

Received: 2004.06.29
Accepted: 2004.09.20
Published: 2004.11.03

β_2 -agoniści – o czym decyduje ich struktura chemiczna?

β_2 -agonists – what does their chemical structure determine?

Ludmiła Węglarz¹, Alicja Grzanka², Barbara Rogala², Tadeusz Wilczok³

¹ Katedra i Zakład Biochemii Śląskiej Akademii Medycznej w Sosnowcu

² Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Alergologii i Immunologii Klinicznej Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze

³ Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Śląskiej Akademii Medycznej w Sosnowcu

Streszczenie

W pracy przedstawiono strukturalną i czynnościową zależność pomiędzy β_2 -agonistami i receptorem β_2 -adrenergicznym. Ludzki receptor β_2 -adrenergiczny należy do rodziny receptorów siedmiokrotnie przenikających błonę. W działaniu tego receptora pośredniczy białko Gs i system kinaz białkowych zależnych od cAMP. Opiszano również alternatywne szlaki niezależne od cAMP związane z funkcją receptora. β_2 -agoniści są lekami rozszerzającymi oskrzela stosowanymi od czasu odkrycia izoprenaliny w 1961 roku. W wyniku wieloletnich badań nad ulepszeniem tych leków wprowadzono do leczenia selektywnych krótko działających, a następnie długo działających β_2 -agonistów. Próby udoskonalenia farmakodynamicznych i farmakokinetycznych właściwości tych leków obejmowały dwa główne szlaki modyfikacji podstawowej struktury katecholamin, które są opisane w tej pracy. Farmakologiczna aktywność zależy zwykle od enancjomeru R. Kinetyka stymulowanej przez β_2 -agonistów bronchodylatacji w astmie jest uwarunkowana różnym molekularnym mechanizmem oddziaływania β_2 -agonistów z receptorem. W omówieniu regulacji β_2 -receptora uwzględniono również jego desensytyzację i aktywację indukowaną m.in. przez glikokortykosteroidy.

Słowa kluczowe:

receptor β_2 -adrenergiczny • struktura β_2 -agonistów • astma • glikokortykosteroidy

Summary

The paper presents the structure and functional relationship of β_2 -agonists and the β_2 -adrenoceptor. The human β_2 -adrenoceptor is a member of the 7-transmembrane family of receptors. Most of the actions of the β_2 -receptor are mediated through the Gs protein and the cAMP-dependent PKA system. Alternative cAMP-independent pathways affected following β_2 -receptor activation have also been described. β_2 -agonists have been used as bronchodilator agents in the treatment of asthma since the development of inhaled isoprenaline preparations in 1961. Over the years, these agents have been markedly improved through the development of short-acting β_2 selective agents followed by long-acting β_2 selective agents with prolonged duration of action. Efforts directed towards improving the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, including the long-acting and selective β_2 -adrenoceptor agonists, included two major pathways of modifying the basic structure of the catecholamines, which are described in this paper. The pharmacological activity usually resides in the (R)-enantiomer. The kinetics of β_2 -agonist-stimulated bronchodilation in asthma is determined by the differences in the molecular mechanism of β_2 -agonists action. Regulation of the β_2 -receptor is influenced by its desensitization following exposure

to high concentrations of or repeated challenges with agonists, and up-regulation which can be induced by glucocorticoids and thyroid hormones.

Key words: β_2 -adrenoceptor • β_2 -agonists structure • asthma • glucocorticoids

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6411.pdf

Word count: 4264

Tables: –

Figures: 5

References: 45

Adres autorki: dr hab. n. med. Ludmiła Węglarz, Katedra i Zakład Biochemii Śl. AM, ul. Narczyków 1, 41-200 Sosnowiec;
e-mail: lwęglarz@slam.katowice.pl

WPROWADZENIE

Agoniści receptora β_2 -adrenergicznego stanowią najważniejszą grupę leków rozszerzających oskrzela, stosowaną w astmie niezależnie od stopnia ciężkości od czasu pojawienia się w latach czterdziestych inhalacyjnych preparatów izoprenaliny [43]. β_2 -agoniści (β_2 AG) działają farmakologicznie przez aktywację receptora β_2 -adrenergicznego (β_2 AR), który w układzie oddechowym ulega ekspresji w komórkach mięśni gładkich i komórkach nabłonkowych oraz w obecnych w tym układzie komórkach zapalnych, takich jak neutrofile, eozynofile, makrofagi, komórki tuczne [10]. β_2 -AG oddziałują głównie w drogach oddechowych na komórki mięśni gładkich oskrzeli. W następstwie wiązania się β_2 AG do β_2 AR jest uruchamiany szlak transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego indukujący wiele zdarzeń, które wywołują działania biologiczne. Najważniejszym z nich jest relaksacja mięśni gładkich oskrzeli, a także poprawa transportu śluzowo-rzęskowego, zmniejszenie przepuszczalności drobnych naczyń płucnych, pobudzenie wytwarzania surfaktantu oraz hamowanie uwalniania niektórych mediatorów procesów zapalnych. W ostatnich latach wiedza o molekularnych mechanizmach działania β_2 -mimetyków znacząco wzrosła i ściśle wiąże się z badaniami struktury receptorów β_2 -adrenergicznych.

FUNKCJONALNE DOMENY STRUKTURY RECEPTORA β_2 -ADRENERGICZNEGO

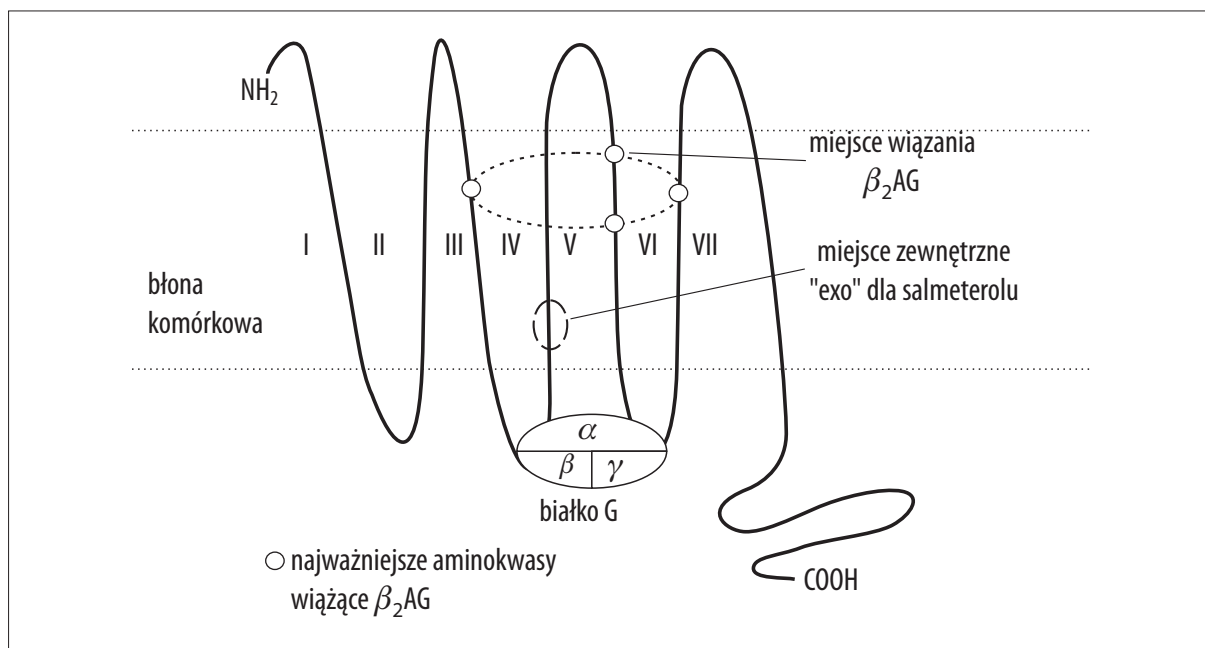
β_2 AR należy do najwcześniej sklonowanych i zsekwencjonowanych receptorów sprzężonych z białkami G (białka wiążące GTP) [23]. Jako typowy receptor metabotropowy, β_2 AR zawiera zewnątrzkomórkowy fragment N-terminalny łańcucha polipeptydowego, siedem helikalnych domen przezłonowych i wewnątrzkomórkowy fragment C-terminalny (ryc. 1) [20,23].

Stwierdzono, iż regiony hydrofobowe łańcucha polipeptydowego przenikające błonę komórkową uczestniczą w wiązaniu liganda (β_2 -agonisty), a usunięcie z receptora dużych zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych fragmentów hydrofilowych nie wpływa na wiązanie agonistów i antagonistów [13]. Wiadomo również, że mutacje polegające na zamianie wysoce konserwatywnych pojedynczych reszt aminokwasowych w helikalnych regionach przezłonowych domen II, III, V i VII prowadzą

do znacznych zmian we właściwościach wiązania liganda przez β_2 AR [39]. Badania z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenyzy umożliwiły zidentyfikowanie w białku receptorowym regionów istotnych dla wiązania β_2 AG oraz sprzężenia receptora z białkiem G i aktywacją cykazy adenylanowej [41]. Aktywne miejsce receptora, z którym muszą oddziaływać β_2 AG w celu wywołania efektu biologicznego znajduje się w odległości około 1/3 od rdzenia receptora w kierunku C-końca łańcucha polipeptydowego. Najważniejszą rolę w wiązaniu β_2 AG z aktywnym miejscem receptora pełni reszta kwasu asparaginowego (Asp) domeny III zajmująca pozycję 113 od N-terminalnego końca łańcucha białkowego, a także dwie reszty seryny (Ser 204 i 207) domeny V oraz dwie reszty fenyloalaniny (Fen 259 i 290) obecne w domenie VI [13,40]. Model wiązania β_2 AG zakłada jego umiejscowienie w obrębie hydrofobowego rdzenia receptora, interkalację między przezłonowymi fragmentami helikalnymi i zakotwiczenie uwarunkowane swoistymi oddziaływaniami molekularnymi między resztami aminokwasowymi receptora i funkcyjnymi grupami β_2 AG. Reszta Asp 113 swym łańcuchem bocznym oddziałuje elektrostatycznie z atomem azotu grupy aminowej w cząsteczce agonisty, natomiast dwie reszty Ser (204 i 207) tworzą wiązania wodorowe z grupami hydroksylowymi (OH) pierścienia fenyloowego agonisty. W rozpoznawaniu agonisty uczestniczy reszta Asp 78 w domenie II i treoniny (Tre) 164 w domenie IV. Główną rolą domen cytoplazmatycznych receptora jest udział w jego sprzężeniu z białkami G. Stwierdzono, że w interakcjach receptora z białkiem G uczestniczą fragmenty drugiej i trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej, a także reszty aminokwasowe terminalnej pętli końca karboksylowego łańcucha polipeptydowego receptora [13].

MECHANIZM SPRZĘGANIA RECEPTORA β_2 -ADRENERGICZNEGO: WEWNĄTRZKOMÓRKOWE SZLAKI SYGNALIZACYJNE W DROGACH ODDECHOWYCH

Aktywacja β_2 AR prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP. W sprzężeniu β_2 AR z cyklazą adenylanową uczestniczy białko G określane jako stymulujące (Gs), składające się z podjednostek α , β i γ [14]. Istnieją dowody wskazujące na występowanie β_2 AR w dwóch postaciach, aktywnej i nieaktywnej, których równowaga w warunkach spoczynkowych receptora jest przesunięta w kierunku stanu nieaktywnego [33]. β_2 AR znajduje się

Ryc. 1. Schemat budowy receptora β_2 -adrenergicznego

w postaci aktywnej wówczas, gdy podjednostka α jest związana z GTP, a kompleks ten (α -GTP) pośredniczy w sprzężeniu receptora z cyklazą adenylanową. Zastąpienie GTP przez GDP katalizuje konwersję ATP do cAMP przez cyklazę adenylanową oraz znacznie obniża powinowactwo podjednostki α do receptora, powodując jej oddysocjowanie i powrót receptora do nieaktywnego niskoenergetycznego stanu. Zatem, pojawienie się podjednostki α związanej z GDP warunkuje konwersję receptora do postaci nieaktywnej. Podjednostka α łączy się ponownie z podjednostkami $\beta\gamma$ tworząc heterotrimer białka G. Uważa się, że β_2 AG nie wykazują swego działania przez indukowanie zmiany konformacyjnej receptora, lecz oddziałują przez wiązanie się i tymczasowe stabilizowanie receptora w jego stanie aktywnym, tj. związanym z kompleksem podjednostki α -GTP, co przesuwa równowagę dwóch postaci receptora w kierunku tego stanu [33]. Wydaje się zatem prawdopodobne, że konsekwencją spontanicznej, aczkolwiek nieczęstej konwersji nieaktywnej postaci receptora w aktywną, która zachodzi w nieobecności agonisty, jest podstawowy poziom aktywności receptora. Natomiast rola β_2 AG polega na amplifikowaniu tej niewielkiej inherentnej aktywności β_2 AR. Na istnienie dwóch stanów receptora wskazuje utrzymywanie się dużych wewnątrzkomórkowych stężeń cAMP w nieobecności agonisty, wywołane przesunięciem równowagi w kierunku stanu aktywacji receptora pod wpływem mutacji polegających na zmianie pojedynczych aminokwasów w białku receptorowym [20,33].

β_2 -adrenolityk wiąże się z dużym powinowactwem do nieaktywnej, niskoenergetycznej postaci β_2 AR odsuwając równowagę od jego stanu aktywnego. Potwierdzają to wyniki badań, w których dodanie GDP powodowało inhibicję wiązania β_2 AG z receptorem i zwiększało wiązanie β_2 -adrenolityków [8]. Uważa się więc, że antagoniści β_2 AR nie mogą być uważani za współzawodniczących z agonistami bezpośrednio o ten sam receptor, ponieważ wiążą się z inną postacią białka receptorowego i przesuują równowagę re-

ceptora w kierunku stanu nieaktywnego, mimo to, iż ich kompetycja dotyczy tego samego regionu receptora.

Mechanizm indukcji relaksacji mięśni gładkich dróg oddechowych wywołany wzrostem stężenia cAMP nie jest całkowicie zrozumiały. Przyjmuje się, że cAMP aktywuje kinazę białkową A (PKA), która fosforyluje główne białka regulatorowe uczestniczące w kontroli napięcia mięśni. Wiadomo również, że działanie cAMP jest związane z hamowaniem uwalniania jonów Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych miejsc ich magazynowania, zmniejszaniem wnikania tych jonów do komórek ze środowiska zewnątrzkomórkowego i sekwestracją wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} . Procesy te prowadzą do obniżenia stężenia jonów Ca^{2+} w komórce, co wywołuje relaksację mięśni gładkich dróg oddechowych [22]. Ponadto wskazuje się, że odpowiedź relaksacyjna na działanie β_2 AG może być uwarunkowana mechanizmami cAMP-niezależnymi, polegającymi na bezpośredniej interakcji aktywnej podjednostki α (α -GTP) białka Gs z kanałami K^+ , obecnymi w błonie plazmatycznej komórek mięśni gładkich dróg oddechowych [7]. Kanał K^+ bramkowany napięciem odgrywa ważną rolę w modulowaniu potencjału błonowego w następstwie stymulacji β_2 AR przez agonistę i w ten sposób może uczestniczyć w odpowiedzi relaksacyjnej na stymulację β_2 AR [25]. Rolę aktywacji kanału K^+ przez β_2 AG potwierdzają obserwacje hamowania stymulacji β_2 AR przez agonistę w obecności charybdotoksyny i iberiotoksyny, inhibitorów kanałów K^+ o dużej przewodności, aktywowanych przez jony Ca^{2+} [5]. Inhibitory te, mimo znacznego hamowania wpływu aktywacji β_2 AR na relaksację mięśni gładkich dróg oddechowych, nie wykazują podobnego działania w komórkach tucznych, co wskazuje na swoistość komórkową procesów transdukcji sygnału. Na poparcie udziału przepływu jonów K^+ w aktywacji β_2 AR przez β_2 AG wskazuje obserwacja depolaryzacji błony komórkowej i otwarcia kanałów K^+ w komórkach mięśni gładkich tchawicy bydłowej pod wpływem β_2 -mimetyków – izoprenaliny i salbutamolu. Działania tego nie

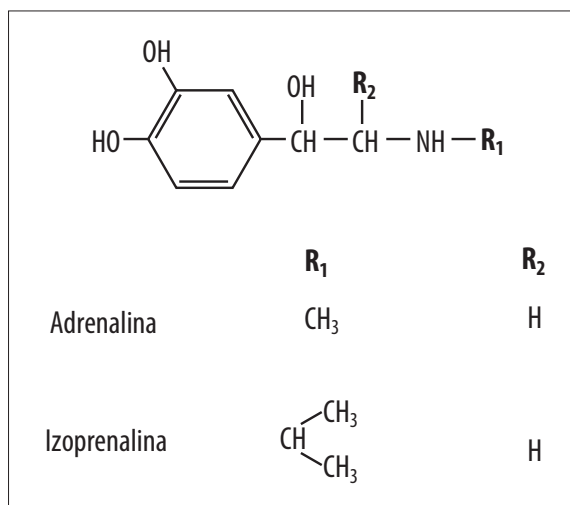
obserwowano jednakże w obecności salmeterolu, mimo iż lek ten, podobnie jak izoprenalina i salbutamol, wywoływał relaksację badanych preparatów tkankowych [5]. Analiza tych wyników sugeruje, że aktywacja kanałów K^+ może odgrywać pewną rolę, ale nie jest niezbędna w relaksacji mięśni gładkich dróg oddechowych.

Sygnal pobudzenia β_2 AR najczęściej jest przekazywany przez białko Gs i układ PKA zależny od cAMP. Jednakże istnieją dowody, że β_2 AR może być również sprzężony z inhibującym białkiem G (białko Gi) wrażliwym na toksynę krztuśca, które hamuje cyklazę adenylanową. Stwierdzono mianowicie, że β_2 AR aktywuje kinazę MAP (mitogen-activated protein) z udziałem podjednostek $\beta\gamma$ białek Gi oraz szlaku obejmującego niereceptorową kinazę tyrozynową cSrc i białka Ras [9]. Aktywacja tego procesu wymaga fosforylacji β_2 AR przez PKA, co potwierdzają obserwacje, że zmutowany β_2 AR pozbawiony miejsc fosforylacji nie ma zdolności stymulowania kinazy MAP, aktywuje natomiast cyklazę adenylanową [23]. W fosforylacji β_2 AR oprócz PKA może uczestniczyć również cAMP-niezależna kinaza, która fosforyluje receptor wyłącznie związany przez agonistę [13]. Wiadomo, że modyfikacja kowalencyjna receptorów przez fosforylację jest związana z ich zaburzonym sprzężaniem z białkami G lub może prowadzić do ich internalizacji z powierzchni komórki [38]. Uważa się więc, że fosforylacja β_2 AR może być wykorzystywana w procesie jego rozprzężania od białka Gs, a także może stanowić mechanizm jego przełączania z białka Gs na białko Gi reprezentując rodzaj inhibicji zwrotnej w celu zahamowania transmisji sygnału z receptora i terminacji odpowiedzi biologicznej [20].

ROLA MODYFIKACJI STRUKTURY β_2 -AGONISTÓW W ICH EFEKTACH FARMAKOLOGICZNYCH

Odkrycie izoprenaliny w 1941 roku stanowiło pierwszy ważny etap w produkcji nowych leków o selektywnym działaniu rozkurczowym na mięśnie gładkie oskrzeli [32]. Jednak ze względu na objawy niepożądane spowodowane małą selektywnością, odpowiedzialne za wiele zgonów chorych na astmę w latach sześćdziesiątych, izoprenalina została wycofana z terapii astmy [43]. Z powodu swej aktywności używana jest jedynie w badaniach naukowych i stanowi lek odnośnikowy, z którym porównuje się inne sympatykomimetyki. Izoprenalina stała się jednak podstawowym narzędziem klasyfikacji receptorów adrenergicznych na receptory α i β przez Ahlquista oraz zapoczątkowała erę nowej grupy leków nazwanych β -agonistami [43]. Z kolei zróżnicowanie receptorów β -adrenergicznych na β_1 i β_2 zapoczątkowało poszukiwanie leków swoistych wobec receptorów β_2 [26]. Wieloletnie badania w tej dziedzinie zaowocowały zsyntetyzowaniem wybiórczych β_2 -mimetyków, najpierw krótko, a następnie długo działających. Selektywność, moc oraz czas i szybkość działania β_2 AG zależy od zróżnicowania strukturalnego ich budowy i różnic w ich oporności na działanie enzymów metabolizujących te leki.

Struktura wszystkich klinicznie ważnych β_2 AG jest oparta na pierścieniu benzenowym i łańcuchu bocznym o dwóch atomach węgla zawierającym grupę aminową, do której może być dołączony podstawnik chemiczny w miejscu atomu wodoru. Obecność grup hydroksylowych w pozycjach 3 i 4 pierścienia benzenowego czyni z tej struktury pier-



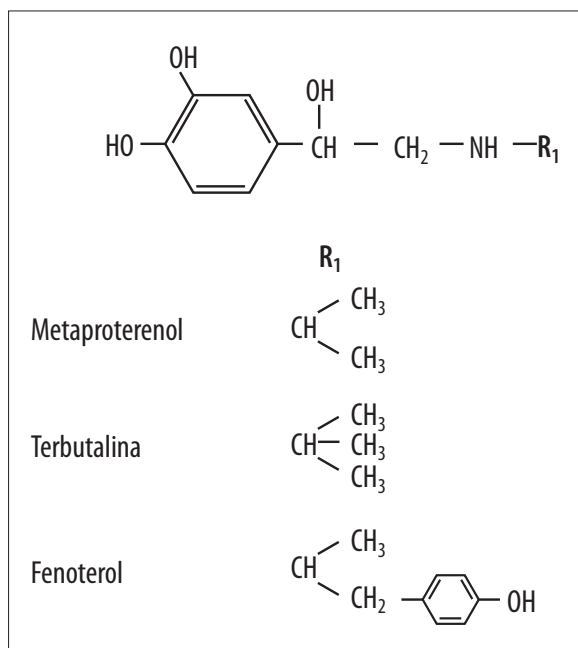
Ryc. 2. Struktura katecholamin

ścieniowej centrum katecholowe cząsteczki i dlatego, taki związek chemiczny jest katecholaminą (ryc. 2).

Podstawienie grup OH inną grupą chemiczną lub zmiana ich położenia przekształca lek w pochodną o mniejszej mocy niż syntetyczna katecholamina, jaką jest izoprenalina, która jest pełnym agonistą β_2 AR [14]. Analiza farmakologicznego działania izoprenaliny wykazała, że ugrupowanie katecholowe wyznacza m.in. jej skuteczność farmakologiczną, natomiast powinowactwo do β_2 AR jest uwarunkowane obecnością bocznego łańcucha izopropylaminoetanolu. Rozwój leków β_2 -adrenergicznych w ciągu ubiegłego wieku polegał więc na modyfikacjach podstawowej struktury katecholaminy, co spowodowało zwiększenie oporności leku na inaktywację metaboliczną w organizmie oraz wzrost jego selektywności [32]. Głównym szlakiem metabolizmu β_2 -agonistów jest enzymatyczna inaktywacja katalizowana przez O-metylotransferazę katecholową (COMT) i oksydazę monoaminową (MAO). Enzymy te występują w wielu tkankach. Działanie COMT jest uzależnione od obecności ugrupowania 3,4-dihydroksylowego w pierścieniu benzenowym aminy katecholowej, które warunkuje przyłączenie przez ten enzym grupy metylowej w pozycji 3.

Głównym celem modyfikacji struktury aminy katecholowej była więc zmiana położenia tych grup hydroksylowych w pozycje 3,5, jak to uczyniono w cząsteczce leków: metaproterenolu, terbutaliny i fenoterolu (ryc. 3) lub podstawienie grupy 3-OH inną grupą chemiczną, tj. hydroksymetylową w przypadku salbutamolu (ryc. 4), pirbuterolu i salmeterolu, oraz formyloaminową w przypadku formoterolu [32].

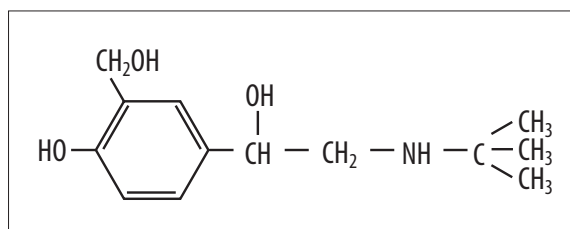
Oporność bitolterolu na działanie COMT uzyskano przez estryfikację grup hydroksylowych w położeniu 3 i 4 kwasem *p*-metylobenzoowym, natomiast struktura prokaterolu została zmodyfikowana przez utworzenie podwójnego układu pierścieniowego, który eliminuje obecność grupy 3-OH w cząsteczce tego leku. Konsekwencją farmakologiczną wszystkich modyfikacji ukierunkowanych na ugrupowanie 3,4-dihydroksylowe w strukturze aminy katecholowej, zmierzających do zmniejszenia szybkości metabolizowa-



Ryc. 3. Układy struktur rezorcynoli

nia przez COMT jest wydłużenie działania rozkurczającego β_2 AG w drogach oddechowych [32]. β_2 AG odporne na działanie COMT (np. salbutamol) mogą być również podawane doustnie. Jednak większość preparatów doustnych słabiej rozszerza oskrzela i ma znacząco większy odsetek działań niepożądanych w porównaniu z lekami stosowanymi wziewnie.

Drugi rodzaj modyfikacji struktury katecholamin polegał na powiększaniu łańcucha bocznego, czego następstwem było zwiększenie selektywności β_2 -mimetyków w stosunku do β_2 AR [32]. Zmodyfikowanie cząsteczki adrenaliny przez umieszczenie grupy izopropylowej przy atomie azotu w łańcuchu bocznym odpowiadało zdaniem Konzetta [24] za działanie bronchospazmolityczne izoprenaliny, oraz zainspirowało do zsyntetyzowania serii fenyloizopropylowych pochodnych izoprenaliny mających dodatkowo pierścień fenylowy dołączony do reszty izopropylowej. Wśród tych związków, protokilol uzyskał wówczas znaczenie kliniczne, jako aktywny związek w stosowaniu doustnym i dłużej działający analog izoprenaliny [44]. Ugrupowanie fenyloizopropylowe przy atomie azotu zostało również zaadaptowane w strukturach kilku innych β_2 AG, takich jak salmefamol, fenoterol i formoterol [44]. Łańcuch boczny prokaterolu zmodyfikowany został podstawnikiem etylowym na węglu α . Natomiast wprowadzenie większej grupy chemicznej, tj. III-rzędowej grupy butylowej przy atomie azotu w cząsteczce salbutamolu, terbutaliny, pirbuterolu i bitolterolu zwiększyło selektywność tych leków w stosunku do izoprenaliny i metaproterenolu, które zawierają mniejsze ugrupowanie izopropylowe przy atomie azotu. Nie stwierdzono jednak postępującego wzrostu swoistości β_2 AG przez wprowadzenie podstawnika większego od N-terminalnej reszty butylowej do struktury cząsteczki leku. Udowodniono to przyłączając grupę 4-hydroksyfenylową do reszty izopropylowej w cząsteczce fenoterolu, co zwiększyło wielkość jej łańcucha bocznego w stosunku do izoprenaliny i metaproterenolu [32]. Fenoterol ma większą



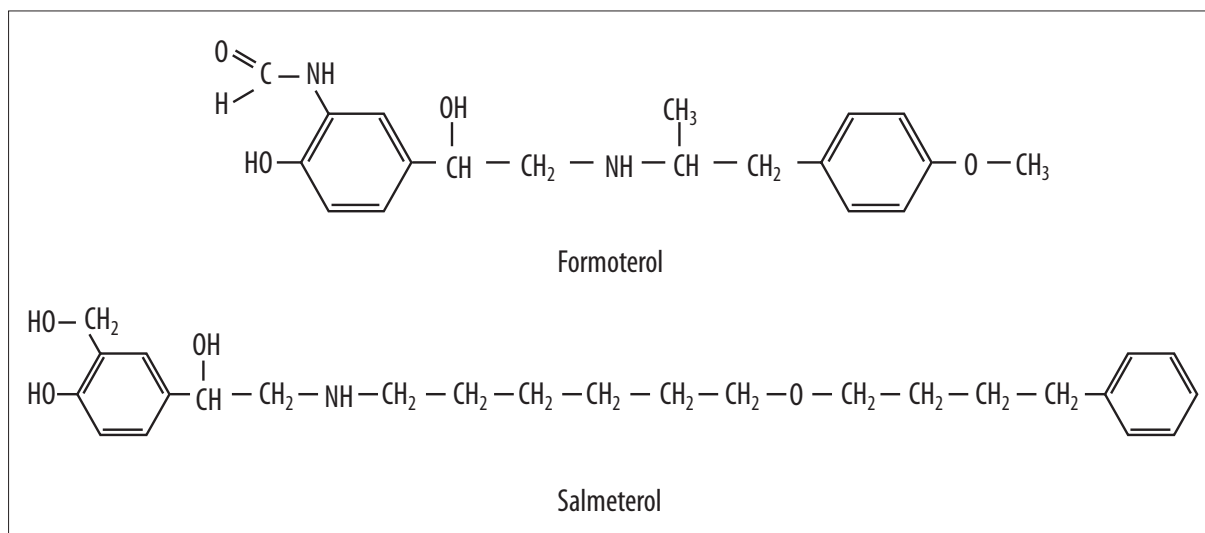
Ryc. 4. Struktura chemiczna salbutamolu, pochodnej saligeniny

moc i aktywność wewnętrzną niż salbutamol, jest jednak mniej selektywnym β_2 AG. Jego częste stosowanie wywołuje niekorzystne działanie, a regularne nadmierne dawkowanie zwiększa śmiertelność u chorych na astmę [31]. Kolejnym odkryciem w pracach nad modyfikacją struktury β_2 -mimetyków było stwierdzenie, iż powiększanie – aczkolwiek ograniczone – wielkości podstawnika chemicznego przy terminalnej grupie aminowej w cząsteczce β_2 AG nie tylko zwiększa swoistość β_2 AG, lecz również zabezpiecza lek przed degradacją enzymatyczną z udziałem MAO, co dodatkowo wydłuża czas rozkurczu oskrzeli.

Pierwszymi selektywnymi β_2 AG zastosowanymi w leczeniu chorych na astmę były salbutamol, fenoterol i terbutalina [43]. Leki te charakteryzowały się dużą skutecznością bronchodylatacyjną, ale stosunkowo krótkim czasem działania, wynoszącym 4–6 godzin. Mimo upływu kilkadziesiąt lat od ich wprowadzenia, leki te nadal są najczęściej stosowanymi w grupie krótko działających β_2 AG. Na polskim rynku farmaceutycznym są dostępne jedynie salbutamol, pochodna saligeniny oraz fenoterol, należący do rezorcynoli, podobnie jak metaproterenol i terbutalina. Metaproterenol z powodu braku selektywności od wielu lat nie jest już polecany, a pirbuterol i prokaterol nie są w Polsce stosowane.

Należy również podkreślić, że wiele zsyntetyzowanych związków β_2 AG nigdy nie znalazło zastosowania klinicznego. Niewątpliwym przełomem w tym zakresie było dopiero uzyskanie długo działających β_2 AG, wśród których głównymi przedstawicielami są salmeterol i formoterol (ryc. 5) [35,42].

Leki te wywołały ogromne ożywienie w badaniach β_2 AG, a przede wszystkim stworzyły nowe perspektywy przewlekłego leczenia astmy [44]. Oba β_2 -mimetyki w dużym stopniu przypominają swą strukturą fenyloetanoloaminową strukturę selektywnych, niecatecholaminowych β_2 AG. Jednakże oba leki mają również lipofilne łańcuchy boczne, z których obecny w salmeterolu jest znacznie dłuższy od występującego w formoterolu [32]. Cząsteczka salmeterolu ma grupę saligeninową (podobnie jak salbutamol) i przypomina swą budową heksoprenalinę, która składa się z dwóch cząsteczek noradrenaliny zawierających grupę aminową, połączonych ugrupowaniem heksametylenowym. Uważa się, że jedna część tej symetrycznej cząsteczki może oddziaływać z aktywnym miejscem receptora, natomiast przeciwny fragment strukturalny decyduje o selektywności leku. Podobnie jak w strukturze heksoprenaliny, w cząsteczce salmeterolu umieszczono heksametylenowy „mostek” łączący dwa fragmenty pierścieniowe cząsteczki [43]. Salmeterol (podobnie jak salbutamol) jest częściowym agonistą. Jego działanie relaksacyjne na mięśnie gładkie

Ryc. 5. Struktury chemiczne długo działających β_2 -agonistów

oskrzeli ocenia się na 65% [16]. Charakteryzuje się jednak największą selektywnością wśród wszystkich β_2 AG. Taka wybiórczość działania salmeterolu warunkuje duże bezpieczeństwo jego stosowania. Z kolei formoterol jest pełnym agonistą o skuteczności zbliżonej do izoprenaliny i fenoterolu, jednak znacząco mniejszej selektywności. Różnice we właściwościach fizyko-chemicznych salmeterolu i formoterolu uwarunkowanych ich budową chemiczną, a przede wszystkim sposobem ich wiązania z receptorem (omawianym poniżej) są związane też z różnym początkiem działania tych leków, tj. wolniejszym dla salmeterolu w porównaniu do formoterolu. Wykazano to w doświadczeniach *in vitro* prowadzonych na fragmentach oskrzeli i na izolowanych komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych oraz potwierdzono badaniami klinicznymi [34]. Sugeruje się, że z powodu tych właściwości formoterol mógłby być stosowany jako lek doraźny w leczeniu zaostrzeń astmy. Pogląd ten nie jest jednak powszechnie akceptowany, a na pewno wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach.

STEREOIZOMERIA β_2 -AGONISTÓW

Obecność grupy OH przy atomie węgla β (β -OH), pochodzącej od reszty etanoloaminy w cząsteczce β_2 AG jest przyczyną asymetryczności strukturalnej tej cząsteczki i jej występowania w postaci izomerów optycznych (R) i (S), zwanych enancjomerami. Endogenna adrenalina ma konfigurację (R). Synteza adrenaliny i jej analogów z wykorzystaniem klasycznych metod chemicznych prowadzi do otrzymania mieszaniny racemicznej enancjomerów (R) i (S). Mimo że od dawna wiadomo, iż farmakologiczna aktywność racematu adrenaliny zależy od enancjomeru (R), syntetyczne pochodne adrenaliny były produkowane w ciągu ubiegłego wieku w postaci racematów, gdyż z powodów technicznych i ekonomicznych produkcja czystych enancjomerów nie była opłacalna [43]. Analizując w latach siedemdziesiątych ub.w. aktywność rozdzielonych izomerów optycznych nowych β_2 -mimetyków, tj. salbutamolu i terbutaliny, stwierdzono, że właściwość relaksacji mięśni gładkich oskrzeli jest uwarunkowana obecnością enancjomeru (R), co prawdopodobnie wynika z optymalnej interakcji przestrzennej pomiędzy skierowaną w dół grupą OH

β_2 AG, a resztą Ser 165 receptora [20]. Izomer (R) salbutamolu wykazuje 100-krotnie silniejsze działanie w porównaniu z postacią (S), aczkolwiek stwierdzono, że obecność enancjomeru (S) nie interferuje z aktywnością odmiany (R). Znaczną aktywnością charakteryzuje się natomiast (S)-salmeterol, który jest jedynie czterdziestokrotnie słabszy niż mieszanina racemiczna tego leku i nie antagonizuje działania jego izomeru (R) [21].

Obecność w cząsteczce β_2 AG więcej niż jednego centrum asymetrycznego jest przyczyną jej występowania w postaci więcej niż dwóch izomerów optycznych. W takich przypadkach selekcjonuje się parę diastereoizomerów, ponieważ diastereoizomery ulegają łatwiej rozdzieleniu niż enancjomery. Tak więc, formoterol stanowi mieszaninę racemiczną bardzo mocnego enancjomeru (RR) i nieaktywnego enancjomeru (SS), którzy różnią się swą aktywnością 1000-krotnie [12]. Prokaterol i izoetaryna są mieszaninami racemicznymi aktywnego enancjomeru (1R2S) i mniej aktywnego enancjomeru (1S2R).

W ostatnich latach pojawiły się sugestie wskazujące, że enancjomer (S) w mieszaninie racemicznej β_2 AG może wywoływać nadreaktywność dróg oddechowych, a nawet zwiększać ryzyko zgonu wśród chorych na astmę. Te sugestie pochodziły z badań, w których obserwowano zwiększoną reaktywność dróg oddechowych świnek gwinejskich w odpowiedzi na traktowanie enancjomerami (S) izoprenaliny, salbutamolu lub terbutaliny po uprzednim zastosowaniu histaminowego mediatora astmy [29]. Poddając dokładnej ocenie farmakologiczny profil (S) salbutamolu, stwierdzono, że ten stereoizomer ma odrębne właściwości farmakologiczne niezwiązane z pobudzeniem β_2 AR. Wykazano, że (S) salbutamol potęguje skurcz oskrzeli i indukuje nadwrażliwość dróg oddechowych u chorych na astmę. Izomer (S) salbutamolu jest metabolizowany 12-razy wolniej niż jego odmiana (R) i utrzymuje się dłużej w drogach oddechowych, zatem stosowanie regularne i nadmierne racemicznego salbutamolu może być odpowiedzialne za niekorzystne objawy występujące u niektórych chorych na astmę [3]. Obserwacje te stały się przyczyną zsyntetyzowania czystej odmiany (R) salbutamolu, znanej jako lewosal-

butamol (lewalbuterol), którą niedawno wprowadzono na rynek farmaceutyczny USA. Stwierdzono początkowo, że lewosalbutamol, β_2 -agonista trzeciej generacji zachowuje wszystkie korzystne cechy klinicznego działania racemicznego salbutamolu. Jednakże dokładna analiza klinicznych wyników stosowania tego enancjomeru nie wykazała istotnych korzyści w porównaniu ze stosowaniem racematu tego leku [1]. Niezależnie od wyników tych badań postuluje się jednak, iż opracowywanie w przyszłości nowych β_2 AG, skuteczniejszych niż dotychczas stosowane leki z tej grupy w kontrolowaniu objawów astmy powinno być związane z rozwojem czystego aktywnego enancjomeru.

MOLEKULARNE MECHANIZMY ODDZIAŁYWANIA β_2 -AGONISTÓW Z RECEPTOREM β_2 -ADRENERGICZNYM

Sposób oddziaływania β_2 AG z jego receptorem w komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych jest uzależniony w istotnym stopniu od wielkości i struktury cząsteczki agonisty. Cząsteczka salbutamolu o długości 11Å i strukturze hydrofilowej dociera do miejsca aktywnego β_2 AR bezpośrednio ze środowiska zewnątrzkomórkowego, czego konsekwencją jest szybki rozkurcz mięśni gładkich oskrzeli [18]. Jednakże czas związania leku z receptorem jest ograniczony, dlatego też działanie jest krótkotrwałe. Szczyt działania występuje po 30–45 minutach i trwa sześć godzin. Tak więc, struktura hydrofilowa krótko działających β_2 AG wiąże się z szybkim początkiem i krótkim czasem ich działania.

Formoterol, lek o umiarkowanie lipofilnej strukturze ulega częściowej akumulacji w błonie komórkowej, skąd progresywnie dociera do miejsca aktywnego receptora [2]. Wielkość puli akumulowanego leku zależy od zastosowanego stężenia lub dawki. Natomiast część cząsteczek leku, podobnie jak w przypadku salbutamolu, dociera do miejsca aktywnego β_2 AR i szybko aktywuje receptor. Efekty działania formoterolu są jednak nieco opóźnione w porównaniu z wywoływanymi przez salbutamol, ale aktywność relaksacyjna jest dłuższa z powodu „magazynowania” leku w błonie komórkowej i jest uzależniona od dawki leku [6]. Taki profil działania formoterolu został potwierdzony klinicznie u chorych na astmę, u których obserwowano rozkurcz oskrzeli przez 8, 10 i 12 godzin po zastosowaniu leku w dawkach 6, 12 i 24 μ g [37]. Szczyt działania formoterolu występuje po 1–2 godzinach.

Cząsteczka salmeterolu o długości 25Å jest 10 000 razy bardziej lipofilna niż cząsteczka salbutamolu i ma najwyższy współczynnik podziału w błonie komórkowej [19], ponieważ w całości jest w niej kumulowana. Badania modelowania molekularnego wykazały, że salmeterol przyjmuje w błonie orientację w taki sposób, że reszta saligeniny układa się w płaszczyźnie polarnych grup fosfolipidów, a heksametylenowy łańcuch boczny, którego długość równa jest głębokości monowarstwy fosfolipidowej i wynosi 17Å, pozostaje w bliskim sąsiedztwie hydrofobowych łańcuchów kwasów tłuszczowych [19]. Stwierdzono, że cząsteczka salmeterolu nie wykazuje ruchliwości poprzecznej typu „flip-flop”, czyli nie przenika z zewnętrznej do wewnętrznej monowarstwy fosfolipidowej, lecz dyfunduje bocznie w błonie komórkowej osiągając miejsce aktywne β_2 AR [36]. Translokacja tego leku jest procesem wolnym, trwającym ponad 30 minut [20], a szczyt jego działania występuje po 2–4 godzinach [42].

Badania doświadczalne wykazały, że wiązanie receptorem salmeterolu charakteryzuje się wolno przebiegającą odwracalnością oraz niekompetycyjnością, natomiast odwracalność komórkowa na działania leku jest całkowicie odwracalna i kompetycyjna [17]. Dzieje się tak dlatego, że długi łańcuch heksametylenowy cząsteczki salmeterolu łączy się z regionem niepolarnym błony komórkowej, umiejscowionym poza receptorem, aczkolwiek w jego sąsiedztwie, tzw. miejscem zewnętrznym (exo-site) [4]. Wiązanie z dużym powinowactwem łańcucha bocznego do tego miejsca umożliwia następnie powtarzalną, pulsacyjną aktywację receptora przez fragment „głowy” reszty saligeniny, co nadaje salmeterolowi cechę długo działającego β -agonisty powodującego długotrwały rozkurcz oskrzeli. Badania modelowania molekularnego pozwalają sugerować, że „głowa” reszty saligeniny przyjmuje uprzywilejowaną konformację „w dół” wiążąc się do miejsca aktywnego receptora, a długi elastyczny łańcuch boczny umiejscawia się głęboko w domenie rdzenia receptora, co wskazuje, że swoiste miejsce zewnętrzne exo salmeterolu może stanowić integralną część białka receptorowego, ważną dla jego funkcji biologicznej [20,27]. Uważa się, że exo-site wykazuje powinowactwo wyłącznie do salmeterolu i nie oddziałuje z innymi krótko i długo działającymi β_2 AG. Badania z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenyzy potwierdziły, że mechanizm działania salmeterolu obejmuje oddziaływanie łańcucha bocznego z pomocniczym miejscem wiązania znajdującym się poza miejscem aktywnym, stanowiącym region zawierający hydrofobowe aminokwasy w obrębie domeny IV β_2 AR [20]. Związanie łańcucha bocznego z miejscem exo zabezpiecza cząsteczkę przed oddysocjowaniem od receptora, natomiast „głowa” saligeniny może swobodnie wchodzić w kontakt z miejscem aktywnym. Z tego względu działanie salmeterolu na mięśnie gładkie dróg oddechowych jest wolniejsze w porównaniu z działaniem innych β_2 AG, takich jak salbutamol i formoterol. Jednakże, w odróżnieniu od formoterolu, którego czas działania można wydłużyć przez zwiększenie jego stężenia oddziałującego na tkankę, salmeterol ma inherentną właściwość długo działającego β_2 AG, tzn. jego działanie jest niezależne od dawki, co jest uwarunkowane wiązaniem do miejsca exo [20]. Uważa się, że uszeregowanie β_2 AG pod względem długości czasu ich działania po indukowanym skurczu oskrzeli jest następujące: salmeterol >> formoterol > salbutamol > terbutalina > fenoterol [6].

W kontekście wewnątrzkomórkowych mediatorów powiązanych z aktywacją β_2 AR, McCrea i Hill [30] stwierdzili szybki wzrost stężenia cAMP w komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych *in vitro* traktowanych izoprenalina i salbutamolem, podczas gdy salmeterol indukował wolniejszy wzrost stężenia cAMP, co jest uwarunkowane wolniejszą kinetyką osiągania miejsca aktywnego β_2 AR przez ten lek. Ponadto maksymalny wzrost stężenia cAMP w odpowiedzi na działanie salmeterolu uzyskuje jedynie 45% maksymalnego wzrostu wywołanego pod wpływem izoprenaliny, co potwierdza naturę salmeterolu jako częściowego agonisty. Jednakże odpowiedź w postaci wzrostu stężenia cAMP na działanie izoprenaliny i salbutamolu jest przejściowa, gdyż cAMP szybko wraca do poziomu podstawowego, natomiast salmeterol indukuje utrzymujący się ponad 120 minut wzrost stężenia cAMP. Zmiany stężenia cAMP w odpowiedzi na oddziaływanie β_2 AG, takich jak salbutamol i salmeterol z receptorem są z tego względu zgod-

ne z kinetyką ich funkcji biologicznych warunkujących relaksację mięśni gładkich dróg oddechowych.

REGULACJA ODPOWIEDZI RECEPTORA β_2 -ADRENERGICZNEGO. DESENSYTYZACJA

Z molekularnym mechanizmem oddziaływania β_2 AG z β_2 AR ściśle wiąże się obniżenie (down-regulation) i wzrost (up-regulation) wydajności przekazu sygnału przez receptor. Wrażliwość receptorów stymulowanych w sposób ciągły może ulec zmniejszeniu, skutkiem czego jest obniżenie wrażliwości adrenergicznej (desensytyzacja). Brak odpowiedzi na β_2 AG może wystąpić bezpośrednio po pobudzeniu receptora przez jego agonistę. Jest to naturalne i odwracalne zjawisko, wiążące się z opisaną wyżej dysocjacją podjednostki α białka G od receptora, które mija po ponownym związaniu i utworzeniu kompleksu α -GTP. Nie dochodzi wówczas do zmiany liczby receptorów. Jednakże istotna klinicznie może być tolerancja rozwijająca się w wyniku długotrwałego podawania β_2 AG. Tego typu inaktywacja β_2 AR wynika z jego sekwestracji, a następnie degradacji w obrębie cytoplazmy. W konsekwencji liczba β_2 AR ulega zmniejszeniu (down-regulation) i w związku z tym konieczna jest ponowna synteza białek receptorowych. Natomiast działanie glikokortykosteroidów oraz hormonów tarczycy jest związane z indukcją syntezy mRNA β_2 AR, co prowadzi do wzrostu liczby cząsteczek β_2 AR w błonie komórkowej (up-regulation). Tak więc jednoczesne podawanie β_2 AG z glikokortykosteroidami oraz wzajemne interakcje występujące na poziomie molekularnym między tymi grupami leków [11] tłumaczą rzadko obserwowaną w klinice oporność na β_2 AG.

MOLEKULARNE ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY β_2 -AGONISTAMI I GLIKOKORTYKOSTEROIDAMI

Od dawna wiadomo, że glikokortykosteroidy zwiększają transkrypcję genu kodującego β_2 AR zapobiegając jego desensytyzacji w mechanizmie down-regulation. Jednak dopiero niedawno udowodniono zjawisko związane z aktywacją receptora glikokortykosteroidów przez β_2 AG, która występuje m.in. przy podawaniu długo działających β_2 AG [11]. W procesie tym uczestniczą podjednostki β i γ białka

G, których rola nie była dotychczas jednoznacznie określona. Uważa się, że heterodimer $\beta\gamma$ aktywuje kinazę MAP, która fosforyluje nieaktywny receptor glikokortykosteroidowy związany z białkiem Hsp 90 powodując oddysocjowanie tego białka z jednoczesną aktywacją receptora. Może on wówczas szybciej przyłączyć steroid. Zatem długo działające β_2 AG zwiększają aktywność biologiczną steroidu.

Opisano również negatywne interakcje pomiędzy glikokortykosteroidami a β_2 AG. Miały one wynikać z działania β_2 AG hamującego aktywność receptora glikokortykosteroidowego. Mechanizm ten polegał na kompetycji pomiędzy czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez cAMP, zwanym CREB (cAMP response element binding protein) a kompleksem glikokortykosteroidu z jego receptorem. Obserwacje te nie zostały jednak ostatecznie potwierdzone [15].

β_2 AG – oprócz glikokortykosteroidów – są najważniejszymi spośród dostępnych obecnie leków stosowanych w terapii astmy. Podawanie krótko działających β_2 AG w istotny sposób zostało ograniczone przez systematyczną, przewlekłą steroidoterapię wziewną. Są one jednak nadal niezbędne w leczeniu zaostrzeń astmy, w których stanowią leki pierwszego rzutu. Wprowadzenie długo działających β_2 AG ponownie zwróciło uwagę na tę grupę leków. Wykazano zarówno na poziomie molekularnym, jak i klinicznym działanie synergistyczne tych leków, które ostatecznie umocniło pozycję β_2 AG i glikokortykosteroidów jako leków skutecznie kontrolujących objawy astmy.

Wydaje się mało prawdopodobne, aby złoty standard leczenia astmy (glikokortykosteroidy wziewne z długo działającymi β_2 AG) został zastąpiony przez inną strategię terapeutyczną. Może zmienić się jednak sposób podawania tych leków, czy ich wykorzystywanie w połączeniach z innymi lekami. Najważniejszym jednak zadaniem, stojącym przed chemikami i farmakologami jest poszukiwanie takich związków β_2 AG (czy również glikokortykosteroidów), których struktura chemiczna i profil farmakologicznych właściwości powodowałyby minimalizację czy też wręcz eliminację ryzyka działań niepożądanych. Inspiracją przyszłych badań dotyczących tego zagadnienia może być analiza strukturalno-funkcjonalnych implikacji oddziaływań β_2 AG z ich receptorem.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahrens R., Weinberger M.: Levalbuterol and racemic albuterol: are there therapeutic differences? *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001; 108: 681–684
- [2] Anderson G.P.: Formoterol: pharmacology, molecular basis of agonist and mechanism of long duration of a highly potent and selective β_2 -adrenoceptor agonist bronchodilator. *Life Sci.*, 1993; 52: 2145–2160
- [3] Boulton D.W., Fawcett J.P.: The pharmacokinetics of levosalbutamol: what are the clinical implications? *Clin. Pharmacokinet.*, 2001; 40: 23–40
- [4] Brittain R.T.: Approaches to a long-acting selective β_2 -adrenoceptor stimulant. *Lung*, 1990; 168: 111–114
- [5] Chiu P., Cook S.J., Small R.C.: β -Adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal K^+ -channels in bovine tracheal muscle: studies of mechanical activity and ion fluxes. *Br. J. Pharmacol.*, 1993; 109: 1149–1156
- [6] Coleman R.A., Johnson M., Nials A.T., Summer M.J.: Salmeterol but not formoterol persists at β_2 -adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.*, 1990; 99: 121P
- [7] Cook S.J., Small R.C., Berry J.L., Chiu P., Downing S.J., Foster R.W.: β -Adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal K^+ -channels in trachealis muscle- electrophysiological and mechanical studies in guinea pig tissue. *Br. J. Pharmacol.*, 1993; 109: 1140–1148
- [8] Costa T., Ogino Y., Munson P.J., Onaran H.O., Rodbard D.: Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory protein-linked receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol. Pharmacol.*, 1992; 41: 549–560
- [9] Daaka Y., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J.: Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G-proteins by protein kinase A. *Nature*, 1997; 390: 88–91
- [10] Davis C., Conolly M., Greenacre J.K.: Beta-adrenoceptors in human lung, bronchus and lymphocytes. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1980; 10: 425–432
- [11] Eickelberg O., Roth M., Lox R., Bruce V., Rudiger J., Johnson M., Block L.-H.: Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by β_2 -adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 1005–1010
- [12] Fozard J.R., Buescher H.: Comparison of the anti-bronchoconstrictor activities of inhaled formoterol, its (R,R)- and (S,S)-enantiomers and salmeterol in the rhesus monkey. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2001; 14: 289–295

- [13] Fraser C.M., Nelson H.S., Middleton E.: Adrenergic agents. W: Allergy. Principles and Practice, Red.: Middleton E., Reed C.E., Ellis E.F., Adkinson N.F., Yunginger J.W., Busse W.W. Mosby, St. Louis, 1993; vol. I, 778–785
- [14] Hall I.P.: β_2 -Adrenoceptor agonists. W: ASTHMA and COPD, Red.: Barnes P., Drazen J., Rennard S., Thomson N. Academic Press, London, San Diego, 2002; 521–526
- [15] Hancox R.J., Stevens D.A., Adcock I.M., Barnes P.J., Taylor D.R.: Effects of inhaled beta-agonist and corticosteroid treatment on nuclear transcription factors in bronchial mucosa in asthma. *Thorax*, 1999; 54: 488–492
- [16] Jack D.: A way of looking at agonism and antagonism: lesson from salbutamol, salmeterol and other β -adrenoceptor agonists. *Br. Clin. Pharmacol.*, 1991; 31: 501–514
- [17] Johnson M.: The pharmacology of salmeterol. *Lung*, 1990; 168: 115–119
- [18] Johnson M.: β_2 -Adrenoceptor agonists: optimal pharmacologic profile. W: The Role of β_2 -Agonists in Asthma Management. The Medicine Group, Oxford 6–8, 1993
- [19] Johnson M.: Salmeterol. *Med. Res. Rev.*, 1995; 15: 225–257
- [20] Johnson M.: The β -Adrenoceptor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 158: S146–S153
- [21] Johnson M., Butchers P.R., Coleman R.A., Nials A.T., Strong P., Summer M., Vardey C.J., Whelan C.J.: The pharmacology of salmeterol. *Life Sci.*, 1993; 52: 2131–2147
- [22] Johnson M., Coleman R.A.: Mechanisms of action of β_2 -adrenoceptor agonists. W: Asthma and Rhinitis, Red.: Busse W.W., Holgate S.T. Blackwell, Cambridge, 1995; 1278–1295
- [23] Joos L., Pare P.D., Sanford A.J.: β_2 -Adrenergic receptor polymorphisms and asthma. *Curr. Opin. Med.*, 2001, 7: 69–74
- [24] Konzett H.: On the discovery of isoprenaline. *Trends Pharmacol.*, 1981; 47–49
- [25] Kume H., Hall I.P., Washabow R.J., Takagi K., Kotlikoff M.I.: β -Adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway smooth muscle cAMP dependent mechanisms. *J.Clin. Invest.*, 1994; 93: 371–379
- [26] Lands A.M., Luduena F.P., Buzzo H.J.: Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci.*, 1976; 6: 2241–2249
- [27] Lewell X.Q.: A model of the adrenergic beta-2 receptor and binding sites for agonist and antagonist. *Drug Des. Discov.*, 1992; 9: 29–48
- [28] Liggett S.B., Bouvier M., Hausdorff W.P., O'dowd B., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: Altered patterns of agonist-stimulated cAMP accumulation in cells expressing mutant β_2 -adrenergic receptors lacking phosphorylation sites. *Mol. Pharmacol.*, 1989; 36: 641–646
- [29] Mazzoni L., Naef R., Chapman I.D., Morley J.: Hyperresponsiveness of the airways following exposure of guinea-pigs to racemic mixtures and diastomers of β_2 -selective sympathomimetics. *Pulm. Pharmacol.*, 1994; 7: 367–376
- [30] McCrea K.E., Hill S.J.: Salmeterol, a long-acting β_2 -adrenoceptor agonist mediating cyclic AMP accumulation in a neuronal cell line. *Br. J. Pharmacol.*, 1993; 110: 619–626
- [31] Mullen M., Mullen B., Carey M.: The association between β -agonist use and death from asthma. *JAMA*, 1993; 270: 1842–1845
- [32] Nelson H.S.: Beta-adrenergic therapy. In: Allergy. Principles and Practice Eds.: Middleton E., Reed C.E., Ellis E.F., Adkinson N.F., Yunginger J.W., Busse W.W. Mosby, St. Louis, 1993; vol. I, 785–790
- [33] Onaran H.O., Costa T., Rodbard D.: Subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits. *Mol. Pharmacol.*, 1993; 43: 245–256
- [34] Palmqvist M., Persson G., Lazer L., Rosenborg J., Larsson P., Lotvall J.: Inhaled dry-powder formoterol and salmeterol in asthmatic patients: onset of action, duration of effect and potency. *Eur. Respir. J.*, 1997; 10: 2484–2489
- [35] Rabe K.F., Chung K.F.: The challenge of long-acting beta-adrenoceptor agonists. *Respir. Med.*, 1991; 85: 5–8
- [36] Rhodes D.G., Newton R., Butler R., Herbert L.: Binding and structural studies of the interactions of salmeterol with membrane bilayers. *FASEB J.*, 1992; 6: A374
- [37] Ringdahl N., Derom E., Pauwels R.: Onset and duration of action of single doses of formoterol inhaled via Turbuhaler in mild to moderate asthma. *Eur. Respir. J.*, 1995; 8: 685
- [38] Sibley D.R., Lefkowitz R.J.: Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase as a model. *Nature*, 1985; 317: 124–129
- [39] Strader C.D., Candelore M.R., Hill W.S., Dixon R.A., Sigal I.S.: A single amino acid substitution in the β -adrenergic receptor promotes partial agonist activity from antagonists. *J. Biol. Chem.*, 1989a; 264: 16470–16477
- [40] Strader C.D., Candelore M.R., Hill W.S., Dixon R.A.F., Sigal I.S.: Identification of two serine residues involved in agonist activation of the β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, 1989b; 264: 13572–13580
- [41] Tota M.R., Candelore M.R., Dixon R.A.F., Strader C.D.: Biophysical and genetic analysis of the ligand binding site of the beta-adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991; 12: 4–6
- [42] Van Noord J.A., Smeets J.J., Raaijmakers J.A.M., Bommer A.M., Maesen F.P.V.: Salmeterol versus formoterol in patients with moderately severe asthma: onset and duration of action. *Eur. Respir. J.*, 1996; 9: 1684–1688
- [43] Waldeck B.: β -Adrenoceptor agonists and asthma – 100 years of development. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002; 445: 1–12
- [44] Weiner N.: Norepinephrine, adrenaline, and the sympathomimetic amines. In: Goodman Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, 6th ed. Ed.: Gilman A., Goodman L.S. MacMillan Publishing, New York, NY, 1980; 138–175
- [45] Wetterlin K.: Resolution of terbutaline, a new β -sympathomimetic amine. *J. Med. Chem.*, 1972; 15: 1182–1183