



Mª del Carmen Avendaño López

Académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia
e-mail: edicion@ranf.com

“Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin-nature’s isoniazid”, Hartkoorn et al., *EMBO Mol. Med.*, 4, 1-11 (2012)

La tuberculosis (TB), una enfermedad producida por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, ha producido a lo largo de la historia la muerte de millones de personas sin distinción de clase social. Antes de que apareciera la estreptomycin, el primer fármaco antituberculoso (1), el tratamiento de la TB consistía en el ingreso en un sanatorio a fin de descansar, tomar aire fresco, y seguir una buena dieta. La estreptomycin, se utilizó a partir de los años 1940 junto con ciertos fármacos de síntesis de baja actividad, como el ácido *p*-aminosalicílico (PAS) o las tiosemicarbazonas, pero pronto se observó que era demasiado tóxica y provocaba la aparición de cepas resistentes. Cuando en 1945, se descubrió que la nicotinamida era algo activa frente al bacilo tuberculoso (2), se empezaron a sintetizar estructuras análogas a esta vitamina, así como distintas tiosemicarbazonas. De este modo, surgieron la pirazinamida y las tiosemicarbazonas de piridina-3(ó 4)-carbaldehído. En el año 1952, se descubrió que un intermedio en la síntesis de estas últimas, la hidrazida del ácido isonicotínico (isoniazida, INH), era extraordinariamente activa y muy superior a los compuestos naturales o sintéticos utilizados anteriormente, siendo desde entonces un fármaco de primera línea para el tratamiento de esta enfermedad (3). A pesar de su sencilla estructura, el mecanismo por el que INH mata a *M. tuberculosis* ha sido controvertido debido a su complejidad, y su entendimiento ha requerido más de 50 años de estudios incluyendo el uso de herramientas genéticas (4).

Uno de los hallazgos más importantes en este sentido se produjo en 1970, cuando se descubrió que INH inhibe la biosíntesis de ácidos micólicos (5), componentes esenciales de la pared celular de las micobacterias. Estos ácidos poseen cadenas de 70 a 90 átomos de carbono en las que el grupo carboxilo se sitúa en un carbono secundario con un grupo hidroxilo en la posición β (Figura 1). La inhibición de su biosíntesis provoca la acumulación de ácidos grasos de cadena

larga y la muerte celular (6). En 1979, se observó que dicha inhibición afectaba a la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados de 24 y 26 átomos de carbono (7).

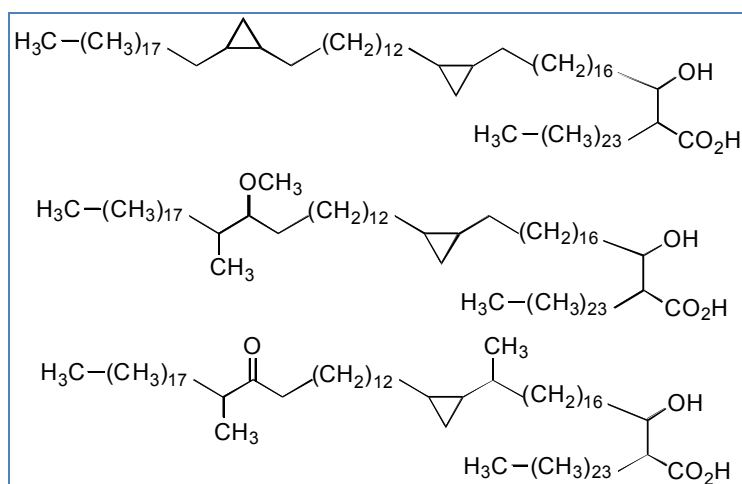


Figura 1.- Estructuras de algunos ácidos micólicos.

Paralelamente a estos hallazgos, se descubrió que INH es un profármaco que requiere la bioactivación por la enzima bacteriana KatG. Este descubrimiento comenzó en 1954 cuando se observó que la mayoría de las cepas resistentes a INH eran catalasa-inactivas (8). En 1973, se demostró que había un determinado gen que estaba implicado en la resistencia de los bacilos tuberculosos a INH (9), aunque no pudo identificarse por la ausencia de técnicas de secuenciación de ADN. Posteriormente, el desarrollo de mutantes reveló que es el gen *katK* el que transfiere la susceptibilidad a INH a las cepas de *M. tuberculosis* resistentes (10), y diferentes estudios bioquímicos demostraron que la catalasa-peroxidasa KatG codificada por dicho gen cataliza la conversión de Mn(II) en Mn(III) y éste es probablemente capaz de oxidar la isoniazida produciendo una serie de especies activas. Algunas de éstas, como el radical del ácido isonicotínico, son capaces de acilar diferentes compuestos (11, 12) a través de un mecanismo que ya se había sugerido en 1960 (13).

Por otra parte, en los años 60 se observó que los bacilos resistentes a INH lo eran también a etionamida (ETH), aunque no hubieran sido previamente tratados con ETH, y la semejanza estructural entre ambos sugirió que debían compartir la misma diana (14). Diversos experimentos con mutantes genéticamente caracterizados, confirmaron que el gen *inhA* codifica una diana común para INH y ETH, y que la mutación que causaba la sustitución de aminoácidos S94A es suficiente para producir la resistencia a ambos profármacos (15, 16). *InhA*, la enzima codificada por dicho gen, es una enoil-reductasa de la sintasa de ácidos

grasos tipo II (FASII) implicada en la biosíntesis de ácidos micólicos, y es también la diana de otro fármaco antituberculoso: el triclosán (17) (Figura 2).

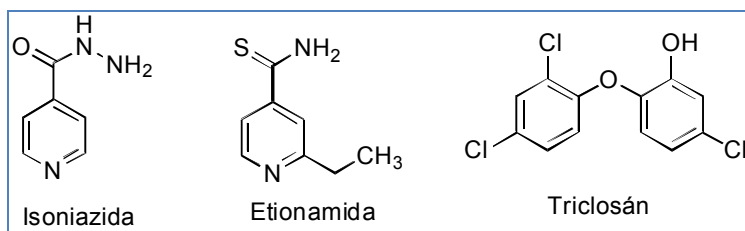


Figura 2.- Compuestos inhibidores de la enzima InhA

La cristalización de InhA en presencia de INH, Mn²⁺ y NADH, permitió descubrir que INH no es el ligando de la enzima InhA, sino que éste es el aducto covalente INH-NAD (18). En resumen, el mecanismo propuesto para INH comienza con la reacción catalizada por KatG y la formación de un hipotético radical acilo derivado del ácido isonicotínico que se enlaza a NAD (NAD⁺ o NAD[•]), y el aducto resultante inhibe a la reductasa InhA (Figura 3).

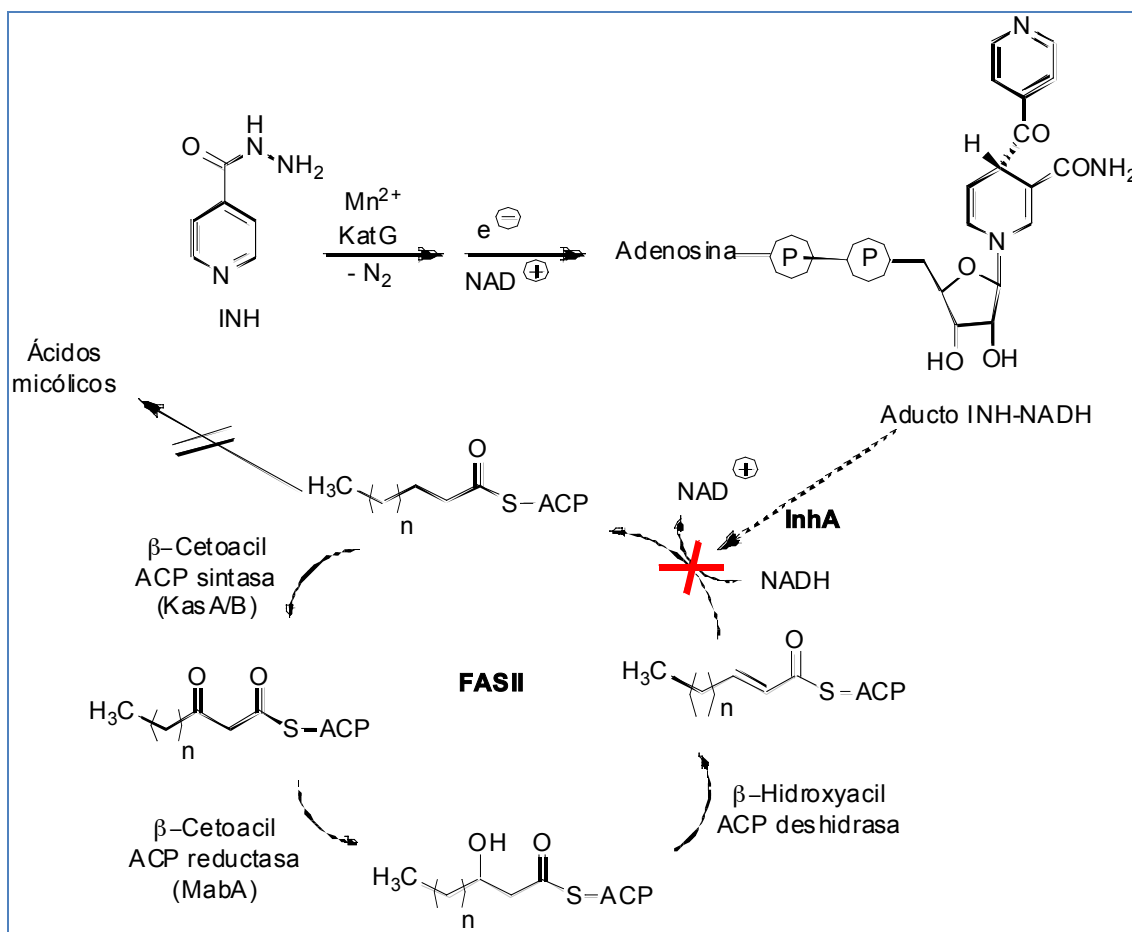


Figura 3.- Mecanismo propuesto para INH (ACP: acyl carrier protein).

Otra posible diana de INH, es la β -cetoacil ACP sintasa (KasA) (19), pero los datos bioquímicos y genéticos no apoyan esta propuesta. Por otra parte, se ha demostrado que la forma activa de INH, también forma con NADP⁺ el aducto INH-NADP que inhibe la dihidrofolato reductasa (DHFR) de *M. tuberculosis* con una gran afinidad. Sin embargo, no se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *dhfr* confiera resistencia a INH en micobacterias (20). Tampoco se ha demostrado que la supuesta interacción con enzimas respiratorias de los radicales NO[•] que podrían originarse cuando INH se activa por KatG, sea responsable en parte de la actividad bactericida (21).

Tan controvertidos como los mecanismos para explicar la acción bactericida de INH sobre *M. tuberculosis*, son los propuestos para explicar las resistencias a este fármaco. En su mayoría, se asocian a mutaciones del gen *katG*, con la consiguiente pérdida de actividad de la enzima KatG y, por tanto, de la formación del aducto INH-NAD inhibidor de InhA. De las más de 130 mutaciones de *katG* conocidas, la más común es la S315T. Otra mutación frecuente del gen *inhA* en cepas resistentes, es la S94A, que se localiza en el bolsillo de unión de InhA con NADH, reduciendo la afinidad entre la enzima y el cofactor. Datos cristalográficos de rayos X, indican que esta mutación distorsiona la red de enlaces de hidrógeno, por lo que el valor K_i para el aducto INH-NAD es mayor (22).

Otras mutaciones de la enzima InhA que afectan al lugar de unión del cofactor NADH, como son I21V, I47T, y S94A, producen un gran reducción en la afinidad de éste por la enzima pero influyen muy poco en la afinidad del aducto INH-NAD, lo que hace pensar que son poco importantes para la resistencia a INH. Ahora bien, como estos estudios se realizan con enzimas aisladas, es posible que las interacciones entre InhA y otras proteínas del *Mycobacterium* sean críticas para modular su actividad *in vivo*. Es un hecho, que varios componentes del proceso FAS-II se asocian entre sí y que la inhibición de InhA en sus mutantes produce cambios conformacionales significativos (23).

En varias cepas de laboratorio resistentes a INH, se han encontrado mutaciones en el gen *ndh* que codifica la NADH deshidrogenasa NdhII, de forma que el NADH acumulado compite con el aducto INH-NAD para interaccionar con la enzima InhA (24). Sin embargo, son raras las mutaciones de *ndh* encontradas en micobacterias resistentes aisladas en la clínica. En éstas, se han encontrado además de los ya mencionados, algunos mecanismos de resistencia asociados a mutaciones *katG* como las que afectan al gen *kasA* y a la sobreexpresión de la enzima *N*-acetiltransferasa (Nat), que cataliza la *N*-acetilación de INH impidiendo su activación por KatG (Figura 4).

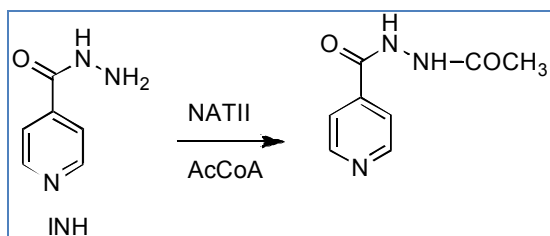


Figura 4.- N-acetilación de INH.

Como vemos, los estudios genéticos y bioquímicos y la cristalografía de rayos X han permitido disponer de un modelo que permite comprender la actividad y las resistencias de INH frente a *M. tuberculosis*. Desde el punto de vista práctico hay un hecho claro: puesto que la gran mayoría de las cepas resistentes a INH poseen mutaciones en la enzima KatG, serían deseables fármacos que no requieran ser bioactivados por esta enzima. Sin embargo, todos estos datos no han aportado mucho al diseño de nuevos fármacos activos frente a las cepas resistentes a INH, y la tuberculosis se está convirtiendo en una enfermedad intratable. De ahí la trascendencia mediática que está teniendo la noticia que nos ocupa, ya que en ella se demuestra que el antibiótico piridomicina es activo frente a muchos tipos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes al tratamiento con INH (25).

Este hallazgo, podría aliviar en un futuro la acuciante necesidad de nuevos fármacos para los enfermos tuberculosos infectados con cepas que se han hecho resistentes a múltiples fármacos (MDRTB), y en especial a los fármacos hasta hace poco tiempo más efectivos: isoniazida y rifampicina (un inhibidor de polimerasas de ARN), en los que la mortalidad se aproxima al 100%. Estas circunstancias, junto a la larga duración de los tratamientos y la susceptibilidad de los individuos VIH-positivos, justifica que el número de muertes al año debidas a la tuberculosis sea actualmente superior a dos millones (26).

¿UN NUEVO FÁRMACO ANTITUBERCULOSO?

En realidad, la piridomicina y su actividad frente a diferentes micobacterias incluyendo *M. tuberculosis* se conocen desde que se aisló de *Streptomyces pyridomiceticus* en 1953 (27). Posteriormente, se aisló también de *Dactylosporangium fulvum* (28). Es un ciclodepsipéptido de 12 eslabones que contiene fragmentos de N-3-hidroxicicolinil-L-treonina, 3-(3-piridil)-L-alanina, ácido propiónico, y ácido 2-hidroxi-3-metilpent-2-enoico (Figura 5).

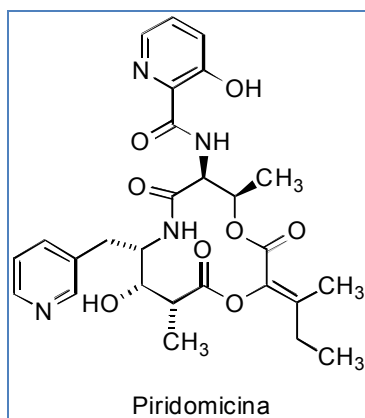


Figura 5. Estructura del antibiótico piridomicina.

De los estudios realizados acerca de su biosíntesis, destaca uno reciente en el que se ha clonado y caracterizado el clúster que codifica las enzimas que lo biosintetizan en *Streptomyces pyridomyceticus* (NRRL B-2517): poliquétido sintetasas (PKS) y péptido sintetasas no-ribosómicas (NRPS). Sin embargo, su mecanismo de acción y su eficacia frente a *M. tuberculosis* no se habían establecido previamente, aunque su escasa o nula actividad frente otras bacterias Gram-positivas y Gram-negativas sugería que la diana de la piridomicina es un componente de las micobacterias que es muy diferente o está ausente en otros géneros.

La publicación que nos ocupa, ha utilizado el antibiótico producido por *Dactylosporangium fulvum* (NRRL B-16292) debido a la baja producción obtenida a partir de *Streptomyces pyridomyceticus* (NRRL B-2517), corroborándose primero su baja toxicidad en diferentes líneas celulares humanas y estableciéndose la susceptibilidad de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. smegmatis*, así como su capacidad para penetrar en los macrófagos y detener la replicación bacteriana.

Para identificar su diana terapéutica, se seleccionó y desarrolló a partir de la cepa H37Rv, un mutante resistente a piridomicina y sensible a isoniazida, moxifloxacina y rifampicina: la cepa PYR7. Cuando se secuenciaron casi por completo los genomas de ambas cepas y se comprobó la correspondencia del de la cepa original con el genoma de referencia para H37Rv (30), se compararon los genomas de la cepa salvaje y la resistente. De los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) encontrados, se desecharon los que correspondían a familias multigénicas o a sinónimos (que no alteran la naturaleza del aminoácido que codifican). Así quedó una mutación del gen *inhA* que supone la sustitución del ácido aspártico en la posición 148 de *InhA* por glicina (D148G), hecho que se corroboró por el clásico método de secuenciación de Sanger. Hay que mencionar,

que según varias publicaciones acerca de esta enzima, el aminoácido Asp148 se localiza cerca del bolsillo al que se enlaza el cofactor NADH.

La enzima InhA, se validó como diana de la piridomicina genéticamente, transformando la cepa H37Rv con un plásmido portador del gen *inhA* a fin de comprobar que la sobreexpresión de este gen en la cepa salvaje de *M. tuberculosis* provoca resistencia al antibiótico. Todos los datos obtenidos en éste y otros experimentos, corroboraron que la mutación D148G de la enzima InhA es la responsable de la resistencia a piridomicina y de la disminución de afinidad del cofactor NADH, sin afectar a la actividad de isoniazida e isotiazida.

Puesto que piridomicina e isoniazida tienen la misma diana, se hizo necesario estudiar si los bacilos resistentes a INH procedentes de la clínica retenían la susceptibilidad frente a piridomicina. Ya se ha dicho, que las mutaciones más frecuentes asociadas a las resistencias a INH se encuentran en el gen *katG* que cataliza la catalasa-peroxidasa requerida para su bioactivación, observándose con menor frecuencia mutaciones en la región promotora del gen *inhA* que aumentan la expresión de la diana. De las ocho muestras resistentes a INH analizadas en este estudio, cuatro presentaron mutaciones en el gen *katG* (S315T), tres en la región promotora de *inhA*, y en una se encontraron ambas. La susceptibilidad a moxifloxacin fue semejante en todas las cepas, incluida la salvaje. Las cuatro con mutaciones en *katG* mostraron, en comparación con la cepa H37Rv, una gran resistencia a INH pero ninguna resistencia a piridomicina, mientras que la mutación en el promotor *inhA* produjo una resistencia intermedia a INH y un aumento en la resistencia a piridomicina. Así pues, los mutantes *katG* (S315T), que son los que producen con mayor frecuencia resistencias a INH retienen totalmente la sensibilidad frente a piridomicina. También se ha demostrado en este trabajo que este antibiótico es un fármaco que no requiere ser bioactivado, y que la inhibición de InhA que origina tiene las mismas consecuencias bioquímicas que produce INH: la reducción de la síntesis de ácidos micólicos.

En resumen, la cepa resistente PYR7 con la mutación D148G en InhA, no muestra resistencia cruzada a isoniazida ni a etionamida mientras que, por el contrario, la mutación S94A responsable de la resistencia a isoniazida mantiene la sensibilidad a la piridomicina. Esto sugiere que ambos compuestos son inhibidores competitivos de NADH y que se enlazan al mismo bolsillo pero de diferente forma. También tiene interés la ausencia de resistencia cruzada con triclosán, porque demuestra que se puede inhibir la enzima de varias maneras sin que se produzcan resistencias cruzadas.

La definición a nivel molecular del enlace entre la piridomicina y la enzima InhA no ha sido posible de forma directa hasta el momento, porque a pesar de un ingente trabajo no se ha encontrado todavía una técnica que permita la obtención

de cristales de InhA, NADH y piridomicina útiles para el estudio del complejo formado por difracción de rayos X. Lo que sí se ha resuelto es la estructura cristalina del complejo InhA (D148G):NADH, la cual se ha comparado con las de los complejos InhA:(NADH) e InhA (S94A):NADH. Superponiendo las tres estructuras, se ha observado que en InhA (D148G):NADH la cadena lateral del residuo Phe149 está rotada alrededor de 90°. Sin embargo, si se superpone la estructura de los complejos InhA (D148G):NADH e InhA:NADH:INH los residuos Phe149 ocupan la misma posición, lo que explica por qué la enzima mutada resistente a piridomicina [InhA(D148G)] es todavía sensible y puede ser inhibida por INH. La rotación de Phe149 origina la apertura de un canal que permite la adición de dos moléculas de agua en el sitio activo y un aumento en la distancia entre NADH y el anillo de Phe149, con la consiguiente disminución de la afinidad por el cofactor, lo que está de acuerdo con los estudios cinéticos. Estos cambios estructurales podrían también explicar la menor sensibilidad a piridomicina de InhA(D148G) comparada con la de la enzima salvaje, puesto que NADH y piridomicina comparten el mismo bolsillo de enlace.

Conclusión

Desentrañar los hechos que afectan a los complejos procesos biológicos, incluyendo los que se originan como consecuencia de la acción de los fármacos, es con frecuencia lenta y penosa, aunque en los últimos años se están produciendo avances mucho más rápidos gracias fundamentalmente al uso de herramientas genómicas. Sin embargo, la enorme cantidad de información que se va adquiriendo no se refleja todavía con la velocidad que sería deseable en la aparición de nuevas terapias.

Hoy sabemos que las dianas para los fármacos antituberculosos son escasas, y que la más importante parece ser InhA (31), siendo la piridomicina el producto natural más potente para inhibirla.

Una vez más, se pone de manifiesto la importancia de los productos naturales como fuente de nuevos fármacos, posiblemente porque aquéllos son el resultado de una selección a lo largo de la evolución de las especies. Esperemos que este importante estudio permita desarrollar un nuevo fármaco para resolver, al menos por un tiempo, el tratamiento de MDRTB.

Referencias

1. Schatz, A.; Waksman, S. A.; (1944) "Effect of streptomycin and other antibiotic substances on *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57, 244-248.

2. Chorine, V.; (1945) "Action of nicotinamide on bacilli of the species *Mycobacterium*", C. R. Acad. Sci. 220, 150-151.
3. Fox, H. H.; (1952) "The chemical approach to the control of tuberculosis", Science 116, 129-134.
4. Vilchèze, C.; Jacobs, W. R.; (2007) "The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics", Annu. Rev. Microbiol., 61, 35-50.
5. Winder, F. G.; Collins, P. B.; (1970) "Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*", J. Gen. Microbiol. 63, 41-48.
6. Takayama, K.; Wang, L.; David, H. L.; (1972) "Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*", Antimicrob. Agents Chemother. 2, 29-35.
7. Davidson, L. A.; Takayama, K.; (1979) "Isoniazid inhibition of the synthesis of monounsaturated long-chain fatty acids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra", Antimicrob. Agents Chemother. 16, 104-105.
8. Middlebrook, G.; (1954) "Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli", Am. Rev. Tuberc., 69, 471-472.
9. Saroja, D.; Gopinathan, K. P.; (1973) "Transduction of isoniazid susceptibility-resistance and streptomycin resistance in mycobacteria", Antimicrob. Agents Chemother., 4, 643-645.
10. Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S.; (1992) "The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*"; Nature, 358, 591-593.
11. Jonson, K.; Schultz, P. G.; (1994) "Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*", J. Am. Chem. Soc., 116, 7425-7426.
12. Lei, B.; Wei, C. J.; Tu, S. C.; (2000) "Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of inhA inhibitor", J. Biol. Chem., 275, 2520-2526.
13. Winder, F.; (1960) "Catalase and peroxidase in mycobacteria. Possible relationship to the mode of action of isoniazid", Am. Rev. Respir. Dis., 81, 68-78.
14. Hok, T. T.; (1964) "A comparative study of the susceptibility to ethionamide, thiosemicarbazone, and isoniazid of tubercle bacilli from patients never treated with ethionamide or thiosemicarbazone", Am. Rev. Respir. Dis., 90, 468-469.
15. Larsen, M. H.; Vilcheze, C.; Kremer, L.; Besra, G. S.; Parsons, L.; et al.; (2002) "Overexpression of inhA, but not kasA, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*", Mol. Microbiol., 46, 453-466.
16. Morlock, G. P.; Metchock, B.; Sikes, D.; Crawford, J. T.; Cooksey, R. C.; (2003) "*ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates", Antimicrob. Agents Chemother., 47, 3799-3805.
17. Parikh, S. L.; Xiao, G.; Tonge, P. J.; (2000) "Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid", Biochemistry, 39, 7645-7650.
18. Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C.; (1998) "Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*", Science 279, 98-102.
19. Mdluli, K.; Slayden, R. A.; Zhu, Y.; Ramaswamy, S.; Pan, X.; et al.; (1998) "Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid", Science, 280, 1607-1610.
20. Argyrou, A.; Vetting, M. W.; Aladegbami, B.; Blanchard, J. S.; (2006) "*Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase is a target for isoniazid", Nat. Struct. Mol. Biol., 13, 408-413.
21. Timmins, G. S.; Master, S.; Rusnak, F.; Deretic, V.; (2004) "Nitric oxide generated from isoniazid activation by KatG: source of nitric oxide and activity against *Mycobacterium tuberculosis*"; Antimicrob. Agents Chemother., 48, 3006-3009.
22. Vilcheze, C.; Wang, F.; Arai, M.; Hazbon, M. H.; Colangeli, R.; et al.; (2006) "Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* inhA resolves the target of isoniazid", Nat. Med., 12, 1027-1029.

23. Kruh, N. A.; Rawat, R.; Ruzsicska, B. P.; Tonge, P. J.; (2007) "Probing mechanisms of resistance to the tuberculosis drug isoniazid: Conformational changes caused by inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*", *Protein Science*, 16, 1617-1627.
24. Vilcheze, C.; Weisbrod, T. R.; Chen, B.; Kremer, L.; Hazbon, M. H.; et al.; (2005) "Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 708-720.
25. Hartkoorn, R. C.; Sala, C.; Neres, J.; Pojer, F.; Magnet, S.; Mukherjee, R.; Uplekar, S.; Boy-Röttger, S.; Altmann, K.-H.; Cole, S. T.; (2012) "Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin-nature's isoniazid", *EMBO Mol. Med.*, 4, 1-11.
26. Glaziou, P.; Floyd, K.; Raviglione, M.; (2009) "Global burden and epidemiology of tuberculosis", *Clin. Chest Med.*, 30, 621-636.
27. Maeda, K.; Kosaka, H.; Okami, Y.; Umezawa, H.; (1953) "A new antibiotic, pyridomycin", *J. Antibiot.*, 7, 140.
28. Shomura, T.; Amano, S.; Yoshida, J.; Kojima, M.; (1986) "*Dactylosporangiurn fulvum* sp. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 166-169.
29. Huang, T.; Wang, Y.; Yin, J.; Du, Y.; Tao, M.; et al.; (2011) "Identification and Characterization of the Pyridomycin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517", *J. Biol. Chem.*, 286, 20648-20657.
30. Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; et al; (1998) "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence", *Nature*, 393, 537-544.
31. Lamichhane, G.; (2011) "Novel targets in *M. tuberculosis*: search for new drugs", *Trends Mol. Med.*, 17, 25-33.