

基于计算方法发现 β_2 -肾上腺素受体短效激动剂

张思尧^{1,2}, 吴晨阳^{1,2}, Horst Vogel^{1,3,4*}, 袁曙光^{5*}

¹ (中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055)

² (中国科学院大学, 北京 100049)

³ (深圳理工大学药学院, 深圳 518055)

⁴ (洛桑联邦理工学院化学科学与工程研究所, 瑞士 1015)

⁵ (AlphaMol 科技有限公司, 深圳 518055)

摘要: G 蛋白偶联受体是一类至关重要的膜蛋白超家族, 在细胞信号转导中发挥核心作用, 同时也是现代药物开发的主要靶点。 β_2 -肾上腺素受体作为 A 类 G 蛋白偶联受体的代表性成员, 是呼吸系统疾病治疗的关键靶点。尽管临床上已应用多种 β_2 -肾上腺素受体激动剂, 但在药物安全性、有效性和受体选择性方面的优化仍存在显著需求。研究使用虚拟筛选策略, 从 1900 万分子的大型化合物库中高效地筛选出 β_2 -肾上腺素受体靶向激动剂。通过严格的细胞功能实验和体内药代动力学评估, 获得一种新型短效激动剂, 其 EC_{50} 值为 0.86 nM, 为开发新一代呼吸系统疾病治疗药物提供了新的候选分子。

关键词: 虚拟筛选; G 蛋白偶联受体; β_2 -肾上腺素受体; 药物发现

中图分类号: R914.2 doi: [10.12146/j.issn.2095-3135.20250317001](https://doi.org/10.12146/j.issn.2095-3135.20250317001)

来稿日期: 2025-03-17 修回日期: 2025-03-28

基金项目: 无

作者简介: 张思尧, 硕士, 研究方向为计算机辅助药物设计; 吴晨阳, 博士, 研究方向为化学生物学; Horst Vogel (通讯作者), 研究员, 研究方向为细胞膜结构与功能和生物技术创新, E-mail: horst.vogel@epfl.ch; 袁曙光 (通讯作者), 研究员, 研究方向为利用计算生物学和人工智能的方法研究 G 蛋白偶联受体的激活机理与药物设计, E-mail: shuguangyuan@cadd2drug.org。

Discovery of short-acting β_2 -adrenergic receptor agonists based on computational methods

ZHANG Siyao^{1,2}, WU Chenyang^{1,2}, Horst Vogel^{1,3,4*}, YUAN Shuguang^{5*}

¹ (Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

² (University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

³ (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Shenzhen University of Advanced Technology, Shenzhen 518055, China)

⁴ (Institute of Chemical Sciences and Engineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne 1015, Switzerland)

⁵ (AlphaMol Science Ltd, Shenzhen 518055, China)

*Corresponding Authors: horst.vogel@epfl.ch; shuguang.yuan@cadd2drug.org

Abstract: G protein-coupled receptors (GPCRs) constitute a crucial superfamily of membrane proteins that play a pivotal role in cellular signal transduction and serve as primary targets in contemporary drug development. The β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR), a representative member of class A GPCRs, is a critical target in the therapeutic management of respiratory diseases. Despite the availability of several β_2 AR agonists in clinical practice, there remains a substantial need for optimization concerning drug safety, efficacy, and receptor selectivity. In this study, a virtual screening approach was utilized to effectively identify β_2 AR agonists from a compound library comprising 19 million molecules. Through comprehensive cellular assays and in vivo pharmacokinetic evaluations, a novel short-acting agonist with an EC₅₀ value of 0.86 nM was discovered, presenting a promising candidate for the development of next-generation treatments for respiratory diseases.

Key words: virtual screening, G protein-coupled receptor, β_2 -adrenergic receptor, drug discovery

1 引言

G 蛋白偶联受体 (G Protein Coupled Receptor, GPCR) 是人类膜蛋白的主要家族, 包含 830 多个成员^[1], 能够感知多种细胞外信号 (如激素、神经递质、光子等), 并将其转化为细胞内信号, 从而调控多种生理过程, 从感官感知到代谢调控, 几乎涵盖了所有生理系统。所有 GPCR 都由 7 个跨膜螺旋组成, 形成一个高度保守的结构框架, 是 GPCR 家族的标志性特征。迄今为止, 已有 175 个 GPCR 被确定为治疗靶点, 约 970 种药物作用于这些靶点, 占有上市药物的三分之一, 覆盖约 400 种不同的疾病适应症, 凸显了 GPCR 在治疗开发中的重要性^[2]。 β_2 -肾上腺素受体 (β_2 -adrenergic receptor, β_2 AR) 是 GPCR A 类超家族的重要成员, 因其在哮喘和慢性阻塞性肺病治疗中的核心地位而备受关注。自 2007 年 β_2 AR 晶体结构被解析以来, 基于结构的药物设计为该靶点的药物开发提供了重要依据^[3]。然而, 现有 β_2 AR 激动剂仍面临受体脱敏、耐受性及个体化治疗差异等局限性^[4-6], 这些问题的解决对提高药物疗效和安全性具有重要意义。

β_2 AR 激动剂可分为短效激动剂、长效激动剂和超长效激动剂。短效激动剂持续时间较短 (约 3~6 小时), 因其起效快, 在临床上主要用于缓解支气管哮喘的发作, 但长期使用可能导致药效减弱并增加病情恶化风险^[7]。近年来, β_2 AR 激动剂的研究取得显著进展。从传统药物如 salbutamol 到新型光控激动剂, 研究者不断探索提高药物选择性和减少副作用的新策略^[8,9]。同时, 结构生物学技术的突破, 特别是冷冻电镜和 X 射线晶体学的应用, 为理解 β_2 AR 的激活机制和药物设计提供了新的视角^[10-12]。然而, β_2 AR 的构象动态性和膜结合特性

仍为药物设计带来挑战。随着计算生物学的发展,高通量虚拟筛选方法为 β_2 AR 激动剂的开发提供了新的途径。这些技术不仅能够快速筛选大型化合物库,还能预测化合物的生物活性,为克服现有药物的局限性提供了可能。本研究基于现有短效激动剂的分子结构,利用计算模拟方法从 1900 万个分子中筛选出 6 个具有短效激动剂潜力的候选分子。随后,通过细胞功能实验进行验证,最终鉴定出一种具有新化学结构的强效激动剂,其 EC_{50} 值为 0.86 nM。最后,通过药物代谢动力学 (Pharmacokinetics, PK) 实验确认该分子属于短效激动剂,期望为呼吸系统疾病的治疗提供一种更安全、更有效的药物选择。

2 材料与amp;方法

2.1 蛋白质结构准备

β_2 AR 的晶体结构 (PDB ID: 4LDE) 从 RCSB Protein Data Bank 获取^[13], 是处于激活状态的结构, 这为激动剂的筛选提供了有力支持。基于这一结构, 我们可以在激活状态下进行结构导向的药物筛选, 确保筛选出的化合物能够激活受体。与此不同, 抑制剂的筛选通常使用的是 β_2 AR 的非激活或基态结构。根据人源 β_2 AR 完整序列, 使用 MODELLER^[14] 软件补全缺失的结构区域, 并将所有突变的氨基酸恢复为其原始形式。

2.2 虚拟筛选

2.2.1 相似性搜索

基于上市短效激动剂的分子结构, 使用 DataWarrior^[15]对 TargetMol 筛选化合物数据库中约 1900 万个分子进行相似性搜索(基于分子指纹和 Tanimoto 系数)。选择了 hexoprenaline、fenoterol 和 procaterol 这三种分子作为短效激动剂的代表, 由于这三种分子化学结构差异较大, 能够有效地探索更广泛的化学空间。相似性搜索的阈值设定为 70%以上, 这不仅能够保留与短效激动剂的相似性, 还能在一定程度上保持化合物的多样性。分子初步筛选采用 Lipinski 五项法则^[16], 该法则规定了以下标准: 分子量 ≤ 500 道尔顿、分配系数 ≤ 5 、氢键供体数 ≤ 5 、氢键受体数 ≤ 10 , 违反这些标准中不超过两项的化合物被保留。

2.2.2 分子对接

本研究采用 Schrödinger 软件 (版本 2022v4)^[17]进行分子对接, 具体流程如下:

首先, 使用 LigPrep 模块对小分子进行预处理, 包括优化分子结构、生成不同的电离状态和互变异构体, 其余参数默认, 并输出处理后的分子文件。

随后, 采用 Protein Preparation Wizard 模块优化受体蛋白结构, 包括补全缺失残基、调整质子化状态以及进行能量最小化处理, 其余参数默认。

接下来, 利用 Receptor Grid Generation 模块生成对接网格, 定义靶蛋白的活性位点及对接盒的范围。然后, 使用 Glide 模块以标准精度模式进行半柔性分子对接, 计算配体与靶蛋白之间的结合模式及结合亲和力, 并生成对接评分结果, 其余参数默认。

最后, 对对接结果进行详细分析, 评估配体与靶蛋白之间的相互作用, 如氢键和疏水相互作用, 并结合 GlideScore 评分筛选出结合稳定性更高的候选分子。

2.2.3 分子动力学模拟

本文所涉及的分子模拟计算均在由 56 核 112 线程处理器 (Intel(R) Xeon(R) Platinum 8173M CPU @ 2.00GHz CPU*2 28 核 56 线程)、RTX 2080 Super 显卡 (Gigabyte Turbo 11 G, Driver: 470.57.02, Cuda: 11.4) 和 192 G 内存 (Sumsang 64G*3 DDR4 2933M Hz) 组装的工作站上运行。

分子的量子化学计算使用 Gaussian16^[18]进行, 随后通过 Antechamber^[19]进行 RESP 电荷拟合, 以获得分子的电荷分布。

模拟体系的构建采用 CHARMM-GUI^[20-23]中的 Membrane Builder 工具, 构建膜蛋白模拟环境。体系包含 1,2-二棕榈酰-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (POPC) 膜模型, 同时使用 TIP3P 水模型及 0.15 M NaCl 以稳定膜蛋白体系。蛋白质和脂质分别应用 Amberff14SB 和 Lipid21 力场, 而配体分子采用 GAFF2 力场。

分子动力学模拟使用 Gromacs 2022^[24]进行, 具体流程包括能量最小化、预平衡和生产模拟。所有分子首先采用最速下降法进行 5000 步的能量最小化, 其中溶质原子受到 1000 kJ (mol·nm²)⁻¹的力常数约束。主链和配体原子分别施加 4000 kJ (mol·nm²)⁻¹的约束, 侧链原子施加 2000 kJ (mol·nm²)⁻¹, 脂质原子施加 1000 kJ (mol·nm²)⁻¹。系统经历 6 个逐步平衡阶段, 以确保在目标温度 303.15 K 和目标压力 1.0 bar 下达到热力学平衡。平衡过程中, 约束逐步释放, 时间分别为 250 ps、250 ps、250 ps、500 ps、500 ps 和 500 ps, 主链和配体原子的约束逐步降低, 依次为 4000、2000、1000、500、200、50 kJ (mol·nm²)⁻¹, 侧链原子的约束降低, 依次为 2000、1000、500、200、50、0 kJ (mol·nm²)⁻¹, 脂质原子的约束降低, 依次为 1000、400、400、200、40、0 kJ (mol·nm²)⁻¹。最终, 在无任何约束条件下运行成品动力学模拟。指令如下:

能量极小化:

```
gmx grompp -f step6.0_minimization.mdp -o step6.0_minimization.tpr -c step5_input.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn -1
```

```
gmx mdrun -v -ntomp 10 -ntmpi 1 -gpu_id 0 -deffnm step6.0_minimization
```

体系预平衡:

```
gmx grompp -f step6.1_equilibration.mdp -o step6.1_equilibration.tpr -c step6.0_minimization.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn -1
```

```
gmx mdrun -v -ntomp 10 -ntmpi 1 -gpu_id 0 -deffnm step6.1_equilibration
```

```
gmx grompp -f step6.2_equilibration.mdp -o step6.2_equilibration.tpr -c step6.1_equilibration.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn -1
```

```
gmx mdrun -v -ntomp 10 -ntmpi 1 -gpu_id 0 -deffnm step6.2_equilibration
```

```
gmx grompp -f step6.3_equilibration.mdp -o step6.3_equilibration.tpr -c step6.2_equilibration.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn -1
```

```
gmx mdrun -v -ntomp 10 -ntmpi 1 -gpu_id 0 -deffnm step6.3_equilibration
```

```
gmx grompp -f step6.4_equilibration.mdp -o step6.4_equilibration.tpr -c step6.3_equilibration.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn -1
```

```
gmx mdrun -v -ntomp 10 -ntmpi 1 -gpu_id 0 -deffnm step6.4_equilibration
```

```
gmx grompp -f step6.5_equilibration.mdp -o step6.5_equilibration.tpr -c step6.4_equilibration.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn -1
```

```
gmx mdrun -v -ntomp 10 -ntmpi 1 -gpu_id 0 -deffnm step6.5_equilibration
```

```
gmx grompp -f step6.6_equilibration.mdp -o step6.6_equilibration.tpr -c step6.5_equilibration.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn -1
```

```
gmx mdrun -v -ntomp 10 -ntmpi 1 -gpu_id 0 -deffnm step6.6_equilibration
```

成品动力学模拟:

```
gmx grompp -f step7_production.mdp -o md.tpr -c step6.6_equilibration.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn -1
```

```
gmx mdrun -v -ntomp 10 -ntmpi 1 -gpu_id 0 -deffnm md
```

2.2.4 结合自由能计算

利用 MM/PBSA 计算模拟平衡后配体分子的结合自由能, 所有结合自由能计算均使用 gmx_MMPBSA v1.4.3^[25]和 MMPBSA.py^[26]进行。在应用隐式膜模型时, 膜蛋白体系的

MM/PBSA 计算方法与溶液环境下的蛋白体系有所不同。由于膜具有部分极性特性，这可能影响配体的结合过程。对于膜结合蛋白体系，MM/PBSA 计算的参数设置依据 Amber 参考手册中的推荐配置进行调整。计算指令如下：

```
mpirun -np 4 gmx_MMPBSA MPI -O -i mmpbsa.in -cs md.tpr -ci index.ndx -cg 1 13 -ct md.xtc -cp topol.top -o FINAL_RESULTS_MMPBSA.dat -eo FINAL_RESULTS_MMPBSA.csv
```

2.3 生物测试

2.3.1 实验材料

细胞系及培养：本论文所使用的 HEK293T 细胞系均在含有 10%胎牛血清(FBS, F0193, Sigma-Aldrich)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的高糖 DMEM(C11995500BT, Gibco) 中在 37 °C、含 5% CO₂ 和 95%相对湿度的加湿气氛中培养。

试剂与耗材：Furimazine (Nano-Glo Luciferase Assay, Promega, N1110)，白色 96 孔板 (Cell Culture Plate, PS, 96 well, White, 85.4x127.6mm, Flat Bottom, TC treated, Sterile, SPL life sciences, 30196)。

2.3.2 NanoBRET 实验

为了验证筛选得到的化合物是否具有激动剂活性，我们使用了基于 NanoBRET 技术的 $\beta_2\text{AR}$ -NanoLuc 募集 miniGs-Venus 测试。此实验设计用于检测化合物是否能够激活 $\beta_2\text{AR}$ ，启动下游信号通路。激动剂的作用是通过增强 $\beta_2\text{AR}$ 的活性来产生可检测的荧光信号，而拮抗剂则会阻断这一过程。HEK293T 细胞转染分为两组，一组以 1:1 的比例与 $\beta_2\text{AR}$ -NanoLuc 和 miniGs-Venus 共转染作为实验组；另一组转染仅 $\beta_2\text{AR}$ -NanoLuc 作为背景对照组。转染试剂为 PEI，按 2:1 的比例加入到质粒中。在转染 24 h 后，将细胞以 100 μL 5 e4 个/孔转移至白色 96 孔板上，继续孵育 18 h。测试使用的荧光底物是 Furimazine (Promega, 终浓度为 5 μM ，1 x HBSS 稀释)，测试前移除培养基并使用 1 x HBSS 洗涤，随后缓慢加入 100 μL 1 x HBSS，再加入 Furimazine 10 μL ，随后加入测试化合物 (10 x) 溶液 10 μL ，将孔板放置在 FlexStation 3 (Molecular Devices) 微孔板读数器中，使用 SoftMax Pro 7.1 软件读数，仪器参数设置如下：

```
Read Mode    LUM
Read Type    Kinetic
Wavelengths  Emission Lm1 440 nm
Emission Lm2 530 nm
Plate Type   96 well Greiner white
PMT Gain     Integration Time 500 ns
Total Time   10 mins
Interval     2.5 mins
```

读数后使用 GraphPad Prism 7 (GraphPad software) 通过三参数非线性回归方程对数据进行分析。NanoBRET 实验测试平行孔设置为 4 个，且测试会独立重复三次。所有 6 种候选化合物均直接购自 TargetMol，每种化合物的特征均由其液相色谱-质谱 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 或氢核磁共振 (Proton Nuclear Magnetic Resonance, ¹H NMR) 谱图确认，结果见附录。

2.3.3 药物代谢动力学实验

PK 实验使用雄性 CD-1 小鼠，每组 3 只，测试时体重约为 20 g，AUP 号为 PK-M-07182024。实验前保持一周以上的适应性饲养：26 °C，50%湿度，12 h 光暗交替，正常给予食物和饮水，并在实验前禁食 12 h。实验采用尾静脉注射给药，剂量分别为 1 mg/kg，于给药后 0、0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24 h 采血。小鼠眼眶采血 0.08mL 置于含标记的 EDTA-2K 抗凝管中，上下轻柔颠倒使抗凝剂 EDTA-2K 与血液充分混合后，立即置于湿冰中，并于采血后 1 小时之内离心分离血浆，离心条件设置为 4 °C、6800 g、6 min。离心后分离得到的血浆装于标记好的 EP 管中，并于 1 小时内存放于不高于 -20 °C 冰箱内，直至样品分析。使用 LC/MS 测定每只动物血样中的化合物浓度，根据实验中测得的血药浓度-时间曲线计算出主要的 PK 参数。实验委托康龙化成 (北京) 新药技术股份有限公司进行。

3 结果

3.1 数据库的虚拟筛选结果

本研究的分子虚拟筛选流程如图 1 所示。将受体结构用 MODELLER 进行修复后，为了确保筛选的全面性和高效性，我们使用了 TargetMol 公司提供的商业化筛选化合物库，该库包含约 1900 万个分子，涵盖了广泛的化学空间和多样性，为活性化合物的筛选提供了丰富的资源。经过 DataWarrior 的 70%相似性搜索后，采用 Lipinski 五项法则进行进一步筛选，最后保留约 35000 个分子进行进一步筛选。

分子对接利用靶蛋白的三维结构，从头识别潜在的活性化合物，避免了对已知先导化合物的依赖。在本研究中，分子对接过程使用了 Schrödinger 软件套件，通过 LigPrep 模块优化小分子构象，Protein Preparation Wizard 模块预处理靶蛋白，Glide 模块完成高精度对接。基于 GlideScore 评价结合模式，筛选出 226 个高亲和力候选分子，同时初步保留了化合物的化学多样性，为后续深入筛选和分析提供了广泛的候选空间。本阶段的对接结果为分子动力学模拟和结合自由能计算奠定了基础，这些研究将提供配体-受体复合物稳定性和灵活性的动态信息。

分子动力学模拟是一种计算机模拟技术，用于研究生物分子（如蛋白质和核酸）在原子和分子尺度上的运动与相互作用，通过模拟原子和分子随时间演化的过程，分子动力学模拟可以揭示系统动态的变化，并提供生物分子结构随时间变化的原子级信息。通过模拟蛋白质和配体在时间尺度上的运动，分子动力学模拟能够揭示配体与受体之间的相互作用机制以及结合模式的稳定性。由于分子动力学模拟的计算成本较高，通常仅能对数百个候选分子进行详细的能量预测和动态行为分析。因此，在本研究中，我们仅对前期筛选得到的 226 个候选分子进行了 100 ns 的分子动力学模拟，并结合分子力学泊松玻尔兹曼表面积（Molecular Mechanics/ Poisson Boltzmann Surface Area, MM/PBSA）方法计算其结合自由能，以深入探究这些分子与 β_2 AR 的结合稳定性。计算原理包括 MM 能量以及溶剂化自由能，其中溶剂化自由能由极性溶剂化自由能（PB 项）和非极性溶剂化自由能（SA 项）组成。PB 方程用于描述溶质分子与溶剂分子之间的静电相互作用，特别适用于处理涉及复杂静电相互作用的分子系统，因此在这类问题中通常能提供较为准确的结果。通过计算均方根偏差评估受体-配体复合物的结构稳定性并分析关键相互作用，筛选出 6 个具有稳定结合模式和合成可及性的候选化合物，其结合自由能 (ΔG) 范围为 -13.0 ± 1.9 至 -22.01 ± 2.83 kcal·mol⁻¹，显示出高亲和力潜力。

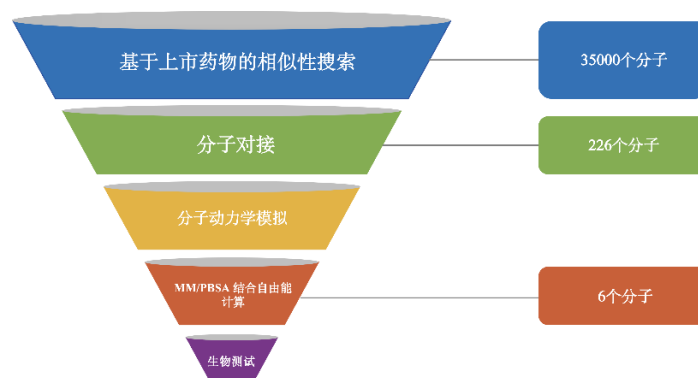


图 1 本研究的虚拟筛选流程

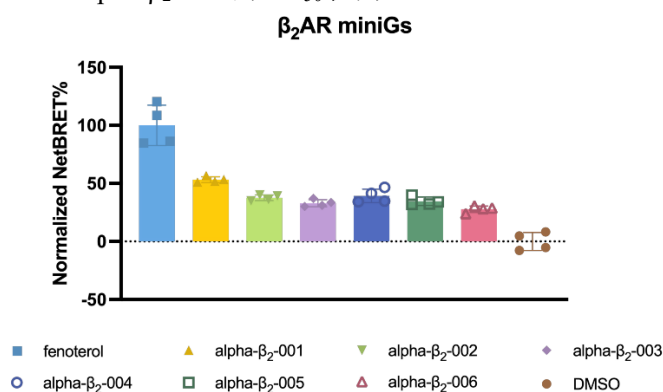
Fig. 1 The virtual screening workflow

3.2 基于细胞功能测定的化合物验证

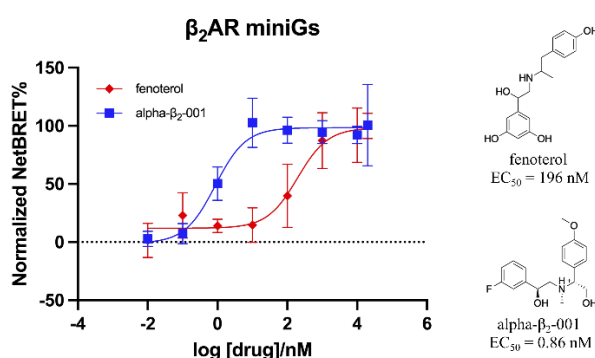
本研究采用 NanoBRET 技术对 6 个筛选出的候选化合物的生物活性进行评估。在 NanoBRET/miniGs 体系中，NanoLuc 被融合至 GPCR (β_2 AR) 的 C 端，而 miniGs 蛋白则结合荧光受体作为能量转移受体。配体结合 GPCR 后，激活的受体与 miniGs 蛋白相互作用，使供体和受体接近，触发能量转移并产生特定 BRET 信号，从而实现配体效力及受体激活的实时监测。

测试结果如图 2(a)所示，在固定浓度 $10\ \mu\text{M}$ 下，评估了不同化合物对 β_2 AR miniGs 蛋白的激活效率。DMSO 对照组未引起显著的 BRET 信号变化，验证了实验体系的可靠性和稳定性。阳性对照选择了在前期基于相似性搜索的筛选中已被确认为关键参考化合物的 fenoterol。Fenoterol 在 $10\ \mu\text{M}$ 的浓度下表现出较高的 netBRET 值，进一步证明了检测体系的灵敏度和准确性。实验数据经标准化处理，以 fenoterol 的最大效应值作为参考基准，并以 DMSO 作为基线 ($n = 4$ 个生物学重复，表示为均值 \pm 标准误)。候选化合物中，alpha- β_2 -001 的 netBRET 信号显著高于其他候选化合物，表明其可能具有较强的 β_2 AR 激活能力。

为了进一步量化 alpha- β_2 -001 的活性，我们进行了剂量-反应曲线分析，以确定其 EC_{50} 值，从而精确衡量其效力。如图 2(b)所示，在不同浓度条件下评估了 alpha- β_2 -001 对 β_2 AR miniGs 蛋白的激活效率，数据根据最大效应值进行归一化处理 ($n = 4$ 个生物学重复，表示为均值 \pm 标准误)，并采用 Logistic 方程拟合剂量-反应曲线。结果显示，阳性对照 fenoterol 的 EC_{50} 值为 $196\ \text{nM}$ ，alpha- β_2 -001 的 EC_{50} 值为 $0.86\ \text{nM}$ 。



(a) 6种候选化合物对 β_2 AR miniGs蛋白在 $10\ \mu\text{M}$ 浓度下激活效率的影响



(b) Fenoterol与alpha- β_2 -001在不同浓度下对 β_2 AR miniGs蛋白的激活效率及分子结构

图 2 候选化合物的细胞功能测定

Fig. 2 Cell function determination of candidate compounds

3.3 药物代谢动力学实验结果

PK 测试主要用于确定药物在特定给药途径下，在血液中的浓度随时间的变化，其结果可以为药效实验确定采样时间。本实验中所用小鼠为雄性 CD-1 小鼠。通过静脉注射的

方式给药，给药剂量为 1mg/kg 并于给药后 0、0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24 h 采血，经 LC-MS 测试小鼠体内化合物含量。

在化合物 PK 测试中，使用短效激动剂 salbutamol 和长效激动剂 salmeterol 作为对照。这两个分子具有同源结构母核（苯乙醇胺骨架），其药代动力学特性差异主要源于 N 端取代基的化学修饰，这种结构-代谢关系的经典模型为本研究候选化合物的代谢机制解析提供了理想参照。三种化合物在静脉注射给药后的半衰期 ($T_{1/2}$) 结果为：alpha- β_2 -001 的 $T_{1/2}$ 为 0.22 h；salbutamol 的 $T_{1/2}$ 为 0.28 h；salmeterol 的 $T_{1/2}$ 为 2.12 h。结果表明 alpha- β_2 -001 的 $T_{1/2}$ 相比于短效激动剂 salbutamol 更短，证明 alpha- β_2 -001 属于短效激动剂。

表 1 静脉注射 1mg/kg 的 alpha- β_2 -001 小鼠体内 PK 实验结果

Table 1 Results of in vivo PK experiment in mice injected 1mg/kg alpha- β_2 -001

PK 参数	单位	M01	M02	M03	均值	标准差	变异系数%
Cl_obs	mL/min/kg	133	98.8	97.7	110	20	18.4
$T_{1/2}$	h	0.197	0.222	0.252	0.223	0.027	12.2
C0	ng/mL	543	684	697	641	86	13.4
AUC _{last}	h*ng/mL	122	163	162	149	23	15.7
AUC _{inf}	h*ng/mL	125	169	171	155	26	16.7
AUC_%Extrap_obs	%	2.44	3.56	4.98	3.66	1.28	34.9
MRT _{inf_obs}	h	0.224	0.256	0.279	0.253	0.027	10.8
AUC _{last} /D	h*ng/mL	122	163	162	149	23	15.7
V _{ss_obs}	L/kg	1.79	1.52	1.64	1.65	0.14	8.42

表 2 静脉注射 1mg/kg 的 salbutamol 小鼠体内 PK 实验结果

Table 2 Results of in vivo PK experiment in mice injected 1mg/kg salbutamol

PK 参数	单位	M01	M02	M03	均值	标准差	变异系数%
Cl_obs	mL/min/kg	188	210	187	195	13	6.68
$T_{1/2}$	h	0.281	0.274	0.285	0.280	0.005	1.97
C0	ng/mL	404	344	378	375	30	8.06
AUC _{last}	h*ng/mL	83.3	74.6	83.2	80.3	5.0	6.23
AUC _{inf}	h*ng/mL	88.6	79.2	88.9	85.6	5.5	6.44
AUC_%Extrap_obs	%	6.03	5.88	6.42	6.11	0.28	4.55
MRT _{inf_obs}	h	0.284	0.287	0.302	0.291	0.010	3.41
AUC _{last} /D	h*ng/mL	83.3	74.6	83.2	80.3	5.0	6.23
V _{ss_obs}	L/kg	3.20	3.62	3.40	3.41	0.21	6.20

表 3 静脉注射 1mg/kg 的 salmeterol 小鼠体内 PK 实验结果

Table 3 Results of in vivo PK experiment in mice injected 1mg/kg salmeterol

PK 参数	单位	M01	M02	M03	均值	标准差	变异系数%
Cl_obs	mL/min/kg	121	134	99.8	118	17	14.5
$T_{1/2}$	h	3.45	1.50	1.39	2.12	1.16	54.9
C0	ng/mL	179	221	271	224	46	20.7
AUC _{last}	h*ng/mL	121	111	151	128	21	16.5
AUC _{inf}	h*ng/mL	138	125	167	143	22	15.2
AUC_%Extrap_obs	%	11.8	11.3	9.46	10.9	1.2	11.5
MRT _{inf_obs}	h	3.00	1.50	1.35	1.95	0.91	46.6
AUC _{last} /D	h*ng/mL	121	111	151	128	21	16.5
V _{ss_obs}	L/kg	21.8	12.0	8.11	14.0	7.0	50.4

3.4 新型短效激动剂与受体的相互作用分析

图 3 展示了化合物 fenoterol 和 alpha- β_2 -001 与 β_2 AR 的结合模式及通过 PLIP^[27]分析得到的相互作用指纹图谱 (Interaction Fingerprint Profile, IFP)。每个轴代表一个特定的氨基酸

残基，残基从中心到外缘的距离表示该残基与配体之间形成的相互作用总数（包括所有类型的相互作用，如盐桥、氢键、 π 堆叠、疏水接触等）。结果表明，fenoterol 直链中的氮原子与 D113^{3.32} 残基形成盐桥，同时与 D113^{3.32}、F193^{5.32}、S203^{5.42}、S207^{5.46}、N293^{6.55} 和 N312^{7.39} 形成氢键相互作用。Fenoterol 的间位双取代苯基和氮原子分别与 F290^{6.52} 残基形成 π - π 堆积作用，以及与 F193^{5.32} 形成 π -阳离子相互作用。此外，其他 β_2 AR 残基（包括 V114^{3.33}、V117^{3.36}、F193^{5.32}、F289^{6.51}、Y308^{7.35} 和 I309^{7.36}）与 fenoterol 形成疏水相互作用。

对于 alpha- β_2 -001，其直链中的氮原子与 D113^{3.32} 形成盐桥，并与 F193^{5.32} 形成 π -阳离子相互作用。此外，alpha- β_2 -001 的苯基甲氧基基团与 β_2 AR 的 Y308^{7.35} 形成较弱的 π - π 堆积作用。alpha- β_2 -001 与 D113^{3.32}、F193^{5.32} 和 N312^{7.39} 残基形成氢键相互作用，其所有环状结构均与关键 β_2 AR 残基（V114^{3.33}、F193^{5.32}、F289^{6.51}、Y308^{7.35} 和 I309^{7.36}）形成疏水相互作用。

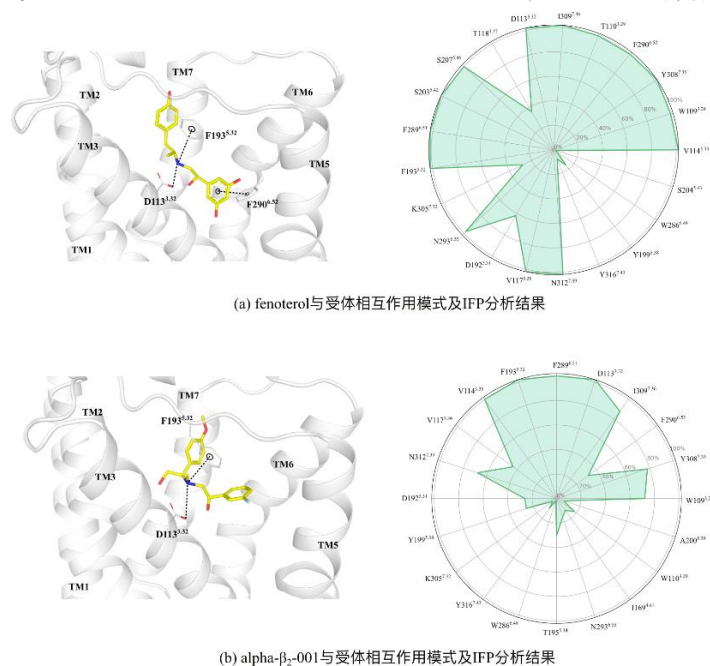


图3 β_2 AR 与 fenoterol、alpha- β_2 -001 的关键相互作用模式，以及 IFP 分析结果

Fig. 3 Key interaction patterns of β_2 AR with fenoterol and alpha- β_2 -001, and IFP results

4 讨论与分析

药物发现是一个长期复杂的过程，传统方法依赖天然产物筛选和偶然发现，效率低、耗时长且缺乏针对性。高通量筛选结合分子生物学和基因组科学的应用虽然使数据量大幅增加，但研发成功率并未显著提升。随着药物机制的发现和新技术的发展，高效的虚拟筛选正在逐步改变传统的研究模式，通过高效处理复杂数据集加速药物筛选和开发进程，在临床前阶段展现出巨大潜力^[28]。虚拟筛选主要包含分子对接，分子动力学模拟，自由能计算等等，这些方法不仅减少了药物发现所需的时间和资源^[29,30]，还促进了具有替代和改进生物活性的新型化合物的设计^[31]。

β_2 AR 激动剂的研究一直是热点领域，将 β_2 AR 激动剂与吸入型糖皮质激素联合使用，可以更有效地控制哮喘和慢性阻塞性肺病的症状^[32]。 β_2 AR 激动剂不仅在治疗呼吸系统疾病中具有重要的临床应用价值，近年来其在免疫调节中的作用也逐渐受到关注，如通过调控 T 细胞分化异常、促进调节性 T 细胞恢复，而成为免疫性血小板减少症的一种潜在治疗方法^[33]。同时，新型 β_2 AR 激动剂的开发仍在进行。

近年来，虚拟筛选在 GPCR 配体发现中的应用取得了显著成功。通过虚拟筛选和类药性过滤，发现了选择性激活 α_2 aAR 的化合物 P300-2342，并且该化合物在小鼠模型中表现出镇静作用且副作用较少，成为潜在的镇静剂先导化合物^[34]。还有研究对 ZINC 数据库进行筛

选和两轮类似物建模，成功鉴定出两种优化的 MRGPRX2 反向激动剂 C9-6、C9 和高效的 MRGPRX4 激动剂 MS47134，其中 C9-6、C9 的 K_i 值分别为 58 nM 和 43 nM，MS47134 的选择性比 Kir6.2/SUR1 钾通道高 47 倍^[35]。

本研究整合了多种先进的计算化学技术，包括相似性搜索、分子动力学模拟及结合自由能计算等，开展了全面且系统的虚拟筛选，以高效识别潜在高亲和力 β_2AR 短效激动剂。

首先，利用已知短效激动剂的化学结构进行相似性搜索，对化合物库进行初步筛选，从而提高了发现有效短效激动剂的可能性。随后，通过分子对接进一步优化筛选范围，最终筛选出 226 种候选化合物。这些化合物经过分子动力学模拟和自由能计算，以评估其结合稳定性及受体活性。通过严格筛选，最终确定 6 种具有良好前景的候选化合物。在实验验证阶段，采用 NanoBRET 功能实验评估了 6 种化合物的生物活性。其中， α - β_2 -001 表现出显著的剂量依赖性反应，并在低浓度下高效激活 β_2AR ，其 EC_{50} 值为 0.86 nM，显示出比 fenoterol 更强的效能，表明 α - β_2 -001 可能具有更好的临床前药物潜力。随后，针对 α - β_2 -001 的 PK 实验表明其具有比已知短效激动剂 salbutamol 更短的半衰期， $T_{1/2}$ 为 0.22 h。更短的半衰期可能缩短药物在血液中的暴露时间，降低心动过速、震颤等全身性副作用的风险。适用于需要短暂、可控的支气管扩张。还可减少肝肾代谢负担，适合肝肾功能不全者。但也可能导致局部疗效不足，需增加给药频率，还会降低患者依从性。进一步的结合模式分析表明，新鉴定的 β_2AR 短效激动剂 α - β_2 -001 在关键相互作用方面与已知短效激动剂 fenoterol 相似，均与 D113^{3,32} 形成盐桥，其芳香环与 F193^{5,32} 形成 π -阳离子相互作用，此外，它们与极性和疏水残基表现出稳定的相互作用。尽管存在这些相似性，新鉴定的化合物与 fenoterol 相比也显示出独特的相互作用。比较显著的是，未发现 α - β_2 -001 与 S203^{5,42}、S207^{5,46} 的氢键相互作用，但是与 I169^{4,61} 和 T195^{5,34} 形成了新的弱相互作用。这些结合模式的差异表明， α - β_2 -001 可能以独特的构象状态稳定 β_2AR ，或通过替代的结合机制与受体相互作用，可能诱导受体产生新的构象变化，从而影响其信号传导特性。这些独特的相互作用模式不仅可能改变配体与受体的结合动力学，还可能影响下游信号通路的激活效率，从而带来独特的药理学特性，同时为 β_2AR 的构象调控提供新的视角，从而为开发更精准的 β_2AR 靶向药物奠定基础。

未来的研究可以进一步优化 α - β_2 -001 的结构，以提高其选择性、药代动力学性质及成药性。此外，可以通过体内药效学研究和临床前动物实验，进一步验证其生物活性和安全性，为后续的临床开发奠定基础。同时，结合更先进的人工智能方法，可进一步提升虚拟筛选的精准度，发现更多具有潜在应用价值的 β_2AR 激动剂。未来的工作还可探索这些激动剂在其他疾病领域的应用潜力，拓宽其临床适用范围。总体而言，本研究的策略可推广至其他 GPCR 靶点，为创新药物研发提供有力支持，加速高效靶向药物的发现进程。

5 结论

本研究通过先进的筛选策略及详细的结合模式分析，成功鉴定出高效的短效 β_2AR 激动剂 α - β_2 -001。与现有激动剂 fenoterol 相比，新发现的分子展现出明显优势，例如显著降低的 EC_{50} 值，表明其具有更高的激动效力。此外， α - β_2 -001 引入了不同于 fenoterol 的新型相互作用特征，可能赋予其独特的药理学特性。本研究不仅筛选出具有潜力的激动剂，为靶向 β_2AR 药物开发提供了新选择，还拓展了该领域的研究视角，同时凸显了计算化学与实验验证相结合在创新药物发现中的重要作用。

参考文献

- [1] Fredriksson R, Lagerström M C, Lundin L G, et al. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints[J]. *Molecular Pharmacology*, 2003, 63(6): 1256-1272.

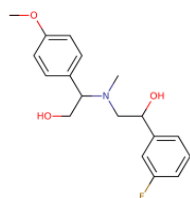
-
- [2] Latorraca N R, Venkatakrisnan A J, Dror R O. GPCR Dynamics: Structures in Motion[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(1): 139-155.
- [3] Rasmussen S G F, Choi H J, Rosenbaum D M, et al. Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor[J]. *Nature*, 2007, 450(7168): 383-387.
- [4] Lohse M J, Benovic J L, Codina J, et al. β -Arrestin: a Protein that Regulates β -adrenergic Receptor Function[J]. *Science*, 1990, 248(4962): 1547-1550.
- [5] January B, Seibold A, Whaley B, et al. β_2 -Adrenergic Receptor Desensitization, Internalization, and Phosphorylation in Response to Full and Partial Agonists[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(38): 23871-23879.
- [6] Green S A, Turki J. Amino-Terminal Polymorphisms of the Human beta2-Adrenergic Receptor Impart Distinct Agonist-Promoted Regulatory Properties[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(32): 9414-9419.
- [7] Chung K F, Wenzel S E, Brozek J L, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma[J]. *European Respiratory Journal*, 2014, 43(2): 343-373.
- [8] Hanania N A, Cazzola M. Bronchodilators: Beta2-Agonists and Anticholinergics[M]//*Clinical Asthma*. Elsevier, 2008: 241-250.
- [9] Sink A, Gerwe H, Hübner H, et al. “Photo-Adrenalines”: Photoswitchable β_2 -Adrenergic Receptor Agonists as Molecular Probes for the Study of Spatiotemporal Adrenergic Signaling[J]. *Chemistry – A European Journal*, 2024, 30(11): e202303506.
- [10] Rasmussen S G F, DeVree B T, Zou Y, et al. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–Gs protein complex[J]. *Nature*, 2011, 477(7366): 549-555.
- [11] Yang F, Ling S, Zhou Y, et al. Different conformational responses of the β_2 -adrenergic receptor-Gs complex upon binding of the partial agonist salbutamol or the full agonist isoprenaline[J]. *National Science Review*, 2021, 8(9): nwaa284.
- [12] Xu J, Chen G, Wang H, et al. Calcineurin-fusion facilitates cryo-EM structure determination of a Family A GPCR[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2024, 121(48): e2414544121.
- [13] Ring A M, Manglik A, Kruse A C, et al. Adrenaline-activated structure of β_2 -adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody[J]. *Nature*, 2013, 502(7472): 575-579.
- [14] Šali A, Blundell T L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1993, 234(3): 779-815.
- [15] Sander T, Freyss J, von Korff M, et al. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2015, 55(2): 460-473.
- [16] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 46(1): 3-26.
- [17] Schrödinger Release Notes - Release 2022-4[EB/OL]. [2025-02-15]. <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2022-4/>.
- [18] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, et al. Gaussian 16, Revision C.01[CP]. Wallingford CT: Gaussian, Inc., 2016.
- [19] Wang J, Wang W, Kollman P A, et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations[J]. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2006, 25(2): 247-260.
- [20] Wu E L, Cheng X, Jo S, et al. CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2014, 35(27): 1997-2004.
- [21] Jo S, Lim J B, Klauda J B, et al. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes[J]. *Biophysical Journal*, 2009, 97(1): 50-58.
- [22] Jo S, Kim T, Im W. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations[J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(9): e880.
- [23] Jo S, Kim T, Iyer V G, et al. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2008, 29(11): 1859-1865.
- [24] Abraham M J, Murtola T, Schulz R, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers[J]. *SoftwareX*, 2015, 1-2: 19-25.
- [25] Valdés-Tresanco M S, Valdés-Tresanco M E, Valiente P A, et al. gmx_MMPBSA: A New Tool

-
- to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2021, 17(10): 6281-6291.
- [26] Miller B R, McGee T D, Swails J M, et al. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2012, 8(9): 3314-3321.
- [27] Adasme M F, Linnemann K L, Bolz S N, et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W530-W534.
- [28] Catacutan D B, Alexander J, Arnold A, et al. Machine learning in preclinical drug discovery[J]. *Nature Chemical Biology*, 2024, 20(8): 960-973.
- [29] Muhammed M T, Aki-Yalcin E. Molecular Docking: Principles, Advances, and Its Applications in DrugDiscovery[J]. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2024, 21(3): 480-495.
- [30] King E, Aitchison E, Li H, et al. Recent Developments in Free Energy Calculations for Drug Discovery[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 1-24.
- [31] Namitha K N, V Velmurugan. Review of bioinformatic tools used in Computer Aided Drug Design (CADD)[J]. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 2022, 14(2): 453-465.
- [32] Naeem A, Sabir A, Khalil K F, et al. Comparison of the Effectiveness of Long Acting Beta 2 Agonist and Long Acting Antimuscuranics with Long Acting Beta 2 Agonist/Long Acting Antimuscuranics Plus Inhaled Corticosteroids in preventing Exacerbations of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Targeted by Blood Eosinophils[J]. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 2022, 16(9): 318-320.
- [33] Zhang G C, Wu Y J, Liu F Q, et al. β 2-adrenergic receptor agonist corrects immune thrombocytopenia by reestablishing the homeostasis of T cell differentiation[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2023, 21(7): 1920-1933.
- [34] Zhou P, Lu F, Zhu H, et al. The Discovery of Novel α 2a Adrenergic Receptor Agonists Only Coupling to $G\alpha i/O$ Proteins by Virtual Screening[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(13): 7233.
- [35] Cao C, Kang H J, Singh I, et al. Structure, function and pharmacology of human itch GPCRs[J]. *Nature*, 2021, 600(7887): 170-175.

附录 候选化合物的谱图

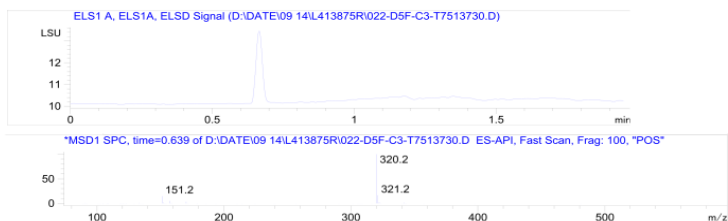
alpha-β₂-001 的 LC/MS 谱图

MaxPeak: 96.39%
Ret_Time: 0.621 min



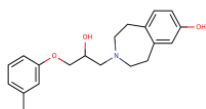
Mol Wt 319.37
Exact Mass 319.19

#	Time	Area%
1	0.591	3.61
2	0.621	96.39



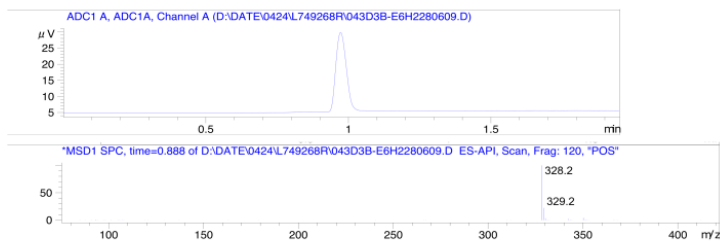
alpha-β₂-002 的 LC/MS 谱图

MaxPeak: 100.00%
Ret_Time: 0.873 min

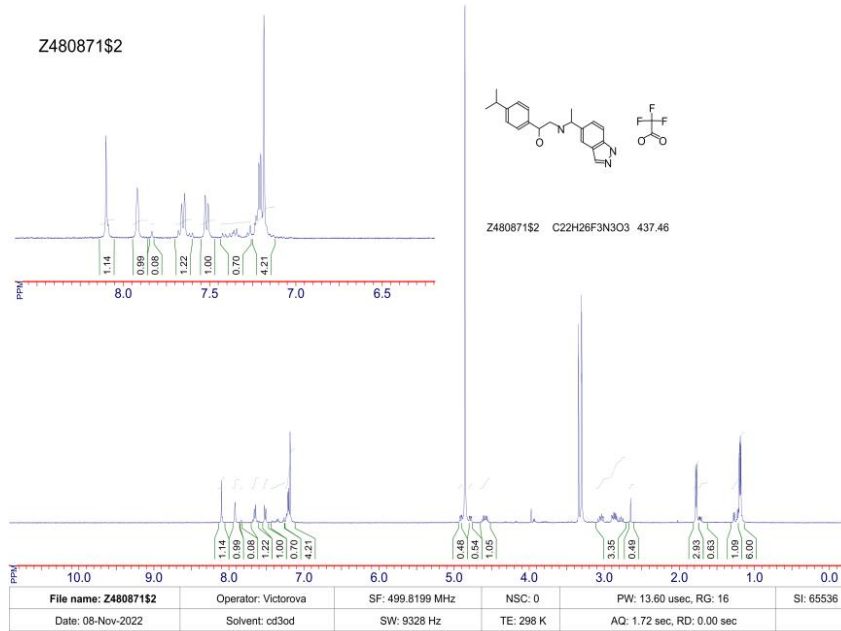


Mol Wt 327.42
Exact Mass 327.22

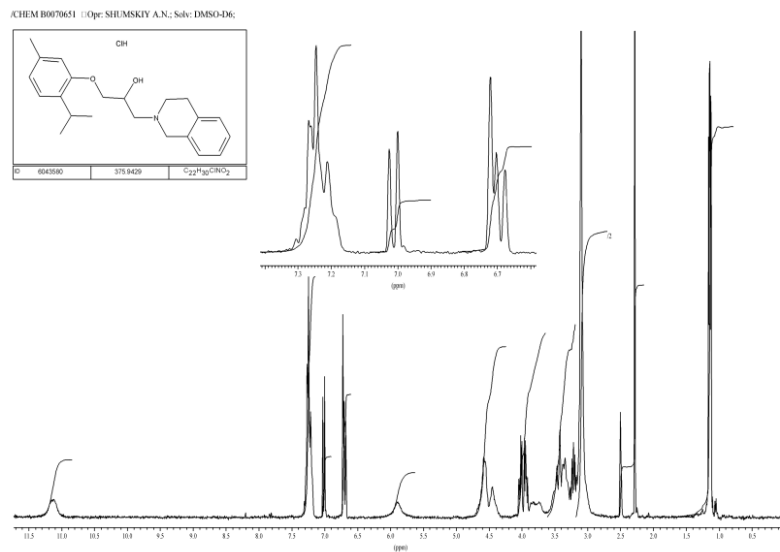
#	Time	Area%
1	0.873	100.00



alpha-β₂-003 的 ¹H NMR 谱图

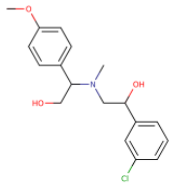


alpha-β₂-004 的 ¹H NMR 谱图



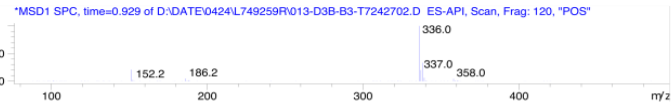
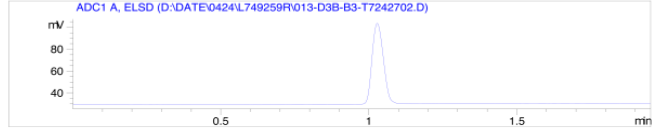
alpha-β₂-005 的 LC/MS 谱图

MaxPeak: 90.32%
Ret_Time: 0.915 min

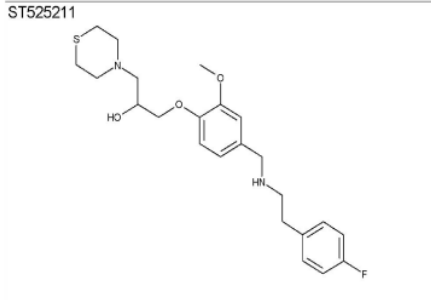


Mol Wt 335.82
Exact Mass 335.16

#	Time	Area%
1	0.806	1.42
2	0.889	2.59
3	0.915	90.32
4	0.991	3.30
5	1.045	1.05
6	1.092	1.31



alpha-β₂-006 的 LC/MS 谱图



ID 54834089 | 434.5775 | C₂₃H₃₁N₂O₃S

Data File R:\HPLC\AUTO\ST5252\1CB-1101.D
Sample Name: ST5252P1-C-02
Instrument 1 02/04/2019 18:15:20
Column: Onyx C18 50x4.6mm | 3.75ml/min | Columns Reg Valve
Gradient: "A"->82.0min->"B" (Hold 0.6min)->0.2min->"A"->PostRun
PMPI, Solvent A : 0.1%TFA in Acn/H2O (2.5:97.5)
PMPI, Solvent B : 0.1%TFA in Acn
PMPI, Solvent C : 0.1%TFA in Acn/H2O (2.5:97.5)
PMPI, Solvent D : 0.1%TFA in Acn
Ionization mode : APCI Positive

Signal 3: MSD1 TIC, MS File

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area	Height	Area %
1	0.972	MM	0.0937	1.90298e7	3.38441e6	100.0000

Totals : 1.90298e7 3.38441e6

