



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

L'ISOTRETINOINA PER LA CURA DELL'ACNE

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Laureanda: Giulia Perdoncin

Matricola: 1238915

Anno accademico 2022/2023

INDICE

1. L'ACNE VULGARIS.....	1
1.1 Definizione e incidenza	1
1.2 Patogenesi e cause	1
1.3 Cutibacterium acnes	2
1.4 Altri fattori.....	4
1.5 Cure e trattamenti	5
2. ISOTRETINOINA.....	7
2.1 Introduzione.....	7
2.2 Struttura e caratterizzazione	7
2.3 Biosintesi isotretinoina	9
2.4 Sintesi industriale di isotretinoina	10
2.6 Farmacocinetica.....	12
2.6.1 Metabolismo	13
2.6.2 Biodisponibilità.....	14
2.7 Farmacodinamica	16
2.7.1 Recettori RAR/RXR	17
2.7.2 Meccanismo d'azione recettore-dipendente	18
2.7.3 Meccanismo d'azione recettore-indipendente	19
Conclusioni	21
Bibliografia	22

1. L'ACNE VULGARIS

1.1 Definizione e incidenza

L'acne vulgaris è una malattia cutanea cronica dell'unità pilosebacea, caratterizzata dalla formazione di lesioni non infiammatorie, come comedoni aperti e chiusi, e lesioni infiammatorie, come papule, noduli e cisti (Tahir, 2010)- (Indu & Tanweer, 2018).

Si manifesta più comunemente in aree del corpo con un maggior numero di ghiandole sebacee, come il viso, la schiena, il torace e la parte superiore delle braccia (Well, 2013).

È un disturbo pleomorfo e le sue varianti possono manifestarsi in qualsiasi momento della vita, ma la comparsa avviene prevalentemente tra i 12 e i 24 anni d'età. Il livello di ormoni, in particolare degli androgeni, è spesso correlato alla gravità della patologia, il cui sviluppo preannuncia l'inizio della pubertà e quindi l'aumento della produzione di ormoni sessuali (Well, 2013)- (Tahir, 2010).

L'acne colpisce circa il 9,4% della popolazione: ne soffrono circa il 94-95% della popolazione puberale, il 20-40% degli adulti e il 25% delle donne, le quali possono soffrire anche di acne femminile adulta (Indu & Tanweer, 2018)- (Suva, 2014).

1.2 Patogenesi e cause

La fisiopatologia dell'acne vulgaris è complessa, con fattori scatenanti sia interni che esterni. Quelli principalmente coinvolti nel suo sviluppo sono: l'iperplasia della ghiandola sebacea con aumento della produzione di sebo, l'ipercheratinizzazione follicolare e la proliferazione batterica (in particolare di *C. acnes*), con conseguente irritazione e infiammazione.

Il processo di formazione dell'acne coinvolge l'unità pilosebacea (figura 1), che consiste in un follicolo pilifero rivestito di cellule e una grande ghiandola sebacea: inizialmente c'è lo sviluppo di un microcomedone, un accumulo di cellule cheratinizzate all'interno del follicolo, le quali bloccano il canale follicolare e formano un tappo sopra il dotto della ghiandola sebacea, che ostruisce il flusso di sebo (Tahir, 2010).

La causa di questo processo viene attribuita all'influenza degli androgeni: con l'aumento della produzione di questi ormoni, le ghiandole sebacee si ingrossano e aumenta la produzione di sebo.

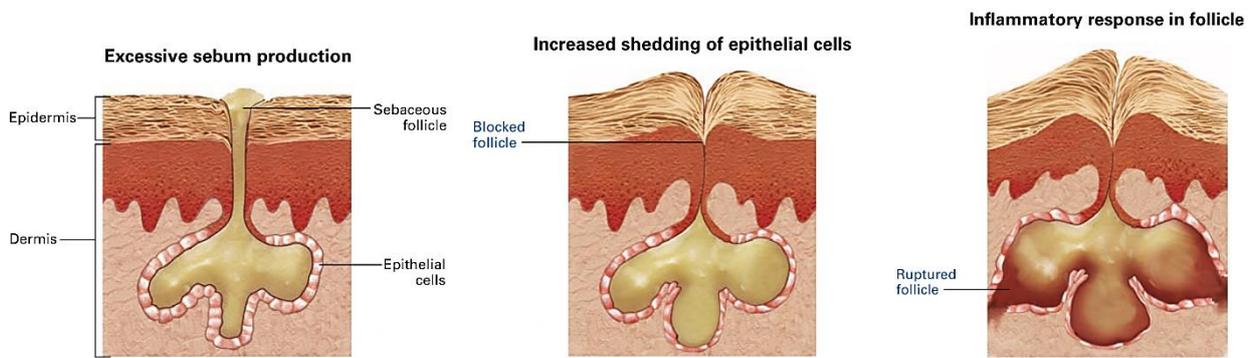


Figura 1 Processo di formazione dell'acne: blocco del follicolo pilifero e ostruzione del flusso di sebo.

Il microcomedone può allargarsi ulteriormente e formare un comedone (figura 2), il quale può risultare aperto (punto nero) o chiuso (punto bianco): i comedoni aperti mostrano tappi ipercheratosici di colore scuro all'interno dell'apertura follicolare, la cui colorazione è correlata all'ossidazione della melanina; i comedoni chiusi sono invece di colore bianco-carne e non hanno un poro centrale aperto (Suva, 2014). Sono questi ultimi ad essere i precursori delle lesioni infiammatorie associate all'acne in quanto, ingrandendosi, possono rompersi e diffondere nel derma circostante il contenuto dell'unità pilosebacea: la combinazione di cheratina, sebo e microrganismi porta al rilascio di mediatori e all'accumulo di linfociti t-helper, neutrofili e cellule giganti da corpo estraneo, che provocano la formazione di papule infiammatorie, pustole e lesioni nodulo-cistiche (Well, 2013)- (Tahir, 2010).

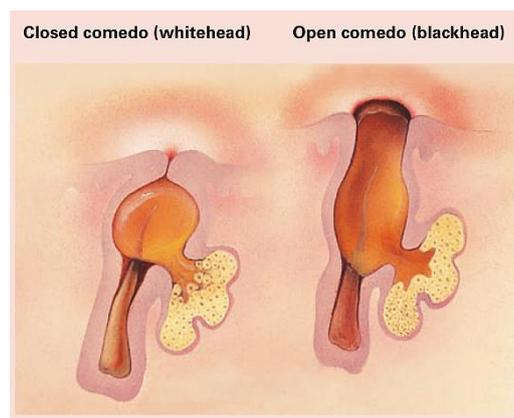


Figura 2 Comedone aperto e chiuso.

1.3 *Cutibacterium acnes*

Cutibacterium acnes (*C. acnes*) è un batterio gram-positivo, ubiquitario, appartenente al Phylum Actinobacteria; è presente sulla superficie cutanea in bassa quantità, mentre è la specie batterica dominante nei follicoli sebacei (B. Dréno, 2018). Originariamente, è stato classificato come specie *Bacillus* e poi come specie *Corynebacterium*; nel 1946, fu riconosciuto come strettamente correlato ai membri

del genere *Propionibacterium*, che fermentano il lattosio in acido propionico, in condizioni anaerobiche (Yvonne Achermann, 2014). Più recentemente, la denominazione è cambiata in *Cutibacterium acnes*, data la sua capacità di colonizzare la pelle (B. Dréno, 2018).

Questo batterio commensale è fondamentale nella regolazione dell'omeostasi cutanea e, indirettamente, le sue attività metaboliche possono creare un ambiente inospitale per molti patogeni dannosi (O'Neill & Gallo, 2018). Le caratteristiche metaboliche specifiche del batterio gli consentono di colonizzare un ambiente ricco di lipidi come quello del follicolo, e di preservare la stabilità del microbiota cutaneo in cui risiede: in particolare può degradare i trigliceridi presenti nel sebo per generare acidi grassi a catena corta, ad esempio propionico, laurico e linoleico, che sono antimicrobici e il cui accumulo contribuisce al mantenimento di un pH cutaneo acido (B. Dréno, 2018)- (O'Neill & Gallo, 2018).

La crescita di *C. acnes* è favorita in un intervallo di pH compreso tra 6 e 7, mentre prolifera più difficilmente in ambienti più acidi o più alcalini; la temperatura ottimale per la sua crescita è compresa tra 30°C e 37°C (Yvonne Achermann, 2014).

Il ruolo di *C. acnes* nell'acne rimane controverso, in quanto il batterio è parte della normale flora cutanea e si trova sia nei follicoli piliferi affetti da acne, sia in quelli normali (Yvonne Achermann, 2014): questa sua presenza ubiquitaria contrasta con la presenza isolata di lesioni infiammatorie e spesso ha vanificato i tentativi di attribuire un ruolo patogeno alla malattia (O'Neill & Gallo, 2018). L'abbondanza relativa di *C. acnes*, infatti, è simile tra i pazienti con acne e quelli sani (87-89%), o anche leggermente superiore nei soggetti sani (94%) (B. Dréno, 2018). Non c'è alcuna differenza quantitativa del batterio tra soggetti sani e malati, ma cambiano le caratteristiche genetiche e fenotipiche: ci sono quindi alcuni ceppi che contribuiscono effettivamente alla salute della pelle, mentre altri possono agire potenzialmente come patogeni opportunisti, favoriti da un ambiente iperseborroico. Diverse metodologie e analisi molecolari hanno permesso di isolare e identificare *C. acnes*: il batterio è stato isolato usando la "biopsia della superficie cutanea" per l'analisi del contenuto di un follicolo (Beylot, 2014).

Un primo metodo per la sua classificazione si basa sulle sequenze geniche e rivela la presenza di due diversi fenotipi (tipo I e tipo II), che differiscono tra loro per la tipologia di zuccheri presenti nella parete cellulare e per la diversa sensibilità ai batteriofagi; successivamente è stato incluso un ulteriore gruppo filogenetico (tipo III), distinto da una morfologia filamentosa lunga (O'Neill & Gallo, 2018)- (Beylot, 2014).

Il tipo I di *C. acnes* può essere suddiviso in sottotipi strettamente correlati: IA1, IA2, IB e IC: varie analisi hanno portato a stabilire che il filotipo IA1 di *C. acnes* è associato all'acne, mentre quelli di tipo II e III sono più comunemente associati alla pelle sana (O'Neill & Gallo, 2018).

Un secondo metodo si basa sulle caratteristiche biologiche e, in particolare, sulla correlazione esistente tra la gravità dell'acne e l'attività della lipasi, che idrolizza i trigliceridi del sebo e rilascia acidi grassi liberi ad azione irritante. Tra i vari biotipi di acne identificati, quello corrispondente al tipo I predomina nelle forme più gravi di acne, in quanto produce maggiori quantità di acido propionico e butirrico rispetto ad altri biotipi di *C. acnes*. Questo suggerisce che i vari ceppi di *C. acnes* possono avere differenti capacità di modulare l'immunità innata e la diversità dei profili infiammatori si riscontra nelle varie tipologie di acne: lieve, moderata e grave (Beylot, 2014).

L'attività di *C. acnes* stimola l'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) e i suoi recettori, aumentando la secrezione di ormoni androgeni, che inducono la produzione di sebo e la cheratinizzazione: l'enzima *C. acnes* lipasi agisce sui trigliceridi forniti dal sebo per formare acidi grassi a catena corta, dai quali si forma il glicerolo, che è la frazione utilizzabile per il metabolismo del batterio (Tahir, 2010)- (Indu & Tanweer, 2018).

La produzione di acidi grassi liberi porta alla formazione di microcomedoni e comedoni, che sono ambienti ideali per la proliferazione del batterio anaerobico, avendo un'elevata concentrazione di lipidi e una ridotta tensione di ossigeno (Tahir, 2010).

C. acnes contribuisce all'infiammazione della pelle tramite l'attivazione di vari fattori chemiotattici: esso secerne lipasi, metalloproteasi e porfirine, che interagiscono con l'ossigeno molecolare, generando specie tossiche a ridotto contenuto di ossigeno e radicali liberi, che causano danni ai cheratinociti (Tahir, 2010)- (Beylot, 2014). Il batterio promuove inoltre la rottura del comedone: produce un polipeptide a basso peso molecolare, che diffonde attraverso l'epitelio dei follicoli e viene ingerito dai neutrofili, con il conseguente rilascio di enzimi lisosomiali idrolitici, che si ritiene influenzino la dissoluzione e la rottura della parete follicolare, provocando l'infiammazione (O'Neill & Gallo, 2018).

È stato dimostrato che *C. acnes* può crescere in macrocolonie, producendo estesi biofilm in profondità all'interno dei follicoli pilosebacei: si forma un conglomerato di cellule batteriche che mostrano una maggiore resistenza agli agenti antimicrobici tradizionali rispetto alle cellule planctoniche (B. Dréno, 2018).

1.4 Altri fattori

Ci sono anche altri fattori che, da soli o in combinazione, sono responsabili della formazione dell'acne, come l'ereditarietà, gli ormoni, la dieta e altre specie batteriche; l'occlusione del follicolo pilifero può essere talvolta causata dall'uso di prodotti comedogenici, come cosmetici e prodotti per capelli grassi (Indu & Tanweer, 2018)- (Well, 2013). Inoltre, un individuo ha maggiori probabilità di sviluppare l'acne se i genitori l'hanno avuta in giovane età (Indu & Tanweer, 2018).

I vari ormoni sessuali, come estrogeni, androgeni, glucocorticoidi e melanocortine sono necessari per regolare l'attività delle ghiandole sebacee: le dimensioni di queste ghiandole sono incrementate dal diidrotestosterone, mentre sono invece ridotte dagli estrogeni, che comportano anche la riduzione della secrezione di sebo (Well, 2013).

1.5 Cure e trattamenti

La molteplicità di cause che porta alle lesioni dell'acne consente vari possibili approcci al trattamento del disturbo (Well, 2013). Alcuni includono agenti topici come il perossido di benzoile e gli acidi salicilico e azelaico (figura 3), che hanno proprietà comedolitiche e antinfiammatorie; anche trattamenti antiandrogeni, come contraccettivi orali combinati, e modalità fisiche come la terapia laser e fotodinamica (O'Neill & Gallo, 2018).

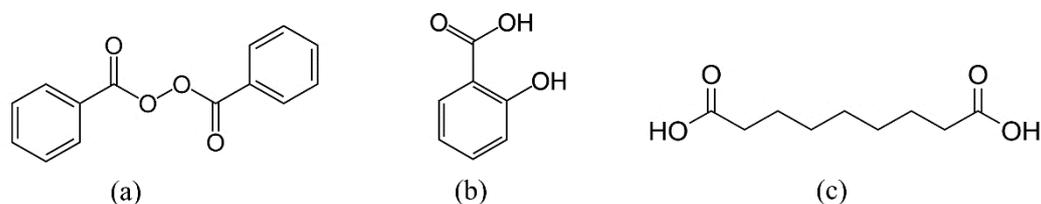


Figura 3 Struttura molecolare di (a) perossido di benzoile, (b) acido salicilico e (c) acido azelaico.

Altre opzioni terapeutiche includono antibiotici topici e orali: quelli topici agiscono sia come agenti antibatterici, sia come agenti antinfiammatori, e spesso sono più efficaci in combinazione con retinoidi topici o perossido di benzoile, che prende di mira *C. acnes* attraverso il rilascio di radicali liberi dell'ossigeno ed è comedolitico; quelli orali sono indicati per le forme di acne moderate o gravi e in casi in cui le combinazioni topiche hanno fallito o non sono state tollerate.

Tuttavia, la scelta di antibiotici sistemici per sopprimere *C. acnes* può rivelarsi controproducente, dato l'aumento della resistenza agli antibiotici da parte del patogeno e il trattamento prolungato, il quale può avere un impatto sul microbioma intestinale (O'Neill & Gallo, 2018).

Attualmente, i retinoidi sono considerati la terapia di prima linea contro l'acne, poiché agiscono sul microcomedone, che è il precursore delle lesioni infiammatorie: quelli topici (tretinoina, adapalene e tazarotene, figura 4) normalizzano la desquamazione follicolare e riducono l'ostruzione, sono sia comedolitici che anticomedogenici, adatti al trattamento di comedoni chiusi, aperti e papule infiammatorie.

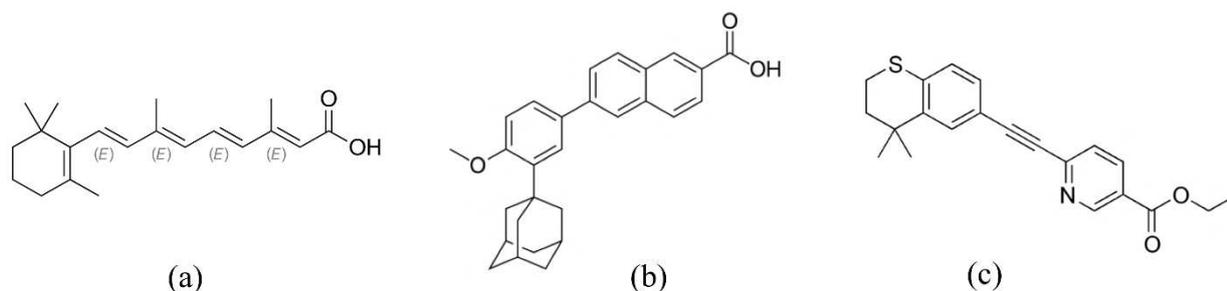


Figura 4 Strutture molecolari di tretinoina, adapalene e tazarotene.

Tra i retinoidi orali, uno dei più utilizzati e studiati è l'isotretinoina (acido 13-cis retinoico) (figura 5), uno stereoisomero dell'acido retinoico adatto al trattamento delle forme di acne moderate o gravi, che non rispondono alle terapie convenzionali (Well, 2013).

Il farmaco ha un effetto soppressivo sull'attività delle ghiandole sebacee, che comporta una diminuzione della produzione di sebo e dell'ostruzione follicolare; è in grado di influenzare la proliferazione e la differenziazione delle cellule, con la possibilità di invertire la desquamazione anormale. Grazie all'influenza che esercita sul ricambio cellulare, l'attività dell'isotretinoina porta all'espulsione dei comedoni maturi (sia aperti che chiusi) e inibisce la formazione dei microcomedoni che causano l'acne; inoltre inibisce l'espressione del recettore Toll-like 2 (TLR-2), che regola molti geni della risposta immunitaria innata e contribuisce ad aggravare l'infiammazione (Thielitz, Krauthiem, & Gollnick, 2006).

2. ISOTRETINOINA

2.1 Introduzione

L'isotretinoina è stata approvata per la prima volta come trattamento per l'acne grave dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense nel 1982. Oltre tre decenni dopo, rimane la terapia antiacne clinicamente più efficace, producendo un miglioramento significativo e una remissione a lungo termine in molti pazienti (Layton, 2009).

Viene somministrata per via orale con lo scopo di trattare l'acne grave, che non ha risposto ad altre misure, e viene anche applicata localmente nelle forme più lievi di acne. Non è indicata per l'acne adolescenziale non complicata e non è autorizzata per l'acne prepuberale (Khalil, Darwish, & Al-Qahtani, 2020).

L'isotretinoina è l'unico farmaco in grado di indurre una remissione a lungo termine o permanente dell'acne: ha un impatto su tutti i principali fattori eziologici implicati nella malattia e raggiunge questa notevole efficacia influenzando la progressione del ciclo cellulare, la differenziazione e la crescita cellulare e l'apoptosi. Comporta una significativa riduzione della produzione di sebo, influenzando la comedogenesi e limitando la proliferazione di *C. acnes* (Layton, 2009).

Raggiunge questi risultati attraverso una serie di meccanismi, il più importante dei quali è la capacità di influenzare la trascrizione genica (Rademaker, 2013).

2.2 Struttura e caratterizzazione

L'isotretinoina – nome IUPAC acido (2Z,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-cicloesenil)nona-2,4,6,8-tetraenoico (figura 5) - è un retinoide monoaromatico naturale di prima generazione, prodotto ossidando la funzione alcolica della vitamina A e isomerizzando a *cis* il doppio legame vicino al gruppo carbossilico (Ganceviciene, 2010).

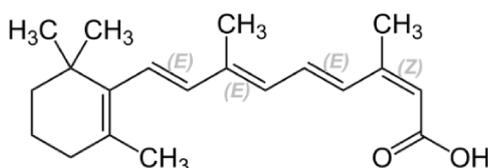


Figura 5 Formula di struttura dell'isotretinoina.

Tra le denominazioni non proprietarie, è noto come acido 13-*cis*-retinoico o (13Z)-acido retinoico, e tra quelle proprietarie si trovano: Accutane, Acugen, Effederm, Isotretinoina, Roaccutane (Khalil, Darwish, & Al-Qahtani, 2020).

I retinoidi come l'isotretinoina possono essere descritti in termini di tre regioni strutturali (figura 6): la regione idrofobica, la regione linker e la regione polare. La regione idrofobica è tipicamente una grande struttura altamente lipofila, in grado di collocarsi nell'apertura idrofobica della tasca delle proteine che legano i retinoidi; la regione linker è una porzione lunga, spesso coniugata, che conferisce lunghezza, determina la forma complessiva del composto e posiziona la regione polare per un legame efficace con i vari recettori. La regione polare, che molto spesso è un gruppo carbossilico, è cruciale per legarsi ad un gruppo di residui carichi alla fine del sito di legame dei RAR/RXR (Chisholm, 2020).

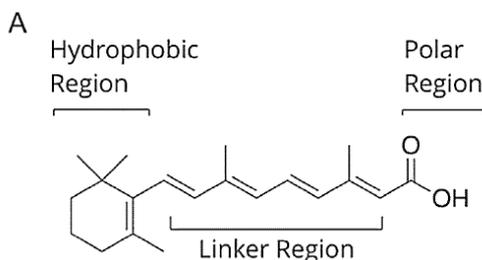


Figura 6 Tre regioni strutturali retinoidi: esempio della tretinoina.

Sebbene l'isotretinoina sia stata utilizzata in medicina per diversi decenni, la sua applicazione clinica è limitata dai suoi problemi di stabilità e solubilità. È sensibile alla luce, all'ossigeno e al calore e può essere degradata, in queste condizioni, tramite ossidazione dei doppi legami: quando è esposta all'ossigeno, l'isotretinoina produce radicali liberi intermedi, la cui stabilizzazione è favorita dall'estesa coniugazione della molecola, e infine porta al prodotto di epossidazione (figura 7).

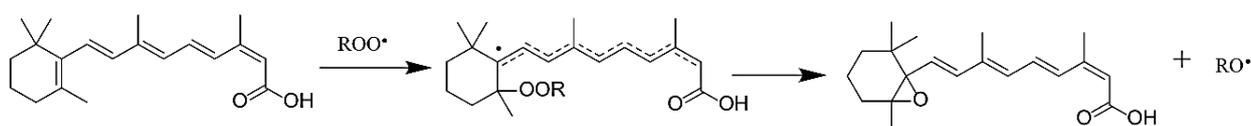


Figura 7 Possibile meccanismo di ossidazione dell'isotretinoina sotto l'azione del calore e dell'aria.

Quando è esposta alla luce, la degradazione della molecola consiste in un'isomerizzazione dei doppi legami, che porta ad ottenere come prodotto la tretinoina (acido tutto-trans-retinoico) (figura 8). Durante la reazione fotochimica, la forza del legame C₁₃-C₁₄ è indebolita e questo può ruotare fino a che il gruppo carbossilico risulta perpendicolare al piano: a questo punto la molecola si trova in uno stato intermedio eccitato; successivamente, la rotazione procede fino all'ottenimento del prodotto E (Cheng, 2021).

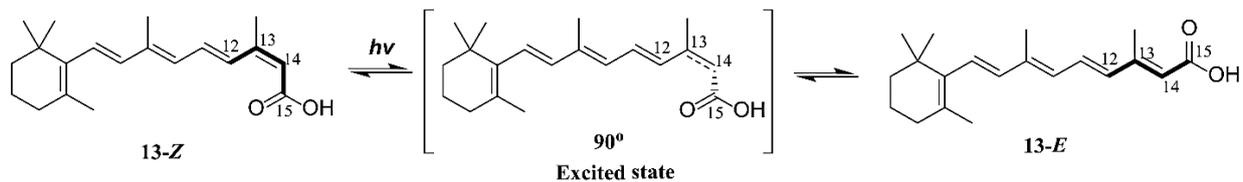


Figura 8 Isomerizzazione dei doppi legami di isotretinoina sotto l'illuminazione di luce forte.

Essendo l'isotretinoina un composto altamente lipofilo, possiede una scarsa solubilità in acqua (Shakeel, 2022); è inoltre scarsamente solubile in alcool, alcool isopropilico e polietilenglicole, mentre è solubile in cloroformio (Khalil, Darwish, & Al-Qahtani, 2020).

2.3 Biosintesi isotretinoina

All'interno dell'organismo, l'isotretinoina viene prodotta a partire dai carotenoidi provitamina A e dalla vitamina A assunta con la dieta (Wiegand, 1998). La vitamina A, chiamata anche retinolo, viene assorbita dal tratto gastrointestinale e metabolizzata dal fegato, che la converte in retinale (figura 9): questa prima reazione è catalizzata dagli enzimi alcol deidrogenasi (ADH), principalmente ADH1, ADH3 e ADH4.

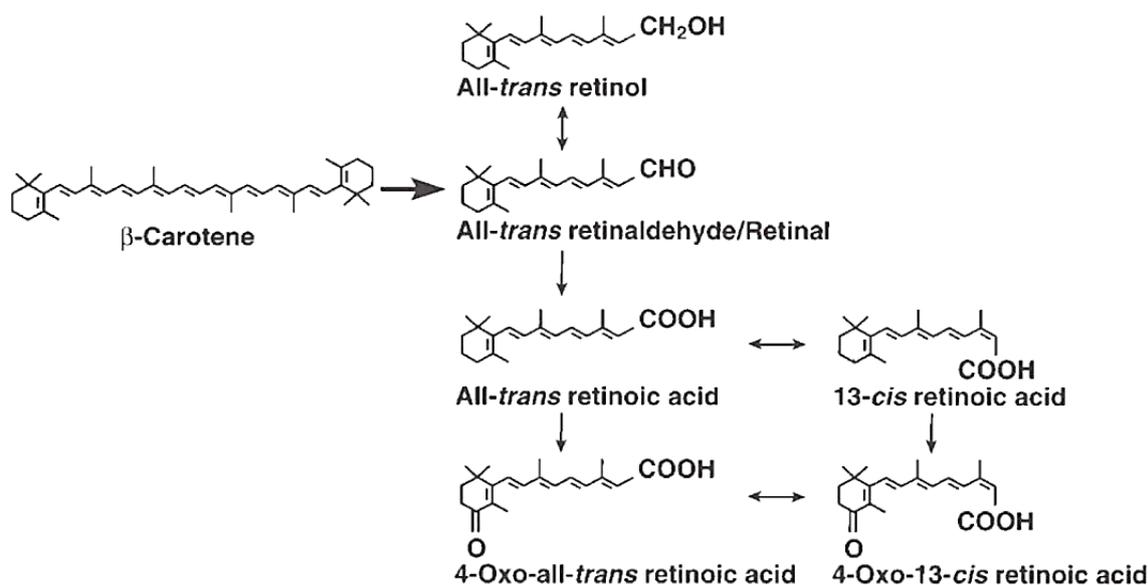


Figura 9 Percorso metabolico di formazione dell'isotretinoina e dei suoi metaboliti a partire dalla vitamina A alimentare e dai carotenoidi provitamina A. (Figura tratta da Wiegand, U.-W. a. (1998). Pharmacokinetics of oral isotretinoin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, S8-S12.)

La successiva ossidazione irreversibile del retinale ai corrispondenti acidi retinoici, i quali si interconvertono reversibilmente l'uno nell'altro, è catalizzata invece dalla retinaldeide deidrogenasi (RALDH), presente in tre diverse classi (RALDH1, RALDH2 e RALDH3) le quali vengono espresse in maniera tessuto-specifica; per il loro funzionamento, sia ADH che RALDH richiedono NAD^+ (Altucci, 2001).

I due isomeri risultanti, l'acido tutto-trans-retinoico e l'acido 13-cis-retinoico (isotretinoina), vengono ulteriormente metabolizzati, rispettivamente in acido 13-cis-4-osso retinoico e acido tutto-trans-4-osso retinoico, e anche tra questi metaboliti avviene un'interconversione (Wiegand, 1998).

2.4 Sintesi industriale di isotretinoina

Esistono vari metodi per la sintesi dell'isotretinoina, ma non tutti offrono un processo commercialmente valido: alcuni richiedono attrezzature speciali per purificare adeguatamente il prodotto e ottenere l'isomero desiderato (Pattenden e Weedon, figura 10), altri coinvolgono un numero troppo elevato di fasi (James Babler, figura 11) (Salman, 2005).

In generale, l'approccio sintetico consiste nello sviluppo di un processo che coinvolga l'accoppiamento stereospecifico di un sintone C_5 e un sintone C_{15} , il quale viene sintetizzato a partire dal β -ionone.

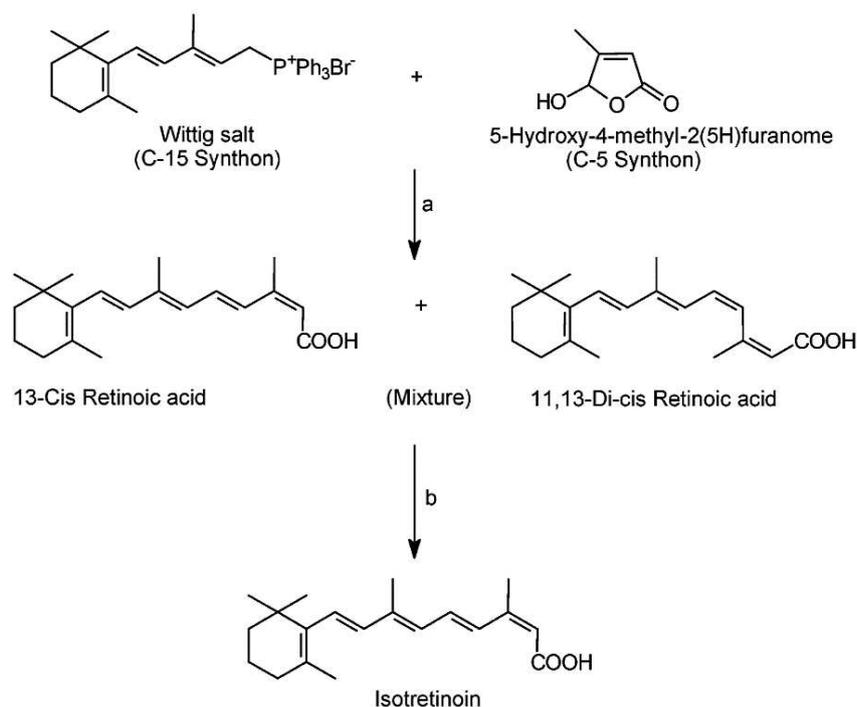


Figura 10 Reazione di Pattenden e Weedon: accoppiamento stereospecifico d. Reagenti: (a) base/solvente protico o aprotico; (b) $h\nu$ /iodio o $h\nu$ /sale di Pd o $h\nu$ /fotosensibilizzante.

La sintesi proposta da Pattenden e Weedon (Figura 10) utilizza un sale di Wittig come sintone C₁₅ e il 4-metil-5-idrossi-2(5H)-furanone come sintone C₅.

Questo processo fornisce una miscela isomerica (al doppio legame in C-11) di acido 13-cis-retinoico con una resa del 66,75%; il contenuto dell'isomero desiderato 11-trans-13-cis è solo del 36% e il resto è costituito dall'isomero 11,13-di-cis. L'isomerizzazione selettiva del doppio legame 11-cis, in presenza del doppio legame 13-cis, si rivela particolarmente difficile da realizzare ed è necessario l'utilizzo di metodi alternativi per la foto isomerizzazione, i quali rendono il processo difficilmente utilizzabile su scala commerciale.

Un secondo approccio, proposto da James Babler (figura 11), consiste invece nell'utilizzo dell'estere fosfonico (sintone C₁₅), come intermedio nella sintesi dell'isotretinoina, il quale subisce una reazione di condensazione con il 4-metil-5-idrossi-2(5H)-furanone, utilizzato come sintone C₅. Sebbene questa reazione non comporti la necessità di una foto isomerizzazione, è comunque antieconomico per essere utilizzato per la produzione industriale, in quanto comprende un numero elevato di passaggi.

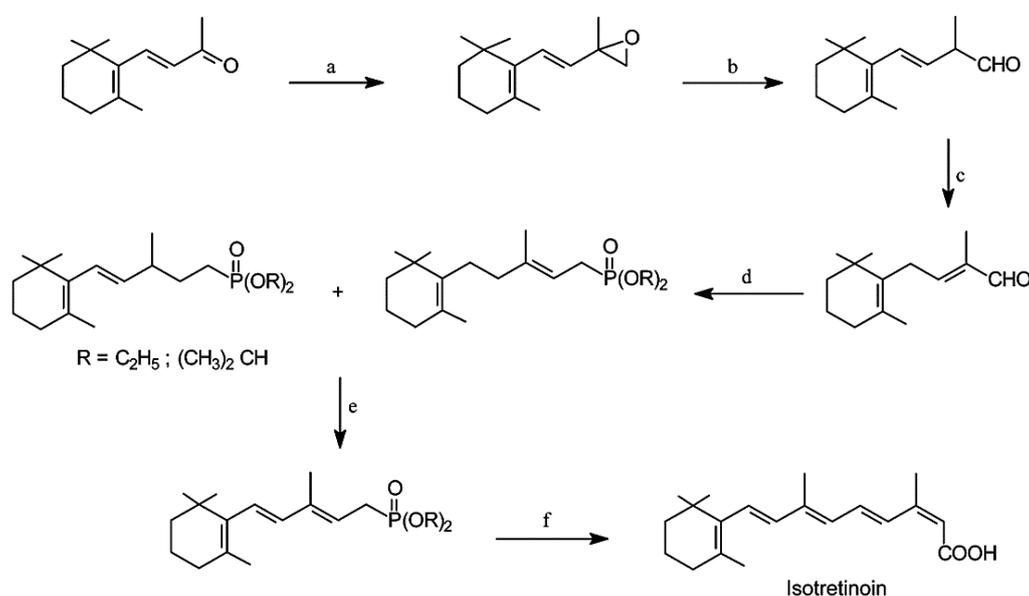


Figura 11 James Babler, sintesi di isotretinoina tramite condensazione dell'estere fosfonato e del 4-metil-5-idrossi-2(5H)-furanone. Reagenti: (a) (i) ioduro di trimetilsolfosonio, NaH/DMSO, (ii) DMSO/THF, -5 °C; (b) MgBr₂; (c) isomerizzazione; (d) tetraetil/tetraisopropil metilendifosfonato, base; (e) alcossido, DMSO; (f) 5-idrossi-4-metil-2(5H)-furanone, KO-terz-butossido, THF/DMSO.

Tra gli approcci più pratici e utilizzabili industrialmente per la sintesi della molecola, c'è quello proposto da Cainelli *et al.*, che prevede la conversione di un lattone in isotretinoina, in presenza di potassio terz-butossido. Tuttavia, la sintesi dell'intermedio lattone chiave è piuttosto complessa e, in seguito, ne viene proposta una più efficiente da Dugger e Heathcock (figura 12): a partire da LDA e metil-3,3-dimetilacrilato, si forma il dienolato di metil-3,3-dimetilacrilato, il quale subisce poi una

reazione di condensazione con la β -ionilidene acetaldeide ad una temperatura di -78°C e fornisce in maniera più semplice il lattone desiderato, dopo purificazione tramite HPLC.

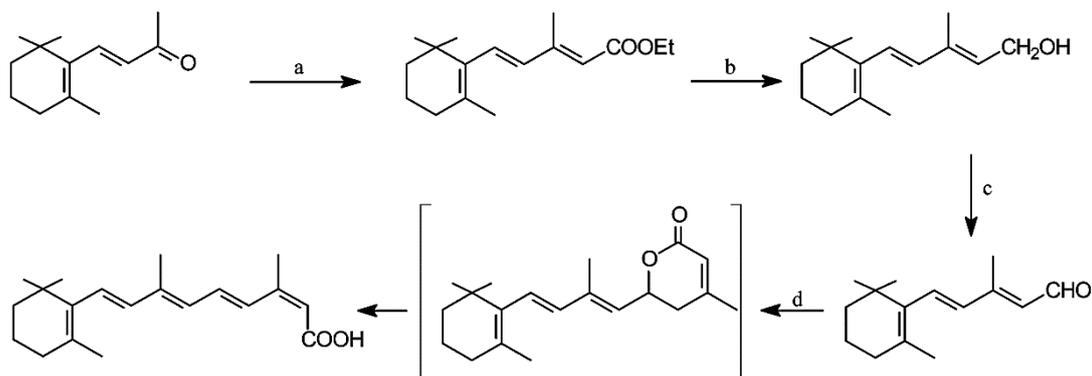


Figura 12 Sintesi isotretinoina proposta da Cainelli, poi ottimizzata da Dugger e Heathcock e, in seguito, da Salman *et al.* Reagenti: (a) trietilfosfonoacetato, NaNH_2 , toluene, 65°C , 15 h; (b) (i) LAH, THF-esano, (ii) $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$; (c) MnO_2 , esano, 60°C , 3h; (d) (i) LDA, metil-3,3-dimetilacrilato, -78°C , 1 h, (ii) 40°C , 1 h, (iii) $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$.

Le condizioni del processo di Dugger e Heathcock sono state ulteriormente ottimizzate da Salman *et al.* (figura 12) per ottenere l'isotretinoina in un unico passaggio partendo dalla beta-ionilidene acetaldeide. La condensazione del dienolato di metil-3,3-dimetilacrilato con la β -ionilidene acetaldeide a -78°C genera l'anione metossido, il quale può essere sfruttato per influenzare l'apertura dell'anello lattone ad una temperatura di 40°C e ottenere, dopo un trattamento acquoso acido, l'isotretinoina. Il processo permette di svolgere la sintesi senza l'isolamento dell'intermedio lattone, in quanto viene aperto sfruttando il metossido generato in situ, e senza l'utilizzo di basi aggiuntive (come KO-terz-butossido); inoltre non richiede alcuna fase di purificazione cromatografica e l'isotretinoina è ottenuta per semplice ricristallizzazione con una buona resa e una purezza $>95\%$ (Salman, 2005).

2.6 Farmacocinetica

L'isotretinoina si trova naturalmente nel siero umano come confermato con un metodo di analisi abbastanza sensibile da rilevare e quantificare le concentrazioni fisiologiche endogene nel plasma, sia della molecola che dei suoi metaboliti.

La molecola è ampiamente legata alle proteine plasmatiche ($>99\%$), specialmente all'albumina (Fallah, 2021), e non viene immagazzinata nel tessuto adiposo; questo è confermato dalla misurazione diretta dell'isotretinoina nel plasma, nella pelle e nel tessuto sottocutaneo: le concentrazioni negli ultimi 2 siti sono inferiori a quelle nel plasma. Sono state rilevate concentrazioni di circa 60 ng/g e

40 ng/g rispettivamente nell'epidermide e del sottocute, rispetto ai 100 g/mL rinvenuti nel plasma (Wiegand, 1998).

2.6.1 Metabolismo

L'isotretinoina viene metabolizzata nel fegato dal sistema enzimatico microsomiale del citocromo P-450 (CYP), principalmente dagli isoenzimi CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 e CYP2B6 (Kapała, 2022); durante questa fase, la catena laterale della molecola viene ossidata e accorciata per formare metaboliti polari biologicamente attivi e importanti (figura 13), che sono principalmente cinque: acido tutto-trans-retinoico (tretinoina), 13-cis-4-ossoretinoico (4-osso-isotretinoina), acido tutto-trans-4-ossoretinoico (4-osso-tretinoina), acido 13-cis-4-idrossiretinoico e acido tutto-trans-4-idrossiretinoico (Layton, 2009).

Circa il 20-30% di una dose di isotretinoina isomerizza a tretinoina; il farmaco progenitore, il suo stereoisomero e i suoi metaboliti ossidati vanno incontro a coniugazione con acido glucuronico, secrezione biliare e riciclo enteroepatico (Lucek, 1985).

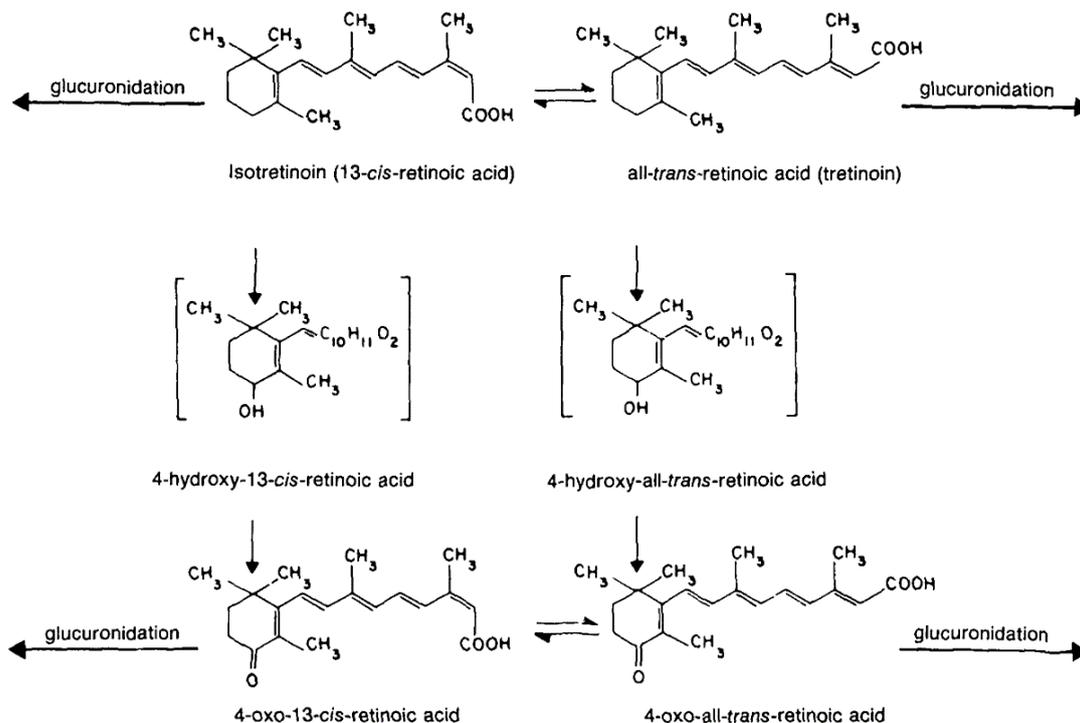


Figura 13 Percorso metabolico per l'isotretinoina.

2.6.2 Biodisponibilità

L'isotretinoina viene somministrata oralmente tramite una capsula di gelatina morbida ed elastica contenente una sospensione del farmaco in olio (Brazzell, 1982): in seguito all'assunzione per via orale, la biodisponibilità dell'isotretinoina è circa del 25% ma può essere aumentata da 1,5 a 2 volte se viene assunta con cibi ricchi di grassi, data l'elevata lipofilia della molecola (Fallah, 2021).

Il profilo della concentrazione ematica di isotretinoina, dopo l'assorbimento nell'uomo, è bifasico con un rapido emivita di disponibilità di circa mezz'ora e un'emivita di eliminazione terminale compreso tra 10 e 20 ore.

Per alcuni soggetti si osservano dei profili di concentrazione di isotretinoina in funzione del tempo piuttosto complessi, con picchi secondari e spesso terziari caratteristici (figura 14), originati dal riciclo enteroepatico del farmaco. Il fatto che il riciclo enteroepatico possa essere una componente della farmacocinetica dell'isotretinoina è suggerito anche dal confronto dei parametri farmacocinetici tra pazienti normali e pazienti con il tubo di Kehr: la dose orale del farmaco è assorbita dal tratto gastrointestinale in misura simile da entrambi i soggetti, ma le concentrazioni ematiche di isotretinoina e del suo metabolita risultano più basse nei pazienti con il tubo biliare, il quale impedisce infatti la circolazione enteroepatica (Brazzell, 1982).

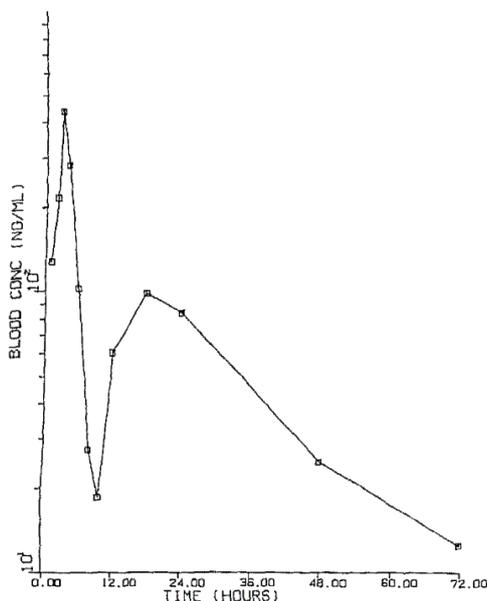


Figura 14 Curva della concentrazione sanguigna di isotretinoina in funzione del tempo in un soggetto, in seguito all'assunzione di una singola dose di isotretinoina da 100mg.

Le curve riportate in figura 15a, che mostrano l'andamento della concentrazione sanguigna di isotretinoina e di 4-osso-isotretinoina in funzione del tempo, evidenziano dei picchi di circa 300 ng/mL 2 o 3 ore dopo una dose orale di 80 mg di isotretinoina, la quale poi diventa rapidamente non rilevabile

(Wiegand, 1998). Le concentrazioni ematiche del metabolita generalmente superano quelle del farmaco progenitore dopo 6 ore; inoltre, l'emivita apparente per l'eliminazione di 4-ossi-isotretinoina è considerevolmente maggiore di quella del composto progenitore, variando da 11 a 50 ore, con una media armonica di 29 ore. I profili farmacocinetici delle due sostanze dopo una singola dose di isotretinoina suggeriscono che, a dosi multiple, il metabolita dovrebbe accumularsi in misura maggiore rispetto al farmaco progenitore: infatti, il rapporto medio tra l'area sottesa dalla curva della concentrazione ematica di 4-osso-isotretinoina e quella sottesa dalla concentrazione ematica di isotretinoina è compreso tra 3 e 3,5 (Brazzell, 1982).

La figura 15b mostra invece le concentrazioni di isotretinoina e del suo principale metabolita 4-osso-isotretinoina, le quali vanno rispettivamente da 100 a 200 ng/mL e da 600 a 800 ng/mL, durante un trattamento di 30 giorni a dosi multiple. Il grafico dimostra che l'isotretinoina e il suo metabolita raggiungono concentrazioni allo stato stazionario entro 10 giorni, con una dose di 40 mg due volte al giorno e le concentrazioni di 4-osso-isotretinoina allo stato stazionario sono circa 4-5 volte superiori a quelle dell'isotretinoina.

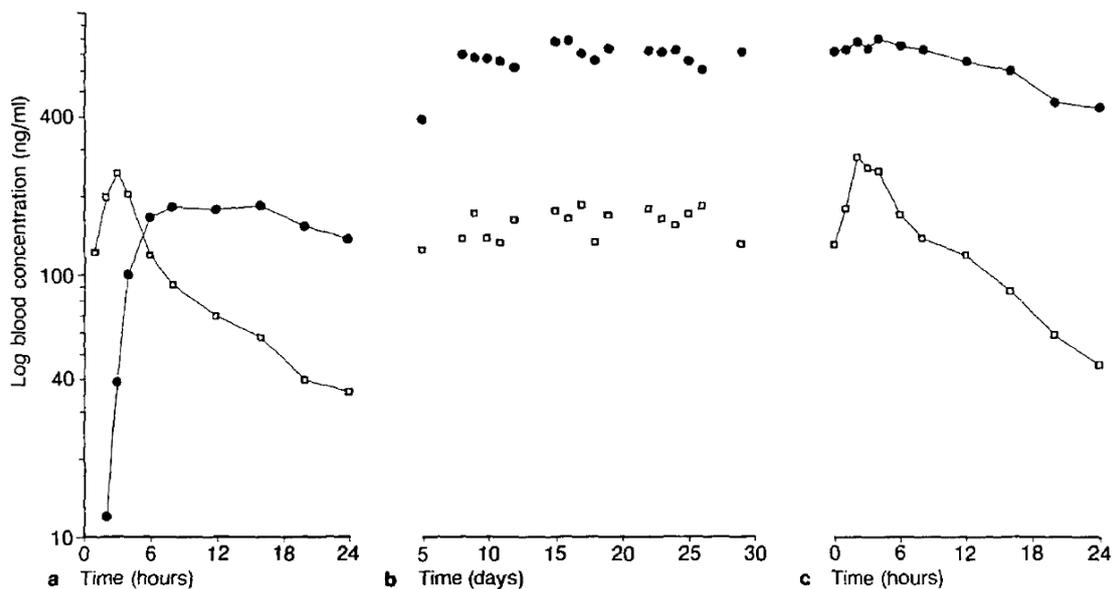


Figura 15 Curve logaritmiche della concentrazione sanguigna di isotretinoina (●) e del suo principale metabolita 4-osso-isotretinoina (○) in funzione del tempo; (a) profilo concentrazione-tempo dopo una singola dose di isotretinoina da 80 mg; (b) concentrazioni medie di isotretinoina e 4-osso-isotretinoina durante l'assunzione di una dose di 40 mg due volte al giorno, per 25 giorni; (c) profili concentrazione-tempo in seguito all'assunzione di una singola dose da 80 mg, somministrata 12 ore dopo l'ultima dose da 40 mg.

La figura 16 mostra le concentrazioni plasmatiche di isotretinoina, acido retinoico e dei loro metaboliti nelle ultime 4 settimane di trattamento, assumendo una dose orale di 30 mg al giorno e durante le 6 settimane seguenti (Wiegand, 1998).

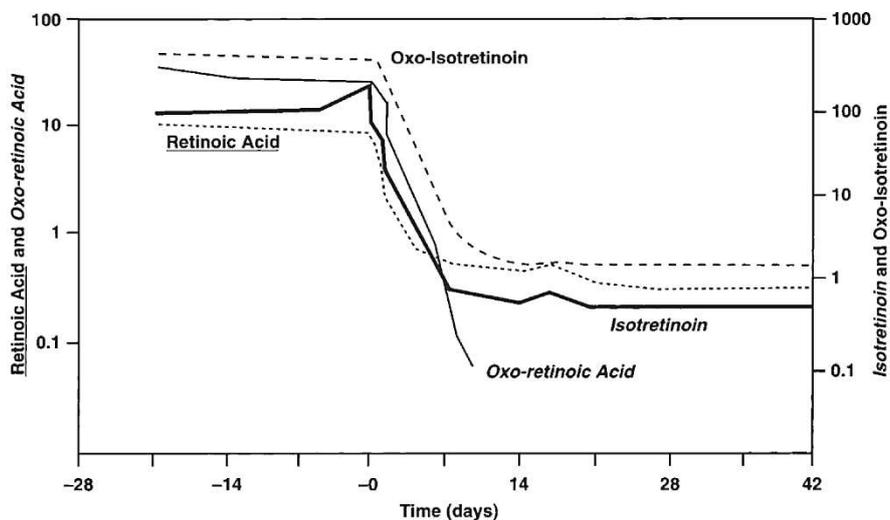


Figura 16 Concentrazioni plasmatiche medie di isotretinoina e dei suoi principali metaboliti durante le ultime 4 settimane di trattamento (giorni da -28 a 0) con isotretinoina orale (normalizzata per una dose orale giornaliera di 30 mg) e durante le 6 settimane dopo la fine del trattamento (giorni da 0 a 42). Si noti la diversa scala dell'asse y per l'acido retinoico e l'isotretinoina (26).

L'emivita di eliminazione dell'isotretinoina varia da 7 a 37 ore, mentre quello dei suoi metaboliti noti varia da 11 a 50 ore (Ganceviciene, 2010); entrambi vengono escreti in quantità simili nelle urine e nelle feci (Wiegand, 1998).

2.7 Farmacodinamica

La principale azione farmacologica dell'isotretinoina nel trattamento dell'acne grave è la soppressione del sebo (Melnik, 2017): essa è efficace nel ridurre le dimensioni delle ghiandole sebacee, diminuendo la proliferazione dei sebociti basali, e nel sopprimere la produzione di sebo fino al 90%, inibendo la sintesi dei lipidi sebacei (Zouboulis, 2006).

Inoltre, esercita anche un effetto antinfiammatorio attraverso una riduzione dell'espressione del recettore Toll-Like-2 nei monociti e un'attenuazione della risposta delle citochine infiammatorie nei confronti di *C. acnes*. Questi cambiamenti persistono per almeno 6 mesi dopo l'interruzione della terapia: la sottoregolazione del TLR-2 potrebbe non essere permanente, ma può essere mantenuta abbastanza a lungo da modulare la risposta immunitaria adattativa, oppure da mantenere l'acne in

remissione fino a quando non si attenuano gli altri fattori legati all'età che influenzano il microbioma cutaneo o la ghiandola sebacea (Dispenza, 2012)- (Fallah, 2021).

2.7.1 Recettori RAR/RXR

I retinoidi esercitano alcuni dei loro effetti fisiologici legandosi a due famiglie distinte di recettori nucleari: RAR (Retinoic Acid Receptor) e RXR (Retinoid X Receptor) (Rademaker, 2013).

Esistono tre isoforme di entrambe le tipologie di recettori, note come α , β e γ , dei quali l'espressione di γ è la più alta nella pelle umana: retinoidi diversi variano nella loro affinità per il sottotipo di recettore e possono essere più selettivi per un recettore rispetto ad un altro (Baldwin, 2021).

I domini di legame dei recettori RAR e RXR mostrano una struttura ad alfa-elica ripiegata antiparallela su sé stessa (figura 17), che è caratteristica di molti recettori nucleari. Alla base di questa si trova una tasca (figura 18), che è il sito di legame dei retinoidi: si tratta di una cavità idrofobica con un'apertura adiacente al carbonio terminale dell'alfa elica, chiamata H12, che funge da botola, chiudendosi quando un retinoide entra nel sito di legame. Quando l'H12 chiude il sito di legame, si forma una superficie di legame esterna, nota come funzione di attivazione 2, che è responsabile del legame con le proteine coattivatrici, fondamentali nella regolazione dei processi di trascrizione (Chisholm, 2020).

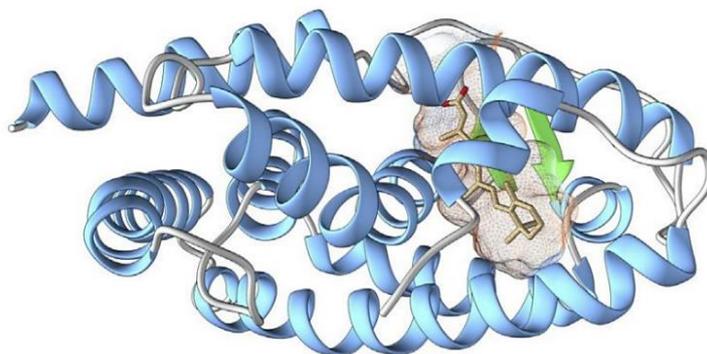


Figura 17 Struttura cristallina a raggi X di RAR- γ legata all'acido tutto-trans-retinoico, con evidenziata la superficie idrofobica di legame.

La differenza importante tra i due tipi di recettori risiede nella forma del sito di legame: nei recettori RXR è a forma di L, in quelli RAR è più lineare, a forma di I. Di conseguenza, l'acido tutto-trans-retinoico è in grado di legarsi ai RAR ma non ai RXR, mentre l'acido 9-cis-retinoico è in grado di legarsi indistintamente ad entrambi.

Questi recettori nucleari sono fattori di trascrizione che funzionano come eterodimeri RAR-RXR e regolano una serie di percorsi di segnalazione, mediando la trascrizione dei RARE (Retinoic Acid Response Element).

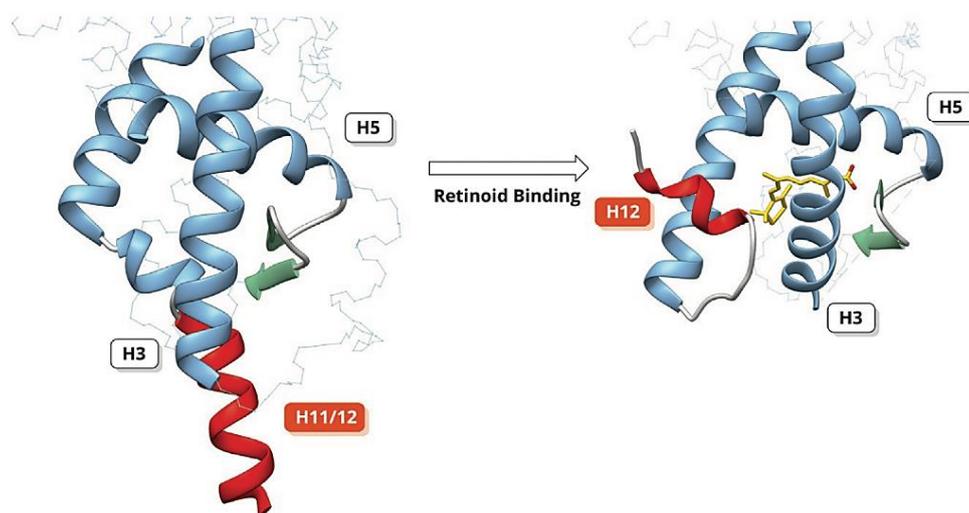


Figura 18 Cambiamenti conformazionali che si verificano in seguito al legame tra l'acido 9-cis-retinoico e il recettore RXR- γ .

Per suscitare queste risposte trascrizionali, i retinoidi vengono trasportati dal citoplasma al nucleo cellulare tramite piccole proteine di trasporto, note come CRABP (Cellular Retinoic Acid-Binding Protein). I CRABP rilasciano i retinoidi, i quali vanno a legarsi al dominio di legame del ligando dei RAR/RXR, provocando una serie di cambiamenti conformazionali che racchiudono il retinoide all'interno del dominio di legame. Questo incapsulamento determina la comparsa di una superficie di legame, la funzione di attivazione 2 (AF-2), che lega i promotori di trascrizione, e una superficie di dimerizzazione che consente la dimerizzazione con un altro RAR/RXR. Questo dimero recettore è in grado di legare un RARE e il risultante complesso ternario funge da piattaforma stabile per la trascrizione di questo RARE (Chisholm, 2020).

2.7.2 Meccanismo d'azione recettore-dipendente

La forte attività dell'isotretinoina risulta sorprendente, in quanto mostra basse affinità di legame sia per le proteine di trasporto dell'acido retinoico (CRABP), sia per le due tipologie di recettori; al contrario, i suoi stereoisomeri si legano specificamente ai recettori RAR e RXR. Questa apparente contraddizione è stata chiarita dimostrando che l'isotretinoina mostra la sua attività attraverso l'isomerizzazione selettiva a tretinoina nei sebociti, la quale agisce tramite RAR per esercitare il suo effetto antiproliferativo su queste cellule.

È quindi considerata un profarmaco per le cellule che sono in grado di isomerizzare l'acido 13-cis-retinoico in tutto-trans-retinoico e il sebocita è una di queste cellule, con un'elevata attività isomerica per la conversione dell'isotretinoina (Zouboulis, 2006).

La tretinoina, che è quindi il principale metabolita attivo della vitamina A, si lega con un'affinità simile a tutti e tre i sottotipi di recettori, ma il legame con RAR- γ è la chiave dei suoi effetti: questo legame attiva il complesso che RAR- γ forma con il recettore X dei retinoidi RXR- α . Il complesso attivato a sua volta si lega a specifiche sequenze del promotore del DNA, che sono gli elementi di risposta dell'acido retinoico (RARE), modificando l'espressione di una moltitudine di geni (Baldwin, 2021).

Si stima che l'isotretinoina colpisca oltre 500 geni: 300 sono sovraregolati e 200 sottoregolati, anche se solo 27 di questi sembrano essere mediati tramite il classico percorso RAR/RARE (Rademaker, 2013).

2.7.3 Meccanismo d'azione recettore-indipendente

Si ritiene che le azioni antiproliferative e antinfiammatorie della molecola siano mediate da un meccanismo di regolazione negativo e indiretto. Questi effetti indiretti derivano dalla sottoregolazione di geni che non contengono RARE nella loro regione del promotore: si ottengono, ad esempio, attraverso la riduzione dell'attività dei fattori di trascrizione nucleare pro-infiammatori, come la proteina attivatrice 1 (AP-1), che normalmente sovraregola le metalloproteasi della matrice responsabili della formazione delle cicatrici dell'acne (Baldwin, 2021).

Il modello di espressione genica indotto dall'isotretinoina cambia nel tempo: immediatamente dopo l'inizio della somministrazione del farmaco, si verifica una sovraregolazione dei geni oncosoppressori e dei geni coinvolti nel trasferimento o nel legame di ioni e piccole molecole. Dopo 8 settimane di trattamento vi è una sottoregolazione dei geni coinvolti nel metabolismo di steroidi, colesterolo e acidi grassi e una sovraregolazione dei geni che codificano proteine strutturali come il collagene e fibronectina: c'è quindi l'adozione, da parte della pelle, di un modello di espressione genica simile alla guarigione della ferita, con successiva riparazione e rimodellamento.

Gli effetti sebo-soppressivi esercitati attraverso un meccanismo recettore-indipendente includono l'induzione all'apoptosi e all'arresto del ciclo cellulare, in particolare nella ghiandola sebacea (Rademaker, 2013).

I sebociti umani vengono eliminati naturalmente per apoptosi nel loro percorso verso la differenziazione terminale, prima della morte e della secrezione olocrina: la differenziazione terminale e l'apoptosi sono diversi eventi cellulari geneticamente programmati, entrambi seguiti dalla morte cellulare (Zouboulis, 2006).

L'apoptosi dei sebociti può essere mediata da un' aumentata induzione di geni chiave, tra cui il TRAIL (Tumor Related Apoptosis Inducing Ligand) e il gene della Lipocalina 2 (LCN2), che codifica per il NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin).

Vi è probabilmente un effetto del dosaggio sull'apoptosi dei sebociti e delle loro cellule progenitrici, che spiega gli effetti soppressivi più lunghi che hanno dosaggi maggiori di isotretinoina (cioè 40 settimane con un dosaggio di 0.1 mg/kg/giorno contro 80 settimane con un dosaggio di 1.0 mg/kg/giorno).

L'arresto del ciclo cellulare può essere invece mediato dall'induzione dei fattori di trascrizione nucleare chiamati FoxO (Forkhead box O), che sono di quattro tipi: FoxO1, FoxO3, FoxO4 e FoxO6: FOXO1, in particolare, sopprime la proliferazione dei cheratinociti umani, promuovendo la loro differenziazione e apoptosi (Fallah, 2021). Nei pazienti con acne, l'attività di FoxO è soppressa a causa della crescita del livello di insulina e del fattore IGF (Insulin-like Growth Factor), che aumentano entrambi durante la pubertà, i quali stimolano l'attività della proteina Akt: questa provoca la fosforilazione di FoxO, con la sua conseguente inattivazione attraverso il sequestro citoplasmatico (Melnik, 2017).

Conclusioni

Una malattia multifattoriale come l'acne necessita di trattamenti che agiscano sulla maggior parte dei fattori responsabili della sua formazione, quindi sull'aumento della produzione di sebo, l'ipercheratinizzazione follicolare e la proliferazione batterica, che comportano irritazione e infiammazione.

L'isotretinoina e i suoi isomeri costituiscono la prima generazione di retinoidi clinicamente utili alla cura della patologia: sono utilizzati sia in forma topica che orale e spesso vengono prescritti in combinazione con agenti antimicrobici o, nel caso di forme più gravi di acne, con antibiotici.

Trattamenti alternativi includono perossido di benzoile, acidi salicilico e azelaico, farmaci antiandrogeni e antiseborroici.

La conoscenza dei numerosi fattori patogeni è in continua evoluzione e potrebbe portare allo sviluppo di una terapia batteriofagea per il trattamento dell'acne, da utilizzare eventualmente in combinazione con retinoidi topici e con la nuova terapia laser e fotodinamica.

In ogni caso, l'inizio della terapia con questo farmaco potenzialmente teratogeno va discusso tra medico curante e paziente, dopo aver analizzato in maniera specifica la gravità della patologia, la risposta alle eventuali terapie precedenti e l'impatto che l'acne ha sulla qualità della vita del paziente.

Bibliografia

- Altucci, L. a. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature Reviews Cancer*, 181-193.
- B. Dréno, S. P. (2018). Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 5-14.
- Baldwin, H. e. (2021). 50 years of topical retinoids for acne: evolution of treatment. *American journal of clinical dermatology*, 315-327.
- Beylot, C. e. (2014). Propionibacterium acnes: an update of its role in the pathogenesis of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 271-278.
- Brazzell, R. K. (1982). Pharmacokinetics of the retinoids isotretinoin and etretinate: A comparative review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 643-651.
- Cheng, Y. e. (2021). Conformational polymorphs of isotretinoin and their impact on physicochemical and biological properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 610.
- Chisholm, D. R. (2020). Design of synthetic retinoids. *Methods in Enzymology*, 453-491.
- Dispenza, M. C. (2012). Systemic isotretinoin therapy normalizes exaggerated TLR-2-mediated innate immune responses in acne patients. *Journal of Investigative Dermatology*, 2198-2205.
- Fallah, H. a. (2021). Isotretinoin in the management of acne vulgaris: practical prescribing. *International journal of dermatology*, 451-460.
- Ganceviciene, R. a. (2010). Isotretinoin: state of the art treatment for acne vulgaris. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, S47-S59.
- Indu, K. L., & Tanweer, H. (2018). Models for acne: A comprehensive study. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 329-340.
- Kapała, J. e. (2022). Adverse Events in Isotretinoin Therapy: A Single-Arm Meta-Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6463.
- Khalil, N. Y., Darwish, I. A., & Al-Qahtani, A. A. (2020). Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. *Isotretinoin*, 119-157.
- Layton, A. (2009). The use of isotretinoin in acne. *Dermato-Endocrinology 1:3*, 162-169.
- Lucek, R. W. (1985). Clinical pharmacokinetics of the retinoids. *Clinical pharmacokinetics*, 38-62.
- Melnik, B. C. (2017). Apoptosis may explain the pharmacological mode of action and adverse effects of isotretinoin, including teratogenicity. *Acta Dermato-Venereologica*, 173-181.
- O'Neill, A. M., & Gallo, R. L. (2018). Host-microbiome interactions and recent progress into understanding the biology of acne vulgaris. *Microbiome*, 1-16.
- Rademaker, M. (2013). Isotretinoin: dose, duration and relapse. What does 30 years of usage tell us? *Australasian Journal of Dermatology*, 157-162.
- Salman, M. e. (2005). An efficient commercial process for the preparation of isotretinoin. *Organic process research & development*, 302-305.
- Shakeel, F. e. (2022). Solubilization and Thermodynamic Analysis of Isotretinoin in Eleven Different Green Solvents at Different Temperatures. *Materials*.
- Suva, M. A. (2014). A brief review on acne vulgaris: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Research & Review: Journal of Pharmacology*, 1-12.

- Tahir, C. M. (2010). Pathogenesis of acne vulgaris: simplified. In C. M. Tahir, *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*. Karachi: Karachi Editors Club.
- Thielitz, A., Krauthiem, A., & Gollnick, H. (2006). Update in retinoid therapy of acne. *Dermatologic therapy*, 272-279.
- Well, D. (2013). Acne vulgaris: A review of causes and treatment options. Nurse practitioner. In *The Nurse Practitioner* (p. 22-31). Lippincott Williams & Wilkins.
- Wiegand, U.-W. a. (1998). Pharmacokinetics of oral isotretinoin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, S8-S12.
- Yvonne Achermann, E. J. (2014). Propionibacterium acnes: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clinical microbiology review*, 419-440.
- Zouboulis, C. C. (2006). Isotretinoin revisited: pluripotent effects on human sebaceous gland cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 2154-2156.