

IMMOBILISATION DE LA TRYPSINE PREALABLEMENT  
PROTEGEE PAR UN INHIBITEUR MACROMOLECULAIRE SYNTHETIQUE

Eric BROWN et André RACOIS

(Laboratoire de Synthèse Totale de Produits Naturels, ERA 394,  
Faculté des Sciences, Route de Laval, B.P. 535, 72017 LE MANS)

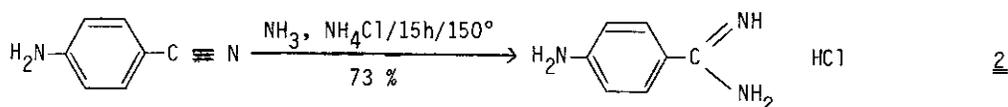
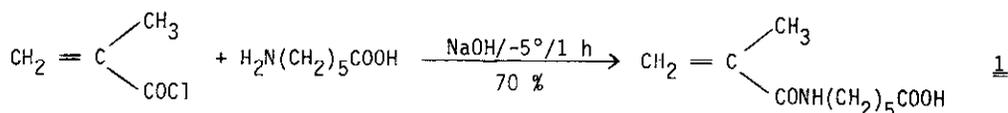
(Received in France 14 June 1976; received in UK for publication 27 July 1976)

Le greffage direct par liaison covalente d'une enzyme sur un support macromoléculaire insoluble entraîne généralement une perte d'activité enzymatique plus ou moins grande (1). Si le centre actif de l'enzyme est préalablement protégé par un inhibiteur réversible de petite masse moléculaire, la dénaturation peut être diminuée sans être pour autant totalement supprimée (2). La perte d'activité enzymatique ainsi observée pourrait bien être due en grande partie au fait que l'enzyme se fixe sur son support par des fonctions réactives plus ou moins proches de son centre actif, dénaturant ainsi ce dernier, ou empêchant tout au moins l'approche du substrat, même quand celui-ci est de petite taille.

Nous avons pensé protéger la trypsine par un inhibiteur hydrosoluble macromoléculaire à groupement benzamidine (3), afin que lors de l'immobilisation ultérieure, la molécule enzymatique ne puisse réagir avec son support insoluble que par des groupements fonctionnels ( $\text{NH}_2$ , vraisemblablement) relativement éloignés du site actif. La réaction de fixation de l'enzyme sur son support étant effectuée, il ne resterait théoriquement plus qu'à enlever l'inhibiteur macromoléculaire protecteur pour obtenir une enzyme immobilisée dotée d'une activité résiduelle élevée. Le principe de cette méthode est illustré par le schéma général ci-joint.

Synthèse de l'inhibiteur macromoléculaire hydrosoluble

Cette synthèse a été réalisée de la manière suivante :







Nous avons également constaté que la protection par le polyinhibiteur 5 permet d'obtenir des dérivés insolubles trypsine/VINAC trois à quatre fois plus actifs vis-à-vis d'un substrat de grande masse moléculaire, tel que l'hémoglobine. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Dérivé Trypsine/VINAC	AER (%)
obtenu sans protection	41 (BAEE) et 12 (hémoglobine)
obtenu après protection	85 (BAEE) et 46 (hémoglobine)

Un dosage du nombre de sites actifs par molécule de trypsine (6) a montré que l'enzyme immobilisée sur le VINAC, après protection par le polyinhibiteur, était très peu dénaturée :

Substance active	Nombre de sites actifs
trypsine native	0,64
dérivé insoluble obtenu sans protection	0,3
dérivé insoluble obtenu avec protection	0,8

En conclusion, ces premiers résultats que nous venons de décrire sont encourageants et semblent confirmer de façon indiscutable le schéma général précédent, à savoir que le polyinhibiteur 5 intervient pour protéger la région de l'enzyme qui abrite le site actif.

A l'heure actuelle, nous nous efforçons d'affiner et de généraliser cette méthode d'immobilisation des enzymes que nous croyons être les premiers à utiliser.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1) E. BROWN et A. RACOIS, Bull. Soc. Chim. Fr., 1974, p. 743.
- 2) L. GOLDSTEIN, M. PECHT, S. BLUMBERG, D. ATLAS et Y. LEVIN, Biochemistry, 1970, 9, 2322.
- 3) B.R. BAKER et E.H. ERICKSON, J. Med. Chem., 1968, 11, 245.
- 4) E. BROWN, M. LORIOT et J. TOUET, Tetrahedron Letters, 1975, p. 357.
- 5) E. BROWN et A. RACOIS, Travaux non publiés.
- 6) S.P. COLOWICK et N.O. KAPLAN, Methods Enzymol., 1970, 19, 20.