



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102159209 A

(43) 申请公布日 2011.08.17

(21) 申请号 200980136553.7

A61K 31/7076(2006.01)

(22) 申请日 2009.08.11

(30) 优先权数据

570469 2008.08.11 NZ

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.03.17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/NZ2009/000164 2009.08.11

(87) PCT申请的公布数据

W02010/019057 EN 2010.02.18

(71) 申请人 奥克兰联合服务有限公司

地址 新西兰奥克兰

(72) 发明人 S·维拉杰科维克 P·R·索恩

G·D·豪斯利

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 31/4188(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 14 页

(54) 发明名称

听力缺失的治疗

(57) 摘要

本发明提供了治疗噪音诱导的听觉缺失的方法,该方法包括将 A₁腺苷受体激动剂施用于有需要的患者的步骤。在特别优选的实施方式中,所述 A₁腺苷受体激动剂为选择性 A₁腺苷受体激动剂。

1. 一种治疗噪音诱导的听觉缺失的方法,所述方法包括施用 A₁ 腺苷受体激动剂的步骤。
2. 一种治疗噪音暴露后耳蜗的组织损伤的方法,所述方法包括施用 A₁ 腺苷受体激动剂的步骤。
3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂为选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述选择性 A₁ 腺苷受体激动剂选自 N6-环戊基腺苷 (CPA)、2-氯-N⁶-环戊基腺苷 (CCPA)、S-N⁶-(2-内-降冰片基)腺苷 [S(-)-ENBA]、腺苷胺同类物 (ADAC)、([1S-[1a,2b,3b,4a(S*)]]-4-[7-[2-(3-氯-2-噻吩基)-1-甲基丙基]氨基]-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]环戊烷甲酰胺 (AMP579)、N-[R-(2-苯并噻唑基)硫基-2-丙基]-2-氯腺苷 (NNC-21-0136)、N-[(1S,反式)-2-羟基环戊基]腺苷 (GR79236)、N-(3(R)-四氢呋喃基)-6-氨基嘌呤核糖核苷 (CVT-510, Tecadeonson)、N6-环己基-2-O-甲基腺苷 (SDZ WAG994) 以及 N6-环戊基-N5'-乙基腺苷-5'-uronamide (Selodenoson)。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为 ADAC。
6. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为 CCPA。
7. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂为非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为腺苷。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂经全身施用。
10. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂经局部施用至耳蜗的圆窗膜上。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂被施用于已暴露于短时噪音或冲击噪音的患者。
12. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂被施用于已暴露于长时间的过度噪音的患者。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂在暴露于过度噪音的约 24 小时内被施用。
14. 根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂在暴露于过度噪音的约 6 小时内被施用。
15. 根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂在暴露于过度噪音后根据包括多于一次 A₁ 腺苷受体激动剂的施用的剂量方案施用。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂根据其中首次施用在暴露于过度噪音的约 24 小时内施用的剂量方案施用。
17. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂根据其中首次施用在暴露于过度噪音的约 6 小时内施用的剂量方案施用。
18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂根据以下剂量方案施用:其中首次施用在暴露于过度噪音的约 6 小时内施用,并且剩余施用从首次施用的时间开始以 24 小时的间隔作为单次施用而施用。

19. 根据权利要求 15 至 18 中任一项所述的方法,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂根据其剂量方案包括至少 5 次 A₁ 腺苷受体激动剂的施用的剂量方案施用。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述暴露于过度噪音不超过以 110dB 声压水平的噪音水平的噪音持续 24 小时。

21. A₁ 腺苷受体激动剂在制备用于治疗噪音诱导的听觉缺失的药物中的用途。

22. A₁ 腺苷受体激动剂在制备用于降低噪音暴露后耳蜗中的自由基损害的药物中的用途。

23. 根据权利要求 21 或权利要求 22 所述的用途,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂为选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。

24. 根据权利要求 23 所述的用途,其中所述选择性 A₁ 腺苷受体激动剂选自 N6-环戊基腺苷 (CPA)、2-氯-N⁶-环戊基腺苷 (CCPA)、S-N⁶-(2-内-降冰片基)腺苷 [S(-)-ENBA]、腺苷胺同类物 (ADAC)、([1S-[1a,2b,3b,4a(S*)]]-4-[7-[[2-(3-氯-2-噻吩基)-1-甲基丙基]氨基]-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]环戊烷甲酰胺) (AMP579)、N-[R-(2-苯并噻唑基)硫基-2-丙基]-2-氯腺苷 (NNC-21-0136)、N-[(1S,反式)-2-羟基环戊基]腺苷 (GR79236)、N-(3(R)-四氢呋喃基)-6-氨基嘌呤核糖核苷 (CVT-510, Tecadeonson)、N6-环己基-2-O-甲基腺苷 (SDZ WAG994) 以及 N6-环戊基-N5'-乙基腺苷-5'-uronamide (Selodenoson)。

25. 根据权利要求 24 所述的用途,其中所述选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为 ADAC。

26. 根据权利要求 24 所述的用途,其中所述选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为 CCPA。

27. 根据权利要求 21 或权利要求 22 所述的用途,其中所述 A₁ 腺苷受体激动剂为非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。

28. 根据权利要求 27 所述的用途,其中所述非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为腺苷。

29. 根据权利要求 21 至 28 中任一项所述的用途,其中所述药物被配制用于施用至已暴露于短时噪音或冲击噪音的患者。

30. 根据权利要求 21 至 28 中任一项所述的用途,其中所述药物被配制用于施用至已暴露于长时间的过度噪音的患者。

31. 根据权利要求 1 至 30 中任一项所述的用途,其中所述药物被配制用于在暴露于过度噪音的约 24 小时内施用。

32. 根据权利要求 1 至 30 中任一项所述的用途,其中所述药物被配制用于在暴露于过度噪音的约 6 小时内施用。

33. 根据权利要求 1 至 30 中任一项所述的用途,其中所述药物被配制用于根据包括多于一次的 A₁ 腺苷受体激动剂的施用的剂量方案的施用。

34. 根据权利要求 33 所述的用途,其中所述药物被配制用于根据其中首次施用暴露于过度噪音的约 24 小时内施用的剂量方案的施用。

35. 根据权利要求 33 所述的用途,其中所述药物被配制用于根据其中首次施用暴露于过度噪音的约 6 小时内施用的剂量方案的施用。

36. 根据权利要求 35 所述的用途,其中所述药物被配制用于根据以下剂量方案的施用:其中首次施用暴露于过度噪音的约 6 小时内施用,并且剩余施用从首次施用的时间开始以 24 小时的间隔作为单次施用而施用。

37. 根据权利要求 33 至 36 中任一项所述的用途,其中所述药物被配制用于根据其中剂量方案包括至少 5 次 A₁ 腺苷受体激动剂的施用的剂量方案的施用。

38. 根据权利要求 21 至 37 中任一项所述的用途,其中所述暴露于过度噪音不超过以 110dB 声压水平的噪音水平的噪音持续 24 小时。

39. 根据权利要求 21 至 38 中任一项所述的用途,其中所述药物被制备用于全身施用。

40. 根据权利要求 21 至 38 中任一项所述的用途,其中所述药物被制备用于局部施用于耳蜗的圆窗膜上。

41. 根据权利要求 21 至 40 中任一项所述的用途,其中所述药物降低噪音暴露后耳蜗中的谷氨酸兴奋毒性。

42. 根据权利要求 21 至 41 中任一项所述的用途,其中所述药物增加对耳蜗的血流量和氧供应。

43. ADAC 在制备治疗噪音诱导的听觉缺失的药物中的用途,所述 ADAC 包括 ADAC 的互变异构形式、立体异构体、多晶型物、药学上可接受的盐类和 / 或药学上可接受的溶剂化物和 / 或化学变体。

44. ADAC 在制备降低噪音暴露后耳蜗内的自由基损害的药物中的用途,所述 ADAC 包括 ADAC 的互变异构形式、立体异构体、多晶型物、药学上可接受的盐类和 / 或药学上可接受的溶剂化物和 / 或化学变体。

45. 一种治疗哺乳动物中噪音诱导的听觉缺失的方法,其包括将 ADAC 施用于哺乳动物的步骤,所述 ADAC 包括 ADAC 的互变异构形式、立体异构体、多晶型物、药学上可接受的盐类和 / 或药学上可接受的溶剂化物和 / 或化学变体。

46. 一种治疗哺乳动物中噪音暴露后耳蜗的组织损伤的方法,其包括将 ADAC 施用于哺乳动物的步骤,所述 ADAC 包括 ADAC 的互变异构形式、立体异构体、多晶型物、药学上可接受的盐类和 / 或药学上可接受的溶剂化物和 / 或化学变体。

47. 一种治疗噪音诱导的听觉缺失的方法,所述方法包括施用具体参考实施例和附图基本如本文所述的 A₁ 腺苷受体激动剂的步骤。

48. 具体参考实施例和附图基本如本文所述的 A₁ 腺苷受体激动剂在制备治疗噪音诱导的听觉缺失的药物中的用途。

49. 具体参考实施例和附图基本如本文所述的 A₁ 腺苷受体激动剂在制备降低噪音暴露后耳蜗内的自由基损害的药物中的用途。

50. 一种治疗噪音暴露后耳蜗的组织损伤的方法,所述方法包括施用具体参考实施例和附图基本如本文所述的 A₁ 腺苷受体激动剂的步骤。

听力缺失的治疗

技术领域

[0001] 本发明总体涉及通过将 A₁ 腺苷受体激动剂施用于有需要的患者来治疗噪音诱导的听觉缺失的方法。

背景技术

[0002] 听觉损害为严重的健康和社会问题。听觉缺失的最普遍的原因之一为过度暴露于噪音。该问题在军事和在工业环境（建筑工人、矿业、林业和航空工业）中尤其普遍，其中常规的听力保护程序难于操作。一些休闲活动（射击、听高声的音乐）也可以导致意外的听觉缺失。美国卫生统计表明：听觉缺失影响多于两千五百万美国人，每年消耗五百亿美元，该消耗高于多发性硬化、中风、癫痫症、脊柱损伤、亨廷顿病和帕金森病的总经济影响 [1]。据估计，10-13% 的新西兰人受严重的听觉缺失的影响，而且约三分之一的听觉缺失归因于过度噪音所引起的损伤。

[0003] 噪音诱导的听觉缺失可由一次性暴露于强音引起，以及由在一段延长的时间内重复暴露于噪音引起。由新西兰职业安全健康局（OSH）制定的标准表明：连续暴露于超过 85dB 的噪音中会最终损害听觉。

[0004] 暴露于冲击噪音（impulse noise）或连续噪音可引起永久性或暂时性听觉缺失。术语“暂时性阈移（shreshold shift）”（TTS）用于表明由于噪音创伤引起的听觉功能的短暂损伤，其通常在暴露于高声噪音后约一周以内消失。“永久性阈移”（PTS）发生于当暴露后听力阈值已经稳定在降低的水平时。

[0005] 大多数听觉缺失是由内耳感觉系统的损伤引起的。尽管存在对于中耳疾病的治疗，但实际上没有疗法可以改善内耳病理学损伤和降低感觉神经性听觉缺失的影响。越来越多的证据显示氧化应激和活性氧物质（ROS）的产生为许多形式的耳蜗损伤（例如由于噪音暴露、细胞毒性药物和老化）的发病机理的关键元素。氧化应激，伴随谷氨酸的神经毒性，几乎被认为是引起多数耳蜗损伤和听觉缺失的统一机理 [2, 3]。因此靶向氧化应激的根本机理的化合物提供治疗听觉缺失的重要可能性。腺苷受体激动剂已被成功地应用于脑缺血和心脏损伤的治疗，并且被证明具有卓越的细胞保护功能。腺苷受体已经被确定存在于耳蜗中，并且已知腺苷水平在耳蜗液中随噪音暴露而升高 [4, 5]。

[0006] 已知腺苷信号传导系统的应用与听觉相关。动物研究已经表明腺苷激动剂可用于预防性防止获得性听觉缺失 [6-9]。使用非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂 R-N6- 苯异丙基腺苷（R-PIA）的预处理显示对暴露于噪音的耳蜗中的听觉阈值的更好的保存，以及由于预防性应用导致的外毛细胞的增加的存活率 [6]。然而，R-PIA 未被用于噪音暴露后，并且其对噪音暴露后耳蜗恢复的作用是未知的。而且，R-PIA 不是选择性腺苷受体激动剂，并且 R-PIA 对腺苷受体的激活可能对耳蜗功能具有相反作用，例如对 A₁ 和 A_{2A} 受体。

[0007] 清楚的是，暴露于过度噪音的情形不总是可以预测的，因此预防性的选择具有局限性的应用。如果暴露于过度噪音为可预测的，那么可以采用预防性选择，诸如如应用耳塞。因此，必须发展用于噪音诱导的听觉缺失的疗法，该疗法可以改善内耳细微结构的损伤

和降低由于暴露于过度噪音所导致的听觉缺失。目前尚无治疗噪音诱导的听觉缺失的药物治疗法,并且听力辅助和耳蜗移植为仅有的提供给患有这种症状的患者的可能。

[0008] 由于全身性(心血管)的副作用,使用预防性 R-PIA 的动物研究已采用局部递送将其送至耳蜗的圆窗膜(RWM)。尽管将化合物局部递送至 RWM 在临床应用中很普遍,可是这是手术程序并且具有一些其他缺点。尽管 RWM 为将药物递送至内耳的最可行手术途径,可是置于 RWM 上的物质在耳蜗中并不均匀分布[10]。全身性药物施用(口服、胃肠外)在临床应用中为优选的,因为其排除了将药物递送至 RWM 上所必需的手术程序的风险。

[0009] 发明目的

[0010] 本发明的目的在于提供克服现有技术中至少一个缺点的听觉缺失的疗法,或者至少提供给公众有用的选择。

发明内容

[0011] 第一方面,本发明提供了治疗噪音诱导的听觉缺失的方法,所述方法包括施用 A₁ 腺苷受体激动剂的步骤。

[0012] 第二方面,本发明提供了治疗噪音暴露后耳蜗的组织损伤的方法,所述方法包括施用 A₁ 腺苷受体激动剂的步骤。

[0013] 优选地, A₁ 腺苷受体激动剂为选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0014] 优选地,选择性 A₁ 腺苷受体激动剂选自 N6-环戊基腺苷(CPA)、2-氯-N⁶-环戊基腺苷(CCPA)、S-N⁶-(2-内-降冰片基)腺苷[S(-)-ENBA]、腺苷胺同类物(ADAC)、([1S-[1a, 2b, 3b, 4a(S*)]]-4-[7-[2-(3-氯-2-噻吩基)-1-甲基丙基]氨基]-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶基-3-基]环戊烷甲酰胺)(AMP579)、N-[R-(2-苯并噻唑基)硫基-2-丙基]-2-氯腺苷(NNC-21-0136)、N-[(1S,反式)-2-羟基环戊基]腺苷(GR79236)、N-(3(R)-四氢呋喃基)-6-氨基嘌呤核糖核苷(CVT-510, Tecadeonson)、N6-环己基-2-O-甲基腺苷(SDZ WAG 994)以及 N6-环戊基-N5'-乙基腺苷-5'-uronamide(Selodenoson)。

[0015] 优选地,选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为 ADAC。

[0016] 可选地,选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为 CCPA。

[0017] 可选地, A₁ 腺苷受体激动剂为非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0018] 优选地,非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为腺苷。

[0019] 优选地,将 A₁ 腺苷受体激动剂经全身施用。

[0020] 可选地,将 A₁ 腺苷受体激动剂局部施用至耳蜗的圆窗膜上。

[0021] 优选地,将 A₁ 腺苷受体激动剂施用于已暴露于短时噪音(acutenoise)或冲击噪音的患者。

[0022] 可选地,将 A₁ 腺苷受体激动剂施用于已暴露于长时间的过度噪音的患者。

[0023] 优选地,将 A₁ 腺苷受体激动剂施用于已暴露于过度噪音约 24 小时内的患者。

[0024] 更优选地,将 A₁ 腺苷受体激动剂施用于已暴露于过度噪音约 6 小时内的患者。

[0025] 优选地,根据包括在暴露于过度噪音后施用 A₁ 腺苷受体激动剂多于一次的剂量方案,施用 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0026] 优选地,根据其中首次施用在暴露于过度噪音的约 24 小时内施用的剂量方案,施用 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0027] 更优选地,根据其中首次施用在暴露于过度噪音的约 6 小时内施用的剂量方案,施用 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0028] 优选地,根据其中首次施用在暴露于过度噪音的约 6 小时内施用并且剩余施用从首次施用的时间开始以 24 小时的间隔作为单次施用而施用的剂量方案,施用 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0029] 优选地,根据其中剂量方案包括至少 5 次 A₁ 腺苷受体激动剂的施用的剂量方案,施用 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0030] 优选地,过度噪音的暴露不超过以 110dB 的声压水平的噪音水平的噪音持续 24 小时。

[0031] 第三方面,本发明提供了 A₁ 腺苷受体激动剂在制备用于治疗噪音诱导的听觉缺失的药物中的应用。

[0032] 第四方面,本发明提供了 A₁ 腺苷受体激动剂在制备噪音暴露后在耳蜗中减少自由基损害的药物中的应用。

[0033] 优选地, A₁ 腺苷受体激动剂为选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0034] 优选地,选择性 A₁ 腺苷受体激动剂选自 N6-环戊基腺苷(CPA)、2-氯-N⁶-环戊基腺苷(CCPA)、S-N⁶-(2-内-降冰片基)腺苷[S(-)-ENBA]、腺苷胺同类物(ADAC)、([1S-[1a, 2b, 3b, 4a(S*)]]-4-[7-[2-(3-氯-2-噻吩基)-1-甲基丙基]氨基]-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶基-3-基]环戊烷甲酰胺)(AMP579)、N-[R-(2-苯并噻唑基)硫基-2-丙基]-2-氯腺苷(NNC-21-0136)、N-[(1S,反式)-2-羟基环戊基]腺苷(GR79236)、N-(3(R)-四氢呋喃基)-6-氨基嘌呤核糖核苷(CVT-510, Tecadeonson)、N6-环己基-2-O-甲基腺苷(SDZ WAG 994)以及 N6-环戊基-N5'-乙基腺苷-5'-uronamide(Selodenoson)。

[0035] 优选地,选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为 ADAC。

[0036] 可选地,选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为 CCPA。

[0037] 可选地, A₁ 腺苷受体激动剂为非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0038] 优选地,非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为腺苷。

[0039] 优选地,该药物被配制用于施用至已暴露于短时噪音或冲击噪音的患者。

[0040] 可选地,该药物被配制用于施用至已暴露于长时间的过度噪音的患者。

[0041] 优选地,该药物被配制用于暴露于过度噪音的约 24 小时内的施用。

[0042] 更优选地,该药物配制用于暴露于过度噪音的约 6 小时内的施用。

[0043] 优选地,根据包括多于一次施用 A₁ 腺苷受体激动剂的剂量方案,配制该药物。

[0044] 优选地,根据其中首次施用在暴露于过度噪音的约 24 小时内施用的剂量方案,配制该药物。

[0045] 优选地,根据其中首次施用在暴露于过度噪音的约 6 小时内施用的剂量方案,配制该药物。

[0046] 优选地,根据其中首次施用在暴露于过度噪音后的约 6 小时内施用并且剩余施用从首次施用的时间开始以 24 小时的间隔作为单次施用而施用的剂量方案,配制该药物。

[0047] 优选地,根据其中剂量方案包括至少 5 次 A₁ 腺苷受体激动剂的施用的剂量方案,配制该药物。

[0048] 优选地,过度噪音的暴露不超过以 110dB 声压水平的噪音水平的噪音持续 24 小

时。

[0049] 优选地,制备该药物用于全身施用。

[0050] 可选地,制备该药物用于局部施用至耳蜗的圆窗膜上。

[0051] 优选地,该药物降低噪音暴露后耳蜗内的谷氨酸的兴奋毒性。

[0052] 优选地,该药物增加对耳蜗的血流量和氧供应。

[0053] 第五方面,本发明提供了 ADAC 在制备治疗噪音诱导的听觉缺失的药物中的用途,所述 ADAC 包括 ADAC 的互变异构形式、立体异构体、多晶型物、药学上可接受的盐类和 / 或药学上可接受的溶剂化物和 / 或化学变体。

[0054] 第六方面,本发明提供了 ADAC 在制备降低噪音暴露后耳蜗内的自由基损害的药物中的用途,所述 ADAC 包括 ADAC 的互变异构形式、立体异构体、多晶型物、药学上可接受的盐类和 / 或药学上可接受的溶剂化物和 / 或化学变体。

[0055] 第七方面,本发明提供了一种治疗哺乳动物中噪音诱导的听觉缺失的方法,其包括将 ADAC 施用于哺乳动物的步骤,所述 ADAC 包括 ADAC 的互变异构形式、立体异构体、多晶型物、药学上可接受的盐类和 / 或药学上可接受的溶剂化物和 / 或化学变体。

[0056] 第八方面,本发明提供了一种治疗哺乳动物中噪音暴露后耳蜗的组织损伤的方法,其包括将 ADAC 施用于哺乳动物的步骤,所述 ADAC 包括 ADAC 的互变异构形式、立体异构体、多晶型物、药学上可接受的盐类和 / 或药学上可接受的溶剂化物和 / 或化学变体。

[0057] 本发明的其他方面根据以下的附图和实施例将会变得清楚,其仅以举例的方式提供:

[0058] 附图简述

[0059] 图 1 :显示在 110dB SPL 下暴露于 8-12kHz 带噪音 24 小时的大鼠的听性脑干反应 (auditory brainstem response) (ABR)。测量响应纯音 (4-24kHz) 和听性短声 (auditory click) 的 ABR。在噪音暴露 6 小时或 24 小时后单次注射施用 ADAC (100 μ g/kg, 腹膜内注射), 或从噪音后 6 小时开始每 24 小时施用, 共 5 次注射 (长期治疗)。在对照组中, 药物载体以和 ADAC 相同的间隔注射施用。数据以平均值 \pm SEM 表示。动物数量 : 每组 n = 8。
*p < 0.05 ; **p < 0.01 ; ***p < 0.001 ; 非配对 t 检验。

[0060] 图 2 :显示在噪音暴露 6 小时后经单次注射 ADAC 或对照溶液治疗的大鼠的阈值恢复 (听性脑干反应, ABR)。(a) 纯音、(b) 听性短声。*p < 0.05 ; **p < 0.01。动物数量 : 每组 n = 8。

[0061] 图 3 :显示在噪音暴露 24 小时后接受单次注射 ADAC 或对照溶液的大鼠的阈值恢复 (ABR)。(a) 纯音、(b) 听性短声。*p < 0.05 ; **p < 0.01。动物数量 : 每组 n = 8。

[0062] 图 4 :显示 (a) 在 5 次注射 ADAC 或对照溶液的组中的阈值恢复 (ABR)。(a) 纯音、(b) 听性短声。***p < 0.001。动物数量 : 每组 n = 8。

[0063] 图 5 :显示不同 ADAC 治疗的 ABR 阈值恢复的比较。(a) 纯音听力图、(b) 听性短声。动物数量 : 每组 n = 8。

[0064] 图 6 :显示在用 (a) ADAC 和 (b) 载体溶液治疗后的大鼠柯蒂氏器 (organ of Corti) (毒伞素染色)。内毛细胞 (IHC) ; 外毛细胞第 1、2、3 排 (OHC1、OHC2、OHC3)。

[0065] 图 7 :显示用 (A) 对照和 (B) ADAC 治疗的耳蜗的柯蒂氏器中的硝基酪氨酸免疫染色。克劳迪乌斯细胞 (Claudius cell) (cc) ; 内毛细胞 (ihc) ; 外沟细胞 (outer sulcus

cell) (osc) ;血管纹 (sv) ;螺旋神经节神经元 (sgn)。

[0066] 图 8 :显示用 ADAC (100 μ g/kg) 治疗的动物的体重和温度。A. 在即将暴露于噪音前和暴露于噪音后 14 天测量体重。B. 在施用 ADAC 前和注射 30 和 60 分钟后测量直肠温度 ($^{\circ}$ C)。动物数量 :每组 n = 8。

[0067] 图 9 :显示在 110dB SPL 下暴露于 8-12kHz 带噪音 2 小时 (短时噪音暴露) 后的大鼠的 ABR 阈移。在噪音暴露之前和噪音暴露之后的时间间隔 (30 分钟和 14 天) 测量响应听性短声和纯音 (4-28kHz) 的 ABR。从噪音后 6 小时开始以 24 小时的间隔注射 ADAC (100 μ g/kg 腹膜内注射) 5 次。在对照组中,载体溶液以和 ADAC 相同的间隔注射施用。数据以平均值 \pm SEM 表示。动物数量 :每组 n = 8。*p < 0.05 ;**p < 0.01 ;非配对 t 检验。

[0068] 图 10 :显示暴露于噪音 2 小时的耳蜗中毛细胞损害百分比。数据以平均值 \pm SEM 表示。动物数量 :每组 n = 8。*p < 0.05 ;***p < 0.001 ;非配对 t 检验。

[0069] 图 11 :显示在 110dB SPL 下暴露于宽带噪音 24 小时的大鼠的听性脑干反应 (ABR)。在噪音暴露之前 (基线)、噪音暴露后 30 分钟 (治疗前) 和施用腺苷受体激动剂后 48 小时 (治疗后) 测量响应听性短声 (a) 和纯音 (b-e) 的 ABR。所有的药物被递送至耳蜗圆窗膜 (f) 上。阈值恢复被定义为治疗后的 ABR 减去治疗前的 ABR。数据以平均值 \pm SEM 表示 (n = 8)。*p < 0.05 ;**p < 0.01 ;***p < 0.001 ;采用 Tukey' s 多重比较测试的单因素方差分析 (one way ANOVA)。AP,人工外淋巴 (对照);腺苷 (10mM),非选择性腺苷受体激动剂;CCPA (1mM),选择性 A₁ 腺苷受体激动剂;CGS-21680 (0.2mM),选择性 A_{2A} 受体激动剂。

[0070] 图 12 :显示腺苷受体激动剂和拮抗剂对维持在环境噪音水平 (大约 60dB SPL) 下的大鼠的总和电位 (summing potential) (SP) 的影响。在人工外淋巴 (AP ;基线) 灌注前、AP 灌注后和用腺苷受体激动剂腺苷和 CCPA 灌注后在 4-26kHz 的频率范围测量 SP 阈值,该阈值代表内毛细胞受体电位。数据以平均值 \pm SEM 表示 (n = 8)。*p < 0.05**p < 0.01, 采用 Tukey' s 多重比较测试的单因素方差分析。AP,人工外淋巴 (对照);腺苷 (10mM),非选择性腺苷受体激动剂;CCPA (1mM),选择性 A₁ 腺苷受体激动剂;CGS-21680 (0.2mM),选择性 A_{2A} 受体激动剂;SCH-58261,选择性 A_{2A} 受体激动剂。

[0071] 图 13 :显示 (A) 用腺苷受体激动剂 (腺苷, CCPA) 或载体溶液 (AP) 处理的在噪音暴露的耳蜗中的硝基酪氨酸免疫染色。当不存在硝基酪氨酸抗体时未检测到免疫染色。(B) 硝基酪氨酸免疫反应的半定量分析。缩写 :cc,克劳迪乌斯细胞 ;dc,戴特斯细胞 (Deiters' cell) ;he,汉森细胞 (Hensen' s cell) ;idc,间齿细胞 ;is,内沟细胞 ;ihc,内毛细胞 ;ohc,外毛细胞 ;ope,外柱细胞。比例尺 :50 μ m。数据以平均值 \pm SEM 表示 (每组动物 n = 4)。**p < 0.01 ;***p < 0.001 ;采用 Tukey' s 多重比较测试的单因素方差分析。

具体实施方式

[0072] 本发明总体涉及 A₁ 腺苷受体激动剂在治疗听觉缺失中的用途。

[0073] 在特别优选的实施方式中,本发明涉及 A₁ 腺苷受体激动剂在制备治疗噪音诱导的听觉缺失的药物中的用途。

[0074] 腺苷受体存在于多数身体组织中,包括内耳耳蜗。腺苷在组织保护和从压力恢复中起作用。本发明人发现使用 A₁ 腺苷受体激动剂治疗噪音诱导的耳蜗损伤可有效地恢复

听力敏感度。曾经认为, A₁ 腺苷受体激动剂仅具有预防性用途。由于该想法, A₁ 腺苷受体激动剂已被认为具有有限的实际应用。

[0075] 在优选的方面, 使用 A₁ 腺苷受体激动剂可提供在噪音暴露后约 5-12dB、或更优选约 25-30dB, 或听觉缺失的约 30-60% 的听力恢复。从应用的角度看, 即使 5dB 的改善在临床上也是有显著的。因此, 本发明取得的改善是非常显著的。

[0076] 因此, 本发明提供治疗噪音诱导的听觉缺失的方法, 该方法包括施用 A₁ 腺苷受体激动剂的步骤。

[0077] A₁ 腺苷受体激动剂可选择性针对 A₁ 受体或对所有腺苷受体 (A₁、A_{2A}、A_{2B}、A₃) 具有广泛的选择性。因此, 如在本发明说明书中所指的 A₁ 腺苷受体激动剂, 应该解释为包括诸如腺苷的非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂, 以及诸如腺苷胺同类物 (ADAC) 和 2-氯-N⁶-环戊基腺苷 (CCPA) 的选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0078] 根据本发明的优选的实施方式, A₁ 腺苷受体激动剂将为选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。合适的选择性 A₁ 腺苷受体可选自 N6-环戊基腺苷 (CPA)、2-氯-N⁶-环戊基腺苷 (CCPA)、S-N⁶-(2-内-降冰片基) 腺苷 [S(-)-ENBA]、腺苷胺同类物 (ADAC)、([1S-[1a, 2b, 3b, 4a(S*)]]-4-[7-[2-(3-氯-2-噻吩基)-1-甲基丙基]氨基]-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶基-3-基]环戊烷甲酰胺) (AMP579), N-[R-(2-苯并噻唑基) 硫基-2-丙基]-2-氯腺苷 (NNC-21-0136)、N-[(1S, 反式)-2-羟基环戊基] 腺苷 (GR79236)、N-(3(R)-四氢呋喃基)-6-氨基嘌呤核糖核苷 (CVT-510, Tecadeonson)、N6-环己基-2-O-甲基腺苷 (SDZWAG 994) 和 N6-环戊基-N5'-乙基腺苷-5'-uronamide (Selodenoson)。在特别优选的实施方式中, 选择性 A₁ 腺苷受体激动剂将为 CCPA。在更特别优选的实施方式中, 选择性 A₁ 腺苷受体激动剂将为 ADAC。

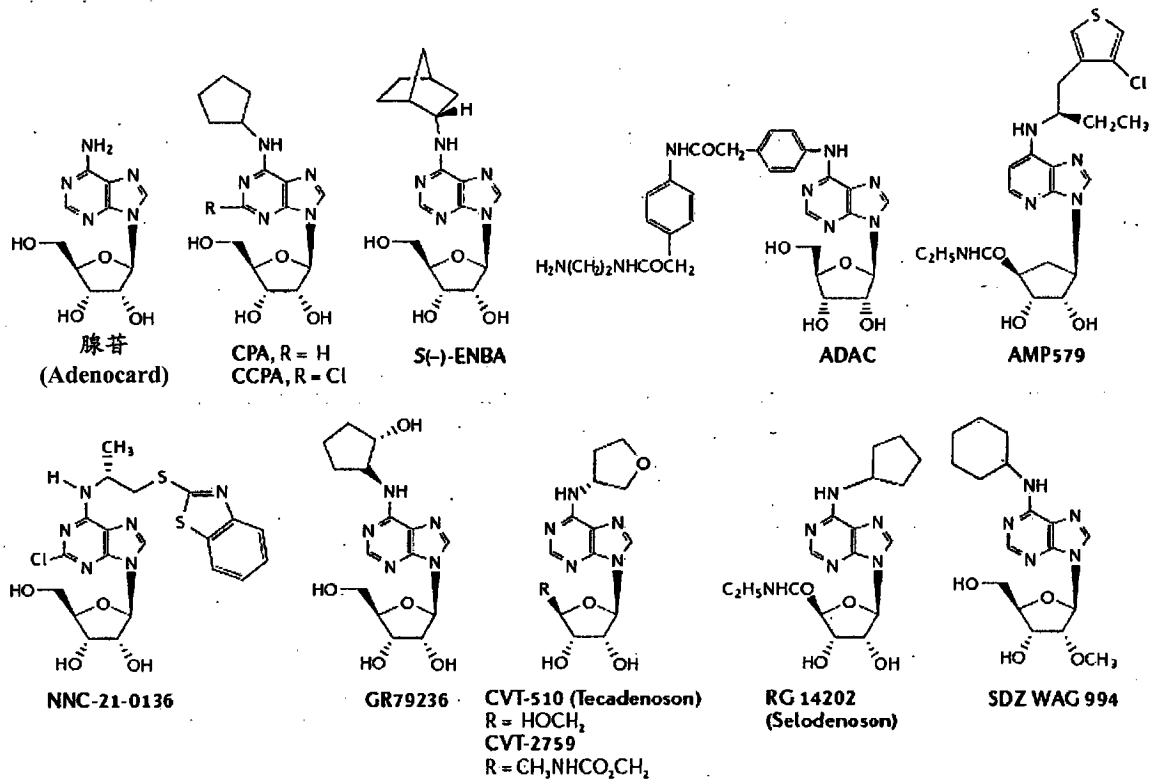
[0079] 根据本发明的可选的实施方式, A₁ 腺苷受体激动剂可为非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂。用于本发明的优选的非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂为腺苷。当根据本发明应用非选择性 A₁ 腺苷受体激动剂时, 需要应用相对于选择性 A₁ 腺苷受体激动剂浓度更高的浓度。

[0080] 当在本发明说明书中提到 A₁ 腺苷受体激动剂 (例如, 腺苷、ADAC 或 CCPA) 时, 其应解释为包括 A₁ 腺苷受体激动剂的互变异构形式、立体异构体、多晶型物、药学上可接受的盐类、药学上可接受的溶剂化物和 / 或化学变体等的应用。如技术人员可理解的, 所指的不同形式和 / 或变体不应该是将会有害地影响本发明中 A₁ 腺苷受体激动剂的使用的类型。技术人员根据本发明的公开内容就能够很好地确定此类问题。

[0081] 选择性 A₁ 腺苷受体激动剂 (尤其是 ADAC) 的化学结构与腺苷相比具有很大改变, 如以下表 1 所示。

[0082] 表 1: 腺苷和选择性 A₁ 腺苷受体激动剂

[0083]



[24]

[0084] 在一个实施方式中，A₁ 腺苷受体激动剂可经全身施用，因此避免向中耳或内耳直接进行治疗（需要诊所程序（office procedure））的需要。A₁ 腺苷受体激动剂可经腹膜内、静脉内、口服、肌肉内或皮下施用以达到该全身效果。最合适的全身递送途径至少部分依赖于所选的 A₁ 腺苷受体激动剂的药理学性质。腹膜内施用在实验部分举例说明。

[0085] 可选地，如果需要，A₁ 腺苷受体激动剂可被配制，用于通过鼓室内注射局部施用至内耳，尤其是局部施用至耳蜗的圆窗膜上。局部制剂的鼓室内施用在实验部分举例说明。该方法的优点为可以避免任何可能的药物全身性副作用。

[0086] 过度噪音由两部分组成 - 暴露的时间和噪音的响度。持续暴露在超过 85 分贝 (dB) 的噪音被认为是过度噪音。当暴露为短时的（例如，持续过度噪音暴露 2 小时）或长时间的（例如，持续暴露 24 小时）时，或当暴露于突然的高声噪音（例如，爆炸或类似情形；称为冲击噪音）时，本发明可随时间与过度噪音的暴露一起使用。优选地，暴露于过度噪音不超过以 110dB 声压水平的噪音水平的噪音持续 24 小时。

[0087] A₁ 腺苷受体激动剂可以优选在暴露于过度噪音约 24 小时内施用。更优选地，应该在暴露于过度噪音约 6 小时内施用。

[0088] 优选地，根据其中首次施用在暴露于过度噪音的约 6 小时内施用并且剩余施用从首次施用的时间开始每 24 小单次施用而施用的剂量方案，施用 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0089] 进一步优选地，根据其中剂量方案包括至少 5 次 A₁ 腺苷受体激动剂的施用的剂量方案，施用 A₁ 腺苷受体激动剂。

[0090] 在过去，ADAC 已用在脑缺血和亨廷顿病的实验模型中提供组织保护 [12-14]。已经发现其作为药物具有显著优势，因为与其他作用于腺苷 A₁ 受体的药物相比，ADAC 具有降低的外周副作用 [12]。其他作用于腺苷 A₁ 受体的药物可具有诸如心动过缓和低血压和体温

过低的心血管副作用 [15]。据信,不存在由 ADAC 引起的副作用和其对脑中 A_1 受体的高亲和性至少部分是由于其修饰的化学结构和穿过血-脑或血-外淋巴屏障的能力的提高 [16]。因此, ADAC 为用于本发明中的尤其优选的 A_1 受体激动剂。本发明人还发现腺苷和 CCPA 或其他的选择性 A_1 腺苷受体激动剂适合用于通过鼓室内注射而局部施用至圆窗膜(诊所程序)。这避免任何全身性副作用的风险。

[0091] 适用于胃肠外施用的诸如 ADAC 的 A_1 腺苷受体激动剂的制剂已在以前描述过 [17]。这些已知制剂包括水性和非水性、等渗无菌注射溶液和无菌悬浮液,其可包含助溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。腺苷 A_1 腺苷受体激动剂可溶于盐水、葡萄糖和相关糖的水溶液、诸如乙醇、异丙醇、乙二醇等的醇类。用于胃肠外施用的 ADAC 制剂的例子在实验部分的方法和材料中提供。

[0092] 适用于 A_1 腺苷受体激动剂的局部施用的制剂也包括水性和非水性、等渗无菌注射溶液和无菌悬浮液,其可包含助溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。 A_1 腺苷受体激动剂可溶于盐水、葡萄糖和相关糖的水溶液;诸如乙醇、异丙醇、乙二醇等的醇类。用于局部施用至圆窗膜的腺苷 A_1 腺苷受体激动剂制剂的例子也提供于实验部分。

[0093] 目前使用的与治疗听觉缺失相关的药物(诸如抗氧化剂)仅为预防性应用的 [8]。这些已知药物对听力恢复帮助很小。目前可用的恢复听力的唯一方法为助听器。虽然助听器可增强声音,但它们不能完全恢复言语识别。助听器对使用者也具有实际的缺点。

[0094] 暴露于过度噪音引起耳蜗中的氧化应激,从而导致听觉缺失。在噪音暴露停止后耳蜗中的氧化应激持续长达 10 天,并且决定了组织损害的最终水平。本发明人认为噪音暴露后施用腺苷 A_1 腺苷受体激动剂可通过如下方式提高噪音暴露后的听觉功能的保护:提高抗氧化剂的生成,抵消自由基和谷氨酸的毒性作用(降低噪音暴露后耳蜗中的谷氨酸的兴奋毒性),以及提高耳蜗血流量和氧供应。这可能使腺苷 A_1 腺苷受体激动剂对噪音诱导的听觉缺失具有治疗效果,恢复听力阈值以及因此提高言语识别。因此本发明的其他方面提供了在噪音暴露后使用腺苷 A_1 腺苷受体激动剂,以降低耳蜗中自由基的损害和/或治疗耳蜗的组织损伤,因而治疗有需要的患者的噪音诱导的听觉缺失。合适的药物的制备以及治疗方案已经在之前所讨论。

[0095] 实验

[0096] 在实验 1 和 2 中, Wistar 大鼠暴露于噪音 (8-12kHz, 110dB SPL, 2-24 小时)。然后, ADAC 可以 $100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 施用于 Wistar 大鼠。ADAC 可在噪音暴露后 6 小时经单次注射施用,或在噪音暴露后 24 小时经单次注射施用,或经多次注射(其中多次注射的首次注射在噪音暴露后 6 小时施用)施用。

[0097] 使用听性脑干反应 (ABR) 评价听力阈值,并且通过定量组织学(毛细胞缺失)评价细胞损害。ABR 代表响应声音(短声或纯音)的听觉神经和中枢听觉途径(脑干/中脑区)的活性。硝基酪氨酸标记被用于自由基损害的免疫组织化学评估。

[0098] 实验工作显示 ADAC 显著地提高 ABR 阈值。据发现,始于噪音暴露停止后 6 小时的 ADAC 的多次注射为最有效的治疗方案。ADAC 治疗的耳蜗显示降低的头发损失和 RNS 免疫反应。

[0099] 实验 1:ADAC 对长时间的噪音暴露的作用(全身性递送)

[0100] 材料和方法

[0101] 动物

[0102] 8-10 周龄雄性 Wistar 大鼠用于本研究中。

[0103] 实验组

[0104] 表 2 :ADAC 注射方案

[0105]

组号	噪音暴露	治疗	治疗方案
组 1	24 小时	ADAC	单次注射, 6 小时 PE
组 2	24 小时	载体 (对照)	单次注射, 6 小时 PE
组 3	24 小时	ADAC	单次注射, 24 小时 PE
组 4	24 小时	载体 (对照)	单次注射, 24 小时 PE
组 5	24 小时	ADAC	多次注射
组 6	24 小时	载体 (对照)	多次注射

[0106] PE = 暴露后

[0107] 各 ADAC 组 (n = 8) 具有一个相应的对照组, 该对照组由载体溶液 (n = 8) 治疗。

[0108] 腺苷胺同类物

[0109] 腺苷胺同类物 (ADAC) 获自 Dr. Ken Jacobson (NIH, Bethesda, USA)。首先将 ADAC (2.5 μ g) 溶解于 100 μ L 的 1N HCl 中, 然后至 50ml 的 0.1M PBS (pH 7.4) 中, 制成 50 μ g/ml 的储备溶液。在微量离心管中将该溶液等分为 1mL, 并且储存于 -20 $^{\circ}$ C 以备后用。当需要时, 施用前在 37 $^{\circ}$ C 水浴中将该 ADAC 等分液加热 30 分钟。ADAC 的注射剂量经腹膜内施用, 100 μ g/kg/ 日, 200 μ l/100g 体重。

[0110] 载体

[0111] 对照载体溶液通过将 100 μ L 的 1N HCl 溶解于 50ml 的 0.1M PBS (pH 7.4) 中制备, 等分在微量离心管中并且也在注射前在 37 $^{\circ}$ C 水浴中加热 30 分钟。将相同体积的载体溶液 (腹膜内 200 μ l/100g 体重) 施用于对照组。

[0112] 噪音暴露

[0113] 大鼠暴露于 8-12kHz 带噪音, 在 110dB SPL 下 24 小时。这是在具有内置扬声器和外置控制器 (声音发生器和频率选择器) 的专门定制的声室 (acoustic chamber) (Shelburg Acoustics, 悉尼, 澳大利亚) 中完成的。在声室内的声音强度应用校准的 Rion NL-40 声级计测定以确保声音强度 (110 \pm 1dB SPL) 的最小偏差。将多达 4 只的大鼠置于声室中的标准鼠笼中。以 1 小时的间隔将大鼠引入至声室中, 以使随后的 ABR 的时间安排可对所有大鼠保持一致。

[0114] 听性脑干反应

[0115] ABR 代表响应于声音 (短声或纯音) 的听觉神经和中枢听觉途径 (脑干 / 中脑区域) 的活性。通过将微型铂电极皮下置于感兴趣的耳朵的乳突区域 (有源电极)、头顶 (参考) 和对侧耳朵的乳突区域 (接地电极) 以获得 ABR。以不同强度和阈值呈现的一系列听

性短声或纯音 (4-28kHz) 产生了反映不同水平听觉处理的电活动。通过逐步削弱声音强度至不再能观测到波形, 来确定 ABR 复合物的声音阈值 (I-IV 波)。

[0116] 产生对 ABR 的声刺激, 并且应用 Tucker-Davis Technologies 听觉生理工作站 (Alachua, FL, USA) 录制应答。

[0117] 所有的 ABR 的测量在声音衰减室 (Shelburg Acoustics, 悉尼, 澳大利亚) 中进行。以氯胺酮 (75mg/kg) 和赛拉嗪 (10mg/kg) 的混合物经腹膜内麻醉大鼠, 然后置于加热垫上以保持体温为 37°C。以数字化产生的 5ms 短音 (tone pip) (0.5ms 升降时间) 在 4 至 28kHz 的频率下以半八度音阶诱发 ABR 电位。声压水平 (SPL) 以 5dB 音阶从低于阈值水平的 10dB 升高至 90dB SPL。在各个声音水平 (具有交替的刺激极性的 1024 次重复) 将应答平均化, 而且当峰-峰振幅超过 15 μ V 时应答波形被弃用。ABR 阈值被定义为当高于本底噪音 (noise floor) 时应答可被可视性检测的最低强度 (至最近的 5dB)。

[0118] 在噪音暴露之前和之后以及 ADAC/ 载体治疗后测量 ABR 阈值。在大鼠第一次接受 ADAC 或载体注射前 1 小时, 获得噪音后 ABR 录制 (recording)。对与第 1、2、5 和 6 组为噪音暴露后的 5 小时, 或对于第 3 和 4 组为噪音暴露后的 23 小时 (表 2)。最终的 ABR 测量在最后的 ADAC/ 载体注射后 18 小时取得。

[0119] 耳蜗提取

[0120] 在最后的 ABR 测量后, 以过量的戊巴比妥处死大鼠, 并且移除耳蜗用于组织学分析。分离的耳蜗保存于 4% 多聚甲醛中过夜, 直至进一步处理 (被膜剥除或脱钙)。

[0121] 毛细胞计数

[0122] 在过夜固定后, 在 0.1M PBS 中被膜剥除耳蜗, 以分离柯蒂氏器。用精细镊子移除柯蒂氏器, 并且分离为顶转 (apical turn)、中转 (middle turn) 和底转 (basal turn)。将柯蒂氏器的全标本 (whollemount) 组织置于 24 孔板中, 然后用在 0.1M PBS 中 1% Triton-X 透化 1 小时。用溶解于 0.1M PBS 中的 1% Alexa Fluor488 毒伞素 (Invitrogen) 将毛细胞和其静纤毛染色。组织在毒伞素中培养 40 分钟, 用 0.1M 的 PBS 清洗三次, 每次 10 分钟, 并且应用 CitiFlour 固封至载玻片上。用 Zeiss 落射荧光显微镜将载玻片显像, 并且应用暗视野滤片和 100x、200x 和 400x 放大率用 Axiovision v3.1 软件处理。得到完整长度的耳蜗的非重叠的图像, 并且对各个回转的减少的外毛细胞的数目进行计数并以毛细胞总数的百分比表示。

[0123] 硝基酪氨酸 (NT) 的免疫组织化学

[0124] 在 4% PFA 中过夜固定后, 大鼠耳蜗在 5% EDTA 溶液中除钙 7 天并且在 30% 蔗糖 (在 0.1M PB 中) 溶液中过夜冷冻保护 (cryoprotect)。将耳蜗在 N- 戊烷中急冻, 并且保存于 -80°C 直到进一步处理。冷冻的耳蜗组织以 30 μ m 冰冻切片并且转移至含有无菌的 0.1M PBS 的 24 孔板中 (Nalge Nunc Int., Naperville, USA), 并且在 1% Triton-X 中透化 1 小时。非特异性的结合位点被 10% 正常山羊血清 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 阻断。硝基酪氨酸抗体 (BIOMOL Research Laboratories Inc., 普利茅斯, PA, USA) 以 1 : 750 在 0.1M PBS 中的 1.5% 正常山羊血清和 0.1% Triton X-100 稀释。组织切片与一级抗体在 4°C 下孵育过夜。在对照孔中略去一级抗体。二级抗体 Alexa 488 山羊抗鼠 IgG 偶联物 (Invitrogen) 以 1 : 400 在含 1.5% 正常山羊血清和 0.1% Triton X-100 的 0.1M PBS 溶液中稀释。组织切片与二级抗体在黑暗中孵育 2 小时, 然后在 PBS 中冲洗若干次, 封固于荧

光基质 (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) 中, 并且应用共聚焦显微镜 (TCS SP2, Leica Leisertechnik GmbH, 海德堡, 德国) 对 NT 特异性免疫荧光进行筛选。使用 Scanware 软件 (Leica) 控制图像获取。对每个标本采集一系列 6-10 个光学切片, 而且从堆叠层的中心在光学截面上进行图像分析。不改变检测设置以允许对对照和 ADAC 治疗的耳蜗的相对染色密度进行比较。

[0125] 统计分析

[0126] 输入所有数据并以 Microsoft Excel 和 SPSS v. 15 分析。结果以平均值 \pm S. E. M. 表示。假定方差不齐, 应用 student' s 非配对 t 检验, 进行 ABR 阈值和毛细胞损害的比较。 α 水平设置为 $P = 0.05$ 。

[0127] 结果

[0128] 在长时间的噪音暴露 (24 小时) 后的听觉阈值

[0129] 在噪音暴露前 (基线)、暴露后以及 ADAC 治疗后测量 ABR 阈值。比较所有组中的基线 ABR 阈值 (图 1)。对于听性短声和纯音, 噪音暴露后 24 小时内的阈移在 45dB 至 60dB 的范围内 (图 1)。以 ADAC 单次注射治疗的动物表现出 ABR 阈值的显著的恢复: 当动物接受早期治疗 (噪音后 6 小时) 时为 17-26dB, 在噪音暴露后 24 小时治疗的动物为 5-13dB。在所有的纯音频率 (22-28dB) 下, 用 ADAC 的长期处理 (5 天) 提供了 ABR 阈值的一致的恢复。对于听性短声, 观测到相似的效果, 在图 1 中以分别的条形图绘制。在接受多次 ADAC 注射 (29dB \pm 3dB) 的组中观测到 ABR 阈值的最高恢复 (图 4 和 5), 而在噪音暴露 (8 \pm 2dB) 后 24 小时接受单次 ADAC 注射的组中观测到最低恢复 (图 3 和 5)。在用载体溶液治疗的对照组中, ABR 应答与噪音暴露后的阈值无统计学上的差异 (图 1)。

[0130] 阈值恢复

[0131] 阈值恢复为暴露后阈值和治疗后阈值之间的差异。ADAC 治疗的和对照组的比较示于图 2-5 中。

[0132] 图 2 表明在暴露噪音后 6 小时用单次注射 ADAC 治疗的大鼠的阈值恢复。对于纯音和听性短声, 组中恢复水平 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) 存在统计学上的显著差异, 然而恢复水平在所测试的频率中不相同, 在 12 和 24kHz 最低。对照动物中观测到的听力阈值的小量恢复归因于暂时的阈移 (TTS)。

[0133] 图 3 显示施用 ADAC 对阈值恢复的作用在噪音暴露后 24 小时较不明显。

[0134] 如图 4 所示, 在长时间的 ADAC 治疗 (5 次注射) 后观测到听力阈值的最佳恢复 (< 25dB)。

[0135] ADAC 注射在所有频率提供稳定的恢复, 而单次 ADAC 注射在 12kHz 和 24kHz 纯音和听性短声下效率较低。晚开始的 ADAC 治疗 (暴露后 24 小时) 为最无效的治疗方案, 如图 5 中所示。

[0136] 毛细胞损害

[0137] 暴露于噪音 (8-12kHz, 110dB SPL, 24 小时) 的柯蒂氏器的组织学分析表明对上底转和中下转 (lower middle turn) 的损害, 但顶转不受影响。柯蒂氏器的底转的代表性例子显示于图 6 中。用载体溶液治疗的噪音暴露的对照耳蜗中的柯蒂氏器显示广泛分布的外毛细胞损害 (尤其是在第一排) 以及一些内毛细胞损害 (图 6(a))。相反, 来自 ADAC 治疗的大鼠耳蜗的柯蒂氏器的表层制备 (图 6(b)) 显示保存良好的毛细胞形态学。

[0138] 硝基酪氨酸 (NT) 免疫染色

[0139] 用载体治疗的大鼠的柯蒂氏器和外沟细胞中显示 NT 免疫反应 (图 7A)。相反,在用 ADAC 治疗的耳蜗的相应组织中观测到非常少的 NT 免疫染色 (图 7B)。在用 ADAC 治疗的耳蜗中的降低的 NT 免疫反应表明低自由基活性。

[0140] 实验 2 :ADAC 对短时噪音暴露的作用 (全身递送)

[0141] 材料和方法

[0142] 实验组

[0143] 表 3 :ADAC 注射方案

[0144]

组号	噪音暴露	治疗	治疗方案
组 1	2 小时	ADAC	多次注射
组 2	2 小时	载体 (对照)	多次注射

[0145] 动物

[0146] 雄性 Wistar 大鼠 (8-10 周龄) 被用于本研究中。

[0147] 治疗

[0148] 按实验 1 准备 ADAC 和等分液和载体溶液。

[0149] 噪音暴露

[0150] 大鼠暴露于 8-12kHz 带噪音,在 110dB SPL 下 2 小时。在具备内置扬声器和外置控制器 (声音发生器和频率选择器) 的专门定制的声室 (Shelburg Acoustics, 悉尼, 澳大利亚) 中完成噪音暴露。应用校准的 Rion NL-40 声级计测定声室内的声音强度以确保声音强度 (110±1dB SPL) 的最小偏差。将多达 4 只大鼠置于声室中的标准鼠笼中。

[0151] 听性脑干反应

[0152] ABR 通过将微型铂电极皮下置于感兴趣的耳朵的乳突区域 (有源电极)、头顶 (参考) 和对侧耳朵的乳突区域 (接地电极) 而获得。以不同强度和阈值呈现的一系列听性短声或纯音 (4-28kHz) 产生反映不同水平听觉处理的电活动。通过逐步减轻声音强度至不再能观测到波形,来确定 ABR 复合物的声音阈值 (I-IV 波)。产生了对 ABR 的声刺激,并且应用 Tucker-Davis Technologies 听觉生理工作站 (Alachua, FL, USA) 录制应答。

[0153] 所有的 ABR 的测量在声音衰减室 (Shelburg Acoustics, 悉尼, 澳大利亚) 中进行。用氯胺酮 (75mg/kg) 和赛拉嗪 (10mg/kg) 的混合物经腹膜内麻醉大鼠,然后将其置于加热垫上以将保持体温为 37°C。用数字化产生的 5ms 短音 (0.5ms 升降时间) 在 4 至 28kHz 的频率下以半八度音阶诱发 ABR 电位。声压水平 (SPL) 以 5dB 的音阶从低于阈值水平 10dB 升高至 90dB SPL。在各个声音水平 (具有交替的刺激极性的 1024 次重复) 将应答平均化,而且当峰-峰振幅超过 15µV 时应答波形被弃用。ABR 阈值被定义为当高于本底噪音时应答可被可视性检测的最低强度 (至最近的 5dB)。

[0154] ADAC 治疗开始于噪音暴露停止后 6 小时,而在噪音暴露后 30 分钟和 14 天记录 ABR。

[0155] 毛细胞计数

[0156] 毛细胞总数百分比如实验 1 确定。

[0157] 统计分析

[0158] 统计分析按实验 1 进行。

[0159] 结果

[0160] 体重和温度

[0161] ADAC 治疗不引起大鼠中明显的行为变化或体重上的改变 (图 8(a))。另外,在施用 ADAC 后体温保持稳定 (图 8(b))。

[0162] 在短时噪音暴露后的听觉阈值

[0163] 在本研究中,大鼠暴露于 8-12kHz 带噪音,在 110dB SPL 下 2 小时。应用和实验 1 相同的治疗方案:以 24 小时的间隔进行五次 ADAC 注射。在噪音暴露前和后 (30 分钟和 14 天) 进行 ABR 录制。

[0164] 所有噪音暴露的动物显示在噪音后 30 分钟对于听性短声和纯音 (4-28kHz) 的可比较的阈移 (32-60dB)。在代表最大损害区域的 8-12kHz 频率下观测到最高阈移 (55-60dB)。在本研究的终点 (噪音后 14 天),与载体治疗的对照相比较,在 ADAC 治疗的动物中阈移降低 (图 9)。在范围从 4 至 16kHz 的纯音频率下,阈值恢复为最高 (高至 30dB)。在暴露于冲击噪音的大鼠中,ADAC 有效地改善听觉缺失。

[0165] 在短时噪音暴露后的毛细胞损害

[0166] 在底转、中转和顶转的柯蒂氏器的 Alexa 488 毒伞素标记的表面制剂中对外毛细胞和内毛细胞计数,并且计算各个回转的缺失毛细胞百分比。毛细胞损害的定量分析显示于图 10 中。在用载体治疗的对照动物中缺失毛细胞的数目在 23 至 34% 之间改变,而用 ADAC 治疗的动物在耳蜗中转和底转中分别显示平均 7-9% 的毛细胞损害。因此,在创伤性噪音暴露后,长期的 ADAC 治疗确实在柯蒂氏器中降低细胞的损伤。

[0167] 在下面的实验中,选择性腺苷受体激动剂被递送至圆窗膜 (RWM) 上,并且复合作用电位 (CAP)、总和电位 (SP) 或者听力脑干反应 (ABR) 被用于测量噪音暴露前和后对耳蜗功能的影响。

[0168] 实验 3:腺苷、CCPA 和 CGS-21680 对短时噪音暴露的作用 (局部递送)

[0169] 材料和方法

[0170] 药物

[0171] 以下腺苷受体激动剂和拮抗剂购自 Sigma-Aldrich:腺苷;CCPA(2-氯-N⁶-环戊基腺苷), A₁ 腺苷受体激动剂;CGS-21680(2-p-(2-羧乙基)苯乙胺基-5'-N-乙基羧酰氨基腺苷盐酸盐一水合物), A_{2A} 受体激动剂;以及 SCH-58261(7-(2-苯基乙基)-5-氨基-2-(2-咪唑基)-吡唑并-[4,3-e]-1,2,4-三唑[1,5-c]嘧啶), A_{2A} 受体拮抗剂。这些化合物的储备液在人工外淋巴溶液 (AP;122mM NaCl,18mM NaHCO₃,5mM KCl,0.7mM CaCl₂,0.5mM MgCl₂,4mM D-葡萄糖,在 5mM HEPES 中 14mM 甘露醇,pH 7.5) 中制备。将化合物等分并且储存于 -80°C 下。

[0172] 动物

[0173] 实验在具有正常 Preyer' s 反射的雄性 Wistar 大鼠 (8-10 周龄) 中进行。动物由 Vernon Jansen Unit(奥克兰大学,新西兰)供应。所有在本研究所述的实验程序由奥克兰大学动物道德委员会批准。

[0174] 噪音暴露

[0175] 大鼠暴露于 8-12kHz 宽带噪音,在 90、100 或 110dB SPL 下 24 小时。在具备内置扬声器和外置控制器(声音发生器和频率选择器)的专门定制的声室(Shelburg Acoustics, 悉尼,澳大利亚)中进行噪音暴露。应用校准的 Rion NL-40 声级计测定笼中的声音强度以确保声音强度的最小偏差。在暴露中,动物可自如取用食物和水。

[0176] 使用腺苷受体激动剂的耳蜗灌注以及听觉功能的评估

[0177] 作为噪音研究的基础以及为了确定选择性腺苷受体激动剂对耳蜗的一般效果,应用总和电位(SP;内毛细胞受体电位的测量)以及复合动作电位(CAP;神经传入功率的测量)首先在对照动物中确定听觉功能。实施该实验以确定正常耳蜗中腺苷受体激活的背景影响,作为噪音暴露的动物研究的平台。

[0178] 动物被麻醉(戊巴比妥钠;60mg/kg 腹膜内注射)并且被置于连接远程恒温控制单元(Harvard Apparatus, Holliston, 马萨诸塞, USA)的恒温调控毯上,以通过直肠热电偶控制器(Harvard Apparatus)保持稳定的体温(37.5°C)。将动物头部置于连接加热块温度控制器(Bio-Medical Engineering Services, 奥克兰大学, 新西兰)的加热的(表面温度 38°C)立体定位的头部支持物上。对动物进行人工通风并且应用腹外侧方法使听觉泡暴露。将灌注管插入邻近圆窗膜(RWM)处。应用 Harvard Apparatus Series PHD 22/2000 注射泵将含有 A₁ 或 A_{2A} 腺苷受体激动剂的测试溶液以 2.5ml/分钟灌流入 RWM。腺苷受体激动剂腺苷(10mM)、CCPA(1mM)、CGS-21680(200 μM),单独或与腺苷受体拮抗剂 SCH-58261(200 μM)组合灌流 90 分钟。从置于耳蜗圆窗内的银线电极上记录声音诱发的耳蜗对纯音刺激(4-28kHz)的响应(CAP 和 SP)。应用 Tucker-Davis 系统 II 测定对于出现的音刺激的这些应答,且通过 Grass P16 前置放大器测量电位捕获。

[0179] 听性脑干反应(ABR)

[0180] 应用听性脑干反应(ABR)测量噪音暴露的动物的听觉阈值,其代表来自听觉神经和脑干听觉核的声音诱发电位。在噪音暴露前至少 24 小时(基线)以及噪音暴露后 30 分钟(治疗前),记录 ABR 测量值。腺苷受体激动剂或载体对照继而递送至耳蜗圆窗(噪音后约 6 小时),然后在施用药物后 48 小时后(治疗后)重复 ABR 测量。ABR 的测量在声音衰减室(Shelburg Acoustics, 悉尼,澳大利亚)中进行。用氯胺酮(75mg/kg)和赛拉嗪(10mg/kg)麻醉大鼠,然后应用所述的加热垫使它们的体温保持在 38°C。通过将微型铂电极皮下置于感兴趣的耳朵的乳突区域(有源电极)、头顶(参考)和对侧耳朵的乳突区域(接地电极)来获得 ABR。以不同强度和阈值呈现的一系列听性短声或纯音(4-28kHz)产生反映不同水平听觉处理的电活动。通过逐步减轻声音强度至不再能观测到波形,以确定 ABR 复合物的声音阈值(I-IV 波)。产生对 ABR 的声刺激,并且应用由基于电脑的数字信号处理包和软件(BioSig, Alachua, FL, USA)控制的 Tucker-Davis Technologies 听觉生理工作站(Alachua, FL, USA)录制应答。以数字化产生的 5ms 短音(0.5ms 升降时间)在 4 至 28kHz 的频率下以半八度音阶诱发 ABR 电位。声压水平(SPL)以 5dB 的音阶从低于阈值水平的 10dB 升高至 90dB SPL。在各个声音水平(具有交替的刺激极性的 1024 次重复)将应答平均化,而且当峰-峰振幅超过 15 μV 时应答波形被弃用(人工弃用)。ABR 阈值被定义为应答在高于本底噪音时可被可视性检测的最低强度(至最近的 5dB)。在听力评估后对动物处以安乐死,并且收集耳蜗以对自由基损害进行免疫组织学评估。

[0181] 耳蜗内腺苷受体激动剂的施用

[0182] 在暴露于宽带噪音 (110dB SPL, 24 小时) 6 小时后, 将腺苷受体激动剂递送至左耳蜗的圆窗膜 (RWM), 而对侧耳作为非治疗的对照。用氯胺酮 (75mg/kg 腹膜内注射) 和赛拉嗪 (10mg/kg 腹膜内注射) 麻醉大鼠, 通过背侧途径打开听觉泡以进入中耳, 并且将耳蜗暴露于无菌条件下。简而言之, 切口位于羽片的中部和后部, 并且从听觉泡骨下面分离肌肉。应用解剖刀片在鼓泡的后部区域切开小裂口以暴露 RWM。RWM 在操作显微镜下显像, 并且将浸泡在 10 μ L 体积的在盐水中的测试药物 (腺苷, 10mM; CCPA, 1mM; CGS-21680, 200 μ M) 中的一片明胶海绵 (Gelfoam; Upjohn, Kalamazoo, MI) 置于直接与 RWM 接触的槽中。在对照试验中, 将无测试药物的盐溶液应用在 RWM 上。然后用骨接合剂封闭水泡, 缝合伤口并且允许动物恢复。在手术后 48 小时测量听性脑干反应。

[0183] 通过硝基酪氨酸的免疫组织化学的氧化应激的评估

[0184] 通过免疫组织化学对在暴露于噪音的耳蜗中硝基酪氨酸的形成进行评估。在 4% PFA 中过夜固定后, 噪音暴露的大鼠耳蜗和对照大鼠耳蜗在 5% EDTA 溶液中除钙 7 天并且在 30% 蔗糖 (在 0.1M PB 中) 溶液中过夜冷冻保护。然后耳蜗在 0.1M 磷酸缓冲液 (PB) 中冲洗, 在异戊烷中急冻并保存于 -80°C 。将冰冻切片 (20 μ m) 置于含有无菌的 0.1M 磷酸缓冲液盐水 (PBS, pH 7.4) 的 48 孔板 (Nalge Nunc Int, Naperville, USA) 中, 进行透化 (1% Triton-X, 1 小时) 和阻断非特异性的结合位点 (5% 正常山羊血清和 5% 牛血清蛋白)。通过与 0.3% H_2O_2 孵育猝灭内源性过氧化物酶活性。切片与 1 : 500 稀释的市售硝基酪氨酸抗体 (SA-468, BIOMOL, 普利茅斯 Meeting, PA, USA) 在 4°C 过夜孵化。在对照反应中, 略去一级抗体。应用二级生物素 - 结合的山羊抗兔 IgG 来检测免疫过氧化物酶反应, 接着应用卵白素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物 (ABC 试剂盒, Vector Laboratories) 和二氨基联苯 (DAB 试剂盒, Vector) 进行反应显影。应用具有 Nomarski 干涉差对比镜片 (differential interference contrast optic) (Zeiss Axioskop, Thornwood, NY, USA) 的显微镜观测免疫染色。数字图像通过数字照相机 (Zeiss AxioCam) 获得并且用 AxioVision 4.7 软件处理。应用相同的采集参数分析图像, 并且应用 ImageJ 软件 (v. 1.38x, NIH, USA) 对免疫标记进行半定量分析。将图像去重叠 (Colour Deconvolution 1.3plugin) 以从背景中分出 DAB 染色, 并且转化为 8-位图像。选择感兴趣的区域并且获得他们的免疫染色强度直方图并在灰度转化后表示为平均像素强度 [23]。以双盲形式, 在每个组中分析耳蜗中转的 15 至 32 个图像 (每组动物 $n = 4$)。

[0185] 统计分析

[0186] 结果以平均值 \pm S. E. M. 表示。应用单因素方差分析和 Tukey' s 多重比较测试进行统计分析 (不同频率的听力阈值和治疗的比较)。 α 水平设置为 $P = 0.05$ 。

[0187] 结果

[0188] 在噪音暴露之后, 腺苷和选择性 A_1 腺苷受体激动剂 CCPA 产生对耳蜗的保护

[0189] 在本节实验中, 大鼠暴露于 110dB SPL 下宽带噪音 24 小时, 并且在噪音暴露后 6 小时在 RWM 上应用单次剂量的腺苷受体激动剂进行治疗。应用针对听性短声和纯音的听性脑干反应 (ABR), 在治疗后 48 小时对听力阈值进行功能进行评估 (图 11)。噪音暴露后的 ABR 阈值从基线的提高 (治疗前) 在所有测试动物中是相似的。在向 RWM 施用腺苷和选择性 A_1 腺苷受体激动剂 CCPA 后四十八小时 (治疗后), 动物显示对短声和纯音的明显改善的 ABR

阈值（图 11(a)、(c) 和 (d)）。相比，在使用 CGS-21680 治疗的耳蜗或对照人工外淋巴 (AP) 溶液处理的耳蜗中，治疗后的阈值保持不变（图 11(b) 和 (e)）。不同组的阈值恢复显示于图 11(f) 中。用腺苷治疗的动物对短声显示 18dB 的阈值恢复，以及对纯音的高至 19dB 的阈值恢复（16kHz ; $p < 0.01$, 单因素方差分析法）。用 CCPA 治疗的动物对短声显示 20dB 的 ABR 阈值恢复，以及对纯音的高至 20dB 的阈值恢复（图 11(f)）。在用载体溶液治疗的对照动物中，存在小量的阈值恢复（1-7dB）。施用选择性 A_{2A} 受体激动剂 CGS-21680 不影响阈值恢复（图 11(f)）。

[0190] 腺苷受体激动剂的听觉阈值的基线测量

[0191] 在对照研究中，通过测量耳蜗灌注前（基线）、对照 AP 灌注后和腺苷受体激动剂灌注后的总和电位 (SP) 和复合动作电位 (CAP) 阈值，以耳蜗电图描记法对不同的选择性腺苷受体激动剂对基线耳蜗功能的普遍效果进行评估。在各组实验中，基线和 AP 灌注后的阈值是相当的（图 12）。腺苷 (10mM) 和选择性 A_1 腺苷受体激动剂 CCPA (1mM) 不影响 SP 阈值（图 12(a) 和 (b)），而选择性 A_{2A} 激动剂 CGS-21680 在 16kHz 下降低 SP 阈值 5dB（图 12(c)）（ $p < 0.01$, 采用 Tukey' s 多重比较测试的单因素方差分析）。该降低被 A_{2A} 受体拮抗剂 SCH-58261 抑制（图 12(d)）。CAP 阈值不被腺苷或任何的选择性腺苷受体激动剂改变（数据未显示）。总而言之，选择性腺苷受体激动剂对耳蜗的毛细胞或神经水平的影响非常有限。

[0192] 噪音暴露的耳蜗中的硝基酪氨酸免疫反应

[0193] 暴露于噪音的耳蜗中的硝基酪氨酸的形成被用作来自活性氮 / 氧物质的组织损害的标记物。最强的硝基酪氨酸免疫染色发现于内沟细胞和支持性汉森细胞中（图 13A）。硝基酪氨酸免疫反应也在其他上皮细胞内衬蜗管（柯蒂氏器中支持克劳迪乌斯细胞、戴特斯细胞和柱细胞）中观测到。在感觉毛细胞中仅观测到非常少的染色。螺旋韧带、血管纹和螺旋神经节神经元被染色（数据未显示）。在非噪音暴露的耳蜗中和当不存在一级抗体时，没有免疫标记（图 13A）。

[0194] 硝基酪氨酸免疫染色的分布在所有噪音暴露的耳蜗中相似。在腺苷和 CCPA 治疗的耳蜗中的免疫标记的强度比载体处理的对照低（图 13A、B）。与 AP 对照相比，在腺苷治疗的耳蜗中的平均像素强度降低 30-42%，尤其是在海森细胞和内沟细胞（ $p < 0.01$, 单因素方差分析）中。相似地，硝基酪氨酸免疫染色的强度在 CCPA 治疗的耳蜗中降低 22-45%，尤其是在戴特斯细胞和内沟细胞中（ $p < 0.01$, 单因素方差分析）。

[0195] 结论

[0196] 这些例子显示对 A_1 腺苷受体的刺激减轻噪音诱导的耳蜗损伤。

[0197] 噪音暴露后 A_1 腺苷受体激动剂的治疗导致听觉阈值的显著恢复。相比较于开始于噪音暴露后 24 小时的晚期处理，开始于噪音暴露后 6 小时的早期治疗提供更好的恢复。长时间的治疗（5 次注射）提供最佳的听力阈值的恢复，并且在临床环境中作为治疗性方法被推荐。

[0198] 这些例子也显示 A_1 腺苷受体激动剂的全身性施用，诸如实验 1 和 2 中的 ADAC，导致显著的听觉阈值的恢复。进一步的，这些例子显示将 A_1 腺苷受体激动剂（例如，腺苷（非选择性腺苷受体激动剂）和 CCPA（选择性 A_1 腺苷受体激动剂））局部施用至圆窗膜上改善听觉阈值并且降低柯蒂氏器中的细胞损伤。

[0199] 施用 A₁ 腺苷受体激动剂 -ADAC, 提高感觉毛细胞的存活率。耳蜗中降低的毛细胞损害和硝基酪氨酸活性强烈地支持 :A₁ 腺苷受体激动剂在噪音诱导的耳蜗损伤后具有细胞保护和抗氧化作用。

[0200] 硝基酪氨酸免疫化学 (NT) 用于分析耳蜗中的氧化应激。NT 经常被用作耳蜗中自由基损害的指标 [20, 21]。NT 免疫染色的总强度在 ADAC 治疗的耳蜗中降低至背景水平, 这暗示 ADAC 的强的抗氧化活性。应用于 RWM 上的腺苷也降低了 NT 免疫染色的强度。

[0201] ADAC 治疗未显示全身性毒性的迹象, 诸如体重降低或进食或饮水习惯的变化或体温过低。

[0202] 之前的研究已经显示作用于腺苷受体的药物在预防上有效, 因为它们可以预防由噪音或耳毒性药物诱导的耳蜗损伤。本研究的实验结果表明腺苷受体激动剂对噪音诱导的听觉缺失具有治疗效果。A₁ 受体关键性地地位于内毛细胞和螺旋神经节神经元上, 并且这些细胞的存活对从噪音压力中耳蜗的恢复是关键性的。

[0203] 目前的实验证据表明 A₁ 腺苷受体的激活降低耳蜗中感音神经性组织的损害, 从而导致听觉阈值的功能性恢复。目前的实验证据也表明施用可为全身性或局部的。

[0204] 这些实验例子强烈表明诸如腺苷、ADAC 和 CCPA 的 A₁ 腺苷受体激动剂将成为对体内噪音诱导内耳损伤的有价值的药理学治疗, 至少在不超过约 110dB 声压水平下 2-24 小时是这样的。基于实验例子, 本发明人也相信 A₁ 腺苷受体激动剂也可用于暴露于短时噪音或冲击噪音的情形中以及暴露于长时间的过度噪音的情形中。治疗可以在声损伤后尽量早开始, 并且疗程应该至少连续 5 天应用优选施用途径中的一种途径。对于需要噪音诱导的听觉缺失的治疗的患者的益处是重要的。考虑到这些益处的重要性, 通过应用 A₁ 腺苷受体激动剂可以提供给患者这些治疗益处是令人惊奇的。

[0205] 上文描述了包括其优选形式的本发明。如本领域普通技术人员可以理解的, 其变型和改变也意图包含在本发明公开的范围之内。

[0206] 当在说明书中提到任何现有技术时, 不意图也不应该理解为表明该现有技术是任何特定国家中的公知常识中的一部分。

[0207] 引用文献

[0208] 1. Corwin JT (1998) Identifying the genes of hearing, deafness and disequilibrium. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 12080-12082。

[0209] 2. Kopke R, Allen KA, Henderson D, Hoffer M, Frenz D, Van de Water T. (1999) A radical demise. Toxins and trauma share common pathways in hair cell death. Ann. N. Y. Acad. Sci. 884 :171-191。

[0210] 3. Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH. (2006) The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. Ear Hear. 27(1) :1-19。

[0211] 4. Vljakovic SM, Abi S, Wang CJ, Housley GD, Thorne PR. (2007) Differential distribution of adenosine receptors in rat cochlea. Cell Tissue Res. 328(3) : 461-471。

[0212] 5. Ramkumar V, Whitworth CA, Pingle SC, Hughes LF, Rybak LP. (2004) Noise induces A1 adenosine receptor expression in the chinchilla cochlea. Hear. Res. 188(1-2) :47-56。

- [0213] 6. Hu BH, Zheng XY, McFadden SL, Kopke RD, Henderson D. (1997) R-phenylisopropyladenosine attenuates noise-induced hearing loss in the chinchilla. *Hear. Res.* 113(1-2) :198-206。
- [0214] 7. Hight NG, McFadden SL, Henderson D, Burkard RF, Nicotera T. (2003) Noise-induced hearing loss in chinchillas pre-treated with glutathione monoethylester and R-PIA. *Hear. Res.* 179(1-2) :21-32。
- [0215] 8. LePrell CG, Yamashita D, Minami SB, Yamasoba T, Miller JM. (2007) Mechanisms of noise-induced hearing loss indicate multiple methods of prevention. *Hear. Res.* 226 :22-43。
- [0216] 9. US Patent 6177434 :Prevention or reversal of sensorineural hearing loss (SNHL) through biologic mechanisms。
- [0217] 10. Richardson RT, Noushi F, O'Leary S (2006) Inner ear therapy for neural preservation. *Audiol. Neuro-Otol.* 11 :343-356。
- [0218] 11. Fredholm BB (2007) Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 14(7) :1315-1323。
- [0219] 12. Von Lubitz DKJE, Lin RC-S, Paul IA, Beenhakker M, Boyd M, Bischofberger N, Jacobson KA (1996) Postischemic administration of adenosine amine congener (ADAC) :analysis of recovery in gerbils. *Eur. J. Pharmacol.* 316 :171-179。
- [0220] 13. Von Lubitz DKJE, Lin RC-S, Bischofberger N, Beenhakker M, Boyd M, Lipartowska R, Jacobson KA (1999) Protection against ischemic damage by adenosine amine congener, a potent and selective adenosine A1 receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 369, 313-317。
- [0221] 14. Blum D, Gall D, Galas M-C, D'alcantara P, Bantunbungu K, Schiffmann SN. (2002) The adenosine A1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 22 :9122-9133。
- [0222] 15. Jacobson KA, Gao ZG. (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 5(3) :247-264。
- [0223] 16. Jacobson KA, Daly JW (1991) Purine functionalized congeners as molecular probes for adenosine receptors. *Nucleosides & Nucleotides* 10 :1029-1038。
- [0224] 17. WO/1997/037667 :Use of an A1 adenosine receptor agonist to treat cerebral ischaemia。
- [0225] 18. Yamashita D, Jiang HY, Schacht J, Miller JM (2004) Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res.* 1019(1-2) :201-209。
- [0226] 19. Knutsen LJ, Lau J, Petersen H, Thomsen C, Weis JU, Shalmi M, Judge ME, Hansen AJ, Sheardown MJ. (1999) N-substituted adenosines as novel neuroprotective A(1) agonists with diminished hypotensive effects. *J Med Chem.* 42(18) :3463-77。
- [0227] 20. Yamashita D, Jiang HY, Le Prell C.G., Schacht J, Miller JM (2005)

Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. *Neurosci.*, 134(2), 663-642.

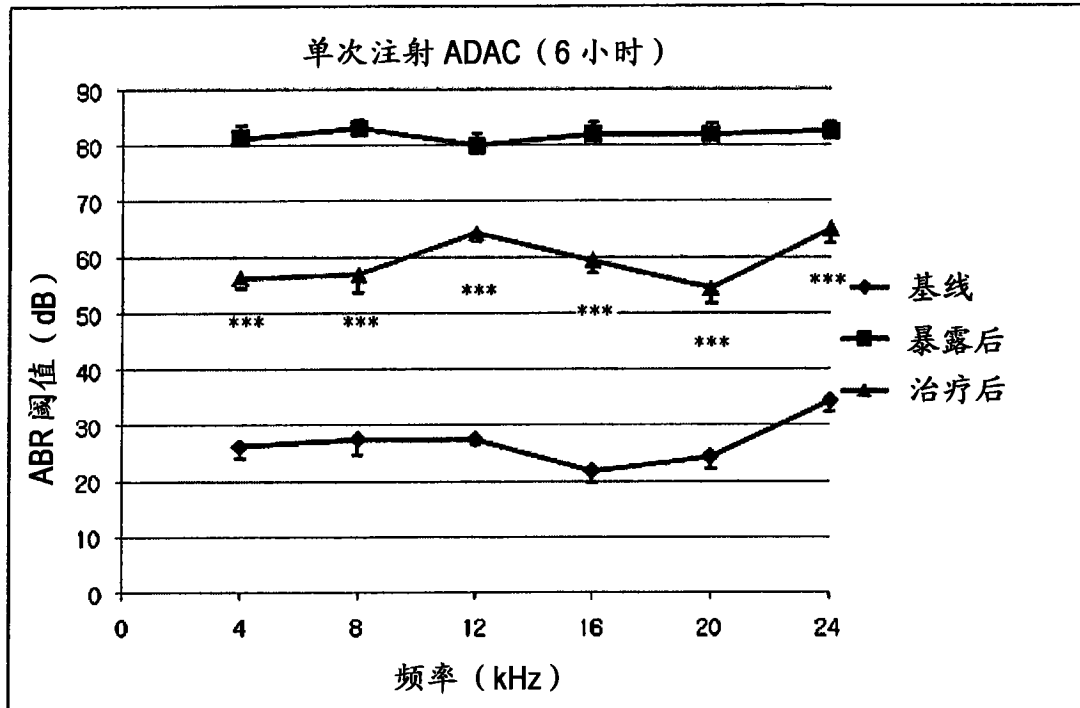
[0228] 21. Jiang H, Talaska A. E., Schacht J, Sha S. H. (2007) Oxidative imbalance in the aging inner ear, *Neurobiol. Aging*, 28(1), 1605-1612.

[0229] 22. Livak KJ and Schmittgen TD (2001), Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25(4) :402-408.

[0230] 23. Vljakovic SM, Housley GD, Munoz DJ, Robson SC, Sevigny J, Wang CJ and Thorne PR, 2004. Noise exposure induces up-regulation of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea, *Neuroscience* 126, 763.

[0231] 24. Jacobsen K. A. and Zhan-Guo, Adenosine receptors as therapeutic targets, *Nature*, March 2006, 250.

(a)



(b)

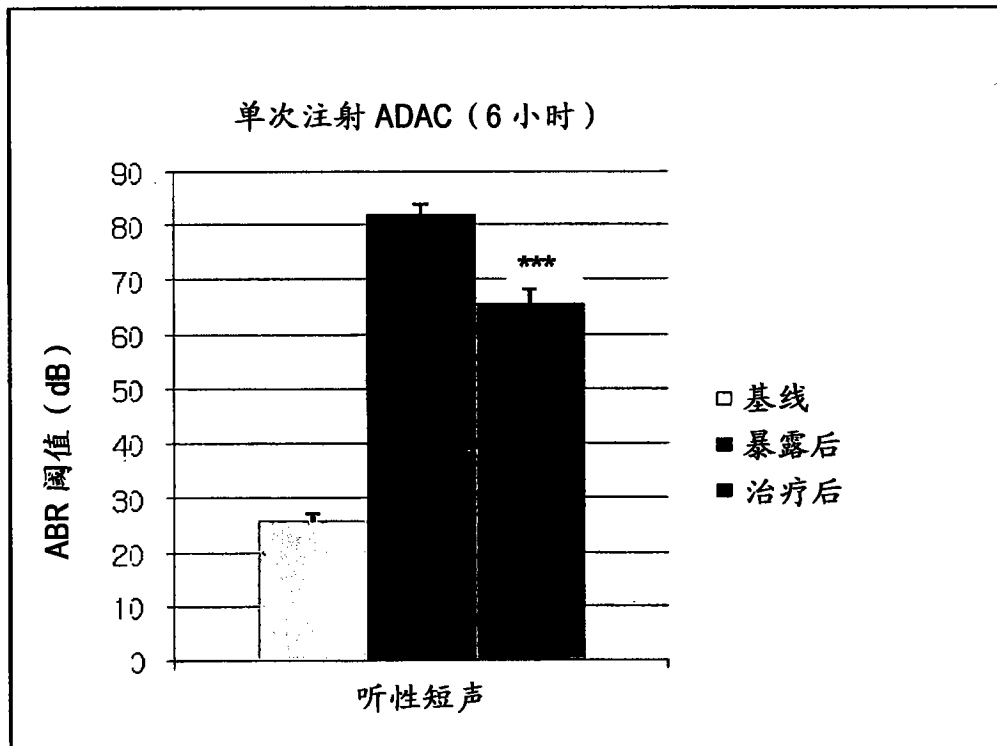
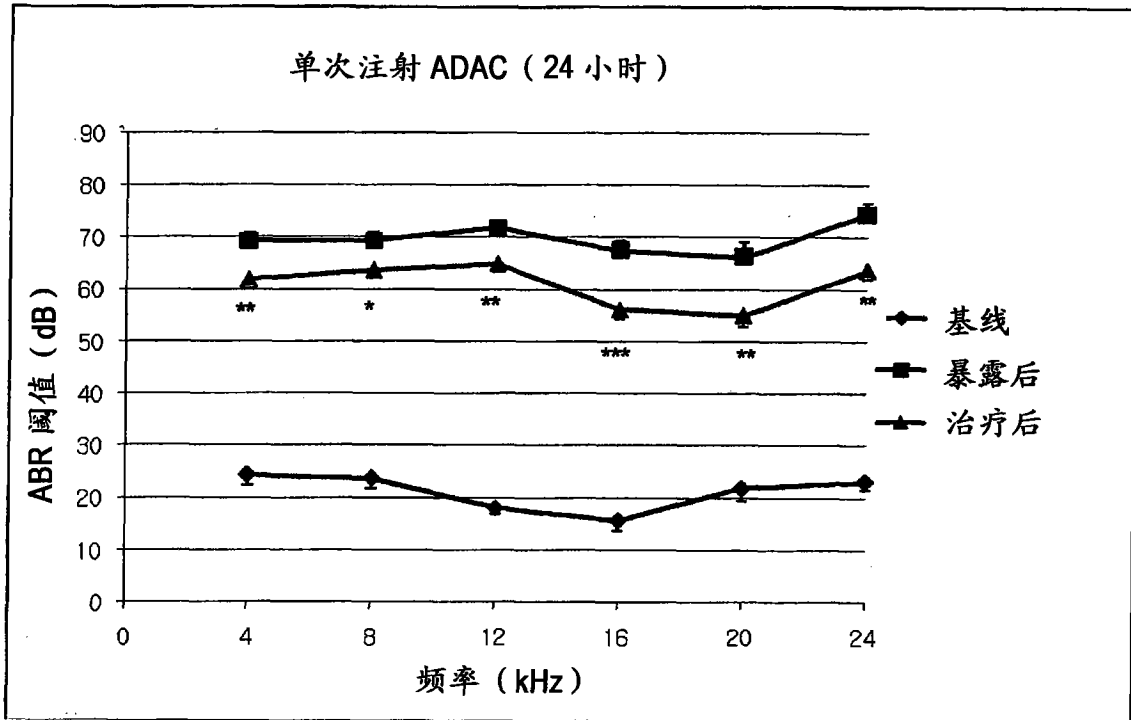


图 1(a) 和 (b)

(c)



(d)

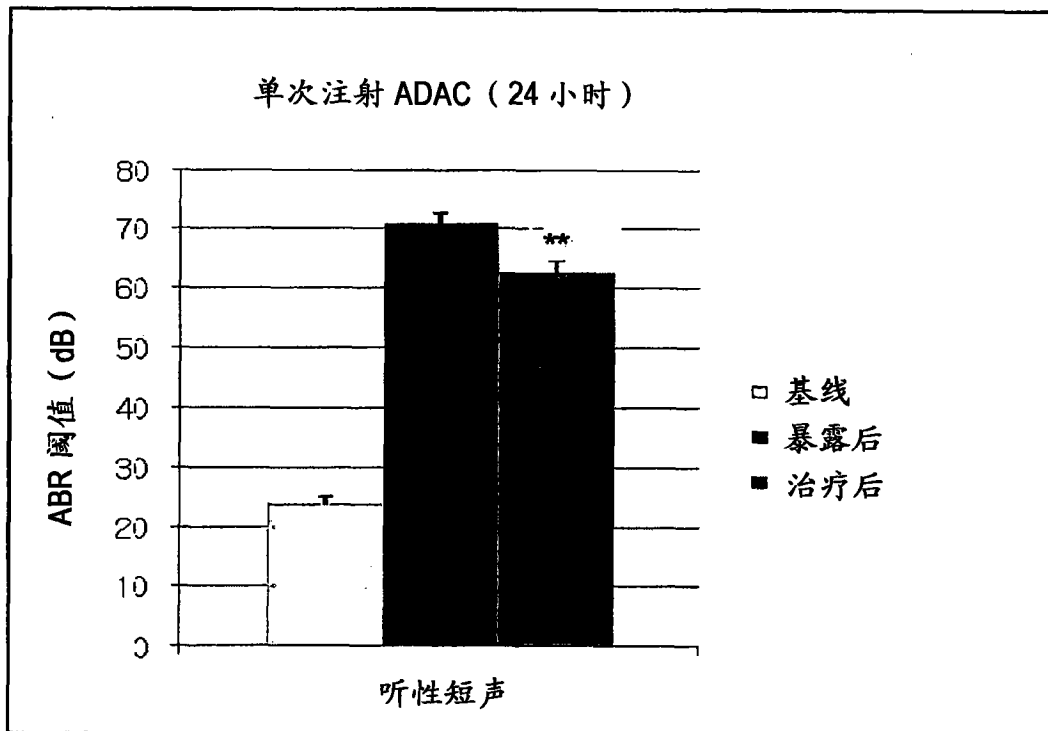
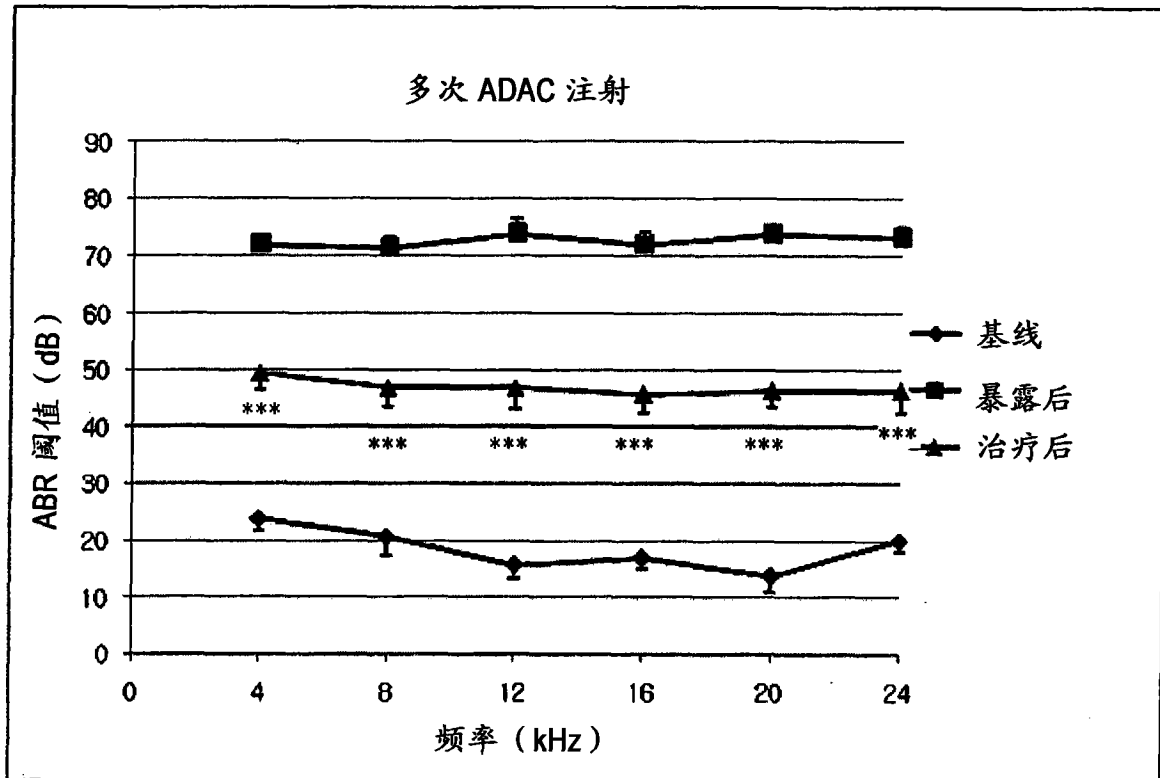


图 1(c) 和 (d)

(e)



(f)

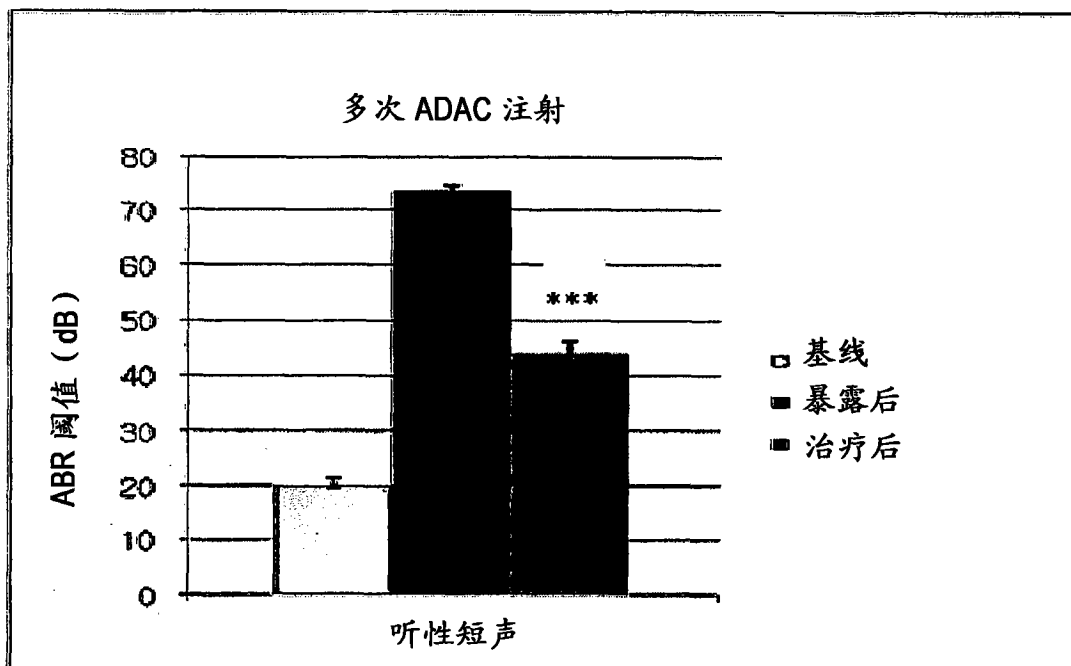
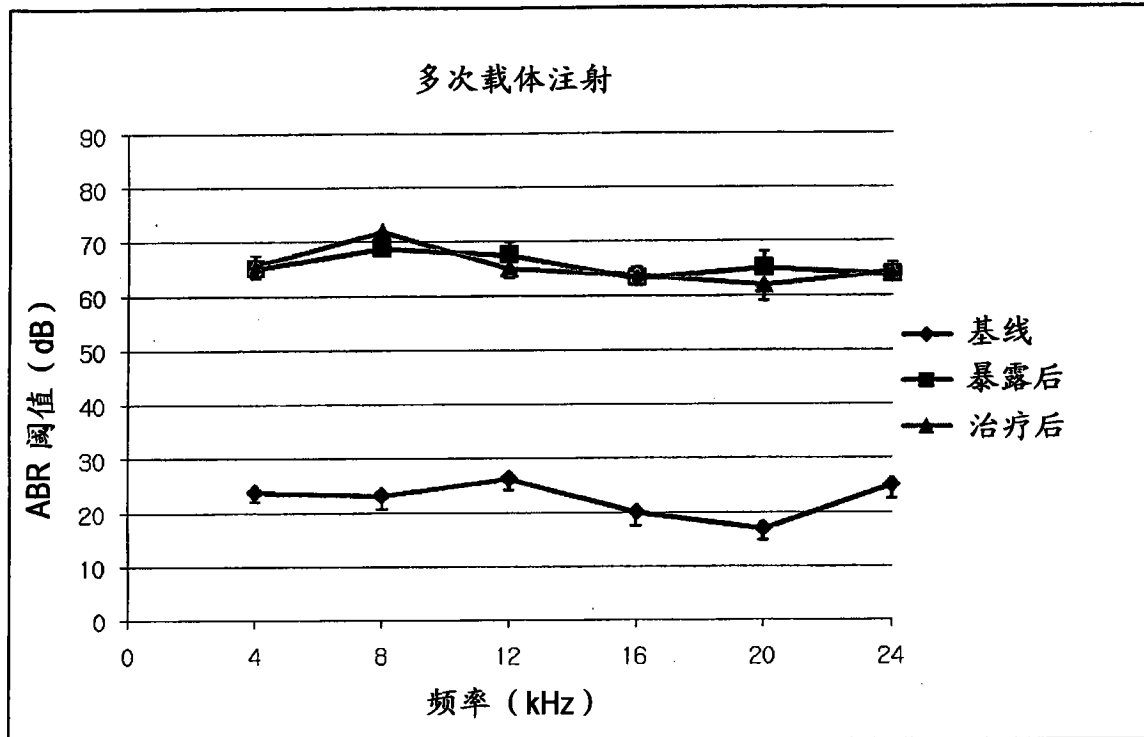


图 1(e) 和 (f)

(g)



(h)

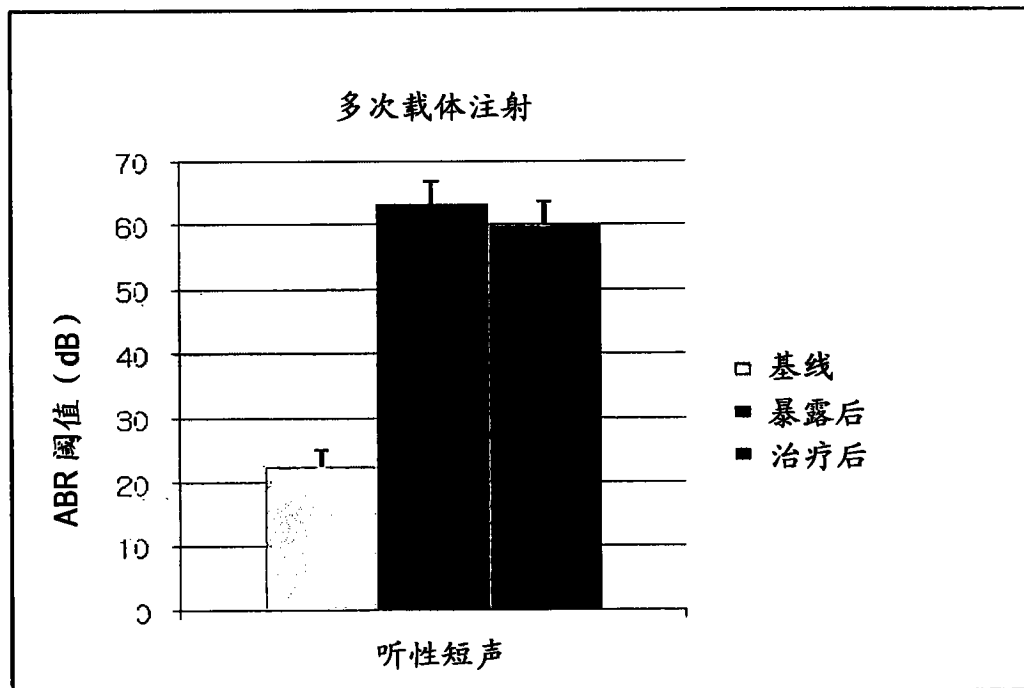


图 1(g) 和 (h)

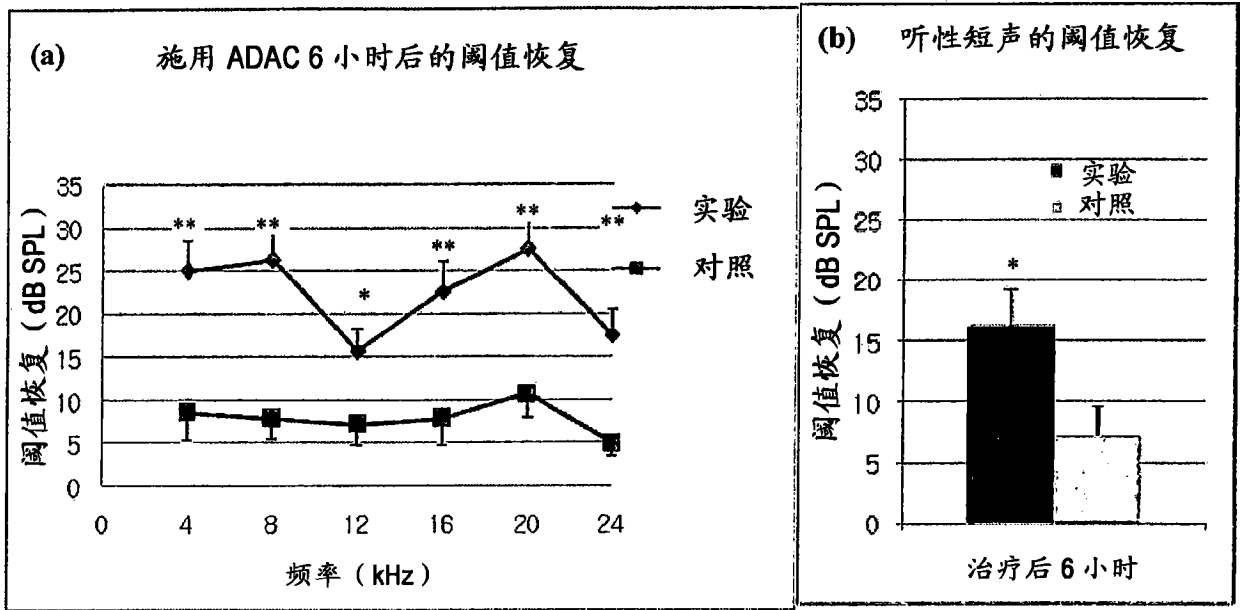


图 2(a) 和 (b)

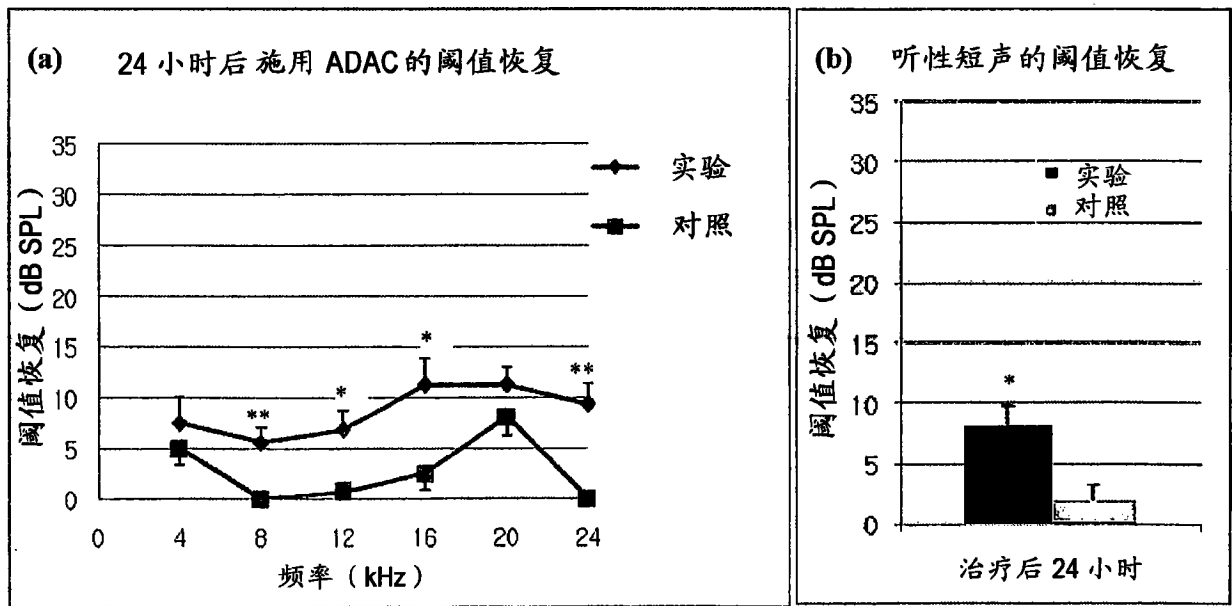


图 3(a) 和 (b)

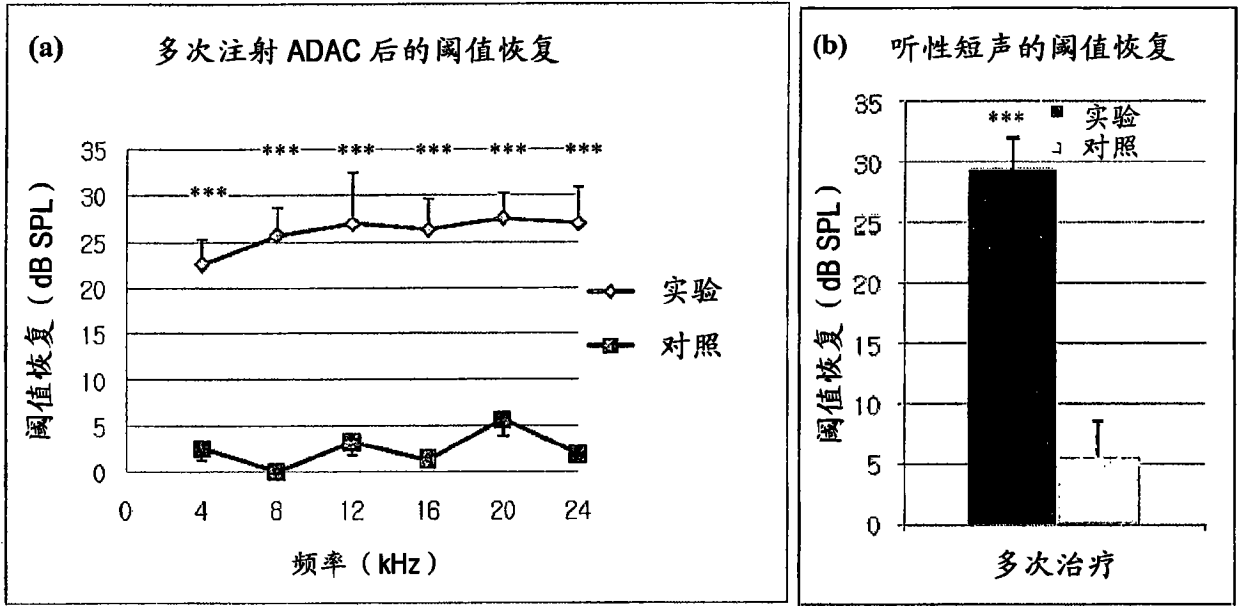


图 4(a) 和 (b)

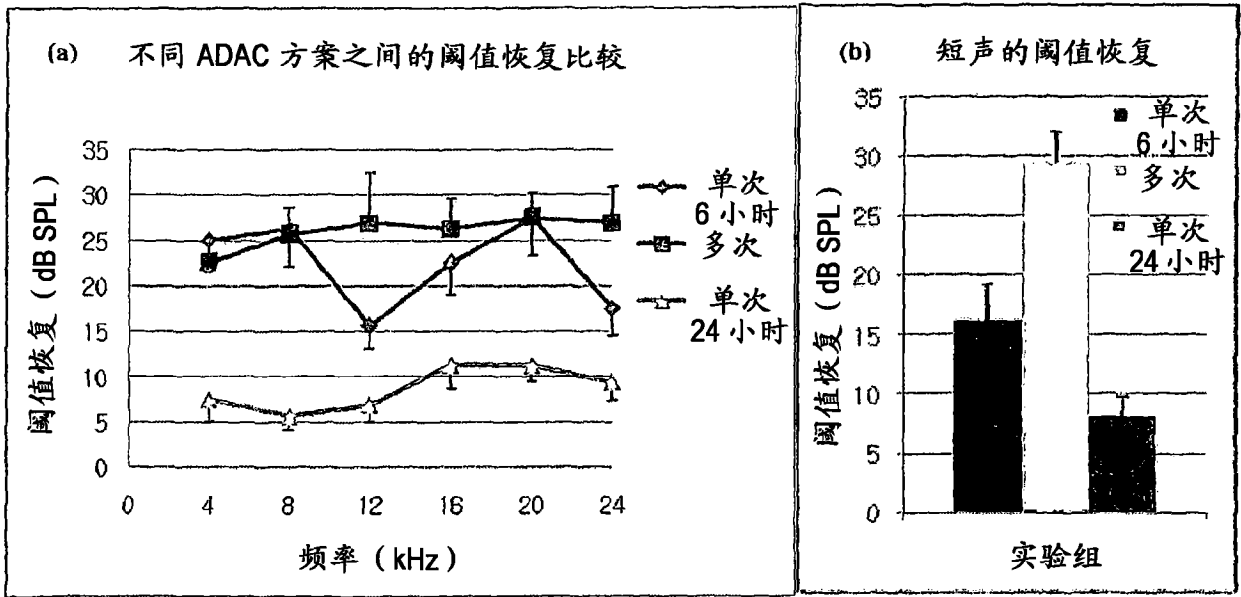


图 5(a) 和 (b)

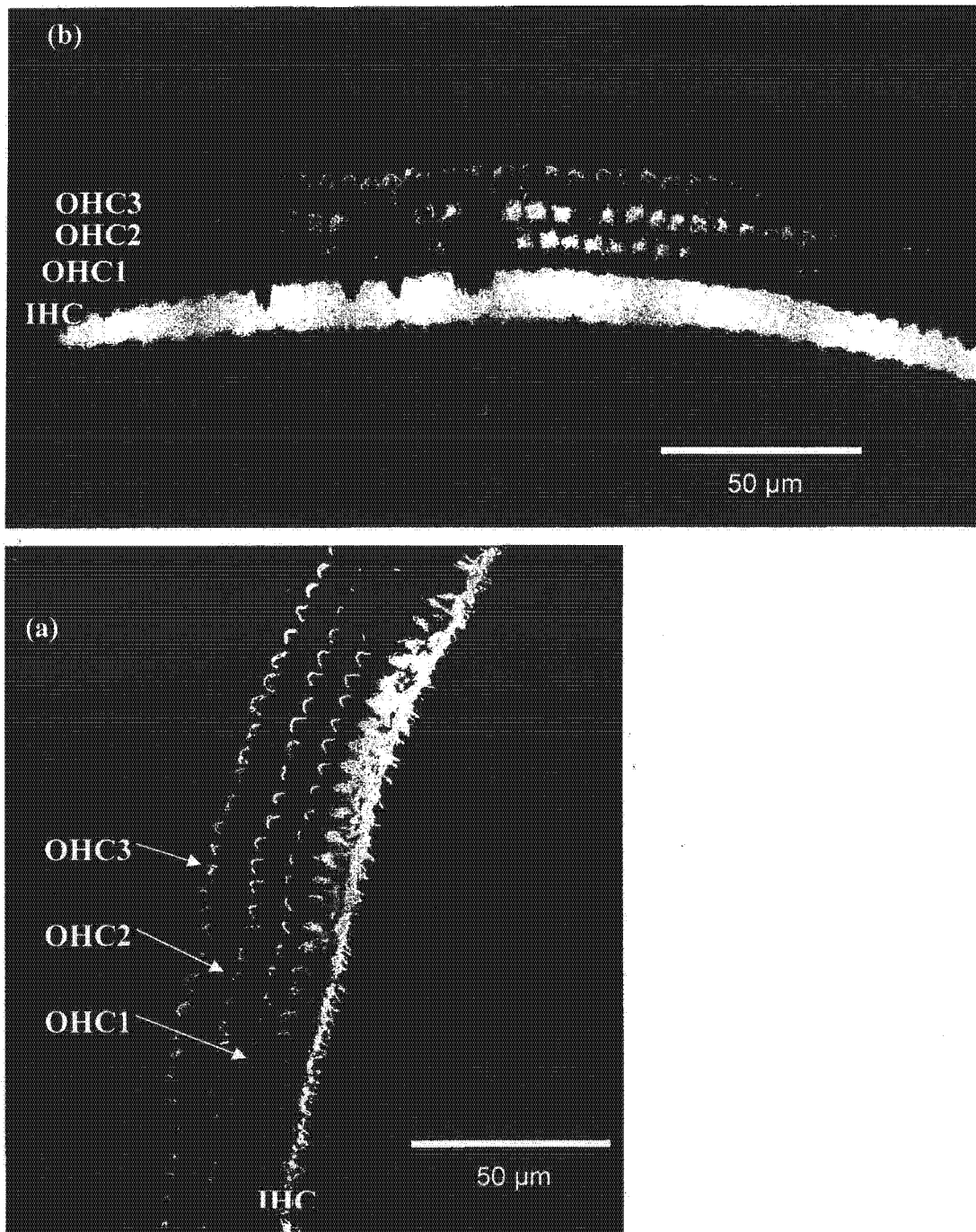


图 6(a) 和 (b)

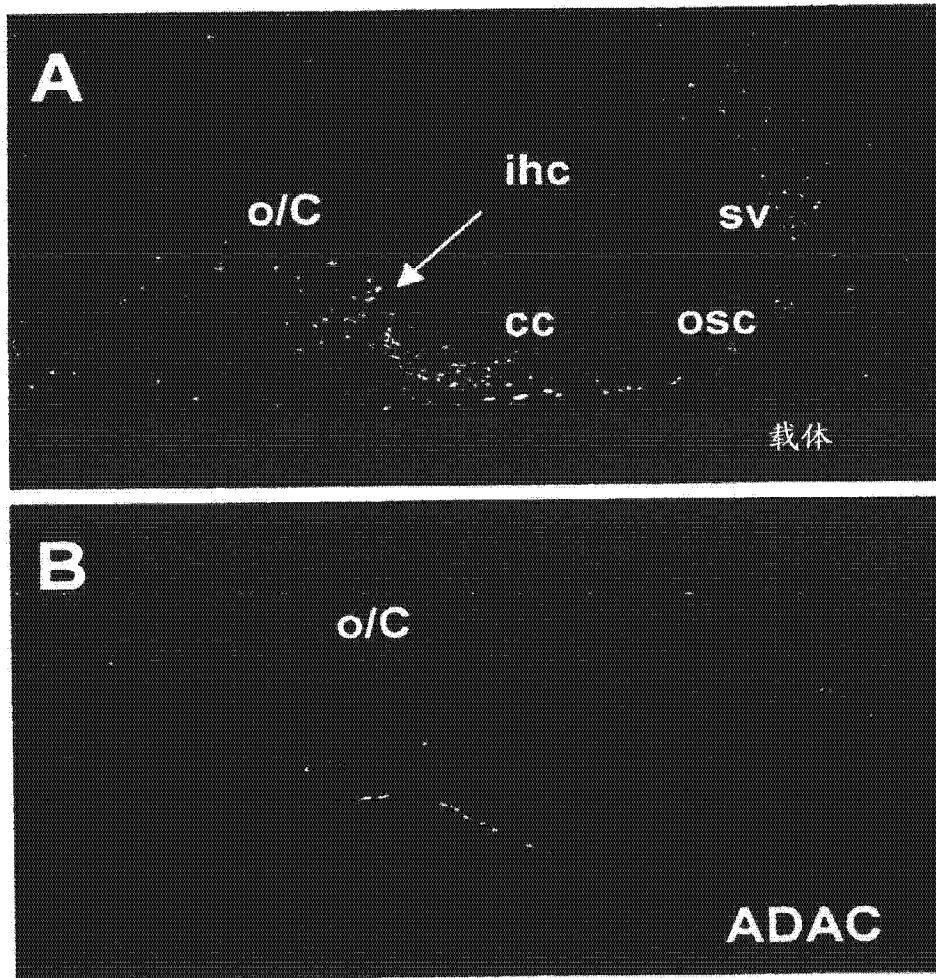
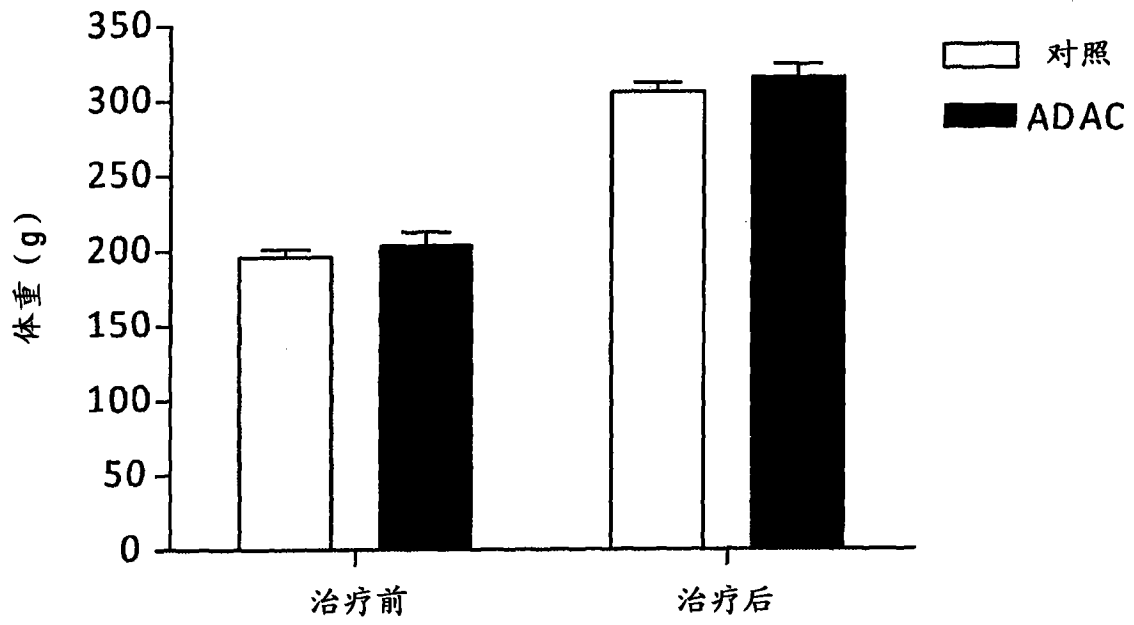


图 7(a) 和 (b)

A



B

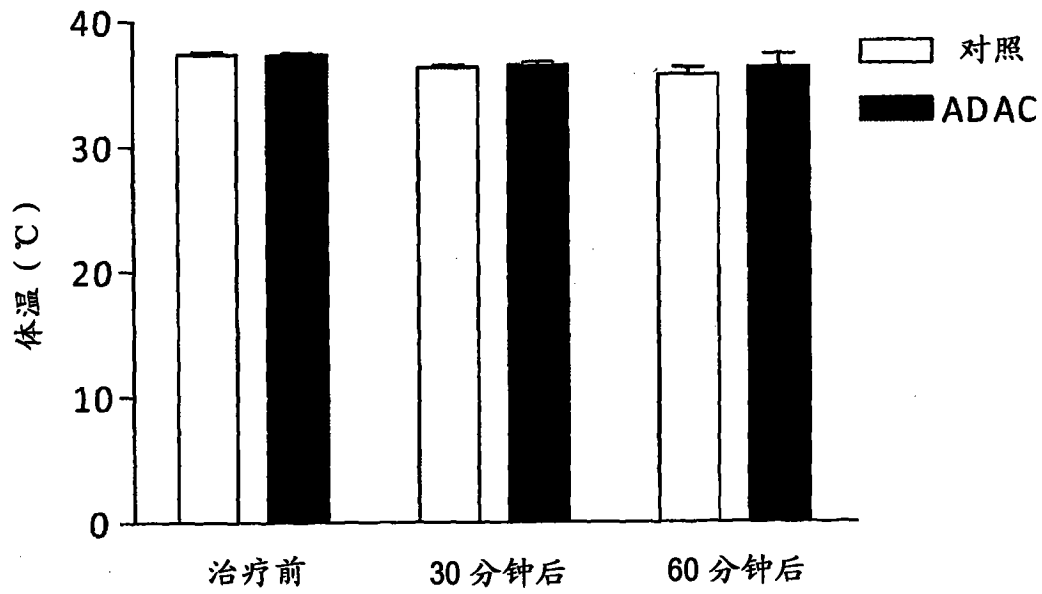


图 8(a) 和 (b)

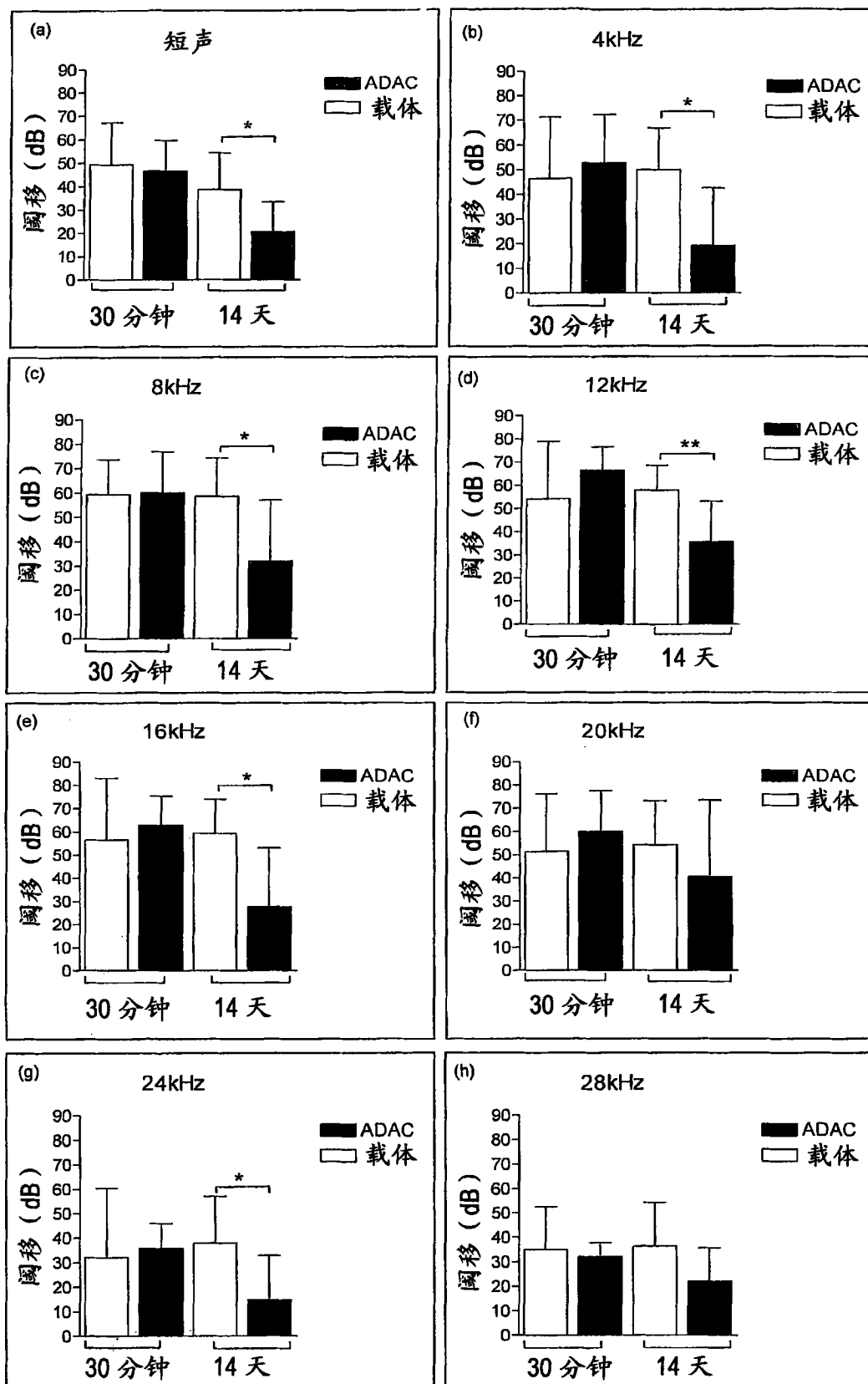


图 9(a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) 和 (h)

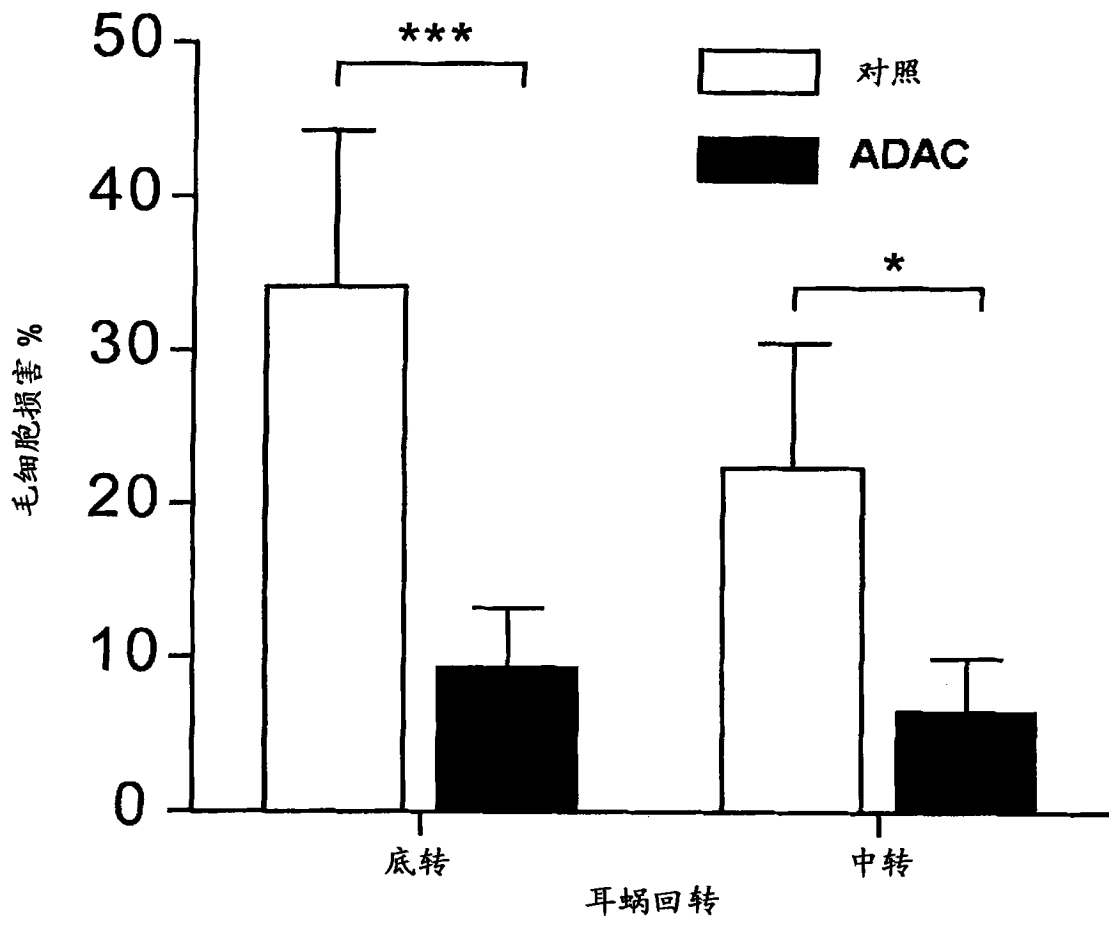


图 10

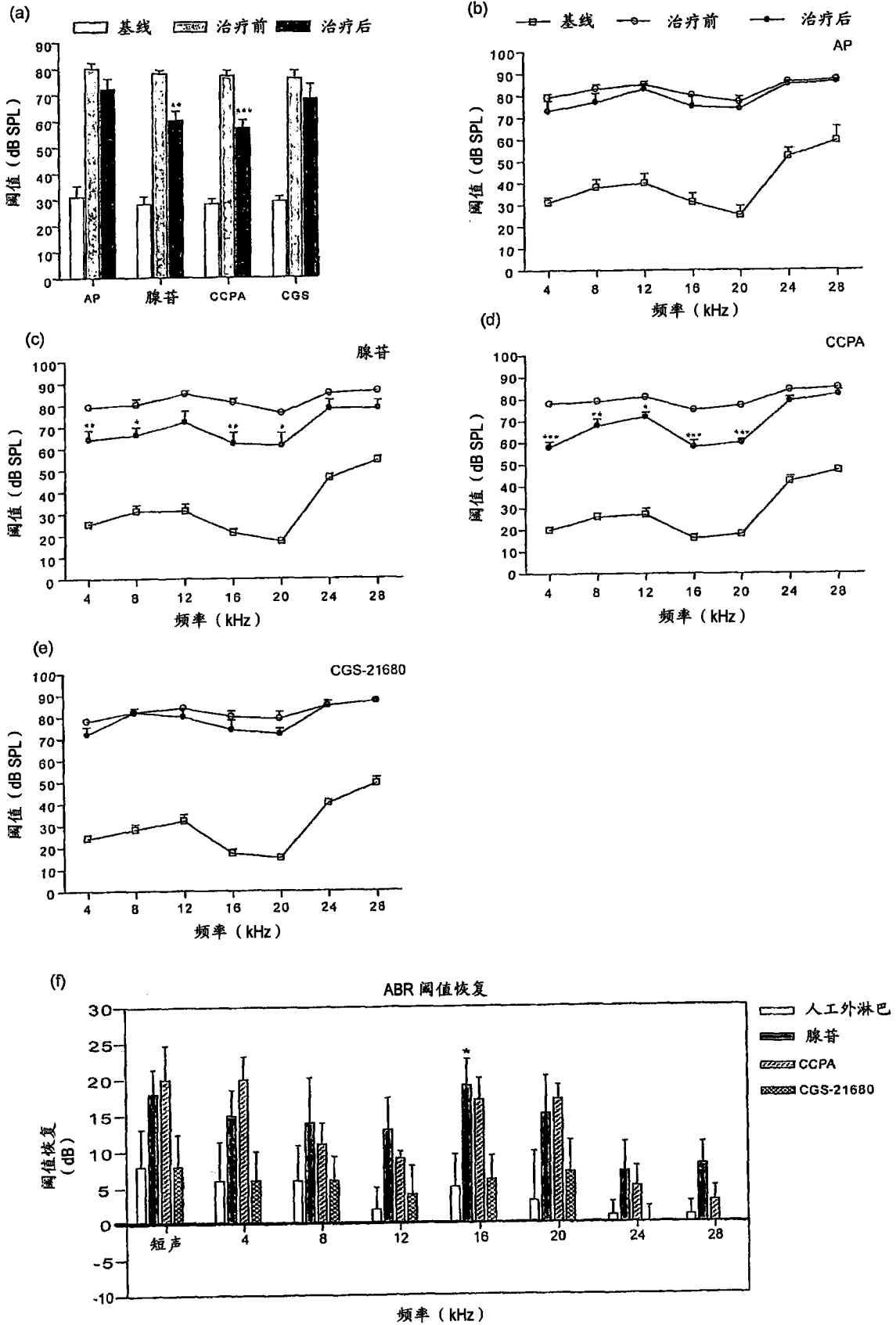


图 11(a), (b), (c), (d), (e) 和 (f)

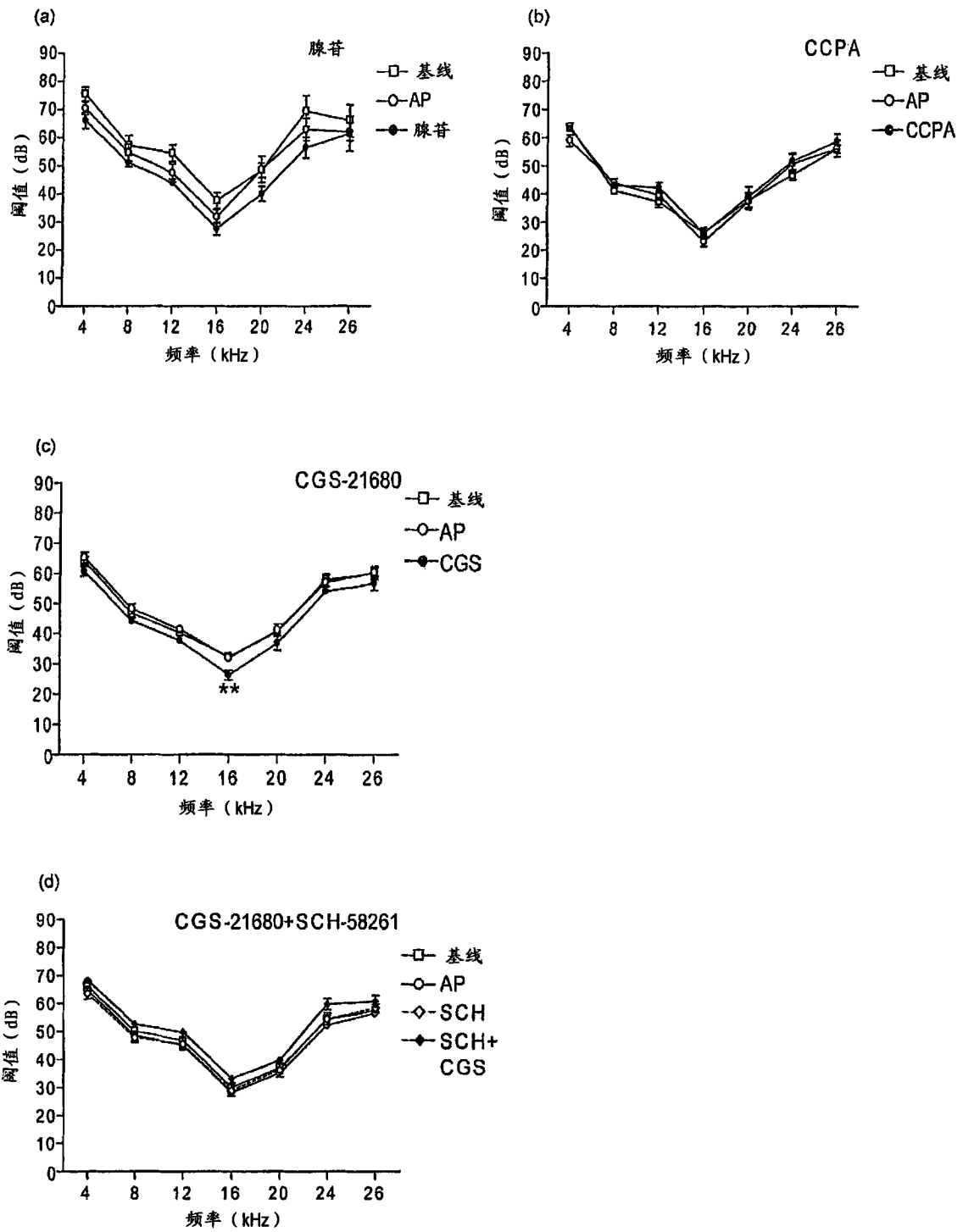
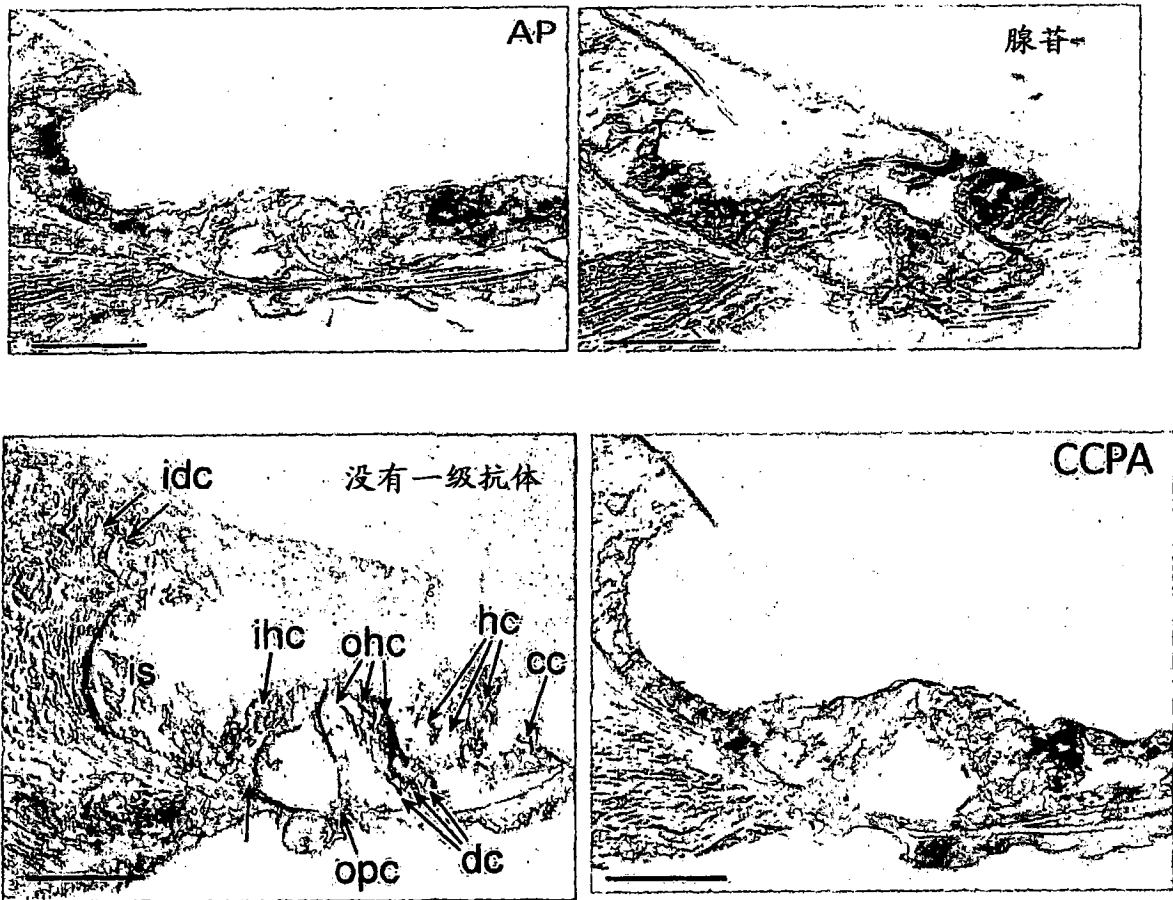


图 12(a), (b), (c) 和 (d)

A



B

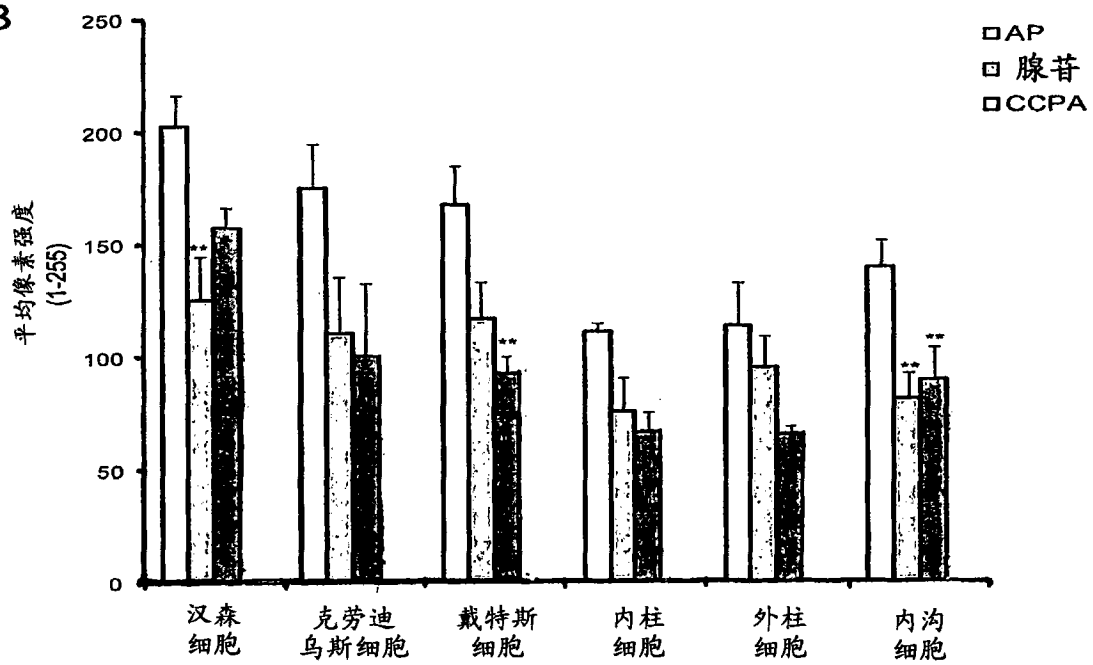


图 13(a) 和 (b)