



**PREMIO
INNOVAGRO 2014**
El fruto del ingenio



UNAM

INNOVACIÓN ORGANIZACIONES PRIVADAS

**Primer antibacteriano latinoamericano
para uso veterinario**



PRIMER ANTIBACTERIANO LATINOAMERICANO PARA USO VETERINARIO

INFORMACIÓN GENERAL DE LA INSTITUCIÓN

Nombre: Coordinación de Innovación y Desarrollo, CID-UNAM.

País: México

Tipo de organización: Oficina de Transferencia de Tecnología adscrita a la Universidad Nacional Autónoma de México

Número de trabajadores: 48

La Coordinación de Innovación y Desarrollo (CID) es el área encargada de la gestión de la innovación que se genera en los Institutos, Centros y Facultades de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La labor de gestión que realiza la CID abarca desde facilitar el acceso a fuentes de financiamiento hasta la difusión, promoción y reconocimiento de tecnologías y proyectos de innovación realizados por los investigadores de la UNAM. Es por ello que la CID, como miembro de la Red INNOVAGRO, ha decidido proponer el presente proyecto desarrollado por el Dr. Héctor Salvador Sumano López y la Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, ambos del Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, para su participación en el Premio INNOVAGRO 2014 en la categoría **Innovación en Organizaciones Privadas con o sin fines de lucro**.

PERSONA RESPONSABLE DE LA PARTICIPACIÓN

Nombre: Mtra. Isabel Mascorro Velarde

Cargo: Directora de Transferencia de Tecnología en la CID-UNAM

Tel: 56-58-5650 ext. 206 correo: imascor@unam.mx

RESUMEN EJECUTIVO

La enrofloxacin es el antimicrobiano más potente y uno de los más utilizados en medicina veterinaria, tanto para animales de compañía como para animales productores de alimentos. Hace más de 20 años se venció la patente que permitía a Bayer ser el único vendedor en el mundo. Desde entonces se han generado una cantidad enorme de supuestos genéricos, tanto en Europa como en América. En diversos artículos se ha demostrado una falta de bioequivalencia de la gran mayoría de estos "genéricos". No obstante, la necesidad de generar nuevas opciones antibacterianas continúa en veterinaria y en otras familias antibióticas se han desarrollado opciones que presentan ventajas como con los macrólidos con: gamitromicina, tulatromicina y tildipirazina. Otras

familias no han generado nuevas opciones e incluso están en peligro de desaparecer de la armamentaria terapéutica, tal es el caso de las cefalosporinas. En este escenario, los investigadores responsables de este proyecto son el Dr. Héctor Salvador Sumano López y la Dra. Lilia Gutiérrez Olverade la Facultad de Medicina de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, concibieron el rediseño de la enrofloxacin para re-cristalizarla y hacerla un cristal clorhidrato-dihidrato (enro-c). Con esta modificación (solicitud de patente en México No.MX/a/2013/014603) se logra un principio activo al menos 3 – 5 veces más biodisponible que el precursor (enrofloxacin referente de Bayer) (enro-r). La enro-c se apega mucho mejor a los requerimientos de PK/PD (farmacocinética/farmacodinamia) para las fluoroquinolonas que son: que la C_{max} (concentración plasmática pico/máxima) debe ser superior en 10 – 12 veces el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) ($C_{max}/CMI = 10 - 12$) del patógeno en cuestión y que el valor de AUC (área bajo la curva de concentración vs. tiempo) dividido entre el valor de CMI debe ser ≥ 125 ($AUC/CMI \geq 125$). En ese sentido, la enro-c vuelve a ser al menos 3 – 5 veces superior a la enro-r e incluso logra concentraciones denominadas en la literatura como inhibidora de la formación de mutantes ($C_{max}/CMI = 16 - 20$).

Las implicaciones clínicas de lo referido son:

1. Se reduce la generación de cepas resistentes de las bacterias sensibles en el ámbito veterinario y por ello, se reduce el peligro de contagio de algunas bacterias zoonóticas para el humano (*E. coli*, *Campylobacter*sp., *Salmonella*sp.).
2. Se logran concentraciones terapéuticas con mayor facilidad para enfermedades en las que habitualmente no se elegía a la enro-r, por ejemplo: tratamiento de la mastitis bovina y caprina (vía parenteral y vía intramamaria), especialmente vs. *Stap. aureus*; tratamiento muy exitoso de leptospirosis en ganado vacuno y perros, etc.
3. Además de su elevada eficacia en avicultura, la presentación en polvo para diluir en agua de bebida, dada la elevada solubilidad en agua de la enro-c, evita el manejo de enro-r en forma fluida. Es decir donde se cargue un litro de enro-r al 10%, se pueden cargar 10 sobres de enro-c de 100 g cada uno.
4. No se aumenta toxicidad ni genotoxicidad o mutagenicidad.
5. El costo de recristalización es en extremo bajo.
6. Se ha probado ya su eficacia en: perros y gatos, vacas, cabras, borregos, cerdos, caballos, conejos y aves comerciales.

Finalmente, es de destacarse que el proceso de convertir emro-r a enro-c es muy económico.

ANTECEDENTES

Las fluorquinolonas son un grupo de agentes antibacterianos sintéticos usados en medicina tanto humana como veterinaria para el tratamiento de una variedad de enfermedades infecciosas. Aunque se han sintetizado muchas de ellas, las más conocidas entre las desarrolladas y usadas en medicina veterinaria incluyen la amifloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, difloxacina, marbofloxacina, norfloxacina y sarafloxacina. Sin embargo, el fármaco que revolucionó la terapéutica de enfermedades bacterianas en medicina veterinaria fue, y sigue siendo, la enrofloxacina, desarrollada en los años 80's para su uso exclusivo en medicina veterinaria. Tanto en la década de los 80's como de los 90's se hace evidente el incremento en el uso de este agente antibacteriano. Las razones de ello son su elevada potencia antibacteriana, rápida destrucción bacteriana en cuestión de minutos y debido a que las concentraciones óptimas bactericidas in vitro son tan solo 2 veces el valor de la concentración mínima inhibitoria. Entre las características más importantes de la enrofloxacina destaca que actúa de manera dependiente de la concentración, ejerciendo un rápido efecto bactericida contra Gram negativas aerobias y micoplasmas, incluyendo algunas que son resistentes a otros antibacterianos y a quinolonas y fluoroquinolonas de primera y segunda generación. Además, con esta sustitución se aumentó la eficacia contra patógenos Gram negativos y se amplió el espectro de actividad al actuar contra patógenos Gram positivos.

La enrofloxacina se caracteriza por una muy buena actividad antimicrobiana, incluso contra microorganismos poco susceptibles o resistentes a los antimicrobianos de uso corriente en animales. Tiene un excelente comportamiento farmacocinético, absorción casi completa y una distribución tisular que garantiza concentraciones inhibitorias mínimas frente a los microorganismos causantes de la mayoría de las enfermedades en los animales. Su índice terapéutico es alto, y puede administrarse sin mayores problemas en terapias combinadas con otros medicamentos. La enrofloxacina es estable a cambios de temperatura e influencias hidrolíticas. Ligera sensibilidad a exposiciones prolongadas e intensas de luz, sin embargo no se afecta su actividad.

OBJETIVOS

Proveer un complejo recristalizado de clorhidrato de enrofloxacinadihidratado, que sea sumamente útil en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas, altamente soluble en agua, pH neutro y que tenga una elevada biodisponibilidad en rumiantes, equinos, perros, cerdos y aves y lograr un método para la obtención del complejo recristalizado de clorhidrato de enrofloxacinadihidratada y proporcionar un composiciones farmacéuticas a base del complejo recristalizado de clorhidrato de enrofloxacin (enro-c) para su uso en medicina veterinaria.

DESARROLLO DEL PROYECTO

La fase de elaboración de la enro-c se detalla en la solicitud de patente en México No.MX/a/2013/014603.

Se han realizado farmacocinéticas en todas las especies y por varias vías de administración. Como ejemplo se presentan algunos rasgos farmacocinéticos de la enro-c. Uno de los estudios llevados a cabo de farmacocinética del complejo recristalizado de clorhidrato de enrofloxacinadihidratado, en él se puede apreciar claramente sus diferencias en comportamiento con respecto a su referente (enro-r) se presenta de manera resumida a continuación:

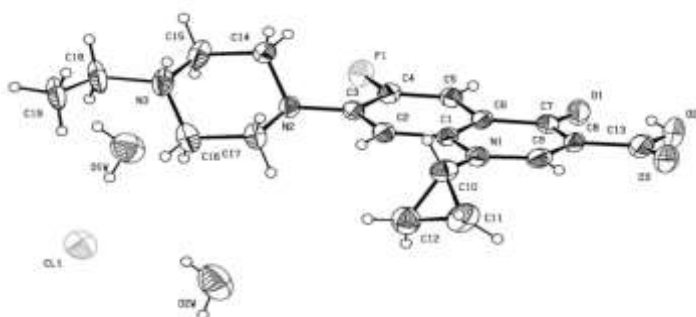
FARMACOCINÉTICA DE ENRO-C EN AVES COMERCIALES

La dosis administrada vía oral con sonda directa en el proventrículo tanto de enro-r, así como de enro-c, fue de 10 mg/kg. Los materiales y métodos empleados en los estudios de la farmacocinética por vía oral de enro-c en pollos de engorda son los ya estandarizados por los investigadores (véanse referencias).

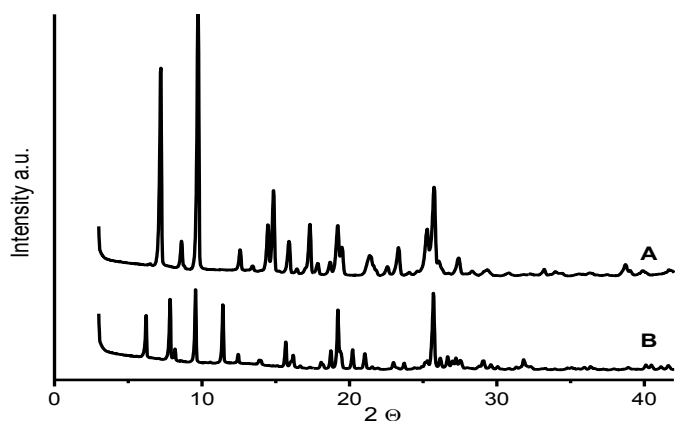
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El complejo recristalizado clorhidrato de enrofloxacinHCl-dihidratado de la fórmula que se presenta abajo tiene un punto de fusión endotérmico con un máximo en 327.9°C y una fase de transición cristalina a 136°C. El análisis de la enro-c por instrumentación, en particular por difracción de Rayos-X de monocristales consistente con la estructura molecular de dicho compuesto en lo que se denomina un polimorfo de clorhidrato de enrofloxacinadihidratado.

Los termogramas de DSC y TGA se obtuvieron aplicando calorimetría diferencial de barrido con un equipo Mettler Toledo, modelo DSC1, con STAR software versión 11.0. Se calibra el equipo para ajuste de temperatura, flujo de calor y calibración total. Las muestras fueron pesadas en paneles de aluminio de 40 L con tapa. Se inicia el calentamiento de 25 a 350°C con una rampa de calentamiento de 10°C/min, en atmósfera de nitrógeno. La elucidación de la estructura se realizó por difracción de rayos X en un equipo. El complejo recristalizado (polimorfo) de clorhidrato de enrofloxacinadihidratado con la fórmula que se presenta abajo como la molécula identificada por cristalografía de rayos X de monocristal:



Estructura de clorhidrato de enrofloxacinadihidratado (enro-c).



Patrones de difracción de rayos X de monocristal de enro-C (B) y su referente enro-r (A).

El complejo recristalizado clorhidrato de enrofloxacinadihidratado presenta un incremento en la solubilidad de hasta 20 veces más en comparación con la enrofloxacin base. La determinación de la solubilidad se realizó a 25°C, en donde las muestras se midieron en un espectrofotómetro a una longitud de onda máxima de 277 nm. En el cuadro que sigue se muestra a continuación, se puede apreciar que la solubilidad de enro-c es mejor que la solubilidad de la enro-r y la enrofloxacinahexahidratada.

Solubilidades en agua de tres formas de enrofloxacin en la que destaca la solubilidad de la enro-c por sobre otras formas

Solubilidad al equilibrio a 25°C			
	Conc (mg/mL)	DesvStd	Incremento en Solubilidad
Enrofloxacina base	0.6023	0.0019	0
Clorhidrato de enrofloxacinadihidratado	11.4447	0.0469	19
Enrofloxacinahexahidratada	9.2714	0.4358	15

Por los resultados químicos y en virtud del comportamiento farmacocinético que se muestran en la figura siguiente y el cuadro adjunto, es factible concebir a esta forma de enrofloxacin; enro-c, como un nuevo principio activo.

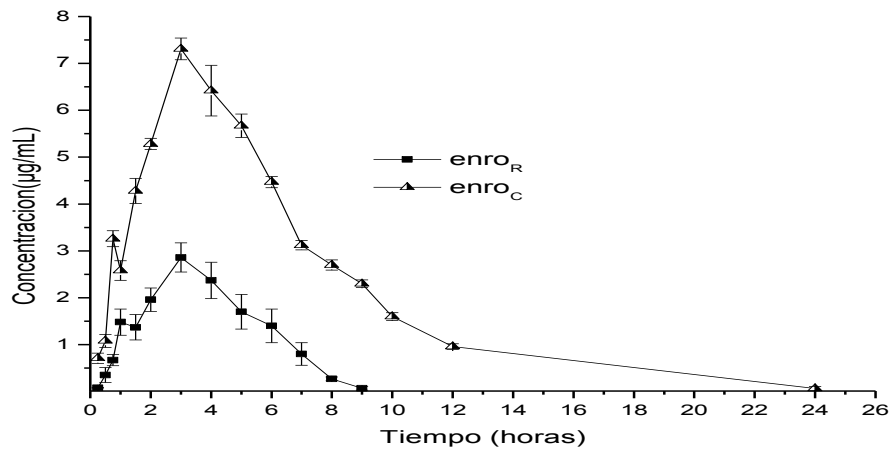


Figura que muestra los perfiles séricos de enrofloxacin derivada de enro-c o de enro-r en pollo de engorda y en la que se percibe claramente la farmacocinética superior de la enro-c con respecto a su precursor, enro-r.

Los valores que se presentan en el cuadro que sigue garantizan una eficacia muy superior de la enro-c con respecto a la enro-r en aves comerciales. Otro ejemplo que destaca la farmacocinética superior de la enro-c está dado por su difusión a leche.

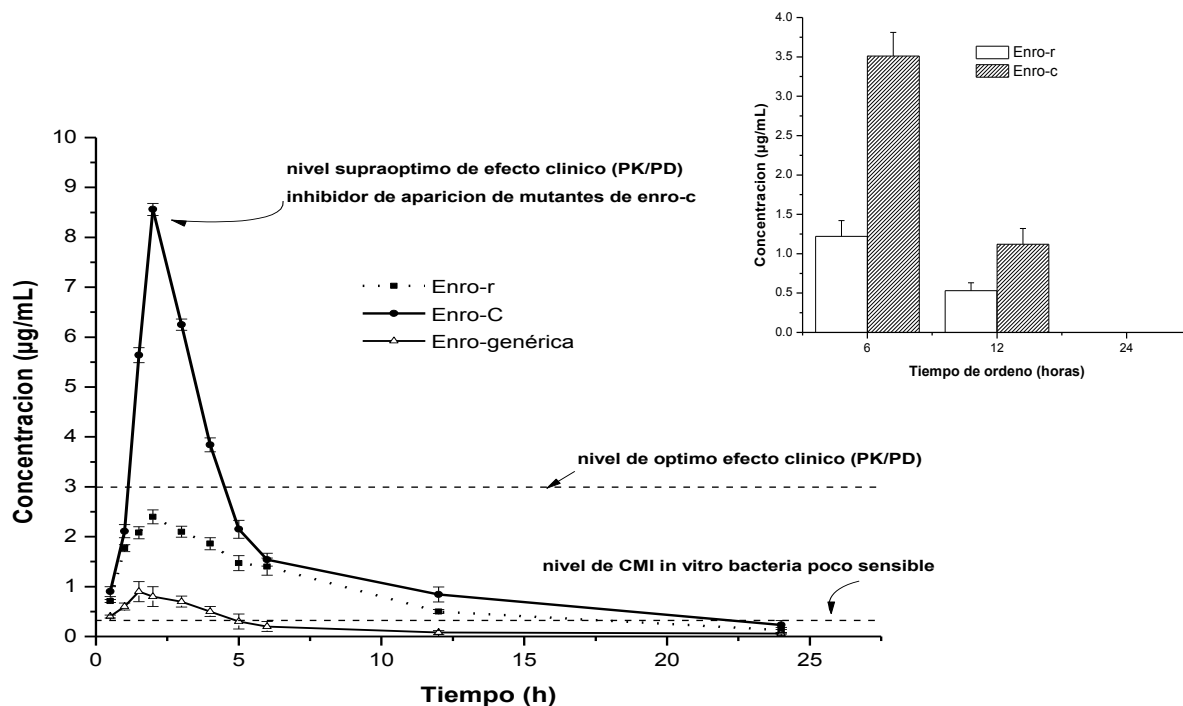
VARIABLES FARMACOCINÉTICAS EN POLLO DE ENGORDA Y VARIABLES PK/PD DE ENROFLOXACINA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE ENRO-CF Y ENRO-R A DOSIS DE 10 MG/KG

Variable	enro _R Media ± 1DE	enro _C Media ± 1DE
K _{1/2AE} (h)	1.91 ± 0.04	2.14 ± 0.06
K _{1/2el} (h)	1.90 ± 0.03	2.20 ± 0.07
T _{max} (h)	2.75 ± 0.14	3.10 ± 0.16
C _{max} (µg/mL)	2.61 ± 0.21	5.90 ± 0.42
AUC (µg/mL·h)	19.53 ± 1.08	49.42 ± 2.87
AUMC (µg/mL·h ²)	107.36 ± 4.23	305.40 ± 7.74
MRT (h)	5.50 ± 0.26	6.20 ± 0.71
AUC _T (µg/mL·h)	17.77 ± 0.73	50.03 ± 3.54
F _r (%)	100	336
AUC/MIC _{0.06}	325	824
C _{max} /MIC _{0.06}	44	98
AUC/MIC _{0.25}	78	198
C _{max} /MIC _{0.25}	10	24

η = media ± DE de tres perfiles farmacocinéticos con 80 pollos por perfil. K_{1/2AE} = constante de la fase de absorción; K_{1/2el} = constante de la fase de eliminación; C_{max} = concentración sérica máxima; T_{max} = tiempo para lograr la C_{max}; AUC = área bajo la curva de concentración vs. tiempo; AUMC = como la anterior pero en su modalidad de momento de momento de cero a ∞ por extrapolación de la fase terminal; MRT = tiempo medio de residencia; AUC_T = valor de AUC por el método trapezoidal. Fr = biodisponibilidad relativa; CMI_{0.06} = concentración mínima inhibitoria de *Escherichiacoli* muy sensible; MIC_{0.25} = concentración mínima inhibitoria de *Escherichiacoli* moderadamente sensible. Todas las comparaciones de valores fueron estadísticamente distintas (P < 0.05).

FARMACOCINÉTICA DE ENRO-C Y SU DIFUSIÓN A LECHE DE VACAS PRODUCTORAS

Con una metodología usual con 10 animales por grupo y tres grupos a los que se les administró enrofloxacin de referencia, enrofloxacin genérica y enro-c y por técnica analítica cromatográfica (HPLC), se definieron los perfiles séricos de la enrofloxacin que se muestran en la figura que sigue a este párrafo. Adicionalmente y mediante ordeña simple en vacas sanas y enfermas medicadas con enro-c a dosis de 10 mg/kg vía IM, se ha demostrado la notable difusión de enrofloxacin a la glándula mamaria (en función de sus concentraciones en leche). En la figura que sigue se presentan las concentraciones de la enro-c y la enro-r. Se utilizó como método analítico HPLC validado en la matriz correspondiente.



Perfiles séricos (y concentraciones en leche en el recuadro) de enrofloxacina tras la administración a 10 vacas por grupo de enrofloxacina de referencia (enro-r), enrofloxacina genérica y enro-c. Todas inyectadas por vía IM a dosis de 10 mg/kg.

Se pueden destacar como impactos de este proyecto de recristalización de la enrofloxacina en un polimorfo denominado enro-c los siguientes:

- **Efectividad del medicamento:**

En diversos ensayos clínicos se ha confirmado eficacia clínica de la enro-c y siempre de manera comparativa al antibacteriano hasta ahora más exitoso, la enrofloxacina. Por ejemplo: la tasa de curación máxima reportada en la literatura mundial para mastitis crónica por *Staph. aureus* es del 40%. En un reto especialmente difícil, la enro-C logró un 80% de curación y la enrofloxacina un 7%. La enrofloxacina NO resulta eficaz para el tratamiento de la leptospirosis en perros (zoonosis) ni en el ganado bovino. La enro-c ha logrado cerca del 100% de curación en ambas especies. En brotes de enfermedad crónica respiratoria complicada en aves comerciales (una de las principales causas de mortalidad y pérdidas comerciales en avicultura), la eficacia de la enro-c fue muy superior a la lograda con enrofloxacina. La enro-c es muy superior para enfermedades respiratorias del perro (traqueobronquitis inespecífica y neumonías) que la azitromicina y la enrofloxacina. En cerdos aumenta notablemente la variable sensible para la producción de “kgs de lechón que llegan a engorda”, al administrar una sola dosis intramuscular al

destete (no afecta jamón por su pH y su característica no irritable). Se le ha probado con éxito y sin toxicidad en conejos, gatos, cabras, borregos, etc. con resultados siempre únicos y superiores a los antimicrobianos conocidos a la fecha.

- **Tipos de atributos más valiosos:**

Se puede considerar que entre sus atributos más destacables están: no requiere estudios medio-ambientales pues es una isoforma de algo ya aceptado. Sus valores farmacológicos clave de al menos $C_{max}/C_{MI} = 10 - 12$ del patógeno en cuestión y $AUC/C_{MI} \geq 125$ que son apenas logrados por las fluoroquinolonas que hay en el mercado (marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin, sarafloxacin) son superadas ampliamente por la enro-c, convirtiendo a este fármaco/fluoroquinolona en la más potente y eficaz hasta ahora conocida.

- **Ventajas al utilizar esta tecnología.**

Además de la eficacia clínica y los beneficios económicos que de por sí tiene el curar eficazmente las enfermedades de los animales domésticos, la manufactura de la enro-c no requiere más de un 10% adicional al costo del precursor, la enrofloxacin, mismo que es tan bajo como 4 – 8 USD /kg. Por añadidura, se ha demostrado que cuando los valores de $C_{max}/C_{MI} \geq 16 - 20$ se logran concentraciones inhibitorias de mutantes, con lo que se minimizaría la generación de cepas resistentes y aumentaría la vida útil de esta tecnología. Por añadidura, esta es la primera fluoroquinolona que puede aplicarse vía intramamaria o llevarse en una bolsita de 100 g y añadirse al tinaco de 1000 litros teniendo garantizada su disolución casi inmediata. Esto reduce los costos de manejo, almacenaje y transporte de los habituales vidones de 1 litro o más que se requieren en avicultura

CONCLUSIONES

1. Por sus características fisicoquímicas, farmacocinéticas y de actividad in vitro la enrofloxacinadihidratada (enro c), puede considerarse una nueva entidad o principio activo, destinado a la medicina veterinaria.
2. Sus características farmacológicas hacen de la enro c el primer antibacteriano concebido en la historia y desarrollado en Latinoamérica para en ámbito veterinario.
3. Sus características farmacológico lo hacen 3 - 5 veces más potente que la enro .

4. Su farmacocinética única, permite cumplir con una ventaja notable las variables PK/PD (farmacocinética/farmacodinamia).
5. La enro c se pueda sintetizar con relativa facilidad y aun costo mínimo.
6. En las pruebas de eficacia clínica mastitis enfermedad respiratoria crónica (ECR) en aves y complejo respiratorio porcino (CRP) en cerdos.
7. No se ha encontrado una toxicidad diferente a la de la enro r en estudios de toxicidad sub-crónica y aguda.

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

1. Sumano L. H., Gutierrez O. L. Farmacología clínica en bovinos de la enrofloxacin recrystalizada(enro-c)- una nueva fluoroquinolona. XVI Congreso latinoamericano de Buiatría Ecuador 2013.
2. Curso pre-congreso Farmacología Veterinaria, con el tema "Nuevos antibióticos en la clínica de los bovinos: Enro-C y Tilmicosina LA," Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de ciencias Agropecuarias. 14 de noviembre de 2013.
3. Sumano L.H., Gracia M.I., Romero V., Ruiz-Ramirez L. The use of ciprofloxacin in proprietary products of enrofloxacin. *Vet. Human Toxicol.* 36 (5): 476-477 (1994).
4. Sumano, H. Ocampo, L Compositional analysis surveillance of eleven brands of enrofloxacin including Baytril® for veterinary use. *Journal of Veterinary Medicine - Series A.* 1995. 42: 10, 669-673.
5. Sumano L.H. and Gutierrez O.L. Administration of capsaicin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations of enrofloxacin. *The Veterinary Record.* 150:350-353 (2002).
6. Sumano LH, Gutierrez OL. Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations. *The Veterinary Journal.* 165: 143-148 (2003).
7. Sumano L.H., Ocampo C.L. y Gutierrez O.L. Non-bioequivalence of 9 trademarks of enrofloxacin and Baytril® in cows. *Dtsch. TierarztWoschernschrift.* 108: 311-314 (2001).
8. Sumano LH, Gutierrez OL Problemática del uso de la enrofloxacin en la avicultura en México. *Veterinaria México.* 31 (2): 137-145 (2000).
9. Sumano L.H., Gutierrez O.L. and Zamora Q.M.A. Bioequivalence of six trademarks of enrofloxacin in poultry. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 24: 309-313 (2001).
10. Sumano L.H., Ocampo C.L., Gutiérrez O.L. Bioequivalence of six generic preparations of enrofloxacin in pigs. *The Pig Journal* 51: 64-73 (2003).
11. Sumano L.H., Gutierrez O.L., Aguilera R., Rosiles, M.R., Bernad B.M.J. and Gracia M.J. Influence of hard water on the bioavailability of enrofloxacin in broilers. *Poultry Science.* 83 (5): 726-781 (2004).
12. Aguilera J.R., Gutiérrez O.L., Sumano L.H. Enhancement of enrofloxacin serum antibacterial activity by calcium primed broilers. *Research in Veterinary Science.* 82 (1): 80-84 (2007.)
13. Sumano LH, Cortés Cuevas A, Rosario C y Gutiérrez L. Assessment of key pharmacokinetic variables of bioequivalent and non-bioequivalent enrofloxacin preparations under various water management conditions. *The Journal of Poultry Science* 47:262-268 (2010).
14. Sumano LH, Gutierrez OL , Zamora QMA. Bioequivalencia de cuatro preparaciones de enrofloxacin en aves. *Boletín Inf. Bayer.* (2002).
15. Sumano L.H. y Ocampo C.L. Bioequivalencia de dos marcas de enrofloxacin con respecto al Baytril® inyectable en cerdos. *Bayvet Año 5 Vol. 6:* 9-12 (2002).
16. Sumano L.H. y Ocampo, C.L. Evaluación de la calidad de los principales preparados comerciales de enrofloxacin. *Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias.* Acapulco, octubre 9-15, p 116, 1994.

17. Sumano L.H. and Gutierrez O.L. Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higher serum concentrations. Proceedings of the Fiftieth Western Poultry Disease Conference. Pp 45-48. March 24-26 University of Davis California, Davis, Cal. USA (2001).
18. Sumano L.H., Gutierrez O.L., Zamora: Bioequivalencia de seis preparaciones de enrofloxacin en aves. Memorias de la XXVI Convención Anual de ANECA. pp 295-298. Abril 25-28, Acapulco Guerrero (2001).
19. Gutierrez O.L., Sumano L.H. y Zamora: Administración estratégica de enrofloxacin en pollo de engorda para obtener concentraciones séricas máximas. Memorias de la XXVI Convención Anual de ANECA. pp 136-139. Abril 25-28, Acapulco Guerrero (2001)
20. Zamora Q.M.A: Sumano L.H. y Gutierrez O.L: Difusión comparativa al árbol respiratorio de enrofloxacin y enrofloxacin más un mucolítico. Memorias de la XXVI Convención Anual de ANECA. pp 341-344. Abril 25-28, Acapulco Guerrero (2001).
21. Sumano LH, Ocampo CL y Gutierrez OL. Bioequivalencia de 9 marcas de enrofloxacin con respecto al Baytril® inyectable en bovinos. Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatría. Asoc. De Med. Vet. Esp. en Bov. A.C., 16-18 de Agosto del 2001. Veracruz, Mex.
22. Sumano L.H. y Gutiérrez O.L. Problemática del uso de la enrofloxacin en la avicultura en México. <http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=1416> [Consulta: 26/03/2007].
23. Pasquali F., Manfreda G. Mutant prevention concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet. Microbiol.* 2006 (119): 304-310.