



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0027611  
(43) 공개일자 2018년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/437 (2006.01) A61K 47/10 (2017.01)  
A61K 47/36 (2017.01) A61K 47/38 (2006.01)  
A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/06 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 31/437 (2013.01)  
A61K 47/10 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-7005804(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2011년01월07일  
심사청구일자 없음  
(62) 원출원 특허 10-2012-7020775  
원출원일자(국제) 2011년01월07일  
심사청구일자 2015년11월26일  
(85) 번역문제출일자 2018년02월27일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/020531  
(87) 국제공개번호 WO 2011/085209  
국제공개일자 2011년07월14일  
(30) 우선권주장  
61/293,019 2010년01월07일 미국(US)

(71) 출원인  
리전츠 오브 더 유니버시티 오브 미네소타  
미국 미네소타 55455 미네아폴리스 오크 스트리트  
싸우스이스트 200 스위트 600  
노파르티스 아게  
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35  
(72) 발명자  
쇼우척, 로날드 제이.  
미국 55372 미네소타주 프라이어 레이크 픽시 포  
인트 서클 에스이 14934  
청, 벨린다 더블유.와이.  
미국 55112 미네소타주 뉴 브라이튼 웨스포드 코  
트 2531  
월, 지. 마이클  
미국 76019 텍사스주 포트 워쓰 오버튼 크레스트  
스트리트 4405  
(74) 대리인  
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 1 항

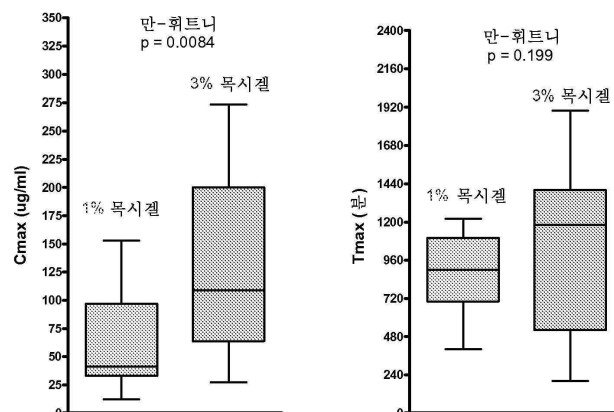
(54) 발명의 명칭 목시플록사신을 귀에 도포하기 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

목시플록사신을 귀에 도포하는 데 유용한 방법 및 물질이 기술된다. 상기 방법은 하나 이상의 증점제 및 목시플록사신 또는 그의 염을 함유하는 조성물을 외이도를 통해 고막의 표피 표면에 전달하는 것을 포함한다. 상기 조성물은 유동성 형태로 고막에 전달되고, 고막에 전달된 후에 목시플록사신이 고막에 위치하기에 충분한 점도를 갖게 된다. 이러한 조성물은 중이염을 비롯한 중이 및 내이 병태를 예방적으로 및/또는 치료적으로 처치하는 데 사용될 수 있다.

대표도 - 도9

1% 및 3% 목시젤에 대한 Cmax 및 Tmax의 비교



(52) CPC특허분류

*A61K 47/36* (2013.01)

*A61K 47/38* (2013.01)

*A61K 9/0046* (2013.01)

*A61K 9/06* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

목시플록사신의 투여 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] <관련 출원에 대한 교차-참조>

[0002] 본 출원은 2010년 1월 7일에 출원된 미국 임시 출원 일련번호 61/293,019를 우선권 주장한다. 선행 출원의 개시내용은 본 출원의 개시내용의 일부로 간주 (및 참고로 인용)된다.

[0003] <기술 분야>

[0004] 본 발명은 목시플록사신을 귀에 도포하기 위한 방법 및 재료에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 중이 (middle ear) 질환의 치료를 위해 고막의 외부 표피 표면에 목시플록사신을 도포하기 위한 방법 및 재료를 특징으로 한다.

#### 배경 기술

[0005] 중이염 (OM)은 특히 어린이에게서 매우 흔하다. OM은 종종, 비인두(nasopharynx)에 체류하는 박테리아가 중이에 침입 및 거주하도록 상부 기도, 유스타키오관(Eustachian tube)및 중이의 미세-환경을 변화시키는 상부 기도의 바이러스 감염으로 시작된다. 이러한 침입은 유스타키오관의 염증 및 폐색을 일으켜, 중이의 환기, 압력 평형화 및 배출을 방해할 수 있다. 통상적으로 공기-충전된 중이강에 유체가 축적되고 압력이 증가하여 큰 통증을 야기한다. 심각한 OM이 있는 경우, 음지각 구조체가 손상될 수 있다. 지속 또는 재발 OM은 중이 내 잠복으로부터 출현하는 박테리아에 의해 야기될 수 있으며, 이는 항생제로부터 점액성 균막에 의해 차폐되어 왔다.

[0006] 현재 OM은 항생제를 사용하고/하거나 중이강의 배수 및 압압을 위해 고막의 수술 절개를 통한 고막천공관 (tympanostomy tube)의삽입에 의해 치료된다. 항생제 치료의 효능은 전달 경로에 의해 제한된다. 항생제는 전신적으로 전달될 수 있으나, 고투여량은 종종 중이에서의 치료 수준 (즉, 최소 억제 농도의 초과)을 달성하여야 하고, 이러한 수준은 종종 유의한 지체 시간 후에 달성된다. 또한, 항생제는 세척액에 의해 또는 점적제를 통해 외이도로 전달될 수 있다. 이러한 전달 경로는 조절하기에 어려울 수 있고, 종종 중이에서의 장시간의 항생제 치료 수준을 달성하는데 효과적이지 못하다. 또한, 항생제는 중이에 주사하거나 또는 항생제-함침 재료를 중이에 삽입함으로써 전달될 수 있으나, 이러한 방법들은 고막의 천공 또는 절단을 수반하고, 이는 일반적인 마취를 필요로 하며, 고막을 손상시킬 수 있다. 또한, 고막천공관의 수술 삽입은 고실경화증 (즉, 고막 및 중이 조직의 석회화), 청력 소실, 지속 이루 (즉, 관으로부터 고름의 배출) 및 감염을 포함한 위험을 수반한다.

[0007] 미국 국립 보건원(National Institutes of Health) 산하의 국립 난청 및 기타 소통 질환 연구소(National Institute on Deafness and Other Communication Disorders, NIDCD)는 최근 OM의 예방 및 치료를 위한 대안적 전략 및 새로운 접근법의 개발을 지원하기 위한 \$2,000,000의 기금을 조성했다. 그의 적용을 위한 신청사항 (RFA-DC-02-002)에서, NIDCD는 다음과 같이 언급하고 있다: (1) OM은 유의한 소아 이환율을 야기하고, 일반 공중보건에 점점더 영향을 미치고 있으며; (2) OM은 응급실 방문의 중요한 원인이고; (3) OM은 의원 방문의 두번째 원인이며; (4) OM은 모든 외래환자 항생제 처방 중 40%를 초과하는 소아 항생제 처방의 중요한 원인이며; (5) OM은 소아 청력 소실의 중요한 원인이고; (6) OM은 어린이에서의 일반 마취의 중요한 원인이다. 또한, NIDCD는 OM을 야기할 수 있는 속들 중 3가지 {스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 비피막형 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 및 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*)}에서의 다중 항생제 내성 박테리아의 걱정스러운 출현에 대해, OM을 치료하는데 폭넓은 범위의 항생제를 사용한 것 때 문으로 보았다. 그 결과, 많은 1차 및 2차 항생제가 OM, 및 폐렴 및 수막염을 비롯한 기타 질병에 대해 점점 효과가 덜해지고 있다. NIDCD는 "1) OM 이환율 및 관련 비용을 감소시키고; 2) OM 및 기타 통상의 심각한 질병의 치료에 사용되는 항생제의 효능을 보존하기 위해, OM의 연구, 치료 및 예방을 위한 신규한 접근법의 개발이

시급히 요구된다"고 결론지었다.

## 발명의 내용

- [0008] 본 발명은, 부분적으로, 목시플록사신을 함유하는 조성물은, 액체-유사 형태로 고막의 외부 표피 표면에 전달되고, 이어서, 전달 후, 조성물이 고막에서 국소화된 채 남아 있도록 고체-유사 겔 상태로 전환될 수 있도록 제형화될 수 있다는 발견에 기초한다. 고막에 이러한 조성물의 전달은 중이 및 내이 질환 (예를 들어, OM)을 치료하는데 보다 효과적인 방법을 제공할 수 있다.
- [0009] 일 양태에서, 포유동물 (예를 들어, 설치류 또는 인간)에 목시플록사신을 투여하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 포유동물의 고막의 표피 표면에 제형을 도포하는 것을 포함하며, 여기서 상기 제형은 증점제 (viscogenic agent) 및 목시플록사신을 포함하고, 상기 제형은 100,000 cps 미만의 점도를 가지며, 상기 제형은 고막에 도포된 후에 상기 제형이 고막에서 유지되기에 충분한 항복 응력을 갖는다. 증점제는 젤란, 아크릴산나트륨을 갖는 N-이소프로필 아크릴아미드 및 n-N-알킬아크릴아미드, 폴리에틸렌 글리콜을 갖는 폴리아크릴산, 폴리에틸렌 글리콜을 갖는 폴리메타크릴산, 히드록시프로필메틸셀룰로스를 갖는 카르보폴(CARBOPOL)® (폴리아크릴산), 셀룰로스 아세테이트 수소 프탈레이트 라텍스, 알긴산나트륨, 또는 역 열경화성 겔, 예컨대 폴록사머 또는 폴록사민일 수 있다. 목시플록사신은 고막을 지나 중이강으로 이동할 수 있다. 1종 이상의 약리적 작용제는 항생제를 포함할 수 있고, 제형은 소염제, 마취제, 부착 촉진제, 투과성 또는 경피흡수 촉진제, 생접착제, 흡습제, 귀지 연화제 또는 보존제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0010] 다른 양태에서, 제형 및 상기 제형을 고막에 도포될 것을 지시하는 설명서를 포함하는 키트가 제공된다. 이러한 제형은 증점제 및 목시플록사신을 포함하고, 상기 제형은 100,000 cps 미만의 점도를 갖고, 상기 제형은 고막에 도포된 후에 상기 제형이 상기 고막에서 유지되기에 충분한 항복 응력을 갖는다.
- [0011] 또한, 그의 고막의 표피 표면에 도포된 제형을 포함하는 설치류 (예를 들어, 친칠라)가 제공되고, 여기서 상기 제형은 증점제 및 목시플록사신을 포함하고, 상기 제형은 100,000 cps 미만의 점도를 갖고, 상기 제형은 상기 고막에서 유지되기에 충분한 항복 응력을 갖는다.
- [0012] 달리 규정하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 숙련자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동일한 방법 및 재료가 본 발명을 수행하는데 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료를 하기에 기술한다. 본원에 언급된 모든 공보물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 그의 전문이 참고로 인용된다. 불일치하는 경우, 정의를 포함한 본원 명세서가 우선할 것이다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시를 위한 것으로서 제한하도록 의도된 것이 아니다.
- [0013] 본 발명의 기타 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 명백할 것이다.

## 도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 시험관내 방출된 목시플록사신 함량의 누적 백분율을 나타내는 그래프이다.
- 도 2는 2가지 수포내(intrabulla) 투여량 수준으로부터의 디콘볼루션(deconvolution) 반응 함수를 나타내는 그래프이다 (N=9).
- 도 3은 수포내 고투여량 수준으로부터의 디콘볼루션 반응 함수를 나타내는 그래프이다 (N=3).
- 도 4a는 집단 1 및 집단 2에 대해 1% 목시겔의 외이(external ear) 투여 후 MEF 중의 목시플록사신 농도를 나타내는 그래프이다.
- 도 4b는 집단 3 및 집단 4에 대해 1% 목시겔의 외이 투여 후 MEF 중의 목시플록사신 농도를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 1% 목시겔의 외이 투여 후 MEF 중의 목시플록사신 농도 (평균, SD)를 나타내는 그래프이다 (N=23).
- 도 6은 집단 1 및 집단 2에 대해 3% 목시겔의 외이 투여 후 MEF 중의 목시플록사신 농도를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 3% 목시겔의 외이 투여 후 MEF 중의 목시플록사신 농도 (평균, SD)를 나타내는 그래프이다 (N=13).
- 도 8은 1% 및 3% 목시겔의 외이 투여 후 MEF 중의 목시플록사신 농도 (평균, SD)를 나타내는 그래프이다.



도 9는 1% 및 3% 목시겔에 대한 Cmax 및 Tmax의 비교를 나타내는 그래프이다.

도 10은 1% 목시겔의 외이 투여 후 MEF로 전달된 누적 양을 나타내는 그래프이다 (N=23).

도 11a는 1% 목시겔의 외이 투여 후 MEF로의 투입량을 나타내는 그래프이다. 제1 집단, N=6; 제2 집단, N=6.

도 11b는 1% 목시겔의 외이 투여 후 MEF로의 투입량을 나타내는 그래프이다. 제3 집단, N=6; 제4 집단, N=5.

도 12는 3% 목시겔의 외이 투여 후 MEF로 전달된 누적 양을 나타내는 그래프이다 (N=13).

도 13은 3% 목시겔의 외이 투여 후 MEF로의 투입량을 나타내는 그래프이다. 제1 집단, N=6; 제2 집단, N=7.

도 14는 1% 및 3% 목시겔의 외이 투여 후 MEF로의 투입량을 나타내는 그래프이다.

도 15는 1% 목시겔의 외이 투여 후 중이 유체 내 목표 농도의 초과를 도달하는 시간 및 지속시간을 나타내는 그래프이다.

도 16은 3% 목시겔의 외이 투여 후 중이 유체 내 목표 농도의 초과를 도달하는 시간 및 지속시간을 나타내는 그래프이다.

도 17은 외이 투여 후 3일에 걸쳐 MEF 중의 AUC를 나타내는 그래프이다.

도 18은 외이 투여 후 MEF 중의 Cmax/MIC를 나타내는 그래프이다.

도 19a는 50% IPM 치료 후 MEF 목시플록사신 농도 (평균, SEM)를 나타내는 그래프이고 (N=9); 도 19B는 로그 형태의 동일한 데이터를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 일반적으로, 본 발명은 목시플록사신 및 하나 이상의 증점제를 함유하는 조성물을 사용하여 귀에 목시플록사신을 도포하는 방법을 제공한다. 조성물은 특히 그들이 액체와 같은 상태, 즉 유동성 형태로 고막의 외부 표피 표면에 전달될 수 있도록 제형화된다. 그러나, 투여 후, 조성물은 고막과의 접촉을 유지하도록 고체와 같은 상태로 변환된다. 그 결과, 조성물은 고막에 대한 국지화를 유지하고, 목시플록사신은 고막을 지나, 예를 들어 중이강으로 이동함으로써, 중이 및 내이 장애 (예를 들어, OM)를 치료하는 보다 효과적인 방법을 제공할 수 있다. 적합한 조성물은 또한, 예를 들어 고막에 대한 제형의 부착을 촉진하고/거나 고막의 투과성을 증가시킴으로써 목시플록사신의 침투력을 증가시키는 다른 구성성분을 함유할 수 있다.

[0016] 중이염과 관련된 통상적인 병원체에는 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*) 및 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*)가 포함된다. 이들 유기체는 각각 0.13, 0.06 및 0.06  $\mu\text{g/ml}$ 의 MIC90 값을 갖는 목시플록사신에 민감하다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, MIC90는 유기체의 90%의 성장을 억제하는 데 요구되는 최소 억제 농도(Minimum Inhibitory Concentration)를 가리킨다. 본원에 기재된 목시플록사신의 경고막 전달을 사용하는 치료 목적은 MIC90 값보다 10배 초과로 더 높은 중이 유체 수준 (예를 들어, 약 0.6  $\mu\text{g/ml}$  초과; 약 0.6 내지 약 1.3  $\mu\text{g/ml}$ )을 달성하고, 이 수준을 24시간 초과 동안 유지하는 것이다. 상기 표적 농도는 단일 도포를 사용하여 본원에 기재된 목시플록사신 겔 제형으로 달성되었다.

[0017] 본 발명의 조성물은 25°C에서 100,000 센티푸아즈 (cps) 미만의 점도를 갖는다. 점도는 흐름에 대한 조성물의 저항성을 가리킨다. 기계적인 장치의 도움 없이 합리적인 물리력에 의해 25°C에서 1분 미만 내에 1-mL 투베르쿨린 주사기에 부착된 19-게이지 바늘을 통과할 수 있는 0.5 mL의 부피를 갖는 조성물은 전형적으로 100,000 cps 미만의 점도를 갖는다. 조성물의 점도는 상업적으로 이용가능한 점도 표준으로 눈금이 정해진 점도계 (예를 들어, 브룩필드로부터 입수)를 사용하여 측정할 수 있다.

[0018] 본 발명의 조성물은 또한 고막에 제형을 유지시키기 위해 충분한 최소 항복 응력을 갖는다. 항복 응력은, 고체 물질에 적용 시, 고체 물질이 추가적인 응력 증가 없이 계속 변형되는 액체와 같은 거동을 나타내도록 하는 힘의 양을 가리킨다. 본 발명의 조성물의 최소 항복 응력은 도포되는 겔의 두께에 의존하지만, 겔의 기하학 및 주변의 온도에 대해서는 독립적이다. 본원에서 사용되는 바와 같은 조성물의 최소 항복 응력은 4 mm의 두께 및 1 g/L의 밀도를 갖는 도포되는 겔에 관한 것이다. 항복 응력 ( $\sigma_0$ )은  $\sigma_0 = \rho gh$ 로서 표현되는데, 여기서  $\rho$ 는 밀도이고,  $g$ 는 중력 가속도이며,  $h$ 는 층 두께이다. 전형적으로, 최소 항복 응력은 약 39 파스칼 (Pa)이다. 본원에 기재된 방법은 또한 조성물이 고막에서 유지되기에 충분한 항복 응력을 갖는지를 추정하기 위해 사용될 수

있다. 예를 들어, 시험 조성물을 친칠라와 같은 동물의 귀에 투여할 수 있고, 그 동물의 귀를 모니터링함으로써 조성물이 보다 고체와 같은 상태로 변환되어 고막에서 유지되는지를 측정할 수 있다. 예를 들어, 본원의 실시예 부분을 참고한다.

[0019] 증점제

[0020] 본원에서 사용되는 바와 같은 증점제는 유체의 점도를 증가시키는 중합체 또는 다른 화학적 잔기를 가진다. 적합한 증점제는, 본 발명의 조성물에 포함된 경우, 조성물을 25℃에서의 액체와 같은 상태 (예를 들어, 유동성)로부터 고막과 접촉 후 고체와 같은 상태 (예를 들어, 겔)로 변환시키고, 비-생물분해성, 즉 포유동물에 천연적으로 존재하는 화학물질 또는 효소에 의해 분해되지 않을 수 있거나, 생물분해성일 수 있다. 조성물은 25℃에서 100,000 cps 미만 (예를 들어, 90,000, 60,000, 30,000, 20,000 또는 10,000 cps 미만)의 조성물 점도 및 일반적으로 고막 도포 후 39 Pa의 최소 항복 응력을 생성하기에 효과적인 양의 증점제를 포함한다. 전형적으로, 조성물은 0.05 내지 50%의 증점제 (예를 들어, 0.15 내지 25, 5 내지 45, 10 내지 40, 12 내지 37, 15 내지 35, 17 내지 33, 또는 20 내지 30%의 증점제)를 포함한다.

[0021] 예시적인 증점제에는 겔란 (겔라이트(GELRITE)<sup>®</sup> 또는 켈코겐(KELCOGEN)<sup>®</sup>), 히드록시프로필메틸셀룰로스 (HPMC)를 갖는 카르보폴(CARBOPOL)<sup>®</sup> 940 (폴리아크릴산), 아크릴산나트륨을 갖는 N-이소프로필 아크릴아미드 (NiPAAm) 및 n-N-알킬아크릴아미드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 갖는 폴리아크릴산 또는 PEG를 갖는 폴리메타크릴산, 셀룰로스 아세테이트 수소 프탈레이트 라텍스 (CAP), 알긴산나트륨, 및 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴록사머 (플루로닉(PLURONIC)<sup>®</sup>) 및 폴리옥사민 (테트로닉(TETRONIC)<sup>®</sup>) 가역성 온도-의존성 겔화 시스템이 포함된다. 겔란은 슈도모나스 엘로데아(*Pseudomonas elodea*)에 의해 분비되는 천연 중합체인 음이온성 탈아세틸화 세포외 다당류이다. 4당류 반복 단위는 1개의 알파-L-람노오스, 1개의 베타-D-글루쿠론산 및 2개의 베타-D-글루코오스 잔기로 이루어진다. 겔란의 동일계내 겔화 메커니즘은 양이온-유도성 (예를 들어, 칼슘 이온의 존재) 및 온도-의존성 (예를 들어, 생리학 온도)이다. 겔화는 열 가역성이다. HPMC를 갖는 카르보폴<sup>®</sup> 940은 동일계내에서 pH-의존적인 방식으로 겔화시킨다. 카르보폴<sup>®</sup>은 겔화제이고, HPMC는 겔의 점도를 증진시키는 데 사용된다. 아크릴산나트륨을 포함하는 NiPAAm 및 n-N-알킬아크릴아미드는 온도에 기반한 가역성 졸-겔 변환을 겪을 수 있는 3량체 히드로겔이다. 아크릴산나트륨 및 n-N-알킬아크릴아미드는 히드로겔의 특성, 특히 전이 온도를 변형시키는 데 사용된다. PEG를 갖는 폴리아크릴산 또는 PEG를 갖는 폴리메타크릴산은 수소 결합을 기반으로 겔화시키는 것으로 여겨진다. 폴리아크릴산은 수용성 알코올 용액에 용해될 수 있고, 주입된 후 알코올이 확산되어 중합체를 침전시키고 용액을 겔화시킨다. CAP는 pH-의존적인 방식으로 겔화시키는 나노미립자 시스템이다. 활성 화합물 (목시플록사신)은 중합체 입자의 표면 위에 부분적으로 흡수시킬 수 있다. 알긴산나트륨은 칼슘 또는 다른 다가 이온의 존재 하에 겔화시킨다.

[0022] 폴록사머 및 폴록사민과 같은 비이온성 계면활성제가 특히 유용하다. 폴록사머는 제약 업계에 익히 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Irving R. Schmolka, *Poloxamers in the Pharmaceutical Industry*, in *Polymers for Controlled Drug Delivery*, Chapter 10 (Peter J. Tarcha ed., 1990)]에 기재되어 있다. 폴록사머는 폴리(옥시에틸렌)-폴리(옥시프로필렌)-폴리(옥시에틸렌)의 3중 블록으로서 설계된 2개의 상이한 중합체 블록 (즉, 친수성 폴리(옥시에틸렌) 블록 및 소수성 폴리(옥시프로필렌) 블록)으로 구성되기 때문에 3중 블록 공중합체이다. 폴록사머는 프로필렌 옥시드 블록 소수성 물질 및 에틸렌 옥시드 친수성 물질을 갖는 블록 공중합체 계면활성제의 한 부류이다. 폴록사머는 상업적으로 이용가능하다 (예를 들어, 플루로닉<sup>®</sup> 폴리올은 바스프 코포레이션 (BASF Corporation)으로부터 입수가 가능함). 다르게는, 폴록사머는 공지된 기술에 의해 합성될 수 있다.

[0023] 폴록사머는 이전에는, 그들의 비-생물분해성, 수 용해도 및 상대적으로 빠른 약물 방출 동역학을 고려할 때, 약리학적 작용제를 투여하는 것에 대해 유용성이 부족하다고 여겨졌었다 (예를 들어, 미국 특허 제6,201,072호 참조). 그럼에도 불구하고, 본원에 기재된 바와 같이, 폴록사머는 제형을 고막에 도포하는 것에 대해 유리한 특성을 공유한다: 폴록사머의 수성 제형은 역 열 겔화 또는 역 열경화성을 나타낸다. 수성 폴록사머 제형은 그의 겔화 온도를 초과하여 가열되는 경우, 그의 점도가 증가하여 겔로 변환된다. 수성 폴록사머 제형은 그의 겔화 온도 미만으로 냉각되는 경우, 그의 점도가 감소하여 액체로 변환된다. 겔과 액체 사이의 전이는 제형의 화학적 조성 변화를 수반하지 않고, 가역적이며, 반복가능하다. 수성 폴록사머 제형의 겔-액체 전이 온도는 일상적인 실험을 사용하여 (예를 들어, 폴록사머 농도, pH 및 제형 내 다른 성분의 존재를 조작함으로써) 당업자에 의해 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 주위 온도보다 높고 고막의 온도보다 낮거나 동일한 겔화 온도를 갖는다. 이러한 조성물은 개인의 외이도를 통해 액체로서 편리하게 도포될 수 있고, 그 후 고막에서 겔로

변환됨으로써 제형 내 목시플록사신을 고막의 바로 가까이에 유지시킬 수 있다.

[0024] 목시플록사신

[0025] 본원에 기재된 바와 같은 조성물은 또한 목시플록사신 또는 그의 염을 함유한다. 목시플록사신은 화학식  $C_{22}H_{24}FN_3O_4$ 를 갖는 3세대 합성 플루오로퀴놀론이다. 목시플록사신은 박테리아 효소 DNA 자이라아제 (토포이소머라아제 II) 및 토포이소머라아제 IV에 결합하여 이들을 억제함으로써, 민감성 박테리아 중에서 DNA 복제와 수선의 억제 및 궁극적으로는 세포 사멸을 초래한다. 본원에 기재된 바와 같은 조성물 중 목시플록사신 또는 그의 염의 양은 약 0.1% 내지 약 50% (예를 들어, 약 0.25% 내지 약 45%; 약 0.5% 내지 약 25%; 약 0.75% 내지 약 10%; 약 1% 내지 약 5%; 또는 약 1% 내지 약 3%) 범위일 수 있다. 목시플록사신의 염에는, 예를 들어 제한 없이, 염산, 황산, 아세트산, 락트산, 수산화나트륨 및 수산화칼륨이 포함된다.

[0026] 목시젤 조성물의 다른 구성요소

[0027] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 조성물은 증점제 및 목시플록사신 이외에 하나 이상의 화합물을 포함한다. 예를 들어, 조성물은 예를 들어, 아드레노코르티코이드 (예를 들어, 코르티코스테로이드, 스테로이드), 진통제, 진통 보조약, 진통제-마취제, 마취제, 목시플록사신 이외의 항생제, 항박테리아제, 항감염제, 항생제 치료 보조약, 해독제, 항구토제, 항진균제, 항염증제, 항현훈제, 항바이러스제, 생물학적 반응 개질제, 세포독성제, 진단 보조제, 면역화제, 면역조절제, 단백질, 펩티드, 및 귀 장애의 치료에 유용할 수 있는 다른 작용제를 포함하는 하나 이상의 약물학적 작용제를 포함할 수 있다. 목시플록사신 이외에, 본원에 기재된 바와 같은 조성물은 하나 또는 복수개의 약물학적 작용제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 박테리아 감염과 싸우고 조직 염증을 감소시키고 자극을 완화시키기 위해, 조성물은 목시플록사신, 항염증제, 및 마취제 또는 진통제를 함유할 수 있다. 당업자는 약물학적 작용제를 확인하고 원하는 효과를 달성하기 위해 필요에 따라 이를 조합할 수 있다. 간단히 아래에 가능한 약물학적 작용제의 대표적 목록을 제공한다.

[0028] 예시적 아드레노코르티코이드에는 베타메타손, 코르티손, 텍사메타손, 히드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 파라메타손, 프레드니솔론, 프레드니손 및 트리암시놀론이 포함된다. 예시적 진통제에는 아세트아미노펜, 아스피린, 부프레노르핀, 부탈비탈, 부토르파놀, 코데인, 데조신, 디플루니살, 디히드로코데인, 에토돌락, 페노프레렌, 펜타닐, 플룩타페닌, 히드로코돈, 히드로모르폰, 이부프로펜, 케토프로펜, 케토롤락, 레보르파놀, 마그네슘 살리실레이트, 메클로페나메이트, 메페남산, 메페리딘, 메프로바메이트, 메타돈, 메토티리메프라진, 모르핀, 날부핀, 나프록센, 아편, 옥시코돈, 옥시모르폰, 펜타조신, 페노바르비탈, 프로폭시펜, 살살레이트 및 나트륨 살리실레이트가 포함된다. 하나의 예시적 진통 보조약은 카페인이다. 예시적 마취제에는 아르티카인-에피네프린, 부피바카인, 클로로프로카인, 에티도카인, 케타민, 리도카인, 메피바카인, 메토헥시탈, 프틸로카인, 프로포폴, 프로폭시카인, 테트라카인 및 티오펜탈이 포함된다. 하나의 예시적 진통제-마취제는 안티피린-벤조카인이다.

[0029] 예시적 항생제 (목시플록사신 이외에), 항박테리아제 및 항감염제에는 술폰아미드 (예를 들어, 술파닐라미드, 술파디아진, 술파메톡사졸, 술파속사졸, 파라-아미노벤조산 또는 술파세타미드), 트리메토프림-술파메톡사졸, 퀴놀론 (예를 들어, 시프로플록사신, 오픈록사신 또는 날리딕산), 베타-락탐 항생제, 페니실린 또는 세팔로스포린, 아미노글리코사이드 (예를 들어, 카나마이신, 토브라마이신, 겐타마이신 C, 아미카신, 네오마이신, 네틸마이신, 스트렙토마이신 또는 반코마이신), 테트라사이클린, 클로람페니콜 및 마크롤라이드 (예를 들어, 에리트로마이신, 클라리트로마이신 또는 아지트로마이신)가 포함된다. 적합한 페니실린의 비제한적 예에는 페니실린 G, 페니실린 V, 메티실린, 옥사실린, 나프실린, 암피실린 및 아목시실린이 포함된다. 적합한 세팔로스포린의 비제한적 예에는 세팔로틴, 세프디니르, 세파졸린, 세팔렉신, 세파드록살, 세파만돌, 세폭시틴, 세파클러, 세포니시드, 세폴레탄, 세포타심, 세프티죽심, 세프트리악손, 세프티도렌 및 세페픽이 포함된다. OM 치료에 유용한 예시적 항생제에는 페니실린, 예컨대 아목시실린 및 아목시실린-클라불라네이트 (오그멘틴(AUGMENTIN)®); 술파-기제 복합제, 예컨대 에리트로마이신-술파속사졸 (페디아졸), 트리메토프림-술파메톡사졸 (박트림(BACTRIM)®, 셉트라(SEPTRA)®); 마크롤라이드 / 아잘라이드, 예컨대 아지트로마이신 (지트로맥스(ZITHROMAX)®) 또는 클라리트로마이신 (비악심(BIAXIN)®); 제2 세대 세팔로스포린, 예컨대 세파클러 (세클러(CECLOR)®), 세프프로질 (세프질(CEFZIL)®), 세퓨록심 악세틸 (세프틴(CEFTIN)®) 또는 로라카르베프 (로라비드(LORABID)®); 및 제3 세대 세팔로스포린, 예컨대 세프디니르 (오니세프(OMNICEF)®), 세픽심 (수프라스(SUPRAX)®), 세포독심 프록세틸 (반틴(VANTIN)®), 세프티부텐 (세닥스(CEDAX)®), 세프티도렌 (스펙트라세프(SPECTRACEF)®) 및 세프트리악손 (로세핀(ROCEPHIN)®)이 포함된다.

[0030] 적합한 항구토제에는 부클리진, 클로르프로마진, 시클리진, 디멘히드리네이트, 디멘히드라민, 디페니돌, 돔페리

돈, 드로나비롤, 할로페리돌, 히드록시진, 메클리진, 메토클로프라민, 나빌론, 온단세트론, 페르페나진, 프로클로르페라진, 프로메타진, 스코폴라민, 티에틸페라진, 트리플루프로마진 및 트리메토펜아민이 포함된다. 예시적 항진균제에는 암포테리신 B, 클리오퀴놀, 클로트리마졸, 플루코나졸, 플루시토신, 그리세오폴빈, 케토코나졸, 미코나졸 및 요오드화칼륨이 포함된다. 예시적 소염제에는 알루미늄 아세테이트, 아스피린, 베타메타손, 부펙사맥, 셀레코시브, 텍사메타손, 디클로페낙, 에토돌락, 플루로비프로펜, 히드로코르티손, 인도메타신, 마그네슘 살리실레이트, 나프록센, 프레드니솔론, 로페콕시브, 살살레이트, 숄린닥 및 트리암시놀론이 포함된다. 예시적 적합한 항현훈제에는 벨라돈나, 디멘히드리네이트, 디펜히드라민, 디페니돌, 메클리진, 프로메타진 및 스코폴라민이 포함된다. 예시적 적합한 항바이러스제에는 아시클로비르, 아만타딘, 델라비르딘, 디다노신, 에파비렌즈, 포스카르네트, 간시클로비르, 인디나비르, 넬피나비르, 리바비린, 니토나비르, 잘시타빈 및 지도부딘이 포함된다. 예시적 생물학적 반응 개질제에는 알데스류킨, 인터페론  $\alpha$ -2a, 인터페론  $\alpha$ -2b, 인터페론  $\alpha$ -n1, 인터페론  $\alpha$ -n3, 인터페론  $\gamma$  및 레바미졸이 포함된다. 예시적 세포독성제에는 포도필록스 및 포도필륨이 포함된다. 예시적 면역화제에는 인플루엔자 바이러스 백신, 폐렴쌍구균 다가 백신 및 면역 글로불린이 포함된다. 예시적 면역조절제는 인터페론  $\gamma$ 이다. 본 발명에 적합한 다른 약물학적 작용제에는 베타히스틴 (예를 들어, 메니에르 병에서 발생하는 오심, 어지러움 및 이명 치료용), 프로클로르페라진 및 히오신이 포함된다.

[0031] 별법으로 또는 추가로, 조성물은 하기 화합물들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 용매 또는 희석제, 예컨대 염수, 생접착제, 투과성 또는 경피흡수 촉진제, 흡습제, 귀지 연화제, 보존제 (예를 들어, 향산화제), 또는 다른 첨가제. 이러한 화합물은 조성물 내에 0.01% 내지 99% (예를 들어, 0.01 내지 1, 0.01 내지 10, 0.01 내지 40, 0.01 내지 60, 0.01 내지 80, 0.5 내지 10, 0.5 내지 40, 0.5 내지 60, 0.5 내지 80, 1 내지 10, 1 내지 40, 1 내지 60, 1 내지 80, 5 내지 10, 5 내지 40, 5 내지 60, 5 내지 80, 10 내지 20, 10 내지 40, 10 내지 60, 10 내지 80, 20 내지 30, 30 내지 40, 40 내지 50, 50 내지 60, 60 내지 70, 또는 70 내지 80%)의 범위의 양으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 하나 이상의 증점제 (예를 들어, 플루로닉(PLURONIC)® F-127 및 카보폴(CARBOPOL)®), 목시폴록사신, 및 하나 이상의 투과성 또는 경피흡수 촉진제 (예를 들어, 비타민 E)를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 조성물은 하나 이상의 증점제, 목시폴록사신 및 하나 이상의 귀지 연화제를 포함할 수 있다. 조성물은 또한 하나 이상의 증점제, 목시폴록사신, 하나 이상의 흡습제 및 하나 이상의 보존제를 포함할 수 있다. 특정 작용제가 제형 내에서 상이한 역할을 수행할 수 있다는 점이 주목된다. 예를 들어, 카보폴®은 그의 농도에 따라 증점제로서 또는 생접착제로서 기능할 수 있다. 비타민 E는 투과성 또는 경피흡수 촉진제, 보존제 및 향산화제로서 기능할 수 있다.

[0032] 생접착제는 고막으로의 조성물의 접착을 촉진한다. 적합한 생접착제에는 히드로콜로이드, 예컨대: 아카시아; 한천 한천; 알기네이트 (예를 들어, 알긴산 및 알긴산나트륨); 카보폴®; 카르복시메틸셀룰로스 나트륨; 카르복시메틸셀룰로스 칼슘; 텍스트란; 젤라틴; 구아 검; 헤파린; 히알루론산; 히드록시에틸셀룰로스; 카라야 검; 메틸셀룰로스; 펙틴; 폴리아크릴산; 폴리에틸렌 글리콜; 폴리-N-비닐-2-피롤리돈; 및 트라가칸트가 포함된다.

[0033] 투과성 또는 경피흡수 촉진제는 고막의 투과성을 증가시켜, 고막을 목시폴록사신에 대해 보다 투과가능하게 한다. 예시적 투과성 또는 경피흡수 촉진제에는 다음이 포함된다: 알콜 (예를 들어, 에탄올 및 이소프로판올); 폴리에틸렌 (예를 들어, n-알칸올, 리모넨, 테르펜, 디옥솔란, 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜 및 글리세롤); 숄록시드 (예를 들어, 디메틸숄록시드, 디메틸포름아미드, 메틸 도데실 숄록시드 및 디메틸아세트아미드); 에스테르 (예를 들어, 이소프로필 미리스테이트/팔미테이트, 에틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 메틸 프로피오네이트 및 카프릴산/카프릴산 트리글리세리드); 케톤; 아마이드 (예를 들어, 아세트아미드); 올레에이트 (예를 들어, 트리올레인); 계면활성제 (예를 들어, 나트륨 라우릴 숄페이트); 알칸산 (예를 들어, 카프릴산); 락탐 (예를 들어, 아존); 알칸올 (예를 들어, 올레일 알콜); 디알킬아미노 아세테이트; 다중불포화 지방산 (예를 들어, 리놀렌산, 알파-리놀렌산 및 아라키돈산); 올레산; 대구 간유; 멘톨 유도체 (예를 들어, 1-멘톨); 스쿠알렌; 선형 포화 지방 알콜로부터 유도된 글리세롤 모노에테르; 플라본 (예를 들어, 카모밀 아피게닌, 루테올린 및 아피게닌 7-O-베타-글루코시드); 비타민 E ( $\alpha$ -토코페롤) 및 그의 에스테르 및 유사체; 및 센큐 (Senkyu) (리구스티시 쿠안 지웅 리조메(Ligustici Chuanxiong Rhizome)) 에테르 추출물.

[0034] 흡습제, 예컨대 프룩토스, 프탈산 및 소르비톨은 종이로부터 고막을 가로질러 젤 매트릭스로의 유체의 이동을 촉진한다. 흡습제는 종이의 유체 축적 및 가압과 관련된 통증을 완화시키는데 도움이 될 수 있고, 종이내 더 작은 유체 부피 중 목시폴록사신을 농축시킬 수 있다.

[0035] 귀지 연화제 (예를 들어, 도큐세이트, 올리브유, 중탄산나트륨, 우레아 또는 과산화수소)는 고막과 조성물 간의 접촉을 촉진한다. 저장 도중 제형의 유통 기한을 연장시키기 위해 향산화제, 예컨대 아스코르브산 및 벤조산



또는 다른 보존제가 사용될 수 있다.

[0036] 조성물을 고막에 도포하는 방법

[0037] 본 발명의 조성물은 예를 들어 중이 또는 내이 장애 (예를 들어, OM)를 치료하기 위해 외이도를 통해 고막의 표피 표면에 도포될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 예방적으로 (예를 들어, 중이 또는 내이 장애의 발병을 예방하기 위해) 도포될 수 있다. 조성물은 고막의 하부인 긴장부 또는 고막의 상부인 이완부를 포함하는 고막의 임의의 부분으로 표적화될 수 있다. 성인 인간에서, 고막은 직경이 약 9 내지 10 mm이고, 30 내지 230  $\mu$ m (평균 약 100  $\mu$ m) 범위의 두께를 갖는다. 이완부는 인간 및 동물, 예컨대 고양이, 기니아피그 및 친칠라에서 고막 영역의 3% 미만을 구성한다. 다른 포유동물 (예를 들어, 게르빌루스쥐, 토끼, 래트 및 마우스)에서, 이완부는 고막 영역의 10% 내지 25%를 구성한다. 얇은 표피 층 (대략 15 내지 30  $\mu$ m 두께)이 인간 고막을 덮는 반면, 두꺼운 표피 층 (대략 75 내지 150  $\mu$ m 두께)이 인체의 다른 영역을 덮는다. 5 내지 10개의 세포층이 이완부를 덮는 반면, 3 내지 5개의 세포층이 긴장부를 덮는다. 그러므로, 긴장부는 종종 고막의 다른 부분보다 더 얇고, 목시플록사신 또는 또 다른 약물학적 작용제에 대해 보다 투과성일 수 있다. 당업자는 긴장부의 중심부가 소리에 대해 반응하여 활동 진동 영역을 제공한다는 것을 이해한다.

[0038] 본 발명의 조성물을 고막에 도포하기 위해 당업계에 공지된 임의의 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 유체 분배 장치를 이용하여 고막에 도포될 수 있다. 분배 장치는 전형적으로 직접적으로 또는 간접적으로 저장소로부터 유동성 조성물을 수용하고 조성물을 분배 출구로 안내하는 전도관에 연결된 저장소를 갖는다. 당업자는 통상적으로 가요성 튜빙에 연결된 시린지로부터 간단한 분배 장치를 제조할 수 있다. 분배 장치는 또한 고막천자 장치, 예컨대 CDT® 스페큘럼(Speculum) (미국 와이오밍주 캐스퍼 소재 월즈 프리시전 인스트루먼트 엘엘씨(Walls Precision Instruments LLC))의 바늘을 유체 전도관으로 대체함으로써 제조될 수 있다. 분배 장치는 공압 또는 진단용 검이경 헤드 (예를 들어, 미국 뉴욕주 스캐니텔리스 팔스 소재 웰치 알린(Welch Allyn) ®으로부터)에 부착되어, 조성물을 고막에 도포하기 위한 정밀 플랫폼을 만들 수 있다.

[0039] 조성물 및 중이 또는 내이 장애에 따라, 고막을 가로질러 목시플록사신을 이동시킨 후 조성물을 귀로부터 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 면봉 또는 집게를 이용하여 수동으로 달성될 수 있다. 시린지 또는 망울이 또한 제형을 부드럽게 하고/거나 용해시키고/거나 배출시키기 위한 물, 염수 또는 다른 생체적합성 수용액을 주입하기 위해 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 조성물은 간단히 일정 기간 후 고막에서 없애버리고 (예를 들어, 운동 또는 목욕 중에) 고막 밖으로 나올 수 있다. 별법으로, 생분해성 제형은 귀로부터 제거될 필요가 없을 수 있다.

[0040] 제조 물품

[0041] 본원에 기재된 조성물은 포장 재료와 조합되고 제조 물품 또는 키트로서 판매될 수 있다. 제조 물품의 제조를 위한 성분 및 방법은 익히 공지되어 있다. 제조 물품은 본원에 기재된 하나 이상의 조성물을 조합할 수 있다. 또한, 제조 물품은 하나 이상의 약물학적 작용제, 멸균수 또는 염수, 제약 담체, 완충제 또는 유체-분배 장치를 추가로 포함할 수 있다. 내이 또는 중이 장애의 치료를 위해 조성물을 귀로 전달할 수 있는 방법을 기재한 라벨 또는 지침이 이러한 키트에 포함될 수 있다. 조성물은 단일 또는 다중 투여에 충분한 양으로 예비-포장된 형태로 제공될 수 있다.

[0042] 본 발명은 청구항에 기재된 발명의 범위를 제한하지 않는 하기 실시예에 추가로 기재될 것이다.

[0043] 실시예

[0044] 실시예 1 - 화학물질 및 시약

[0045] 목시플록사신 히드로클로라이드 분말은 알콘 랩스, 인크.(Alcon Labs, Inc.) (텍사스주 포트 워스 소재)로부터 입수하였다. 플루로닉 F-127, 시프로플록사신 히드로클로라이드, 소 알부민, 포름산, 이소프로필 미리스테이트 및 일염기성 인산암모늄은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) (미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수하였다. 아세트니트릴 및 메탄올은 벌딕 앤드 잭슨 래보러토리즈(Burdick and Jackson Laboratories) (미시건주 머스케곤 소재) 또는 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific) (뉴저지주 페어 론 소재)으로부터 입수하였고, 염화나트륨은 말린크로트, 인크.(Mallinckrodt, Inc.) (켄터키주 파리 소재)로부터 입수하였고, 이염기성 인산나트륨 칠수 화물은 유나이티드 스테이트 바이오케미칼(United States Biochemical) (오하이오주 클리브랜드 소재)로부터 입수하였고, 일염기성 인산나트륨은 피셔 사이언티픽 (뉴저지주 페어 론 소재)으로부터 입수하였고, 프로필렌 글리콜은 더 유니버시티 오브 미네소타(the University of Minnesota) (미네소타주 미네아폴리스 소재)로부터 입수하였고, PEG 4000 및 PEG 6000은 루저 케미칼 코, 인크.(Ruger Chemical Co, Inc.) (뉴저지주 린덴 소재)로

부터 입수하였고, 이들은 모두 제공받은 대로 사용하였다. 용매는 HPLC 등급이었고, 모든 다른 화학물질들은 분석용 등급이었다.

[0046] 실시예 2 - 미세투석 프로브

[0047] CMA/20 미세투석 프로브 (CMA/마이크로다이알리시스(Microdialysis), 메사추세츠주 노스 첼름스퍼드 소재)를 사용하여 중이 유체 투석액 샘플을 획득하였다. 프로브의 폴리카르보네이트 막은 20,000 Dalton의 분자량 컷오프(cutoff)를 갖는다. 프로브의 투석액 막의 길이는 10 mm였다. 프로브 막의 외부 직경은 0.5 mm였다.

[0048] 실시예 3 - 인공 중이 유체 (AMEF)

[0049] 유스타키오관 폐쇄로 비-감염된 친칠라에 축적되는 장액성 중이 유체 (MEF)의 부피는 크게 달라졌다. 미세투석에 충분한 MEF를 축적하는 성공률은 유의하게 50% 미만이었다. 이에 따라 MEF를 모방한 인공 중이 유체 (AMEF)의 제제화가 필요하게 되었다. 외이에 투여하는 겔 제형에 대해, 인산염 완충 염수 용액 (PBS, 0.015 M 인산염, pH = 7.4)을 프로브 이식 직전에 3% 소 알부민과 함께 친칠라 중이 대수포 내에 점적주입하였다.

[0050] 실시예 4 - 목시플록사신의 역투석 교정자로서의 시프로플록사신의 확인

[0051] 시프로플록사신은 목시플록사신의 화학적 유사체이고, 둘 다 퀴놀론 항생제이다. 시프로플라신은 목시플록사신과 약간 유사한 물리적 및 화학적 특성을 갖는다. 따라서, 이것이 가능한 역투석 교정자로서 선택되었다. AMEF 내에서의 시험관내 동시 손실 연구를 0.4, 0.5, 0.6 및 0.7  $\mu\text{l}$ /분의 관류 유속 및 10분의 투석액 수집 간격으로 수행하였다. 관류액은 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 목시플록사신 및 시프로플록사신을 함유하였다. 각 화합물의 손실율은 1에서 관류액의 농도에 대한 투석액의 농도의 비를 뺄셈하여 측정하였다. 목시플록사신의 시험관내 손실율은 모든 4 가지 유속에 대해 시프로플록사신의 것과 유의하게 차이가 나지 않는 것으로 밝혀짐에 따라, 미세투석 교정자로서의 시프로플록사신의 유용성이 입증되었다.

[0052] 실시예 5 - 인공 및 인큐베이션된 친칠라 중이 유체 내 목시플록사신의 유리 (비-결합된) 분획의 측정

[0053] 상기 내부 연구는 친칠라 중이 내에 점적주입한지 18 내지 24시간 후에 인공 중이 유체 (AMEF)가 천연 MEF와 비슷해지기 시작하고 세균 성장을 유지함을 보여주었다. 유리 분획을 측정하기 위해, 전날에 AMEF를 점적주입한 후 유체를 중이로부터 수거하였고, 상기 유체를 인큐베이션된 중이 유체 (IMEF)라고 지칭하였다.

[0054] AMEF 및 IMEF에서 목시플록사신의 단백질 결합을 초미세여과에 의해 측정하였다. 이 연구는 생리적 온도 (37°C)에서, 220 및 492  $\mu\text{g/ml}$ 의 공칭 농도로 수행하였다. 섞은(spiked) AMEF 또는 IMEF 용액의 분취량 120  $\mu\text{l}$ 를 마이크로콘(Microcon)<sup>®</sup> 원심분리 장치 (메사추세츠주 베드포드 소재의 밀리포어 코포레이션(Millipore Corporation))의 상단부에 두고, 클레이 아담스 트라이액(Clay Adams Triac) 0200 진동-버킷 회전자 원심분리기 (뉴저지주 파시파니 소재의 벡톤, 디킨슨 앤드 컴파니(Becton, Dickinson and Company))를 사용하여 15 내지 20분 동안 2000  $\times$  g로 원심분리하였다. 마이크로콘<sup>®</sup> 장치에의 목시플록사신의 비-특이적 결합이 있다면, 그의 정도를 조사하기 위해, 동일한 약물 농축물을 인산염 완충 염수에 넣어 섞고, MEF 표본과 유사한 장치를 통해 원심분리하였다. MEF 중의 총 농도에 대한 초미세여과물의 농도의 비를 목시플록사신에 대한 유리 분획으로서 계산하였다.

[0055] 실시예 6 - 제형 개발

[0056] 베이스 제형

[0057] 플루로닉® F-127 (PF-127)을 열경화성 겔 베이스를 형성하기 위한 중합체로서 선택하였다. PF-127을 물 중에 용해시켜 저온에서는 용액을 형성하고, 온도가 졸-겔 전이 온도 초과로 증가한 경우에는 겔을 형성하였다. PF-127 용액은 실온에서 매우 잘 유동하고, 적용되는 표면의 윤곽을 따라 흐른다. 연구된 초기 제형은 물 중 20% (w/v) PF-127로 구성되었다.

[0058] PF-127 용액은 냉각법에 의해 제조하였다. 칭량된 양의 PF-127을 필요한 양의 냉각수 (중량 기준)에 천천히 첨가하고, 약하게 교반하고, 4°C에서 밤새 저장하여 중합체가 완전히 수화 및 용해되도록 하였다.

[0059] 전이 온도 측정

[0060] 소량 (100 내지 200  $\mu\text{l}$ )의 최종 제형을 미세원심분리기 튜브로 옮겼다. 이어서, 튜브를 실온에서 수조에서 인큐베이션시켰다. 수조의 온도를 서서히 증가시켰다. 90° 이상의 각도로 기울여졌을 때 미세원심분리기 튜브 안의 겔 용액의 메니스커스(meniscus)가 변형되지 않는 경우에 겔화가 일어난 것으로 하였다. 전이 온도는 겔

화가 발생하는 사이의 2 개의 온도 값으로서 취해졌다. 베이스 제형 (20% PF-127)의 전이 온도는 22 내지 23 °C였다. 최종 제형에 대한 표적 전이 온도는 28°C 내지 32°C였다.

[0061] 첨가제

[0062] 겔의 전이 온도 및 다른 특성에 대한 첨가제의 효과를 평가하기 위해 다수의 첨가제를 시험하였고, 여기에는 에탄올, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 4000 (PEG 4000), PEG 6000, 및 이소프로필 미리스테이트 (IPM)가 포함되었다. PEG 6000 및 에탄올만이 겔 베이스의 전이 온도를 유의하게 증가시킨다는 것이 밝혀졌다. 표 1 및 2는 20%의 PF-127 용액의 전이 온도에 대한 PEG 6000 및 에탄올의 효과를 나타낸다.

## 표 1

다양한 농도의 PEG 6000을 함유하는 20%의 PF-127 용액의 전이 온도

PEG 6000 농도	전이 온도 (°C)
0.10%	22 - 23
0.30%	22 - 23
0.50%	22 - 23
1%	22 - 23
2%	23 - 24
3%	26 - 27
5%	>37(겔화되기 어려움)

[0063]

## 표 2

다양한 농도의 알콜 및 2%의 PEG 4000을 함유하는 20%의 PF-127 용액의 전이 온도

에탄올 농도	전이 온도 (°C)
2%	30 - 31
4%	31 - 32
6%	35 - 36
8%	>37

[0064]

[0065] 또한, 고농도의 PF-127 (21 및 22%)을 시험하였으나, 이들 제형이 완전히 수화되는 데에는 장기간이 소요되었고 (3일 이하), 높은 점도로 인하여 다루기가 어려웠다. 또한, 이들은, 22%의 겔의 경우 베이스 겔에 대해 영하의 온도 내지 PEG 6000의 첨가 후에 10°C 미만의 범위인 실온보다 훨씬 미만한 전이 온도, 및 21%의 겔의 경우 23 내지 24°C의 전이 온도를 나타내었다.

[0066] 생성된 가장 유망한 베이스 겔 제형은 23 내지 24°C의 전이 온도, 실온에서의 우수한 유동성을 가지며, 하기 조성물을 갖는다.

[0067] PEG 6000 2% (v/w)

[0068] 프로필렌 글리콜 20% (v/w)

[0069] PF-127 20% (w/w)

[0070] 2가지 수준의 목시플록사신 염산염을 베이스 겔로 혼입시켰다: 1 및 3% (w/w). 1%의 목시겔은 밝은 황색을 갖는 투명한 용액인 반면, 3%의 목시겔은 황색 액체에 분산된 백색 분말을 가진 미세한 현탁액이었다. 이러한 목시겔 둘 다는 29 내지 31°C 범위의 최종 전이 온도를 나타내었다.

[0071] 10 ml 배치의 1%의 목시겔을 제조하기 위해, 하기 절차를 수립하였다.

[0072] 1. 신틸레이션 바이알에 수용액 중 PEG 6000 5.0 ml (40 mg/ml)를 첨가하고,

[0073] 2. 2.0 ml의 프로필렌 글리콜을 첨가하고,



- [0074] 3. 100 mg의 목시플록사신 염산염을 천천히 첨가하고,
- [0075] 4. 3 내지 5분 동안 상기 혼합물을 초음파처리하고,
- [0076] 5. 1.3 ml의 물을 첨가하고,
- [0077] 6. 2 g의 PF-127을 첨가하고,
- [0078] 7. 신틸레이션 바이알에 약하게 소용돌이를 일으켜 PF-127 분말을 습윤화시키고,
- [0079] 8. 완전한 수화를 위해 밤새 냉장고에서 상기 혼합물을 보관하고,
- [0080] 9. 사용하기 전에 용액을 완전히 볼텍싱한다.
- [0081] 3%의 목시겔의 제조 절차는 300 mg의 목시플록사신 염산염을 첨가하고, 단지 물 1.1 ml만이 필요하다는 점을 제외하고는 1%의 목시겔의 제조 절차와 거의 동일하다.
- [0082] 시험관내 방출 연구
- [0083] 목시플록사신의 시험관내 방출의 연구 목적은 겔 제형으로부터의 방출 속도 및 정도를 측정하기 위한 것이었다. 각 방출 연구에서, 프란츠(Franz) 확산 셀을 한슨 마이크로메트(Hanson Microette) 장치 (캐나다 채트스워드, 한슨 리서치(Hanson Research))에 설치하였다. 수용기 구획을 250 rpm으로 자석으로 교반시킨, 15%의 물 중 PF-127 8.0 ml의 방출 매질로 충전하였다. 각 프란츠 셀의 하부 부분을 둘러싼 물 순환 자켓으로 온도를 37℃로 유지하였다. 셀룰로스 투석 막 시트 (미국 뉴저지주 피카닉, 벨-아트 프로덕츠(Bel-Art Products)사의 사이언스웨어(Scienceware)®, MW 한계치 = 6 kD)를 작은 원형 (3 cm의 직경)으로 절단하고, 각 수용기 구획의 상부에 탑재시켰다. 도넛-형태의 테플론 디스크를 막의 상부에 위치시켜 공여체 구획을 형성하였다. 이어서, 각 목시플록사신 겔 제형의 350  $\mu$ l의 분취량을 투여 구획으로 부가하였다. 프란츠 셀의 밀봉 이전의 5분의 대기 시간은 완전한 겔 형성을 보장하도록 하였다. 샘플 암을 필름으로 커버하여 증발을 방지하였다. 겔 투여 후의 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 및 96시간에 수용기 구획으로부터 40  $\mu$ l의 각각의 샘플을 회수하였다. 이 샘플들을 분석때까지 -20℃에서 보관하였다.
- [0084] 시험관내 샘플 중의 목시플록사신 농도를 본원에서 약술된 오프라인 HPLC-형광 방법에 의해 측정하였다. 각 샘플의 10  $\mu$ l의 분취량에 125  $\mu$ l의 인산염 완충 염수 (PBS)를 첨가하여 표준 곡선 샘플과 동일한 부피를 달성하였다. 이어서, 내부 표준물 (100  $\mu$ g/ml의 시프로플록사신 65  $\mu$ l)을 첨가한 후, 이동상을 이용하여 5.0 ml의 최종 부피로 희석하였다. 1000, 100, 10, 및 1  $\mu$ g/ml의 PBS 중 표준 원액으로부터 0.05 내지 20.0  $\mu$ g/ml의 목시플록사신 표준 샘플을 제조하였다. 각 표준 곡선 샘플을 위해, 65  $\mu$ l의 내부 표준물, 15%의 PF-127 10  $\mu$ l, 및 다양한 부피의 PBS를 첨가하여 시험관내 샘플로 동일한 부피를 달성한 후, 이동상을 이용하여 5.0 ml의 최종 부피로 희석하였다. 상기 혼합물을 30초 동안 빠른 속도로 볼텍싱하였다. 주입 부피는 50  $\mu$ l이었다.
- [0085] 실시예 7-수술
- [0086] 동물
- [0087] 390 내지 670 g의 수컷 친칠라 (*Chinchilla laniger*) (미국 오하이오주 폴리마우쓰 소재의 라이어슨 (Ryerson) 또는 미국 미네소타주 로체스터 소재의 단 몰튼 (Dan Moulton))를 본 연구에 사용하였다. 프로토콜은 미네소타 대학의 동물실험윤리위원회 (IACUC)에서 승인하였다.
- [0088] 유스타키오관 폐쇄 (ETO)
- [0089] ETO 수술의 목적은 인공 중이 유체가 비인두로 흘러가는 것을 방지하여 미세투석 동안 수포내에 적절한 유체가 남아있도록 하는 것이다. 구타 페르카 포인트 (크기 15, 디아덴트 (DiaDent)®, 대한민국 소재의 디아덴트 그룹 인터내셔널 인크. (DiaDent Group International Inc.))의 중간 부분을 4 mm의 길이로 자르고 유스타키오관을 폐쇄하는데 사용하였다.
- [0090] ETO 수술은 조사트 (Jossart) 등의 문헌 [Jossart et al., 1990, Pharm. Res., 7:1242-7]에 따라 변형하여 수행하였다. 간단히, 동물을 케타민 (40 내지 50 mg/kg, 근육내) 및 펜토바르비탈 (5 내지 10 mg/kg, 복강내)로 마취시켰다. 이어서 연구개에 작은 절개를 만들어 유스타키오관을 노출시켰다. 유스타키오관의 각 개구를 4 mm 절편의 포인트로 폐쇄하였다. 수술 마지막에, 조직 접착제 (벳본드 (Vetbond)®, 미국 미네소타주 세인트 폴 소재의 쓰리엠)를 사용하여 절개를 닫았다.

[0091] 인공 중이 유체 점적

[0092] 각 수포에 인공 중이 유체 (AMEF)를 점적하는 것은 미세투석 프로브 이식 전 투여일에 수행하였다. 두개골의 후방면에서 머리쪽 수포를 통해 친칠라 중이 공동으로 접근하였다. 15 GA 1½ B 피하주사기 바늘 (미국 미주리 주 세인트 루이스 소재의 셔우드 메디컬 컴파니 (Sherwood Medical Company))을 사용하여 뼈가 얇은 우측 및 좌측 수포의 끝에 수동으로 작은 구멍을 뚫었다. 적절한 AMEF를 PE-50 길이의 배관을 통해 꼭대기까지 완전치 채워질 때까지 각 수포로 점적하였다. 검이경을 이용하여 고막의 완전성을 시험하였다. 외이도로 AMEF가 누출된 흔적이 있는 귀에는 투여하지 않았다.

[0093] 미세투석 프로브의 이식

[0094] AMEF 점적 후에 바로 미세투석 프로브를 이식하였다. 머리쪽 수포 상의 동일한 구멍을 통해 친칠라 중이 공동으로 접근하였다. 이어서 CMA/20 미세투석 프로브를 구멍을 통해 각 중이 공동으로 조심스럽게 삽입하였다. 프로브는 후양 (Huang) 등에 의해 개발된 방법 (문헌 [Huang et al., 2001, J. Pharm. Sci., 90:2088-98])에 따라 치과용 시멘트 및 고정 바늘로 고정된 플라스틱 크라운을 사용하여 친칠라 두개골 상에 고정시켰다.

[0095] 실시에 8-분석 방법

[0096] 미세투석물에서 목시플록사신 및 시프로플록사신의 온-라인 HPLC-MS-MS 분석

[0097] 온-라인 미세투석 HPLC-MS-MS 시스템을 확립하였다. 미세투석 관류 유속은 1-ml, 2.5-ml (CMA/마이크로디알리시스 (Microdialysis), 미국 매사추세츠주 노쓰 첼름스포드 소재) 또는 5-ml (미국 네바다주 레노 소재의 해밀턴 컴파니 (Hamilton Company)) 미세주사기가 장착된 하버드 미세주사 펌프 (모델 22; 하버드 아파라투스 인크. (Harvard Apparatus Inc.); 미국 매사추세츠주 사우쓰 나틱 소재)를 사용하여 조절하였다. 양쪽 귀에서의 미세투석물을 연속 프로그래머로 조절된 10-포트 밸브 바디의 2가지 10- $\mu$ l 또는 25- $\mu$ l 샘플 고리 (미국 텍사스주 휴스턴 소재의 발코 인스트루먼트 코. 인크. (Valco Instruments Co. Inc.))로 교대로 수집하였다. 본 연구에서는 0.5  $\mu$ l/분의 미세투석 관류 유속이 사용되었다. HPLC 컬럼은 YMC J'스피어 (sphere)<sup>®</sup> M80 4- $\mu$ m 역상 컬럼 (2 x 100 mm, 4  $\mu$ m, 미국 매사추세츠주 밀포드 소재의 워터스 코퍼레이션 (Waters Corporation))이었다. 이동상은 물 중 0.1% 포름산 (pH = 2.8 내지 2.9, 80% v/v) 및 아세트ونی트릴 (20% v/v)로 이루어지고, 유속은 0.1 ml/분이었다. 컬럼 성능이 시간에 따라 변하기 때문에, 상이한 백분율의 아세트ونی트릴 (19 내지 25 %의 범위)을 사용하여 컬럼 온도를 40 °C로 유지하면서 피크 형태 및 보유 시간을 최적화하였다. 시마즈 (Shimadzu) 10-A HPLC 시스템 (일본 교토 소재의 시마즈 코퍼레이션 (Shimadzu Corporation))을 사용하여 발코 (Valco) 온-라인 샘플 수집 시스템에 접속하였다. 이는 LC-10Advp 펌프, SIL-10A 시스템 제어장치, CT0-10A 컬럼 히터, FCV-10ALvp 프로포셔너 (proportioner) 및 DGU-14A 기체제거장치로 구성되었다. HPLC 유출물은 PE-사이엑스 (Sciex) API-365 삼중 사중극 MS-MS 질량 분석계 (캐나다 온타리오주 콘코드 소재의 퍼킨-엘머 사이엑스 인스트루먼트 (Perkin-Elmer Sciex Instruments))의 터보 이온분무 공급원 (400 °C, 질소 7 l/분)으로 진입하였다. 검출은 다중 반응 모니터링 (MRM) 모드로 목시플록사신에 대해서는 402.5 내지 358.2에서 및 레트로투석 고정기인 시프로플록사신에 대해서는 332 내지 288에서 모-생성물 이온 쌍에 대해 수행하였다. 각 실험에 대해 적용된 농도 범위는 중이 유체 투석물에서 관찰되는 농도에 따라 변화하였다. 사용된 최저 표준 농도는 0.1  $\mu$ g/ml이었으나, 최고 농도는 118  $\mu$ g/ml이었다. 표준 농도 범위가 증가함에 따라, 신호가 농도 증가에 따라 비례하지 않게 증가하는, 약간 비선형으로 나타났다. 이 문제를 해결하기 위해, 일정한 중량으로 선형 회귀를 수행하기 전에 신호 (피크 면적) 및 표준 농도 모두에 대수 변형을 적용하였다.

[0098] 미세투석물 중 목시플록사신 및 시프로플록사신의 온라인 HPLC-형광 분석

[0099] 생산성을 향상시키기 위해서, 복수의 동물 실험이 동시에 실시되도록 할 뿐만 아니라 장치 고장이 발생한 경우 백업 (backup)으로도 기능하는 추가 온라인 검정법을 개발하였다. 상기 검정법은 여기 파장 295 nm 및 방출 파장 490 nm에서의 형광 검출의 사용을 포함하였다. 암모늄 포스페이트 (20 mM, pH = 2.8, 76 또는 78%) 및 아세트ونی트릴 (24 또는 22%)의 이동상 조성물 및 유속 0.5 ml/분의 YMC ODS-A 5  $\mu$ m, 120 A (4.6 x 100 mm, 워터스 코퍼레이션; 미국 매사추세츠주 밀포드 소재) 컬럼을 적용하였다. 목시플록사신에 대해 7.4분 및 시프로플록사신에 대해 3.6분의 보유 시간을 달성하기 위해서 45°C의 컬럼 온도를 적용하였다. 형광 검출기는 시마즈 RF 535 (시마즈; 일본 교토 소재) 또는 제스코 821FP (제스코 인코퍼레이티드 (Jasco Inc.); 미국 메릴랜드주 이스턴 소재)를 사용했다. 온라인 시스템의 기타 성분 및 설정은 본원에 약술된 것과 동일하였다. 상기 검정에 사용된 표준 농도 범위는 0.1 내지 205  $\mu$ g/ml이었다. 상기 검정에 대한 반응 신호에서 비선형성은 나타나지 않았으나, 기울기 및 y-절편을 수득하기 위한 선형 회귀 이전의 일관성을 위해서 신호 (피크 영역) 및 표준 농

도의 로그 변환을 실시하였다.

[0100] 온라인 HPLC-MS-MS 및 온라인 HPLC-형광에 의한 목시플록사신 중이 유체 미세투석 샘플의 분석에서의 정밀도 및 정확도

[0101] 표준 곡선 리드백 (readback)으로부터 중이 유체의 미세투석물 중 목시플록사신에 대한 두 검정 방법의 정밀도 및 정확도를 평가하였다. 온라인 HPLC-MS-MS 검정에서 농도가 0.5 내지 100 (0.1 내지 118)  $\mu\text{g/ml}$  범위인 6개의 표준물을 전형적으로 사용하였다. 0.5 내지 50  $\mu\text{g/ml}$  범위에 걸쳐 정확도는 96 내지 105% 범위로 계산되었다. 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서의 정확도는 91%이었고, 이것은 상기 범위에서 미세투석물의 수준을 결정하는데 있어서의 약간의 하향 성향을 나타냈다. HPLC-MS-MS 표준 곡선의 전체 범위에 걸쳐 정밀도는 1.1 내지 6.2% (%CV)이었다. 온라인 HPLC-형광 검정에서 농도가 0.1 내지 200  $\mu\text{g/ml}$  범위인 5개 또는 6개의 표준물을 전형적으로 사용하였다. 표준 곡선의 전체 범위에 걸쳐 정확도는 98 내지 102% 범위로 계산되었다. 정밀도는 0.5 내지 200  $\mu\text{g/ml}$  범위에 걸쳐 0.3 내지 3.6% (%CV) 이었고, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 13.3%이었다.

[0102] 중이 유체 및 시험관내 방출 샘플 중 총 농도 및 미결합 농도의 검정

[0103] 단백질 결합 연구 샘플 및 시험관내 방출 샘플 중 목시플록사신 농도를 형광 검출을 이용하여 HPLC (시마즈; 일본 교토 소재)에 의해 측정하였다. 성분 및 크로마토그래피 조건은 본원에 약술된 것과 유사하였다. 시험관내 방출 샘플의 처리는 본원에 약술된 것과 같았다. 단백질 결합 연구 샘플에 대해서, 3개의 별개의 표준 곡선을 사용하였다; 한외여과물 및 PBS 샘플에 대한 1개의 표준 곡선 및 각각의 블랭크 매트릭스를 사용하여 AMEF 및 IMEF 샘플 중 총 약물 농도를 측정하기 위한 2개의 표준 곡선. 스파이크 처리된 PBS, AMEF 및 IMEF 중 최고 농도를 갖는 샘플을 상응하는 블랭크 매트릭스로 3배 희석시키고, 분석하기 위해서 50  $\mu\text{l}$  분취액을 취하기 전에 최고 농도 군으로부터의 한외여과물을 PBS로 2배 희석시켰다. 내부 표준물 (10  $\mu\text{l/ml}$  시프로플록사신 125  $\mu\text{l}$ ) 을 표준 샘플을 비롯한 모든 샘플에 첨가하였다. 각각의 샘플에 아세트니트릴 200  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 이후, 상청액 100  $\mu\text{l}$ 를 여과된 20 mM 암모늄 포스페이트 1염기 300  $\mu\text{l}$ 에 첨가하기 전에 샘플을 보텍스시키고 10분 동안 2000 xg으로 원심분리하여 최종 샘플이 이동상과 유사하게 되도록 하였다. 25  $\mu\text{l}$ 의 주입 부피를 사용하였다.

[0104] 실시예 9 - 수포내 투약 연구

[0105] 디콘볼루션 분석에 사용하고자 하는 단위 임펄스 반응 함수를 결정하기 위해 본 연구를 실행하였다. 이를 위해, 중이 내의 초기 목시플록사신 농도 및 반감기를 수포내 볼루스 투약 연구로부터 평가하였다. 모든 동물이 수포내 투약 이전에 본원에 개괄한 유스타키오관 폐쇄 절차를 겪게 하였다. 친칠라를 투약 및 미세투석 프로브의 이식 동안 케타민 (40 내지 50 mg/kg, IM) 및 펜토바르비탈 (20 내지 30 mg/kg, IP)로 마취시켰으나, 나머지 실험 동안에는 마취에서 회복하게 두었다. 2가지 투약 수준을 목표로 하였다. 50 및 150  $\mu\text{g}$ 의 목시플록사신의 볼루스 투약량을 본원에 기재된 절차를 사용하여 1 ml의 AMEF 중에서 중이 (n = 9 귀) 내로 직접 전달하였다. 각 귀 (중이)로부터 결합되지 않은 목시플록사신 농도를 4 내지 5회의 반감기 동안 HPLC-MS-MS 또는 HPLC-형광과 커플링된 미세투석법을 사용하여 투약 845분 후까지 20분마다 모니터링하였다.

[0106] 실시예 10 - 외이 겔 제형 투약 연구

[0107] 투약 1일 전에 동물들을 양쪽 유스타키오관 폐쇄 (ETO) 수술하였다 (1마리에 대해서만 ETO를 투약일에 실행하였다). 고실측정으로부터 음압 수치를 나타내는 동물이 성공적인 유스타키오관 폐쇄를 나타내었다. 투약일에 ETO를 실시한 친칠라 (#638)에 대해서는, 고실측정을 건너뛰었다. 고막의 완전성을 AMEF 점적주입, 프로브 이식 이후, 및 투약 이전에 이경을 사용하여 눈으로 확인하였다. 약화된 고막을 나타내는 귀에는 투약하지 않았다.

[0108] 투약일에, 동물을 케타민 (40 내지 50 mg/kg, IM) 및 펜토바르비탈 (20 내지 30 mg/kg, IP)로 마취시키고 가열 패드 위에 두어 정상 체온을 유지시켰다. 고실측정 후, 친칠라를 마우스 바 클램프(mouth bar clamp) 위에 두어 본원에 개괄한 AMEF 점적주입 및 프로브 이식을 가능케 하였다. 치아관이 치과용 집착체에 의해 고정되면, 동물을 마우스 클램프로부터 제거하고 그 옆에 두었다. 고막의 완전성을 다시 한번 이경으로 확인하였다.

[0109] 50  $\mu\text{l}$ 의 100% 이소프로필 미리스테이트 (IPM) 형태의 경피흡수 촉진제로의 전처리를 1 ml 투베르쿨린 주사기에 부착된 폴리에틸렌 (PE-50) 배관 조각을 사용하여 고막에 도포하였다. PE-50 배관은 이경 끝단을 통해 외이에 진출시켰고 이경의 도움으로 고막 부근에 배치하였다. 이소프로필 미리스테이트가 귀에 도포되면, 타이머를 활성화시키고 PE-50 배관을 회수하였다. 0.5분 (이소프로필 미리스테이트 점적주입 직후), 2분, 5분 및 20분의 4번의 전처리 시간이 포함되었다. 전처리 시간에 도달하면, 겔 제형이 채워진 1 ml 투베르쿨린 주사기에 부착된

또다른 PE-배관 조각 (1% 목시겔의 경우 PE-50 및 3% 목시겔의 경우 PE-160)을 이경의 도움으로 고막 부근의 외이도에 진출시켰다. 겔 제형을 이경 끝단에 닿을 때까지 서서히 도포하였다. 타이머를 개시하고, 외이피관을 적어도 5분 동안 온화하게 위로 잡아당겨 제형이 겔이 되게 하면서 PE-배관 및 이경을 회수하였다. 외이피관을 놓고 반대쪽 귀에 투약하기 전에 10분의 총 겔화 시간을 허용하였다. 동물의 심박수, 호흡수, 체온 및 마취심도를 상기 절차에 걸쳐 지속적으로 모니터링하였다.

[0110] 한쪽 또는 양쪽 귀의 투약을 완료하면, 엘리자베션 칼라(Elizabethan collar)에 동물을 묶은 후 레이턴(Raturn)® 자유-이동 동물 감금 시스템 (바이오애널리티컬 시스템즈, 인코포레이티드(Bioanalytical Systems, Inc.: 미국 인디애나주 웨스트 라파예트 소재)) 내부에 배치하고 마취로부터 완전히 회복되게 하였다. 중이 유체 미세투석물 샘플을 각 귀로부터 20분마다 수집하고 HPLC-MS-MS 시스템 또는 HPLC-형광 시스템에서의 분석을 위해 온-라인 주입하였다. 동물들을 실험 기간에 걸쳐 음식 및 물에의 자유로운 접근을 가능하게 하였다. 부프레노르핀 (0.05 mg/kg IM) 및 피하 유체 보충물 (6 mL의 정상 염수)를 10 내지 14시간마다 공급하였다. 중이 유체 미세투석물 내의 목시플록사신 농도를 1% 목시겔로의 외이 투약 5375분 후까지 및 3% 목시겔로의 투약 6180분 후까지 모니터링하였다.

[0111] 실시에 11-데이터 분석

[0112] 프로브 회수율을 위한 중이 유체 미세투석물 농도 및 지연 시간의 보정

[0113] 샘플 루프에 미세투석 프로브를 연결하는 관의 길이 및 미세투석 관류 유속을 기준으로, 지연 시간을 추정하였다. 이러한 값은 프로브의 팁으로부터 샘플 수집 루프로의 투석물 수송 시간을 나타낸다. 전형적인 지연 시간은 약 45분이었다. 실제 샘플 시간은 지연 시간을 위해 보정되고 5분에 가장 근사하게 통합된 10-분 수집 간격의 중점이었다.

[0114] 각각의 투석물 샘플에 있어서, 프로브 회수율은 투석물에서의 검정기 피크 면적 대 개체로부터의 관류액에서의 검정기 피크 면적의 비를 감산함으로써 결정하였다. 바이어스를 경감시키고 실험 과정에 걸쳐 프로브 성능에서의 변화를 나타내기 위해, 5개의 추정값의 이동 평균을 사용하여 "지점-대-지점" 보정 방법 대신에 프로브 회수율을 보정하였다. 실제 중이 유체 약물 농도를 수득하기 위해, 각각의 투석물 중의 목시플록사신 농도를 평균 프로브 회수율로 나누었다.

[0115] 인트라볼라 투여 후 중이 유체에서의 목시플록사신 농도-시간 데이터

[0116] 아홉 (9)개의 각각의 데이터 세트에서의 목시플록사신의 중이 유체 수준을 단일지수함수 감소에 따라 분석하였고, 여기서 초기 부피 및 제거 속도 상수는 추정된 변수였다. 비선형 회귀 분석 (SAAM II, v 1.2.1, 워싱턴대학교 (미국 워싱턴주 시애틀 소재))을 사용하여 1-구획 모델의 변수를 특성화하였다. 가중치 함수는 5%의 계수 변화로 추정되었고, 선택된 변화량 모델은 피팅된 함수보다는 데이터와 관련있었다.

[0117] 1% 및 3% 목시플록사신 (목시겔) 제형의 외부 귀 투여 후 중이 유체 중의 목시플록사신 농도의 분석

[0118] 데이터의 검사는 중이 유체 농도가 예상보다 매우 높은 경우의 데이터 세트의 정확한 분석을 포함하였다. 확증적인 증거가 이것들이 손상된 고막으로부터의 결과임을 암시하는 경우, 데이터 세트를 추가의 분석으로부터 제외하였다. 1% 목시겔 도포를 위한 23개의 사용가능한 데이터 세트가 있었고, 3% 목시겔 도포를 위한 13개의 세트가 있었다. 후속의 비구획 분석 및 디콘볼루션 절차를 위한 데이터를 버리기 위해서 10분에 가장 근사한 시간으로 목시플록사신 중이 유체 농도-시간 데이터를 조정하였다. 이러한 "버림" 단계는 실제 시간으로부터 명목상 시간으로의 시간을 10분 이하로 조정하는 것을 필요로 한다.

[0119] 각각의 중이 유체 농도 데이터 세트의 비구획 분석은 윈놀린 프로페셔널 (WinNonlin Professional) (v 5.2, 파사이트 코퍼레이션 (Pharsight Corporation) (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재))로 수행하였다. 선형 사다리꼴 및 선형 보간 옵션으로 혈관의 투여 (모델 200)를 선택하였다. 로그 회귀 및 균일한 가중치로 "람다\_z를 위한 최적의 피트" (말단 속도 상수) 옵션을 선택하였다. 목시플록사신의 중이 유체로의 진입 정도 (생물학적 이용가능성, %F)를 각각의 데이터 세트에 대해 외부 귀 투여량, 0시간으로부터 무한대까지의 곡선하의 면적 (AUCinf), 및 인트라볼라 투여 연구로부터 측정된 중이 유체로부터의 평균 제거 간격 (CL)으로부터 다음과 같이 계산하였다.



[0120] <수학식 1>

$$\%F = \frac{CL \cdot AUC_{inf}}{\text{투여량}}$$

[0121]

[0122] 원놀린 프로페셔널 (v 5.2, 파사이트 코포레이션 (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재))에서 디콘볼루션을 수행하여 투입 함수 (중이 유체로의 목시플록사신의 침투 속도)를 측정하였으며, 여기서 2-기간 단위 충격 반응 함수는 분포의 평균 부피 및 인트라볼라 투여 데이터의 분석으로부터 측정된 평균 제거 속도 상수를 사용하여 규정하였다. 짝이 없는 t-시험은 부피 및 속도 상수 변수가 두 인트라볼라 투여량 수준에서 유의하게 상이하지 않음을 나타내었다.

[0123] 실시예 12 - 시험관내 1% 및 3% 목시겔로부터의 목시플록사신의 방출

[0124] 겔 중 목시플록사신의 검정된 농도를 참조하여 표현된, 겔 제형으로부터 방출된 목시플록사신의 누적 백분율 플롯을 도 1에 도시하였다. 적당한 초기 방출 속도 후, 두 제형은 약 2 내지 6시간에 일어난 최대 시험관내 방출 속도를 나타냈다. 이후 방출 속도는 서서히 감소하였다.

[0125] 데이터의 외삽은, 1% 목시겔이 5시간에 그의 함량의 약 50%를 방출하고, 9.5시간에 75%를 방출하고, 16시간에 90%를 방출하였음을 나타냈다. 1% 목시겔 제형에서 관찰된 최대 방출 속도는 시간 당 대략 12%였으며, 이는 1% 목시겔로 외이 내에 투여된 전형적인 부피의 겔인 500  $\mu$ l의 제형으로부터의 약 9.4  $\mu$ g/분의 방출 속도에 상응한다.

[0126] 3% 목시겔은 7.5시간에 그의 함량의 약 50%를 방출하고, 15시간에 75%를 방출하고, 26시간에 90%를 방출하였음을 나타냈다. 3% 목시겔 제형에서 관찰된 최대 방출 속도는 시간 당 대략 9.1%였으며, 이는 3% 목시겔로 외이에 투여된 전형적인 부피의 겔인 350  $\mu$ l의 제형으로부터의 약 15  $\mu$ g/분의 방출 속도에 상응한다.

[0127] 3% 목시겔 제형은 시험관내에서 1% 목시겔보다 높은 목시플록사신 절대 방출 속도를 나타냈지만, 3% 목시겔로부터의 보다 느린 분획 방출 속도는 현탁액에 존재하는 투여량의 일부분에 기인하는 것 같으며, 그 결과 겔로부터의 방출 전에 용해를 위한 일부 시간이 필요하다.

[0128] 실시예 13 - 인공 및 인큐베이션된 중이 유체 중 목시플록사신의 유리 분획

[0129] 단백질 결합 연구로부터의 결과를 하기 표 3에 요약하였다. PBS에 대해 관찰된 유리 분획은 모두 100%에 근접하였으며, 이는 초여과 장치의 멤브레인에 대한 약물 흡착이 거의 없거나 전혀 없음을 나타낸다. AMEF의 경우, 매우 높은 비결합률 (%)이 농도 범위에 걸쳐 계산되었으며 (84 내지 92%), 이는 소 알부민에 대한 목시플록사신의 최소 결합을 나타낸다. IMEF에서, 목시플록사신의 유리 분획은 유사한 농도의 AMEF에서 관찰된 경우보다 낮았으며, 이는 상기 매트릭스에 또다른 결합 단백질이 존재함을 시사한다.

[0130] 전체적으로, 목시플록사신에 대한 유리 분획은 시험된 농도 범위에서 비교적 높게 유지되었다. 따라서, 미세투석에 의해 측정된 약물 농도는 중이 유체에 존재하는 전체 목시플록사신 수준의 대부분을 나타낸다. 투여 후 처음 몇시간 동안, 샘플 매트릭스는 AMEF와 매우 닮아있다. 실험 시간이 18시간 이상에 근접함에 따라, 샘플 매트릭스는 IMEF에 의해 나타난 경우보다 우수하다고 예상된다. 하기 표 3에 제시된 결과에서, 두 매트릭스에서의 유리 분획 사이에 유의한 차이가 존재하였다. 그러나, 이러한 차이는 MEF 미세투석 데이터의 해석에 대해 임의의 의미있는 영향을 갖는 것 같지 않다.

표 3

[0131]

인큐베이션된 중이 유체 (IMEF), 인공 중이 유체 (AMEF) 및 포스페이트 완충 염수 (PBS) 중 목시플록사신의 비결합률 (%)			
스파이킹된(spiked) 샘플 매트릭스	공칭 스파이킹된 농도 ( $\mu$ g/ml)	평균 측정 농도 ( $\mu$ g/ml)	비결합률 (%) (평균 $\pm$ 표준편차)
IMEF	220	175	68 $\pm$ 0.4
	492	387	75 $\pm$ 2.0
AMEF	220	182	84 $\pm$ 6.3
	492	369	92 $\pm$ 1.3
PBS	220	200	97 $\pm$ 2.6
	492	421	105 $\pm$ 6.0

[0132] 실시예 14 - 수포내 투여 후 목시플록사신의 중이 유체 농도대략 50 및 150  $\mu\text{g}$ 으로 중이 내에 직접 투여한 후 미세투석에 의해 측정된 비결합 중이 유체 목시플록사신 농도 ( $C_{\text{mef}}$ )의 플롯을 도 2 및 도 3에 도시하였다. 중이 유체 목시플록사신 농도는 단일지수적으로 감소하였으며, 비교적 적당한 대상체간 변이성을 나타냈다. 이들 농도-시간 프로파일은 횡단-고막 전달 후  $C_{\text{mef}}$  데이터의 디컨볼루션(deconvolution) 분석에서 단위 충격 응답 함수 (UIRF)를 정의하는데 사용되었다. 중이 유체 중 목시플록사신 분포의 부피는 저 수포내 투여량 및 고 수포내 투여량 각각에 대해  $1.75 \pm 0.79$  및  $1.90 \pm 0.43$  ml (평균  $\pm$  표준편차)로 평가되었다. 제거 속도 상수는 각각  $0.0102 \pm 0.0040$  및  $0.0075 \pm 0.0010$ 분<sup>-1</sup>로 평가되었다. 부피나 제거 속도 상수 모두 투여량 의존적이지 않았다. 따라서, 이들 두 파라미터에 대한 평균 값은 디컨볼루션 절차에서 UIRF를 정의하는데 사용되었다.

[0133] 실시예 15 - 1% 및 3% 목시겔에 의한 외이 투여 후 목시플록사신의 중이 유체 농도

[0134] 1% 목시겔에 의한 외이 투여

[0135] 1% 목시겔에 의한 외이 투여 후 중이 유체 목시플록사신 농도 ( $C_{\text{mef}}$ )의 플롯을 그룹별로 도 4a 및 도 4b에 도시하였다. 투여 후 4일 (5375분)까지에 대해 측정가능한 수준을 얻었다. IPM에 의한 사전처리 시간의 길이 (0.5, 2, 5 또는 20분)는 이들 연구에서 측정된  $C_{\text{max}}$  또는 AUCinf 값에 대해 영향을 미치지 않았다.

[0136] 이들 데이터를 도 5에서 선형 및 로그 농도 척도 상에 평균  $\pm$  표준편차로서 제시하였다. 목시플록사신의 최대 평균 농도는 대략 48  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였으며, 투여-후 약 900분 (15시간)에 일어났다. 평균 농도 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 약 90분에 도달하였고, 투여 후 약 2100분 (35시간)까지 상기 수준을 초과하여 유지되었다. 평균 농도 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 약 230분에 도달하였고, 투여 후 약 1610분 (27시간)까지 상기 수준을 초과하여 유지되었다.

[0137] 비결합 (유리) 중이 유체 농도-시간 데이터의 비구획 분석의 결과를 하기 표 4에 요약하였다.  $C_{\text{max}}$  및 말단 속도 상수  $\lambda_z$ 에서 유의한 변이성이 관찰되었다. 후자의 파라미터는  $C_{\text{mef}}$ 의 감소 분획 속도를 나타내며, 목시플록사신의 중이 내로의 유입 및 중이로부터의 유출에서 속도-제한 단계를 반영한다. 여기서, 속도-제한 단계는 고막을 가로지르는 항생제의 침투 속도이다. 이는 수포내 투여 연구에서 결정된 바와 같이 중이 유체로부터의 제거와 관련된 평균 속도 상수가 여기서 결정된 평균 값 0.0043보다 실질적으로 더 큰 0.008 내지 0.010분<sup>-1</sup>의 범위에 있었기 때문에 명백하다.

표 4

1% 목시겔에 의한 외이 투여 후 $C_{\text{mef}}$ 데이터의 NCA로부터의 목시플록사신 파라미터 (N=23)						
	$\lambda_z$ 1/분	반감기 (분)	Tmax (분)	$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	AUCinf 분* $\mu\text{g}/\text{mL}$	%F
평균	0.00403	381	870	57.8	65712	23.7
표준편차	0.00424	323	239	36.9	34760	12.6
%CV	105.4	84.9	27.5	63.7	52.9	53.2
최소	0.001	41	400	12.1	12889	3.8
최대	0.017	1101	1220	153.1	143175	46.2

[0139] 비결합  $C_{\text{mef}}$ 의 평균 최대 값 57.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 인간에서 400 mg의 경구 투여 후 혈장에서 관찰된 경우 (2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 보다 20배 내지 30배 더 크다 (문헌 [Owens & Ambrose, 2002, *Pharmacodynamics of Quinolones*, In "Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice, pg 162, Eds, Nightingale, Marakawa and Ambrose, Marcel Dekker, Basel, CH] 참조). 중이 유체 내 1% 목시겔로부터의 목시플록사신의 생체이용률 (%F)은 상기 방정식 1에 기재된 바와 같이 계산하였다. 하기 표 5A는  $C_{\text{mef}}$ 가 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 도달하는데 필요한 시간, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  미만으로 하락하는데 필요한 시간, 및 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  초과 기간을 요약한다. 요약된 값은 1% 목시겔에 의한 투여 후 각 데이터 세트의 검사에 의해 얻었다 (N=23).  $C_{\text{mef}}$  수준이 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하여 유지된 평균 시간은 1700분 (대략 29시간)을 넘었다.

[0140] <표 5A>

[0141] 1% 목시겔의 외이 투여 후 10  $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하고, 10  $\mu\text{g/ml}$  이하로 떨어지고, 10  $\mu\text{g/ml}$  초과하는 시간

	10 $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하는 시간 ( 분 )	10 $\mu\text{g/ml}$ 이하로 떨어지는 시간 ( 분 )	10 $\mu\text{g/ml}$ 초과하는 시간 ( 분 )
평균	223	1971	1749
SD	202	675	719
%CV	90.8	34.2	41.1
중앙값	180	1780	1660
분	20	1200	460
최대값	800	4060	3720

[0142]

[0143] 표 5B는 C<sub>mf</sub>에 대해 20  $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하고, 20  $\mu\text{g/ml}$  이하로 떨어지고, 20  $\mu\text{g/ml}$  초과로 유지하는데 필요한 시간을 요약하고 있다. 표의 값은 1% 목시겔의 투여 후 각각의 데이터 세트의 검사에 의해서 획득하였다 (N=23). C<sub>mf</sub> 레벨이 20  $\mu\text{g/ml}$  초과로 유지되는 평균 시간은 1100분 (대략 19시간) 초과였다. 데이터 세트 중 두 개에서의 C<sub>mf</sub>는 20  $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하지 않았고, "20  $\mu\text{g/ml}$  초과 시간"에 대해 2 개의 데이터 세트에서 0분의 값이 산출되었다.

[0144] <표 5B>

[0145] 1% 목시겔의 외이 투여 후 20  $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하고, 20  $\mu\text{g/ml}$  이하로 떨어지고, 20  $\mu\text{g/ml}$  초과하는 시간

	20 $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하는 시간 ( 분 )	20 $\mu\text{g/ml}$ 이하로 떨어지는 시간 ( 분 )	20 $\mu\text{g/ml}$ 초과하는 시간 ( 분 )
평균	326	1569	1135
SD	218	407	573
%CV	67.0	26.0	50.5
중앙값	300	1520	1160
분	60	1020	0
최대값	860	2620	2340

[0146]

[0147] 3% 목시겔의 외이 투여

[0148] 3% 목시겔의 외이 투여 후 중이 유체 목시플록사신 농도 (C<sub>mf</sub>)의 플롯 (Plot)을 그룹별로 도 6에 나타냈다. 측정가능한 레벨을 투여 후 4일 (6180분)까지 획득하였다. 1% 목시겔 투여 데이터의 경우에서와 같이, IPM으로의 예비처리 시간의 길이는 이들 연구에서 결정된 C<sub>max</sub> 또는 AUC<sub>inf</sub> 상에 아무런 영향을 주지 않았다.

[0149] 이들 데이터는 도 7에서 선형 및 로그 농도 스케일 상에서 평균  $\pm$  SD로서 나타낸다. 목시플록사신의 최대 평균 농도는 대략 120  $\mu\text{g/ml}$ 였고, 투여-후 약 1300분 (22시간)에서 발생하였다. 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 평균 농도는 약 60분에서 도달되었고, 투여 후 연구 기간 (5000분 초과) 내내 그 수준을 초과하여 유지하였다. 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 평균 농도는 약 230분에서 도달되었고, 약 5340분 (89시간)까지 그 수준을 초과하여 유지하였다. 57시간을 초과하여 측정가능한 레벨을 이용한 데이터 세트가 2개 뿐이므로, 이 관찰은 데이터의 전체 추세를 반영하지 않는다.

[0150] 3% 목시겔의 외이 투여 후, 비결합 중이 유체 농도-시간 데이터의 구분없는 분석의 결과가 표 6에 요약되어 있다.

[0151] <표 6>

[0152] 3% 목시겔의 외이 투여 후 C<sub>mf</sub> 데이터의 NCA로부터의 목시플록사신 파라미터 (N=13)

	$\lambda_z$ 1/ 분	반감기 ( 분 )	T <sub>max</sub> ( 분 )	C <sub>max</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	AUC <sub>inf</sub> 분 * $\mu\text{g/mL}$	%F
평균	0.00288	493	1049	130.4	206398	34.8
SD	0.00203	470	534	79.5	130684	21.7
%CV	70.5	95.4	50.9	61.0	63.3	62.4
분	0.00040	116	200	27.2	12311	2.9
최대값	0.00600	1623	1900	273.6	493290	77.5

[0153]



[0154] 1% 목시겔 투여에서와 같이, Cmax 및 종결 속도 상수 ( $\lambda_z$ )에서 유의한 가변성이 관찰되었다. 이 속도 상수의 평균값은 수포내 투여 후 결정된 제거 속도 상수보다 상당히 적은 0.0029분<sup>-1</sup>이었다. 이는 목시플록사신이 중이 유체로 직접 투여되는 경우 관찰된 제거 반감기보다 훨씬 더 큰 약 350분의 기하학적 평균 반감기에 상응한다. 이것은 1% 목시겔 연구의 경우에서와 같이, 고막을 가로지르는 목시플록사신의 관통이 중이 유체로부터의 소실의 속도를 제한한다는 증거가 된다. 중이 유체로의 외이 투여의 평균 생체이용율은 대략 35%이지만, 상당히 가변적이다. 이는 아마도 겔 및 막 사이의 불충분한 접촉으로부터 일부 기인하는, 고막과 겔의 접촉에서의 가변성으로 인한 것으로 보인다. %F에서의 이러한 가변성에도 불구하고, 매우 높은 목시플록사신의 최대 중이 유체 농도 (평균 130  $\mu\text{g/ml}$ )가 본 연구에서 관찰되었다. 사실, 10배의 최대 비결합 혈장 농도보다 큰, 27.7  $\mu\text{g/ml}$ 의 Cmax를 사용하고, 2.9%의 생체이용율을 나타내는 데이터 세트는 보통 400 mg의 목시플록사신의 경구 투여 후 관찰되었다 (오웬스(Owens) 등, supra).

[0155] 표 7A는 C<sub>mf</sub>에 대해 10  $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하고, 10  $\mu\text{g/ml}$  이하로 떨어지고, 10  $\mu\text{g/ml}$  초과로 유지하는데 필요한 시간을 요약하고 있다. 표의 값은 3% 목시겔의 투여 후 각각의 데이터 세트의 검사에 의해서 획득하였다 (N=13). C<sub>mf</sub> 레벨이 10  $\mu\text{g/ml}$  초과로 유지되는 평균 시간은 2800분 (대략 48시간) 초과였다.

[0156] <표 7A>

[0157] 3% 목시겔의 외이 투여 후, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하고, 10  $\mu\text{g/ml}$  이하로 떨어지고, 10  $\mu\text{g/ml}$  초과하는 시간

	10 $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하는 시간 ( 분 )	10 $\mu\text{g/ml}$ 이하로 떨어지는 시간 ( 분 )	10 $\mu\text{g/ml}$ 초과하는 시간 ( 분 )
평균	172	3020	2848
SD	107	1762	1750
%CV	62	58	61
중앙값	180	3140	2740
분	20	580	500
최대값	400	6180	5960

[0158]

[0159] 표 7B는 C<sub>mf</sub>에 대해 20  $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하고, 20  $\mu\text{g/ml}$  이하로 떨어지고, 20  $\mu\text{g/ml}$  초과로 유지하는데 필요한 시간을 요약하고 있다. 표의 값은 3% 목시겔의 투여 후 각각의 데이터 세트의 검사에 의해서 획득하였다 (N=13). C<sub>mf</sub> 레벨이 20  $\mu\text{g/ml}$  초과로 유지되는 평균 시간은 2500분 (대략 42시간) 초과였다.

[0160] <표 7B>

[0161] 3% 목시겔의 외이 투여 후, 20  $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하고, 20  $\mu\text{g/ml}$  이하로 떨어지고, 20  $\mu\text{g/ml}$  초과하는 시간

	20 $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하는 시간 분	20 $\mu\text{g/ml}$ 이하로 떨어지는 시간 분	20 $\mu\text{g/ml}$ 초과하는 시간 분
평균	237	2769	2532
SD	127	1600	1583
%CV	53	58	63
중앙값	240	2920	2420
분	20	580	220
최대값	500	5520	5300

[0162]

[0163] 실시예 16-1% 및 3% 목시겔의 외이 투여 후, 목시플록사신에 대한 비교 매트릭스(metrics)

[0164] 시간에 대한 중이 유체 목시플록사신 농도의 평균 및 SD를 플롯팅하는, 1% 및 3% 목시겔의 외이 투여 후, 중이 유체 농도 (C<sub>mf</sub>)-시간 프로파일의 비교를 도 8에 제공하였다. 외이로 도입된 각각의 제형의 부피가 동일하지 않기 때문에 (1% 목시겔 및 3% 목시겔에 대해, 각각 평균 대략 500 및 350  $\mu\text{l}$ ), 외이에 배치된 투여량은 평균적으로 1% 목시겔 그룹에서보다 3% 목시겔 집단에서 약 2배 더 크다 (4800 $\mu\text{g}$ 에 비교해서 9900 $\mu\text{g}$ 임). 또한, 관통의 시간 과정은 그의 더 느린 목시플록사신 상대 방출 속도의 결과에서와 같이 3% 목시겔 집단에서 유의하게 연장되었다 (도 1 참조). 투여 및 방출 속도에서의 이러한 차이는 도 8에서 입증되고, 이는 평균 C<sub>mf</sub>

값의 최대치에 도달하는데 있어서 3% 목시겔에서의 더 높은 평균 Cmax 값 및 명백하게 낮은 시간을 입증한다.

[0165] 이들 2개의 제형에 대해서 관찰된 중이 유체 목시플록사신 레벨에 대한 Cmax 및 Tmax 값의 비교는 도 9의 비교 박스 및 위스커(whisker) 플롯에 나타났다. 이들 플롯은 이들 메트릭스에 대한 중앙값 및 사분위값 범위를 나타낸다. 이들 플롯은 또한 2개의 제형에 대한 Tmax 중앙값 (1% 목시겔 및 3% 목시겔, 각각에 대해 900 대 1180분)이 비모수적 만-휘트니(Mann-Whitney) 시험에 의해 달라지지 않을지라도, Cmax 중앙값이 0.0084의 p-값으로 유의하게 다르다는 것 (1% 목시겔 및 3% 목시겔, 각각에 대해 41.2 대 109  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 나타낸다.

[0166] 실시예 17-중이 유체로의 목시플록사신의 관통 속도 및 정도

[0167] 목시겔의 외이 투여 후, C<sub>mef</sub>의 시간 과정 및 수포내 투여 연구 결과를 사용하여, 목시플록사신의 트랜스-고막 관통의 속도 및 정도를 계산하기 위해 디콘볼루션(deconvolution)을 사용하였다.

[0168] 1% 목시겔을 사용한 중이 유체로의 목시플록사신의 투과

[0169] 1% 목시겔로의 외이 투여 후 중이 유체에 도달하는 목시플록사신의 누적 양의 시간 경과를 도 10에 나타낸다. 중이 유체에 전달된 누적 양은 약 250 내지 2300  $\mu\text{g}$ 의 범위이었으며, 이 범위는 1% 목시겔로의 투여에 대해 관찰된 AUC<sub>inf</sub> 값의 범위를 반영한다.

[0170] 또한 디콘볼루션(deconvolution)에 의해 계산되는 투과의 상응하는 속도 (투입 속도)는, 군별로, 도 11a 및 11b에 도표로 제시된다. 데이터 세트의 그 군에서의 투입 속도의 전반적인 추세를 반영시키기 위해 각각의 집단에 스플라인 함수를 적용시켰다. 이는 절차에서 10 데이터 점의 폭을 사용하여 국부적 가중 산포도 평활화(smoothing)를 사용하여 수행되었다. 도 11a 및 11b에서의 스플라인의 조사는 중이 유체로의 목시플록사신의 최대 투과 속도는 약 0.2 내지 2  $\mu\text{g}/\text{분}$ 이며, 이는 시험관내 조건 하에 1% 목시겔의 비슷한 투여량에 대해 추정된 상응하는 방출 속도 (9.4  $\mu\text{g}/\text{분}$ )보다 유의하게 더 낮다는 것을 나타낸다. 이들 최대 투과 속도는 대략 약 12 내지 120  $\mu\text{g}/\text{시간}$ 의 생체내 목시플록사신 전달 속도에 상응한다.

[0171] 3% 목시겔을 사용한 중이 유체로의 목시플록사신의 투과

[0172] 3% 목시겔로의 외이 투여 후 중이 유체에 도달하는 목시플록사신의 누적 양의 시간 경과를 도 12에 나타낸다. 중이 유체에 전달된 누적 양은 약 200 내지 6000  $\mu\text{g}$ 의 범위이었으며, 이는 대략 3% 목시겔로의 투여에 대해 관찰된 AUC<sub>inf</sub> 값의 범위를 반영한다.

[0173] 디콘볼루션에 의해 계산되는 투과의 상응하는 속도 (투입 속도)는, 군별로, 도 13에 도표로 제시된다. 이들 데이터에서의 투입 속도의 전반적인 추세를 반영하는 각각 집단에 적용시킨 스플라인 함수를 또한 나타낸다. 도 13에서의 스플라인의 조사는 중이 유체로의 목시플록사신의 최대 투과 속도는 약 0.5 내지 5  $\mu\text{g}/\text{분}$ 이며, 이는 시험관내 조건 하에 3% 목시겔의 비슷한 투여량에 대해 추정된 상응하는 방출 속도 (15  $\mu\text{g}/\text{분}$ )보다 유의하게 더 낮다는 것을 나타낸다. 이들 최대 투과 속도는 대략 약 30 내지 300  $\mu\text{g}/\text{시간}$ 의 생체내 목시플록사신 전달 속도에 상응한다.

[0174] 1% 목시겔 및 3% 목시겔에 대한 중이 유체로의 목시플록사신의 비교적 투과 속도.

[0175] 각각의 1% 목시겔 및 3% 목시겔 데이터 세트 (N=36)에 대해 디콘볼루션에 의해 추정된 투과의 속도 (투입 속도)를 데이터에 적용시키고, 투여량 및 상기 기재된 바와 같이 스플라인 함수에 따라 나누었다. 데이터 및 상응하는 투입 속도 스플라인은 도 14에 도표로 제시된다. 이들 그래프는 1% 목시겔에 대한 전형적인 최대 투과 (투입) 속도는 대략 0.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고, 약 700 내지 800 분 (대략 12 내지 13시간)에서 발생한다는 것을 나타낸다. 3% 목시겔에 대한 상응하는 최대 투과 속도는 약 2  $\mu\text{g}/\text{분}$ 이고, 1600 내지 2000분 (대략 27 내지 33분)에서 발생한다. 3% 목시겔로 관찰되는 더 높은 최대 투입 속도는 이 제형과 연관된 더 높은 투여량과 일관된다. 1% 목시겔을 사용한 전형적인 외이 투여량은 약 4800  $\mu\text{g}$ 이고, 전형적으로 더 작은 부피로 투여된 3% 목시겔을 사용한 상응하는 투여량은 약 9900  $\mu\text{g}$ 이라는 것을 주목해야 한다. 따라서, 3% 목시겔과 연관된 투여량은 1% 목시겔에 대한 투여량보다 약 2배이었다. 3% 목시겔로 관찰된 후의 피크 투과 속도는 목시플록사신은 3% 겔 제형으로 부분적으로 현탁액에 있기 때문에 이는 시험관내, 및 아마 생체내에서 이 제형으로부터 더 천천히 방출된다는 사실을 반영한다.

[0176] 실시예 18 - 중이 유체에서의 목표 목시플록사신 농도에 도달하는 시간, 및 상기 기간

[0177] 이 연구의 특정 목표는 중이 유체에서의 목시플록사신 농도를 최소 24 내지 48시간 동안 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  초과로 유지

하기 위해 트랜스-고막 전달 시스템을 개발하는 것이었다. 도 15는 1% 목시겔로의 외이 투여에 관여하는 연구에서 나타나는 10 및 20  $\mu\text{g/ml}$  둘다에 도달하기 위해 요구되는 시간에 대한 중앙값 및 사분위값 범위를 나타낸다. 10 및 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 중이 유체 수준을 달성하기 위해 요구되는 중앙값 시간은 각각 180 및 300분이었다. 도면은 또한 이들 수준이 유지된 동안의 중앙값 시간을 나타낸다. 이들은 1660 및 1160분이거나, 또는 각각 대략 28 및 19시간이었다. 따라서, 이 목표는 1% 목시겔 제형으로 달성된 것으로 나타났다.

[0178] 추가로, 도 16은 3% 목시겔로의 연구에서 나타나는 10 및 20  $\mu\text{g/ml}$  둘다에 도달하기 위해 요구되는 시간에 대한 중앙값 및 사분위값 범위를 나타낸다. 10 및 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 중이 유체 수준을 달성하기 위해 요구되는 중앙값 시간은 각각 180 및 240분이었다. 도면은 또한 이들 수준이 유지된 동안의 중앙값 시간을 나타낸다. 이들은 2740 및 2420분이거나, 또는 각각 대략 28 및 19시간이었다. 10  $\mu\text{g/ml}$  초과와 기간에 관련된 상기 기재된 목표는 또한 3% 목시겔 제형으로 달성되었다. 추가로, 비록 이는 목표로서 명백히 언급되지는 않았지만, 3% 목시겔 제형은 거의 2일의 20  $\mu\text{g/ml}$  초과와 기간을 제공하였다. 이 제형이 목시플록사신을 현탁액 및 용액으로 포함하는 것으로 나타남은 시험관내 방출의 그의 더 느린 상대 속도에 따라 아마 생체내에서의 지속된 방출 속도를 수득하였다.

[0179] 도 15 및 16에 나타난 시간 및 기간은 각각 1% 목시겔 및 3% 목시겔에 대해 표 8A 및 8B 및 표 9A 및 9B에 요약된다. 개별 데이터 세트에서 관찰된 평균 시간, 및 최소 및 최대 시간을 또한 표로 만들었다.

[0180] <표 8A>

1% 목시겔로의 외이 투여 후 10  $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하고, 미만으로 내려가는 시간,  
및 10  $\mu\text{g/ml}$ 를 초과하는 시간

	10 $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하는 시간 분	10 $\mu\text{g/ml}$ 미만으로 내려가는 시간 분	10 $\mu\text{g/ml}$ 를 초과하는 시간 분
평균	223	1971	1749
SD	202	675	719
%CV	90.8	34.2	41.1
중앙값	180	1780	1660
분	20	1200	460
최대	800	4060	3720

[0181]

[0182] <표 8B>

1% 목시겔로의 외이 투여 후 20  $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하고, 미만으로 내려가는 시간,  
및 20  $\mu\text{g/ml}$ 를 초과하는 시간

	20 $\mu\text{g/ml}$ 에 도달하는 시간 분	20 $\mu\text{g/ml}$ 미만으로 내려가는 시간 분	20 $\mu\text{g/ml}$ 를 초과하는 시간 분
평균	326	1569	1135
SD	218	407	573
%CV	67.0	26.0	50.5
중앙값	300	1520	1160
분	60	1020	0
최대	860	2620	2340

[0183]

[0184] <표 9A>

3% 목시겔로의 외이 투여 후 10 µg/ml에 도달하고, 미만으로 내려가는 시간,  
및 10 µg/ml를 초과하는 시간

	10 µg/ml에 도달하는 시간 분	10 µg/ml 미만으로 내려가는 시간 분	10 µg/ml를 초과하는 시간 분
평균	172	3020	2848
SD	107	1762	1750
%CV	62	58	61
중앙값	180	3140	2740
분	20	580	500
최대	400	6180	5960

[0185]

[0186] <표 9B>

3% 목시겔로의 외이 투여 후 20 µg/ml에 도달하고, 미만으로 내려가는 시간,  
및 20 µg/ml를 초과하는 시간

	20 µg/ml에 도달하는 시간 분	20 µg/ml 미만으로 내려가는 시간 분	20 µg/ml를 초과하는 시간 분
평균	237	2769	2532
SD	127	1600	1583
%CV	53	58	63
중앙값	240	2920	2420
분	20	580	220
최대	500	5520	5300

[0187]

[0188] 실시예 19 - 1% 및 3% 목시겔의 외이 투여에 따른, 목시플록사신에 대한 AUC 비율

[0189] 슈엔타크(Schentag) 등 (문헌 [2003, Ann.Pharmacother., 37:1287-98])에 의해, 박테리아 사멸율에 연관된 3개의 중요한 중단점(break point)이 플루오로퀴놀론에 대해 제시되었다. 상기 클래스의 항생제의 명백한 농도-의존성 사멸로 이루어져 볼 때, 이러한 중단점들은 시험관내 및 동물 모델에서 확립되었다. AUC는, 특정 미생물에 대한 해당 플루오로퀴놀론의 24시간에 걸친 곡선 하의 면적 (혈장 또는 혈청 농도)을 최소 억제 농도로 나눈 값으로서 정의된다. 상기 슈엔타크 등은 플루오로퀴놀론에 대한 하기의 중단점들을 보고했다:

[0190] a. AUC 값 < 30 내지 50이거나, 또는 피크:MIC 비율이 5:1인 경우, 플루오로퀴놀론은 정균성(bacteriostatic)임

[0191] b. 100 < AUC 값 < 250인 경우, 미생물은 보통 7일의 처치에 의해 느린 속도로 사멸됨

[0192] c. AUC > 250이거나, 또는 피크:MIC이 25:1인 경우, 플루오로퀴놀론은 신속한 농도-의존성 사멸을 나타내고, 24시간 이내에 박테리아 박멸이 발생함.

[0193] 1% 목시겔 및 3% 목시겔 연구에서 제시된 모든 데이터에 대한 AUC 값은, 외이 투여 후의 각각의 연속적인 24시간의 기간 동안 계산되었다. 이러한 계산으로, 목시플록사신에 대한 MIC은 0.25 µg/ml인 것으로 추정되었다. 1% 목시겔 투여 후 중이 유체에서의 AUC 중앙값 (N=23)은, 도 17에서 보여지는 바와 같이 각각 투여 후 1일, 2일 및 3일에 2398, 7756 및 62였다. 1% 목시겔에 대한 상기 값은, 투여 후 1일 및 2일 동안은 상기에서 확인된 카테고리 c 내에 들어간다 (즉, 24시간 이내에 박테리아가 박멸됨). 투여 후 3일에 측정된, 1% 목시겔 연구에 대한 AUC 중앙값은 카테고리 b와 a 사이에 놓인다.

[0194] 3% 목시겔 투여 후 중이 유체에서의 AUC 중앙값 (N=13)은, 도 17에서 또한 보여지는 바와 같이 각각 투여 후 1일, 2일 및 3일에 5930, 4901 및 570이었다. 3% 목시겔에 대한 상기 값은, 외이 투여 후 3일 동안 모두 상기에서 확인된 카테고리 c 내에 들어간다 (즉, 24시간 이내에 박테리아가 박멸됨). 이러한 결과는, 3% 목시겔의 도포 후 친칠라(chinchilla)의 중이 유체에서의 목시플록사신 농도의 시간대별 추이(time-course)가 1% 목시겔의 도포시 관찰되는 것보다 실질적인 장점을 제공할 것이라는 것을 제시한다. 하지만, 슈엔타크 등의 권장사항이 옳은 경우, 투여 후 1일 및 2일에서의 연합된 AUC가 24시간 이내로 박테리아를 박멸시키기에 충분한 것으로 보이기 때문에, 1% 목시겔의 외이 투여에 의해 생성된 목시플록사신의 수준이 적절할 수도 있다.

- [0195] 상기 AUC 계산에서의 목시플록사신에 대한 MIC로 0.25  $\mu\text{g/ml}$ 가 적당하며, 이는 실제보다 약간 적게 잡은 값일 수도 있다. 다음 장에서, 슈엔타크 등 (문헌 [2003, Ann. Pharmacotherap., 37:1478-88])은, 중단점을 플루오로퀴놀론의 살균 효과에 대한 평가의 목적으로 사용하는 것에 초점을 맞추고, 종이염에서 접하게 되는 공통의 병원체인 균주 에스. 뉴모니에(*S. pneumoniae*)에 대항하는 목시플록사신에 대한 MIC90이 0.125  $\mu\text{g/ml}$ 임을 보고한다. 흥미롭게도, 이러한 간행물에서 인간 임상 시험의 결과가 조사되고, 이전에 보고되었던 중단점들이 확인되고 있다. 실제로, 저자들은, AUC가 250 초과이거나 또는 Cmax 대 MIC의 비율이 15:1 초과인 경우, 플루오로퀴놀론에 의한 농도-의존성 박테리아 사멸이 인간에서 1 내지 2시간 이내에 박테리아 박멸을 야기함을 언급하고 있다.
- [0196] 상기 기재된 중단점들은 단백질 결합을 고려하지 않은 것으로 보인다. 본 연구에서의 측정된 중이 유체 농도는 미결합된 수준이며, 생성된 AUC의 계산에 총 수준이 사용되는 경우, AUC는 다소 더 높을 것이고, 이에 따라 이들은 보다 더 확실히 클래스 c (플루오로퀴놀론이 신속한 농도-의존성 사멸을 나타내고, 24시간 이내에 박테리아 박멸이 발생함)에 속할 것이다.
- [0197] 실시예 20 - 1% 목시겔 및 3% 목시겔의 외이 투여에 따른, 목시플록사신에 대한 Cmax/MIC 비율
- [0198] 상기 실시예 19에서 논의된 중단점들은 또한, Cmax/MIC ("피크:MIC") 비율에 관한 소정의 기준들을 포함하였다. 상기로부터의 클래스 a 및 c에서의 이들 비율에 초점을 맞추면서, 슈엔타크 등 (문헌 [2003, Ann. Pharmacotherap., 37:1287-98])은,
- [0199] a. 피크:MIC 비율이 5:1의 범위인 경우, 플루오로퀴놀론은 정균성임
- [0200] c. 피크:MIC이 25:1인 경우, 플루오로퀴놀론은 신속한 농도-의존성 사멸을 나타내고, 24시간 이내에 박테리아 박멸이 발생함
- [0201] 을 언급하고 있다.
- [0202] 중단점들은 제2 간행물 (문헌 [Schentag et al., 2003, Ann. Pharmacotherap., 37:1478-88])에서 약간 수정되었으며, 이는 클래스 a, b 및 c에 대한 Cmax/MIC 비율이 각각 3:1, 6:1 및 15:1임을 보고하고 있다. 1% 목시겔 및 3% 목시겔 연구에서 제시된 모든 데이터에 대한 Cmax/MIC는, 외이 투여 후의 각각의 연속적인 24시간의 기간 동안 계산되었다. 앞과 같이, 이러한 계산으로, 목시플록사신에 대한 MIC는 0.25  $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 추정되었다. 1% 목시겔 투여 후 중이 유체에서의 Cmax/MIC 중앙값 (N=23)은 도 18에서 보여지는 바와 같이 165:1이었다. 이 값은 클래스 c에 대해 확인된 것 (다르게는 25:1 또는 15:1로서 보고됨)의 몇 배이며, 이에 따라 24시간 이내의 박테리아 박멸이 예상된다.
- [0203] 3% 목시겔 투여 후 중이 유체에서의 Cmax/MIC 중앙값 (N=13)은 도 18에서 보여지는 바와 같이 436:1이었다. 이 값은 클래스 c에 대해 확인된 것보다 몇 배 더 높으며, 이 또한 24시간 이내의 박테리아 박멸을 제시한다.
- [0204] 상기 언급된 바와 같이, 상기 기재된 중단점들은 단백질 결합을 고려하지 않고 있다. 본 연구에서의 측정된 중이 유체 농도는 미결합된 수준이고, 보고된 중단점들에서 고려되는 Cmax/MIC 비율에 총 수준이 사용되는 경우, 이러한 비율은 다소 더 높을 것이고, 이에 따라 이들은 보다 확실히 클래스 c (플루오로퀴놀론이 신속한 농도-의존성 사멸을 나타내며, 24시간 이내에 박테리아 박멸이 발생함)에 속할 것이다.
- [0205] 실시예 21 - 10% 경피흡수 촉진제 대 50% 경피흡수 촉진제로의 사전 치료를 비교하기 위한 방법
- [0206] 동물은 투여 1일 전에 양측 유스타키오관 폐색 (ETO) 수술을 받았다. 고실측정으로부터 음압 관독이 나타난 귀가 성공적인 유스타키오관의 폐색을 나타내었다. 대수포(bulla)에 인공 중이 유체 (AMEF)를 점적하고, 프로브 이식한 이후, 고막의 보전을 검이경을 사용하여 시각적으로 확인하고, 그 후 투여하였다. 악화된 고막이 나타난 귀는 투여하지 않았다.
- [0207] 투여 당일에, 동물을 케타민 (40 내지 50 mg/kg, IM) 및 펜토바르비탈 (20 내지 30 mg/kg, IP)로 마취시키고, 가열 패트에 두어 정상 체온을 유지시켰다. 고실측정 후에, 친칠라(chinchilla)를 구강 바/클램프에 두어 AMEF의 점적 및 마이크로투석(microdialysis) 프로브 이식이 가능하도록 하였다. 머리뼈의 배면(dorsal side) 상의 머리쪽 대수포(cephalad bulla)를 통해 친칠라 중이강에 접촉하였다. 뼈가 얇은 우측 및 좌측 대수포의 정점에서 15 GA 피하주사기로 소형 구멍을 수동으로 뚫었다. 상부까지 완전히 충전될 때까지 하나의 PE-50 배관을 통해 AMEF를 각 대수포에 점적하였다.
- [0208] AMEF 점적하고 곧이어, 좌측 및 우측 중이 대수포에서 10 mm 막을 갖는 마이크로투석 프로브 (MD-2310) (BASi;



인디애나주 웨스트 라파에트(West Lafayette, IN) 소재)를 이식하였다. 머리쪽 대수포 상의 동일한 구멍을 통해서 친칠라 중이강에 접촉하였다. 프로브를 접촉 구멍을 통하여 각 중이강에 조심스럽게 삽입하였다. 고막의 보전을 검이경을 사용하여 조사하였다. 치과용 시멘트 및 앵커 바늘에 의해 고정된 플라스틱 크라운을 사용하여 프로브를 친칠라 머리뼈에 고정시켰다.

[0209] 상기 기재된 것과 같이 3% 목시겔(목시겔) 용액을 외이에 투여하기 이전에, 미네랄 오일 중 10% 또는 50% v/v 이소프로필 미리스테이트 (IPM) 용액 중 하나의 형태인 경피흡수 촉진제로의 사전 치료를 수행하였다. 이는 검이경의 도움으로 외이를 통해 50  $\mu$ L의 사전 치료 용액을 고막 영역에 도포하는 것으로 구성되었다. 이는 1-mL 투베르쿨린 주사기에 부착된 하나의 폴리에틸렌 (PE-50) 배관을 사용하여 달성되었다. 사전 치료 용액을 0.5분 동안 고막에 체류하도록 하고, 이후 투여하였다.

[0210] 적은 부피 (0.3 mL)의 3% 목시플록사신 제형을 검이경의 도움으로 외이를 통해 고막 영역에 액체로서 점적하였다. 대략 29°C 내지 31°C의 술-겔 전이 온도를 갖는 액체 제형은, 그의 온도가 서서히 증가되는 동안 겔화되었다. 10분의 총 겔화 시간이 주어졌으며, 이후 반대쪽 귀에 투여하였다. 동물의 심장 박동수, 호흡수, 체온 및 마취 심도를 시술 내내 계속 모니터링하였다.

[0211] 9 mg (30 mg/mL를 함유하는 제형 0.3 mL)의 단일 용량 도포에 이어서, 하기 기재되는 것과 같이 투여 후 최대 7200분 동안 온라인 마이크로투석을 사용하여 중이 유체 중의 목시플록사신의 미결합된 농도를 모니터링하였다.

[0212] 온라인 마이크로투석 HPLC 시스템을 사용하여 투석물 중 목시플록사신 및 시프로플록사신을 정량하였다. 마이크로투석 관류 유속을 5-mL 마이크로주사기 (해밀톤 컴퍼니(Hamilton Company; 네바다주 레노(Reno, NV) 소재))가 장착된 하바드(Harvard) 마이크로주사 펌프 (모델 H11; 하바드 어파라투스 인크.(Harvard Apparatus Inc.; 메사추세츠주 사우스 나티크(South Natick, MA) 소재))로 제어하였다. 양쪽 귀로부터의 마이크로투석물을 순서 프로그래머 (발코 인스트루먼트즈 코. 인크.(Valco Instruments Co. Inc.; 텍사스주 휴스턴(Houston, TX) 소재))에 의해 제어되는 10-포트 밸브체의 2개 25- $\mu$ L 샘플 루프에 교대로 수집하였다. 프로브를 0.5  $\mu$ L/분의 유속에서 역투석 캘리브레이터(retrodialysis calibrator) (시프로플록사신, PBS 중 5  $\mu$ g/mL)와 함께 관류시켰다.

[0213] 시마주(Shimadzu) 10-A HPLC 시스템 (시마주 코퍼레이션 (Shimadzu Corporation; 일본 교토(Kyoto, Japan) 소재))를 이용하여 발코 온라인 샘플 수집 시스템과 접속하였다. 이는 LC-10ADvp 펌프, SIL-10A 시스템 제어기, CTO-10A 컬럼 가열기, FCV-10ALvp 프로포셔너(proportioner) 및 DGU-14A 탈기 장치로 구성되어 있다. 또한, 295 nm의 여기 파장 및 490 nm의 방출 파장을 갖는 시마주 분광형광 검출기 (RF-10A)를 사용하였다. YMC ODS-A 5  $\mu$ m, 120 Å (4.6 x 100 mm, 워터스 코퍼레이션(Waters Corporation; 메사추세츠주 밀포드(Milford, MA) 소재)) 컬럼을 화합물의 분리를 위해 사용하였으며, 0.5 mL/분의 유속의 76% 암모늄 포스페이트 (20 mM, pH = 2.8) 및 24% 아세트오니트릴로 구성된 이동상으로 용리시켰다. 40°C의 컬럼 온도는 목시플록사신에 대하여 대략 6분의 체류 시간 및 캘리브레이터인 시프로플록사신에 대하여 3분의 체류 시간을 유발하였다.

[0214] **실시예 22 - 10% 경피흡수 촉진제의 사전 치료 및 50% 경피흡수 촉진제로의 사전 치료 사이의 비교 결과**

[0215] 고막을 10% IPM으로 사전 치료한 경우의 3% 목시겔의 외이 투여 이후에, 중이 유체 중의 미결합된 목시플록사신 농도 ( $C_{mf}$ )는 통상적으로 정량 한계 미만이었다. 사전 치료가 10% IPM을 이용한 경우에 매우 적은 측정가능한 수준이 관찰되기 때문에, 목시플록사신의 전달과 관련된 파라미터는 계산할 수 없었다.

[0216] 반면에, 고막을 50% IPM으로 사전 치료한 경우의 3% 목시겔의 외이 투여 이후에, 중이 유체 중의 미결합된 목시플록사신 농도는 최대 7200분 또는 5일의 기간에 걸쳐 상당히 측정가능하였다. 연구된 9개 귀에서, 중이 유체에서의  $C_{max}$  (최대 미결합된 목시플록사신 농도)는  $33.3 \pm 23.3$   $\mu$ g/mL였다. 인간에서 혈청 단백질과 30% 내지 50% 결합되는 것으로 보고된 목시플록사신은 400 mg의 경구 투여 후에 3.1  $\mu$ g/mL의 혈장에서 관찰되는 전체 (결합된 + 유리) 최대 농도를 나타낸다. 상응하는 혈장 중 미결합된  $C_{max}$ 는 대략 1.9  $\mu$ g/mL이다. 따라서, 본 연구에서 외이에의 9 mg의 단일 투여 후의 친칠라 중이 유체에서 관찰되는 평균 최대 미결합된 목시플록사신 농도는 400 mg 용량을 복용한 인간에서의 혈장에서 관찰되는 평균 미결합된  $C_{max}$ 의 약 15 내지 20배이다.

[0217] 최대 농도가 관찰되는 시간인  $T_{max}$ 는  $1410 \pm 486$ 분이었다. 0으로부터  $t_{last}$ 까지의 AUC는 약  $74,400 \pm 52,100$   $\mu$ g-분/mL였으며, 0으로부터 무한대까지의 AUC ( $AUC_{inf}$ )는 대략  $93,400 \pm 79,200$   $\mu$ g-분/mL였다. 400 mg의 단일 경구 용량을 복용한 건강한 인간에서의 평균 AUC는 2170  $\mu$ g-분/mL인 것으로 보고되었다. 상응하는 미결합된 AUC는 이의 대략 60%이거나, 또는 약 1300  $\mu$ g-분/mL이다. 따라서, 친칠라 외이에의 단일 9 mg 투여 후의 미결합된 수준의 목시플록사신에의 중이 유체의 평균 노출은 400 mg의 목시플록사신의 단일 경구 용량을 복용한 건

강한 인간의 혈장에서 나타난 것의 대략 75배이다.

[0218] 목시플록사신의 중이 유체로의 고막-경유 전달의 정도를, 중이강으로 직접 목시플록사신을 투여 (대수포내 (intrabulla) 투여)한 후 마이크로투석을 사용하여 측정된 단지수 농도-시간 프로파일로부터 계산하였다. 중이 유체에서의 목시플록사신의 분포의 부피는 1.8 mL인 것으로 추정되었다. 제거 속도 상수는 0.0093 분<sup>-1</sup>인 것으로 추정되었다. 따라서, 중이 유체로부터 목시플록사신의 평균 클리어런스(CL)는 0.0167 mL/분인 것으로 계산되었다. 목시플록사신의 중이 유체로의 전달 (생체이용률, %F) 정도를 외이 용량, 시간 0에서 무한대까지의 곡선하 면적 (AUCinf), 및 대수포내 투여 연구로부터 결정된 중이 유체로부터의 평균 클리어런스 (CL)로부터의 각 데이터 집합에 대하여 아래와 같이 계산하였다.

[0219] <수학식 1>

$$\%F = \frac{CL \cdot AUC \text{ inf}}{\text{용량}}$$

[0220]

[0221] 중이강에 전달된 외이 용량의 분율 (평균±SD)은 17.4±14.7%인 것으로 결정되었다.

[0222] 9 mg 목시플록사신의 투여, 및 50% 이소프로필 미리스테이트로의 고막의 사전 치료 후의 목시플록사신의 친칠라 중이 유체 (MEF)로의 고막-경유 전달을 검사한 본 연구의 결과를 도 19a 및 19b에 나타내었다. 상응하는 파라미터 및 측정값을 하기 표 10에 나타내었다.

[0223] <표 10>

[0224] 경피흡수 촉진제로의 사전 치료 후의 목시플록사신의 전달

	평균	SD	%CV
Cmax (μg/mL)	33.3	23.3	69.9
Tmax (분)	1409	486	34.5
AUClast (분 *μg/mL)	74374	52067	70.0
AUCinf (분 *μg/mL)	93381	79183	84.8
10 μg/mL에 도달하는 시간 (분)	618	296	47.9
10 μg/mL를 초과하는 시간 (분)	2847	1750	61.5
%F	17.4	14.7	84.8

[0225]

[0226] 다른 실시양태

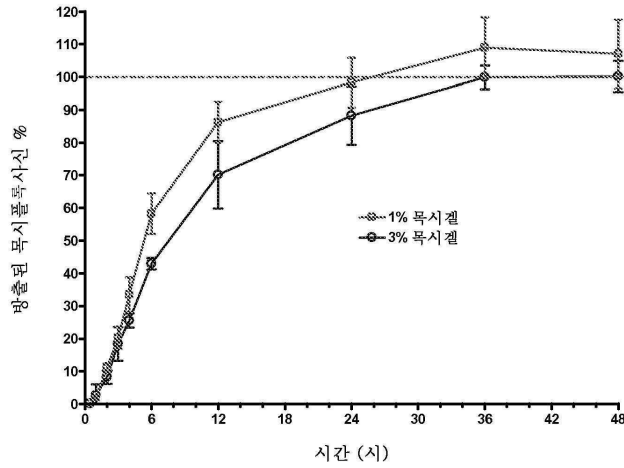
[0227] 본 발명이 발명의 상세한 설명과 관련하여 기재되었지만, 상기 기재는 예시를 위한 것이며 첨부된 특허청구범위의 범주에 의해 정의되는 본 발명의 범주를 제한하지 않는 것으로 이해하여야 한다. 다른 측면, 이점 및 변형은 하기 특허청구범위의 범주 내에 있다.



## 도면

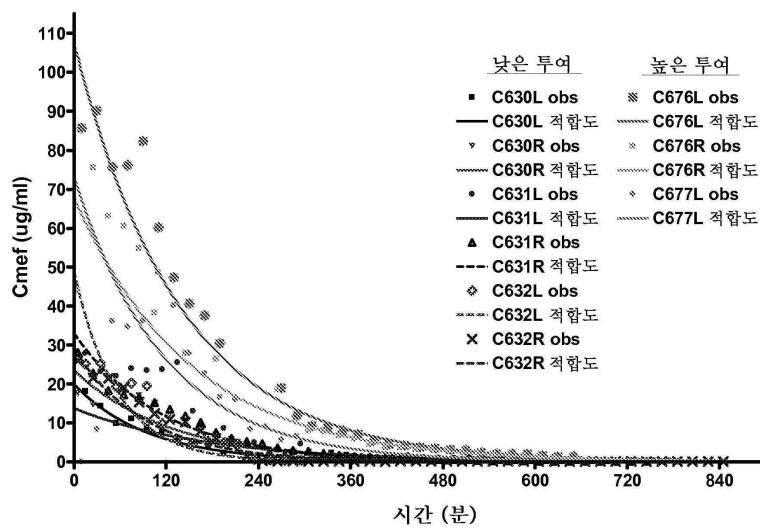
### 도면1

시험관내에서 방출된 목시플록사신 함량의 누적 %



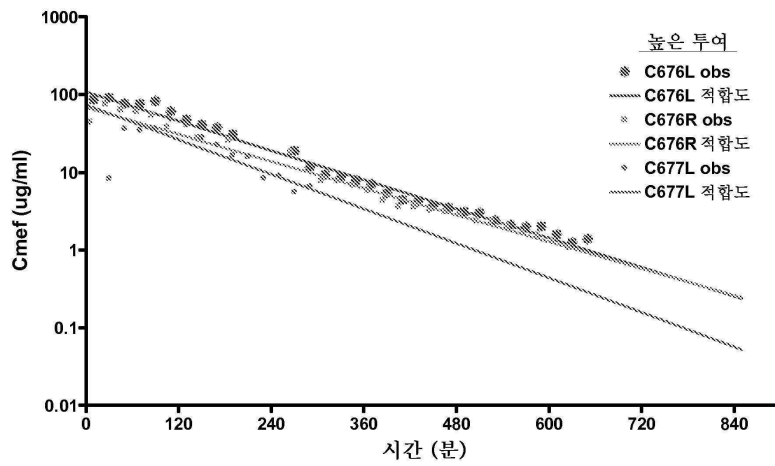
### 도면2

2개의 수포내 투여 수준으로부터의, 디콘볼루션에 대한 반응 함수 (N=9)



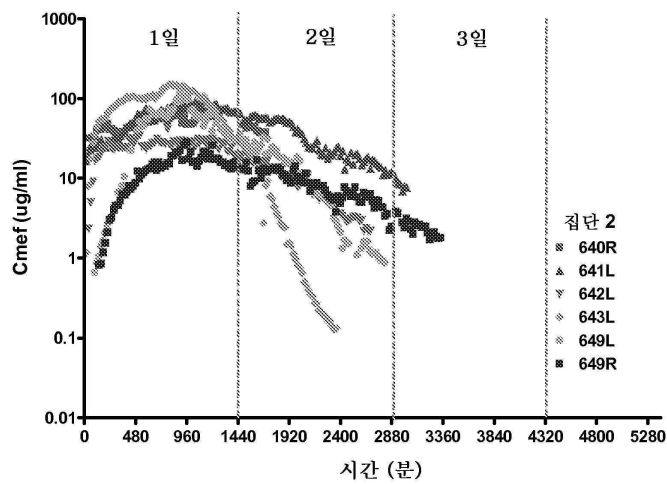
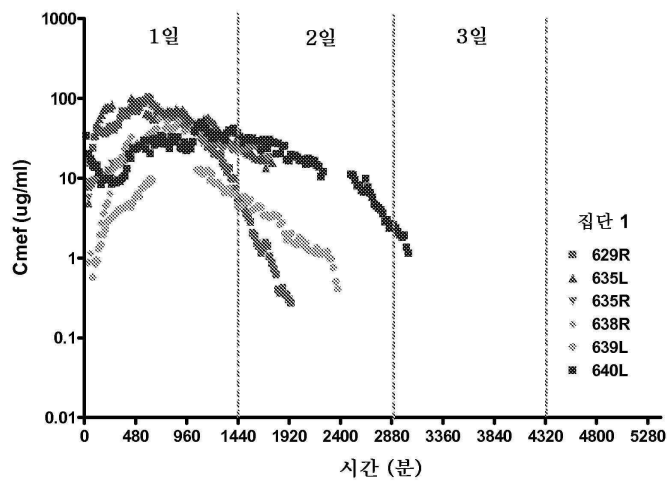
도면3

높은 수포내 투여 수준으로부터의, 디콘볼루션에 대한 반응 함수 (N=3)



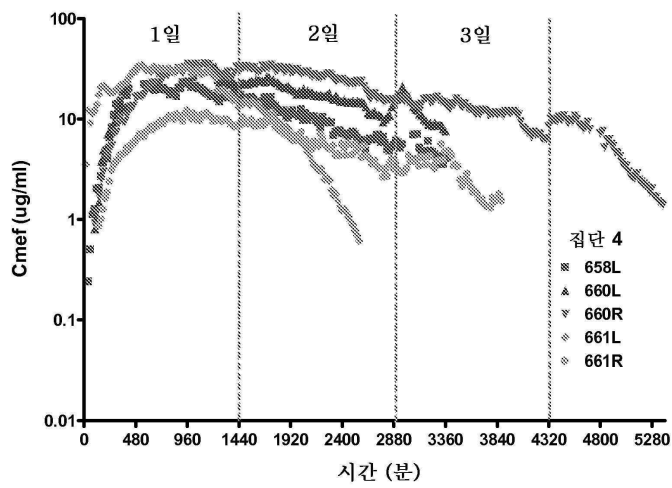
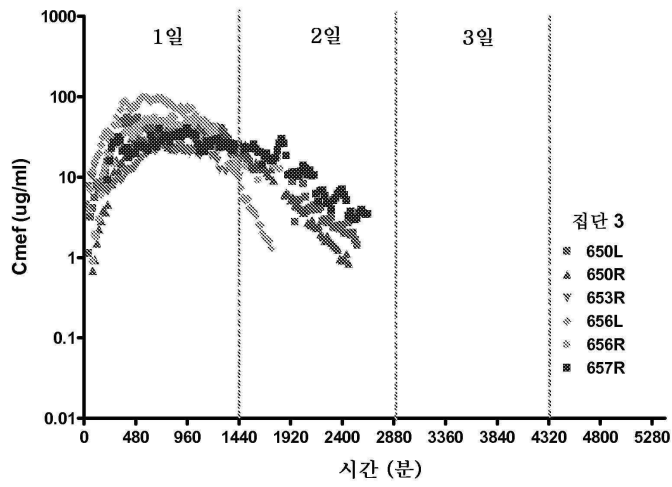
도면4a

1% 목시겔의 외이 투여 후의 MEF에서의 목시플록사신 농도



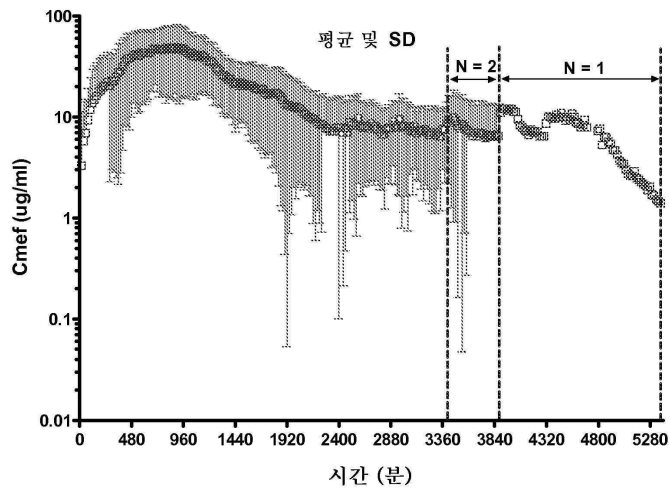
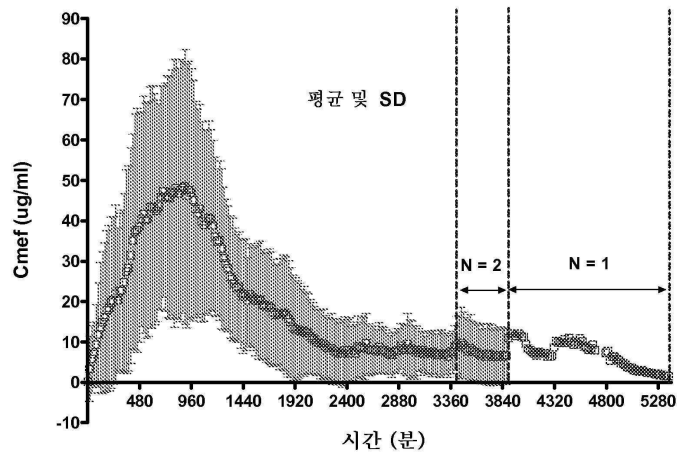
도면4b

1% 목시겔의 외이 투여 후의 MEF에서의 목시플록사신 농도



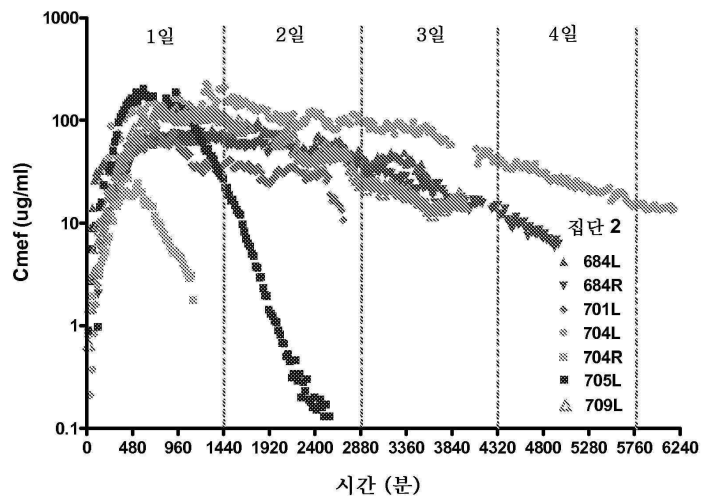
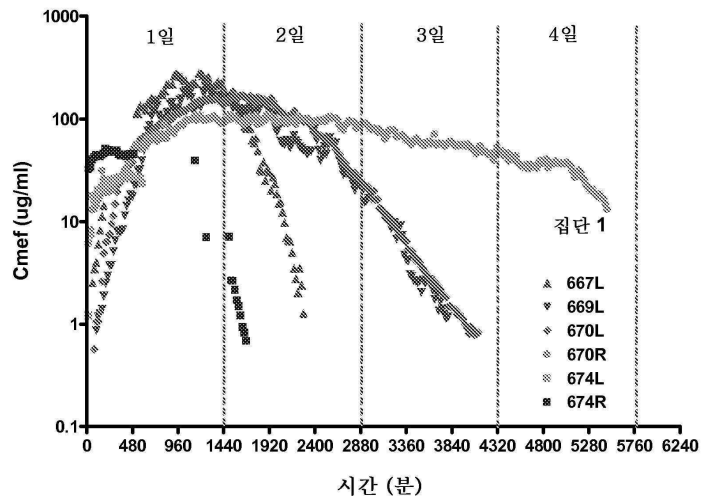
도면5

1% 목시겔의 외이 투여 후의 MEF에서의 목시플록사신 농도(평균, SD)  
(N=23)



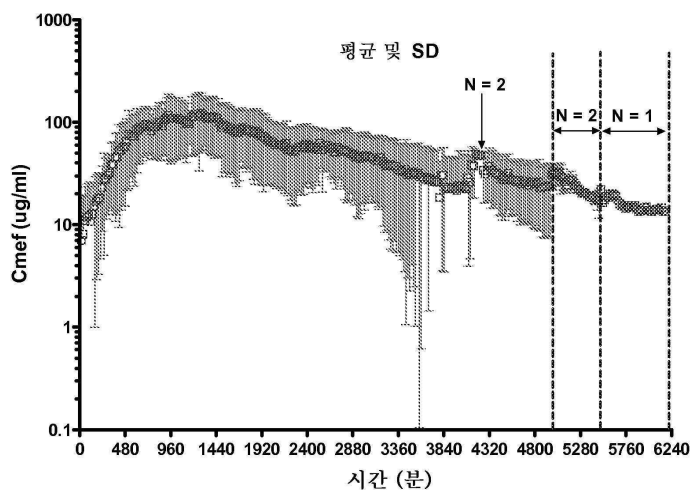
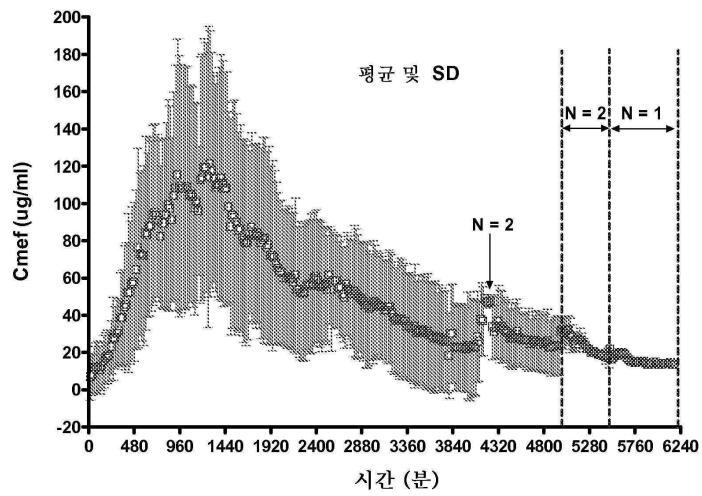
도면6

3% 목시겔의 외이 투여 후의 MEF에서의 목시플록사신 농도



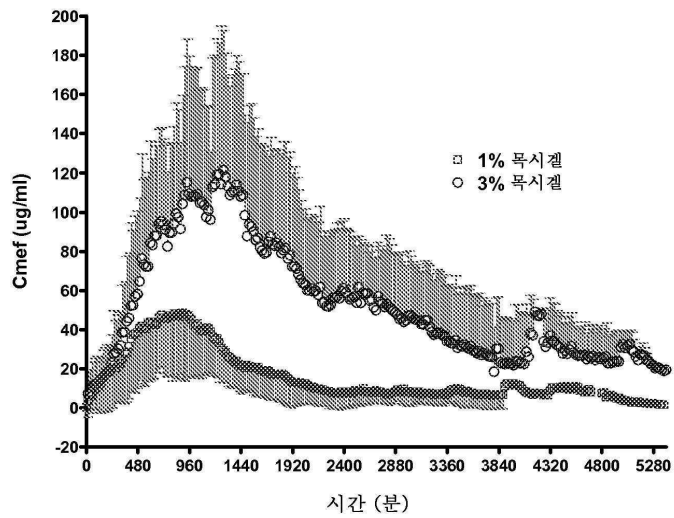
도면7

3% 목시겔의 외이 투여 후의 MEF에서의 목시플록사신 농도(평균, SD)  
(N=13)



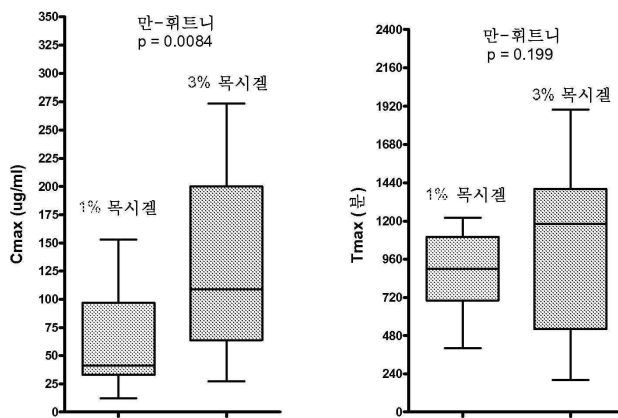
도면8

1% 및 3% 목시겔의 외이 투여 후의  
MEF에서의 목시플록사신 농도(평균, SD)



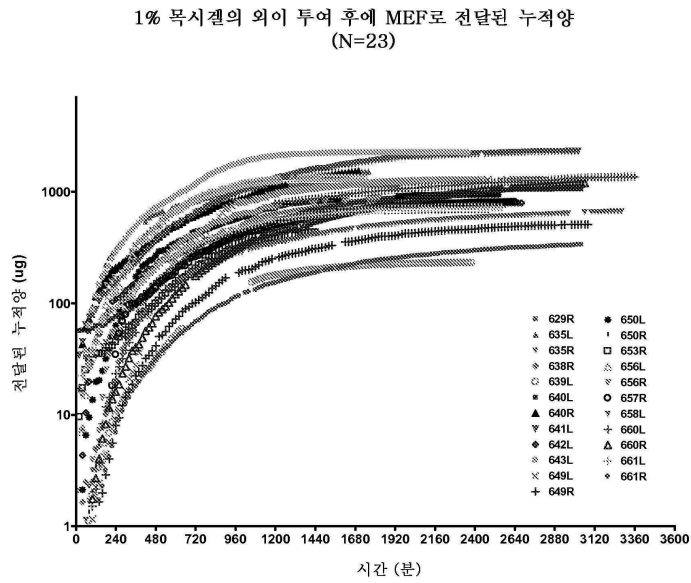
도면9

1% 및 3% 목시겔에 대한 Cmax 및 Tmax 의 비교

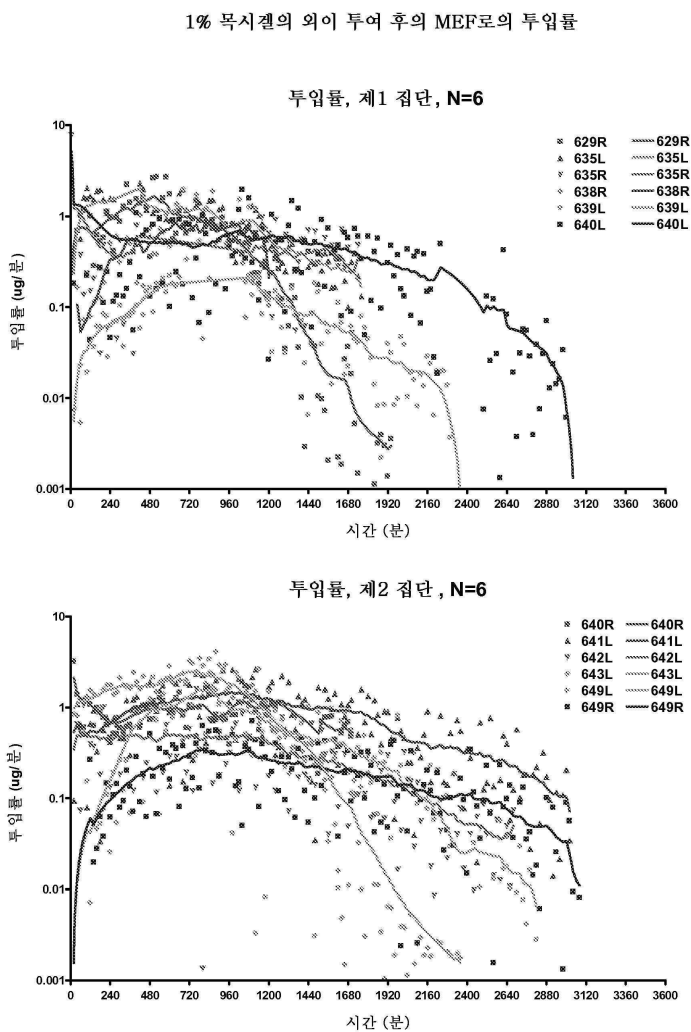




도면10

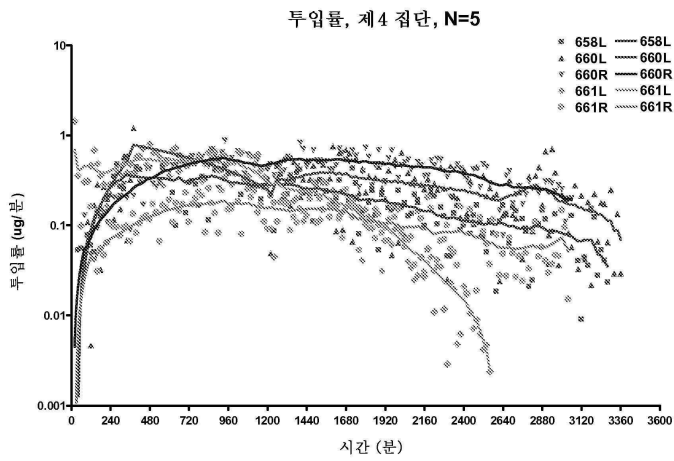
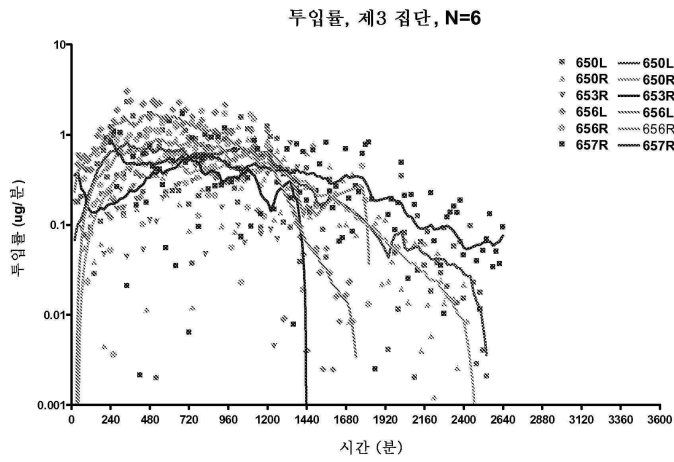


도면11a



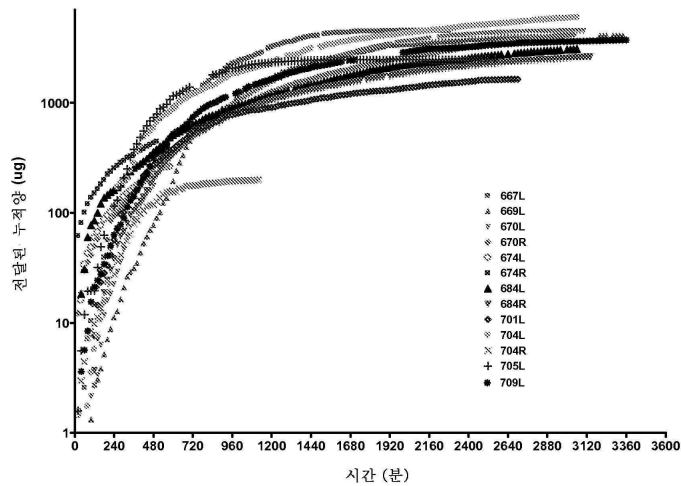
도면11b

1% 목시겔의 외이 투여 후의 MEF로의 투입률



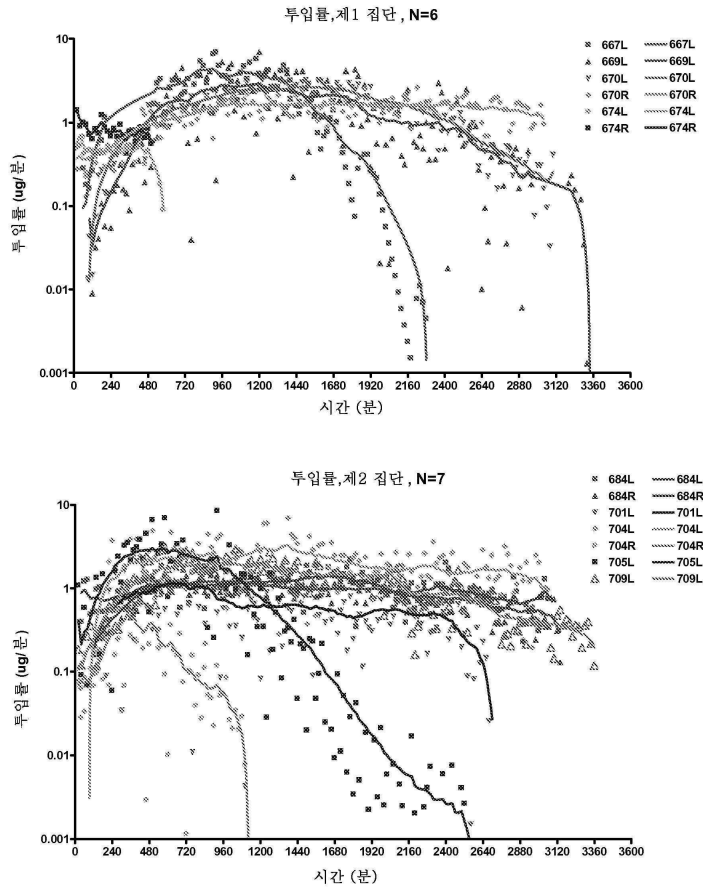
도면12

3% 목시겔의 외이 투여 후에 MEF로 전달된 누적량 (N=13)



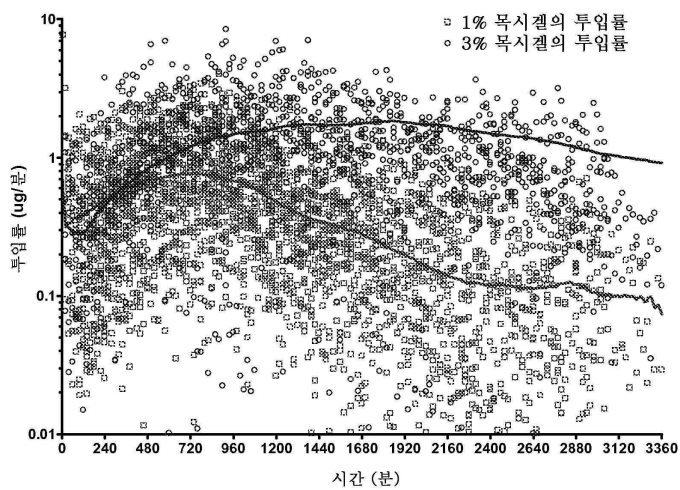
도면13

3% 복시겔의 외이 투여 후의 MEF로의 투입물



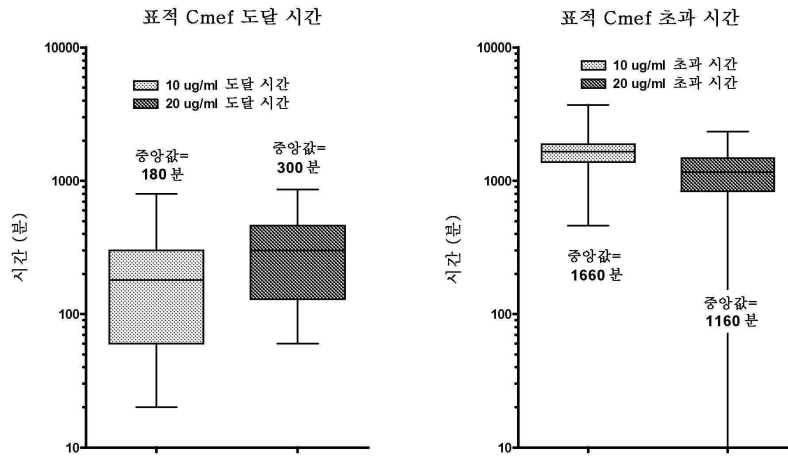
도면14

1% 및 3% 복시겔의 외이 투여 후의 MEF로의 투입물



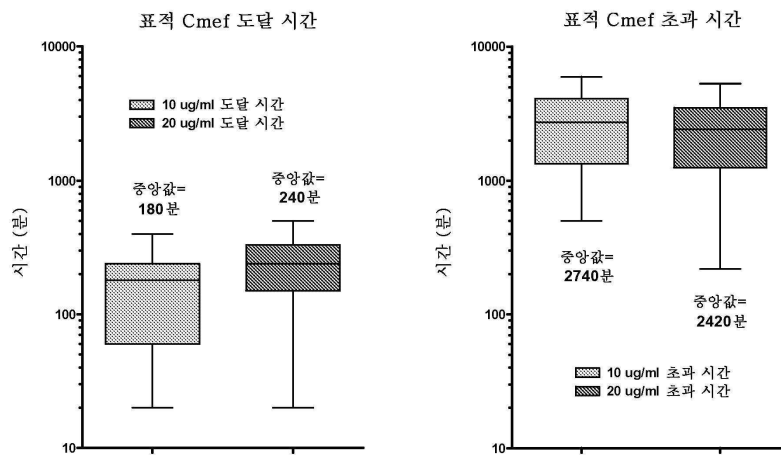
### 도면15

1% 목시겔의 외이 투여 후에, 중이 유체에서의 표적 농도 초과 시간 및 지속 시간

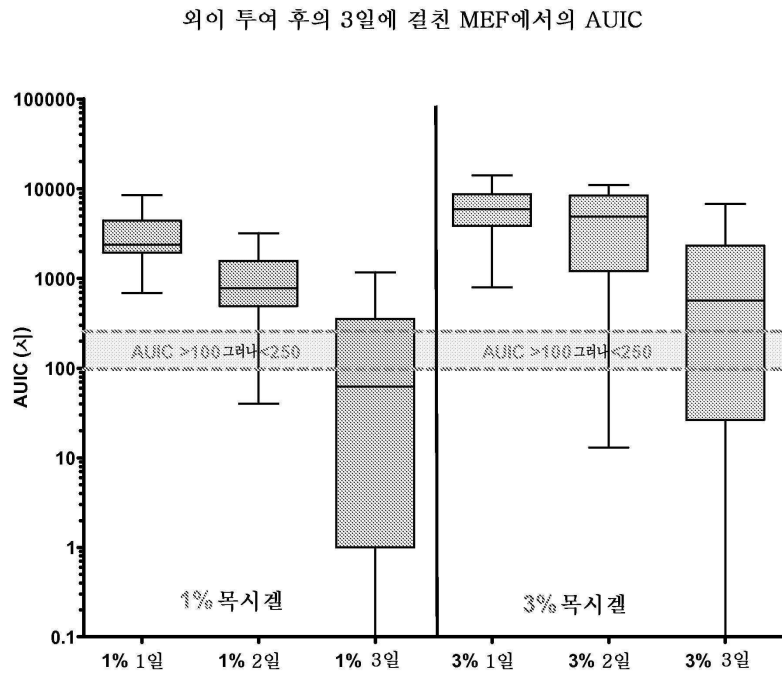


### 도면16

3% 목시겔의 외이 투여 후에, 중이 유체에서의 표적 농도 초과 시간 및 지속 시간

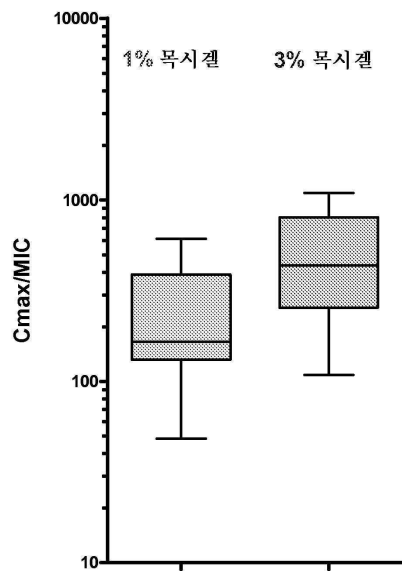


도면17



도면18

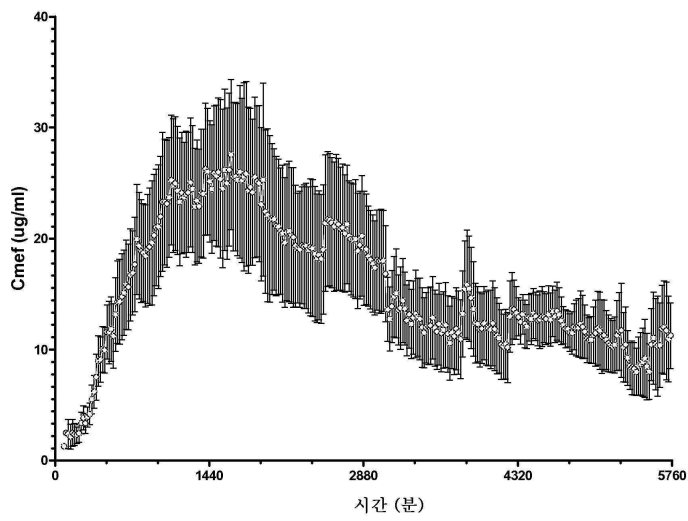
외이 투여 후의 MEF에서의 Cmax/MIC





도면19a

50% IPM 치료 후의 MEF 목시플록사신 농도 (평균, SEM)  
(N=9)



도면19b

50% IPM 치료 후의 MEF 목시플록사신 농도 (평균, SEM)  
(N=9)

