

Desarrollo de nuevos agentes antituberculosos

Esther del Olmo Fernández, José Luís López-Pérez, Arturo San Feliciano, Ana Esther García

Departamento de Química Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Campus Unamuno

Correspondencia:

Esther del Olmo. Dpto. Quím. Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Campus Unamuno
37007-Salamanca. E-mail: olmo@usal.es

Resumen

La tuberculosis (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otras micobacterias, constituye uno de los principales problemas de salud para la humanidad. Las características del patógeno y de la enfermedad, su presencia en forma latente, el desarrollo de cepas resistentes a los fármacos habituales, el sinergismo oportunista con enfermedades inmunodepresoras, como el SIDA, etc. han alertado a la comunidad científica a enfocar sus esfuerzos hacia la búsqueda y el desarrollo de nuevos agentes para combatir esta enfermedad. El establecimiento del genoma de MTB, que ha facilitado el conocimiento de la constitución de la micobacteria, el establecimiento de nuevas dianas terapéuticas y el mejor entendimiento del mecanismo de acción de los fármacos en uso, están sirviendo para diseñar y desarrollar nuevos fármacos mejores y más eficaces.

Palabras clave: Tuberculosis. Fármacos anti-tuberculosos. MDR-TB. Ácidos micólicos. Diseño inhibidores enzimáticos. Productos naturales. Mecanismo de acción.

Abstract

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and other mycobacteria, still constitutes a major human health problem. The pathogen characteristics and the illness features, with latent and multi drug resistant (MDR) forms and the opportunistic synergy with other diseases as AIDS, have contributed to alert the scientific community worldwide to focus their effort towards the design and development of new TB drugs. The assignment of the MTB genome, improving the knowledge on the mycobacterial constitution and the understanding of mechanisms of action of the currently used drugs and leading to the discovery of new therapeutic targets, are helping to design and develop better and more selective new drugs.

Key words: Tuberculosis. Anti-tubercular drugs. MDR-TB. Mycolic acids. Enzyme inhibitors design. Natural products. Drug action mechanism.

Introducción

La tuberculosis (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otras micobacterias, es una de las infecciones más antiguas y perversas que continúa siendo uno de los grandes problemas de la humanidad, afectando aproximadamente a un tercio de la población mundial; es

decir, que infecta a unos dos mil millones de personas, más que cualquier otra enfermedad respiratoria. Entre la población infectada unos ocho millones desarrollan TB cada año, de los cuales unos dos millones mueren por causa de la infección. El 95% de los casos nuevos de TB se produce en países poco desarrollados¹⁻³, afectando aproximadamente a un millón de mujeres jóvenes.

Desde el punto de vista histórico *M. tuberculosis* es una bacteria muy antigua. Se han encontrado signos de infección por tuberculosis en fragmentos de la espina dorsal de las momias de Egipto, que datan de 2400 a.c. En el siglo XVII se describió con precisión la anatomía y patología de la enfermedad y, fue Robert Koch en 1882 quien descubrió brillantemente que la enfermedad era causada por *M. tuberculosis*. En el siglo XIX Calmette y Guerin crearon la vacuna BCG (Bacilo Calmette-Guerin) que, a pesar de su dudosa eficacia, ha sido y sigue siendo utilizada ampliamente. La introducción de los antibióticos en terapéutica y el descubrimiento, hacia la mitad del siglo XX, de los primeros fármacos de síntesis eficaces frente a *M. tuberculosis*, constituyeron las bases para el tratamiento de la enfermedad, que hasta entonces sólo contaba con actuaciones paliativas, basadas principalmente en la mejora de la alimentación y la higiene de los pacientes.

La TB es una enfermedad infecciosa que se transmite por vía respiratoria atacando principalmente a los pulmones, aunque también puede afectar a otros órganos. Los individuos con un sistema inmunológico fuerte son capaces, por sí mismos, de controlar la progresión de la infección, pero no de erradicar al microorganismo⁴. En esas circunstancias, la mayoría de los casos son asintomáticos, pero pueden ser reactivados en condiciones de malnutrición, diabetes, otras enfermedades y especialmente en casos de pacientes con un sistema inmunológico deprimido, con es el caso del SIDA. La incidencia de la enfermedad está asociada a zonas de población densa, malas condiciones de nutrición y sanidad insuficiente⁵.

Se estima que un tercio de los pacientes de SIDA/HIV, 42 millones actualmente, están co-infectados con TB⁶. Según indican los informes de OMS, un noventa por ciento de los pacientes que tienen TB y HIV mueren a los pocos meses de la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad infecciosa. Ante esta alarmante situación la OMS ha hecho una llamada especial a esta "crisis TB/HIV", que es especialmente significativa en los países sub-saharianos, en los que la mitad de las muertes de infectados de SIDA son debidas a la tuberculosis⁷.

La aparición de resistencias a numerosos fármacos anti-tuberculosos (MDR-TB) ha complicado aún más el control de la TB. Se han encontrado resistencias prácticamente a todos los fármacos de primera línea⁸⁻⁹, por

lo que existe una necesidad urgente de encontrar nuevos fármacos frente a esta enfermedad. Los mecanismos implicados en las resistencias pueden ser diversos: dificultad del fármaco para atravesar la envuelta celular altamente hidrofóbica de la bacteria¹⁰, sistemas de eflujo¹¹, producción de ciertas enzimas que inactivan el fármaco (β -lactamasas, aminoglicósido-aciltransferasa)¹²⁻¹³ y a nivel molecular, mutaciones del genoma de *M. Tuberculosis*¹⁴.

El control de la tuberculosis

Tres son las aproximaciones que se han aplicado para controlar la enfermedad. La vacunación, el reposo en sanatorios al aire fresco, con buena limpieza y una dieta equilibrada, y la quimioterapia.

Vacunación e inmunoterapia. La inmunización activa es esencial para el control de la TB, a pesar de ser inefectiva en la mayoría de los casos. Hasta la fecha unos mil millones de personas han sido vacunadas con la vacuna BCG. El desarrollo de nuevas vacunas está basado en cuatro técnicas: cepas de *M. tuberculosis* atenuado¹⁵, mejoras en la vacuna BCG¹⁶, vacunas que contienen sub-unidades proteicas de MTB¹⁷ y vacunas con ácidos nucleicos¹⁸.

Otra forma de inmunoterapia implicaría inyectar la micobacteria inactivada para que estimulara el sistema inmune, generando activación de células TH1 e inactivación de células TH2. Las células TH1 inducen la producción de interleukina-2 y de gamma-interferón, necesarios para la generación de los efectos anti-micobacterianos desarrollados por los fármacos anti-TB y para el retardo en la respuesta hipersensitiva¹⁹. Se ha usado *M. vaccae* como agente inmunoterapéutico junto con agentes quimioterápicos para el control de TB con buenos resultados, especialmente en el caso de MDR TB²⁰⁻²¹.

Quimioterapia. La quimioterapia frente a TB comenzó en los años 40, con el descubrimiento de agentes tales como estreptomycin (ST), ácido *p*-aminosalicílico (PAS), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), cicloserina, etionamida, rifampicina (RMP) y etambutol (EMB)²²⁻²³. La utilidad de la mayoría de estos agentes fue descubierta en programas de ensayo masivo y sin optimización alguna. La escasez de herramientas bioquímicas en esos años, el desconocimiento de la bioquímica de la micobacteria y la dificultad de manipulación de la misma, hacían difícil el conocimiento del mecanismo de acción de estos fármacos. Los nuevos avances en estos campos, unidos al descubrimiento del genoma de la micobacteria han ayudado positivamente en su entendimiento. Así, las terapias actuales son muy complejas, especialmente en los casos de MDR-TB, e implican el uso simultáneo de varios fármacos durante bastantes meses, con una farmacología tediosa. INH y RMP son los fármacos de elección y, una vez iniciado el tratamiento, el médico debe supervisar muy cuidadosamente la evolución de los síntomas y signos de la enfermedad ante un mal progreso, que pueda indicar cualquier fallo terapéutico: fiebre prolongada y recurrente; persistencia de la micobacteria en los esputos²⁴, etc.

Genómica. La secuenciación del genoma²⁵⁻²⁶ de *M. tuberculosis* ha constituido un avance muy importante en el campo de la tuberculosis, llegándose a clonar también cepas altamente virulentas, como la H37Rv. Están implicados unos 4500 genes, de los cuales se conoce con precisión la función bioquímica de un 40% de ellos; otro 44% presenta una secuencia muy semejante y del 16% restante no se sabe muy bien su implicación, quizás estén relacionadas con funciones específicas de las micobacterias. La comparación de los genomas de *M. tuberculosis* y *M. leprae* ha servido para identificar genes asociados con el desarrollo de la virulencia²⁷ y proporciona, a su vez, una nueva herramienta para el desarrollo de estra-

tegias para el control de la enfermedad.

Agentes quimioterápicos en uso

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la TB incluyen agentes de amplio y de reducido espectro, así como combinaciones de varios fármacos, que pueden llegar a ser cinco, en función del tipo de infección, con el fin de: conseguir cultivos negativos de esputos en el menor tiempo posible; prevenir de la aparición de resistencias y asegurar una cura completa sin recaídas.

- *Agentes de primera elección:* isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB) y estreptomycin (ST).
- *Agentes de segunda elección y complementarios:* etionamida (ETH),

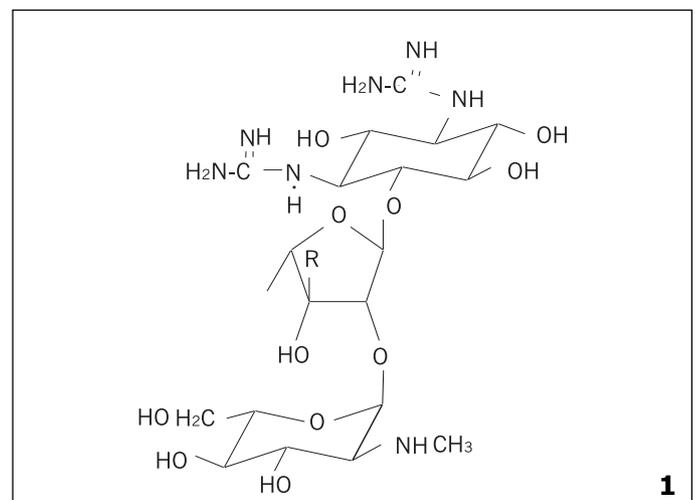


Figura 1 Agentes de primera elección

1a. R = CHO Estreptomycin; 1b. R = CH₂ OH Dihidroestreptomycin

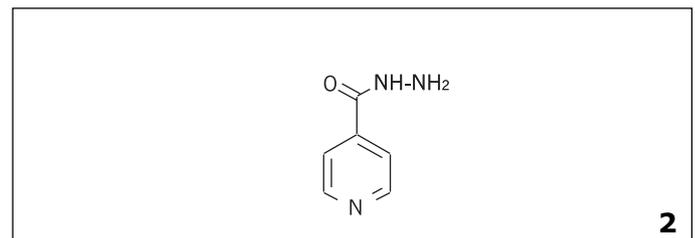


Figura 2. Agentes de primera elección. Isoniazid

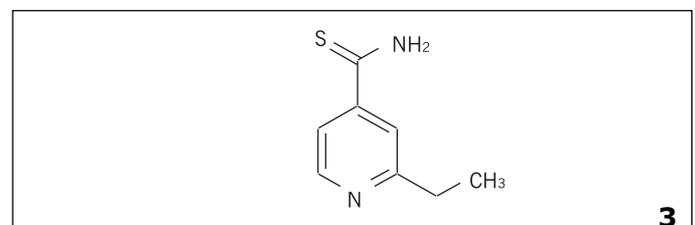


Figura 3. Agentes de segunda elección y complementarios. Etionamida

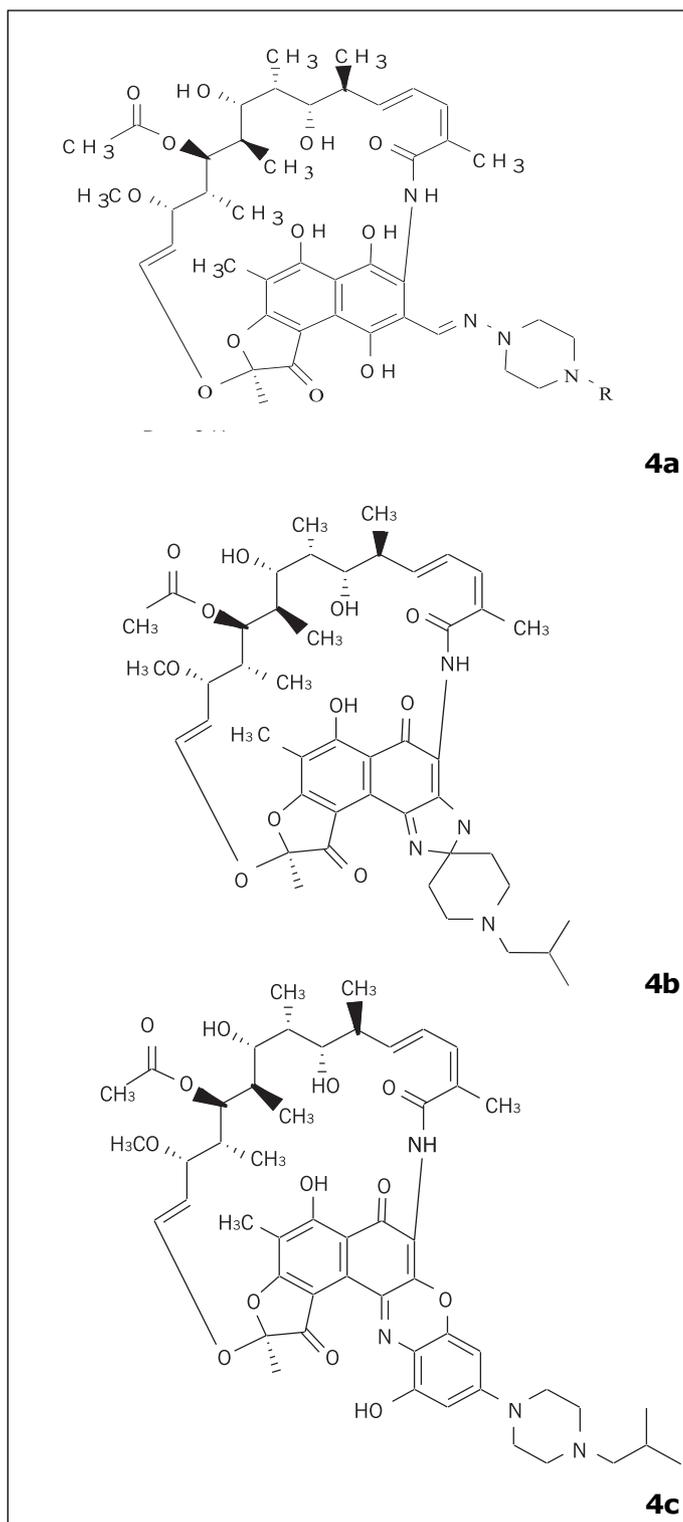


Figura 4. Agentes de primera elección.
4a. R= CH₃ Rifampicina; 4b. Rifabutina; 4c. KRM-1648

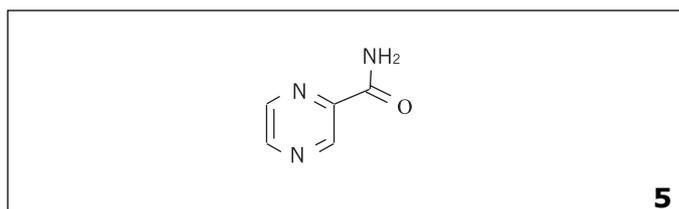


Figura 5. Agentes de primera elección. Pirazinamida

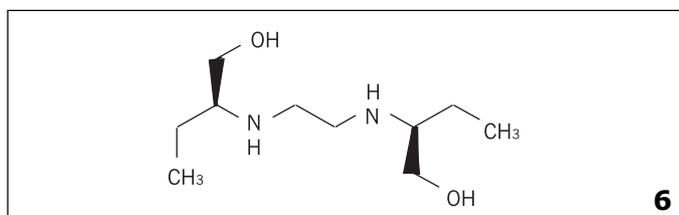


Figura 6. Agentes de primera elección. Etambutol

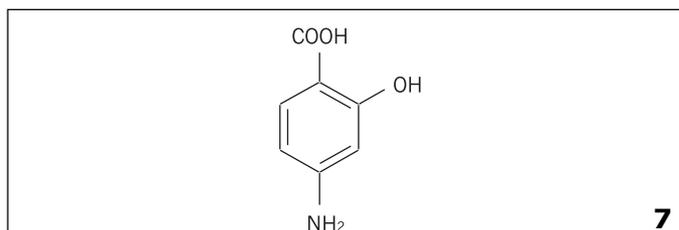


Figura 7. Agentes de segunda elección y complementarios. PAS

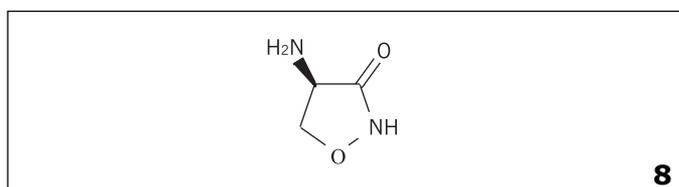


Figura 8. Agentes de segunda elección y complementarios. D-Cicloserina

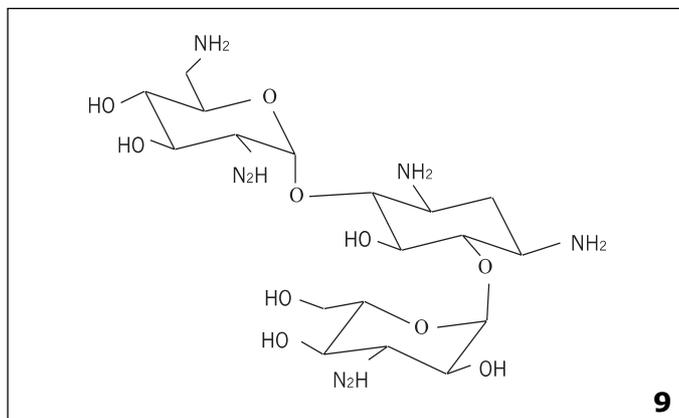


Figura 9. Agentes de segunda elección y complementarios.
Kanamicina B

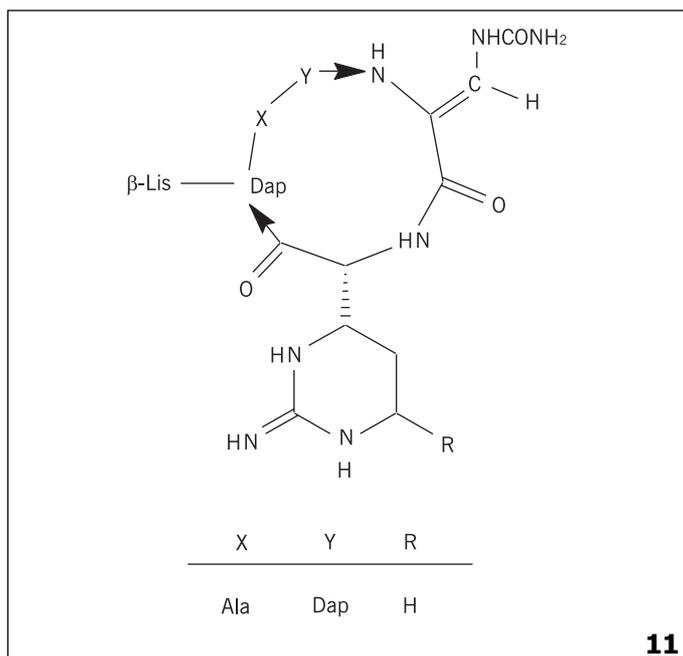


Figura 11. Agentes de segunda elección y complementarios. Capreomicina

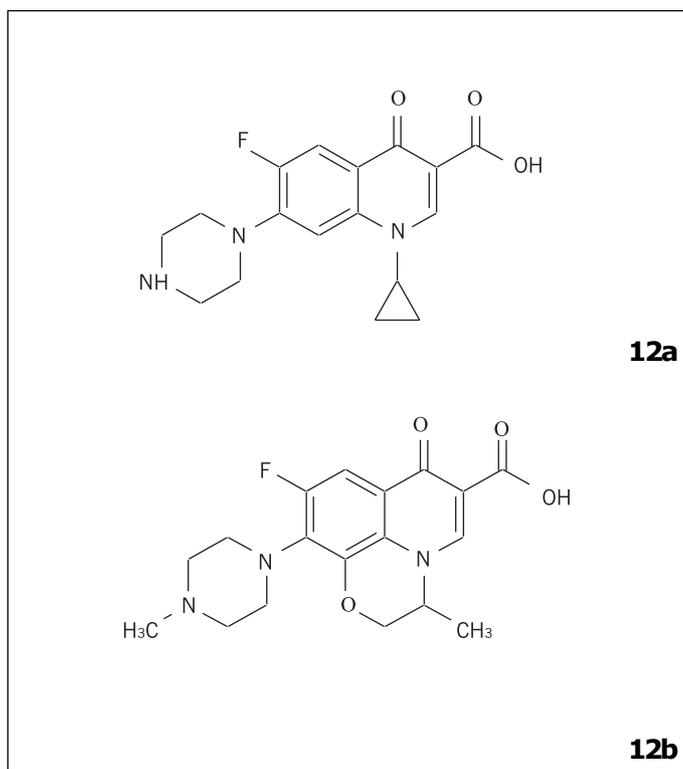


Figura 12. Agentes de segunda elección y complementarios; 12a. Ciprofloxacin; 12b. Ofloxacin

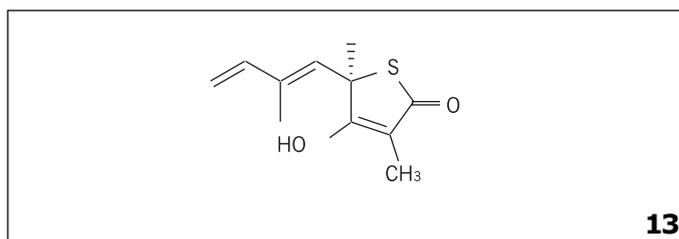


Figura 13. Agentes descubiertos recientemente. Tialactomicina

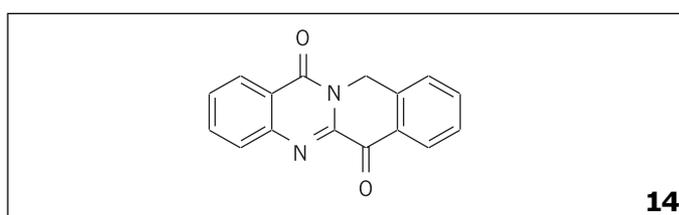


Figura 14. Agentes descubiertos recientemente. Triptantrina

Fluoroquinolonas (FQ)

Son derivados sintéticos del ácido nalidixico que presentan un amplio espectro anti-micobacteriano⁴⁷, así, ciprofloxacin (Figura 12a) y ofloxacin (Figura 12b) han sido usados terapias asociadas para combatir MTB y *M. avium*. Se han hecho modificaciones estructurales que han mejorado grandemente la actividad de las FQ iniciales. Actúan a nivel de la DNA girasa y DNA topoisomerasa IV⁴⁸.

Agentes descubiertos recientemente

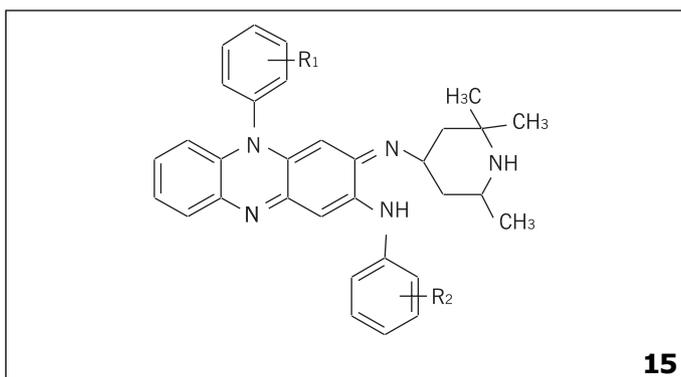
En los años 90 se pusieron a punto nuevas técnicas de ensayo en la evaluación de MTB que requerían menos tiempo de incubación y que además eran más seguras⁴⁹⁻⁵², ello hizo posible que apareciera en la bibliografía un gran número de agentes nuevos tanto de origen natural como de síntesis, posibles candidatos a fármacos anti-TB.

Tialactomicina

La tialactomicina (Figura 13) es una tialactona natural que pertenece a un grupo de agentes derivados del ácido tiotetrónico. Actúa inhibiendo la biosíntesis de ácidos micólicos, por inhibición de FAS-II de plantas y bacterias pero no del hospedador⁵³, es decir, es selectiva. Presenta una MIC de 5µg/mL pero no se dispone de datos de toxicidad *in vivo*, ni de citotoxicidad *in vitro*. El desarrollo de análogos del compuesto 13 es bastante prometedor en la búsqueda de nuevos agentes anti-TB.

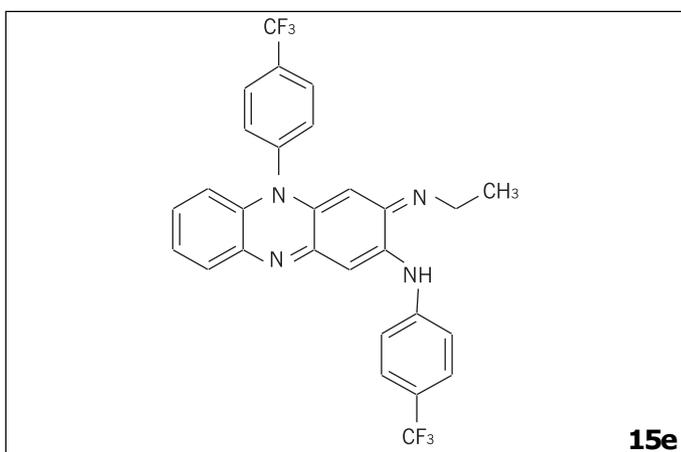
Triptantrina

Con estructura de alcaloide indoloquinazolínico, la triptantrina (Figura 14) presenta una MIC de 0,5-1,0 µg/mL y es activa incluso frente a MDR TB. Al igual que en el caso anterior no se disponen de datos de toxicidad ni *in vivo* ni *in vitro*.



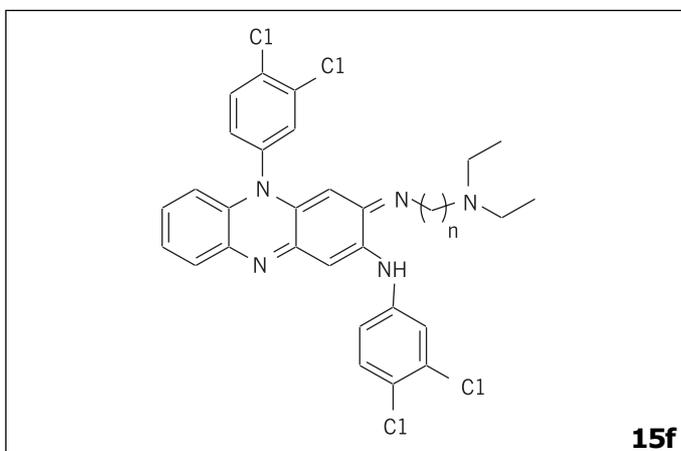
15

Figura 15a, b, c, d. Agentes descubiertos recientemente. Derivados fenazínicos. 15a. B4121 $R_1, R_2 = 3,5$ -dicloro; 15b. B4125 $R_1, R_2 = 2$ -cloro; 15c. B4128 $R_1, R_2 = 2,4$ -dicloro; 15d. B4169 $R_1, R_2 = 3,4,5$ -triclora.



15e

Figura 15e. B4157



15f

Figura 15f. B4154

Derivados fenazínicos

Se han encontrado buenas propiedades antimicobacterianas en algunas trimetil-piperidinilfenazinas (Fig.15a - 15d), incluso frente a MDR TB, actividad que es superior a la hallada en clofazimina⁵⁴. Algunos de los compuestos (Figura 15e y f) son activos *in vivo*, presentan además, actividad anti-inflamatoria, baja resistencia, eliminación metabólica lenta y acumulación intracelular en células fagocíticas mononucleares, que les hace ser nuevos candidatos para el tratamiento de las infecciones por TB.

Nitro-imidazoxazoles y nitro-imidazoxazinas

Los nitroimidazoxazoles usados inicialmente como radiosensitizantes en la quimioterapia del cáncer, presentan actividad antimicobacteriana *in vivo*. Desafortunadamente, el compuesto líder CGI-17341 (Figura 16a) y análogos presentaron acción mutagénica, por lo que no pudieron ser llevados a la clínica⁵⁵⁻⁵⁶. Nitro-imidazoxazinas bicíclicas (Figura 16b y c) también presentan actividad anti-TB y, concretamente el PA-824 (Figura 16c) con una MIC de 0,015-0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y actividad tanto frente a MTB en replicación como latente ha surgido como un nuevo cabeza de serie para el desarrollo de nuevos fármacos anti-TB. Además PA-824 también es activo frente a cepas de MTB multi-resistentes a los fármacos habituales⁵⁷. Actúa inhibiendo la biosíntesis de proteínas y de lípidos de la pared celular sin afectar a la biosíntesis de los ácidos nucleicos, por un mecanismo dependiente del cofactor F420 del MTB. El análogo amídico PA-1343 (Figura 16b) con una MIC 0,015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se encuentra en estudios preclínicos⁵⁸.

Oxazolidinonas

Las primeras oxazolidinonas⁵⁹⁻⁶⁰ antibacterianas fueron descubiertas en la DuPont (Dup 721, Figura 17a), y actuaban vía oral inhibiendo la síntesis de proteínas en la fase inicial. Distintos análogos, como la hidroxiketona (Figura 17b) o aquellos en los que se ha incorporado un resto de tiomorfolina (Figura 17c-e) han mostrado buenas propiedades antimicobacterianas *in vitro*. Desafortunadamente no pueden pasar a estudios clínicos debido a su toxicidad.

Diterpenos

Los diterpenos son bien conocidos por sus innumerables efectos biológicos. Recientemente han sido ensayados frente a MTB⁶¹ y algunos, como el *nor*-diterpenoide 12-desmetil-multicaulina (Figura 18a), presenta una MIC semejante a rifampicina. Del *Sapium indicum* se aisló un éster de forbol⁶² Figura 18b con MIC semejante a kanamicina, pero inferior a INH. El alcaloide benzo-oxazólico Figura 18c inhibe el *M. Tuberculosis* H37Rv en un 97% a dosis de 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁶³⁻⁶⁴.

Purinas

9-Bencilpurinas (Figura 19) con sustituyentes en posiciones 2-, 6- y/o 8- han mostrado actividad frente a MTB. Algunos de los compuestos más activos presentaban de agrupaciones *trans*-estirilo o arilo en posición 6 junto a cloros en posición 2 (MIC 0,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *in vitro*)⁶⁵, también se han descrito propiedades antimicobacterianas para 6-aril-9-sulfonilpurinas y 6-mercapto-9-sulfonilpurinas⁶⁶.

Tiadiazintionas

Las actividades antifúngicas y antibacterianas de las tiadiazintionas (Figura 20) son conocidas desde hace tiempo⁶⁷, por lo que se ensayaron frente a MTB, mostrando algunas de ellas buena actividad frente a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* incluso, en cepas resistentes⁶⁸.

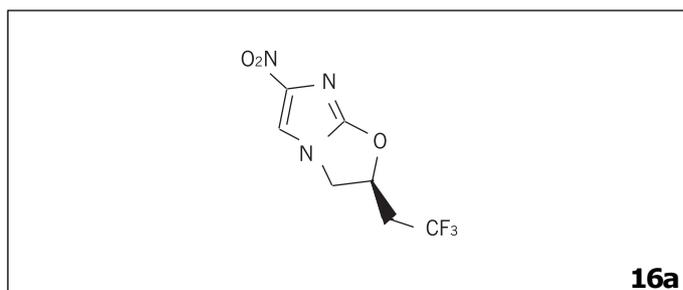


Figura 16a. Agentes descubiertos recientemente. Nitro-imidazoxazoles y Nitro-imidazoxazinas. CGI-17341

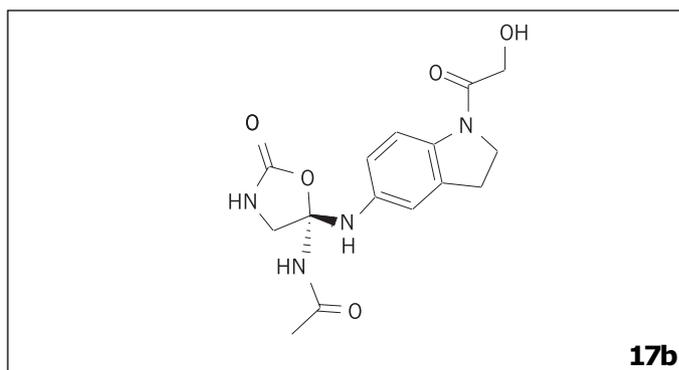


Figura 17b. U-100480

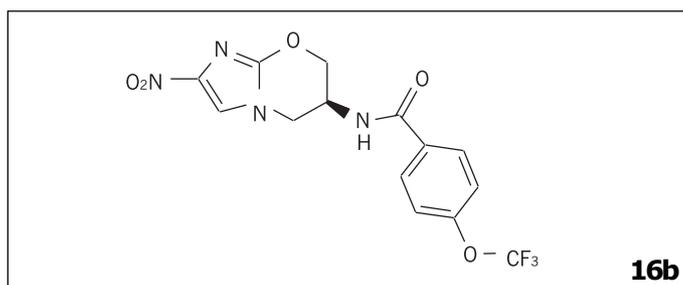


Figura 16b. PA-1343

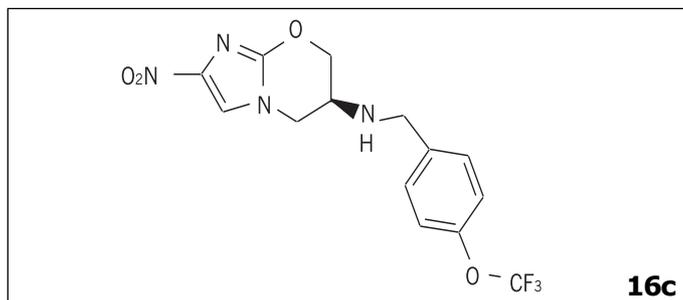


Figura 16c. PA-824

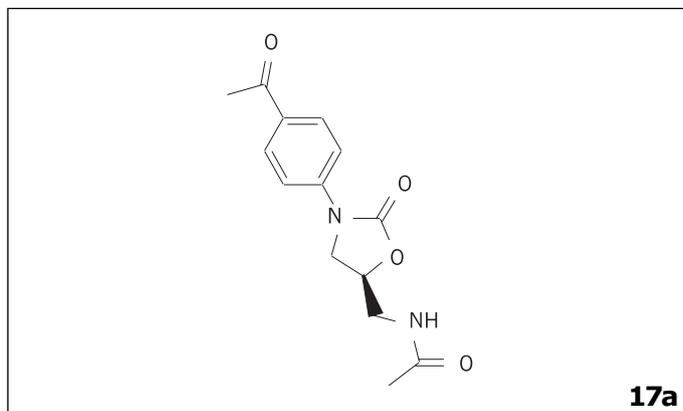


Figura 17a. Agentes descubiertos recientemente. Derivados de Oxazolidinonas. DUP-721

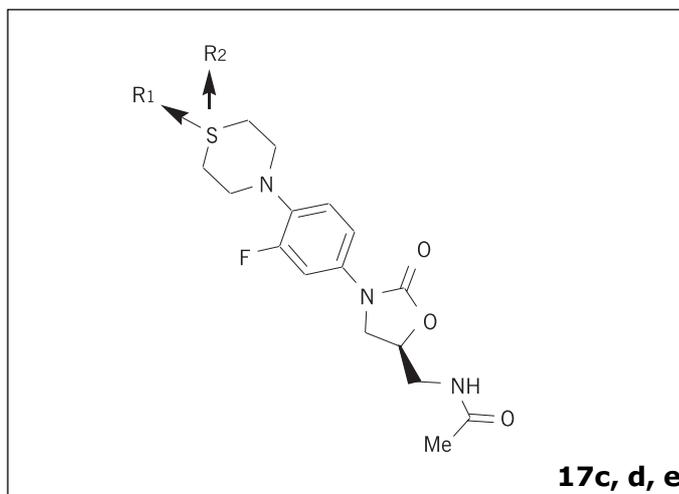


Figura 17c. $R_1, R_2 = \text{---}$; 17d. U-101603 $R_1 = \text{O}; R_2 = \text{---}$; 17e. U-101244 $R_1, R_2 = \text{O}$

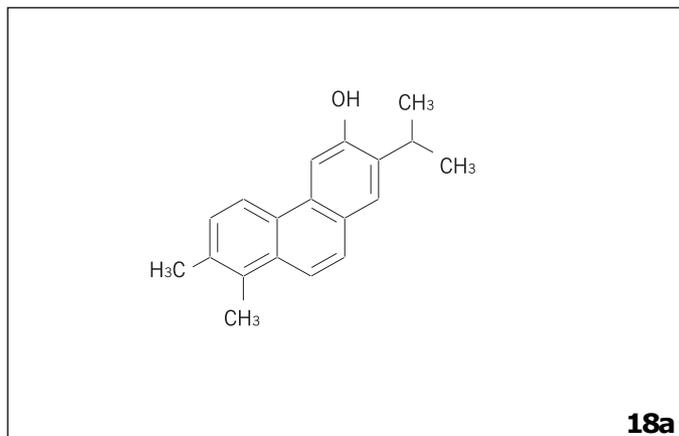


Figura 18a. Diterpenos. 12-desmetilmilticaulina

Derivados simples de carbohidratos

Debido a la observación de que algunos azúcares sencillos inhibían ciertas enzimas implicadas en la biosíntesis de la pared celular, distintos derivados de monosacáridos (Figura 21) fueron sometidos a ensayos antimicrobianos, encontrándose buenos resultados *in vitro*, incluso frente a la cepa altamente virulenta H37Rv⁶⁹ y cepas MDR⁷⁰⁻⁷², sin embargo mostraron toxicidad en animales, por lo que aún se sigue buscando buenos cabezas de serie en este campo.

Cumarinas sustituidas

La actividad antimicrobiana frente a *M. tuberculosis* H37Rv de este tipo de compuestos fue puesta de manifiesto investigando la actividad anti-HIV de las cumarinas, (+) calanolida A (Figura 22) y (-) calanolida, con MIC de 3,13 µg/mL⁷³⁻⁷⁶.

Productos naturales de origen marino

Del medio marino se han aislado, identificado y ensayado un gran número de compuestos con estructuras muy diversas: derivados de naturaleza peptídica, esteroides, sesquiterpenos, etc. Así, massetolida A (Figura 23a) y viscosina B (Figura 23b) aislados de cultivos de algas marinas mostraron MIC de 2,5-5 y 5-10 µg/mL respectivamente frente a *M. avium-intracellulare*. La kahalalida A (Figura 23c) aislada del molusco *Elysia rufescens* inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a 12µg/mL. Los 19-hidroxiesteroides: Litosterol (Figura 23d) y Nefalesterol B y C (Figura 23e y f) y el sesterterpeno Heteronemina (Figura 23g) inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a MIC de 3,13; 12,5 y 6,25 µg/mL respectivamente⁷⁷⁻⁸⁰.

Estos son solo algunos ejemplos de compuestos, pero la lista es mucho mayor: hidantoínas, hidrazonas, indolinonas, quinoxalinas, quinazolininas, quinolininas, succinimidinas, tiosemicarbazonas, ditiocarbamatos, triazinas, etc.

Perspectivas futuras

Los grandes avances realizados en los últimos años en el entendimiento de la biología, del ciclo intracelular y la bioquímica de MTB, han proporcionado una información muy valiosa para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas en la lucha frente a la tuberculosis, incluso frente a cepas multi-resistentes. La mayoría de estas dianas actúan sobre la biosíntesis de procesos vitales para la micobacteria, se ha podido identificar sus estructura y en algunos casos los complejos de interacción con ciertos inhibidores. Algunos ejemplos son: *Isocitrato liasa (icl)*, (Figura 24), *Catalasa-peroxidasa (KatG)* y *Nitrato reductasa (narGHJI)* relacionadas con la persistencia de infección; *Ciclopropano sintasa (pca)* con la síntesis de ácidos micólicos; *RNA polimerasa (sigF, sigH)* con la disminución de la patología; *Galactosiltransferasa* con la biosíntesis del polisacárido de la pared de MTB, *dTTP-Ramnosa sintasa (RmlC)* síntesis de arabinogalactano, etc. Algunos de estos procesos son específicos de MTB, lo que les hace muchos más interesantes. También se ha evaluado un gran número de compuestos tanto de origen natural como de síntesis, sin embargo y a pesar de los esfuerzos realizados, aun no se han aportado compuestos nuevos al arsenal terapéutico que puedan sinergizar y/o sustituir a los fármacos en uso.

Existe una necesidad de desarrollo de ensayos validos para las diferentes formas de TB, en la detección rápida de resistencias, así como de evaluar muchos más compuestos con el fin de encontrar nuevas moléculas activas frente a la TB. El desarrollo de vacunas eficaces sería la mejor manera de prevenir y controlar la enfermedad, así mismo, una disponibilidad

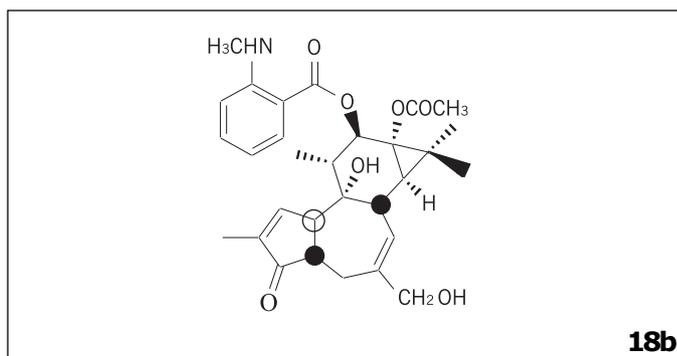


Figura 18b.

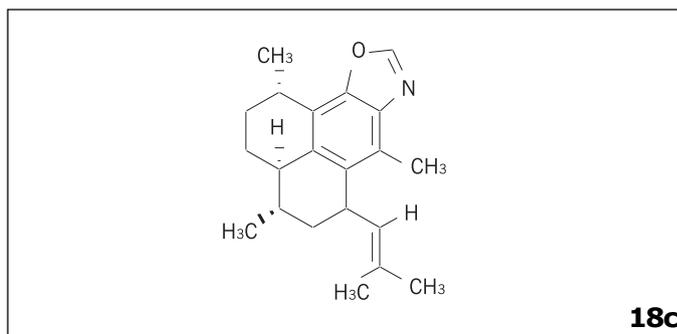


Figura 18c. Pseudopteroxazol

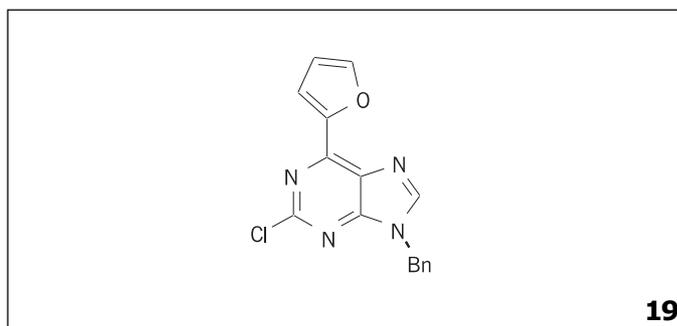


Figura 19. Agentes descubiertos recientemente. Purinas. 2-Cloro-4-(2-furanil)-9-bencilpurina

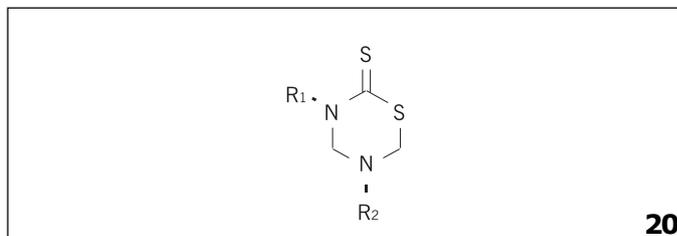


Figura 20. Agentes descubiertos recientemente. Tiazintionas. R₁: Alquil, cicloalquil, arilaquil. R₂: Alquil, cicloalquil, arilaquil. funcionalizados o no

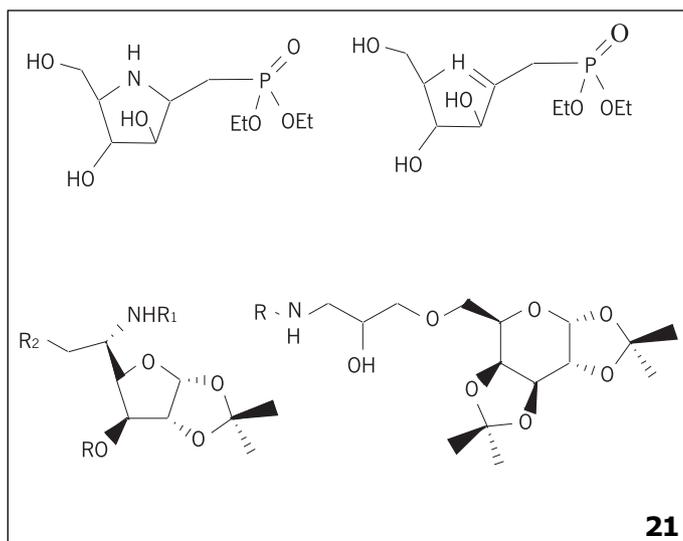


Figura 21. Agentes descubiertos recientemente derivados de carbohidratos. R = CH₃, CH₂Ph. R₁ = Alquil o aril. R₂ = COOEt, CH₂OH, CONH₂. R = Alquil, cicloalquil, arilalquil, heteroalquil

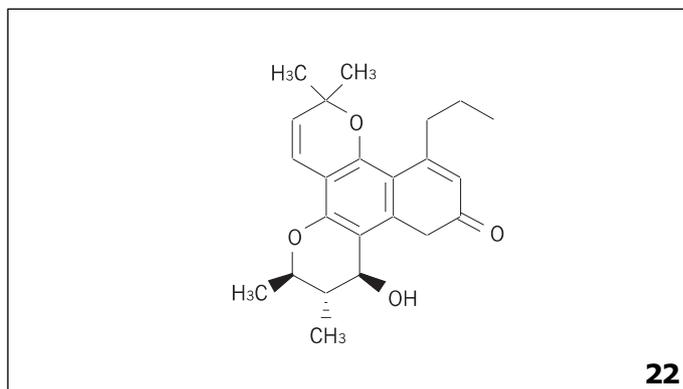


Figura 22. Agentes descubiertos recientemente. Cumarinas. (+)Calanolide A

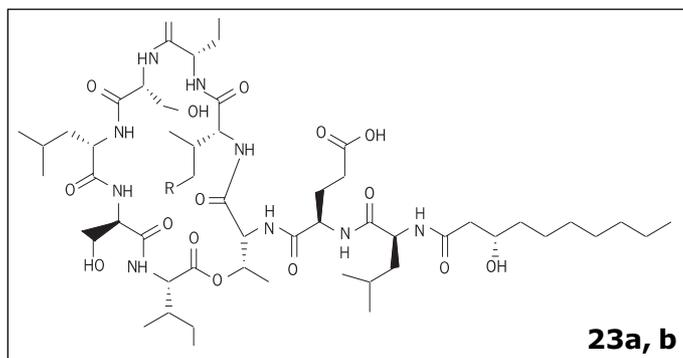


Figura 23. Agentes descubiertos recientemente. Productos marinos. R=CH₃ Massetolida A (23a). R: Viscosina (23b)

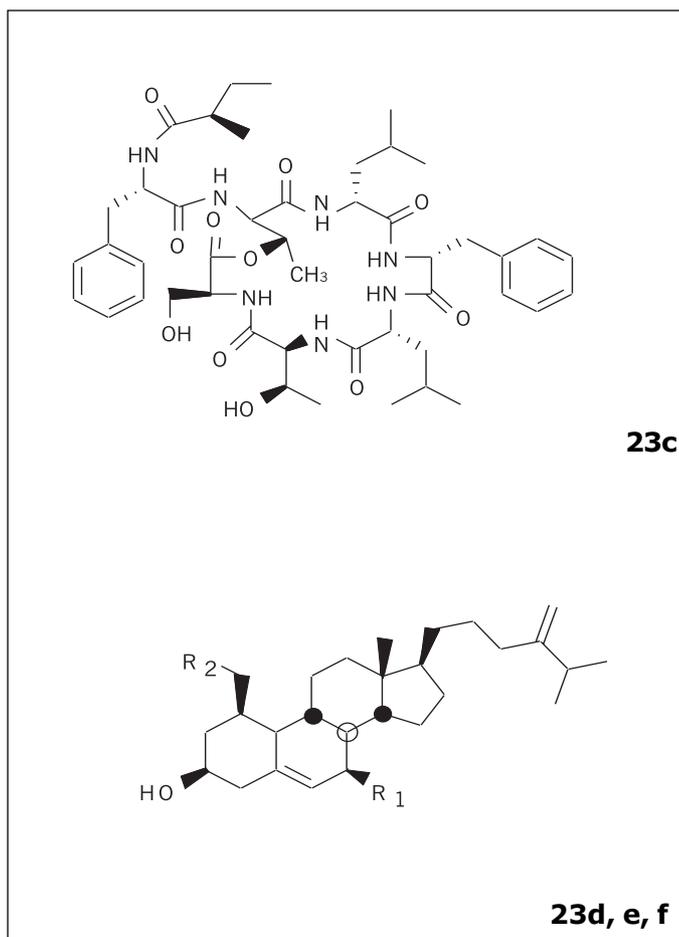


Figura 23f. 23c. Kahalalide A. 23d. R₁ = H; R₂ = OH. Litosterol; 23e, R₁ = OH; R₂ = OH. Nefasterol B; 23f, R₁ = OAc; R₂ = OH. Nefasterol C

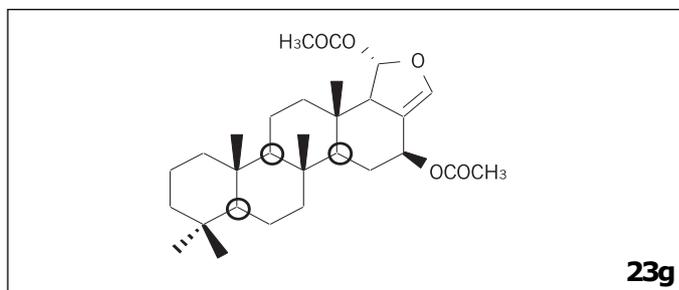


Figura 23g. Heteronemina

amplia e ininterrumpida de fármacos anti-TB, especialmente en los países menos desarrollados, es otro de los factores importantes a tener en cuenta para un control adecuado de la enfermedad.

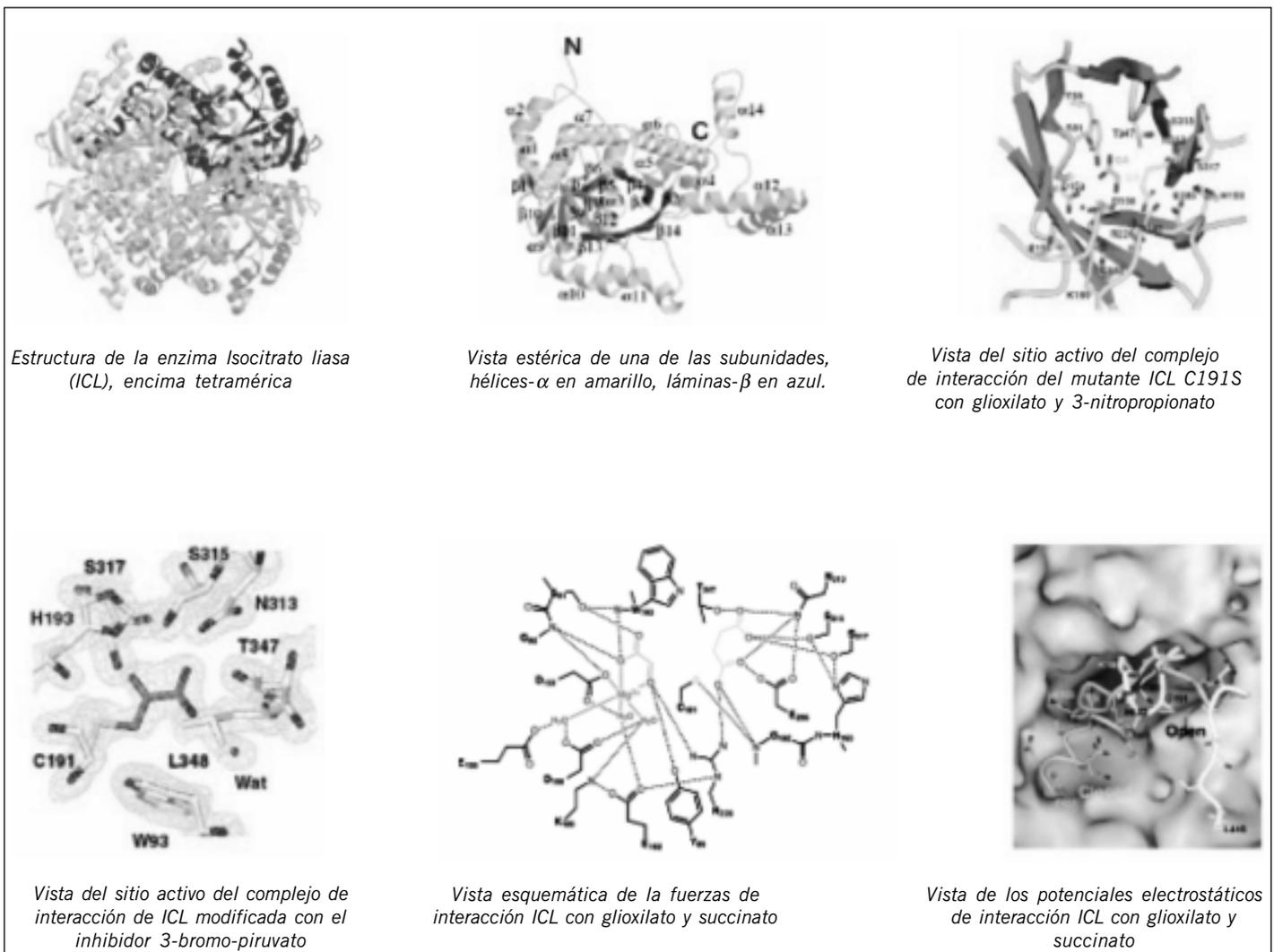


Figura 24. Estructura de la enzima Isocitrato liasa, su sitio de acción e interacciones con sustratos e inhibidores específicos. (tomado de <http://structbio.nature.com>)

Bibliografía

- World Health Organization. *WHO Report* 2001.
- World Health Organization. *Tuberculosis Fact Sheet, No. 104*. 2000, <http://www.who.int/inf-fs/en/fact104.html>.
- Farmer P, Bayona J, Beccera M, *et al.* The dilemma of MDR TB in global era. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:869-76
- Mc Kinney JD, Honer zu Bentrup K, Muñoz-Elias EJ, *et al.* Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000;406:735-8.
- Dony JF, Ahmad J, Khen Tiong Y. Epidemiology of tuberculosis and leprosy, Sabah, Malaysia. *Tuberculosis* 2004;84:8-18
- World Health Organization. Strategic framework to decrease the burden of TB/HIV document WHO/CDS/TB2002, 296, WHI/HIV AIDS/2002,2. Geneva, Switzerland World Health Organization; 2002.
- World Health Organization, 2002. *Global tuberculosis*. Doc. WHO/CDS/TB/2000.275.
- Piatek AS, Tyagi S, Pol AC, *et al.* Molecular beacon sequence analysis: A novel approach to the detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotech* 1998;16:359-63.
- Crofton JO, Chaullet P, Maher D. Guidelines for the management of drug resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 1997. Also available from: URL: <http://www.who.int/gtb/publication/gmdrt/>.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
- Ainsa JA, Perez E, Pelicic V, *et al.* Aminoglycoside 20-N-acetyltransferase genes are universally present in Mycobacteria: Characterization of the aac(20)-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the aac(20)Id gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 1997;24:431-41.
- Bush K, Miller GH. Bacterial enzymatic resistance: β -lactamases and aminoglycoside modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:509-15.

13. Rose DN. Short course prophylaxis against tuberculosis in HIV infected persons: A decision and cost-effective analysis. *Ann Intern Med* 1998;129: 779-86.
14. Heym B, Honore N, Schurra C, et al. Implications of multidrug resistance for the future of short source chemotherapy of tuberculosis: A molecular study. *Lancet* 1994;344:293-8.
15. Cooler RN, Campos Neto A, Owendale P, et al. Vaccination with T cell antigen Mtb 8.4 protects against challenge with *M. tuberculosis*. *J Immunol* 2001;166:6227-35.
16. Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Briscoe H, Britton WJ. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *M. tuberculosis*. *Infect Immun* 1999;67:1702-7.
17. Olsen AW, Pinxteren LAH, Okkels LM, Rasmussen PB, Anderson P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and ESAT-6. *Infect Immun* 2001;69:2773-8.
18. Nor NM, Musa M. Approaches towards the development of a vaccine against tuberculosis: Recombinant BCG and DNA vaccine. *Tuberculosis (Edinb)* 2004;84:102-9.
19. Murthy KJR, Lakshmi VV, Singh S, Vijai Lkshmi V. Role of immunotherapy in the treatment of tuberculosis. *Ind J Clin Biochem* 1997;12(Suppl):76-9.
20. Stanford JL, Rook GA, Bahr GM, et al. *Mycobacterium vaccae* in immunoprophylaxis and immunotherapy of leprosy and tuberculosis. *Vaccine* 1990;8(6):525-30.
21. Dalgleish AG. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae*. *Lancet* 1999;354:1338-1339.
22. Tillotson GS. Tuberculosis : New aspects of chemotherapy. *J. Med. Microbiol.* 1996 ;44: 16-20.
23. Greenwood D. Historical introduction. In: O'Grady F, Lambert HP, Finch RG, Greenwood D, editors. *Antibiotic and chemotherapy*, 7th edition. Edinburg: Churchill Livingstone; 1997. pp 2-9.
24. Miesner G. The bacteriology of the tubercular bacillus. In: Barry BC, editor. *Chemotherapy of tuberculosis*. London: Butterworths; 1964.
25. Sreevatsan S, Pan Xi, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9869-74.
26. Bosch R, Gordon SV, Billault A, et al. Use of *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing and comparative genomics. *Infect Immun* 1998;66:2221-9.
27. Davidson PT, Le HQ. Drug treatment of tuberculosis-1992. *Drugs* 1992;43:651-73.
28. Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem* 1996;65:215-39.
29. Zhang Y, Garbe T, Young D. Transformation with katG restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol Microbiol* 1993;8:521-524.
30. Jhonson K, Schultz PG. Mechanistic studies of the oxidation of INH by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Am Chem Soc* 1994;116:7425-6.
31. Chopra I, Brennan P. Molecular action of antimycobacterial agents. *Tuber Lung Dis* 1998;78(2):89-98.
32. Parneti F, Lancini G. Rifamycins. In: O'Grady F, Lambert HP, Finch RG, Greenwood D, editors. *Antibiotic and chemotherapy*, 7th edition. Edinburg: Churchill Livingstone; 1997. pp 453-9.
33. Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. In vitro antimycobacterial activities of newly synthesized benzoxazinorifamycins. *Antimicrobial Agents Chemother* 1991;35:542-47.
34. Robin PM, Reznik T, Kutlin A, Hammerschlag MR. In vitro activities of rifamycin derivatives ABI-1648 (Rifalazil, KRM-1648), ABI-1657 and ABI-1131 against *Chlamydia trachomatis* and recent clinical isolates of *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(3):1135-6.
35. Tomioka H. Prospects for development of new antimycobacterial drugs, with special reference to a new benzoxazinorifamycin, KRM-1648. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000;48(3):183-8.
36. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 1996;2:1-6.
37. Konno K, Feldmann FM, Mc Dermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercular bacilli. *Am Rev Resp Dis* 1967;95:461-9.
38. Mc Dermott W, Tompsett R. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environment *in vitro*. *Am Rev Tuberculosis* 1954;70:748-54.
39. Cyanamon MH, Klemmens SP. Antimycobacterial activity of a series of pyrazinoic acid esters. *J Med Chem* 1982;35:1212-15.
40. Rastogi N, Labrousse V. Extracellular and intracellular activities of clarithromycin used alone and in association with ethambutol and rifamycin against *Mycobacterium avium* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:462-70.
41. Mikusova K, Slayeden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2484-89.
42. Lee RE, Mikusova K, Brennan PJ, Besra GS. Synthesis of the mycobacterial arabinose donor β -D-arabinosyl-1-monophosphoryldecaprenol, development of basic arabinosyl transferase assay and identification of ethambutol arabinosyl transferase inhibitor. *J Am Chem Soc* 1995;117:11829-32.
43. Offe HA. Historical introduction and chemical characteristics of antituberculosis drugs. In: Bartmann K, editor. *Antituberculosis drugs, handbook of experimental pharmacology*, Vol. 84. Berlin: Springer-Verlag; 1988. pp 1-30.
44. Trink L, Mison P. Drugs and treatment regimens, 1. *p*-aminosalicylic acid (PAS). In: Bartmann K, editor. *Antituberculosis drugs, handbook of experimental pharmacology*, Vol. 84. Berlin: Springer-Verlag; 1988. pp 51-68.
45. Otten H. Experimental evaluation of efficacy VII. Cycloserine (CS) and terizidone (TZ). In: Bartmann K, editor. *Antituberculosis drugs. Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 44, Berlin: SpringerVerlag; 1988. pp 158-66.
46. Gale EF, Cundliffe E, Reynolds PE, Richmond MH, Waring MJ. *The molecular basis of antibiotic action*, 2nd edition. London: John Wiley and Sons; 1981.
47. Tumbanatham A, Vinodkumar S. Ofloxacin induced arthropathy in patients with multidrug resistance tuberculosis. *J Assoc Physicians India* 2000;48(6):647-8.
48. Wolfson JS, Hooper DC. The fluoroquinolones: Structures, mechanism of action and resistance, and spectra of activity *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:581-6.
49. Ashtekar DR, Fernandez F, Khadse GG, Shirodkar MVN. A rapid method for the evaluation of new antituberculosis agents. *Chemotherapy*, (Basel, Switzerland) 1987;33:22-7.
50. Cheng GAC, Aktar Z, Jackson S, Duncan K. High-throughput screen for detecting antimycobacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39:2235-8.
51. Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997;41:1004-9.
52. Heifets LB. Qualitative and quantitative drugs-susceptibility tests in mycobacteriology. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988;137:1217-22.
53. Kremer L, Douglas JD, Morehouse C, et al. Thioactomycin and related analogs as novel antimycobacterial agents targeting Kas A and Kas B condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2000;275:16857.
54. Field SK, Cowie RL. Treatment of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex lung disease with a macrolide, ethambutol, and clofazimine. *Chest* 2003;124(4):1482-1786.
55. Agrawal KC, Bears KB, Sehgal RK. Potential radiosensitizing agents dinitroimidazoles. *J Med Chem* 1979;22:583-6.
56. Nagarjan K, Shumker RG, Rajjapa S, Shenoy SJ, Costa-Perira R. Nitroimidazoles XXI-2,3-Dihydro-6nitroimidazol[2,1-b] oxazoles with antitubercular activity. *Eur J Med Chem* 1989;24:631-3.
57. Wayne LG, Sramak HA. Nitroimidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2054.
58. Ashtekar DR, Costa-Perira R, Nagarjan K, Vishvanathan N, Bhatt AD, Rittel W. *In vitro* and *in vivo* activities of the nitroimidazoles CGI 17341 against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:183-6.
59. Eustice DC, Feldman PA, Zajac I, Slee AM. Mechanism of action of DuP 721: Inhibition of an early event during initiation of protein synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1218.
60. Tucker JA, Allwine DA, Grega KC, et al. Piperazinyl oxazolidenone antibacterial agents containing a pyridene diazene or triazene heteroaromatic ring. *J Med Chem* 1998;41:3727-35.
61. Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med.* 2001;67:685-94.
62. Chumkaew P, Karalai C, Ponglamanont C, Chantrapromma K. Antimycobacterial activity of phorbol esters from the fruits of *Sapium indicum*. *J Nat Prod.* 2003;66:540-3.

63. Wachter GA, Franzblau SG, Montenegro G *et al.* A new antitubercular mulinate diterpenoid from *Azorella madreporic clos.* *J. Nat. Prod.* 1998;61:965-8.
64. Rodríguez AD, Ramírez C. Serrulatane diterpenes with antimycobacterial activity isolated from the west Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae.* *J Nat Prod.* 2001;64:100-2.
65. Gundersen LL, Meyer JN, Spilsberg B. Synthesis and antimycobacterial activity of 6-aryl purines: The requirements for the N-9-substituted in active antimycobacterial purines. *J Med Chem* 2002;45:1383-6.
66. Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. Antimycobacterial activity of 9-sulfonated/sulfenylated-6mercaptapurine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:1675-8.
67. Eratan M, Bilgin AA, Palaska E, Yulug N. Synthesis and antifungal activities of some 3-(2-phenylethyl)-5substituted-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazine-2-thiones. *Arzne Forsch/Drug Res* 1992;42(1):160.
68. Katiyar D, Tiwari VK, Tripathi RP *et al.* Synthesis and antimycobacterial activity of 3,5-disubstituted thiadiazine thiones. *Bioorg Med Chem* 2003;11:4369-75.
69. Maddry JA, Bansal N, Bermudez LE, *et al.* Homologated aza analogs of arabinose as antimycobacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8:237-342.
70. Tewari N, Tiwari VK, Tripathi RP, *et al.* Synthesis of galactopyranosyl amino alcohols as a new class of antitubercular and antifungal agents. *Bio Med Chem Lett* 2004;12:329-32.
71. Tripathi RP, Tripathi R, Tiwari VK, *et al.* Synthesis of glycosylated β -amino acids as new class of antitubercular agents. *Eur J Med Chem* 2002;37:773-81.
72. Tewari N, Tiwari VK, Mishra RC, *et al.* Synthesis and bioevaluation of glycosyl ureas as α -glucosidase inhibitors and their effect on *Mycobacterium.* *Bioorg Med Chem* 2003;11:2911-22.
73. Flavin MT, Xu Z-Q, Rizzo JD, *et al.* US Pat. 6043271. Method for the preparation of (+/-)calanolide A and its intermediates. *Chem Abs* 1996;124:289113.
74. Flavin MT, Xu Z-Q, Rizzo JD, *et al.* Method for the preparation of (+)calanolide A and its analogs as HIV reverse transcriptase inhibitors. *Chem Abstr* 1998;129:216461.
75. Flavin MT, Xu Z-Q, Rizzo JD, *et al.* Preparation of (+)calanolide A and analogs. Sarwak Medichem pharmaceutical, Inc., USA. *Chem Abstr* 1999;130:281913.
76. Flavin M, Ze-Qi Xu. Preparation and antiviral activity of (+/-)-, (-)- and (+)calanolide A. *Chem Abs* 2000;132:222387.
77. Gerard J, Lloyd R, Barshy T, Haden P, Kelly MT, Andersen RJ, Massetoudes A-H. Antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitat. *J Nat Prod* 1997;60:223-9.
78. Hamann MT, Scheuer PJ, Kahalalide F. A bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysea rufescens* and green alga bryopsis sp. *J Am Chem Soc* 1993;115:5825-6.
79. Hamann MT, Oho CS, Scheuer PJ, Dunbar DC, Kahalalide F. *Elysea rufescens* and its algal diet bryopsis sp. *J Org Chem* 1996;61:6594-600.
80. Guchi KI, Saitoh S, Yamata Y. Novel 19-oxygenated sterols from the okinawan soft coral *Litophytom Viridis.* *Chem Pharm Bull* 1989;37:2553-4.