

EMPLOI DES TRISACRYLS DANS LA PREPARATION DE NOUVEAUX DERIVES  
INSOLUBLES DE LA TRYPSINE ET DE LA CHYMOTRYPSINE

Eric BROWN, M. LORiot et J. TOUET

Laboratoire de Synthèse Totale de Produits Naturels - ERA N° 394

Route de Laval -BP 535 - 72017-LE MANS CEDEX

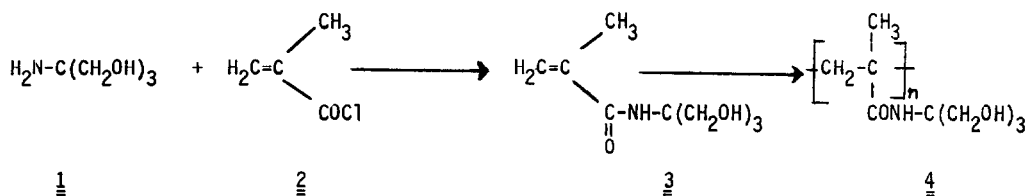
(Received in France 9 August 1974; received in UK for publication 23 December 1974)

De nouveaux dérivés insolubles de la trypsine et de la chymotrypsine ont été préparés dans notre laboratoire (1 à 3), en utilisant comme supports macromoléculaires des polyméthacrylates d' $\omega$ -iodo-n-alcyle (Poliodals) et des polyméthacrylates de vanilline (Vanacryls).

Il est probable que l'activité résiduelle spécifique relativement faible observée pour les enzymes ainsi immobilisées est due au fait que les supports utilisés n'étaient pas suffisamment hydrophiles. De la nature hydrophobe du support résulterait une dénaturation partielle de l'enzyme fixée et un faible contact entre celle-ci et le substrat en solution aqueuse.

Nous avons donc cherché à synthétiser un nouveau type de polyol très hydrophile susceptible de propriétés voisines de celles des polysaccharides (tels que l'agarose ou le séphadex) tout en étant plus économique et plus stable chimiquement et biologiquement. L'immobilisation de la trypsine ou de la chymotrypsine sur un tel polyol peut être réalisée à l'aide d'un agent bifonctionnel classique, tel que le glutaraldéhyde ou le bromure de cyanogène (4 à 6).

En traitant le tris (hydroxyméthyl) amino méthane 1 commercial par le chlorure de méthacryloyle 2, on isole la N-tris (hydroxyméthyl) méthyl méthacrylamide 3 (F = 89-90°, CHCl<sub>3</sub>) avec un rendement de 63 %.



Le monomère 3 est polymérisé en solution aqueuse par voie radicalaire (azobis-isobutyronitrile) en présence de réticulants tels que la N,N'éthylène bis-méthacrylamide ou la N,N'méthylène bis-acrylamide. On obtient ainsi des polymères réticulés tridimensionnels, les Trisacryl-M 4. Les polymères sont obtenus sous forme de gels insolubles qui sont centrifugés, lavés à l'eau distillée puis lyophilisés.

Nous avons également synthétisé le Trisacryl-H 6, analogue acrylique du Trisacryl-M par aminolyse du polyacrylate de méthyle 5, en présence d'un excès d'aminoalcool 1 dans l'éther monométhyle de l'éthylèneglycol, et en présence d'hexaméthylène diamine (HMD) (réticulant). On obtient le polyol 6 sous forme d'un gel très hydrophile qui est lavé à l'eau, centrifugé puis lyophilisé. Le spectre IR du Trisacryl-H montre que l'aminolyse des fonctions esters de 5

n'est pas complète puisque l'on observe une bande C=O ester à  $1725\text{ cm}^{-1}$ .

L'immobilisation de la trypsine sur les Trisacryl-M ou les Trisacryl-H (activés par le glutaraldéhyde ou le BrCN) a été effectuée à  $4^\circ$  dans le tampon borate pH 7,8 ou dans le tampon phosphate 0,2 M pH 7,8. Dans le tableau ci-dessous, le taux de fixation de l'enzyme sur le support est donné en mg par gramme de polymère. L'activité trypsique des dérivés a été mesurée avec un pH-stat à pH 8 à  $25^\circ$  par titrage à la soude 0,1 N de l'acide libéré par hydrolyse enzymatique du BAEE (7). L'activité enzymatique spécifique résiduelle (AER) de l'enzyme fixée est déterminée par rapport à une solution étalon de trypsine.

Support	Mode d'activation	Masse d'enzyme fixée (mg/g de support)	% d'Enzyme fixée	AER (%)
Trisacryl-M	glutaraldéhyde	56 à 64	56 à 64	12 à 14
Trisacryl-H	glutaraldéhyde	8 à 22	8 à 22	30 à 60
Trisacryl-H	BrCN	36 à 64	36 à 64	49 à 70

L'immobilisation de la chymotrypsine- $\alpha$  sur le Trisacryl-H activé par BrCN est conduite dans le tampon borax 0,1 M pH 8 pendant 24 h à  $4^\circ$ . L'activité chymotrypsique du dérivé insoluble a été mesurée à pH 8 par titrage à la soude 0,1 N de l'acide libéré par hydrolyse enzymatique de l'ATEE (8). L'AER de l'enzyme fixée est déterminée de la même façon que précédemment. Le taux de fixation observé est de 45 mg par gramme de support pour une AER spécifique de 40 %.

En conclusion, l'emploi des Trisacryls dans l'immobilisation de la trypsine et de la chymotrypsine- $\alpha$  permet d'atteindre des valeurs élevées pour les taux de fixation et pour les activités résiduelles spécifiques. Ainsi, l'immobilisation de la trypsine et de la chymotrypsine sur le Trisacryl-H a fourni des dérivés dont les activités enzymatiques sont bien supérieures à celles observées dans notre laboratoire avec d'autres supports synthétiques moins hydrophiles que les Trisacryl-H (1 à 3).

#### B I B L I O G R A P H I E

- 1.- E. BROWN, A. RACOIS et H. GUENIFFEY, Bull. Soc. Chim. Fr., 1971, (12), 4341.
- 2.- E. BROWN et A. RACOIS, Bull. Soc. Chim. Fr., 1971, (12), 4351,4357.
- 3.- E. BROWN et A. RACOIS, Tetrahedron, 1974, 30, 675 et 682.
- 4.- K. MOSBACH, Sci. Amer., 1971, 224, (3), 26.
- 5.- R. AXEN, P. MYRIN et J.V. JANSON, Biopolymers, 1970 (9), 401.
- 6.- R. AXEN, J.O. PORATH et S. ERNBACK, Nature, 1967, 214, 1302.
- 7.- A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1963, 238, 1689.
- 8.- G. KAY et M.D. LILLY, Biochim. Biophys. Acta, 1970, 198, 276.