



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og  
Varemærkestyrelsen

---

(51) Int.Cl<sup>7</sup>: A 61 K 31/535

(21) Patentansøgning nr: PA 1989 01681

(22) Indleveringsdag: 1989-04-07

(24) Løbedag: 1989-04-07

(41) Alm. tilgængelig: 1989-10-09

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-08-16

(30) Prioritet: 1988-04-08 JP 86378/88

(73) Patenthaver: Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., 14-10, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo, Japan

(72) Opfinder: Kiichi Sato, 184, Awagasakimachi 3-chome, Kanazawa-shi, Ishikawa, Japan  
Akira Handa, c/o Daiichi Seiyaku Co., Ltd., 8-5, Hatchobori 2-chome, Chuo, -ku, Tokyo, Japan  
Takeji Kitahara, c/o Daiichi Seiyaku Co., Ltd., 8-5, Hatchobori 2-chome, Chuo, -ku, Tokyo, Japan

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau A/S, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark

---

(54) Benævnelse: Anvendelse af ofloxacin eller et salt deraf til fremstilling af et topisk præparat til behandling af otopati

(57) Sammendrag:

Topisk præparat til behandling af otopati fremstilles ved at inkorporere ofloxacin eller et salt heraf som en aktiv bestanddel.

Opfindelsen angår anvendelsen af ofloxacin eller et salt deraf til fremstilling af et topisk præparat i form af en opløsning til behandling af otopati, hvor anvendelsen af S-(-)-ofloxacin er udelukket.

5 Almindelige topiske præparater til behandling af otopati omfatter opløsninger indeholdende antibiotika, såsom fradiomycin, kanamycin, chloramphenicol og cefmexim.

10 Imidlertid er det blevet påpeget, at disse præparater har ototoksicitet som bivirkninger, eller at deres terapeutiske virkninger er tilbøjelige til at blive formindsket på grund af fremkomst af resistente mikroorganismer.

15 H.N.O., 34, 1986, side 511-514 refererer til anvendelsen af gyraseinhibitoren ciprofloxacin ved den lokale behandling af kroniske bakterielle infektioner i Cavum Tympani. Ciprofloxacin blev tilført i form af en opløsning, og det viste sig, at ciprofloxacin er et egnet middel til lokal behandling af otopati.

20 Lab. med., 10, 1986, side 82-83 beskriver den orale anvendelse af ofloxacin og ciprofloxacin ved behandlingen af otopati.

25 Infection, 14 (suppl. 4), 1986, side S324-S326 refererer til den orale anvendelse af ofloxacin ved behandlingen af ofloxacin ved behandlingen af otopati. På baggrund af de foreløbige rapporterede resultater har ofloxacin vist sig at være et meget effektivt oralt stof.

30 For at overvinde de ovennævnte problemer er der udført omfattende undersøgelser, og som et resultat heraf er nærværende opfindelse fremkommet.

Opfindelsen angår anvendelsen af ofloxacin eller et salt deraf til fremstilling af et topisk præparat i

form af en opløsning til behandling af otopati, hvor anvendelsen er S-(-)-ofloxacin er udelukket.

Ofloxacin er 9-fluor-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]-benzoxazin-6-carboxylsyre. S-(-)-ofloxacin er en af de optiske isomerer deraf.

Saltene af ofloxacin omfatter syreadditionssalte med organiske eller uorganiske syrer, fx saltsyre, og salte dannet fra carboxylgruppen og et alkalimetal, fx natrium eller kalium.

Otopatien som præparatet ifølge opfindelsen er effektiv mod, omfatter inflammatorisk otopati, såsom otitis media og otitis externa og især purulent otitis media, otitis externa circumscripta og diffus otitis externa.

Doseringsformer af det topiske præparat ifølge opfindelsen omfatter spray, øre-opløsninger, fx intratympaniske injektionepreparater og øredråber.

Opløsningerne kan fremstilles ved at opløse ofloxacin i vand, fysiologisk saltvand eller en passende puffer, og om ønsket tilsætte antiseptika, fx methyl-p-hydroxybenzoat og benzalkoniumchlorid, til den vandige ofloxacinopløsning, og indstille opløsningens pH-værdi til en værdi i det neutrale område. Koncentrationen af ofloxacin i den vandige opløsning ligger sædvanligvis i området fra ca. 0,05 til ca. 2% (vægt/volumen), og især fra 0,1 til 1 % (vægt/volumen).

Ved administrering af ofloxacinopløsningen, appliceres adskillige 0,5 ml-doser pr. dag til den udvendige øregang ved påsmøring, påsprøjtning eller inddrypning, eller intratympanisk injektion gennem en punktur i den tympaniske membran.

Ofloxacin er meget sikkert. Akut toksicitet (LD<sub>50</sub>) for ofloxacin blev fundet at være 5450 mg/kg

(p.o.) hos mus, 200 mg/kg eller mere (p.o.) hos hunde og fra 500 til 1.000 mg/kg (p.o.) hos aber.

Præparatet ifølge opfindelsen udviser tydelige forbedringer i forhold til de sædvanlige medikamenter 5 ikke blot med hensyn til ototoxicitet men også med hensyn til vævsfordeling og enestående terapeutiske virkninger på otopati, især otitis media og otitis externa. Således er præparatet ifølge opfindelsen anvendeligt som et topisk præparat til behandlingen af 10 otopati.

Opfindelsen illustreres nu i detaljer ved hjælp af de efterfølgende eksempler og testeksempler.

#### Eksempel 1

15 Ofloxacin blev opløst i destilleret vand til injektion, og opløsningen blev indstillet til en pH-værdi fra 6,0 til 7,0 og dernæst sterilfiltreret til fremstilling af en 0,5%'s vandig ofloxacinopløsning.

20

#### Eksempel 2

Ofloxacin blev opløst i fysiologisk saltvand, og opløsningen blev behandlet på samme måde som i Eksempel 1 for at danne en ofloxacinopløsning.

25

#### Eksempel 3

Ofloxacin blev opløst i fysiologisk saltvand, og opløsningen blev behandlet på samme måde som i Eksempel 1 for at danne en 0,3%'s vandig ofloxacinopløsning.

30

#### Testeksempel 1

1) Testmetode:

15 hvide marsvin blev opdelt i de følgende 2 grupper: 10 i en ofloxacin-gruppe, der topisk fik ad-

ministreret 0,3%'s ofloxacin (herefter benævnt "0,3% OFLX-gruppe"), og 5 i en kontrolgruppe, der fik indgivet fysiologisk saltvand.

Før testning blev hvert af dyrenes auditoriske  
5 hjernestammerespons (herefter benævnt "ABR") bestemt til opnåelse af respons-tærskelværdi. En Logon-lydbølge med en frekvens på 10.000 blev anvendt som stimulerende lyd.

Den venstre tympaniske membran blev punkteret  
10 under almindelig anesthesia, og 0,2 ml af ofloxacinopløsningen fra Eksempel 3 eller 0,2 ml af kontrolopløsningen (fysiologisk saltvand) blev injiceret i mellemøret en gang dagligt i 7 på hinanden følgende dage. ABR blev målt 10 dage efter den sidste injektionsdag.

15

## 2) Resultat:

Forskellen mellem ABR-tærskelværdien før indgivning og efter indgivning er vist i Tabel 1 herunder.

20

TABEL 1

Ændring i ABR-tærskelværdiTærskelværdi (dB, gennemsnit  $\pm$  stand.afv.)

	<u>Før indgivning</u>	<u>Efter indgivning</u>
0,3% OFLX-gruppe	30 $\pm$ 1,3	34,5 $\pm$ 1,4
25 Kontrolgruppe	30 $\pm$ 1,6	35 $\pm$ 1,6

Som det fremgår af tabel 1, er ændringerne i  
tærskelværdierne for både 0,3% OFLX-gruppen og kontrol-gruppen små (henholdsvis 4,5 dB og 5,0 dB), hvilket  
30 indikerer, at reduktionen i akustisk skarphed på grund af indgivningen af ofloxacin er ubetydelig.

Testeksempel 2

## 1) Forsøgsdyr og indgivningsvej:

29 marsvin, der havde en normal Preyer's refleks (kropsvægt: 250-350 g), blev opdelt i de følgende 3 grupper; 12 i en gruppe, der topisk fik administreret 0,5%'s ofloxacinopløsning (herefter benævnt "0,5% OFLX-gruppe"); 13 i en gruppe, der topisk fik administreret gentamicin (herefter benævnt "GM-gruppe"); og 4 i en kontrolgruppe, der fik administreret fysiologisk saltvand.

Efter intramuskulær indgivning af ketalar og et muskelafslappende middel (xylazin), blev der lavet et snit på 2 mm i diameter ved mellemøret fra den bagerste del af marsvinets øre og et rør med samme diameter blev indsat i mellemøret gennem åbningen, og det blev fastgjort med et plaster. Snittet blev syet midlertidigt og lukket. Umiddelbart efter operationen blev ABR målt. Fra den samme dag blev der injiceret 0,2 ml af en 4%'s gentamicinopløsning, 0,2 ml af ofloxacinopløsningen fra Eksempel 2 eller 0,2 ml af kontrolopløsningen (fysiologisk saltvand) ind i mellemøret gennem røret. Injektionen blev udført en gang dagligt i 10 på hinanden følgende dage. På den 10'ende dag blev ABR igen målt, og dyrene blev aflive.

## 2) Observeringsmetode:

## 1) Måling af ABR:

Der anvendtes en trommehindeafledning til måling af ABR. Grundelektroden blev placeret på forbenet på samme side af marsvinet som det injicerede øre. Den udvendige øregang blev udsat for en klikkende lyd fra et rør via en krystalmodtager. Det auditoriske respons blev givet som en reaktionsbølge, og gennemsnittet af 200 målinger, der blev udført af en computer, blev op-

tegnet af en XY-skriver. ABR-tærskelværdien for de individuelle dyr blev dannet fra det resulterende elektrocochleogram.

ii) Morphologisk observation

5 a. Mikroskopisk observation:

En vævsprøve (mellemsøre mucosa) blev fixeret på sædvanlig måde i formalin ved anvendelse af den auditoriske bulla. Efter alkalkning blev prøven indstøbt i paraffin og skåret i skiver. Paraffinsektionen blev 10 farvet med hematoxylin og eosin og undersøgt i mikroskop.

b. Observation i scanning-elektromikroskop (SEM):

En vævsprøve (cochlea) blev vasket grundigt i en stråle af fysiologisk saltvand og fixeret i en opløsning af 2,5% glutaraldehyd i 12 timer ved anvendelse af 15 en sædvanlig metode. Dernæst blev vævet igen vasket med phosphatpufferopløsning (pH 7,4) under rystning, fixeret i 1%'s osmiumsyreopløsning i 1 time og farvet elektrisk med osmiuntannat. Vævet blev dehydratiseret 20 med en alkohol ved en sædvanlig metode og tørret ved et kritisk punkt efterfulgt af katodeforstøvning med platinioner. Den således fremstillede prøve blev observeret under et scanning-elektronmikroskop model Hitachi S-570.

25 iii) Bestemmelse af ofloxacin-fordeling

Fordeling af medikamentet i serum, hjernevæv, mellemsøremucosa og cochlear perilymfe blev undersøgt for kontrolgruppen og 0,5% OFLX-gruppen. Der blev opsamlet en blodprøve fra karotidarterien, og hjernevævet 30 blev udskåret umiddelbart efter halshugning. Mellemsørets mucosa blev trukket af efter grundig vaskning af mellemsørets hulrum med fysiologisk saltvand. Derefter blev cochlear perilymfen opsamlet med et glaskappilar-rør.

Koncentrationen af medikamentet i vævet blev testet biologisk ifølge en papir-skivemetode ved anvendelse af B. subtilis ATCC 6051 og E. coli Kp som testmikroorganismer.

5 Serumet blev anvendt ubehandlet til testen. Hjernevævet blev homogeniseret sammen med en lige så stor vægtdel 0,1M fosfat-buffer-opløsning (pH 7,0) i et homogeniseringsapparat af glas til opnåelse af en 50%'s homogenatopløsning.

10 Prøveudtagningen af perilymfen og mellemøremucosa blev udført inden for den samme tidszone, og prøverne blev forenet køligt. Efter måling af perilymfens volumen blev prøven fortyndet 10 gange med fosfatpuffer og testet. På den anden side blev mucosaprøven testet  
15 efter vejning og homogenisering.

3) Resultat:

1) Ændring i akustisk skarphed:

Ændringen i ABR-tærskelværdierne er vist i tabel 2 herunder.

20

TABEL 2

ABR-tærskelværdiændring

Tærskelværdiændring  
(dB, gnsn. ± stand.afv.)

25

0,5% OFLX-gruppe	-7,9 ± 2,8**
GM-gruppe	-38,5 ± 5,8*
Kontrolgruppe	-15,0 ± 5,8

Note: \*\*p < 0,01 vs. GM-gruppe

30

\*p < 0,05 vs. kontrolgruppe

Som det kan ses af tabel 2, blev der målt en reduktion i akustisk skarphed på i gennemsnit 15 dB for

kontrolgruppen, medens GM-gruppen viste en stigning i ABR-tærskelværdi på 38,5 dB, dvs. en bemærkelsesværdig reduktion i akustisk skarphed. På den anden side viste 0,5%'s OFLX-gruppen en ekstrem lille stigning i ABR-tærskelværdi, dvs. en reduktion i auditorisk skarphed på i gennemsnit 7,9 dB. Derfor blev det bekræftet, at ofloxacin ikke havde nogen ototoxicitet.

ii) SEM-observationer på cochlear hårcelle:

SEM-billedet af cochleaet i kontrolgruppen eller 0,5%'s OFLX-gruppen afslørede at de ydre og indre hårcellers hår ikke led af nogen forstyrrelse i den primære drejning og i den 2. og 3. drejning.

På den anden side afslørede SEM-billedet af cochlea fra GM-gruppen, at de ydre og indre hårceller led af forstyrrelse i hårcellernes række eller forsvinden af hårceller fra den primære drejning til den tredje drejning. Der blev observeret en tendens mod, at forstyrrelsen i de indre hårceller blev mere alvorlig mod den øvre drejning. På den anden side viste de ydre hårceller ikke en sådan tendens, dog blev der bemærket en stærkere forstyrrelse af de ydre hårceller ved deres tredje drejning. Når SEM blev udført på 6 ører fra den modsatte side af dyrene fra GM-gruppen, blev der også observeret en lille smule forstyrrelse af de ydre hårceller i alle tilfælde, på trods af at GM blev indgivet direkte til disse ører.

iii) Observationer af mellemøremucosa:

Der blev observeret betydelig betændelse, såsom bemærkelsesværdig cellulær infiltrering i mucosa eller fortykkelse af mucous periosteum, hos kontrolgruppen. I modsætning hertil blev der ikke observeret sådan inflammation i mellemøremucosa hos 0,5%'s OFLX-gruppen og GM-gruppen.

iv) Fordeling af ofloxacin:

Resultaterne er vist i tabel 3.

TABEL 3

5 Koncentration af OFLX i forskellige vævstyper efter OFLX-indgivning.

		<u>Tid Ofloxacin-koncentrat (<math>\mu\text{g/ml}</math> eller <math>\mu\text{g/g}</math>)</u>					
		<u>Nr. fra</u>					
		<u>indgivn.</u>	<u>Serum</u>	<u>Hjerne</u>	<u>Mucosa</u>	<u>Lymfe</u>	
<u>10</u>		<u>timer</u>					
	OFLX-						
	gruppe	1	1-1,5	<0,19	<0,20	78,70	<1,00
		2	-	0,91	<0,20		
		3	-	<0,19	<0,20		
<u>15</u>		4	-	<0,19	<0,20		
		5	1,5-2	<0,19	<0,20	45,85	3,80
		7	-	1,20	<0,20		
		9	-	<0,19	<0,20		
		10	-	<0,19	<0,20		
<u>20</u>		6	2-2,5	<0,19	<0,20	40,85	<1,00
		11	-	<0,19	<0,20		
		12	-	0,19	<0,20		
		13	-	0,39	<0,20		
	Kontr.-	1			<0,20		
<u>25</u>	gruppe	2			<0,20		

Som det kan ses af tabel 3 er ofloxacinkoncentrationen i serum mindre end 0,19  $\mu\text{g/ml}$  i de fleste tilfælde af OFLX-gruppen. Derfor fordeles ofloxacin ikke til andre vævstyper end mellemøret. Dette ses især ud fra den kendsgerning, at koncentrationen af ofloxacin i hjernen er mindre end 0,20  $\mu\text{g/g}$  i alle tilfælde, det samme niveau som i kontrolgruppen. Derfor blev

det fundet, at bivirkningerne på centralnervesystemet, der er tilbøjelige til at blive inducerede af anvendelsen af nye antibakterielle midler af quinolon-typen, slet ikke blev fremkaldt ved administrering af ofloxacin i øret. På den anden side var indholdet af ofloxacin i mellemøremucosa, større end 40 µg/g, hvilket er af vigtigste set ud fra et effektivitetssynspunkt.

Som demonstreret ovenfor bevirkede topisk administration af ofloxacin i øret i det væsentlige ingen ototoksicitet og udviste fremragende fordeling i det ønskede mellemøremucosa uden at udvise væsentlig spredning. Til andre vævstyper end den ønskede, især ikke til hjernevæv. Således menes topiske ofloxacinpræparater ifølge opfindelsen til otopati at være overordentligt klinisk anvendelige.

#### Testeksempel 3

Det er kendt, at otitis media og otitis externa induceres gennem bakteriel infektion. Derfor er ofloxacin's antibakterielle aktiviteter mod alle bakterier, der er isoleret fra en læsion hos en patient, der lider af purulent otitis media, testet til sammenligning med andre medikamenter mod otopati. De opnåede resultater er vist i tabel 4 herunder.

Tabel 4

MIC<sub>80</sub> på test-mikroorganismer  
Sammensætning af mikroorganismer (%)

Medikament	MIC <sub>80</sub> (µg/ml)	Samlet antal stammer	S.aureaus midis	S.epider- ginosa	P.aeru- ginosa	Proteus	Andre mikro- organismer
Ofloxacin	1,56	174	33,3	11,3	14,5	11,1	S.pneumoniae Corynebacterium anaerob bakterie
Cefmenoxim	25	237					
Chloroam- phenicol	50	237	37,7	10,77	13,5	13,1	A.calcaetocus
Fradlomyacin	100	237					Peptostrepto- coccus

Som det fremgår af tabel 4 ovenfor udviser ofloxacin endnu bedre antibakteriel aktivitet på bakterier, der bevirker purulent otitis media, end andre almindelige medikamenter.

## P A T E N T K R A V

1. Anvendelse af ofloxacin eller et salt deraf til fremstilling af et topisk præparat i form af en opløsning til behandling af otopati, hvor anvendelsen af S-(-)-ofloxacin er udelukket.