UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

TESI DI LAUREA TRIENNALE

Ossitocina e uso di peptidi sintetici come suoi antagonisti: il caso Atosiban

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Laureanda: Chiara Manganello

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

Indice

1. 1. Introduzione 1

1.1 Ossitocina e nascita dei peptidi 1

1.2 Ascesa dei peptidi come farmaci 1

1.3 Atosiban, peptide antagonista dell'ossitocina 3

2. 2. Scopo della tesi 4

3. 3. Ossitocina e antagonisti: sviluppo, struttura e ruolo di atosiban 5

3.1 Ossitocina 5

3.1.1 Struttura 5

3.1.2 Meccanismo d'interazione 5

3.1.3 Ruolo di agonisti e antagonisti 6

3.2 Evoluzione dei tocolitici e sviluppo degli antagonisti 7

3.3 Atosiban 9

3.3.1 Struttura e confronto con ossitocina 9

3.3.2 Farmacodinamica e meccanismo d'azione 10

3.3.3 Farmacocinetica e proprietà chimico-fisiche 11

3.3.4 Sintesi e sviluppo 12

3.3.5 Valutazione critica 15

4. 4. Nuovi analoghi e sfide per il futuro 17

4.1 Migliorie necessarie e possibili sfide per il progresso 17

4.2 Nuovi analoghi post-atosiban 18

5. 5. Conclusioni 21

6. 6. Bibliografia 22

1. Introduzione

1.1 Ossitocina e nascita dei peptidi

I peptidi sono catene di amminoacidi legati tra loro tramite legami peptidici (ammidici), che svolgono un ruolo centrale nella chimica bio-organica e supramolecolare. Il primo dipeptide è stato sintetizzato da Theodor Curtius nel 1881. Tuttavia, il padre fondatore della chimica che li riguarda è considerato Emil Fisher, il quale ha specificato il tipo di legame che lega gli amminoacidi per formare dipeptidi, polipeptidi e proteine, ovvero R_1-CONH-R_2, e sintetizzato il dipeptide glicilglicina **[1].** Il punto di svolta in questa branca della chimica avviene attorno agli anni '50 quando viene sequenziata e sintetizzata l'ossitocina per merito di Vincent du Vigneaud e del suo gruppo di ricerca, tramite la sintesi tradizionale in fase liquida allora conosciuta **[2].**

L'ossitocina è un peptide ciclico formato da nove amminoacidi scoperto per la prima volta nel 1906 da Sir Henry Dale, che viene prodotto nel cervello a livello dell'ipotalamo e poi rilasciato dalla neuroipofisi. Nel corpo umano svolge diversi ruoli importanti ed è coinvolto in numerosi processi fisio-patologici, come la regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene in risposta allo stress, la modulazione delle relazioni affettive e del comportamento sessuale, le funzioni metaboliche e cardiovascolari e i disturbi neuropsichiatrici; è nel corpo della donna, tuttavia, che svolge le azioni più importanti perché implicato nella stimolazione delle contrazioni uterine durante il parto e nel rilascio di latte durante l'allattamento **[3].**

Essendo il primo polipeptide di sintesi che ha dimostrato avere la stessa attività biologica di quello naturale, esso ha segnato una svolta nello sviluppo della chimica dei peptidi.

1.2 Ascesa dei peptidi come farmaci

Dopo la sintesi in soluzione dell'ossitocina di Du Vigneaud, la chimica ha compiuto numerosi progressi e ha sviluppato nuove tecniche, come la sintesi su fase solida (SPPS, solid-phase peptide synthesis) messa a punto da Bruce Merrifield nel 1963, per sintetizzare peptidi e piccole proteine **[4].** La SPPS è basata sull'utilizzo di un supporto solido su cui viene ancorato l'ultimo amminoacido della catena tramite legame covalente che coinvolge il gruppo carbossilico; successivamente, si aggiungono in sequenza inversa gli amminoacidi fino al primo; infine si stacca la catena dal supporto ottenendo il peptide desiderato; si riporta in *figura 1* un esempio della sintesi. La sintesi viene condotta dall'estremità C-terminale all'estremità N-terminale, in maniera opposta a quanto avviene con la sintesi ribosomiale, perché così con vari accorgimenti si riesce a limitare la racemizzazione degli amminoacidi. Essa è infatti molto probabile quando si attiva la funzione carbossilica per formare il legame ammidico. La SPPS permette di semplificare le operazioni da eseguire e soprattutto diminuire il tempo necessario per la sintesi, aspetto fondamentale **[1].**

Grazie a queste scoperte, e grazie ad alcuni ruoli che svolgono i peptidi a livello biologico, che possono essere ormoni, neurotrasmettitori, molecole segnale… tali catene sono state sempre più considerate

importanti target in ambito farmaceutico. In particolare, per merito anche dello sviluppo delle tecnologie omiche che studiano le interazioni tra geni, proteine e metaboliti nei sistemi biologici, sono stati identificati nel corso degli anni numerosissimi peptidi bersaglio coinvolti in processi patologici, fungendo da punto di partenza per sviluppare farmaci di natura peptidica che possiedono numerosi vantaggi rispetto alle comuni piccole molecole organiche di sintesi **[5].**

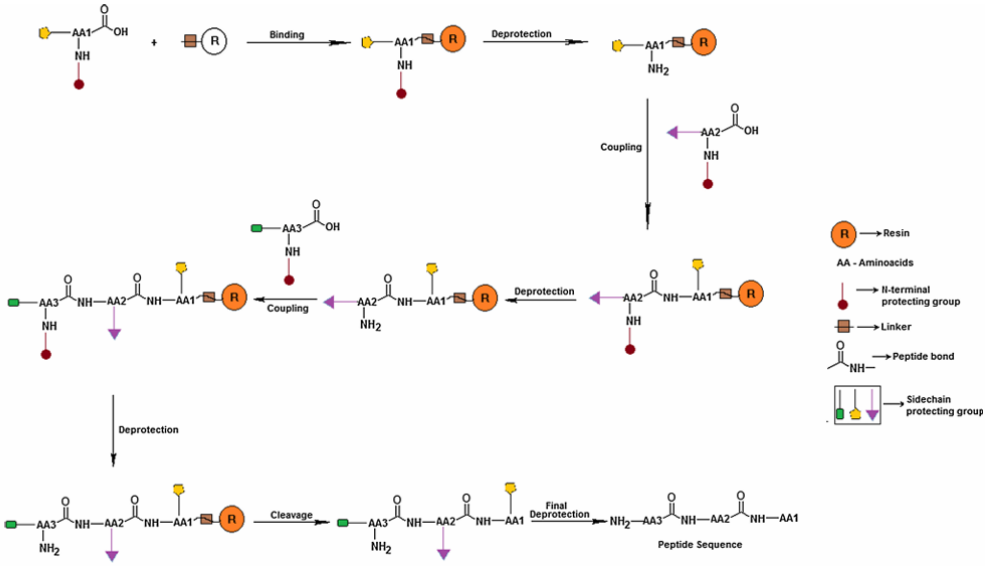


Figura 1. *Schema di sintesi su fase solida* ***[1].***

L'utilizzo di farmaci di natura peptidica possiede numerosi aspetti positivi: essi hanno alta specificità e affinità con il bersaglio; minori tossicità ed effetti collaterali rispetto alle piccole molecole, essendo naturalmente presenti a livello biologico, e un metabolismo di conseguenza più prevedibile; sono meno immunogenici rispetto a proteine ricombinanti o anticorpi; possiedono una sintesi più rapida; grazie alle dimensioni ridotte, possiedono una migliore penetrazione tissutale **[1], [6], [7].**

Tutti questi aspetti hanno permesso, a partire dagli anni '80, anche grazie allo sviluppo di nuove tecniche come la tecnologia del DNA ricombinante e migliorie in ambito biotecnologico, uno sviluppo via via maggiore dell'industria dei peptidi e del loro utilizzo come farmaci per trattare numerose patologie, tra cui malattie genetiche e infettive, tumori, diabete, ma anche condizioni cliniche avverse, o per essere utilizzati come sistemi di drug delivery **[4], [6].** Si riporta di seguito in *figura 2* un grafico che mostra la progressiva e continua crescita nel numero di farmaci peptidici approvati dall'FDA, U. S. Food and Drug Administration, dal 1950 al 2023.

Nonostante tale progresso e i numerosi vantaggi dati da questi farmaci peptidici, ci sono ancora aspetti da migliorare, che verranno approfonditi in seguito.

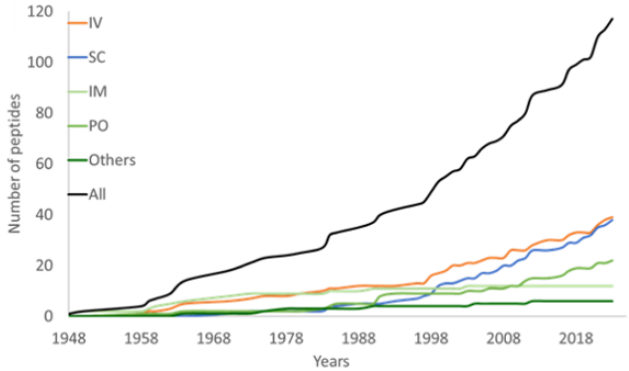


Figura 2**. Numero di farmaci peptidici approvati dall'FDA tra il 1950 e il 2023, suddivisi per modo di somministrazione; in particolare IV: intravenoso, S: sottocutaneo; IM: intramuscolo; PO: orale; IN: intranasale; IT: intratecale; ITr: intratracheale **[8].

1.3 Atosiban, peptide antagonista dell'ossitocina

Dopo il lavoro di Du Vigneaud per definire l'ossitocina e lo sviluppo via via crescente di farmaci di natura peptidica, numerosi analoghi sono stati sviluppati per studiare il ruolo fisiologico di quell'ormone, primo polipeptide di sintesi utilizzato in ambito clinico. Nonostante inizialmente tali composti avessero utilità solo sperimentale, le modifiche mirate alla molecola madre hanno portato, negli anni '80, alla sintesi di antagonisti completi. Tra questi è emerso l'atosiban, caratterizzato da elevata affinità recettoriale e assenza di attività agonista.

Nello stesso periodo, la ritodrina, una piccola molecola organica usata come beta-agonista, era approvata come tocolitico, ovvero per inibire l'azione dell'ossitocina ritardando il parto pretermine in gravidanze con particolari condizioni cliniche. Tuttavia, il suo impiego fu limitato dall'insorgenza di effetti avversi gravi, come l'edema polmonare **[9].** Dunque, è proseguito lo sviluppo dell'atosiban fino all'approvazione nel 2000 da parte dell'EMA, European Medicine Agency, con conseguente commercializzazione con il marchio Tractocile e dal 2013 anche come farmaco generico Atosiban SUN **[10], [11].**

2. Scopo della tesi

Questo elaborato si focalizza sul ruolo dell'ossitocina e sugli antagonisti sintetizzati nel corso del tempo, con particolare attenzione a farmaci antagonisti di natura peptidica. Verranno innanzitutto chiariti il ruolo dell'ossitocina, la sua struttura e le vie di trasduzione del segnale mediate dal legame con il recettore. In seguito verrà approfondito il ruolo degli antagonisti dell'ossitocina, esplicitando il motivo per cui sono stati indagati, descrivendo i vari tocolitici utilizzati nel corso del tempo, fino a giungere al peptide che riveste un ruolo centrale nell'elaborato: atosiban. Di quest'ultimo verranno analizzati la struttura, in relazione a quella dell'ossitocina, il ruolo, il legame con il recettore e il meccanismo d'azione, una sintesi industriale in soluzione collegata al suo primo metodo di sintesi su fase solida.

Particolare attenzione verrà data alle caratteristiche di questo farmaco in relazione alla sua natura chimica di peptide, e agli aspetti positivi e negativi che ne derivano, rispetto anche ad analoghi non peptidici, individuando anche spunti per il miglioramento futuro di tali farmaci.

Infine, si analizzeranno gli svantaggi dell'antagonista considerato e i conseguenti miglioramenti necessari che hanno portato allo studio e alla sintesi di nuovi analoghi, sia peptidici che non, nessuno dei quali, però, ha ancora superato tutti i test clinici ed è stato approvato.

3. Ossitocina e antagonisti: sviluppo, struttura e ruolo di atosiban

3.1 Ossitocina

3.1.1 Struttura

Dal punto di vista chimico l'ossitocina è una catena ciclica costituita da nove amminoacidi legati tra loro da legami peptidici (*figura 3*). Viene sintetizzata biochimicamente all'interno degli organismi viventi nell'ipotalamo ed è stata sequenziata e in seguito sintetizzata chimicamente in soluzione per la prima volta da Vincent Du Vigneaud e il suo gruppo di ricerca negli anni '50.

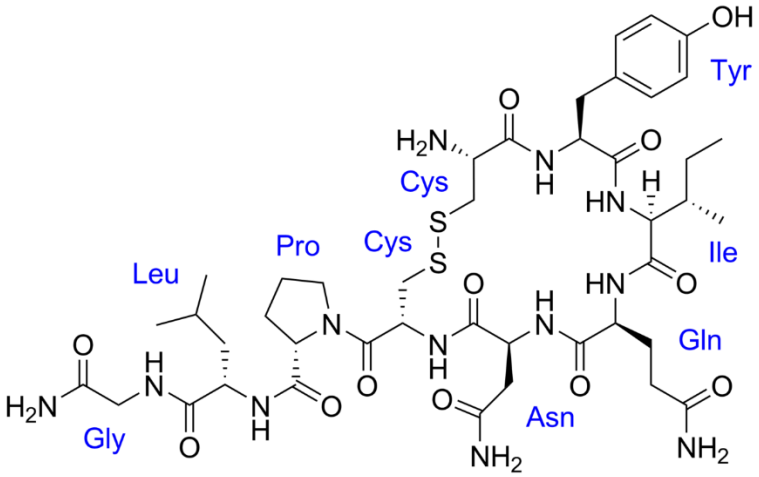
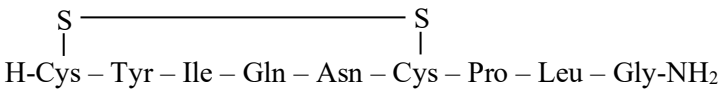


Figura 3. *Struttura dell'ossitocina* ***[11].***

In particolare, la sequenza si può scrivere in una forma più compatta come:



in cui si osservano gli amminoacidi in ordine cisteina, tirosina, isoleucina, glutammina, asparagina e nuovamente cisteina, che formano un ciclo grazie al ponte disolfuro tra i due gruppi tiolici delle cisteine in posizione 1 e 6. La catena che sporge dall'anello (Pro-Leu-Gly-NH_2) ha una certa rigidità nella struttura perché la prolina ha il gruppo amminico legato anche alla catena laterale. Tutti gli amminoacidi risultano in configurazione L, come si osserva solitamente in natura **[12].**

3.1.2 Meccanismo d'interazione

L'ossitocina è protagonista di una cascata di segnali il cui obiettivo finale è quello di portare alla contrazione del miometrio, muscolo liscio che compone la parete dell'utero responsabile della contrazione che provoca il parto. In *figura 4,* si può osservare visivamente tutto il meccanismo d'interazione. L'ossitocina si lega al suo specifico recettore di membrana, OTR, che appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G, GPCR, innescando una cascata di segnali. In particolare, il recettore è accoppiato alle proteine $G\alpha_{q/11}$ che attivano la fosfolipasi C, PLC, la quale ha il compito di idrolizzare un fosfolipide di membrana chiamato PIP_2 generando inositolo trifosfato, $InsP_3$, e diacilglicerolo, DAG, due messaggeri che svolgono due azioni diverse ma complementari. Il primo si

diffonde nel citoplasma legandosi a specifici recettori sul reticolo endoplasmatico, causando il rilascio di ioni Ca^{2+} e un aumento della loro concentrazione; il secondo, invece, rimane ancorato alla membrana cellulare attivando la proteina chinasi C, PKC, coinvolta in molteplici processi. Gli ioni Ca^{2+} prodotti si legano alla calmodulina, formando un complesso che attiva la chinasi della catena leggera della miosina, MLCK, che fosforila le catene leggere della miosina permettendo a quest'ultima di interagire con l'actina portando alla fine alla contrazione del miometrio; tale meccanismo è operativo anche nelle cellule mammarie mioepiteliali ed è responsabile della eiezione di latte. Oltre a questa cascata di segnali principale, l'interazione tra ossitocina e recettore influenza i canali voltaggio-dipendenti causando una depolarizzazione della membrana e l'ingresso di ulteriori ioni Ca^{2+}. Infine, vi sono altri meccanismi secondari, visibili in *figura 4*, che contribuiscono all'aumento della concentrazione di tale ione. In particolare, si osserva la stimolazione della proteina chinasi MAPK e della rho-chinasi, di cui la prima aumenta l'attività della fosfolipasi A2 citosolica che idrolizza i fosfolipidi liberando acido arachidonico, portando ad un incremento della produzione di prostaglandine tramite la ciclossigenasi-2, mentre la seconda è coinvolta in numerosi altri processi cellulari **[3], [9].**

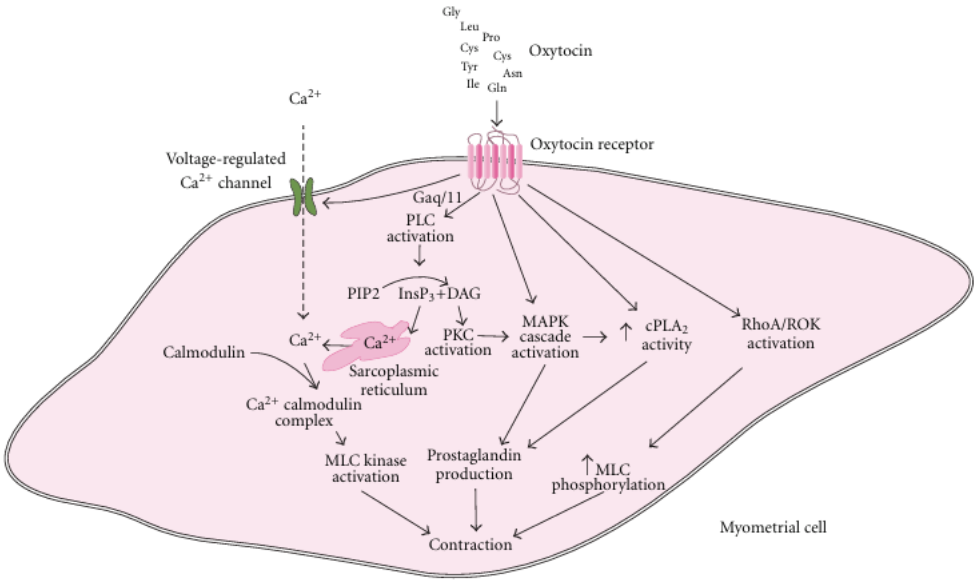


Figura 4. *Vie di trasduzione del segnale mediate dal recettore dell'ossitocina che inducono la contrazione del miometrio.* ***[3]***

3.1.3 Ruolo di agonisti e antagonisti

Oltre all'ossitocina, tuttavia, possono legarsi all'OTR anche altre molecole simili a quest'ultima: agonisti, che incrementano il suo ruolo, oppure antagonisti, che vi si oppongono; questo grazie a strutture tra loro molto simili che permettono alle molecole di interagire correttamente con la tasca del recettore.

In particolare, sono stati analizzati vari agonisti, sia di natura peptidica e di conseguenza molto simili alla struttura dell'ossitocina, sia non peptidici, i quali vengono utilizzati come farmaci per potenziare

gli effetti causati dall'ossitocina, sia a livello neurologico per disturbi legati all'ansia o alla schizofrenia, sia per indurre il parto e trattare le emorragie post-parto **[3].**

Per quanto riguarda gli antagonisti, invece, il loro ruolo è quello di intervenire nei parti pretermine, inibendo le contrazioni uterine **[3].** Essi, chiamati farmaci tocolitici, possono ritardare temporaneamente il parto, di circa 48-72 ore, in modo tale da permettere il trasferimento della gestante in centri specializzati in terapia intensiva neonatale e soprattutto la somministrazione di glucocorticoidi per la maturazione polmonare del feto, fondamentale per aumentare le probabilità di sopravvivenza di quest'ultimo **[13].**

3.2 Evoluzione dei tocolitici e sviluppo degli antagonisti

Lo sviluppo degli antagonisti dell'ossitocina comincia poco dopo la sua sintesi. Infatti, già negli anni '60 vari gruppi di ricerca hanno analizzato la struttura dell'ossitocina per trovare posizioni che, se variate, avrebbero potuto cambiare completamente l'effetto della molecola, e ciò si è osservato nel 1981 con la variazione della struttura dell'ossitocina in posizione 2 **[9].**

Questi studi, però, rappresentano un momento già molto avanzato nell'evoluzione dei tocolitici. Infatti, nel corso del tempo erano stati osservati altri possibili farmaci adibiti al trattamento dei parti pretermine, come ad esempio la relaxina, un ormone peptidico naturale scoperto nel 1926, il cui meccanismo prevede l'inibizione dell'effetto stimolante di una prostaglandina. In particolare, si ipotizzava che agisse tramite l'inibizione della fosfolipasi A2, responsabile della produzione di acido arachidonico; tuttavia, studi successivi hanno evidenziato che non vi sono prove sufficienti a dimostrare l'effettiva utilità di tale ormone nei parti pretermine.

Purtroppo sono state considerate anche sostanze ora ben note per effetti dannosi sul corpo umano, come oppiacei tra cui la morfina, l'etanolo o il solfato di magnesio, noto per le sue proprietà sedative. Esso infatti interviene nella modulazione dell'ingresso e della distribuzione del calcio all'interno delle cellule della muscolatura liscia; tuttavia anche in tale caso non sono stati evidenziati effetti tocolitici importanti, ma viene tutt'ora utilizzato per le sue proprietà anticonvulsive e neuroprotettive nell'eclampsia e nei neonati molto pretermine **[14].**

In seguito, grazie all'introduzione di agonisti β-adrenergici, c'è stato un importante sviluppo in questo campo. Si ricorda, ad esempio, la ritodrina (*figura 5*), farmaco approvato dall'FDA e perciò ampiamente diffuso negli Stati Uniti negli anni '80, che si lega a recettori accoppiati a proteine G, il cui effetto è quello di inibire la muscolatura liscia uterina e ridurre il rilascio di ioni Ca^{2+}. Tuttavia, tali farmaci provocavano numerosi effetti collaterali cardiovascolari sia sulla madre sia sul nascituro, portando ad una notevole diminuzione del loro uso e alla ricerca di alternative più valide **[13].**

Contemporaneamente, la scoperta dell'aumento delle contrazioni uterine da parte delle prostaglandine, porta alla ricerca di inibitori delle ciclo-ossigenasi, COX, responsabili della loro sintesi, conducendo allo sviluppo di numerosi farmaci, uno dei più importanti è l'indometacina (*figura 5*). Esso è un inibitore COX non selettivo, dunque funge da tocolitico ma può causare potenziali effetti collaterali gravi, come

disfunzioni renali, poiché si lega a più recettori; nonostante ciò, visti gli effetti tocolitici, esso è attualmente utilizzato negli Stati Uniti come farmaco fino a 32 settimane di gravidanza **[14].**

In aggiunta, tra le tipologie di farmaci studiati vi sono anche i bloccanti dei canali del calcio, come la nifedipina (*figura 5*), la quale, non essendo selettiva, agisce come tocolitico ma anche in situazioni di ipertensione, provocando effetti collaterali nella madre.

Infine, tra le varie categorie, una delle più importanti è quella dei farmaci antagonisti degli ormoni coinvolti direttamente nelle contrazioni uterine, tra cui ossitocina e arginina vasopressina. Studiandone la struttura e l'interazione con i recettori, sono stati sviluppati numerosi farmaci peptidici e non in grado di legarsi ai recettori specifici inibendo il processo che porta alla liberazione di calcio all'interno delle cellule, in modo tale da aumentare l'efficacia e diminuire gli effetti collaterali. Tra questi vi sono relcovaptan (*figura 5*), usato come antagonista del recettore di arginina vasopressina, responsabile delle contrazioni della muscolatura liscia uterina, con ruolo secondario rispetto all'ossitocina, e anche della vasocostrizione, usato principalmente come antagonista per quest'ultima funzione data la mancanza di studi esaustivi sugli effetti nel parto. Al contrario, per quanto riguarda l'ossitocina, è presente un peptide antagonista, atosiban, attentamente studiato e sviluppato, prevalentemente per le sue caratteristiche di tocolitico con pochi effetti collaterali rispetto ai suoi predecessori **[13], [3], [14].**

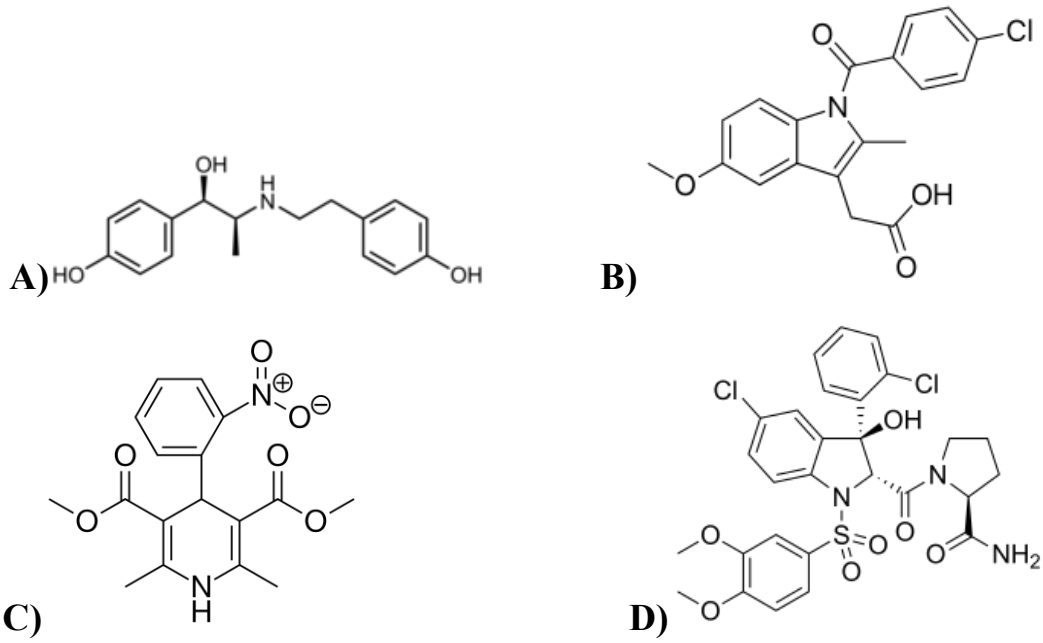


Figura 5. *Strutture molecolari di ritodrina (A)**[15],** indometacina (B) **[16],** nifedipina (C) **[17],** e relcovaptan (D) **[18].***

3.3 Atosiban

L'atosiban (*figura 6*) è il primo antagonista peptidico dell'ossitocina, utilizzato per il trattamento delle contrazioni uterine in parti pretermine, ad avere ricevuto l'approvazione per uso clinico.

È stato approvato nel 2000 dall'EMA come farmaco tocolitico utilizzabile solo tramite prescrizione medica per donne in gravidanza tra la 24ª e la 33ª settimana di gestazione, quando ci sono segni chiari di minaccia di parto pretermine, ovvero contrazioni regolari di durata almeno 30 secondi con almeno 4 contrazioni ogni 30 minuti, dilatazione della cervice di 1-3 cm e battito cardiaco del feto regolare. Lo scopo di tale farmaco è di ritardare fino a 48 ore il parto, in modo tale da somministrare corticosteroidi alla madre per favorire la maturazione dei polmoni del feto o per organizzare il trasferimento in un ospedale con terapia intensiva neonatale, fondamentale per monitorare l'atto finale della gravidanza e ottenere tutte le cure in caso di necessità **[10].**

3.3.1 Struttura e confronto con ossitocina

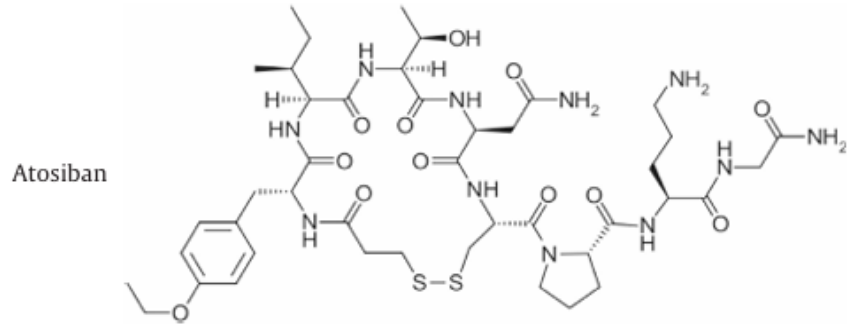


Figura 6. *Struttura dell'Atosiban* ***[19].***

L'atosiban possiede una struttura chimica (*figura 6*), molto simile a quella dell'ossitocina. In particolare, contiene un anello di 6 residui amminoacidici, chiuso tramite un ponte disolfuro tra i gruppi tiolici di una cisteina e dell'acido mercaptopropionico, e una coda laterale formata da tre amminoacidi. Si può osservare che la struttura è la stessa ma ci sono variazioni nelle posizioni 1, 2, 4 e 8: al posto di un residuo di cisteina, in posizione 1 vi è l'acido mercaptopropionico, a cui manca dunque il gruppo amminico terminale; in posizione 2 vi è il residuo di tirosina con configurazione D anziché L e con il gruppo alcolico esterificato, grazie al quale la degradazione enzimatica, estremamente selettiva, diventa più lenta e il farmaco può agire più a lungo; in posizione 4 la glutammina è stata sostituita con la treonina; infine al posto della leucina è stata inserita l'ornitina, amminoacido non essenziale derivato dall'arginina dopo la perdita del gruppo guanidinico. Tali modifiche permettono alla molecola di essere riconosciuta dal recettore dell'ossitocina e di legarvisi in modo tale da impedirne le funzioni. Queste differenze sono evidenziate in *figura 7*, dove sono poste a confronto le strutture dei due peptidi **[9].**

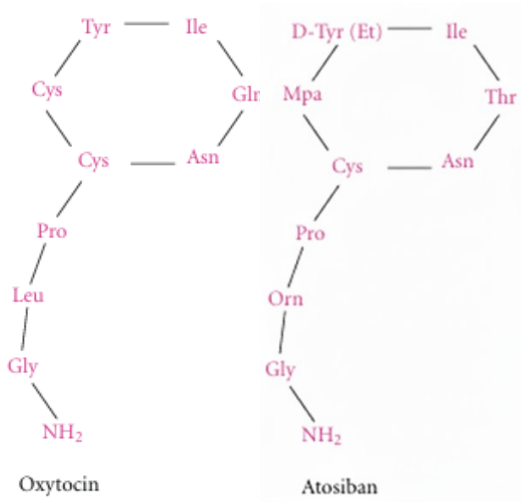


Figura** 7. Strutture di ossitocina e atosiban **[3].

3.3.2 Farmacodinamica e meccanismo d'azione

I recettori dell'ossitocina, a cui si lega l'atosiban, appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G, GPCR, di classe A. Esse sono proteine integrali di membrana caratterizzate da sette α-eliche transmembrana, TM1-TM7, connesse da anse idrofile intracellulari, IL, ed extracellulari, EL, con l'estremità N-terminale nello spazio extracellulare e quella C-terminale nell'altro, come illustrato in *figura 8*.

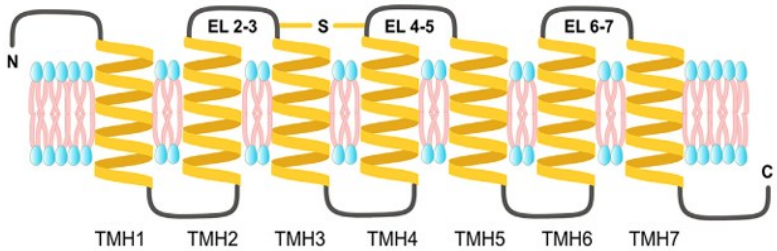


Figura 8.** Disegno schematico del recettore dell'ossitocina **[20].

In particolare le eliche TM2-TM7 contribuiscono a formare la tasca di legame per il ligando, ovvero il sito attivo, a cui possono legarsi un'ampia varietà di molecole, come gli antagonisti tra cui l'atosiban. Dagli studi di dinamica molecolare di complessi di atosiban e recettori simili a OTR, come quelli della vasopressina, si è osservato come il legame tra atosiban e OTR sia estremamente forte e selettivo. Questo comportamento è dato da diversi fattori: l'interazione idrofilica tra la parte C-ter data dall'Orn (8) e l'entrata della tasca idrofilica; quella idrofobica tra la parte N-terminale e la regione interna più idrofobica; il mantenimento di alcuni residui già presenti nell'ossitocina che hanno interazioni specifiche con il sito attivo. Tra questi vi sono le interazioni dei residui di glutammina presenti nel sito attivo con le catene N-terminali dei residui dell'anello, e diverse interazioni di dispersione tra residui come Val, Ala, Leu con Ile (3); variare il residuo in posizione 3 compromette infatti l'interazione; al contrario, nonostante vi sia un'interazione tra Leu (8) dell'ormone con il recettore, variare quel residuo

non inficia il legame. Infatti, è stato sostituito con Orn (8), la quale, basica e carica positivamente, ha un'interazione elettrostatica stabile con un residuo di acido aspartico, carico negativamente. Inoltre, si osservano un'interazione di tipo π-π tra il fenile di D-Tyr (OEt) (2) e i residui aromatici del recettore, un'interazione tra il ponte disolfuro dell'atosiban e i residui idrofobici come la metionina, e infine diversi legami a idrogeno, come quello tra Gly (9) e un residuo di Ser.
In conclusione, la doppia natura dell'atosiban è il motivo per cui l'interazione con il bersaglio risulta molto selettiva e stabile. La parte N-terminale, più idrofobica rispetto all'ossitocina, si posiziona più in profondità nella porzione idrofobica della tasca, interagendo con le eliche transmembrana apolari, mentre la parte C-terminale, più polare rispetto all'ossitocina, forma un'interazione ionica forte con un'ansa extracellulare del recettore **[21], [22].**
La conseguenza di tale insieme di interazioni determina una serie di effetti che complessivamente conducono all'inibizione della contrattilità uterina. In particolare, provoca un'inibizione dose-dipendente della produzione di inositolo trifosfato (IP_3) stimolata dall'ossitocina, con conseguente riduzione del rilascio di calcio intracellulare dai depositi del reticolo sarcoplasmatico; determina la chiusura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti presenti nella membrana plasmatica delle cellule del miometrio, impedendo l'ingresso di ioni Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare; inibisce il rilascio di prostaglandine mediato dall'ossitocina a livello dell'endometrio e delle membrane fetali, le quali svolgono un ruolo di potenziamento dei meccanismi descritti sopra **[9].**

3.3.3 Farmacocinetica e proprietà chimico-fisiche

Nelle donne in travaglio pretermine trattate con infusione di atosiban (300 µg/min per 6–12 ore), le concentrazioni plasmatiche allo stato stazionario vengono raggiunte entro un'ora dall'inizio della somministrazione, con valori compresi nell'intervallo 298–533 ng/ml. Dopo l'interruzione dell'infusione, la concentrazione plasmatica diminuisce rapidamente, con una fase di emivita iniziale di 0,21 ± 0,01 ore e una fase terminale di 1,7 ± 0,3 ore. La clearance media, ovvero il volume di plasma ripulito dal farmaco per unità di tempo, è pari a 41,8 ± 8,2 L/h, mentre il volume di distribuzione medio è di 18,3 ± 6,8 L; per quanto riguarda il legame di atosiban con le proteine plasmatiche, che ne determina l'inattività, esso si attesta tra il 46 e il 48% **[23].**
Dal punto di vista metabolico, sono stati identificati due metaboliti nelle urine e nel plasma, il principale è M1, des-(Orn^8, Gly-NH_2^9)-[Mpa^1, D-Tyr $(Et)^2$, Thr^4]-ossitocina. Questo metabolita si forma per degradazione dell'atosiban ed è farmacologicamente attivo, ma con una potenza circa 10 volte inferiore rispetto al farmaco originario (test *in vitro*). Le concentrazioni plasmatiche di M1 aumentano progressivamente durante l'infusione: il rapporto M1/atosiban è pari a 1,4 dopo due ore e a 2,8 al termine. La quantità di atosiban escreto immodificato nelle urine è molto ridotta (circa 50 volte inferiore a quella di M1), mentre la quota eliminata per via fecale non è stata determinata; è stato inoltre osservato che M1 viene secreto anche nel latte materno **[23].**

Infine, studi in vitro suggeriscono come atosiban non interferisca con il sistema degli isoenzimi del citocromo P450, riducendo la probabilità di interazioni farmacologiche basate su questo meccanismo.
Il farmaco può essere somministrato tramite iniezione, più rapida, prevalentemente per via endovenosa. Ogni fiala contiene una soluzione di 0,9 mL con 6,75 mg di atosiban, sottoforma di acetato; oppure può essere somministrato più lentamente tramite infusione sempre per via endovenosa, utilizzando fiale da 5 mL di soluzione con 37,5 mg di atosiban acetato, diluite fino ad una concentrazione di 0,75 mg/mL **[23].**
Il motivo di tali particolari metodi di somministrazione è legato alla natura del farmaco. Essendo un peptide, infatti, verrebbe degradato velocemente a livello gastrointestinale e faticherebbe ad attraversare le membrane data la sua polarità. Quindi, deve essere introdotto direttamente nel circolo sanguigno per via endovenosa.

3.3.4 Sintesi e sviluppo

Per quanto riguarda la sintesi dell'atosiban, nelle fasi iniziali del suo sviluppo e dei primi test clinici è stato impiegato il metodo SPPS, che permette di automatizzare le procedure rendendo la sintesi rapida anche con molecole complesse. Inoltre, la sintesi chimica permetteva di produrre qualsiasi sequenza, comprese quelle che contengono amminoacidi con configurazione D o di origine puramente sintetica, cosa non possibile con metodi biotecnologici.
Tuttavia, a causa delle richieste crescenti di atosiban, è stato preso in considerazione il metodo della sintesi in soluzione per la produzione su larga scala. In particolare, per cercare di mantenere equivalenti le quantità di impurezze, si è scelta una sintesi che avesse in comune con la sintesi iniziale un intermedio, come si può osservare dalle *figure 9 e 10,* un nonapeptide protetto.

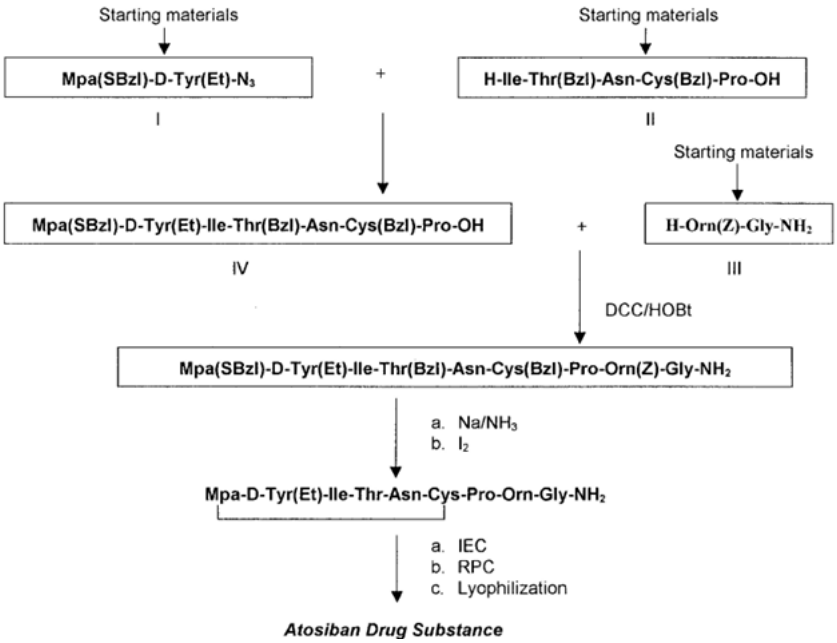


Figura 9. *Sintesi in soluzione dell'atosiban* ***[24].***

Nella sintesi in soluzione schematizzata in *figura 9*, la strategia adottata è quella della sintesi convergente utilizzando amminoacidi protetti all'estremità N terminale con il gruppo Boc (*tert*-butilossicarbonile) e protetti anche in catena laterale con i gruppi appropriati: si sintetizzano separatamente tre segmenti, due dipeptidi, I e III, e un pentapeptide, II, che vengono poi condensati insieme a formare il nonapeptide protetto, l'intermedio V. Si osserva che i frammenti II e III hanno all'estremità C-terminale prolina e glicina, amminoacidi ottimi dal punto di vista strategico poiché permettono di ridurre notevolmente il rischio di racemizzazione. Per la condensazione dei frammenti IV e III, inoltre, si attiva il residuo C-terminale via esteri attivi, con DCC (dicicloesilcarbodiimmide) e HOBt (N-idrossibenzotriazolo), attivando debolmente per evitare racemizzazione.

Una volta ottenuto l'intermedio, dopo essere stato purificato, viene sottoposto a una reazione di deprotezione. Questa fase critica utilizza sodio in ammoniaca liquida per rimuovere contemporaneamente tutti i gruppi protettivi presenti sulla molecola.

Dopo la deprotezione, la molecola di peptide lineare viene ossidata. L'ossidazione, condotta con iodio in acido acetico acquoso è la fase in cui si forma il ponte disolfuro tra la cisteina e l'acido mercaptopropionico, dando origine alla struttura ciclica dell'atosiban. Questo passaggio è noto per essere particolarmente critico, in quanto può generare impurità se non ben controllato.

Infine, il peptide viene purificato per rimuovere le impurezze residue. La purificazione su larga scala viene eseguita mediante una combinazione di cromatografia a scambio ionico (IEC), con la quale si passa da una purezza del 90% a circa il 96%, e cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RC-HPLC) usando una colonna di silice C-18 e un gradiente di etanolo in acido acetico, giungendo ad almeno il 98% di purezza. Dopo la purificazione, il prodotto viene concentrato tramite osmosi inversa, soggetto a diafiltrazione, lavando la soluzione con un solvente per rimuovere l'etanolo, e infine isolato tramite liofilizzazione, ottenendo così il prodotto finale in forma solida come sale di acetato, con una purezza piuttosto elevata e impurezze minori dello 0,1% **[24].**

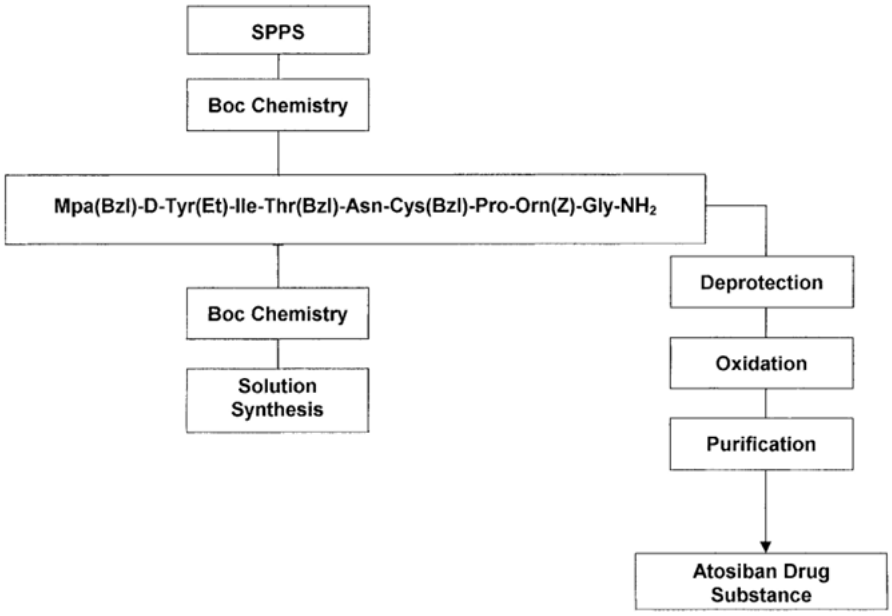


***Figura 10**. Schema di sintesi utilizzando l'intermedio comune tra sintesi in soluzione e in fase solida* **[24].**

In conclusione, l'utilizzo iniziale del metodo di sintesi su fase solida è giustificato da:

- rapidità e semplicità del procedimento, data l'assenza della purificazione intermedia sostituita dal lavaggio di reagenti e sottoprodotti;
- automazione, che consente una maggiore riproducibilità su piccola scala;
- maggior efficienza, poiché le reazioni possono essere spinte verso il completamento usando un eccesso di reagenti.

Tuttavia tale tecnica possiede alcuni lati negativi, tra cui un difficile scale-up, dato che i volumi di reagenti, solventi e resina necessari aumentano notevolmente con la scala, rendendo il processo non economicamente sostenibile. Inoltre, la purificazione del prodotto finale è più complessa e costosa per l'assenza di purificazioni intermedie.

Al contrario, è stata illustrata una possibile via di sintesi in soluzione per la produzione su larga scala, che è economicamente più efficiente per grandi volumi. Prevede una purificazione intermedia, rimuovendo le impurità man mano che si formano, e permette un maggior controllo delle varie reazioni del processo, consentendo una gestione più precisa delle condizioni di reazione.

Anche in tale metodo, però, si osservano svantaggi. Esso infatti risulta essere piuttosto complesso, con diversi passaggi laboriosi, e richiede un uso considerevole di solventi il cui smaltimento ha un impatto ambientale significativo e costi elevati. Pertanto, il rendimento è potenzialmente inferiore, perché ogni passaggio di purificazione intermedio può portare a una perdita di materiale, riducendo il rendimento complessivo del processo rispetto alla sintesi in fase solida. Nonostante ciò, però, i benefici derivanti dalla via di sintesi in soluzione superano gli aspetti negativi, motivo per cui è questa la tecnica utilizzata, che ha comunque in comune con la sintesi inizialmente utilizzata lo stesso nonapeptide come intermedio **[24].**

Il farmaco che ha come principio attivo l'atosiban è stato approvato per la sua commercializzazione in Europa sotto il nome di Tractocile dall'EMA, European Medicines Agency, il 20 gennaio 2000. Le motivazioni che hanno portato alla sua approvazione includono che atosiban ha dimostrato efficienza nel posticipare i parti pretermine pari a quella dei precedenti β-agonisti, ma allo stesso tempo che è meglio tollerato rispetto a questi ultimi. Pertanto, i benefici apportati superano i rischi **[10].**
In altre parti del mondo, come ad esempio in Canada, l'uso dei tocolitici è molto raro, per politiche interne al paese, ma il farmaco è comunque stato approvato. Al contrario, in altri paesi come USA e Giappone, il farmaco non è stato approvato. L'azienda produttrice non ne ha richiesto l'approvazione, anche perché in tali paesi si utilizzano come tocolitici altre sostanze, tra cui gli inibitori delle COX, come l'indometacina, e i bloccanti dei canali del calcio. Inoltre, le motivazioni dell'FDA includono il fatto che non vi siano abbastanza benefici in modo tale che il rapporto benefici/rischi sia piuttosto elevato. Infatti, negli studi eseguiti non sono stati evidenziati notevoli miglioramenti negli esiti neonatali, anche se si sono rilevati miglioramenti negli effetti collaterali causati alla madre; inoltre, complici di tale negazione sono anche i costi di produzione dell'atosiban, molto più elevati rispetto a piccole molecole, come ad esempio l'indometacina **[25], [26].**

3.3.5 Valutazione critica

Volendo eseguire un'analisi critica tra il peptide analizzato nell'elaborato e gli altri farmaci utilizzati come tocolitici, dalla *tabella 1* si può innanzitutto evincere come siano solo atosiban e β-agonisti i farmaci approvati principalmente per le loro funzioni tocolitiche. Gli altri vengono utilizzati primariamente per altre funzioni, stando a dimostrare che sono meno selettivi e colpiscono più bersagli, andando a provocare anche diversi effetti collaterali.
Valutando gli effetti avversi, si osserva che l'atosiban è il farmaco che provoca il minor numero di effetti collaterali sia per la madre che per il feto.
Si osserva inoltre che tutti necessitano di controllo, sia perché farmaci con un ruolo molto delicato, sia perché la maggior parte viene somministrata per via endovenosa.
Osservando l'ultima colonna della *tabella 1*, si può notare l'ostacolo maggiore alla diffusione dei farmaci peptidici, ovvero il fatto che hanno costi molto elevati, derivante dalla ricerca per il loro sviluppo e dalla sintesi piuttosto complessa.

Tocolytics	Approved	Prolongation of pregnancy* by 48 h	Adverse effects – mother	Adverse effects – child	Mode of application	Amount of monitoring needed	Drug costs
Beta sympathomimetics (continuous i. v.)	+	++	+++	++	i. v.	high	moderate
Indomethacin	–	++(+)	(+)	+(+)	rectal/oral	low	very low
Atosiban	+	++	(+)	–	i. v.	low	high
Magnesium sulphate	–	Controversially dose-dependent	Dose-depen-dent ++	++	i. v.	moderate	moderate
Calcium channel blockers (nifedipine)	–	++(+)	+	(+)	oral	low	very low
NO donors	–	++	++	–	transdermal	low	low

*evaluated according to meta-analyses of Haas et al. 2009 and 2012 [25, 26]
To some extent no direct comparative studies
Preference: Nifedipine, indomethacin < 32 weeks of pregnancy (48 h) (off-label use); Atosiban: approved

Tabella 1**. Confronto di proprietà tra vari tocolitici **[26].

Riassumendo, le caratteristiche generali dei farmaci peptidici, che li rendono sempre più vantaggiosi, sono l'alta potenza, la selettività e la bassa tossicità. Tutto questo perché le molecole di natura peptidica hanno caratteristiche analoghe a molecole già presenti nell'ambiente biologico, come osservato nella struttura dell'atosiban in riferimento a quella dell'ossitocina e al bersaglio. Rispetto a farmaci che sono piccole molecole, i peptidi sono più specifici e ciò si traduce in un minor numero di effetti collaterali. Inoltre, a causa della breve emivita hanno una minore propensione ad accumularsi nei tessuti e vengono perciò eliminati dal corpo più velocemente.

Anche rispetto a farmaci biologici i peptidi sono vantaggiosi perché: i) permeano meglio le membrane, potendo così attraversare il corpo più velocemente; ii) sono meno immunogenici, con così meno probabilità di scatenare reazioni del sistema immunitario; iii) sono più stabili e quindi si conservano meglio e più a lungo; iv) sono più facili da sintetizzare e meno costosi, date le dimensioni minori e le strategie di sintesi più avanzate **[3].**

Tuttavia, i peptidi mostrano anche dei limiti che si cerca di superare con la ricerca: i) possiedono instabilità metabolica e perciò vengono aggrediti dagli enzimi proteolitici; ii) vengono velocemente eliminati dall'organismo, agendo per un tempo molto limitato; iii) hanno una scarsa biodisponibilità orale e ciò ne limita l'utilizzo perché non possono essere usati autonomamente in diversi contesti; iv) alcuni hanno una scarsa solubilità perché molto idrofobici mentre altri, per la presenza di residui molto polari, possiedono una scarsa permeabilità delle membrane. Dunque, lo studio e lo sviluppo di farmaci peptidici, pur offrendo numerosi vantaggi, devono sempre considerare anche i loro inevitabili svantaggi. Di conseguenza, si cerca di bilanciare questi due aspetti, così come è stato fatto in parte per atosiban e soprattutto per gli analoghi prodotti successivamente, di cui si parla nelle sezioni che seguono.

4. Nuovi analoghi e sfide per il futuro

4.1 Migliorie necessarie e possibili sfide per il progresso

Nel corso degli anni, con l'avanzamento dell'ingegneria genetica e biotecnologica sono stati fatti numerosi passi avanti per migliorare gli aspetti negativi dei farmaci di natura peptidica, tra cui:

- il metodo di somministrazione dei farmaci, è infatti preferibile la via orale ma con tale metodo l'assorbimento del farmaco è estremamente ridotto, poiché viene digerito nel tratto gastrointestinale;
- la bassa stabilità metabolica con conseguente breve emivita, dovuta alla rapida eliminazione da parte dei reni.

In particolare, si sono approfondite varie tipologie di modificazioni chimiche, tra cui:

- PEGilazione, ovvero la coniugazione covalente della molecola con catene di polietilenglicole, polimero non tossico né immunogenico, che aumenta la solubilità e riduce la proteolisi, diminuendo la risposta immunitaria dell'organismo;
- sostituzione di amminoacidi in configurazione L con amminoacidi in configurazione D, come si è osservato per la tirosina in posizione 2 nell'atosiban, *figura 6*, in modo tale da diminuire il riconoscimento da parte degli enzimi;
- aumento dell'idrofobicità attraverso la modifica superficiale con porzioni lipofile, rendendo il farmaco meno solubile in acqua e più affine ai grassi, per migliorarne alcune proprietà.

Oltre a queste sono state messe a punto altre strategie come:

- l'uso di inibitori enzimatici combinato alla somministrazione del farmaco, che blocca il metabolismo dei peptidi da parte degli enzimi proteolitici;
- l'introduzione di peptidomimetici, che mimano la struttura tridimensionale del peptide ma hanno maggiore stabilità;
- lo studio di formulazioni innovative in modo da migliorare l'assorbimento, sfruttando i liposomi e le nanoparticelle;
- l'utilizzo di polimeri mucoadesivi, che aderiscono allo strato di muco nel tratto gastrointestinale aumentando la permanenza del farmaco e di conseguenza la sua biodisponibilità orale **[4], [1].**

Un'altra sfida per il futuro che va indubbiamente considerata consiste in tutto ciò che riguarda la sintesi di tali peptidi. Infatti, gli approcci sono molto elaborati e costosi, al fine di raggiungere elevati standard qualitativi, ma soprattutto sono poco sostenibili.

Guardando all'evoluzione futura, sarebbe molto importante cercare di progredire verso sintesi più sostenibili e rispettose dell'ambiente, in linea con i principi della chimica verde.

Tra gli aspetti che possono essere migliorati si trovano:

- l'utilizzo di solventi alternativi più sicuri e meno dannosi, data l'elevata quantità utilizzata;
- la sintesi assistita con microonde, tecnica che riduce i tempi di reazione e i volumi di rifiuti prodotti di conseguenza;

- l'uso di enzimi come biocatalizzatori, facendo avvenire la reazione in condizioni blande;
- metodi di sintesi che utilizzano limitate quantità di solventi, o acqua ad esempio;
- strategie che non implicano l'utilizzo di peptidi protetti, molto più elaborati e costosi da produrre **[6].**

4.2 Nuovi analoghi post-atosiban

Considerando nello specifico il farmaco analizzato in questo elaborato, esso ha rappresentato il punto di partenza per lo sviluppo dei tocolitici di natura peptidica. Tuttavia, nonostante alcuni aspetti dei peptidi fossero già stati studiati e approfonditi, non può ancora essere considerato un composto ottimale, motivo per cui la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di nuovi analoghi, sia peptidici sia non, con l'obiettivo di superarne i limiti.

Uno degli aspetti da migliorare riguarda il fatto che l'atosiban sia sì piuttosto selettivo, rispetto ad altri tocolitici sintetizzati antecedentemente, ma non quanto si vorrebbe. Esso infatti oltre a legarsi ai recettori dell'ossitocina tende a legarsi anche a quelli della vasopressina, avendo quest'ultima una struttura piuttosto simile a quella del farmaco; motivo per cui si è cercato di sviluppare nuovi analoghi, con una ancora maggiore selettività. Inoltre, come già sottolineato in precedenza, ha una limitata biodisponibilità e richiede, data la somministrazione per via endovenosa, costante monitoraggio medico, configurandosi come un rilevante limite per l'impiego clinico **[3].**

La *tabella 2* raccoglie alcuni antagonisti dell'ossitocina che sono stati sintetizzati dopo la messa in commercio dell'atosiban. Alcuni di essi sono peptidi analoghi dell'atosiban, caratterizzati da modifiche strutturali che li rendono maggiormente affini al recettore dell'ossitocina. Tra essi, quelli che hanno evidenziato una maggior selettività per OTR nell'essere umano sono gli ultimi quattro della prima colonna, prima di barusiban; ma nessuno di loro ha dimostrato di poter proseguire nei test clinici.

Il barusiban (*figura 11*) ha rappresentato inizialmente un punto di svolta, poiché ha mostrato un'elevata affinità per il recettore dell'ossitocina e una scarsa affinità per quello della vasopressina. Inoltre, presenta una potenza e durata d'azione significativamente superiori rispetto all'atosiban e, in alcuni studi sulla contrattilità del miometrio umano, ha dimostrato un'efficacia inibitoria equivalente a quella dell'atosiban. Nonostante i risultati molto promettenti ottenuti da studi su scimmie, negli ulteriori studi su donne in gravidanza non si sono ottenuti i risultati sperati. Infatti, non si è osservata notevole differenza nell'evoluzione delle contrazioni tra chi ha assunto il farmaco e chi ha assunto il placebo.

Oxytocin antagonists	Organism	Experimental or therapeutic application
(I) *Peptide*		
1-Deamino-2-D-Tyr-(O-ethyl)-4-Thr-8-ornoxytocin (Atosiban)	Human	Clinically used tocolytic agent
$d(CH_2)_5[Tyr(Me)^2]OVT$	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
$desGly–NH_2,d(CH_2)_5[Tyr(Me)^2,Thr^4]OVT$	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
$desGly–NH_2,d(CH_2)_5[D-Tyr^2,Thr^4]OVT$	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
$d(CH_2)^5,[D-Thi^2,Thr^4,Tyr–NH_2^9]OVT$	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
$desGly–NH_2,d(CH_2)_5[D-Trp^2,Thr^4,Dap^5]OVT$	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
$desGly–NH_2,d(CH_2)_5[D-2-Nal^2,Thr^4]OVT$	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
$desGly–NH_2,d(CH_2)_5[2-Nal^2,Thr^4]OVT$	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
$d(CH_2)_5[D-2-Nal^2,Thr^4,Tyr–NH_2^9]OVT$	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
$d(CH_2)_5[2-Nal^2,Thr^4,Tyr–NH_2^9]OVT$	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
FE 200 400 (Barusiban)	Monkeys/human myometrial tissue	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
(II) *Nonpeptide*		
GSK221149A (Retosiban)	Rats	Tocolytic action. A phase ll clinical trial for its use as a tocolytic in humans has not yet been completed
L-368,899	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tools in experimental studies of OT function. CNS effects. Inhibits spontaneous nocturnal uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. Clinical studies discontinued
L-371,257	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
WAY-162720	Animals/human cells and tissues, or both	Pharmacological tool in experimental studies of OT functions
SSR-126768A	Rats/human myometrial tissue	Tocolytic action in rats. Inhibits the response to OT in term human pregnant uterine sections

Tabella 2. *Antagonisti dell'ossitocina, studiati dopo l'approvazione dell'atosiban* ***[3].***

Questa mancanza di effettivi miglioramenti non ha permesso al barusiban di progredire nei test clinici e di essere approvato come tocolitico per rimpiazzare l'atosiban **[3].**

Oltre ai peptidi, come espresso in *tabella 2*, anche piccole molecole sono state studiate e sviluppate, per cercare di ottenere gli stessi effetti ma aggirando la mancanza di biodisponibilità dei peptidi, aspetto purtroppo molto condizionante. Tra i possibili farmaci il più discusso è quello noto come retosiban (*figura 11*), un antagonista non peptidico costituito da legami ammidici e anelli aromatici **[3].**

Esso ha dimostrato di essere sicuro per la donna e, nelle prime fasi di sperimentazione, di portare a un prolungamento medio della gravidanza di circa 8 giorni; nonostante tali traguardi molto brillanti esso è stato bloccato nella fase III dei test a causa della difficoltà di reclutare un numero adeguato di pazienti. Da questi ultimi test, ad ogni modo, si era osservato un netto miglioramento rispetto alla somministrazione di placebo, cosa non avvenuta per il barusiban, ma non rispetto ai risultati dati dall'atosiban **[27].**

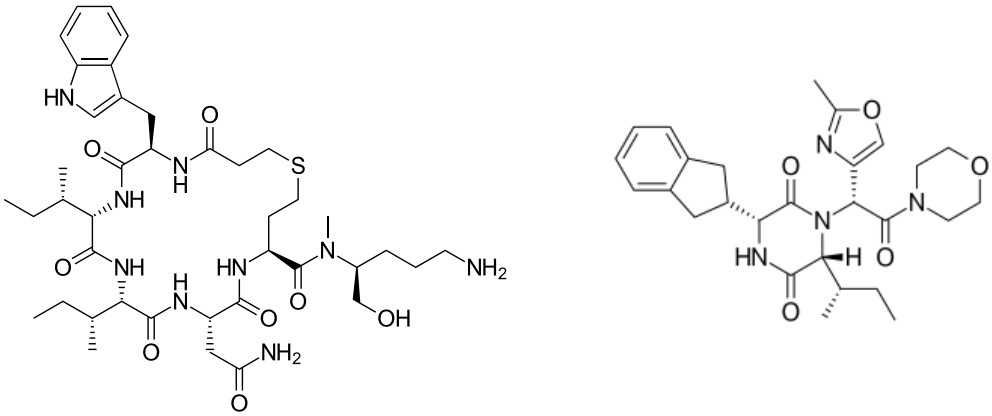


Figura 11**. Strutture molecolari di barusiban (a sinistra) **[28]** e retosiban (a destra) **[29].

Si può osservare, perciò, come negli ultimi anni l'unico tocolitico approvato e tuttora utilizzato sia l'atosiban, grazie ai numerosi vantaggi che esso possiede in quanto antagonista peptidico dell'ossitocina. Nonostante questo, però, si stanno cercando alternative più economiche, facili da produrre, più selettive ed efficienti e possibilmente meno costose. Sono ad esempio in fase di sperimentazione progesterone, aspirina e acidi grassi omega-3, per prevenire i parti pretermine.
Si stanno indagando inoltre anche i candidati per gestire tali parti, come trinitrato di glicerolo, donatore di ossido nitrico che attiva cascate di segnale che portano ad un rilassamento della muscolatura liscia, o calcio-antagonisti, come nicardipina e nicorandil (*figura 12*) **[27], [14].**
Tuttavia, queste molecole sono ancora in fase di sperimentazione e, ad oggi, non sono stati pubblicati dati concreti sull'efficacia clinica dei relativi farmaci. Di conseguenza, la ricerca di alternative all'atosiban è ancora in corso e non ha ancora fornito soluzioni definitive.

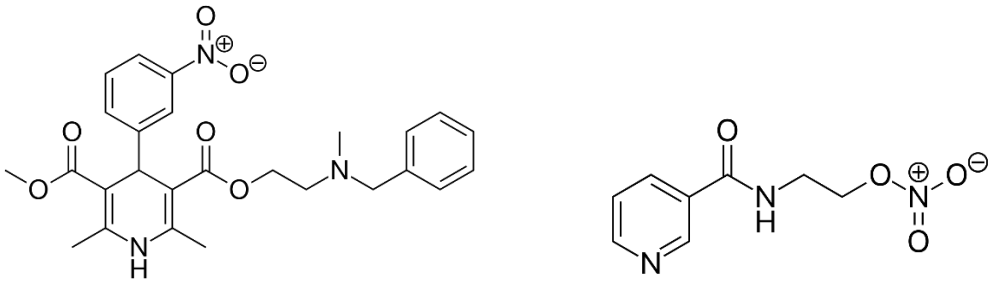


***Figura 12**. Strutture molecolari di nicardipina (a sinistra) **[30]** e nicorandil (a destra) **[31]**.*

5. Conclusioni

In questo elaborato si è affrontato il tema dei farmaci tocolitici, focalizzando l'attenzione sull'atosiban, un farmaco peptidico. Si è dapprima approfondito il ruolo e la struttura dell'ossitocina, un ormone peptidico naturale. Esso promuove una cascata di segnali che aumentano la contrazione della muscolatura liscia del miometrio durante il parto e attivano l'escrezione di latte materno durante l'allattamento. È stata evidenziata, perciò, l'importanza dello sviluppo dei cosiddetti farmaci tocolitici per modulare queste funzioni dell'ossitocina. Tra le varie molecole considerate nel corso degli anni e sviluppate anche grazie ai miglioramenti avvenuti in campo biochimico, ci si è focalizzati su un peptide antagonista: l'atosiban.

Di tale farmaco sono stati analizzati la struttura, paragonandola a quella dell'ossitocina, evidenziando tutte le interazioni che sono state studiate al fine di rendere il peptide quanto più possibile selettivo per il recettore bersaglio. Inoltre, si è voluta approfondire anche la sintesi del peptide, in particolare la sintesi su scala industriale.

Infine, si sono analizzati vantaggi e limiti dell'atosiban, dato che l'obiettivo della tesi riguardava anche la valutazione di proprietà favorevoli e eventuali criticità dei farmaci di natura peptidica in relazione alla loro funzione. Si evince che i farmaci peptidici hanno un gran potenziale, sono molto selettivi, ben tollerati, causano pochi effetti collaterali, hanno un'elevata affinità con i recettori e sono meno immunogenici rispetto a farmaci biologici. Tali aspetti positivi, tuttavia, si scontrano con la bassa stabilità metabolica e emivita, lo scarso assorbimento orale e la sintesi complessa e costosa.

Passando in rassegna altri farmaci con lo stesso scopo, ma studiati dopo l'approvazione dell'atosiban, ci si rende conto però che nessuna molecola ha ancora dimostrato di essere migliore dell'atosiban in termini di potenza del farmaco. Pertanto, nonostante gli svantaggi in quanto peptide esso rimane un farmaco estremamente importante e potente.

Guardando al futuro, se si vuole sfruttare l'uso dei peptidi come farmaci, bisogna innanzitutto continuare a progredire con la ricerca e con l'esecuzione di test per valutarne l'efficacia, ma anche migliorare l'efficienza della sintesi, poiché essa risulta piuttosto costosa in termini economici e ambientali. È necessario ottimizzare i processi, sfruttando nuove vie di sintesi, solventi innovativi o tecniche avanzate, per identificare peptidi in grado di competere con le piccole molecole in termini di efficacia, costi e sostenibilità ambientale.

6. Bibliografia

[1] Sachdeva, S.; *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2017**, *23*, 49-60.

[2] Viero, C.; Shibuya, I.; Kitamura, N.; Verkhratsky, A.; Fujihara, H.; Katoh, A.; Ueta, Y.; Zingg, H. H.; Chvatal, A.; Sykova, E.; Dayanithi, G.; *CNS Neurosci. Ther.* **2010**, *16*, 138-156.

[3] Vrachnis, N.; Malamas, F. M.; Sifakis, S.; Deligeoroglou, E.; Iliodromiti, Z.; *Int. J. Endocrinol*. **2011**, ID 350546.

[4] Muttenthaler, M.; King, G. F.; Adams, D. J.; Alewood, P. F.; *Nat. Rev. Drug Discov*. **2021**, *20*, 309-325.

[5] Mäde, V.; Els-Heindl, S.; Beck-Sickinger, A. G.; *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1197-1212

[6] Rossino, G.; Marchese, E.; Serra, M.; Linciano, P.; Galli, G.; Verde, F.; Finizio, M.; Collina, S.; *Molecules,* **2023**, *28*, 7165.

[7] Sharma, K.; Sharma, K. K.; Sharma, A.; Jain, R.; *Drug Discov. Today.* **2023**, *28*, 2, ID 103464.

[8] Rosson, E.; Lux, F.; David, L.; Godfrin, Y.; Tillement, O.; Thomas, E.; *Int. J. Pharm*. **2025**, *675,* 125555.

[9] Lamont, R. F.; *BJOG.* **2003***, 110,* 108-112.

[10] https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tractocile; ultimo accesso in rete 11.09.2025.

[11] https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/atosiban-sun; ultimo accesso in rete 11.09.2025.

[11] https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8482270; rielaborazione grafica di struttura inserita su “PubChem”, ultimo accesso in rete 12.09.2025

[12] Du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J.M.; *J. Biol. Chem.* **1953**, *203,* 25–40.

[13] Van Geijn, H. "Uterine contraction agents, tocolytics, vaginal therapeutics, and local contraceptives" in *Drugs During Pregnancy and Lactation*; Schaefer, C.; Peters, P.; Miller, R. K. (Eds.), Academic Press: Amsterdam, 2007; pp. 368-380.

[14] Van Winden, T.; Roos, C.; Mol, B. W.; Pajkrt, E.; Oudijk, M. A.; *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2024**, *22*, 100313.

[15] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ritodrine2.png; rielaborazione grafica di struttura inserita su “PubChem”, ultimo accesso in rete 14.09.2025.

[16] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Indometacin.svg; rielaborazione grafica di struttura inserita su “PubChem”, ultimo accesso in rete 14.09.2025.

[17] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nifedipine.svg; rielaborazione grafica di struttura inserita su “PubChem”, ultimo accesso in rete 14.09.2025.

[18] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Relcovaptan.svg; rielaborazione grafica di struttura inserita su “PubChem”, ultimo accesso in rete 14.09.2025.

[19] Lia, Q.; Huanga, Y.; Zhang, Y.; Cui H.; Yin, L.; Li, Y.; Yuan A.; Hu, Y.; Wu, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2019,** *177*, 112808.

[20] Uvnäs-Moberg, K.; *Am. J. Obstet. Gynecol*. **2024**, *230*, S740-S758.

[21] Slusarz, M. J.; Slusarz, R.; Meadows, R.; Trojnar, J.; Ciarkowski, J.; *QSAR Comb. Sci.* **2004,** *23*, 536-545

[22] Slusarz, M. J.; Slusarz, R.; Ciarkowski, J.; *J. Peptide Sci*. **2006,** *12*, 171-179.

[23] https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tractocile-epar-product-information_en.pdf; ultimo accesso in rete 12.09.2025.

[24] Andersson, L.; Blomberg, L.; Flegel, M.; Lepsa, L.; Nilsson, B.; Verlander, M.; *Biopolymers.* **2000**, *55*, 227-250.

[25] Klumper, J.; Breebaart, W.; Roos, C.; Naaktgeboren, C. A.; van der Post, J.; Bosmans, J.; van Kaam, A.; Schuit, E.; Mol, B. W.; Baalman, J.; McAuliffe, F.; Thornton, J.; Kok, M.; Oudijk, M. A.; *BMJ Open.* **2019**, *9*, 1-7.

[26] Rath, W.; Kehl, S.; *Geburtshilfe Frauenheilkd.* **2018,** *78*, 1245-1255.

[27] McDougall, A. R. A.; Hastie, R.; Goldstein, M.; Tuttle, A.; Ammerdorffer, A.; Metin Gülmezoglu, A.; Vogel, J. P.; *BMC Pregnancy Childbirth*. **2023**, 23, 1-16.

[28] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Barusiban.svg; rielaborazione grafica di struttura inserita su "PubChem", ultimo accesso in rete 14.09.2025.

[29] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Retosiban_structure.svg; rielaborazione grafica di struttura inserita su "PubChem", ultimo accesso in rete 14.09.2025.

[30] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nicardipine.svg; rielaborazione grafica di struttura inserita su "PubChem", ultimo accesso in rete 14.09.2025.

[31] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nicorandil.svg; rielaborazione grafica di struttura inserita su "PubChem", ultimo accesso in rete 14.09.2025.