

Bioequivalencia de dos formulaciones de amoxicilina-ácido clavulánico para uso oral en perros

Bioequivalence of two amoxicillin-potassium clavulanate oral preparations in dogs

Sayuri Hayashida* Lilia Gutiérrez* Jorge Luna del Villar**
Fernando Osnaya*** Héctor Sumano*

Abstract

The aim of this trial was to carry out a bioequivalence (BE) study in dogs using a generic preparation of amoxicillin-potassium clavulanate vs a commercially available reference preparation, both claiming to achieve plasma concentrations that allow a 12 h dosing interval after oral administration. The oral pharmacokinetic profiles of a single dose of each preparation were carried out in 12 adult mongrel dogs in a crossover model with a 10 day washout period at a dose of 12.5 mg/kg of trihydrate amoxicillin and potassium clavulanate as tablets. A composite determination of amoxicillin-potassium clavulanate concentration in each sample of plasma was carried out in triplicate, using a microbiological agar diffusion analysis. Pharmacokinetic analysis was carried out with a non-compartmental model. Statistical analysis of pharmacokinetic variables was carried out by ANOVA and Bonferroni t test, setting a $P < 0.05$. In accordance with international standards, it was found that the generic preparation failed to be bioequivalent, i.e: $AUC_{0-\infty} 9.08 \pm 0.26 \mu\text{g h/ml}$ and $C_{\text{max}} 5.48 \pm 0.19 \mu\text{g/ml}$ for the generic preparation vs $AUC_{0-\infty} 13.28 \pm 0.30 \mu\text{g h/ml}$ and $C_{\text{max}} 2.9 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$ for the reference one. A $0.25 \mu\text{g/ml}$ breakpoint can be set as minimum effective plasma concentration for amoxicillin; hence the generic preparation requires a dose interval of eight h.

Key words: AMOXICILLIN, CLAVULANATE ACID, β -LACTAM, DOGS, PHARMACOKINETICS, TABLETS.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la bioequivalencia entre dos preparados comerciales de amoxicilina-ácido clavulánico disponibles en forma de tableta para uso oral en perros, y cuyo intervalo de dosificación indicado por los fabricantes es de 12 horas. Se calculó el perfil farmacocinético de cada preparado, a una dosis oral de 12.5 mg/kg de amoxicilina y ácido clavulánico en doce perros adultos mediante un modelo cruzado. Se determinó la concentración activa de la combinación de ambos fármacos en cada muestra de plasma, utilizando un método de análisis microbiológico por difusión en agar. El cálculo farmacocinético se llevó a cabo con un modelo no compartamental y los valores obtenidos se analizaron mediante un ANDEVA y prueba T de Bonferroni, con una $P < 0.05$. Tomando en cuenta las pautas internacionales, la formulación genérica resultó no ser bioequivalente a la de referencia. Esto es, se obtuvieron valores de $AUC_{0-\infty} 9.08 \pm 0.26 \mu\text{g h/ml}$ y $C_{\text{max}} 5.48 \pm 0.19 \mu\text{g/ml}$ para el genérico vs $AUC_{0-\infty} 13.28 \pm 0.30 \mu\text{g h/ml}$ y $C_{\text{max}} 2.9 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$ para el de referencia. Si se considera un punto de inflexión para bacterias susceptibles, de $0.25 \mu\text{g/ml}$, el preparado genérico requiere un intervalo de dosificación de ocho horas.

Palabras clave: AMOXICILINA, ÁCIDO CLAVULÁNICO, BETA-LACTÁMICOS, PERROS, FARMACOCINÉTICA, TABLETAS.

Recibido el 27 de julio de 2010 y aceptado el 19 de mayo de 2011.

*Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, Coyoacán, 04510, México, D.F.

**Departamento de Clínica y Cirugía en Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, Coyoacán, 04510, México, D.F.

***Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, 54714, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Autor responsable de correspondencia: Dr. Héctor Sumano, Tel.: + 52 55 56-22-59-80, Fax: + 52 55 56-22-59-80, Correo electrónico: sumano@servidor.unam.mx

Introduction

Nowadays, β -lactam antibiotics are frequently used in small animal clinic. Amoxicillin (AMX) is especially used to treat some respiratory, urinary and skin infections.¹ A strategy to mitigate the development of bacterial strains resistant to amoxicillin consists of administering it in combination with clavulanic acid (in its stable form, potassium clavulanate [PC]). This molecule forms complexes that irreversibly inactivate β -lactamases produced by bacteria, by means of covalent links.^{2,4} In numerous species, including humans, AMX and PC have similar pharmacokinetic behavior, in particular the biological half-life ($T^{1/2B}$) = 1.27 ± 0.20 h; 1.03 ± 0.1 h, respectively. Time to reach maximum plasma concentration (T_{max}) = 1.50 h and 1.03 h for AMX and PC, respectively,⁵ which shows that they represent an adequate congruent pharmacokinetic combination against a great variety of bacterial strains.⁶

For some time, conventional formulas of AMX/PC were administered to humans at a dose of 500/125 mg, three times a day.⁷ Thereafter, preparations indicated to be administered every 12 hours were introduced with great success in the market. In the case of the veterinary area, a commercially available formulation for dogs* is indicated by the manufacturer to be administered twice a day with a dose of 12.5 mg/kg. Even though the pharmaceutical company does not specify it, such dosage interval implies that it is a modified release system, which makes possible such dosage interval. After an extended research in formal literature, through a digital data base, (Agricola, MedLine, VETCD, Agris, and others) no studies were found describing oral pharmacokinetics of AMX/PC extended release formulations for dogs, as there are in humans.^{5,8} Although there are pharmacokinetic studies for conventional tablets.^{6,7}

On the other hand, it is worth pointing out that a notable decrease in AMX absorption capacity has been observed in distal parts of the gastrointestinal tract (GIT)⁹ and it is probable that this characteristic is also present in dogs. Nevertheless, differences between humans and dogs regarding gastric emptying, gastrointestinal transit and pH variation in different segments,^{10,11} could cause modifications of great importance in the rate of absorption of both drugs. Consequently, extrapolation of an extended release formula of AMX/PC for human use may not produce in dogs the same favorable profiles obtained with these antibiotics considered time-dependants.⁵ Frequently, small animal clinicians choose a branded formulation of AMX/PC based on price, without taking into account interchangeability and bioequivalence criteria, requi-

Introducción

En la actualidad los antibióticos β -lactámicos son utilizados con frecuencia en la clínica de pequeñas especies. Especialmente se recurre a la amoxicilina (AMX) para tratar algunas infecciones respiratorias, urinarias y de piel.¹ Una estrategia para mitigar el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a la amoxicilina consiste en administrarla en combinación con ácido clavulánico (en su forma estable, clavulanato de potasio [PC]). Éste forma complejos que inactivan de forma irreversible las β -lactamasas producidas por bacterias, por medio de enlaces covalentes.^{2,4} En numerosas especies, incluyendo humanos, la AMX y el PC tienen un comportamiento farmacocinético similar, es decir, vida media de eliminación ($T^{1/2B}$) = 1.27 ± 0.20 h; 1.03 ± 0.1 h, respectivamente. Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima (T_{max}) = 1.50 h y 1.03 h para AMX y PC respectivamente,⁵ lo que demuestra que representan una combinación congruente farmacocinéticamente adecuada contra una gran variedad de cepas bacterianas.⁶

Durante algún tiempo, las formulaciones convencionales de AMX/PC se administraban en humanos a una dosis de 500/125 mg, tres veces por día.⁷ Posteriormente se introdujeron preparaciones indicadas para su administración cada 12 horas con gran éxito en el mercado. En el caso del área veterinaria, una formulación comercialmente disponible para perros* está indicada por el fabricante para ser administrada dos veces al día a una dosis de 12.5 mg/kg. A pesar de que la compañía farmacéutica no lo especifica, dicho intervalo de dosificación implica que se trata de un sistema de liberación modificada, que hace posible el intervalo de dosificación dicho. Luego de una amplia búsqueda en la literatura formal, a través de bases de datos digitales (Agricola, MedLine, VETCD, Agris, y otras) no se encontraron estudios que describan la farmacocinética oral de preparados de AMX/PC de larga acción en perros, como ocurre en humanos.^{5,8} A pesar de que sí existen estudios farmacocinéticos de tabletas convencionales.^{6,7}

Por otro lado, es importante destacar que se ha observado una notable disminución en la capacidad de absorción de la AMX en las partes distales del tubo gastrointestinal (TGI)⁹ y es probable que esta característica también se presente en perros. Sin embargo, las diferencias entre humanos y perros en cuanto al tiempo de vaciamiento gástrico, tránsito gastrointestinal y variación del pH en los diferentes segmentos,^{10,11} podría causar modificaciones de gran importancia en la tasa de absorción de ambos fármacos. Como conse-

*Clavamox®, Pfizer, Mexico.

site still not demanded in some countries. In Mexico, for example, up to date with this work, bioequivalence studies were still not obligatory for drug registration; therefore, classification of the generic was not real in many cases, as also observed in other developing countries.

Based on the aforementioned, the aim of this study was to define AMX/PC plasma concentration active fractions from the reference* preparation and compare obtained data in a bioequivalence study, against a generic preparation, both prescribed in dogs two times a day.

Material and methods

This work was done under the Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 guidelines, in the Departamento de Fisiología y Farmacología of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Nacional Autónoma de México. The pharmacokinetic analysis was carried out after an oral dose (OD) of 12.5 mg/kg of AMX/PC (in a proportion of 4:1) in twelve mongrel dogs, by a cross model (6 x 6). Commercial preparations were obtained directly from a distributor, this is: reference group (RG) with Clavamox®** and generic group (GG) with a preparation whose manufacturer did not authorized to reveal its commercial name, but it is a pharmaceutical specialty commercialized in Mexico.

Oral administration of each preparation was carried out using a piece of approximately 5 g of commercial sausage to hide the tablets in its interior. Twelve mongrel dogs clinically healthy, from three to nine years old (7 males and 5 females) and with an average weight of 17.3 ± 1.8 kg were used. Animals were dewormed with a commercial product of ivermectin-praziquantel*** and were fed *ad libitum* with a dry formula for adults† and for 15 days they were allowed to adapt to their new environment in individual cages of 2 x 3 m, with free access to fresh water and food. The study was design as a cross model (6 x 6) with a washout period of 10 days.

With the aim to decrease variations in absorption rate, all animals were deprived of food eight hours before and one after administration. Each dog was weighed before dosing and commercial tablets of 250 mg of AMX/PC were adjusted to each dog's weight, using a razor blade to scrap off excess. The established dose was 12.5 mg/kg of AMX and PC, as suggested by the reference product manufacturer.

A 3 inch no. 20* heparin coated catheter was placed in the cephalic vein of each dog and an Elizabethan collar was placed to avoid removal of the catheter. Three ml of blood were obtained in the following sam-

plasma, la simple extrapolación de una formulación de AMX/PC de larga acción utilizada en humanos, podría no producir en perros los mismos perfiles favorables que se obtienen en plasma con estos antibióticos considerados tiempo-dependientes.⁵ Con frecuencia, los clínicos de pequeñas especies eligen una marca de preparados de AMX/PC con base en consideraciones de costo, sin tomar en cuenta criterios de intercambiabilidad y bioequivalencia, requisito que aún no se exige en algunos países. En México, por ejemplo, a la fecha de realización de este trabajo, los estudios de bioequivalencia todavía no eran obligatorios para registrar un medicamento, por lo que la clasificación de genérico no era real en muchos casos, como se observa también en otros países en desarrollo.

Por lo antes mencionado, el objetivo de este estudio es definir la concentración plasmática de las fracciones activas de AMX/PC del preparado de referencia* y comparar los datos obtenidos en un estudio de bioequivalencia, contra un preparado genérico, ambos indicados dos veces al día en perros.

Material y métodos

Este trabajo se llevó a cabo bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, dentro de las instalaciones del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El análisis farmacocinético se realizó después de una dosis oral (PO) de 12.5 mg/kg de AMX y PC (en una proporción de 4:1) en doce perros mestizos, mediante un modelo cruzado (6 x 6). Las formulaciones comerciales se obtuvieron directamente de un distribuidor, esto es, el grupo de referencia (GR) con Clavamox® y el grupo genérico (GG) con un preparado cuyo fabricante no autorizó que se revelara el nombre comercial, pero sí es una especialidad farmacéutica comercializada en México.

La administración oral de cada preparado se llevó a cabo utilizando una pieza de aproximadamente 5 g de salchicha comercial para ocultar las tabletas en su interior. Se utilizaron doce perros mestizos clínicamente sanos cuya edad osciló entre los 3 y 9 años (7 machos y 5 hembras) y cuyo peso promedio fue de 17.3 ± 1.8 kg. Los animales fueron desparasitados con un producto comercial de ivermectina-praziquantel** y se les alimentó con una fórmula seca para adultos*** *ad libitum*, y durante 15 días se les permitió adaptarse a su nuevo entorno en jaulas individuales de 2 x 3 m, con acceso libre a agua fresca y alimento. El estudio se

*Clavamox™, Pfizer Animal Health.

**Pet-Gard® Cpmax Pharmaceuticals, Mexico.

***Pedigree® Mars Incorporated, México.

pling times post-administration: 0.16, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 12 h. Blood samples were immediately centrifuged at 3 000 g, plasma from each tube was collected, identified and frozen in liquid nitrogen for 5 days, until its analysis. The AMX/PC concentration/activity was determined in each plasma sample by triplicate, using the qualitative/quantitative agar diffusion analysis, described by Bennett *et al.*,¹² which measures concentration in terms of *in vitro* antibacterial activity of the drug or combination. A sensitive strain of *Bacillus subtilis* was used as control microorganism, at 5×10^5 cfu/ml concentration in Müller-Hinton** agar, enriched with 0.1 ml of dog plasma as standard sample.

The achieved percent recovery by this technique was $98 \pm 2.5\%$. The quantification limit was $0.07 \mu\text{g/ml}$, corresponding to an inhibition halo of 9.9 mm in diameter, and was measured with an electronic caliper. This value corresponds to the lower limit of the calibration line, whose correlation coefficient of AMX/PC standard solution (4:1) was 0.98, calculated by linear regression with Origin Pro 8 program (OriginLab Corporation, Northampton, MA 01060). Inter and intra assay coefficients of variation were 5 and 6%, respectively. Data are expressed as the mean $\pm$ 1 standard deviation. The pharmacokinetic analysis was carried out with a non-compartmental model, using WinNonlin program (Pharsight Corporation, Mountain View, CA 94041). The area under concentration *vs* time curve ($\text{AUC}_{0-\infty}$) was calculated using trapezoidal linear rule. Maximum plasma concentration (C_{max}), mean retention time (MRT) and T_{max} were obtained directly from the program. Relative bioavailability (Fr) was calculated from the formula: $\text{AUC}_{0-\infty} \text{GG} / \text{AUC}_{0-\infty} \text{RG} \times 100$. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of twelve observations per variable and the statistical analysis of pharmacokinetic variables was carried out by an analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni t-test, using the computer program JMP (JMP Statistic Mode Visual 1989-1995 SAS Institute Inc. Version 3.1.6.2, SAS Campus Drive Cary, N.C. 27513) with an established probability of $P < 0.05$.

The established limits to declare bioequivalence in veterinary products by international standards state that there is bioequivalence when, under the same experimental conditions, mean value differences of AUC and C_{max} of both products remain between 0.8 – 1.25, with a confidence interval of 90%.¹³⁻¹⁵

Results

Figure 1 shows average values of active concentration (here referred to as concentration) of AMX and PC *vs* time, after oral administration of 12.5 mg/kg of AMX

diseñó como un modelo cruzado (6×6) con un periodo de depuración de 10 días.

Con la finalidad de disminuir las variaciones de la tasa de absorción, todos los animales fueron privados de alimento desde ocho horas antes y hasta una hora después de la dosificación. Se pesó a cada perro antes de la dosificación y se ajustaron las tabletas comerciales de 250 mg de AMX/PC al peso de cada perro, utilizando una navaja para raspar el excedente. La dosis establecida fue de 12.5 mg/kg de AMX y PC, como lo recomienda el fabricante del producto de referencia.

En la vena cefálica de cada perro se colocó un catéter heparinizado núm. 20,* de 3 pulgadas y se les colocó un collar isabelino para evitar que se retiraran el catéter. Se obtuvieron 3 ml de sangre en los siguientes tiempos de muestreo pos-administración: 0.16, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 12 h. Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente a 3000 g, se recolectó el plasma de cada tubo, se identificaron y se congelaron en nitrógeno líquido durante 5 días, hasta su análisis. La concentración/actividad de AMX/PC se determinó en cada muestra de plasma por triplicado, utilizando el análisis cuantitativo/cualitativo de difusión en agar, descrito por Bennett *et al.*,¹² el cual mide la concentración en términos de la actividad antibacteriana *in vitro* del fármaco o combinación. Se utilizó una cepa sensible de *Bacillus subtilis* como microorganismo de referencia, a una concentración de 5×10^5 ufc/ml en agar Müller-Hinton,** enriquecido con 0.1 ml de plasma de perro como muestra estándar.

El porcentaje de recuperación logrado con esta técnica fue de $98 \pm 2.5\%$. El límite de cuantificación fue de $0.07 \mu\text{g/ml}$, que corresponde a un halo de inhibición de 9.9 mm de diámetro, y se midió con un calibrador electrónico. Este valor corresponde al límite inferior de la línea de calibración, cuyo coeficiente de correlación de la solución estándar de AMX/PC (4:1) fue de 0.98, calculado mediante regresión lineal con el programa Origin Pro 8 (OriginLab Corporation Northampton, MA 01060). Los coeficientes de variación inter e intra-ensayo fueron de 5 y 6%, respectivamente. Los datos se expresan como la media $\pm$ 1 desviación estándar. El análisis farmacocinético se llevó a cabo como un modelo no-compartmental, utilizando el programa WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View CA 94041). El área bajo la curva concentración *vs* tiempo ($\text{AUC}_{0-\infty}$) se calculó utilizando la regla trapezoidal lineal. Los valores de la concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo de residencia media (MRT) y T_{max} se obtuvieron directamente del programa. La biodisponibilidad relativa (Fr) se calculó a partir de la fórmula: $\text{AUC}_{0-\infty} \text{GG} / \text{AUC}_{0-\infty} \text{RG} \times 100$. Los datos se expresan como la media $\pm$ desviación estándar

*Becton Dickinson®, México.

**Merck, México.

and PC from reference and generic preparations. Table 1 shows the mean values $\pm$ 1 standard deviation of the obtained pharmacokinetic variables, and statistically significant differences between them.

After oral administration of the preparations, AMX/PC plasma profiles showed a combined maximum antimicrobial activity, after four hours in generic preparation and 2.9 h in the reference. However, a strong decline in the generic preparation concentration was observed after four hours, while in the reference one a slight drop was shown. The AUC values were statistically different with a greater value for the reference preparation ($P < 0.05$).

Discussion

The microbiological method of agar diffusion is considered feasible to determine plasma concentrations of AMX and PC joint action, if plasma samples are kept frozen in liquid nitrogen before being processed in a period of time no longer than four weeks to avoid degradation. However, it is evident that the numeric values obtained in this study may differ from other analyses where chromatographic methods were used, since in this study the concentration was determined in function of AMX and PC compound antimicrobial activity. PC antimicrobial activity is null by itself, but its joint activity with AMX may generate AMX plasma concentration data different to the ones found chro-

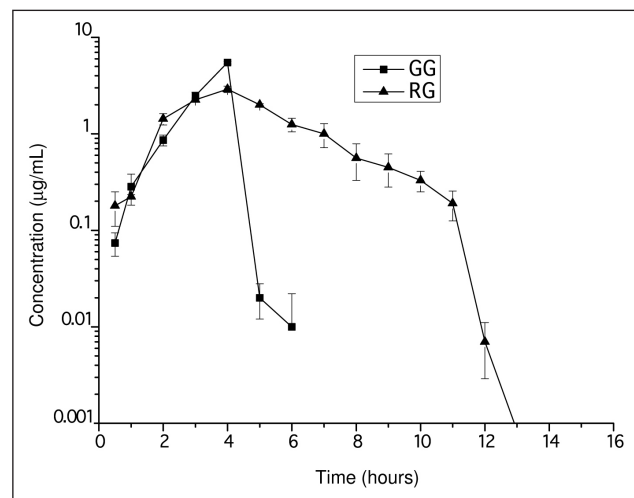


FIGURA 1. Promedio $\pm$ 1 DE de los perfiles de la actividad microbiológica expresados como concentraciones plasmáticas *vs* tiempo de los preparados de amoxicilina/clavulanato genérico y de referencia en perros criollos adultos posteriores a la administración de una dosis de 12.5 mg/kg de la mezcla.

FIGURE 1. Average $\pm$ 1 SD of microbiological activity profiles expressed as plasma concentrations *vs* time of generic and reference amoxicillin/clavulanate preparations in adult mongrel dogs after one dose of 12.5 mg/kg of the preparation.

de doce observaciones por variable y el estadístico de las variables farmacocinéticas se llevó a cabo por medio de un análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de t de Bonferroni, utilizando el programa de cómputo JMP (JMP Statistic Mode Visual 1989-1995 SAS Institute Inc. Version 3.1.6.2, SAS Campus Drive Cary, N.C. 27513) con una probabilidad establecida en $P < 0.05$.

Los límites para declarar bioequivalencia en productos veterinarios establecidos por los estándares internacionales determinan que la bioequivalencia existe si bajo las mismas condiciones experimentales, los valores medios de las diferencias de AUC y $C_{\max}$ de ambos productos, permanecen entre 0.8 – 1.25, con un intervalo de confidencialidad de 90%.¹³⁻¹⁵

Resultados

En la Figura 1 se presentan los valores promedio de la concentración activa (referido aquí como concentración) de AMX y PC *vs* tiempo, después de la administración oral de 12.5 mg/kg de AMX y PC a partir del preparado de referencia y del genérico. En el Cuadro 1 se muestran los valores promedio $\pm$ 1 desviación estándar de las variables farmacocinéticas obtenidas, y las diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Los perfiles plasmáticos de AMX/PC después de la administración oral de los preparados, mostraron una actividad antimicrobial combinada máxima, después de cuatro horas en la formulación genérica, y 2.9 h en la de referencia. No obstante, después de las cuatro horas se observó un fuerte declive en la concentración del preparado genérico, mientras que en el de referencia se percibe una caída más suave. Los valores de AUC fueron estadísticamente diferentes con un valor mayor para el preparado de referencia ($P < 0.05$).

Discusión

Se considera viable el método microbiológico de difusión en agar para determinar las concentraciones plasmáticas de la acción conjunta de AMX y PC, si las muestras de plasma se mantienen congeladas en nitrógeno líquido antes de ser procesadas en un lapso de no más de cuatro semanas para evitar su degradación. No obstante, es evidente que los valores numéricos obtenidos en este estudio pueden diferir de otros análisis en los que se utilizaron métodos cromatográficos, dado que en este estudio se determinó la concentración en función de la actividad antimicrobiana compuesta de la AMX y PC. La actividad antimicrobiana del PC es nula por sí sola, pero su actividad conjunta con AMX puede generar datos de concentración plasmática de AMX que difieren de los encontrados cro-

matographically. Nevertheless, since this method only quantifies active fraction or fractions of the drug or drug combination, it reveals a clear image of the antimicrobial properties of the combination in the context of its joint pharmacokinetic profile. Considering the aforementioned and the fact that values of inter and intra-assay in this work was notably low, it can be concluded that the obtained results are reliable and repeatable. Based on this fact and established criteria by European Medicines Agency (EMA), for determining when two pharmaceutical products are or not bioequivalent,¹³⁻¹⁵ it is feasible to state that the generic preparation tested is not bioequivalent to the reference preparation. This is, on its own, an important result from the pharmacovigilance point of view, likewise, a potentially useful finding for small animal clinics when clinical results are evaluated. Mean values of $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} of the generic preparation were 31.6% lower and 52.9% higher than the corresponding values to reference preparation ($AUC_{0-\infty} = 13.28 \text{ hr } \mu\text{g/ml}$ and $C_{max} = 2.9 \text{ } \mu\text{g/ml}$ for the reference preparation and $AUC_{0-\infty} = 9.08 \pm 0.26$ and $C_{max} = 5.48 \pm 0.21 \text{ } \mu\text{g/ml}$ for the generic preparation).

The observed differences allow some considerations: for example, the pharmacokinetic behavior of amoxicillin and factors that modulate its concentration *vs* time profile are essential to obtain a maximum clinical efficacy considering its pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relation. That is, the joint action of AMX/PC expressed as concentration, must be kept in plasma above minimum inhibitory concentration (MIC), at least during 50% of dosage interval, since there is evidence for β -lactams that the maximum clinical

matográficamente. Sin embargo, ya que este método sólo cuantifica la fracción o fracciones activas del fármaco o combinación de fármacos, revela una imagen clara de las propiedades antimicrobianas de la combinación en el contexto de su perfil farmacocinético conjunto. Considerando lo anterior y el hecho de que los valores de la variación inter e intra-ensayo obtenidos en este estudio fueron notablemente bajos, puede concluirse que los resultados conseguidos son confiables y repetibles. Tomando como base este hecho y los criterios establecidos por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), para determinar cuándo dos productos farmacéuticos son bioequivalentes o no,¹³⁻¹⁵ es factible afirmar que la preparación genérica probada no es bioequivalente al preparado de referencia. Este es, por sí mismo, un resultado importante desde el punto de vista de farmacovigilancia y, de igual manera, un hallazgo potencialmente útil para los clínicos de pequeñas especies cuando se evalúan los resultados clínicos. Los valores medios de $AUC_{0-\infty}$ y C_{max} del preparado genérico fueron 31.6% más bajos y 52.9% más altos que los valores correspondientes al preparado de referencia ($AUC_{0-\infty} = 13.28 \text{ hr } \mu\text{g/ml}$ y $C_{max} = 2.9 \text{ } \mu\text{g/ml}$ para el preparado de referencia y $AUC_{0-\infty} = 9.08 \pm 0.26$ y $C_{max} = 5.48 \pm 0.21 \text{ } \mu\text{g/ml}$ para el preparado genérico).

Las diferencias observadas permiten algunas consideraciones, por ejemplo, el comportamiento farmacocinético de la amoxicilina y los factores que modulan su perfil concentración *vs* tiempo son esenciales para obtener una eficacia clínica máxima considerando su relación farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD). Esto es, la acción conjunta de AMX/PC expresada

CUADRO 1

Variables farmacocinéticas de las concentraciones plasmáticas *vs* tiempo de los preparados de amoxicilina/clavulanato genérico (GG) y de referencia (GR) en perros criollos adultos posteriores a la administración de una dosis de 12.5 mg/kg

Pharmacokinetic variables of plasma concentrations *vs* time of generic (GG) and reference (RG) amoxicillin/clavulanate preparations in adult mongrel dogs after administering one dose of 12.5 mg/kg

Pharmacokinetic variable	Amoxicillin/clavulanate	
	GR	GG
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	13.28 ± 0.34^a	9.08 ± 0.26^b
MRT (h)	4.82 ± 0.07^a	3.45 ± 0.24^b
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	2.90 ± 0.17^a	5.48 ± 0.21^b
T_{max} (h)	4.0 ± 0.03^a	4.0 ± 0.13^a
Fr (%)	68.44	

^{a, b} Different letters mean different statistics between columns ($P < 0.05$).

AUC = Area under concentration *vs* time; MRT = Mean retention time; C_{max} = Maximum plasma concentration; T_{max} = Time to achieve maximum plasma concentration; Fr = Relative bioavailability.

cal effect is reached when plasma concentrations are kept above MIC for 70% of the dosage interval.¹⁶ This is no simple task, when considering that in conventional preparations of these drugs, $T_{1/2\beta}$ is very short, for example: according to Arancibia *et al.*,¹⁷ AMX has a $T_{1/2\beta}$ of one hour approximately in humans; Marier *et al.*¹⁸ recorded the same in dogs. Furthermore, AMX absorption is limited in the first segments of the GIT.⁹ Therefore, AMX/PC preparations must be capable of releasing active principles in proximal parts of the GIT, without being distally dragged by peristaltic movements. Thus, absorption will be carried out in stomach and particularly in duodenum.⁸ However, if total antibiotic is released towards the duodenum in a short period of time, alkaline pH of this medium will inactivate most of the AMX available,¹⁹ besides, if this would not happened, it is known that AMX has a saturable absorption, mediated by specific carrier proteins for AMX, and apparently specific for aminopenicillins, called PepT1, which are expressed in enterocyte brush borders in small intestine,^{20,21} and can only absorb part of the AMX that arrives at the duodenum.

One of the most critical problems that reduces AMX absorption rate from extended release preparations, is food transit through the GIT. It has been demonstrated that under fasting conditions, AMX/PC preparations are cleared much faster than when administered at the beginning of a carbohydrate rich meal.²² Considering the peculiarities presented by AMX/PC absorption in the GIT, it is not risky to point out that interaction of the two drugs with adequate vehicles is essential to obtain preparations with greater gastro-retentive capacities achieving to release small fractions of active principles in a prolonged way to be absorbed by the stomach and above all by the duodenum,⁸ with the aim to achieve pharmacokinetic profiles in accord to the pharmacodynamics of this combination.

If MIC is established in ≤ 0.25 $\mu\text{g/ml}$, based on standard values for the inflection point established by the *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI* (before *NCCLS*)²³ for pathogenic bacteria causing respiratory and skin infections in dogs,²⁴⁻²⁶ then the minimum effective concentration (MEC) of 2-4 times the value for amoxicillin would be 0.5 $\mu\text{g/ml}$.^{27,28} Ideally, this MEC should be maintained for at least 50-70% of the dosage interval.¹⁶ Under such perspective, the generic preparation must be administered three times a day, while the reference preparation could be administered every 12 hours, since it reaches plasma concentrations of antimicrobial activity during such dosage interval. However, for treating less susceptible microorganisms, higher plasma concentrations are required to comply with the optimal PK/PD relation, that is, two times previous MIC value (0.5 $\mu\text{g/ml}$).²⁸ In those cases, obtained

como concentración, debe mantenerse en el plasma por arriba de la concentración mínima inhibitoria (CMI), por lo menos durante 50% del intervalo de dosificación, ya que existe evidencia para β -lactámicos, de que el máximo efecto clínico se alcanza cuando las concentraciones plasmáticas se mantienen arriba del nivel de la CMI durante 70% del intervalo de dosificación.¹⁶ Esta no es una meta sencilla, si se considera que la $T_{1/2\beta}$ de estos fármacos en las formulaciones convencionales es muy corta, por ejemplo; la AMX de acuerdo con Arancibia *et al.*,¹⁷ tiene una $T_{1/2\beta}$ de aproximadamente una hora en humanos; Marier *et al.*¹⁸ registran lo mismo en perros. Además, la absorción de la AMX se ve limitada a los primeros segmentos del TGI.⁹ Por lo tanto, las formulaciones de AMX/PC deben ser capaces de liberar los principios activos en las partes proximales del TGI, sin ser arrastrados distalmente por los movimientos peristálticos. De este modo, la absorción se llevará a cabo en el estómago y particularmente en el duodeno.⁸ Sin embargo, si el total del antibiótico es liberado hacia el duodeno en un corto periodo, el pH alcalino de ese medio inactivará la mayor parte de la AMX disponible,¹⁹ además, si esto no ocurriera, se sabe que la AMX tiene una absorción saturable, mediada por transportadores proteínicos específicos para la AMX, y aparentemente específicos para las aminopenicilinas, denominados PepT1, que se expresan en el borde de cepillo de los enterocitos en el intestino delgado,^{20,21} y sólo se puede absorber una parte de la AMX que llega al duodeno.

Uno de los problemas más críticos que reducen la tasa de absorción de la AMX a partir de las formulaciones de larga acción, es el tránsito del alimento por el TGI. Se ha demostrado que bajo condiciones de ayuno, las formulaciones de AMX/PC son desalojadas del estómago mucho más rápido que si se administran al inicio de una comida rica en carbohidratos.²² Considerando las peculiaridades que presenta la absorción de AMX/PC en el TGI, no resulta aventurado señalar que la interacción de los fármacos con vehículos adecuados es esencial para obtener formulaciones con mayores capacidades gastro-retentivas que logren liberar pequeñas fracciones de los principios activos de forma prolongada para ser absorbidos por el estómago y sobre todo por el duodeno,⁸ a fin de lograr perfiles farmacocinéticos más acordes con la farmacodinamia de esta combinación.

Si la CMI se establece en ≤ 0.25 $\mu\text{g/ml}$, basándose en los valores estándares para el punto de inflexión establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI* (antes *NCCLS*)²³ para cepas bacterianas patógenas causantes de infecciones respiratorias y cutáneas en perros,²⁴⁻²⁶ entonces la concentración mínima efectiva (CME) de 2-4 veces el valor para la amoxicilina será de 0.5 $\mu\text{g/ml}$.^{27,28} De forma ideal, esta CME

results suggest that the simple strategy of increasing doses is not enough to obtain required concentrations, as observed in previous studies by Vree *et al.*,⁷ whom defined the pharmacokinetics of two AMX/PC commercial preparations in dogs at 25 mg/kg. These authors do not specify if they used extended release preparations in their studies, nevertheless, from their results, it is possible to observe that useful plasma concentrations were not obtained beyond eight hours. A similar pharmacokinetic profile was described by Bywater *et al.*⁶ with a $T > MIC$ (0.25 µg/ml) of six to eight hours approximately, after administering 12.5 mg/kg of AMX/PC from a conventional preparation for dogs. Apparently, all those preparations and the generic preparation used in this study are not bioequivalent to the reference preparation used here, and only could provide adequate plasma concentrations if administered every eight hours. If such indication is established for fulfilling the expected relation PK/PD, it is possible to obtain higher plasma concentrations than the obtained with the reference preparation administered every 12 hours.

Finally, it is important to highlight that absence of bioequivalence between generic and reference preparation, not necessarily means that the first is not effective, as long as its dosage interval is adjusted to obtain a more appropriate PK/PD relation.

Referencias

1. FRANCIS ME, MARSHALL AB, TURNER WT. Amoxicillin: clinical trials in dogs and cats. *Vet Rec* 1978; 102: 377-380.
2. RICHMOND MH, SYKES RB. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiologic role. In: ROSE AH, TEMPEST DW, editors. *Advances in Microbial physiology*. Vol 9. London: Academic Press, 1973: 31-38.
3. BROWN AG, BUTTERWORTH D, COLE M, HANSCOMB G, HOOD JD, READING C *et al.* Naturally- occurring β lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot* 1976; 29: 668-669.
4. READING C, COLE M. Clavulanic acid: A β -lactamase-inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11: 852-857.
5. KAYE CM, ALLEN A, PERRYS, MCDONAGH M, DAVY M, STORM K *et al.* The Clinical Pharmacokinetics of a new pharmacokinetically enhanced formulation of amoxicillin/ clavulanate. *Clin Ther* 2001; 23: 578-584.
6. BYWATER RJ, PALMER GH, BUSWELL JF, STANTON A. Clavulanate-potentiated amoxicillin: Activity *in vitro* and bioavailability in the dog. *Vet Rec* 1985; 116: 33-36.
7. VREE TB, DAMMERS E, VAN DUURE E. Variable absorption of clavulanic acid after an oral dose of 25 mg/kg of ClavubactinTM and SynuloxTM in healthy dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2003; 26: 165-171.
8. KERC J, OPARA J. A new amoxicillin/clavulanate therapeutic system: Preparation, *in vitro* and pharmacokinetic evaluation. *Int J Pharm* 2007; 335: 106-113.
9. BARR WH, ZOLA EM, CANDLER EL, HWANG SM, TENDOLKAR AV, SHAMBUREK R *et al.* Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 56: 279-285.
10. OGATA H, AOYAGI N. Bioavailability of nalidixic acid from uncoated tablets in humans and *in vitro* dissolution rates. *Int J Clin Pharmacol Toxicol Ther* 1984; 22: 240-245.
11. LUI CY, AMIDON GM, BERARDI RR, FLEISHER D, YOUNGBERG C. Comparison of gastrointestinal pH in dogs and humans: implications on the use of the

debería mantenerse por lo menos durante 50-70% del intervalo de dosificación.¹⁶ Bajo tal perspectiva, la formulación genérica necesitaría ser administrada tres veces al día, mientras que el preparado de referencia se podría administrar cada 12 horas, dado que alcanza concentraciones plasmáticas con actividad antimicrobiana durante dicho intervalo de dosificación. Sin embargo, para tratar microorganismos menos susceptibles, se requieren concentraciones plasmáticas más altas para cumplir con la relación óptima PK/PD, es decir, dos veces el valor de CMI previa (0.5 µg/ml).²⁸ En esos casos, los resultados obtenidos sugieren que la simple estrategia de incrementar la dosis no es suficiente para lograr las concentraciones requeridas, como fue observado en estudios previos por Vree *et al.*,⁷ quienes definieron la farmacocinética de dos formulaciones comerciales de AMX/PC en perros, a 25 mg/kg. Esos autores no especifican si se utilizaron formulaciones de larga acción en sus estudios, sin embargo, a partir de sus resultados, es posible distinguir que no se obtuvieron concentraciones plasmáticas útiles más allá de las ocho horas. Un perfil farmacocinético similar fue descrito por Bywater *et al.*⁶ con una $T > MIC$ (0.25 µg/ml) de seis a ocho horas aproximadamente, después de la administración de 12.5 mg/kg AMX/PC de una formulación convencional para perros. Aparentemente, todas esas formulaciones y el preparado genérico que se utilizó en este estudio no son bioequivalentes al preparado de referencia aquí usado, y únicamente podrían proveer concentraciones plasmáticas adecuadas si son administrados cada ocho horas. Si dicha indicación se establece para el cumplimiento de la relación PK/PD esperada, es posible que se obtengan concentraciones plasmáticas más altas que las que se obtienen con el preparado de referencia, administrado cada 12 horas.

Finalmente, es importante hacer hincapié en que la ausencia de bioequivalencia entre la preparación genérica y la de referencia no necesariamente significa que la primera no sea efectiva, siempre y cuando su intervalo de dosificación se ajuste hasta lograr una relación PK/PD más apropiada.

- beagle dogs as a model for oral absorption in humans. *J Pharm Sci* 1986; 75: 271-274.
12. BENNETT JV, BRODIE JL, BRENNER EJ, KIRBY J. Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol* 1966; 14: 170 – 177.
 13. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for veterinary medicinal products: Guidelines for the Conduct of Bioequivalence studies for Veterinary Medicinal Products. London: EMA, 2001.
 14. RIVIERE JE. Unique problems associated with the determination of veterinary drug preparation bioequivalence. *J Vet Pharmacol Ther* 1994; 17: 86-88.
 15. STEINIJANS V, HAUSCHKE D, JONKMAN G. Controversies in bioequivalence studies. *Clin Pharmacokinet* 1992; 22: 247-253.
 16. CRAIG WA. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26:1-12.
 17. ARANCIBIA A, GUTTMANN J, GONZALEZ G, GONZALEZ C. Absorption and disposition kinetics of amoxicillin in normal human subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17: 199–202.
 18. MARIER JF, BEAUDRY F, DUCHARME MP, FORTIN D, MOREAU JP, MASSÉ R *et al.* A pharmacokinetic study of amoxicillin in febrile beagle dogs following repeated administrations of endotoxin. *J Vet Pharmacol Ther* 2001; 24: 379-383.
 19. ZIA H, SHALCHIAN N, BORHANIAN F. Kinetics of amoxicillin degradation in aqueous solution. *Can J Pharmacol Sci* 1977; 12:80-83.
 20. WESTPHAL JF, DESLANDES A, BROGARD JM, CARBON C. Reappraisal of amoxicillin absorption kinetics. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27:647-654.
 21. LI M, ANDERSON GD, PHILLIPS BR, KONG W, SHEN DD, WANG J. Interactions of amoxicillin and cefaclor with human renal organic anion and peptide transporters. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 547-555.
 22. WEITSCHIES W, FRIEDRICH C, WEDEMEYER RS, SCHMIDTMANN M, KOSCH O, KINZIG M *et al.* Bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid from extended release tablets depends on intragastric tablet deposition and gastric emptying. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 2:641-648.
 23. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard. 2nd ed. Wayne PA: NCCLS document M31-A, 2004.
 24. GANIERE JP, MEDAILLE C, MANGION C. Antimicrobial Drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* Clinical Isolates from canine Pyoderma. *J Vet Med* 2005; 52: 25-31.
 25. PAPICH MC. Susceptibility testing in animals-How breakpoints are derived and interpretation of susceptibility data. Proceeding of 15th AAVPT Biennial Symposium; 2007 May 20-24; Pacific Grove, California. [Serial online: 2007 May] [Cited: 2010 December 13]. Available from: <http://www.ivis.org/proceedings/aavpt/2007/papich.pdf>
 26. ROYJ, MESSIERS, LABRECQUE O, COX WR. Clinical and *in vitro* efficacy of amoxicillin against bacteria associated with feline skin wounds and abscesses. *Can Vet J* 2007; 48: 607-611.
 27. GOODMAN LS, GILMAN A. The Pharmacological basis of Therapeutics. 2nd ed. New York: Macmillan, 1956.
 28. AMBROSE PGJ, OWENS RC, GRASELA D. Antimicrobial pharmacodynamics. *Med Clin North Am* 2000; 84: 1431-1446.

