

31. Structure cristalline d'une thiazolorifamycine: rifamycine P

par Jean-Michel Léger et Alain Carpy*

Laboratoire de Chimie Analytique, URA 605 CNRS, UFR des Sciences Pharmaceutiques,
Université de Bordeaux II, 3 Place de la Victoire, F-33076 Bordeaux Cedex

(17.XII.90)

Crystal Structure of a Thiazolorifamycine: Rifamycin P

The crystal structure of a natural thiazolorifamycin, rifamycin P, as an adduct with EtOH and H₂O, has been determined by X-ray crystallography by a combination of direct methods and *Patterson* techniques. Block-diagonal least-squares refinement using 5996 independent reflections and 1475 parameters led to an *R* factor of 0.092 (two independent molecules of rifamycin P). The middle part of the ansa chain, essential for activity against the bacterial DNA-dependent RNA polymerase (DDRP) resembles that of active rifamycins. The four OH groups lie on the same side of the molecule and are almost in the same plane. Interatomic distances between the O-atoms agree well with a spatial model derived from X-ray studies, performed on semisynthetic active rifamycins.

Introduction. – Les rifamycines sont des métabolites secondaires synthétisées par un microorganisme *Nocardia mediterranea* (longtemps considéré comme appartenant au genre *Streptomyces*). Dans les conditions normales de fermentation, on obtient un

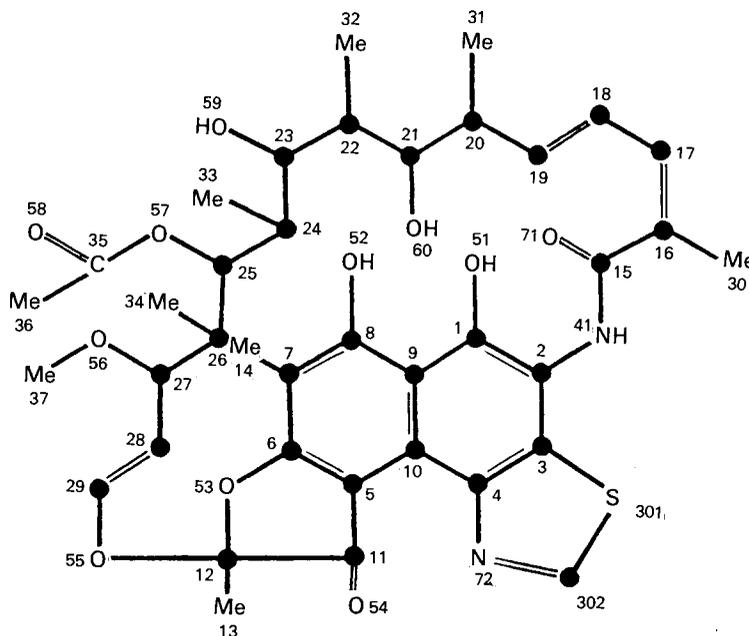


Fig. 1. Numérotation atomique

mélange complexe de substances. L'une d'entre elles, la rifamycine B, est la seule qui soit produite industriellement par cette voie [1]. Des substances apparentées, les tolypomycines et les halomycines ont été isolées à partir de *Streptomyces tolypophorus* et *Micromonospora halophytica* respectivement [2]. Enfin des centaines de rifamycines hémisynthétiques ont été obtenues par modification de la structure de la rifamycine B.

Les thiazolorifamycines sont isolées par fermentation, mais elles peuvent aussi être obtenues par voie chimique [3] [4]. La rifamycine P est l'une d'entre elles. Elle est active *in vitro* et *in vivo*. C'est l'ansamycine naturelle la plus active isolée à ce jour.

Malgré tout, seules quatre rifamycines (rifamycine SV, rifamide, rifampicine, rifaximine) ont trouvé place en thérapeutique en tant qu'antibiotiques, principalement dans des cas de tuberculose ou d'infections intestinales. D'autres comme la rifabutine sont en phase III de l'étude clinique aux USA dans des cas d'infections opportunistes par le complexe *Mycobacterium avium* qui apparaissent chez 40% des malades atteints du SIDA [5].

Un certain nombre de structures cristallines de rifamycines a déjà été déterminé [6–13]. Ce travail est relatif à celle de la rifamycine P (fig. 1).

Expérimentale. – Des cristaux jaunes ont été obtenus par évaporation lente d'une soln. d'EtOH à 293 K; ils sont instables à l'air. Les données cristallographiques sont les suivantes: $C_{38}H_{46}N_2O_{11}S_2 \cdot 3C_2H_5OH \cdot H_2O$, $M_r = 1633,9$, symétrie orthorhombique; groupe spatial $P2_12_12_1$, $a = 37,089(11)$, $b = 15,546(5)$, $c = 14,892(5)$ Å, $V = 8586(7)$ Å³, $Z = 4$ (2 molécules indépendantes de rifamycine P), $D_x = 1,26$ g·cm⁻³, $F(000) = 3488$, $CuK\alpha$, $\lambda = 1,54178$ Å, $\mu = 9,33$ cm⁻¹. Le cristal étudié, de forme prismatique, de dimensions 0,3 × 0,09 × 0,09 mm a été monté dans un tube de Lindemann scellé. Les intensités ont été collectées à 213 K à l'aide d'un diffractomètre automatique *Enraf-Nonius CAD-4* utilisant la radiation $CuK\alpha$ et un monochromateur en graphite jusqu'à $\theta = 60^\circ$ (balayage $\omega/2\theta$). Les paramètres de la maille ont été affinés par moindres carrés à partir des valeurs de θ de 25 réflexions de l'espace. Aucune variation d'intensité de deux réflexions standards mesurées toutes les 90 min n'a été observée pendant la collection des données; 5996 réflexions indépendantes mesurées ont été incluses dans les affinements. Les intensités ont été corrigées par le facteur de Lorentz-polarisation mais pas pour l'absorption. La structure a été déterminée en combinant les résultats des méthodes directes données par MULTAN 80 [14] et ceux donnés par l'étude de la fonction de Patterson. Les facteurs de diffusion provenaient des tables internationales de radiocristallographie [15]. La solution retenue par les méthodes directes faisait apparaître tous les cycles des deux molécules indépendantes de rifamycine P. Cependant les positions des atomes de S ne coïncidaient pas avec celles trouvées sur les sections de Patterson. Après translation des deux molécules, amenant les atomes de S en position correcte, un calcul de facteurs de structure donnait un facteur $R = 0,45$. A ce stade de la résolution, des sections de Fourier ont révélé les positions des groupements propionates et acétates. L'affinement des coordonnées de 104 atomes non-H affectés de facteurs de température isotrope conduisait à un facteur résiduel $R = 0,23$. De nouvelles sections de Fourier indiquaient alors la présence dans la maille de trois molécules d'EtOH et d'une molécule d'H₂O. Après cinq cycles d'affinement sur tous les atomes non-H affectés de facteurs d'agitation thermique anisotrope, le facteur R atteignait la valeur 0,12. Après introduction des atomes d'H en positions théoriques, affectés de facteurs

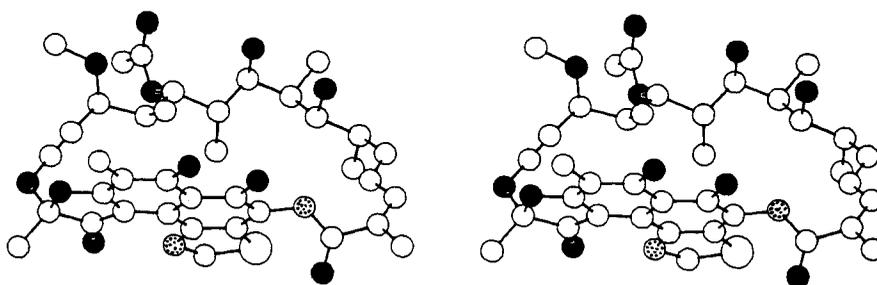


Fig. 2. Vue stéréoscopique de la molécule A

d'agitation thermique isotrope, un dernier cycle d'affinement conduisait à un facteur $R = 0,092$. Cette valeur relativement élevée du facteur R peut être due à plusieurs raisons dont la qualité moyenne du cristal, endommagé lors de sa mise en tube scellé et le nombre important de paramètres affinés (1475) comparé au nombre de réflexions utilisées pour l'affinement (5996). Un *Fourier*-différence final ne faisait apparaître que des pics inférieurs à $0,5 \text{ e} \cdot \text{Å}^{-3}$. Les tableaux des positions finales des atomes ainsi que de leurs facteurs d'agitation thermique isotrope équivalents sont déposés auprès du *Cambridge Crystallographic Data Center*. Une vue stéréoscopique de la molécule A est représentée sur la *fig. 2*.

Discussion. – Les valeurs des distances (écart-type max. $0,018 \text{ Å}$) et des angles interatomiques (écart-type max. $0,9^\circ$) sont conformes aux valeurs attendues et sont comparables à celles trouvées dans les autres rifamycines en ce qui concerne la partie commune [6–13]. La différence de conformations entre les molécules A et B est illustrée sur la *fig. 3*. L'écart le plus important (20°) se situe au niveau de l'angle de torsion $C(28)–C(29)–O(55)–C(12) - 59$ et -39° respectivement. Les deux angles de torsion

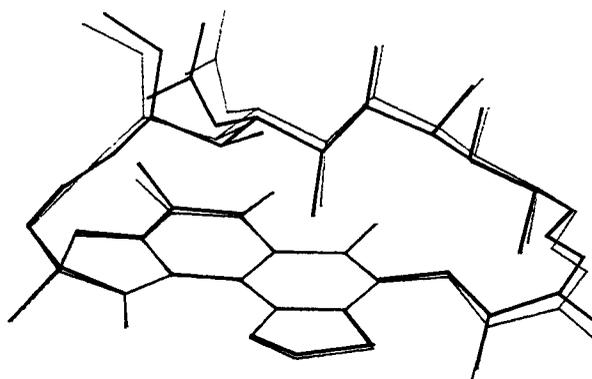


Fig. 3. Superposition des molécules A (gras) et B

définissant l'orientation de la chaîne ansa par rapport au groupement naphthoquinone sont $C(1)–C(2)–N(41)–C(15) = 133$ et 144° et $O(53)–C(12)–O(55)–C(29) = 89$ et 75° , respectivement. La partie linéaire centrale de la chaîne ansa (de $C(22)$ à $C(28)$) fait un angle d'environ 90° avec le plan contenant le chromophore.

Le mécanisme d'action des rifamycines consiste en l'inhibition spécifique de l'ARN polymérase bactérienne, ADN dépendante [16]. Il a été montré que la présence et la position spatiale des quatre groupements hydroxyles $OH(51)$, $OH(52)$, $OH(59)$ et $OH(60)$, étaient cruciales pour l'activité [17]. Dans le cas présent, comme trouvé par

Tab. 1. Distances ($\pm 0,02 \text{ Å}$) entre $O(51)$, $O(52)$, $O(59)$ et $O(60)$ dans les deux molécules A et B, comparées aux distances moyennes équivalentes dans des molécules actives et inactives

| | Molécule A | Molécule B | Active | Inactive |
|---------------|------------|------------|--------|----------|
| $O(51)–O(52)$ | 2,47 | 2,41 | 2,5 | 2,5 |
| $O(52)–O(59)$ | 7,86 | 8,35 | 7,9 | 4,5 |
| $O(59)–O(60)$ | 2,69 | 2,73 | 2,7 | 2,3 |
| $O(60)–O(51)$ | 5,97 | 6,43 | 6,2 | 4,0 |
| $O(51)–O(59)$ | 6,92 | 7,49 | 7,1 | 5,7 |
| $O(52)–O(60)$ | 7,68 | 8,00 | 7,7 | 3,8 |

ailleurs, ces quatre groupements pointent du même côté de la molécule. Les quatre atomes d'O sont situés sensiblement dans un plan (écart max. 0,14 Å pour O(51) dans les deux molécules A et B) orienté à environ 60° par rapport au plan contenant le chromophore. La *tab. 1* compare les distances spatiales entre les quatre atomes d'O avec les moyennes des distances observées dans les molécules actives et inactives (déduites de [12]). Les résultats observés confirment que la rifamycine P entre bien dans le modèle géométrique des molécules actives.

Les principales liaisons H intra- et intermoléculaires représentées sur la *fig. 4*, sont rassemblées dans la *tab. 2*.

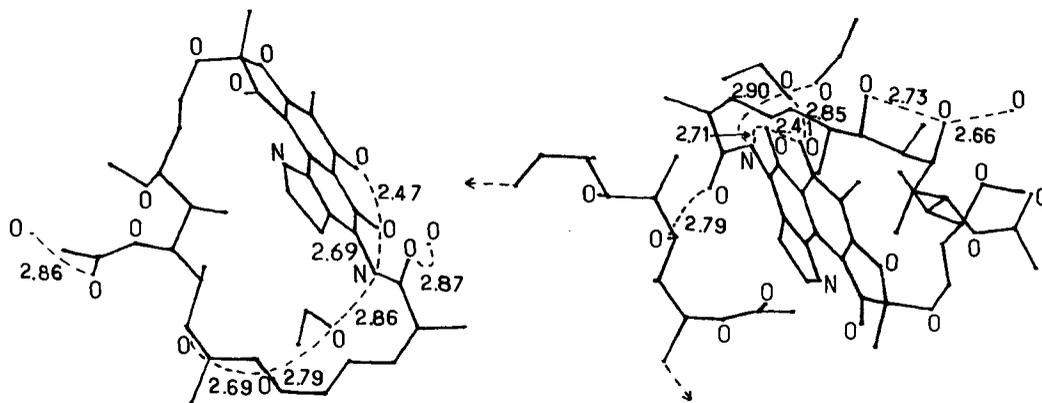


Fig. 4. Principales liaisons intra- et intermoléculaires ($< 2,90 \pm 0,02$ Å)

Tab. 2. Principales distances intra- et intermoléculaires ($< 2,90 \pm 0,02$ Å)^{a)}. Code de symétrie: (I) x, y, z ; (II) $1/2+x, 3/2-y, \bar{z}$; (III) $1+x, y, z$; (IV) $1-x, 1/2+y, 1/2-z$; (V) $3/2-x, 1-y, 1/2+z$; (VI) $x, 1+y, z$.

| | Molécule A | Molécule B |
|---------------------|------------|------------|
| O(51, I)–O(52, I) | 2,47 | 2,41 |
| O(51, I)–N(41, I) | 2,69 | 2,71 |
| O(59, I)–O(60, I) | 2,69 | 2,73 |
| N(41, I)–O(83, II) | 2,86 | |
| O(58, I)–O(82, II) | 2,86 | |
| O(60, I)–O(83, II) | 2,79 | |
| O(71, I)–O(82, IV) | 2,87 | |
| O(52, I)–O(86, II) | | 2,85 |
| O(59, I)–O(82, III) | | 2,66 |
| N(41, I)–O(89, IV) | | 2,90 |

^{a)} Les molécules A et B sont liées entre elles par une liaison H: O(71, B, I) ... O(59, A, V) = 2,79 Å.

Les auteurs remercient le Groupe *Lepetit* (Milan) qui leur a fourni l'échantillon étudié.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. C. Lancini, 'Biotechnology', Eds. H. J. Rehm et G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1986, Vol. 4, pp. 431.
- [2] G. C. Lancini, M. Grandi, 'Antibiotics', Ed. J. W. Corcoran, Springer-Verlag, New York, 1981, Vol. 4, pp. 12.
- [3] R. Cricchio, P. Antonini, G. C. Lancini, G. Tamborini, R. J. White, E. Martinelli, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 1415.
- [4] R. Cricchio, P. Antonini, G. Sartori, *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 342.
- [5] T. E. Kiehn, F. F. Edwards, P. Brannon, A. Y. Tsang, M. Maio, J. W. Gold, E. Whimbey, B. Wong, J. K. McClatchy, D. Armstrong, *J. Clin. Microbiol.* **1985**, *21*, 168.
- [6] M. Brufani, S. Cerrini, W. Fideli, A. Vaciago, *J. Mol. Biol.* **1974**, *87*, 409.
- [7] M. Gadret, M. Goursolle, J. M. Léger, J. C. Colleter, *Acta Crystallogr., Sect. B* **1975**, *31*, 1454.
- [8] M. Brufani, L. Cellai, S. Cerrini, W. Fideli, A. Vaciago, *Mol. Pharmacol.* **1978**, *14*, 693.
- [9] S. K. Arora, *Acta Crystallogr., Sect. B* **1981**, *37*, 152.
- [10] M. Brufani, L. Cellai, S. Cerrini, W. Fideli, A. Vaciago, *Mol. Pharmacol.* **1982**, *21*, 394.
- [11] S. K. Arora, *Mol. Pharmacol.* **1983**, *23*, 133.
- [12] S. K. Arora, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1099.
- [13] C. Bartolucci, L. Cellai, S. Cerrini, D. Lamba, A. L. Segre, V. Brizzi, M. Brufani, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 185.
- [14] P. Main, S. J. Fiske, S. E. Hull, L. Lessinger, G. Germain, J. P. Declercq, M. M. Woolfson, Multan 80, 'a System of Computer Programs for the Automatic Solution of Crystal Structures from X-Ray Diffraction Data', Universités de York, Angleterre, et Louvain, Belgique, 1980.
- [15] 'International Tables for X-Ray Crystallography', Kynoch Press, Birmingham, 1974, Vol. IV.
- [16] W. Wehrli, *Rev. Infect. Dis.* **1983**, *5*, S407.
- [17] P. Sensi, G. C. Lancini, 'Inhibitors of Transcribing Enzymes: Rifamycins and Related Agents' dans 'Comprehensive Medicinal Chemistry', Ed. C. Hansch, Pergamon Press, New York, 1990, Vol. 2, pp. 800.