMF и его варианты, W2EWT0_9ACTN и его варианты, A0A0B1T9I4_OESDE и его варианты, A0A0A7LM60_9BACT и его варианты, A0A087M7T5_9RHIZ и его варианты, C0C180_9FIRM и его варианты, A0A159Z531_9RHOV (см. также SEQ ID NO:1) и его варианты, R5JTP2_9CLOT и его варианты, A0A010RM85_9PEZI и его варианты, E1R8C9_SEDSS и его варианты, A0A010YEH8_9BACT и его варианты, A0A031LV69_9CREN и его варианты, A0A1F9QT17_9BACT и его варианты, ALLB_BACVZ и его варианты, HUTI_FLAPJ и его варианты, A0A073J5J1_9BACT и его варианты, A0A034W2Q8_BACDO и его варианты, A0A0D8IVV8_9FIRM и его варианты, A0A0B5QKE4_CLOBE и его варианты, A0A098B7X6_DESHA и его варианты, A0A0B5H4M8_9EURY и его варианты, A0A0C1YDP1_9ACTN и его варианты, Q981H2_RHILO и его варианты, T1EEN7_HELRO и его варианты, A0A060DTG8_AZOBR и его варианты, A0A011MGZ5_MANHA и его варианты, A0A060LYB6_9BACI и его варианты,

S0F3L7_CHOCR и его варианты, A0A133VNR0_9EURY и его варианты,
 A0A133U7U9_9EURY и его варианты, A0A0U2XD52_ECOLX и его варианты,
 M1YZY6_NITG3 и его варианты, T0N9X6_9EURY и его варианты,
 T0LMU2_9EURY и его варианты, A0A0N1GBZ8_9ACTN и его варианты,
 5 HUTI_ANASK и его варианты, A0A031JUP0_9SPHN и его варианты,
 A0A061N9L2_9BACL и его варианты, A0A017T4D2_9DELT и его варианты,
 A0A174ADZ3_9FIRM и его варианты, A0A021X7D5_9RHIZ и его варианты,
 A0A021XAC5_9RHIZ и его варианты, A0A0C2UIW0_9BACL и его варианты,
 A0A1F8NGY1_9CHLR и его варианты, D3F1S3_CONWI и его варианты,
 10 A0A021XG06_9RHIZ и его варианты, U7V9Q6_9FUSO и его варианты,
 D6XY37_BACIE и его варианты, A0A0J1FAI4_9FIRM и его варианты,
 B5Y9A6_COPPD и его варианты, PHYDA_ECOK1 и его варианты,
 A0A0A9X9B7_LYGHE и его варианты, A0A0S8H576_9BACT и его варианты,
 A0A151ABI4_9EURY и его варианты, A0A064AFD7_9FUSO и его варианты,
 15 A0A0C2FCG7_9ACTN и его варианты, A0A0S8CI48_9CHLR и его варианты,
 A0A1F9CZ74_9DELT и его варианты, A0A0A3YKD1_9ENTR и его варианты,
 A0A084R4T2_STACH и его варианты, A0A070A1Z0_9PROT и его варианты,
 A0A1J4J4Y8_9EUKA и его варианты, R1BR72_EMIHU и его варианты,
 R1DD72_EMIHU и его варианты, A0A1L0FIA0_9ASCO и его варианты,
 20 F7DRE9_ORNAN и его варианты, A0LK75_SYNFM и его варианты,
 A0A0Q1A918_9BACT и его варианты, H2YZ10_CIOSA и его варианты,
 I4YD99_WALMC и его варианты, A0A077YYH5_TRITR и его варианты,
 A0A077Y189_9SPHI и его варианты, A0A089K5P4_9BACL и его варианты,
 A0A0Q7W2T1_9RHIZ и его варианты, A0A174NIK6_9FIRM и его варианты,
 25 A0A0D5NFS5_9BACL и его варианты, A0A0D5NNJ7_9BACL и его варианты,
 A0A1H2AV66_9BACL и его варианты, A0A0Q4RXY0_9BACL и его варианты,
 A0A0Q7SB75_9BACL и его варианты, A0A015NM92_9BACL и его варианты,
 A0A100VRN2_PAEAM и его варианты, W4BDJ0_9BACL и его варианты,
 A0A147K2G0_9EURY и его варианты, A0A0W8FVM4_9ZZZZ и его варианты,
 30 A0A147JXR0_9EURY и его варианты, E8R8J7_DESM0 и его варианты,
 D5U113_THEAM и его варианты, A0A1F8T9J2_9CHLR и его варианты,
 G3C952_9ARCH и его варианты, Q6YNI0_9MICC и его варианты,
 A0A1G0YIQ9_9BACT и его варианты, A0A1J5EHQ6_9DELT и его варианты,
 A0A1J5E082_9DELT и его варианты, A0A1C4PKD1_9ACTN и его варианты,

H8GX25_DEIGI и его варианты, A0A1H5ZFN3_9BACT и его варианты,
 A0A0M9Z5S1_9ACTN и его варианты, A0A1B2HNC5_9PSEU и его варианты,
 A0A1B2GNI8_STRNR и его варианты, A0A1F8LBZ3_9CHLR и его варианты,
 A0A1F8NMM2_9CHLR и его варианты, A0A1F8SDV1_9CHLR и его варианты,
 5 A0A1H1PLX0_9BACT и его варианты, I0IDC5_PHYMF и его варианты,
 A0A0Q5I8X4_9DEIO и его варианты, A0A0F4JEN6_9ACTN и его варианты,
 BAD75708.1, *WP_014453859.1 и его варианты, *WP_046170519.1 и его
 варианты, *CDP53201.1 и его варианты, *WP_035078314.1 и его варианты,
 *WP_042803791.1 и его варианты, *EQB70510.1 и его варианты, *EQB65904.1 и
 10 его варианты, *WP_023512514.1 и его варианты, *WP_023514195.1 и его
 варианты, *WP_023516147.1 и его варианты, *KGT87257.1 и его варианты,
 *WP_045756097.1 и его варианты, *WP_056239694.1 и его варианты,
 *KUO41395.1 и его варианты, *KOV34818.1 и его варианты, *ANZ15483.1 и его
 варианты, *KJY32595.1 и его варианты, и их смеси, где варианты определены
 15 как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %,

предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95%, идентичностью

последовательности к соответствующей полипептидной последовательности.

Также предпочтительно, фермент гидантоиназа выбран из группы,

состоящей из следующих: O69809 и его варианты, Q846U5_9BACL и его
 20 варианты, P81006 и его варианты, Q84FR6_9MICC и его варианты,
 Q56S49_9BACI и его варианты, A1E351_9BACI и его варианты, Q28SA7 и его
 варианты, Q45515 и его варианты, A0A399DRQ3_9DEIN и его варианты,
 Q55DL0 и его варианты, F7X5M8_SINMM и его варианты, Q9I676 и его
 варианты, Q44184 и его варианты, B5L363 и его варианты, P42084 и его
 25 варианты, P25995 и его варианты, Q3Z354 и его варианты, B1XEG2 и его
 варианты, Q9F465_PAEAU и его варианты, A0A161KD37_9CHLR и его
 варианты, A0A1J4XHR4_9BACT и его варианты, A0A1C4QIY5_9ACTN и его
 варианты, A0A0K2UMP4_LEPSM и его варианты, A0A159Z531_9RHOB и его
 варианты, E1R8C9_SEDSS и его варианты, A0A1F9QT17_9BACT и его
 30 варианты, A0A0D8IVV8_9FIRM и его варианты, A0A0B5QKE4_CLOBE и его
 варианты, A0A0N1GBZ8_9ACTN и его варианты, A0A174ADZ3_9FIRM и его
 варианты, U7V9Q6_9FUSO и его варианты, A0A0J1FAI4_9FIRM и его варианты,
 PHYDA_ECOK1 и его варианты, A0A0S8H576_9BACT и его варианты,
 A0A1J4J4Y8_9EUKA и его варианты, A0A0D5NFS5_9BACL и его варианты,

A0A0D5NNJ7_9BACL и его варианты, A0A1H2AV66_9BACL и его варианты, A0A0Q4RXY0_9BACL и его варианты, A0A0Q7SB75_9BACL и его варианты, A0A100VRN2_PAEAM и его варианты, W4BDJ0_9BACL и его варианты, A0A1J5E082_9DELT и его варианты, A0A1H5ZFN3_9BACT и его варианты, A0A1F8NMM2_9CHLR и его варианты, A0A1F8SDV1_9CHLR и его варианты, A0A1H1PLX0_9BACT и его варианты, A0A0Q5I8X4_9DEIO и его варианты, *WP_046170519.1 и его варианты, *WP_023514195.1 и его варианты, *WP_023516147.1 и его варианты, и *ANZ15483.1, и их смеси, где варианты определены как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95%, идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности.

Также, подходящие ферменты гидантоиназы могут быть выбраны из группы, состоящей из следующих: Q846U5_9BACL и его варианты, P81006 и его варианты, Q84FR6_9MICC и его варианты, Q56S49_9BACI и его варианты, Q45515 и его варианты, A0A399DRQ3_9DEIN и его варианты, Q55DL0 и его варианты, F7X5M8_SINMM и его варианты, Q9I676 и его варианты, Q44184 и его варианты, B1XEG2 и его варианты, A0A161KD37_9CHLR и его варианты, A0A159Z531_9RHOB и его варианты, E1R8C9_SEDSS и его варианты, A0A1F9QT17_9BACT и его варианты, A0A0B5QKE4_CLOBE и его варианты, A0A0N1GBZ8_9ACTN и его варианты, BAD75708.1 и его варианты, A0A064AFD7_9FUSO и его варианты, и их смеси, где варианты определены как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95%, идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности.

В предпочтительном варианте осуществления, фермент гидантоиназа выбран из группы, состоящей из следующих: Q846U5_9BACL и его варианты, P81006 и его варианты, Q84FR6_9MICC и его варианты, A0A399DRQ3_9DEIN и его варианты, B1XEG2 и его варианты, A0A161KD37_9CHLR и его варианты, A0A159Z531_9RHOB и его варианты, E1R8C9_SEDSS и его варианты, A0A1F9QT17_9BACT и его варианты, A0A0B5QKE4_CLOBE и его варианты, A0A0N1GBZ8_9ACTN и его варианты, BAD75708.1 и его варианты, A0A064AFD7_9FUSO, и их смеси, где варианты определены как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее

предпочтительно 95%, идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности.

Наиболее предпочтительно, фермент гидантоиназа выбран из группы, состоящей из следующих: Q45515, Q44184 и его варианты,
 5 A0A1C4QIY5_9ACTN и его варианты, A0A0K2UMP4_LEPSM и его варианты,
 *WP_046170519.1 и его варианты, и E1R8C9_SEDSS и его варианты,
 A0A159Z531_9RHOV и его варианты, и их смеси, где варианты определены как
 полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно
 90%, и наиболее предпочтительно 95%, идентичностью последовательности к
 10 соответствующей полипептидной последовательности.

Следует понимать, что вышеизложенные ферменты гидантоиназы указаны в номенклатуре идентификатора базы данных в соответствии с базой данных UniProt (www.UniProt.org) или базой данных белков NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein), где последовательности из NCBI обозначаются
 15 значком “*” в начале соответствующего идентификатора базы данных.

В предпочтительном варианте осуществления, фермент гидантоиназа имеет SEQ ID NO:1.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, фермент гидантоиназа представляет собой фермент L-гидантоиназу.

20 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, фермент гидантоиназа представляет собой фермент D-гидантоиназу.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, R в формулах (1) и (2) представляет собой H или C1-Сбалкил, предпочтительно H или C2-С4алкил, более предпочтительно этил или бутил, и в частности этил.

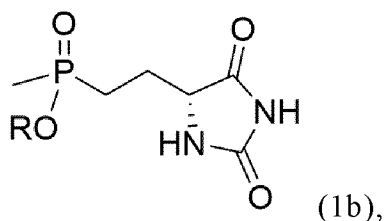
25 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно содержит добавление фермент гидантоин рацемазу. Возможен любой подходящий фермент гидантоин рацемазы. Подходящие ферменты гидантоин рацемазы выбраны из группы, состоящей из следующих: EC 5.1 Рацемаза, EC 5.1.1 Рацемазы, действующие на аминокислоты и их производные, EC 5.1.99.5 Гидантоин рацемаза, и их смеси. Подходящие
 30 ферменты гидантоин рацемазы, которые можно использовать в способе, включают выбранные из группы, состоящей из следующих: Q9RYA6_DEIRA и его варианты, Q9F466 и его варианты, Q9F466 и его варианты, A0A7L5BQP9_9RHIZ и его варианты, Q00924 и его варианты, F7X6X4_SINMM и

его варианты, A0A6V7ACK5_RHIRD и его варианты, A0A7Y0XLH3_9RHIZ и его варианты, A0A5B8XR30_9DELT и его варианты, A0A533QH78_9PROT и его варианты, A0A3M9Z0A0_9CYAN и его варианты, A0A3A0A4T5_9CHLR и его варианты, A0A1F6C9P8_HANXR и его варианты, A0A4S0NM85_9RHIZ и его варианты, A0A1V5I086_9SPIR и его варианты, A0A6P0NEY4_9CYAN и его варианты, A0A2K0YBY8_9SPHN и его варианты, A0A1H5NHN7_9RHIZ и его варианты, A0A317KUZ3_9ACTN и его варианты, A0A430VJ34_THESC и его варианты, A0A1J5KHA5_9PROT и его варианты, A0A535LIJ4_9CHLR и его варианты, A0A2T6KHH4_9RHOV и его варианты, A0A3G8JSD5_9ACTN и его варианты, A0A3A9JRT3_9THEO и его варианты, A0A2N7WBP6_9BURK и его варианты, A0A1A2N8C4_9MYCO и его варианты, A0A1R3TB43_9RHIZ и его варианты, X1T733_9ZZZZ и его варианты, A0A6P1SX79_9RHOV и его варианты, A0A0Q5VT22_9RHIZ и его варианты, A0A2N1RKS5_9SPIR и его варианты, A0A529XJR5_9RHIZ и его варианты, A0A358TXS4_9FIRM и его варианты, A0A1Q9UJX6_9ACTN и его варианты, A0A434WJY9_9RHIZ и его варианты, A0A4R7C3Y1_9RHIZ и его варианты, A0A2T4IRF7_9RHIZ и его варианты, A0A2E8B427_9PLAN и его варианты, A0A538D678_9ACTN и его варианты, A0A1W6Z0D5_9BORD и его варианты, A0A3P1UKI1_9RHIZ и его варианты, U2S1Q0_9FIRM и его варианты, A0A3D5IHC5_AGRSP и его варианты, A0A3D5JEU3_9DELT, и его варианты, где варианты определены как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95%, идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности, и их смеси. Следует понимать, что вышеуказанные ферменты гидантоин рацемазы указаны в номенклатуре идентификатора базы данных в соответствии с базой данных Uniprot (www.UniProt.org). Наиболее предпочтительно, фермент рацемаза выбран из группы, состоящей из следующих: A0A6V7ACK5_RHIRD и его варианты, A0A2T6KHH4_9RHOV и его варианты, где варианты определены как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95%, идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности.

В особом варианте осуществления настоящего изобретения, способ включает добавление фермента гидантоин рацемазы и фермента рацемазы N-карбамоиламинокислоты.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стадию гидролиза и стадию отщепления осуществляют в одной емкости. В этом отношении, предпочтительно, когда стадию гидролиза осуществляют в ферментативных условиях. Предпочтительно, все реагенты в основном добавляют в начале реакции. Альтернативно, реагенты для стадии гидролиза и реагенты для стадии отщепления добавляют в одну емкость в разное время.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно включает стадию отделения гидантоина, который имеет формулу (1b)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, который получают на стадии гидролиза. Отделение гидантоина, который имеет формулу (1b), предпочтительно достигается с использованием обращенно-фазовой хроматографии. Альтернативно, отделение может быть достигнуто с помощью ионного обмена, экстракции, солеобразования, кристаллизации и фильтрации.

Гидантоин, который имеет формулу (1b), может быть химически рацемизирован и повторно использован на стадии гидролиза. Для рацемизации гидантоинов, которые имеют формулу (1b), их можно обработать подходящим основанием, предпочтительно при значении pH 8 или больше, более предпочтительно 8 - 14, даже более предпочтительно 8.5 - 12, и в частности 8.5 - 10. Предпочтительно рацемизацию осуществляют в водных условиях.

Альтернативно, гидантоин, который имеет формулу (1b), можно обработать ферментом гидантоин рацемазой.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ включает добавление фермента гидантоиназы, фермента гидантоин рацемазы, и фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, где все стадии реакции осуществляют в одной емкости (методика, также известная как условия «одного сосуда»), предпочтительно где все реагенты в основном добавляют в начале реакции или где реагенты добавляют в одну емкость в разное время.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ включает добавление фермента гидантоиназы, фермента гидантоин рацемазы, фермента рацемазы N-карбамоиламинокислоты, и фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, где все стадии реакции осуществляют в одной емкости (методика, также известная как условия «одного сосуда»), предпочтительно где все реагенты в основном добавляют в начале реакции или где реагенты добавляют в одну емкость в разное время.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ включает добавление фермента рацемазы N-карбамоиламинокислоты и фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, где все стадии реакции осуществляют в одной емкости (методика, также известная как условия «одного сосуда»), предпочтительно где все реагенты в основном добавляют в начале реакции или где реагенты добавляют в одну емкость в разное время.

В ещё одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ включает добавление фермента гидантоиназы и фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, где все стадии реакции осуществляют в одной емкости (методика, также известная как условия «одного сосуда»), предпочтительно где все реагенты в основном добавляют в начале реакции или где реагенты добавляют в одну емкость в разное время. В этом отношении предпочтительно, когда значение pH реакционной смеси составляет 7 - 9.

Используемые ферменты могут быть применены любым подходящим способом, известным в уровне техники.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения используемые ферменты применяют в виде очищенного клеточного лизата, цельных клеток или иммобилизованных ферментов.

Альтернативно, некоторые или все компоненты, кроме L-глюфосината, можно удалить из биотрансформационной смеси, смесь необязательно концентрировать, а затем смесь можно использовать непосредственно (и/или с добавлением различных вспомогательных веществ) для профилактики или борьбы с сорняками. Биотрансформационная смесь в некоторых случаях может использоваться непосредственно (и/или с добавлением различных вспомогательных веществ) для профилактики или борьбы с сорняками.

Могут быть добавлены дополнительные стадии дальнейшей очистки L-глюфосината. Такие дополнительные способы очистки и выделения включают ионный обмен, экстракцию, солеобразование, кристаллизацию и фильтрацию; каждый может использоваться несколько раз или в подходящей комбинации.

5 Ферменты могут быть удалены путем простой фильтрации, если они поддерживаются, или, если они свободны в растворе, путем применения ультрафильтрации, применения абсорбентов, таких как целит, целлюлоза или уголь, или денатурации с помощью различных методик, известных специалистам в данной области техники.

10 Способы ионного обмена обеспечивают разделение путем селективной адсорбции растворенных веществ на выбранных для этой цели смолах. Поскольку перед адсорбцией продукты и примеси должны быть растворены в одном растворе, перед выделением обычно требуется концентрирование потока очищенного продукта путем упаривания или дистилляции. Примеры применения ионного обмена для очистки описаны Schultz et al. и в EP0249188(A2).

15 Очистка может быть достигнута путем образования нерастворимой соли L-глюфосината с помощью добавления подходящей кислоты, включая соляную кислоту, серную кислоту, фосфорную кислоту, азотную кислоту, уксусную кислоту и т.п. Аналогично, очистка может быть достигнута путем добавления 20 подходящего основания с образованием нерастворимой соли. Пригодные основания включают гидроксиды, карбонаты, сульфаты и фосфаты щелочных металлов или гидроксиды, карбонаты, сульфаты и фосфаты щелочноземельных металлов. Могут быть использованы и другие основания, содержащие азот, включая аммиак, гидроксилламин, изопропиламин, триэтиламин, трибутиламин, 25 пиридин, 2-пиколин, 3-пиколин, 4-пиколин, 2,4-лутидин, 2,6-лутидин, морфолин, N- метиморфолин, 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен и диметилэтанолламин. Может быть предпочтительным концентрировать смесь или добавлять растворитель (или и то, и другое), чтобы максимизировать выход и оптимизировать чистоту желаемой соли. К подходящим для этой цели 30 растворителям относятся те, в которых растворимость желаемой соли очень низка (такие растворители часто называют «антирастворителями»). Соли L-глюфосината можно трансформировать в формы глюфосината, подходящие для состава, стандартными способами, известными специалистам в данной области

техники. Альтернативно, L-глюфосинат может быть выделен в виде цвиттер-иона.

В патенте US 9,255,115 B2 описано, как соль соляной кислоты L-глюфосината может быть превращена в цвиттер-ионную форму с помощью основания, такого как гидроксид натрия или метоксид натрия, и затем кристаллизована из водно-спиртового растворителя с получением L-глюфосината относительно высокой чистоты. Преимуществом этого способа является получение кристаллического L-глюфосината, который не гигроскопичен и, следовательно, сохраняет более высокую чистоту по сравнению с аморфным L-глюфосинатом при длительном воздействии влаги.

Другие соли L-глюфосината известны специалистам в данной области техники. В патентах US 5,767,309 и US 5,869,668 описано применение хиральных алкалоидных оснований для образования диастереомерных солей с рацемическим глюфосинатом. Очистка достигается за счет того, что соль L-глюфосината осаждается из раствора в гораздо большем количестве, чем соответствующая соль D-глюфосината. Следовательно, этот способ можно было бы использовать согласно настоящему изобретению для получения L-глюфосината с высоким энантиомерным избытком, при желании.

Необязательно, очистка может быть достигнута путем сначала кристаллизации одной или более примесей, удаления примесей фильтрованием и затем дальнейшей очистки L-глюфосината из полученного фильтрата путем образования соли, как описано выше. Предпочтительно, если непрореагировавший донор амина может быть частично или полностью выделен и использован в последующих реакциях. Аналогично, непрореагировавшая N-карбамоиламинокислота, которая имеет формулу (2), которая частично или полностью выделена, может быть рециркулирована для применения в последующих реакциях.

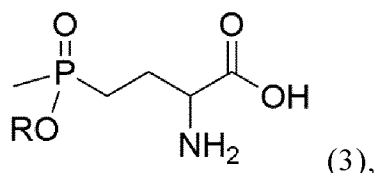
Для очистки продукта можно использовать экстракцию. DE 3920570 C2 описывает способ, в котором избыток глутаминовой кислоты (используемой в качестве донора амина) осаждается путем установления значения pH раствора на 3,7-4,2 с помощью серной кислоты. После фильтрования глутаминовой кислоты значение pH фильтрата снижают до 1-2, вследствие чего остальные примеси экстрагируют в растворитель. После экстракции и концентрирования к водному раствору добавляют аммиак до значения pH 5-7, вследствие чего сульфат

аммония осаждается. Сульфат аммония удаляют фильтрованием и полученный фильтрат концентрируют с получением соли аммония L-глюфосината.

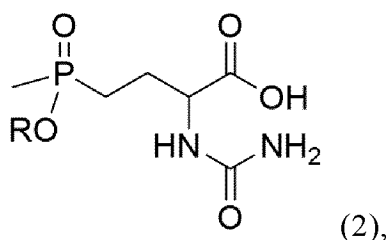
Выделение L-глюфосината или его солей может быть желательным, например, с целью доставки твердых веществ к целевому составу или
 5 применению. Могут быть использованы типичные промышленные способы выделения, например, фильтрация, центрифугирование и т.п. Выделенный продукт часто требует удаления воды, летучих примесей и растворителей (при наличии), и для этой цели можно использовать типичное промышленное сушильное оборудование. Примеры такого оборудования включают печи,
 10 сушилки с вращающимся барабаном, сушилки с перемешиванием и т. д. В некоторых случаях может оказаться предпочтительным применение распылительной сушилки.

После очистки не обязательно получать твердый продукт. Может быть предпочтительным, чтобы состав L-глюфосината находился в том же месте, что
 15 и используемое для получения L-глюфосината. L-глюфосинат и многие его соли легко растворимы в воде, а вода представляет собой удобную жидкость для применения в составлении продуктов. Например, донор амина выделяют фильтрованием, а полученный фильтрат концентрируют путем дистилляции. Значение рН фильтрата можно довести до желаемого значения, и полученный
 20 раствор можно использовать в чистом виде или в смеси с ингредиентами состава. В другом примере суспензия L-глюфосината или одной из его солей может быть приготовлена, как описано выше, и выделена фильтрованием. Твердое вещество можно растворить непосредственно на фильтре путем добавления воды или подходящего растворителя для получения раствора L-
 25 глюфосината.

Кроме того, описан способ получения глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, который включает стадию
 30 химического отщепления карбамоильного фрагмента N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2)



где R представляет собой H или C1-C8алкил.

Следует понимать, что термин “химическое отщепление” относится к стадии отщепления, которую не осуществляют в ферментативных условиях.

5 Возможен любой подходящий химический подход.

Предпочтительно, химическое отщепление осуществляют в кислотных условиях, предпочтительно с использованием хлористого водорода, серной кислоты, и их смесей, более предпочтительно хлористого водорода, и в частности концентрированного хлористого водорода (то есть 34 - 38 %

10 хлористого водорода в воде).

Предпочтительно, химическое отщепление осуществляют путем добавления нитрита натрия.

Предпочтительно, химическое отщепление осуществляют при повышенной температуре, более предпочтительно при температуре 50 - 130 °С, даже более

15 предпочтительно 70 - 120 °С, и в частности 80 - 110 °С.

Предпочтительно, давлением реакции является давление окружающей среды. Давление реакции предпочтительно находится в диапазоне от 0.995 до 1.030 мбар, более предпочтительно от 1.005 до 1.020 мбар, и в частности приблизительно 1.013 мбар.

20 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, отщепление осуществляют при значении pH 0 - 5, предпочтительно 0 - 3.

В особом варианте осуществления, химическое отщепление осуществляют путем i) растворения N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2), в кислотных условиях, предпочтительно при температуре от -15 до 20 °С, более

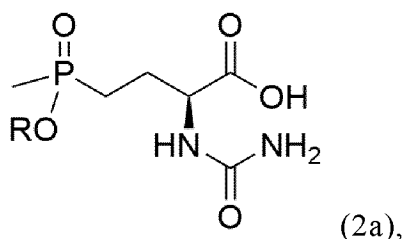
25 предпочтительно от -10 до 10 °С, и в частности от -5 до 5 °С, ii) добавления нитрита натрия, предпочтительно с последующим перемешиванием при температуре от 10 до 35 °С, предпочтительно от 15 до 30 °С, и в частности от 20 до 25 °С или при комнатной температуре, и необязательно iii) добавления

30 нагревания реакционной смеси до температуры от 50 до 130 °С,

предпочтительно от 70 до 120 °С, и в частности от 80 до 110 °С. Стадия iii) является подходящей для отщепления сложного эфира, при наличии.

Реакционная смесь может быть обработана стандартным способом (то есть промывкой и очисткой).

- 5 Как указано выше, изобретение также относится во втором аспекте к композиции, которая содержит N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2a)



- 10 где R представляет собой H или C1-C8алкил, и L-глюфосинат или его соли.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, R в формуле (2a) представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C2-C4алкил, более предпочтительно H, этил или бутил, и в частности H.

- 15 Подходящими солями является соль соляной кислоты, соли аммония, и соли изопропиламмония. Кроме того, следует понимать, что также охвачен соответствующий цвиттер-ион L-глюфосината.

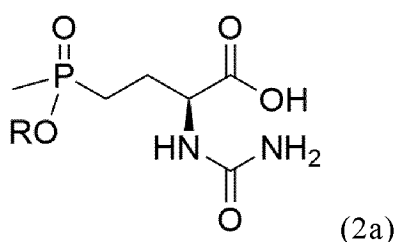
- 20 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, количество L-глюфосината или его солей составляет по меньшей мере 30 масс.%, предпочтительно по меньшей мере 40 масс.%, более предпочтительно по меньшей мере 50 масс.%, даже более предпочтительно по меньшей мере 60 масс.%, еще более предпочтительно по меньшей мере 70 масс.%, и в частности по меньшей мере 80 масс.% или по меньшей мере 90 масс.%, в пересчете на общее количество N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), и L-глюфосината или его солей.

- 25 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, количество L-глюфосината или его соли находится в диапазоне 20 - 99.9 масс.%, предпочтительно 30 - 99.8 масс.%, более предпочтительно 40 - 99.7 масс.%, даже более предпочтительно 50 - 99.6 масс.%, еще более предпочтительно 60 - 99.5 масс.%, и в частности 70 - 99.5 масс.% или 80 - 99.5 масс.%, в пересчете на

общее количество N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), и L-глюфосината или его солей.

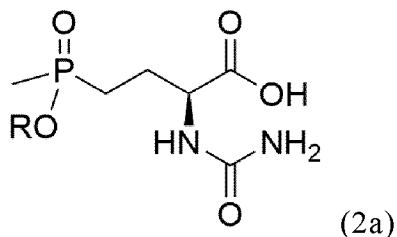
В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, количество L-глюфосината или его солей находится в диапазоне 80 - 99.995 масс.%, предпочтительно 90 - 99.99 масс.%, более предпочтительно 95 - 99.95 масс.%, даже более предпочтительно 97 - 99.92 масс.%, и в частности 99 - 99.9 масс.%, в пересчете на общее количество N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), и L-глюфосината или его солей.

Композиция может содержать N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2a)



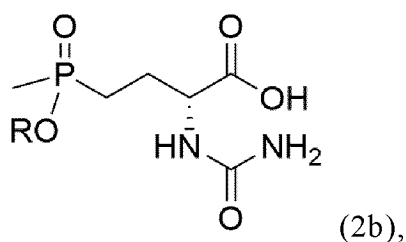
в количестве до 70 масс.%, предпочтительно до 60 масс.%, более предпочтительно до 50 масс.%, даже более предпочтительно до 40 масс.%, еще более предпочтительно до 30 масс.%, и в частности до 20 масс.% или до 10 масс.%, в пересчете на общее количество N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), и L-глюфосината или его солей. Композиция также может содержать N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2a), в количестве до 40 масс.%, предпочтительно до 20 масс.%, более предпочтительно до 10 масс.%, даже более предпочтительно до 5 масс.%, еще более предпочтительно до 3 масс.%, и в частности до 1 масс.%, в пересчете на общее количество N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), и L-глюфосината или его солей.

Композиция может содержать N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2a)

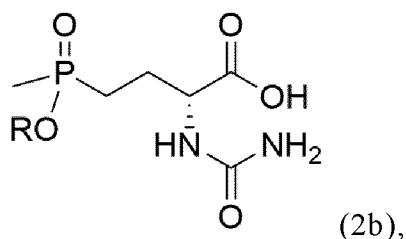


в количестве 0.1 - 80 масс.%, предпочтительно 0.2 - 70 масс.%, более предпочтительно 0.3 - 60 масс.%, даже более предпочтительно 0.4 - 50 масс.%, еще более предпочтительно 0.5 - 40 масс.%, и в частности 0.5 30 масс.% или 0.5 - 20 масс.%, в пересчете на общее количество N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), и L-глюфосината или его солей. Композиция также может содержать N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2a), в количестве 0.001 - 40 масс.%, предпочтительно 0.005 - 20 масс.%, более предпочтительно 0.01 - 10 масс.%, даже более предпочтительно 0.05 - 5 масс.%, еще более предпочтительно 0.08 - 3 масс.%, и в частности 0.1 - 1 масс.%, в пересчете на общее количество N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), и L-глюфосината или его солей.

Композиция может дополнительно содержать N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2b)



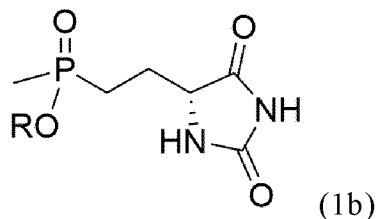
предпочтительно в количестве до 40 масс.%, предпочтительно до 20 масс.%, более предпочтительно до 10 масс.%, даже более предпочтительно до 5 масс.%, еще более предпочтительно до 3 масс.%, и в частности до 1 масс.%, в пересчете на общее количество N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2b), и L-глюфосината или его солей. Композиция может дополнительно содержать N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2b)



в количестве 0.001 - 40 масс.%, предпочтительно 0.005 - 20 масс.%, более предпочтительно 0.01 - 10 масс.%, даже более предпочтительно 0.05 - 5 масс.%, еще более предпочтительно 0.08 - 3 масс.%, и в частности 0.5 - 1 масс.%, в пересчете на общее количество N-карбамоиламинокислоты, которая имеет

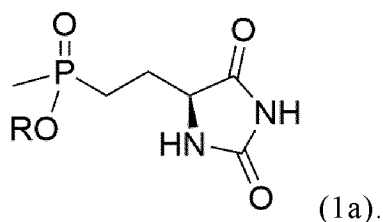
формулу (2a), N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2b), и L-глюфосината или его солей.

Композиция может дополнительно содержать гидантоин, который имеет формулу (1b)



и/или

гидантоин, который имеет формулу (1a)



10 Гидантоин (который имеет формулы (1b) и/или(1a)) предпочтительно присутствует в композиции в количестве до 30 масс.%, предпочтительно до 20 масс.%, более предпочтительно до 10 масс.%, даже более предпочтительно до 5 масс.%, еще более предпочтительно до 2 масс.%, и в частности до 0.5 масс.%, в пересчете на общее количество гидантоина (который имеет формулы (1b) и/или(1a)), N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), и L-
15 глюфосината или его солей.

Альтернативно, гидантоин (который имеет формулы (1b) и/или(1a)) присутствует в композиции в количестве 0.001 - 30 масс.%, предпочтительно 0.005 - 20 масс.%, более предпочтительно 0.01 - 10 масс.%, даже более предпочтительно 0.05 - 5 масс.%, еще более предпочтительно 0.08 - 2 масс.%, и в
20 частности 0.1 - 0.5 масс.%, в пересчете на общее количество гидантоина (который имеет формулы (1b) и/или(1a)), N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2a), и L-глюфосината или его солей.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, R в формулах (2a) и (1b) представляет собой H или C1-Сбалкил, предпочтительно H или C2-С4алкил, более предпочтительно H, этил или бутил, и в частности H или этил, при наличии. В этом отношении следует понимать, что R в формулах (2b) и (1a) также предпочтительно представляет собой H или C1-Сбалкил,

25

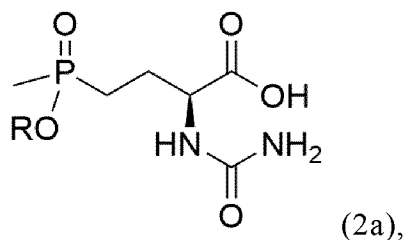
предпочтительно Н или С2-С4алкил, более предпочтительно Н, этил или бутил, и в частности Н или этил, при наличии. В этом отношении следует понимать, что R в формулах (2b), (1a), и (1b) предпочтительно представляет собой Н или С1-Сбалкил, предпочтительно Н или С2-С4алкил, более предпочтительно Н, этил или бутил, и в частности Н или этил, при наличии.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения описанная в данной заявке композиция может быть использована непосредственно в качестве гербицидной композиции или в качестве ингредиента в составленном гербицидном продукте.

Описанные в данном документе композиции являются пригодными для применения на поле сельскохозяйственных культур для профилактики или борьбы с сорняками. Композиция может быть приготовлена в виде жидкости для распыления на поле. Глюфосинат, предпочтительно L-глюфосинат, обеспечен в композиции в эффективных количествах. В настоящем документе эффективное количество означает от приблизительно 10 грамм активного ингредиента на гектар до приблизительно 1500 грамм активного ингредиента на гектар, например, от приблизительно 50 грамм до приблизительно 400 грамм или от приблизительно 100 грамм до приблизительно 350 грамм. В некоторых вариантах осуществления активным ингредиентом является L-глюфосинат. Например, количество L-глюфосината в композиции может составлять about 10 грамм, приблизительно 50 грамм, приблизительно 100 грамм, приблизительно 150 грамм, приблизительно 200 грамм, приблизительно 250 грамм, приблизительно 300 грамм, приблизительно 350 грамм, приблизительно 400 грамм, приблизительно 500 грамм, приблизительно 550 грамм, приблизительно 600 грамм, приблизительно 650 грамм, приблизительно 700 грамм, приблизительно 750 грамм, приблизительно 800 грамм, приблизительно 850 грамм, приблизительно 900 грамм, приблизительно 950 грамм, приблизительно 1,000 грамм, приблизительно 1,050 грамм, приблизительно 1,100 грамм, приблизительно 1,150 грамм, приблизительно 1,200 грамм, приблизительно 1,250 грамм, приблизительно 1,300 грамм, приблизительно 1,350 грамм, приблизительно 1,400 грамм, приблизительно 1,450 грамм, или приблизительно 1,500 грамм L-глюфосината на гектар.

Описанные в данном документе гербицидные композиции (включая концентраты, требующие разведения перед нанесением на растения) содержат L-

глюфосинат (то есть активный ингредиент), необязательно N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2a)



5 и один или более вспомогательных компонентов в жидкой или твердой форме.

Композиция может также содержать дополнительно описанный в данном документе гидантоин формулы (1).

Композиции готовят путем смешивания активного ингредиента с одним или более вспомогательными веществами, такими как разбавители, наполнители, носители, поверхностно-активные вещества, органические растворители, увлажнители или кондиционирующие агенты, чтобы получить композицию в форме тонкоизмельченных твердых частиц, гранул, раствора, дисперсии или эмульсии. Таким образом, активный ингредиент можно использовать с адьювантом, таким как тонкоизмельченное твердое вещество, жидкость органического происхождения, вода, смачивающий агент, диспергирующий агент, эмульгирующий агент или их любая подходящая комбинация. С точки зрения экономии и удобства вода является предпочтительным разбавителем. Однако не все соединения устойчивы к гидролизу, и в некоторых случаях это может диктовать применение неводных растворяющих сред, как это известно специалистам в данной области.

20 Необязательно в композицию можно добавить один или более дополнительных компонентов для получения приготовленной в составе гербицидной композиции. Такая приготовленная композиция может включать L-глюфосинат, носители (например, разбавители и/или растворители) и другие компоненты. Приготовленная композиция включает эффективное количество L-глюфосината.

В приготовленную композицию также может быть включен разбавитель. Подходящие разбавители включают воду и другие водные компоненты. Необязательно разбавители присутствуют в количестве, необходимом для получения композиции, готовой к упаковке или использованию.

Описанные в данном документе гербицидные композиции, в частности жидкости и растворимые порошки, могут содержать в качестве дополнительных вспомогательных компонентов один или более поверхностно-активных агентов в количествах, достаточных для того, чтобы сделать данную композицию легко диспергируемой в воде или масле. Включение в композиции поверхностно-активного агента значительно повышает их эффективность. Поверхностно-активный агент, используемый в данном документе, включает смачивающие агенты, диспергирующие агенты, суспендирующие агенты, а также эмульгирующие агенты. В равной степени можно использовать анионные, катионные и неионные агенты.

Подходящие смачивающие агенты включают алкилбензол и алкилнафталинсульфонаты, сульфатированные жирные спирты, амины или амиды кислот, сложные эфиры длинноцепочечных кислот изотионата натрия, сложные эфиры сульфосукцината натрия, сложные эфиры сульфатированных или сульфонируемых жирных кислот нефтяных сульфонатов, сульфонируемых растительных масел, дитретичные ацетиленовые гликоли, полиоксиэтиленовые производные алкилфенолов (в частности, изооктилфенол и нонилфенол), и полиоксэтиленовые производные сложных эфиров моновысших жирных кислот ангидридов гексита (например, сорбитан). Типичные диспергаторы включают метилцеллюлозу, поливиниловый спирт, лигнинсульфонаты натрия, полимерные алкилнафталинсульфонаты, нафталинсульфонат натрия, полиметиленабиснафталинсульфонат и натрия N-метил-N-(длинноцепочечные кислоты) лаураты.

Вододиспергируемые порошковые композиции могут быть изготовлены содержащими один или более активных ингредиентов, инертный твердый наполнитель и один или более смачивающих и диспергирующих агентов. Инертные твердые наполнители обычно имеют минеральное происхождение, как например, природные глины, диатомовая земля и синтетические минералы, полученные из кремнезема и т.п. Примеры таких наполнителей включают каолиниты, аттапульгитовую глину и синтетический силикат магния. Описанные в данном документе вододиспергируемые порошки необязательно могут содержать от приблизительно 5 до приблизительно 95 массовых частей активного ингредиента (например, от приблизительно 15 до 30 массовых частей активного ингредиента), от приблизительно 0,25 до 25 массовых частей

смачивающего агента, от приблизительно 0,25 до 25 масс.частей диспергатора, и от 4,5 до приблизительно 94,5 массовых частей инертного твердого наполнителя, причем все части относятся к массе всей композиции. При необходимости от приблизительно 0,1 до 2,0 массовых частей твердого инертного наполнителя
5 можно заменить ингибитором коррозии или пеногасителем, или и тем и другим.

Водные суспензии можно приготовить путем растворения или путем смешивания и измельчения водной суспензии нерастворимого в воде активного ингредиента в присутствии диспергатора с получением концентрированной суспензии очень мелкодисперсных частиц. Полученная концентрированная
10 водная суспензия характеризуется чрезвычайно малым размером частиц, поэтому при разбавлении и распылении покрытие получается очень равномерным.

Эмульгируемые масла обычно представляют собой растворы активного ингредиента в несмешивающихся с водой или частично несмешивающихся с
15 водой растворителях вместе с поверхностно-активным агентом. Подходящие растворители для активного ингредиента, описанного в данном документе, включают углеводороды и несмешивающиеся с водой простые эфиры, сложные эфиры или кетоны. Композиции эмульгируемого масла обычно содержат от приблизительно 5 до 95 частей активного ингредиента, от приблизительно 1 до
20 50 частей поверхностно-активного агента и от приблизительно 4 до 94 частей растворителя, причем все части приведены по массе в расчете на общую массу эмульгируемого масла.

Описанные в данном документе композиции могут также содержать другие добавки, например, удобрения, фитотоксиканты и регуляторы роста растений,
25 пестициды и т.п., используемые в качестве адъювантов или в сочетании с любым из описанных выше адъювантов. Описанные в данном документе композиции можно также смешивать с другими веществами, например, удобрениями, другими фитотоксикантами и т. д., и применять за один раз.

В каждом типе составов, описанных в данном документе, например, в
30 жидких и твердых составах, концентрация активных ингредиентов одинакова.

Признано, что гербицидные композиции можно использовать в комбинации с другими гербицидами. Гербицидные композиции настоящего изобретения часто применяют в сочетании с одним или несколькими другими гербицидами для борьбы с более широким разнообразием нежелательной растительности. При

использовании в сочетании с другими гербицидами заявленные в данной заявке соединения могут быть введены в состав с другим гербицидом или гербицидами, смешаны в баке с другим гербицидом или гербицидами или применены последовательно с другим гербицидом или гербицидами. Некоторые из

5 гербицидов, которые можно применять в сочетании с соединениями настоящего изобретения, включают следующие: амидные гербициды, такие как аллидохлор, бифлутамид, бензадокс, бензипрам, бромбутид, кафенстрол, CDEA, хлортиамид, ципразол, диметенамид, диметенамид-Р, дифенамид, эпроназ, этнипромид, фентразамид, флупоксам, фомесафен, галосафен, изокарбамид,

10 изоксабен, напропамид, наталам, петоксамид, пропизамид, хинонамид и тебутам; анилидные гербициды, такие как хлоранокрил, цизанилид, кломепроп, ципромид, дифлуфеникан, этобензанид, фенасулам, флуфенацет, флуфеникан, мефенацет, мефлюидид, метамифоп, моналид, напроанилид, пентадохлор, пиколинафен и пропанил; арилаланиновые гербициды, такие как бензоилпроп,

15 флампроп и флампроп-М; хлорацетанилидные гербициды, такие как ацетохлор, алахлор, бутлахлор, бутенахлор, делахлор, диэтилат, диметахлор, метазахлор, метолахлор, S-метолахлор, претилахлор, пропахлор, пропизохлор, принахлор, тербухлор, тенилхлор и ксилахлор; сульфонилидные гербициды, такие как бензофтор, перфлуидон, пиримисульфат и профлуазол; сульфонамидные

20 гербициды, такие как асулам, карбасулам, фенасулам и оризалин; антибиотико-гербициды, такие как биланафос; гербициды бензойной кислоты, такие как хлорамбен, дикамба, 2,3,6-ТВА и трикамба; гербициды пиримидинилоксибензойной кислоты, такие как биспирибак и пириминобак; гербициды пиримидинилтиобензойной кислоты, такие как пиритиобак;

25 гербициды фталевой кислоты, такие как хлортал; гербициды пиколиновой кислоты, такие как аминопиралид, клопиралид и пиклорам; гербициды хинолинкарбоновой кислоты, такие как квинклолак и квинмерак; мышьяковые гербициды, такие как какодиловая кислота, СМА, DSMA, гексафлюрат, МАА, МАМА, MSMA, арсенит калия и арсенит натрия; бензоилциклогександионовые

30 гербициды, такие как мезотрион, сулкотрион, тефурилтрион и темботрион; бензофуранилалкилсульфонатные гербициды, такие как бенфурезат и этофумезат; карбаматные гербициды, такие как асулам, карбоксазол, хлорпрокарб, дихлормат, фенасулам, карбутилат и тербукарб; карбанилатные гербициды, такие как барбан, ВСРС, карбасулам, карбетамид, СЕРС, хлорбуфам,

хлорпрофам, СРРС, десмедифам, фенизофам, фенмедифам, фенмедифам-этил, профам и свеп; циклогексеносимные гербициды, такие как аллоксидим, бутроксидим, клетодим, клопроксидим, циклоксидим, профоксидим, сетоксидим, тепралоксидим и тралкоксидим; циклопропилизоксазольные гербициды, такие как изоксахлортол и изоксафлутол; дикарбоксимидные гербициды, такие как бензфендизон, цинидон-этил, флумезин, флумиклорак, флумиоксазин и флумипропин; динитроанилиновые гербициды, такие как бенфлуралин, бутралин, динитрамин, эталфлуралин, флухлоралин, изопропалин, металпропалин, нитралин, оризалин, пендиметалин, продиамин, профлуралин и трифлуралин; динитрофенольные гербициды, такие как динофенат, динопроп, диносам, диносеб, динотерб, DНОС, этинофен и мединотерб; дифенилэфирные гербициды, такие как этоксифен; нитрофенилэфирные гербициды, такие как ацифлуорфен, аклонифен, бифенокс, хлометоксифен, хломитрофен, этнипромид, фтордифен, фторгликофен, фторнитрофен, фомесафен, фурилоксифен, галосафен, лактофен, нитрофен, нитрофлуорфен и оксифлуорфен; дитиокарбаматные гербициды, такие как дазомет и метам; галогенированные алифатические гербициды, такие как алорак, хлорпон, далапон, флупропанат, гексахлорацетон, йодметан, метилбромид, монохлоруксусная кислота, SMA и TCA; имидазолиноновые гербициды, такие как имазаметабенз, имазамокс, имазапик, имазапир, имазаквин и имазетапир; неорганические гербициды, такие как сульфамат аммония, бура, хлорат кальция, сульфат меди, сульфат железа, азид калия, цианат калия, азид натрия, хлорат натрия и серная кислота; нитриловые гербициды, такие как бромобонил, бромоксинил, хлороксинил, дихлобонил, йодобонил, иоксинил и пираклонил; фосфорорганические гербициды, такие как амипрофос-метил, анилофос, бенсулид, биланафос, бутамифос, 2,4-DEP, DMPA, EBER, фосамин, глифосат и пиперофос; феноксигербициды, такие как бромфеноксим, кломепроп, 2,4-DEB, 2,4-DEP, дифенопентен, дисул, эрбон, этнипромид, фентеракол и трифопсим; феноксиуксусные гербициды, такие как 4-CPA, 2,4-D, 3,4-DA, MCPA, MCPA-тиоэтил и 2,4,5-T; феноксимасляные гербициды, такие как 4-CPB, 2,4-DB, 3,4-DB, MCPB и 2,4,5-TB; феноксипропионовые гербициды, такие как клопроп, 4-CP, дихлорпроп, дихлорпроп-P, 3,4-DP, фенопроп, мекопроп и мекопроп-P; арилоксифеноксипропионовые гербициды, такие как хлоразифоп, клодинафоп, клофоп, цигалофоп, диклофоп, феноксапроп, феноксапроп-P, фентиапроп,

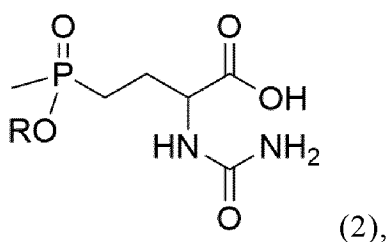
флуазифоп, флуазифоп-Р, галоксифоп, галоксифоп-Р, изоксапирифоп, метамифоп, пропаквизафоп, квизалофоп, квизалофоп-Р и трифоп; фенилендиаминовые гербициды, такие как динитрамин и продиамин; пиразолильные гербициды, такие как бензофенап, пиразолинат, пирасульфотол, пиразоксифен, пироксасульфоп и топпрамезон; пиразолилфениловые гербициды, такие как флуазолат и пирафлуфен; пиридазиновые гербициды, такие как кредазин, пиридафол и пиридат; пиридазиновые гербициды, такие как бромпиразон, хлоридазон, димидазон, флуфенпир, метфлуразон, норфлуразон, оксапиразон и пиданон; пиридиновые гербициды, такие как аминопиралид, клиодинат, клопиралид, дитиопир, флуроксипир, галоксидин, пиклорам, пиколинафен, пириклор, тиазопир и триклопир; пиримидиндиаминовые гербициды, такие как ипримидам и тиоклорим; четвертичные аммонийные гербициды, такие как циперкват, диетамкват, дифензокват, дикват, морфамкват и паракват; тиокарбаматные гербициды, такие как бутилат, циклоат, диаллат, ЕРТС, эспрокарб, этиолат, изополинат, метиобенкарб, молинат, орбенкарб, пебулат, просульфокарб, пирибутикарб, сульфаллат, тиобенкарб, тиокарбазил, триаллат и вемолат; тиокарбонатные гербициды, такие как димексано, EXD и проксан; гербициды тиомочевины, такие как метиурон; триазиновые гербициды, такие как дипропетрин, триазифлам и тригидрокситриазин; хлортриазининовые гербициды, такие как атразин, хлоразин, цианазин, ципразин, эглиназин, ипазин, мезопразин, проциазин, проглиназин, пропазин, себутилазин, симазин, тербутилазин и триетазин; метокситриазининовые гербициды, такие как атратон, метометон, прометон, секбуметон, симетон и тербуметон; метилтиотриазининовые гербициды, такие как аметрин, азипротрин, цианатрин, десметрин, диметаметрин, метопротрин, прометрин, симетрин и тербутрин; триазиноновые гербициды, такие как аметридион, амибузин, гексазинон, изометиозин, метамитрон и метрибузин; триазольные гербициды, такие как амитрол, кафенстрол, эпроназ и флупоксам; триазолоновые гербициды, такие как амикарбазон, бенкарбазон, карфентразон, флукарбазон, пропоксикарбазон, сульфентразон и тиенкарбазон-метил; триазолопиримидининовые гербициды, такие как клорансулам, диклосулам, флорасулам, флуметсулам, метосулам, пенокксулам и пирокксулам; урациловые гербициды, такие как бутафенацил, бромацил, флупропацил, изоцил, ленацил и тербацил; 3-фенилурацилы; мочевиновые гербициды, такие как бензтиазурон, кумилурон, циклурон,

дихлоралмочевина, дифлуфензопир, изонорурон, изоурон, метабензтиазурон, монисурун и норурон; фенилмочевинные гербициды, такие как анизурон, бутурон, хлорбромурон, хлоретурон, хлортолурун, хлороксурон, даимурон, дифеноксурон, димефурон, диурон, фенурон, флуометурон, флуотиурон, 5 изопротурон, линурон, метиурон, метилдимрон, метобензурон, метобромурон, метоксурон, монолинурун, монурон, небурон, парафлурун, фенобензурон, сидурон, тетрафлурун и тидиазурон; гербициды пиримидинилсульфонилмочевины, такие как амидосульфурон, азимсульфурон, бенсульфурон, хлоримурон, циклосульфамурон, этоксисульфурон, 10 флазасульфурон, флуцетосульфурон, флупирсульфурон, форамсульфурон, галосульфурон, имазосульфурон, мезосульфурон, никосульфурон, ортосульфамурон, оксасульфурон, примисульфурон, пиразосульфурон, римсульфурон, сульфометурон, сульфосульфурон и трифлорисульфурон; гербициды триазинилсульфонилмочевины, такие как хлорсульфурон, 15 циноссульфурон, этаметсульфурон, йодосульфурон, метсульфурон, просульфурон, тифенсульфурон, триасульфурон, трибенурон, трифлусульфурон и тритосульфурон; гербициды тиadiaзолилмочевины, такие как бутиурон, этидимурон, тебутиурон, тиазифлурун и тидиазурон; и неклассифицированные гербициды, такие как акролеин, аллиловый спирт, аминоклопирахлор, 20 азафенидин, беназолин, бентазон, бензобициклон, бутидазол, цианамид кальция, камбендихлор, хлорфенак, хлорфенпроп, хлорфлуразол, хлорфлуренол, цинметилин, кломазон, СРМФ, крезол, орто-дихлорбензол, димепиперат, эндотал, флуоромидин, флуридон, флуорохлоридон, флуртамон, флутиацет, инданофан, метазол, метилизотиоцианат, нипираклофен, ОСН, оксадиаргил, 25 оксадиазон, оксазикломефон, пентахлорфенол, пентоксазон, ацетат фенилртути, пиноксаден, просульфалин, пирибензосим, пирифталид, хинокламин, родетанил, сульфгликапин, тидиазимин, тридифан, триметурон, трипропиндан и тритак. Гербицидные композиции согласно настоящему изобретению могут, дополнительно, использоваться в сочетании с глифосатом или 2,4-D на 30 толерантных к глифосату или толерантных к 2,4-D культурах. Как правило, предпочтительно применять композиции согласно настоящему изобретению в сочетании с гербицидами, которые являются селективными в отношении обрабатываемых культур и которые дополняют спектр сорняков, которые поддаются борьбе с помощью этих композиций, при используемой норме

применения. Кроме того, как правило предпочтительно одновременно применять композицию согласно настоящему изобретению и другие дополнительные гербициды либо в виде комбинированного состава, либо в виде баковой смеси.

5 Как указано выше, изобретение также относится в третьем аспекте к способу селективной борьбы с сорняками на участке, предпочтительно содержащем урожай высеянных семян или сельскохозяйственных культур, устойчивых к глюфосинату, который включает:

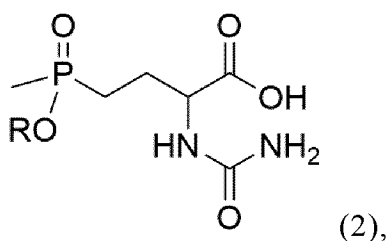
10 нанесение на участок эффективного количества композиции, которая содержит L-глюфосинат или его соли в процентном энантиомерном отношении по меньшей мере 80% относительно D-глюфосината или его солей, и от более чем 0.01 масс.% до менее чем 10 масс.%, в пересчете на общее количество композиции, N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2)



15 где R представляет собой H или C1-C8алкил.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, композиция содержит L-глюфосинат или его соли в процентном энантиомерном отношении 80 - 99.9%, предпочтительно в процентном энантиомерном отношении 85 - 99.8%, более предпочтительно 90 - 99.7%, и в частности 92 - 20 99.5%, относительно D-глюфосината или его солей.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, композиция содержит 0.02 - 8 масс.%, предпочтительно 0.03 - 5 масс.%, более предпочтительно 0.05 - 3 масс.%, и в частности 0.1 - 2 масс.%, в пересчете на 25 общее количество композиции, N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H.

Следует понимать, что композиция может содержать те же адъюванты и/или другие гербициды, которые более подробно описаны выше.

Предпочтительные варианты осуществления описаны выше более
5 подробно.

Описанная в данной заявке композиция является пригодной для нанесения на поле сельскохозяйственных культур для профилактики или борьбы с сорняками. Композиция может быть приготовлена в виде жидкости для
10 распыления на поле. L-глюфосинат обеспечивается в составе в эффективных количествах. В данной заявке эффективное количество означает от приблизительно 10 грамм активного ингредиента на гектар до приблизительно 1500 грамм активного ингредиента на гектар, например, от приблизительно 50 грамм до приблизительно 400 грамм или от приблизительно 100 грамм до
15 приблизительно 350 грамм. В некоторых вариантах осуществления активным ингредиентом является L-глюфосинат. Например, количество L-глюфосината в композиции может составлять приблизительно 10 грамм, приблизительно 50 грамм, приблизительно 100 грамм, приблизительно 150 грамм, приблизительно 200 грамм, приблизительно 250 грамм, приблизительно 300 грамм, приблизительно 350 грамм, приблизительно 400 грамм, приблизительно 500
20 грамм, приблизительно 550 грамм, приблизительно 600 грамм, приблизительно 650 грамм, приблизительно 700 грамм, приблизительно 750 грамм, приблизительно 800 грамм, приблизительно 850 грамм, приблизительно 900 грамм, приблизительно 950 грамм, приблизительно 1,000 грамм, приблизительно 1,050 грамм, приблизительно 1,100 грамм, приблизительно 1,150 грамм, приблизительно 1,200 грамм, приблизительно 1,250 грамм,
25 приблизительно 1,300 грамм, приблизительно 1,350 грамм, приблизительно 1,400 грамм, приблизительно 1,450 грамм, или приблизительно 1,500 грамм L-глюфосинат на гектар.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими
30 примерами.

Примеры

Вещества и методы

Получение ферментов

a) Клонирование генов ферментов (Прим. 1)

- 5 Аминокислотные последовательности соответствующих ферментов идентифицировали из общедоступных баз данных (UniProt, <https://www.uniprot.org>; база данных белков NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>. Последовательности из NCBI обозначаются значком «*» в начале идентификатора соответствующей базы данных).
- 10 Соответствующая последовательность ДНК была получена с использованием стандартного использования кодонов *Escherichia coli*. Последовательность ДНК синтезировали (BioCat GmbH) и клонировали в плазмиду pDHE19.2 (Ress-Loeschke, M. et al., DE 19848129, 1998, (BASF AG)). Полученные плазмиды использовали для трансформации компетентных клеток (Chung, C.T. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86, 2172) штамма *E.coli* TG10, pAgro, pHSG575 (*E.coli* TG10 (Kessler, M. et al., WO2004050877A1, 2004, (BASF AG)): rhaA-производное *E.coli* TG1, трансформированное посредством pHSG575 (Takeshita, S. et al., Gene, 1987, 61, 63) и pAgro4 (pBB541 в Tomoyasu, T. et al., Mol. Microbiol., 2001, 40, 397).

20 *b) Рекомбинантное продуцирование ферментов (Прим. 2)*

Приготовление биокатализатора в шейкерных колбах

- E. coli* TG10, несущую рекомбинантную плазмиду фермента, использовали для инокуляции 2 мл среды LB (Bertani, G., J Bacteriol, 1951, 62, 293), дополненной 100 мкг/л ампициллина, 100 мкг/л спектиномицина, 20 мкг/л хлорамфеникол и полученную предкультуру инкубировали в течение 5 ч при 37 °С при перемешивании 250 об/мин. 1 мл предкультуры использовали для инокуляции 100 мл среды LB, дополненной 100 мкг/л ампициллина, 100 мкг/л спектиномицина, 20 мкг/л хлорамфеникола, 1 мМ MnCl₂, 0,1 мМ изопрропил-β-D-тиогалактопиранозида и 0,5 г/л рамнозы в колбе Эрленмейера с перегородкой на 500 мл. Культуру инкубировали при 37°С в течение 18 ч при встряхивании.
- 30 Впоследствии биомассу собирали центрифугированием при 3220×g в течение 10 минут при 8°С. Супернатант отбрасывали, а осадок клеток ресуспендировали в 8 мл буфера HEPES при концентрации 100 мМ и pH 8,2, дополненного 1 мМ MnCl₂. Клеточную суспензию использовали без какой-либо дополнительной

подготовки к синтезу в случае проведения биотрансформации цельных клеток. В случае, если вместо этого использовались очищенные клеточные лизаты, 5 мл клеточной суспензии распределяли в 5 реакционных пробирок, содержащих лизирующую матрицу В (кварцевые шарики по 0,7 мл диаметром 0,1 мм, MP Biomedicals), пробирки охлаждали на льду, и клетки впоследствии разбивали в гомогенизаторе (Pеqlab Precellys24, VWR) на два 30-секундных цикла. В перерывах между циклами образцы охлаждали на льду. Полученные бесклеточные лизаты очищали центрифугированием 20817×g в течение 10 минут при 8°C. Супернатанты выделяли и фракции из одной партии объединяли (=очищенный клеточный лизат).

Ферментативное получение цельноклеточных биокатализаторов

E. coli TG10, содержащие плазмиды pAgro4 и pHSG575, трансформировали с помощью плазмиды pDHE, кодирующей белок, представляющий интерес. Трансформанты культивировали на планшете с агаром LB, дополненным 100 мкг/мл ампициллина, 100 мкг/мл спектиномицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола.

Предкультуральная среда:

Раствор EсоK12

	Сверхчистая вода	1.0 кг
	Моногидрат лимонной кислоты	40.0 г
20	Гептагидрат сульфата цинка	11.0 г
	Гексагидрат сульфата железа диаммония	8.6 г
	Моногидрат сульфата марганца	3.0 г
	Пентагидрат сульфата меди	0.8 г
	Гептагидрат сульфата кобальта	0.09 г

25
Стерилизовано фильтрованием с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм.

Часть 1

30	Сверхчистая вода	1.0 кг
	Моногидрат лимонной кислоты	3.4 г
	Гептагидрат сульфата магния	2.4 г
	Дигидрат хлорида кальция	0.1 г
	Раствор EсоK12	20 г

Раствор гидроксида натрия 25% используется для установления рН на 6,6

Часть 2

5	Сверхчистая вода	500 г
	Дигидрофосфат калия	26.6 г
	Гидрофосфат диаммония	8.0 г
	Раствор гидроксида натрия 25%	используется для установления рН на 6.4

10

Часть 3

	Сверхчистая вода	500 г
	Глицерин 99%	36.0 г
	Глюконат натрия	24.0 г
15	Фосфорная кислота 20%	используется для установления рН на 6.6

Все 3 части стерилизовали при 121°C в течение 30 минут.

20 *Витаминный раствор*

	Сверхчистая вода	100 г
	Гидрохлорид тиамин	1.0 г
	Витамин В ₁₂	0.5 г

25 Стерилизовано фильтрованием с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм.

Для получения окончательной предкультуральной среды части 1, 2 и 3 объединяют и добавляли 2,0 мл витаминного раствора. Кроме того, среду пополнили 100 мкг/мл ампициллина, 100 мкг/мл спектиномицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола. Несколько трансформантов соскребали с планшета с агаром LB и использовали для инокуляции 2x 100 г предкультуральной среды в 1-литровые колбы Эрленмейера с перегородками. Эти предкультуры инкубировали при 37°C и 150 об/мин. При достижении OD₆₀₀, равного 12, предкультуры использовали целиком для инокуляции основной культуры.

Основная культуральная среда:

Часть 4

5	Сверхчистая вода	9.6 кг
	Моногидрат лимонной кислоты	21.1 г
	Дигидрофосфат калия	173.6 г
	Гидрофосфат диаммония	52.8 г
	Гептагидрат сульфата магния	15.1 г
10	Дигидрат хлорида кальция	0.7 г
	Раствор ЕсоК12	123 г
	Раствор гидроксида натрия 25%	с установленным рН на 6.4
	Плюриол Р 2000	1 мл

15 Часть 4 стерилизовали при 125°C в течение 45 мин.

Часть 5

	Сверхчистая вода	300 г
	Гидрохлорид тиамин	151 мг
20	Витамин В12	30.2 мг
	Натриевая соль ампициллина	1000 мг
	Гидрохлорид спектиномицина	500 мг
	Хлорамфеникол	200 мг

25 Часть 5 стерилизовали стерильной фильтрацией с использованием фильтрующей установки с размером пор 0,1 мкм.

Глицериновый раствор

	Сверхчистая вода	804 г
30	Моногидрат лимонной кислоты	29.1 г
	Сульфат натрия	58.1 г
	Гексагидрат сульфата железа диаммония	4.5 г
	Глицерин 99%	3370 г

Раствор тиамина

Сверхчистая вода	40 г
Гидрохлорид тиамина	55 мг

5 *Раствор пеногасителя*

Плюриол Р 2000	350 г
----------------	-------

Основной раствор

Аммиачная вода 25%	1500 мл
--------------------	---------

10

Раствор индуктора

Сверхчистая вода	150 г
Моногидрат рамнозы	100 г
IPTG	238 мг

15

Глицерин и раствор пеногасителя стерилизовали при 121°C в течение 30 мин. Раствор тиамина и индуктора стерилизуют фильтрованием с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм.

20 Части 4 и 5 объединяли в стерилизованном сосуде для ферментации (Techfors, Infors HT) и инокулировали предкультурой. В сосуде поддерживали температуру 37°C, давление 0,2 бар и значение pH 6,6 путем дозирования основного раствора в ходе ферментации. Уровень pO₂ поддерживали на уровне 20–40% путем регулирования скорости мешалки (обычно 500 об/мин) и скорости аэрации (обычно 6 л/мин). При необходимости добавляли раствор пеногасителя.

25 Растворы глицерина и тиамина объединяли, получая питательный раствор. После инокуляции питательный раствор дозировали со скоростью 10 г/час. Через 7 ч дозирование питательного раствора переводили в режим «остановки и просмотра», при котором подача активировалась со скоростью 10 г/ч при повышении уровня pO₂. Через 14 ч или расхода 330 г питательного раствора

30 скорость подачи увеличивали до 80 – 100 г/ч. Экспрессию гена индуцировали при скорости переноса кислорода 80 ммоль/л/ч или альтернативно при OD₆₀₀, равной 12, путем добавления раствора индуктора. Ферментацию останавливали через 36 часов после индукции путем снижения температуры до 15°C.

Охлажденный ферментативный бульон сливали из ферментера и

центрифугировали при 4700 об/мин и 10 °С для осаждения клеток. Полученный супернатант отбрасывали, а клетки ресуспендировали в 3850 г 50 мМ буфера дигидрофосфата калия при рН 7,0. Суспензию клеток замораживали при -80°С перед лиофилизацией. В связи с этим лиофилизатор поддерживали при

5 температуре -50°С и давлении 0,25 мбар. Лиофилизированные клетки хранили при 4°С.

Получение лиофилизированных бесклеточных экстрактов

Лиофилизированные клетки ресуспендировали в сверхчистой воде при концентрации 100 г/л. Суспензию клеток охлаждали на льду, а затем клетки

10 разрушали тремя пропусканиями через гомогенизатор под давлением (Panda Plus 2000, GEA), давление которого было установлено на 800 бар. Давление в трех пропусканиях обычно составляло от 1000 до 1400 бар. Полученную смесь очищали от остатков центрифугированием при 10000 об/мин при температуре

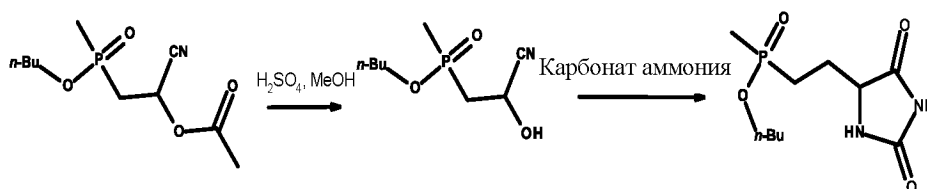
15 10°С в течение 15 мин. Полученный осадок отбрасывали, а концентрацию белка в супернатанте анализировали методом Брэдфорда. Супернатант замораживали при -80°С и затем лиофилизировали при -50°С и давлении 0,25 мбар.

Приготовление исходных веществ и промежуточных продуктов

с) *Химический синтез 5-([2-*

[бутоксид(метил)фосфорил]этил]имидазолидин-2,4-дион (Прим. 3)

20



К перемешиваемому раствору [2-[бутоксид(метил)фосфорил]-1-цианозтил]ацетата (100 г, чистота 90%, Cas 167004-78-6) в метаноле (400 мл) добавляли концентрированную серную кислоту (1 г) и реакционную смесь

25 нагревали до 40°С и перемешивали в течение 15 ч при этой температуре. Реакционной смеси давали охладиться до комнатной температуры, затем добавляли метоксид натрия в метаноле (30%, 3,52 г), а затем сульфат натрия (2 г) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении (84,5

30 г).

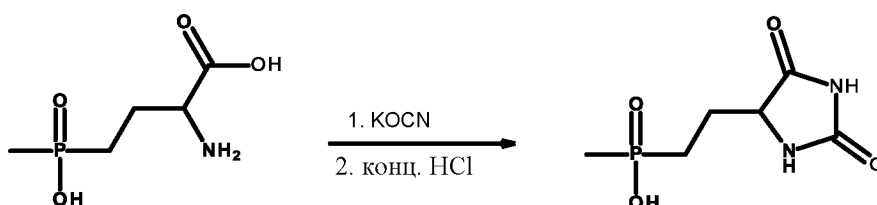
К сырому бутил 3-циано-3-гидроксипропил(метил)фосфинату (84,5 г, 366 ммоль) добавляли раствор карбоната диамония (70,4 г, 732 ммоль) в воде (290 мл). Реакционную смесь нагревали до 70°C в течение 4 ч, а затем упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток суспендировали в теплом

5 изопропаноле (70°C), полученную суспензию фильтровали и осадок на фильтре промывали изопропанолом (2 x 10 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и фильтровали через диоксид кремния (элюирование 1,5 л смеси дихлорметан/метанол 9:1). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 55,5 г продукта и полученное твердое вещество

10 перекристаллизовывали из смеси изопропанол/диизопропиловый эфир (выход 34%).

¹H ЯМР (500 МГц, оксид дейтерия) δ 4.42 – 4.37 (m, 1H), 4.08 – 4.00 (m, 2H), 2.19 – 1.77 (m, 4H), 1.70 – 1.64 (m, 2H), 1.61 (d, *J* = 13.8 Гц, 3H), 1.46 – 1.34 (m, 2H), 0.92 (td, *J* = 7.4, 0.8 Гц, 3H).

15 d) *Химический синтез 5-([2-этокси(метил)фосфорил]этил)имидазолидин-2,4-дион из рацемического глюфосината (Прим. 4)*



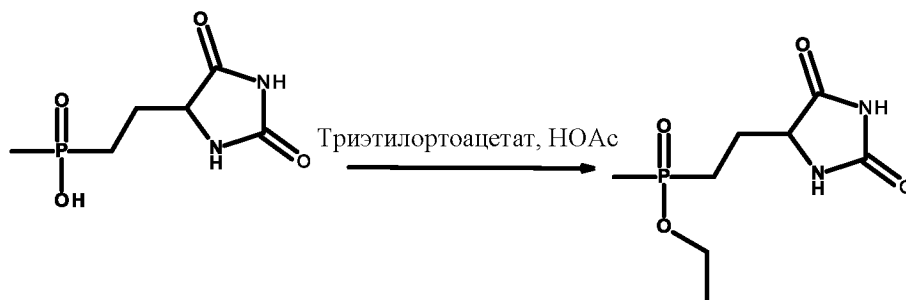
20 К перемешиваемому раствору глюфосината аммония (50% в воде, 50 г, 126 ммоль) в вакууме (200 мбар) добавляли раствор цианата калия (17 г, 202 ммоль) в воде (50 мл) при температуре 50°C в течение 40 мин. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в вакууме (200 мбар) в течение еще 1,5 ч, а затем давали охладиться до комнатной температуры. После перемешивания при комнатной

25 температуре и давлении окружающей среды в течение еще 14 часов добавляли концентрированную HCL (125 мл, 36%) и реакцию смесь нагревали с обратным холодильником в течение 30 минут. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в воде при 50°C (50 мл) и фильтровали. Фильтрат подвергали ионообменной хроматографии

(Dowex-50 WX 8 200-400 (H), 500 мл) и продукт элюировали водой (1 л), получая продукт с по сути количественным выходом.

^1H ЯМР (500 МГц, оксид дейтерия) δ 4.41 – 4.36 (m, 1H), 2.15 – 1.70 (m, 4H), 1.52 (d, $J = 13.9$ Гц, 3H).

5

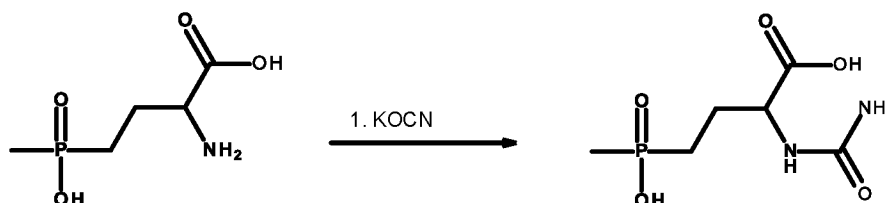


К смеси уксусной кислоты (50 мл) и триэтилортоацетата (75 мл, 409 ммоль) добавляли 2-(2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)этилметилфосфиновую кислоту (10 г, 48,5 ммоль, синтезированную как описано выше) при комнатной температуре.

10 Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником (110°C, температура нагревательной бани) в течение 15 мин. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией (дихлорметан/метанол 9:1), получая этил 2-(2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)этил(метил)фосфинат (4,8 г, 42%).

15 ^1H ЯМР (500 МГц, оксид дейтерия) δ 4.41 – 4.36 (m, 1H), 4.13 – 4.03 (m, 2H), 2.19 – 1.74 (m, 4H), 1.60 (d, $J = 13.9$ Гц, 3H), 1.35 – 1.28 (m, 3H).

e) Синтез N-карбамоиламинокислоты (в химических условиях) (Прим. 5)



20 К перемешиваемому раствору рацемического глюфосината аммония (50% в воде, 39,6 г, 99,9 ммоль) в вакууме (200 мбар) добавляли раствор цианата калия (11,8 г, 145 ммоль) в воде (30 мл) при 50°C в течение 30 мин. Реакционную смесь перемешивали при температуре 50°C в вакууме (200 мбар) в течение еще 1 часа, а затем давали охладиться до комнатной температуры. Реакционную смесь

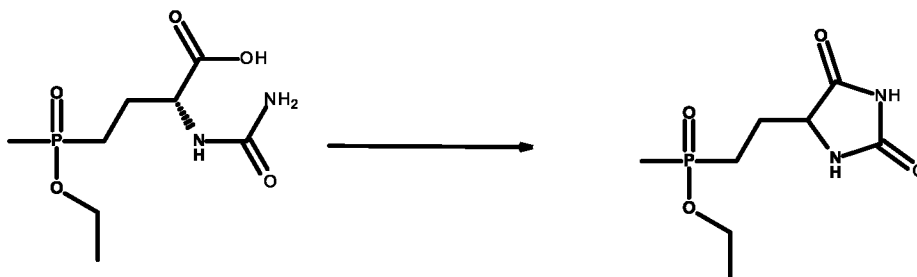
подвергали ионообменной хроматографии (Dowex-50 WX 8 200-400 (H), 220 мл) и продукт элюировали водой (1 л). Элюированный продукт концентрировали при пониженном давлении, получая продукт карбамоиловой кислоты (7,9 г).

5 Оставшуюся карбамоиловую кислоту повторно выделяли из колонки в виде калиевой соли.

^1H ЯМР (500 МГц, оксид дейтерия) δ 4.31 – 4.25 (m, 1H), 2.19 – 1.81 (m, 4H), 1.52 (d, J = 14.1 Гц, 3H). D- и L-энантиомеры синтезировали, исходя из коммерчески доступного D- и L-глюкофосината аналогичным образом.

10 Специфическое вращение для соединения L-энантиомера $[\alpha] = +27,5^\circ$ (c=1 H₂O, измерено в пересчете на калиевую соль). Время удержания ВЭЖХ-МС с использованием Supelco Chirobiotic T2 (элюент: 40% воды в ацетонитриле, 0,1% муравьиной кислоты). Температура: 20°C, скорость потока 0,8 мл/мин. Время удержания L-карбамоиламинокислоты (7,4 мин); D-карбамоиламинокислота (9,2 мин).

15 *f) Химический синтез 5-([2-этокси(метил)фосфорил]этил)имидазолидин-2,4-диона из N-карбамоиламинокислоты (Прим. 6)*

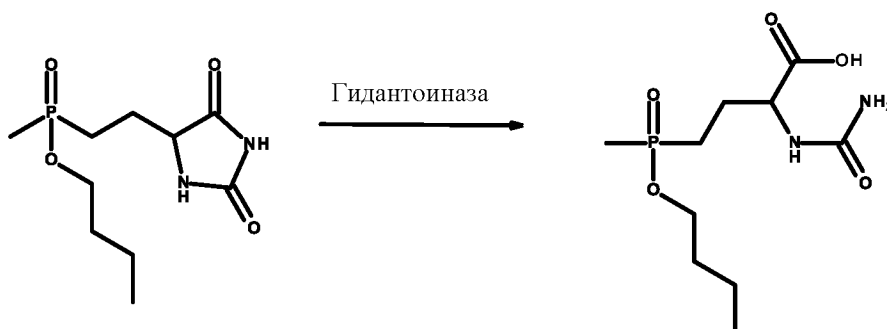


20 (2R)-4-[этокси(метил)фосфорил]-2-уреидобутановую кислоту (синтезированную, то есть через Прим. 11 или Прим. 12) (164 мг) растворяли в растворе HCl в воде (5%, 3 мл). Реакционную смесь встряхивали в течение 48 ч при температуре 40°C. ЯМР показал полное превращение N-карбамоиламинокислоты в D-гидантоин. D-гидантоин можно легко

25 рацемизировать в соответствии с Примером 14 (фермент) или путем обработки водным раствором аммиака при pH 8,5 (аналогично описанному в Примере 15).

Реакция с использованием стадии химического отщепления карбамоила.

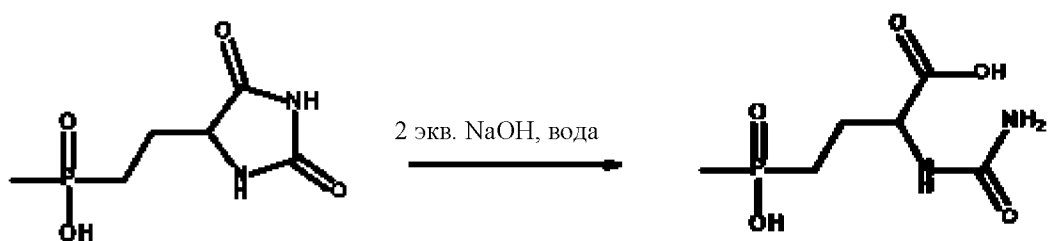
g) Ферментативный синтез бутил-защищенной N-карбамоиламинокислоты (Прим. 7)



- 5 К раствору ([2-[бутоксид(метил)фосфорил]этил]имидазолидин-2,4-диона (7,8 г, 29,7 ммоль) в дегазированном водном калий-фосфатном буфере (60 мл, 0,496 М, рН 8,0) добавляли КОН (3М в воде, 390 мкл) для установления значения рН на 8,0. К смеси добавляли калий-фосфатный буфер (223 мл, 0,100 М, рН 8,0) и фермент гидантоиназу (Uniprot ID: A0A159Z531_9RHOV, SEQ ID NO:1,
- 10 очищенный клеточный лизат, 16,5 мл, общая концентрация белка 8,1 мг/мл) и раствор $MnCl_2$ (1М в воде, 240 мкл). Реакционную смесь перемешивали (250 об/мин) при 37°C в течение 24 часов. Сырое вещество фильтровали с удалением клеточного лизата, а осадок на фильтре промывали водой (60 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, повторно растворяли в смеси
- 15 ТГФ/влажный MeOH и фильтровали через диоксид кремния (элюент: чистый метанол). Затем сырой продукт очищали обращенно-фазовой хроматографией (градиент вода/ацетонитрил от 99:1 до 95:5), с получением 4-[бутоксид(метил)фосфорил]-2-уреидобутановой кислоты (2,05 г, 25%).

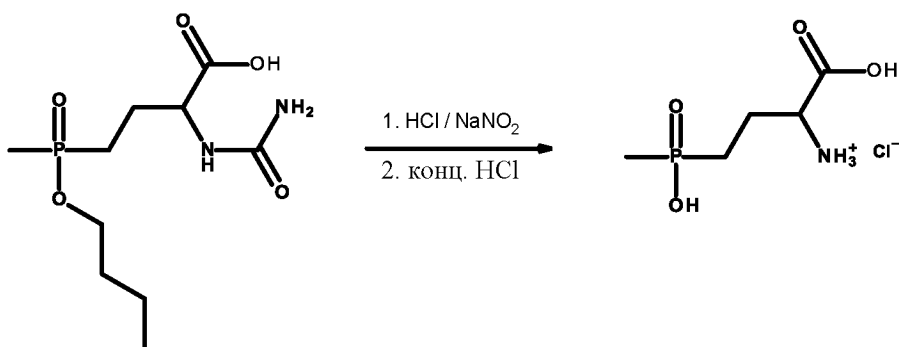
- 20 1H ЯМР (500 МГц, оксид дейтерия) δ 4.11-4.07 (m, 1H), 4.06 – 4.00 (m, 2H), 2.09 – 1.80 (m, 4H), 1.71 – 1.63 (m, 2H), 1.59 (d, J = 13.7 Гц, 3H), 1.46 – 1.34 (m, 2H), 0.92 (t, J = 7.4 Гц, 3H).

h) Ферментативный синтез N-карбамоиламинокислоты (Прим. 7a)



2-(2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)этилметилфосфиновую кислоту (2,47 г) растворяли в воде (2 мл) и добавляли NaOH (50% в воде, 1,91 г). Реакционную смесь разбавляли водой до объема 6 мл и встряхивали при 50°C в течение 28 часов. По истечении этого времени реакции ЯМР выявил, что 96% гидантоина превратилось в натриевую соль N-карбамоиламинокислоты.

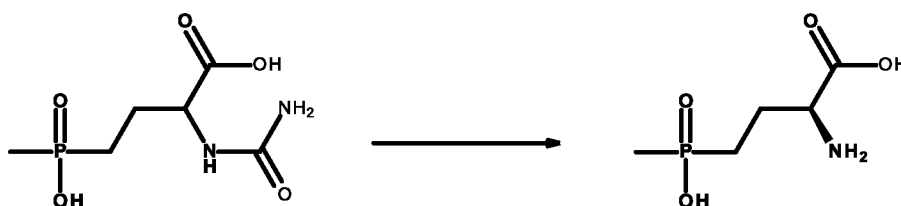
i) Химический синтез глюфосината (Прим. 8)



4-[бутоксид(метил)фосфорил]-2-уреидобутановую кислоту (100 мг), синтезированную с использованием гидантоиназы (Uniprot: A0A159Z531_9RHOV), растворяли в водном растворе HCl (3,5 М, 10 мл) и перемешиваемую реакционную смесь охлаждали до 0°C. Добавляли раствор нитрита натрия (26 мг) в воде (2 мл) и реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение еще 2 часов. Затем добавляли конц. HCl в воде (36%, 7,5 мл) и реакционную смесь нагревали до 100°C и перемешивали при этой температуре в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и дважды экстрагировали метилхлоридом (2×10 мл). Водную фазу концентрировали при пониженном давлении с получением соли соляной кислоты глюфосината.

^1H ЯМР (500 МГц, оксид дейтерия) δ 3.84 – 3.78 (m, 1H), 2.17 – 2.00 (m, 2H), 1.74 – 1.54 (m, 2H), 1.27 (d, J = 13.5 Гц, 3H).

j) Ферментативный синтез глюфосината (Прим. 9)

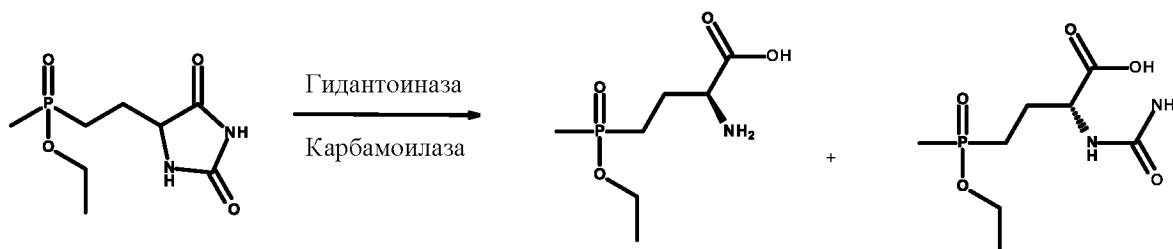


К раствору 2-(карбамоиламино)-4-[гидрокси(метил)фосфорил]бутановой кислоты (0,6 г, 2,5 ммоль) в дегазированном водном калий-фосфатном буфере (5,4 мл, 0,496 М, рН 8,0) добавляли КОН (3М в воде) для установления значения рН на 8,0. К реакционной смеси (6,1 мл) добавляли калий-фосфатный буфер (19,2 мл, 0,100 М, рН 8,0) и фермент гидролазу N-карбамоиламинокислоты (Uniprot ID: A0A1Y4GC62_9BACT, SEQ ID NO:2, очищенный клеточный лизат, 1,5 мл, общая концентрация белка 12,9 мг/мл, белок, полученный в шейкерной колбе) и раствор $MnCl_2$ (1М в воде, 20 мкл). Реакционную смесь перемешивали (250 об/мин) при 37°C в течение 24 часов. Аналитика ЯМР и ВЭЖХ показывала 31% превращение в глюфосинат. Энантиомерное соотношение глюфосината анализировали с помощью хиральной ВЭЖХ. Хиральная ВЭЖХ: >99%-L-глюфосинат/<1% D-глюфосинат; Аналитический способ: колонка Chirex (D)-Pencilamine 250x4,6 мм от Phenomenex; изократическое элюирование 10 мМ сульфата меди (II); УФ-детектирование при 245 нм).

k) Ферментативный синтез глюфосината (Прим. 10)

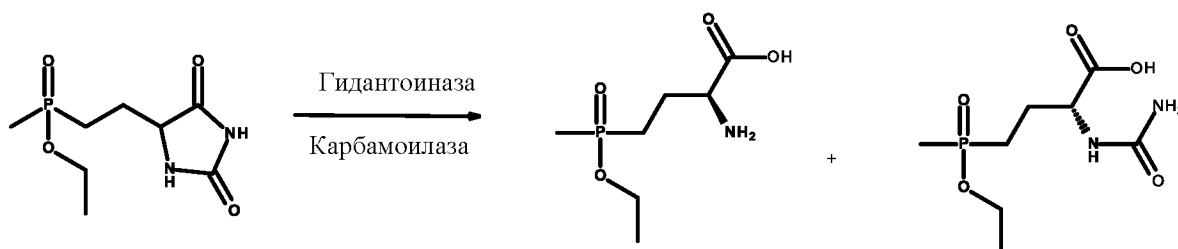
Параллельно реакцию Прим. 9 проводили с другим ферментом гидролазы N-карбамоиламинокислоты в тех же условиях (Uniprot ID: A0A6P2ISL4_BURL3, SEQ ID NO:3, очищенный клеточный лизат, 1,5 мл, общая концентрация белка 10,2 мг/мл, белок, полученный в шейкерной колбе) с получением также L-глюфосината (превращение 21%, хиральная ВЭЖХ: >99%-L-глюфосинат/<1% D-глюфосинат).

a) Ферментативный 1-стадийный синтез этил-глюфосината из сложного этилового эфира гидантоина (Прим. 11, SEQ ID NO: 1+4)



К раствору 5-[2-[этокси(метил)фосфорил]этил]имидазолидин-2,4-диона (5,6 г, 24 ммоль) в воде (20 мл) добавляли аммиак (25% в воде) для установления значения рН. на 8,5. К этой смеси добавляли раствор $MnCl_2$ (2М в воде, 1 мл) и фермент гидантоиназу (Uniprot ID:A0A159Z531_9RHOB, SEQ ID NO:1, 5 очищенный клеточный лизат, 7,5 мл, общая концентрация белка 33 мг/мл) и фермент гидролазу N- карбамоиламинокислоты (A0A535Y1H2_9CHLR, SEQ ID NO: 4, очищенный клеточный лизат, 2,8 мл, общая концентрация белка 44,8 мг/мл). Реакционную смесь перемешивали при 37°C в течение 72 часов. В течение 72 часов реакции значение рН поддерживали на 8,5 с помощью аммиака 10 (25% в воде). По истечении общего времени реакции 7 ч, 27 ч, 30 ч и 49 ч добавляли фермент гидролазу N-карбамоиламинокислоты (A0A535Y1H2_9CHLR, Seq ID: 4, 2,8 мл, очищенный клеточный лизат). ЯМР показывал 36% превращение в сложный этиловый эфир L-глюфосината через 24 часа и 43% - через 72 часа (энантиомерное соотношение по данным хиральной 15 ВЭЖХ L>99%, D>1%). После завершения реакции сырую реакцию смесь нагревали до 80°C в течение 30 мин и фильтровали для удаления клеточного лизата. Смесь сложного этилового эфира L-глюфосината и сложного этилового эфира N-карбамоиламинокислоты разделяли на Dowex-50 WX 8 200-400 (H). N-карбамоиламинокислоту элюировали водой, а сложный этиловый эфир L- 20 глюфосината элюировали аммиаком (0,5 М в воде), получая сложный этиловый эфир L-глюфосината. Альтернативно, сложный этиловый эфир L-глюфосината можно отделить кристаллизацией. Оставшуюся карбамоиламинокислоту можно переработать с помощью Примера 6. Концентрации сложного этилового эфира L- и D-глюфосината определяли методом ВЭЖХ-МС с использованием Supelco 25 Chirobiotic T2 (элюент: 25% воды в ацетонитриле, 0,1% муравьиной кислоты). Температура: 20°C, скорость потока 1,0 мл/мин. Время удержания сложного этилового эфира глюфосината: диастереоизомеры с L-конфигурацией (7,6 + 7,8 мин); D-конфигурация (8,5 и 11,5 мин).

b) Ферментативный 1-стадийный синтез этил-глюфосината из сложного этилового эфира гидантоина (Прим. 12, SEQ ID NO: 1 + 3)



5 К раствору 5-[2-[этоксид(метил)фосфорил]этил]имидазолидин-2,4-диона (5,6 г, 24 ммоль) в воде (20 мл) добавляли аммиак (25% в воде) для установления рН. на 8,5. К этой смеси добавляли раствор $MnCl_2$ (2М в воде, 1 мл) и фермент гидантоиназу (Uniprot ID:A0A159Z531_9RHOB, SEQ ID NO:1, очищенный клеточный лизат, 7,5 мл, общая концентрация белка 33 мг/мл) и фермент гидролазу N- карбамоиламинокислоты (A0A6P2ISL4_BURL3, SEQ ID NO:3, очищенный клеточный лизат, 2,8 мл, концентрация общего белка 44 мг/мл).
10 Реакционную смесь перемешивали при 37°C в течение 48 часов. В течение 48 часов реакции значение рН поддерживали на 8,5 с помощью аммиака (25% в воде). По истечении общего времени реакции 7 ч, 27 ч и 30 ч добавляли фермент гидролазу N-карбамоиламинокислоты (SEQ ID NO:3, 2,8 мл, очищенный клеточный лизат). ЯМР показывал 24% превращение в сложный этиловый эфир L-глюфосината (энантиомерное соотношение L:D >99:1). Концентрации сложного этилового эфира L- и D-глюфосината определяли с помощью ВЭЖХ-МС с использованием Supelco Chirobiotic T2 (элюент: 25% воды в ацетонитриле,
15 0,1% муравьиной кислоты). Температура: 20°C, скорость потока 1,0 мл/мин. Время удержания сложного этилового эфира глюфосината: диастереоизомеры с L-конфигурацией (7,6 + 7,8 мин); D-конфигурация (8,5 и 11,5 мин).
20

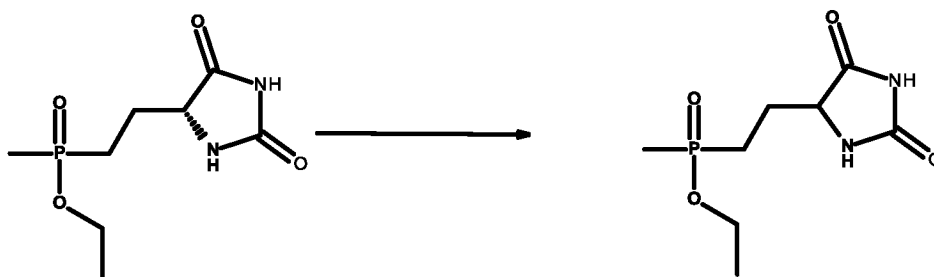
c) Ферментативный синтез N-карбамоиламинокислоты(Прим. 13, SEQ ID NO:1)



2-(2,5-диоксоимидазолидин-4-ил)этилметилфосфиновую кислоту (25 г) растворяли при нагревании в водном растворе аммиака (53 мл, 10 М).

5 Реакционную смесь охлаждали до 37°C и значение pH устанавливали на 8,7 с помощью аммиака. Добавляли раствор $MnCl_2$ (2М в воде, 2,5 мл) и фермент гидантоиназу (Uniprot ID:A0A159Z531_9RHOB, SEQ ID NO:1, лиофилизированный бесклеточный экстракт, 1,28 г) и значение pH
10 устанавливали на 8,7 с использованием водного раствора аммиака. Реакционную смесь перемешивали при 37°C в течение 72 часов и значение pH непрерывно доводили до 8,7 с использованием 10 М раствора аммиака. Через 24 часа ВЭЖХ показывала 95% превращение гидантоина в карбамоиловую кислоту. Условия ВЭЖХ: превращение гидантоина в карбамоиловую кислоту определяли методом ВЭЖХ-МС с использованием колонки Luna C8 150x, 3,0 мм (вода + 0,1% муравьиной кислоты). Температура: 40°C, скорость потока 0,5 мл/мин. Время
15 удержания: гидантоин 3,4 мин, N-карбамоиламинокислота 2,5 мин.

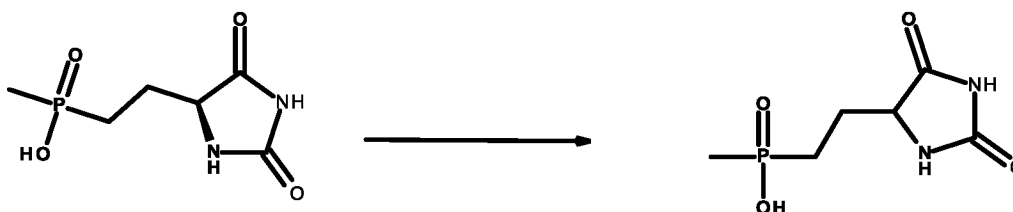
d) Рацемизация гидантоина (сложный этиловый эфир) с использованием рацемазы при значении pH 7.0 (Прим. 14, рацемаза A0A6V7ACK5_RHIRD, Seq ID: 5)



20 (5R)-5-[2-[этоксидиметил]фосфорил]этил]имидазолидин-2,4-дион (37,5 мг, соотношение между гидантоином с D-конфигурацией и с L-конфигурацией 95/5) растворяли в воде (75 мкл) и значение pH устанавливали на 7,0 с помощью аммиака (10М в воде). К этой смеси добавляли гидантоин рацемазу (Seq ID:5; A0A6V7ACK5_RHIRD, 20,2 мг/мл, 150 мкл, очищенный клеточный лизат), а
25 затем 1,6 мкл $MnCl_2$ (2 М в воде). Реакционную смесь встряхивали при 37°C в течение 24 часов. После общего времени реакции в 4 часа соотношение D/L-гидантоина изменилось с 95/5 на 53/47. Через 20 ч рацемизация гидантоина была практически полной (соотношение 51/49). Концентрацию L- и D-гидантоина определяли методом ВЭЖХ-МС с использованием Supelco Chirobiotic T2

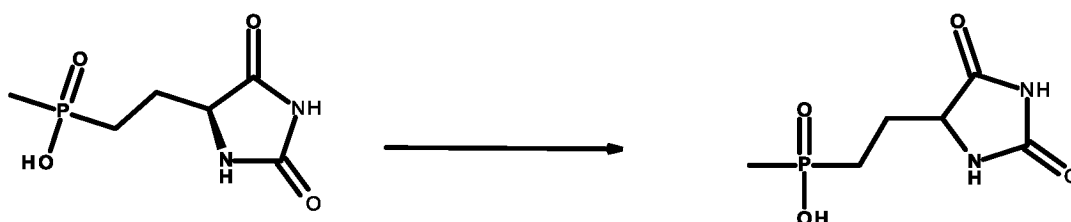
(элюент: 25% воды в ацетонитриле, 0,1% муравьиной кислоты). Температура: 20°C, скорость потока 0,8 мл/мин. Время удержания сложного этилового эфира глюфосината: Диастереоизомеры с D-конфигурацией (5,8 + 6,1 мин); L-конфигурация (7,2 и 10,5 мин).

5 e) *Рацемизация гидантоина при значении pH 8.5 (Прим. 15)*



2-[(4S)-2,5-диоксиимидазолидин-4-ил]этилметилфосфиновую кислоту (206 мг, энантиомерное соотношение L:D 92:8, измеренное с помощью хиральной ВЭЖХ) растворяли в 900 мкл воды и значение pH устанавливали на 8,5, с использованием 50 мкл аммиака (10 М в воде). К реакционной смеси добавляли 10 мкл 2 М раствора $MnCl_2$, а затем 30 мкл воды. Реакционную смесь встряхивали при 37°C в течение 24 часов. После общего времени реакции в течение 3 часов энантиомерное соотношение составляло L:D 53:47, а после общего времени реакции в 24 часа оно составляло 50:50. Это демонстрирует, что гидантоин легко рацемизируется в концентрированных основных условиях в водном аммиаке. Концентрации L- и D-гидантоина определяли методом ВЭЖХ-МС с использованием Supelco Chirobiotic T2 (элюент: 40% воды в ацетонитриле, 0,1% муравьиной кислоты). Температура: 20°C, скорость потока 0,8 мл/мин. Время удержания L-гидантоина (11,3 мин); D-гидантоина (6,6 мин).

20 f) *Рацемизация гидантоина с использованием рацемазы при значении pH 7.8 (Прим. 16, рацемаза A0A2T6KHH4_9RHOB, Seq ID : 6)*



2-[(4S)-2,5-диоксиимидазолидин-4-ил]этилметилфосфиновую кислоту (206 мг, энантиомерное соотношение L:D 92:8, измеренное с помощью хиральной ВЭЖХ) растворяли в 500 мкл воды и значение pH устанавливали на 7,8, с использованием аммиака (10 М в воде). К этой смеси добавляли гидантоин

рацемазу (A0A2T6KHH4_9RHOB, Seq ID: 6, 100 мкл, бесклеточный экстракт, общая концентрация белка 26,1 мг/мл), а затем 10 мкл $MnCl_2$ (2 М в воде). Объем реакционной смеси доводили до 1 мл, а значение pH устанавливали на 7,8 с помощью аммиака (10 М в воде). Реакционную смесь встряхивали при 37°C в течение 24 часов. По истечении общего времени реакции в течение 2 часов энантиомерное соотношение L:D составляло 50:50.

g) Ферментативный скрининг новых биокатализаторов (Прим. 17)

E. coli TG10, содержащие плазмиды pAgro4 и pHSG575, трансформировали с помощью pDHE плазмиды, кодирующей белок, представляющий интерес.

- 10 Полученный единичный клон использовали для инокуляции 1 мл предкультуральной среды (см. «Производство ферментативного цельноклеточного биокатализатора», EX2), дополненной 1 мМ $MnCl_2$, 100 мкг/мл ампициллина, 100 мкг/мл спектиномицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола на лунку 48-луночного микротитровального планшета в форме цветка (m2plabs).
- 15 Культуры инкубировали при 37°C и 1000 об/мин в течение ночи. В основную предкультуральную среду для культур (см. «Производство ферментативного цельноклеточного биокатализатора», EX2) добавляли 1 мМ $MnCl_2$, 100 мкг/мл ампициллина, 100 мкг/мл спектиномицина, 20 мкг/мл хлорамфеникола, 1 мМ IPTG и 1% рамнозы. 1 мл полученной среды распределяли в лунку 48-луночного
- 20 микротитровального планшета в форме цветка (m2plabs) и инокулировали 10 мкл предкультуры. Основную культуру инкубировали в течение ночи при 37°C и 1000 об/мин. Затем клетки осаждали центрифугированием при 3750 xg, при 4°C в течение 15 минут и супернатант отбрасывали. Для скрининга с использованием цельных клеток осадки клеток ресуспендировали в 500 мкл 50 мМ HEPES-
- 25 буфера при значении pH 8,4, дополненного 1 мМ $MnCl_2$. В случае использования очищенных клеточных лизатов клеточные осадки ресуспендировали в 500 мкл 50 мМ HEPES-буфера со значением pH 8,4, дополненного 1 мМ $MnCl_2$, 1 мг/мл лизоцима, 0,3 мг/мл сульфата полимиксина b, 0,01 мг/мл ДНКазы, 0,01 мг/мл РНКазы и суспензию инкубировали при комнатной температуре и 1000 об/мин в
- 30 течение одного часа. Полученные клеточные лизаты очищали от дебриса центрифугированием при 3750 xg при 4°C в течение 20 мин. 50 мкл очищенного клеточного лизата или суспензии цельных клеток использовали в 200 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ соответствующего субстрата и 1 мМ $MnCl_2$ в 100 мМ HEPES при значении pH 8,4. Реакции проводили в течение ночи

при 37°C, а затем гасили TFA в конечной концентрации 5%. Осадки удаляли центрифугированием, а супернатант подвергали количественному определению аналитов с использованием ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим детектором. ВЭЖХ-МС с использованием колонки Luna C8 150x, 3,0 мм (вода +
 5 0,1% муравьиной кислоты). Температура: 40°C, скорость потока 0,5 мл/мин использовали для детектирования N-карбамоиловой кислоты, гидантоина и глюфосината самих по себе, тогда как молекулы, содержащие сложный бутиловый эфир, разделяли на колонке Kinetex C18 100x2,1 мм (скорость потока 0,5 мл/мин, 20 % ацетонитрила в воде с 0,1 % муравьиной кислоты).

10 1) Гидантоиназы подвергали скринингу с использованием цельных клеток и 10 мМ рацемического 5-([2-[этокси(метил)фосфорил]этил]имидазолидин-2,4-диона (глюфосинат гидантоин, синтез Прим. 3) или 5-([2-[бутоксид(метил)фосфорил]этил]имидазолидин-2,4-диона (сложный бутиловый эфир глюфосината гидантоина, синтез Прим. 4) в качестве субстрата.

15 Контролировали образование соответствующей N-карбамоиламинокислоты из гидантоиназы. Гидантоиназы Q45515, Q44184, A0A1C4QIY5_9ACTN, A0A0K2UMP4_LEPSM, *WP_046170519.1, и E1R8C9_SEDSS показывали выходы 2-(карбамоиламино)-4-[гидрокси(метил)фосфорил]бутановой кислоты (N-карбамоиловой кислоты глюфосината), которые составляли >0.1%.

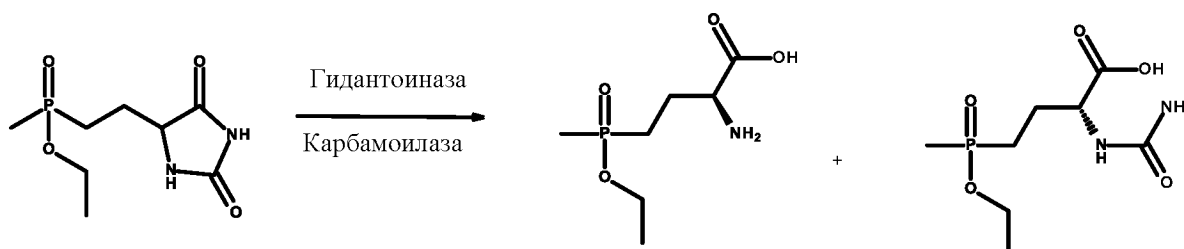
20 Гидантоиназы O69809, Q846U5_9BACL, P81006, Q84FR6_9MICC, Q56S49_9BACI, A1E351_9BACI, Q28SA7, Q45515, A0A399DRQ3_9DEIN, Q55DL0, F7X5M8_SINMM, Q9I676, Q44184, B5L363, P42084, P25995, Q3Z354, B1XEG2, Q9F465_PAEAU, A0A161KD37_9CHLR, A0A1J4XHR4_9BACT, A0A1C4QIY5_9ACTN, A0A0K2UMP4_LEPSM, A0A159Z531_9RHOB,
 25 E1R8C9_SEDSS, A0A1F9QT17_9BACT, A0A0D8IVV8_9FIRM, A0A0B5QKE4_CLOBE, A0A0N1GBZ8_9ACTN, A0A174ADZ3_9FIRM, U7V9Q6_9FUSO, A0A0J1FAI4_9FIRM, PHYDA_ECOK1, A0A0S8H576_9BACT, A0A1J4J4Y8_9EUKA, A0A0D5NFS5_9BACL, A0A0D5NNJ7_9BACL, A0A1H2AV66_9BACL, A0A0Q4RXY0_9BACL, A0A0Q7SB75_9BACL,
 30 A0A100VRN2_PAEAM, W4BDJ0_9BACL, A0A1J5E082_9DELT, A0A1H5ZFN3_9BACT, A0A1F8NMM2_9CHLR, A0A1F8SDV1_9CHLR, A0A1H1PLX0_9BACT, A0A0Q5I8X4_9DEIO, *WP_046170519.1, *WP_023514195.1, *WP_023516147.1, и *ANZ15483.1 показывали выходы 4-

[бутокс(метил)фосфорил]-2- уреидо-бутановой кислоты (N-карбамоиловой кислоты глюфосината-бутилового сложного эфира), которые составляли >0.1%.

2) Карбамоилазы подвергали скринингу с использованием очищенных клеточных лизатов и 10 mM 2-(карбамоиламино)-4-

5 [гидрокси(метил)фосфорил]бутановой кислоты (N-карбамоиловой кислоты глюфосината) или 4-[бутокс(метил)фосфорил]-2-уреидо-бутановой кислоты (N-карбамоиловой кислоты глюфосината-бутилового сложного эфира) в качестве субстрата. Отслеживали образование глюфосината или бутилового сложного эфира глюфосината. Карбамоилазы A0A3E0C996_9BURK,
 10 A0A535Y1H2_9CHLR, A0A6P2ISL4_BURL3, и A0A1Y4GC62_9BACT показывали выходы глюфосината >0.1%. Карбамоилазы A0A0K9YX84_9BACL, E3HUL6_ACHXA, Q9F464, A0A4D7Q548_GEOKU, Q9F464, A0A2S9D976_9MICC, A0A3E0C996_9BURK, A0A535Y1H2_9CHLR, A0A6P2ISL4_BURL3, и A0A1Y4GC62_9BACT показывали выходы бутилового
 15 сложного эфира глюфосината >0.1%

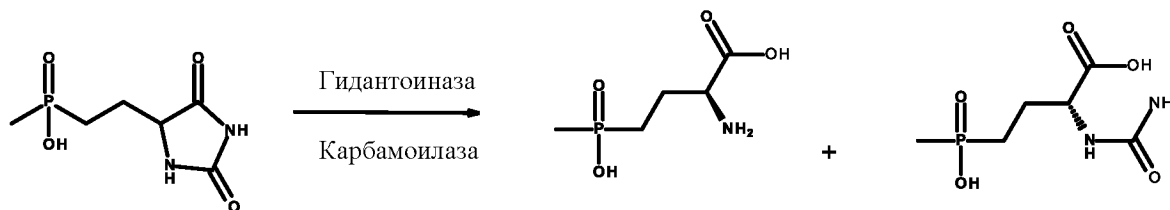
h) Ферментативная каскадная реакция в небольшом масштабе (Прим. 18)



Лиофилизированные бесклеточные экстракты растворяли в 1 M буфере
 20 HEPES при значении pH 8,4. Реакции проводили в масштабе 400 мкл в 1 M HEPES-буфере при значении pH 8,4, содержащем 75 mM MnCl₂ и 100 mM рацемического 5-[2-[этокс(метил)фосфорил]этил]имидазолидин-2,4-диона. Реакции инициировали путем добавления гидантоиназы Q44184 (SEQ ID 7) и карбамоилазы A0A535Y1H2_9CHLR (SEQ ID 4) при конечной концентрации 19
 25 мг/мл и 7,3 мг/мл соответственно. Затем реакции инкубировали при 37°C в течение 24 часов, а затем останавливали нагреванием до 95°C в течение 5 минут. Осадки удаляли центрифугированием, супернатант 100-кратно разбавляли и подвергали количественному определению аналитов с использованием хиральной ВЭЖХ, в сочетании с масс-спектрометрическим детектором. Выход

реакции для сложного этилового эфира глюфосината составлял 22,3% с энантиомерным соотношением L>99%, D>1%.

i) Ферментативный 1-стадийный синтез глюфосината из N-карбамоиламинокислоты (Прим. 19, SEQ ID NO:1+3)



5

К раствору 2-(2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)этилметилфосфиновой кислоты (7,3 г) в 30 мл водн. аммиака (2М) добавляли водн. аммиак (25% в воде) для установления рН на значение 8,0. К этой смеси добавляли раствор $MnCl_2$ (2М в воде, 1 мл), фермент гидантоиназу (Uniprot ID:A0A159Z531_9RHOB, SEQ ID NO:1, лиофилизированный очищенный клеточный лизат, 1,2 г) и фермент гидролазу N-карбамоиламинокислоты (Uniprot ID: A0A6P2ISL4_BURL3, очищенный клеточный лизат, 2,8 мл, концентрация общего белка 44 мг/мл). Реакционную смесь перемешивали при 37°C в течение 44 часов. По истечении общего времени реакции 4 ч добавляли фермент гидролазу N-карбамоиламинокислоты (A0A6P2ISL4_BURL3, 2,8 мл), а по истечении общего времени реакции 23 часа его добавляли снова (A0A6P2ISL4_BURL3, 11,2 мл). Через 44 часа 83% гидантоина превращались в N-карбамоиламинокислоту, а 10% - в глюфосинат, согласно измерению ЯМР. Аналитика хиральной ВЭЖХ показала энантиомерное соотношение L-глюфосинат:D-глюфосинат 92:8. Соотношение между L- и D-глюфосинатом определяли с помощью ВЭЖХ-МС с использованием Supelco Chirobiotic T2 (элюент: 40% воды в ацетонитриле, 0,1% муравьиной кислоты). Температура: 20°C, скорость потока 0,8 мл/мин. Время удержания L-глюфосината (6,8 мин) : D-глюфосината (7,4 мин). Оставшуюся карбамоиламинокислоту можно переработать с помощью Прим. 6.

25

SEQ ID NO:1 (из *DeFluviimonas alba*)

MTLIVTNGRVVSPEGVALRDVVVEGETIAAVLPAGEAVKACPGAVIDAT
GRIVIPGGVDPHVHLLVGFMGQRSVYDFASGGIAALRGGTTAIVDFALQRRGGS
MLKGLAHRRKQADANVTLDYGLHLIVTDVTADTLAELPALRAAGVTTLKVYT
VYEEDGLKVEDGALFALMQGAARHGLSVVLHAENAGIVERLRAEAVARGDTH

30

PRHHALTRPPIVEIEAVSRAIAFSRATGCGVHILHLVAADAIALVAAARAEGLPV
 TAETCSHYLALTDEALERPNGHEFILSPPLRDKANQDRLWKGLETAALSLVASD
 EVSYSAAAKAMGLPSFATVANGITGIEARLPLLYTLGVDQGRIGLQRFVKLFST
 WPAEIFGFAGKGRIAPGFDADLVLIDPDGRRVISTSDYGDIGYTPYAGMELTGF
 5 ATETIYRGRLVVRDGVFLGTEGQGRFIERVAPRRPAP

SEQ ID NO:2 (из *Cloacibacillus sp. An23*)

MNCVNDILRSIGKAGRNEDGSYTRACYSAEYFAAVDITEKLMREYGMETS
 RDAAGNLHGVLPGTEPGLKSIIGSHLDTVPEGGLFDGAYGVAGGLEVVRRLKE
 EGRRPRHTIELYGFNAEESSPLGGTFGSRAVTGLVSPEQPGLAEALKSYGHTVEE
 10 IMGCRDFSDAKCYLELHIEQGDYLFSEGQKIGVVSGIVGVIRYKVTALGHSNH
 AGTTMMKNRRDAMVAMARLITEADRRRCRAIDDRLVLTVGTIKCWPGSENVIPG
 KVECSFEMRHMDKAKTDELIREIREIAENIATVEFEIVNMIDKGAVSCDAHLMD
 VICEAAEEAGESHVVMPSGAGHDANPMAHRVPIGMIFVPSKDGMSHCPEEWD
 SEETAAGAEVLYRTVLALDAED

15 SEQ ID NO:3 (из *Burkholderia lata*)

MNPTDFPFPPLNAERLNARVEQLARFTRPDVPWTRRAFSPFTEARAWLA
 AQFAEAGLAVSMDAGGNLIGRREGSGRCKPLVTGSHCDTVVGGGRFDGIIGV
 LAGIEVAHTLNEQGIVLDHPFEVIDFLSEEPSDYGISCVGSRALSGVLDAGMLRA
 TNAEGETLAEALRRIGGNPDALREPLRAPGSTAAFVELHIEQGPVLETRGLPIGV
 20 VTNIVGIRRVLITVTGQPDHAGTTPMDIRRDALVGAAHLIEAAHARASALSGNP
 HYVVATIGRIAMTPNVPNAVPGQVELMLEVRSDDAVLDAFPEALLAGAAARL
 DALRLSARAEHVSRRARPTDCQPLVMDAVEQAATQLGYPSMRLPSGAGHDAVY
 VAPTGPIMIFIPCLGGRSHCPEEWIEPQQLLDGTRVLYQTLVALDRSLAGAA

SEQ ID NO:4 (из *Chloroflexi bacterium*)

25 MTDAAARLERRIHEL AQIGRTDDPAREIYATAVSRLGLSAEEQRARDLVT
 CAPHGATARRDPAANLYLRFPGADPHAPVVLVGSHLDSVPMGGFRFDGALGVC
 CAVEAVVSLLESGARFARPVEVVGWADEEGARFGYGLFGSAAAFGRLRVDPER
 VRDKGGTSIAEALRALGESGDLAGAMRDPKGIRAYLELHIEQGPRLERAGAPLG
 VVSDIVGIFHGLVMVRGEQNHAGATVMGERHDALVAASHMIIALERIASSVPDA
 30 VATVGEITVKPGAKNVIPGECTFSLDIRAPKQESIDLVLERFKAEANEIFRKSRE
 WGLRPLQSVAVTPLDEDLRDLLWKSAMSVGNAPTLVSGAGHDAQNPSLAGV
 PTGMIFVRSSTGGSHTPTEFAATAALGAKALEIAIRELATA

SEQ ID NO: 5 (из *Rhizobium radiobacter (Agrobacterium tumefaciens)*)

MHIRLINPNSTASMTAQALDSALRVKQKDTHTVSAANPVDTPVSIEGQADEAMA

VPGLLAEIRKGEHGVDAYVIACFDDPGLHAAREVARGPVGICQAAVQVAMTI
 SRRFSIITTLPRSIPIIEDLVEDYGAQRYCRKVRAIDLPLVGLLEEDPEVAEALLRRE
 IEAAKREDAEAEAILGCAGMSSLCDRLRDATGVPVIDGVTAAIKLAEALVGAGY
 TTSKVNAYDYPRVKGPALVACA

5 SEQ ID NO:6 (*Yoonia sediminilitoris*)

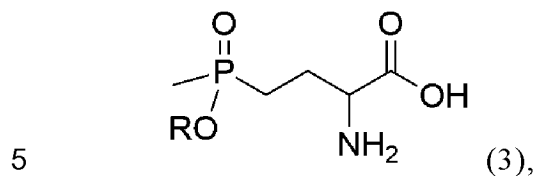
MSALIIINPNSSQTVTDGIDAAVAPLRSFGTPIRCLTLAEGPPGIESQKQADLTVAP
 MLKLAAEQADAAGYVIACFGDPGLHALRDQTHLPVVGIQEAAVMTALTLGQRF
 GVIAIMPGSIPRHLRAFGAMSVLDRLAGDRALGLGVADLADPDRSLAAMIATGK
 RLRDEDGAHVLMGCAGMAHYRPTLETETGLPVVEPCQAATAMVLGHIALGQS
 10 HRRDQN

SEQ ID NO:7 (*Rhizobium radiobacter*) (*Agrobacterium tumefaciens*)
 (*Agrobacterium radiobacter*)

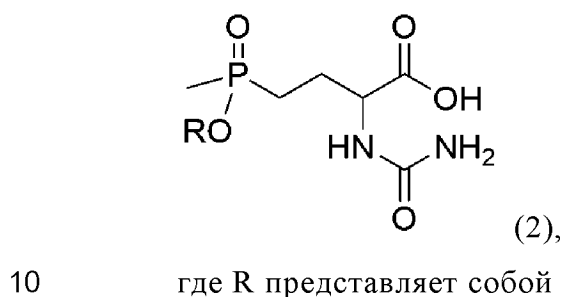
MDIIKNGTIVTADGISPADLGIKDGKIAQIGGTFGPAGRTIDASGRYVFPGG
 IDVHTHVETVSFNTQSADTFATATVAAACGGTTTIVDFCQQDRGHSLREAVAK
 15 WDGMAAGGKSAIDYGYHIIVLDPTDSVIEELEVLPLDLGITSFKVFMA YRGMNMID
 DVTLLRTLDKAAKTGSLVMVHAENGDAADYLRDKFVADGKTAPIYHALSRPPR
 VEAEATARALALAEIVNAPIYIVHLTCEESFDELMRAKARGVHALAETCTQYLY
 LTKDDLERPDEFEGAKYVFTPPPRTKKDQEILWNALRNGVLETVSSDHCSWLFEG
 HKDRGRNDFRAIPNGAPGVEERLMMVYQGVNEGRISLTQFVELVATRPAKVFG
 20 MFPEKGTVAVGSDADIVLWDPEAEMVIEQSAMHNAMDYSSYEGHKIKGVPKT
 VLLRGKVIVDEGTYVGAPTDGQFRKRRKYKQ

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

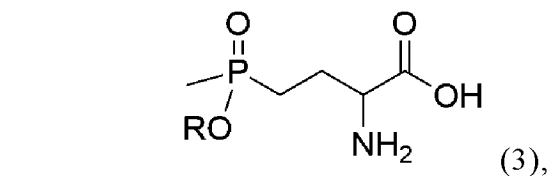
1. Способ получения глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, который включает стадию ферментативного отщепления карбамоильного фрагмента N-карбамоиламинокислоты формулы (2)

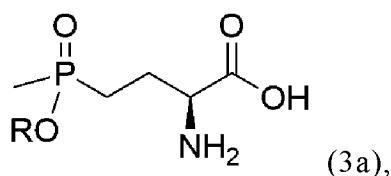


2. Способ по п. 1, где стадия отщепления обеспечивает глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C1-C8алкил, более предпочтительно H или C2-C4алкил, даже более предпочтительно H, этил, или бутил, и в частности H.

20 3. Способ по п. 1 или 2, где стадия отщепления обеспечивает глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3), в форме рацемической смеси или в форме энантиомерного избытка L-глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3а)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, предпочтительно H или C1-C8алкил, более предпочтительно H или C2-C4алкил, даже более предпочтительно H, этил, или бутил, и в частности H; предпочтительно в форме энантиомерного избытка L-глюфосината, его сложного алкилового эфира или его солей, который имеет формулу (3a).

4. Способ по любому из пп. 1 - 3, где по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, и в частности по меньшей мере 80% N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2), превращают в L-глюфосинат, его сложный алкиловый эфир или его соли, который имеет формулу (3a), где формула (3a) имеет значения, указанные в п. 3.

5. Способ по любому из пп. 1 - 4, где отщепление осуществляют с помощью фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, предпочтительно фермента гидролазы L-N-карбамоиламинокислоты.

6. Способ по любому из предшествующих пп. 1 - 5, где стадию отщепления осуществляют с помощью фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, который выбран из группы ферментов, идентифицированных по их идентификатору Uniprot, которая состоит из следующих: A0A0K9YX84_9BACL и его варианты, E3HUL6_ACHXA и его варианты, Q9F464 и его варианты, A0A4D7Q548_GEOKU и его варианты, Q9F464 и его варианты, A0A2S9D976_9MICC и его варианты, A0A3E0C996_9BURK и его варианты, A0A535Y1H2_9CHLR и его варианты, A0A6P2ISL4_BURL3 (SEQ ID NO:3) и его варианты, A0A1Y4GC62_9BACT (SEQ ID NO:2) и его варианты, где варианты определены как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95% идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности, предпочтительно выбран из группы ферментов, идентифицированных по их идентификатору Uniprot, которая

состоит из следующих: A0A3E0C996_9BURK и его варианты, A0A535Y1H2_9CHLR и его варианты, A0A6P2ISL4_BURL3 (SEQ ID NO:3) и его варианты, A0A1Y4GC62_9BACT (SEQ ID NO:2), где варианты определены как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95%, идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности, предпочтительно с помощью фермента гидролазы N-карбамоиламинокислоты, который выбран из группы ферментов, идентифицированных по их идентификатору Uniprot, которая состоит из следующих: A0A1Y4GC62_9BACT (SEQ ID NO:2) и его варианты, A0A6P2ISL4_BURL3 (SEQ ID NO:3) и его варианты, и их смеси, где варианты определены как полипептидные последовательности с по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90%, и наиболее предпочтительно 95%, идентичностью последовательности к соответствующей полипептидной последовательности.

7. Способ по любому из пп. 1 - 6, где R в формулах (2) и (3) представляет собой H или C1-Сбалкил, предпочтительно H или C2-С4алкил, более предпочтительно H, этил, или бутил, и в частности H.

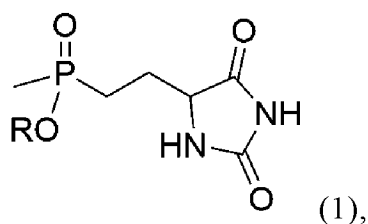
8. Способ по любому из пп. 1 - 7, где стадию отщепления осуществляют при значении pH 6 - 11, предпочтительно 6.5 - 10, более предпочтительно 7 - 9.5, и в частности 7.5 - 9 и/или при температуре 20 - 50 °C, предпочтительно 25 - 45 °C, более предпочтительно 30 - 42 °C, и в частности 32 - 40 °C.

9. Способ по любому из пп. 1 - 8, где R в формулах (2) и (3) представляет собой C1-С8алкил, предпочтительно C1-Сбалкил, более предпочтительно C2-С4алкил, даже более предпочтительно этил или бутил, и в частности этил, и где способ дополнительно включает стадию

с) снятия защиты в кислотных условиях, предпочтительно с использованием соляной кислоты или серной кислоты.

10. Способ по любому из пп. 1 - 9, где способ дополнительно включает добавление фермента рацемазы N-карбамоиламинокислоты.

11. Способ по любому из пп. 1 - 10, где N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2), обеспечивают с помощью предшествующей стадии гидролиза, которая включает гидролиз гидантоина, который имеет формулу (1)

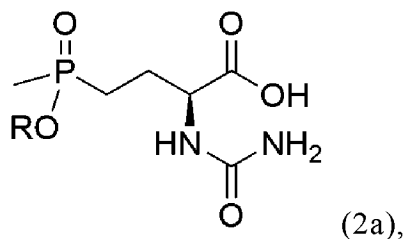


5 где R представляет собой H или C1-C8алкил, с образованием N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2), который предпочтительно осуществляют в ферментативных условиях.

10 12. Способ по любому из пп. 1 - 11, где N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2), обеспечивают с помощью предшествующей стадии гидролиза, где гидролиз гидантоина, который имеет формулу (1), осуществляют с помощью фермента гидантоиназы, предпочтительно где способ дополнительно включает добавление фермента гидантоин рацемазы.

15 13. Способ по любому из пп. 11 или 12, где стадию гидролиза и стадию отщепления осуществляют в одной емкости, предпочтительно где все реагенты в основном добавляют в начале реакции, или где реагенты для стадии гидролиза и реагенты для стадии отщепления добавляют в одну емкость в разное время.

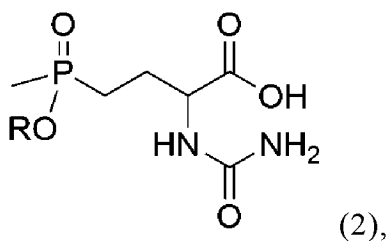
20 14. Композиция, которая содержит N-карбамоиламинокислоту, которая имеет формулу (2a)



где R представляет собой H или C1-C8алкил, и L-глюфосинат или его соли.

15. Способ селективной борьбы с сорняками на участке, предпочтительно содержащем урожай высеянных семян или сельскохозяйственных культур, устойчивых к глюфосинату, который включает:

5 нанесение на участок эффективного количества композиции, которая содержит L-глюфосинат или его соли в процентном энантиомерном отношении по меньшей мере 80% относительно D-глюфосината или его солей, и от более чем 0.01 масс.% до менее чем 10 масс.%, в пересчете на общее количество композиции, N-карбамоиламинокислоты, которая имеет формулу (2)



10 где R представляет собой H или C1-C8алкил.