



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN FARMACIA

**Il metabolismo del folato come bersaglio
terapeutico: approcci di vecchia e nuova
generazione**

Relatore: Chiar.mo Prof. Pasquale Linciano

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

Giulia Giusti
Matricola: 466464

Anno Accademico 2024/2025

Abstract

Il metabolismo del folato costituisce un bersaglio terapeutico centrale poiché l'acido folico, convertito in tetraidrofolato e nei suoi derivati attivi, sostiene processi essenziali per la proliferazione e la sopravvivenza cellulare.

La tesi si propone di analizzare in dettaglio i principali meccanismi cellulari, molecolari e biochimici del metabolismo del folato. Una volta definiti i principali enzimi coinvolti, nello specifico la diidrofolato reduttasi (DHFR) e la timidilato sintasi (TS), si evidenzierà la loro rilevanza come bersagli dei farmaci antifolati.

In questo contesto saranno prese in esame, in un'ottica comparata, diverse molecole terapeutiche di generazioni consecutive, progettate con lo scopo di compromettere il metabolismo del folato al fine di arrestare dei processi patologici.

L'attenzione verrà rivolta inizialmente al metotrexato, capostipite degli antifolati di prima generazione, efficace nell'azione terapeutica sia in ambito oncologico che immunitario, ma limitato dalla scarsa selettività e dalla severa tossicità sistemica. Per superare questi limiti vennero sviluppate le strutture dei derivati di seconda generazione, (pralatrexato, pemetrexed e raltitrexed) al fine di migliorare selettività, accumulo intracellulare ed efficacia terapeutica.

L'ultima sezione dell'elaborato è dedicata all'esame di protocolli terapeutici innovativi basati sul "drug targeting". Saranno oggetto di approfondimento le terapie mirate ai recettori dei folati FR- α e FR- β , che permettono di indirizzare i farmaci direttamente alle cellule tumorali o

infiammatorie. In questo scenario verranno evidenziate anche le terapie CAR-T, che rappresentano un ulteriore livello di precisione, in grado di riconoscere e distruggere selettivamente le cellule tumorali.

Complessivamente, l'evoluzione nella progettazione di nuove strutture molecolari promuovono lo sviluppo di approcci terapeutici più sicuri, efficaci e personalizzabili in base alle caratteristiche del paziente e della patologia.

Indice

1. Basi Chimico-Fisiche e percorsi metabolici dell'acido folico

- 1.1 La vitamina B9 e il suo ruolo nel corpo umanop. 4
- 1.2 Struttura chimica e proprietà chimico-fisichep. 5
- 1.3 Trasporto e assorbimento intestinale.....p. 7
- 1.4 Sistemi di efflusso e trasportatori di anioni organici.....p.13
- 1.5 Carenza e implicazioni cliniche.....p.13
- 1.6 Percorso metabolico e dinamiche dei folati.....p.14

2. Il metabolismo del carbonio a un atomo e il suo controllo enzimatico

- 2.1 Il metabolismo del carbonio a un atomop.16
- 2.2 Regolazione enzimatica e implicazioni clinichep.19

3. Metotrexato: antagonista dei folati e farmaco multitasking

- 3.1 Scoperta degli antifolatip.22
- 3.2 Struttura chimica e meccanismi d'azionep.23
- 3.3 Versatilità clinica e applicazioni terapeutichep.28
- 3.4 Proprietà farmacocinetiche del metotrexato: dall'assorbimento all'eliminazionep.30
- 3.5 Effetti collaterali e profilo di tossicità del metotrexato.....p.31
- 3.6 Meccanismi di resistenza al metotrexato.....p.33

4. Antifolati di seconda generazione

- 4.1 Pralatrexatop.36
- 4.2 Pemetrexedp.38
- 4.3 Raltitrexedp.41
- 4.4 Meccanismi di resistenza e tossicità dei derivati di seconda generazione p.42

5. Le nuove strategie terapeutiche

- 5.1 Gli anticorpi farmaco-coniugati ADCp.46
- 5.2 Le cellule CAR-Tp.50
- 5.3 Vaccini anti-FR α p.54

Conclusioni.....p.56

Bibliografia e Sitografia.....p.57

1. Basi Chimico-Fisiche e Percorsi Metabolici dell'acido folico

La scoperta dei folati risale agli anni '30 con gli studi di Lucy Wills sull'anemia in gravidanza. Isolata la molecola negli anni '40, la sua struttura chimica definitiva fu determinata solo nel 1948. (Shulpekova et al., 2021). La vitamina B9 (che comprende sia i folati naturali che l'acido folico sintetico) è un nutriente essenziale per la sintesi di DNA e RNA e per il metabolismo degli amminoacidi (Ebara, 2017).

Proprio la comprensione dei complessi meccanismi biochimici coinvolti ha permesso di delineare il ruolo centrale del metabolismo monocarbonioso, regolato dai folati, come motore della replicazione e riparazione genetica, focalizzando l'attenzione della ricerca verso lo sviluppo di strutture chimiche terapeutiche capaci di modularne l'attività.

Le prime applicazioni cliniche rivelarono che l'acido folico accelerava la leucemia; tale evidenza suggerì la necessità di contrastarne l'azione, portando alla sintesi dei primi antifolati, i quali gettarono le basi della moderna chemioterapia, con la comprensione del meccanismo d'azione di molecole come il metotrexato, capaci di inibire enzimi chiave del metabolismo monocarbonioso (Zheng & Cantley, 2019).

1.1. La vitamina B9 e il suo ruolo nel corpo umano

Un apporto adeguato di folati è essenziale per diverse funzioni fisiologiche: sostiene gli apparati cardiovascolare, emopoietico e immunitario, garantisce il corretto sviluppo del sistema nervoso fetale, protegge il benessere intestinale e contribuisce alla prevenzione oncologica (Liu et al., 2025).

Affinché la vitamina possa svolgere le sue funzioni, l'organismo ne garantisce un assorbimento costante a livello intestinale, finalizzato al suo rilascio nel torrente ematico; da qui, viene distribuita ai tessuti periferici per espletare le sue funzioni biologiche.

La sola dieta può non essere sufficiente in fasi che richiedono un'integrazione mirata, come per esempio la gravidanza. In questi contesti, si integra l'acido folico (forma sintetica) poiché offre maggiore stabilità e biodisponibilità rispetto ai folati naturali (Ebara, 2017).

1.2. Struttura chimica e proprietà chimico-fisiche dell'acido folico

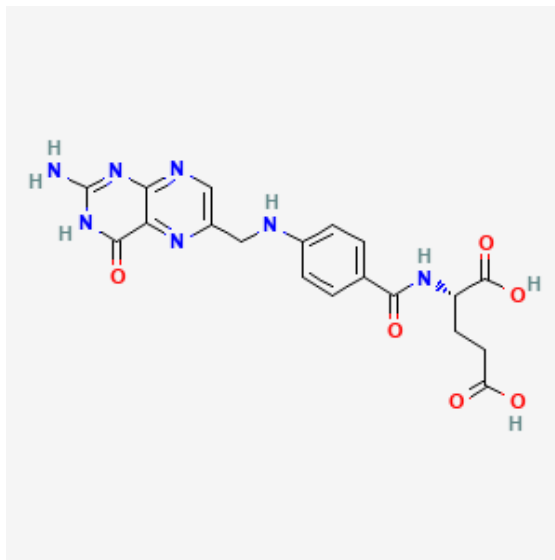


Fig.1 Chemical Structure Depiction. Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Folic acid. PubChem.

L'acido folico ($C_{19}H_{19}N_7O_6$) chiamato anche acido pteroilmonoglutammico, è composto da un nucleo pterinico — costituito da anelli pirimidinici e pirazinici fusi, sostituiti con un gruppo amminico in posizione 2 e un gruppo idrossilico in posizione 4 — unito all'acido para-amminobenzoico (PABA) tramite un ponte metilenico; il PABA è a sua volta legato a un residuo di glutammato (Shulpekova et al., 2021).

Inoltre, l'acido folico presenta solubilità (1,6 mg/L) e permeabilità ridotte (Pérez-Carreón et al., 2023) ma la sua biodisponibilità per via orale è superiore a quella dei folati naturali grazie alla sua stabilità chimica (Ebara, 2017) che gli consente di raggiungere integro il lume intestinale.

I derivati dei folati si distinguono per stato redox e per l'unità monocarboniosa trasportata: i derivati ridotti variano in base allo stato di ossidazione dell'unità monocarboniosa trasportata: dal 10-formil-THF (più ossidato) al 5-metil-THF (più ridotto). Quest'ultimo è la principale forma circolante nel sangue, mentre i derivati intermedi (10-formil-THF, metenil- e metilen-THF) agiscono prevalentemente a livello intracellulare, dove fungono da donatori di unità monocarboniose (Shulpekova et al., 2021).

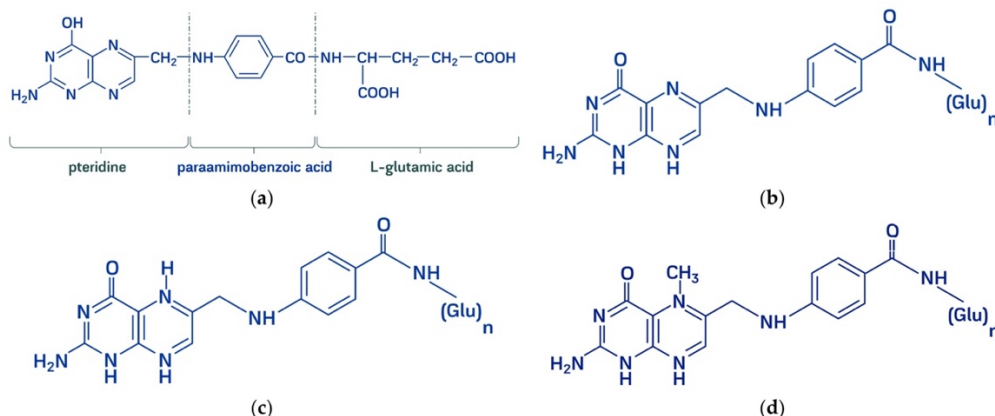


Fig.2 Confronto delle strutture chimiche di: (a) acido folico e dei suoi derivati metabolicamente attivi: (b) diidrofolato, (c) acido tetraidrofolico, (d) 5-metiltetraidrofolato. (Shulpekova et al., 2021).

Il folato circola dunque prevalentemente come 5-metil-THF, una forma metabolicamente inattiva. Per rientrare nel ciclo dei folati, deve essere convertita in tetraidrofolato (THF) attraverso una reazione di demetilazione che è catalizzata dall'enzima metionina sintetasi (MS) con la vitamina B12 (cobalamina) come cofattore. Altrimenti il folato rimane

intrappolato nella forma metilata, sottraendo i precursori necessari alla biosintesi dei nucleotidi e compromettendo quindi la replicazione del DNA (Shuvalov et al., 2017).

Poiché i folati sono termolabili e sensibili a luce e ossigeno (eccetto il 5-formil-THF), la ricerca farmaceutica sta sviluppando sistemi di rilascio avanzati con maggior solubilità e permeabilità (Pérez-Carreón et al., 2023). Per ottimizzare la risposta terapeutica in caso di barriere biologiche o di difetti genetici del trasportatore si possono inoltre utilizzare forme già ridotte come il 5-MTHF (Shulpekova et al., 2021).

1.3. Trasporto e assorbimento intestinale

I folati si trovano prevalentemente sotto forma poligluttammata negli alimenti. Vengono convertiti in monogluttammati dall'enzima γ -glutamil idrolasi per poter essere assimilati dalla mucosa intestinale.

Dato il carattere idrofilo del folato, che rende difficile la libera diffusione, il suo ingresso nelle cellule è mediato da tre sistemi specifici che variano per affinità e specificità nei confronti del substrato oltre che per sensibilità al pH (Visentin et al., 2014).

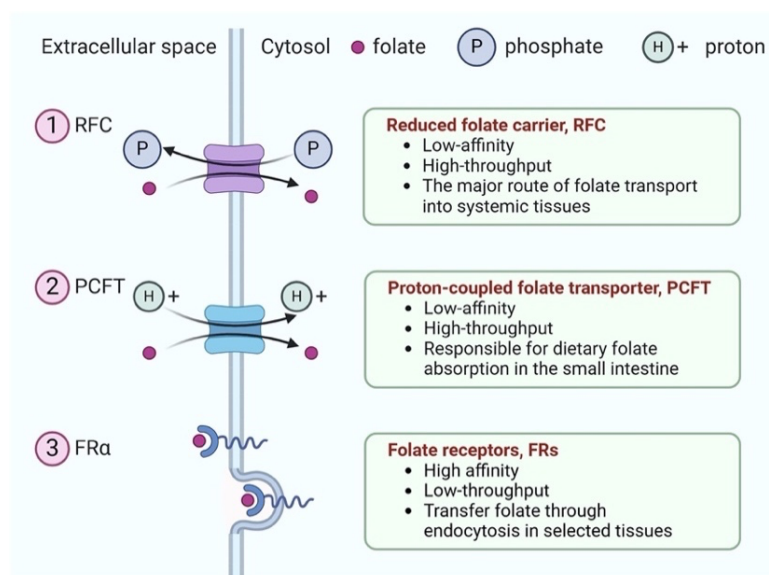


Fig. 3 Trasportatori cellulari del folato (Mai et al., 2023).

- **Trasportatore di folati ridotti (RFC)**

L'RFC (Reduced Folate Carrier), proteina della famiglia SLC è il principale trasportatore dei folati dal sangue verso l'interno delle cellule dei tessuti periferici. Agisce tramite un meccanismo di anti-porto bidirezionale (sposta due molecole contemporaneamente in direzioni opposte), sfruttando il gradiente di concentrazione dei fosfati organici tra l'interno e l'esterno della membrana cellulare. Questo squilibrio funge da motore per l'RFC, che fa uscire i fosfati organici dalla cellula per far entrare i folati (Gonen & Assaraf, 2012).

L'RFC ha un'elevata affinità per i folati ridotti (tra cui il 5-metilTHF e il 5-formil-THF) e una scarsa efficacia verso l'acido folico sintetico (Zhao et al., 2017). La sua attività è strettamente dipendente dal gradiente anionico e funziona al meglio quando il pH è neutro (intorno a 7.4), mentre diminuisce progressivamente se il pH si abbassa, fino ad annullarsi a pH acidi (< 6.5). Questo perché a pH acido avviene la protonazione dei gruppi funzionali del trasportatore o del ligando, che impedisce il legame proteina-folato. A differenza di altri sistemi di trasporto, l'RFC non possiede un dominio di legame per l'ATP. Pertanto, la sua funzione è indipendente dalla disponibilità di ATP come fonte energetica (Shulpekova et al., 2021).

La proteina RFC è ampiamente distribuita nei tessuti sani (midollo osseo, tratto gastrointestinale, cute, polmoni e linfociti) ma è espressa anche in numerosi tessuti tumorali (Gonen & Assaraf, 2012) (Shulpekova et al., 2021).

Come verrà illustrato nei capitoli successivi, sono proprio i trasportatori RFC ad essere sfruttati dai farmaci derivati dei folati come sistema di trasporto per accedere alla cellula. È infatti grazie alle loro particolari caratteristiche strutturali, che queste molecole possono essere riconosciute

e penetrare nella cellula attraverso questa via di accesso per esplicare la loro azione citotossica.

Infatti, livelli troppo bassi di RFC, riducendo l'espressione del trasportatore, limitano anche la captazione cellulare di alcuni farmaci, come il metotrexato, con conseguente resistenza farmacologica e aumento della tossicità (Shulpekova et al., 2021).

- **Recettori dei folati (FR)**

Gli FR (Folate Receptors) sono proteine ad alta affinità per il 5-metilTHF e l'acido folico, presenti in tre isoforme (Gonen & Assaraf, 2012):

- FR α (FOLR1): ancorata alla membrana, è espressa in tessuti epiteliali sani (es. utero) ma frequentemente sovraespressa in molti tumori (ovaio, seno), rendendola un bersaglio d'elezione per le moderne terapie mirate, come i coniugati anticorpo-farmaco (Gonzalez et al., 2024), che verranno trattati in seguito più nel dettaglio.
- FR β (FOLR2): ancorata alla membrana, si trova in organi del sistema immunitario (timo, milza), nella placenta e in alcune cellule maligne, in particolare quelle associate a leucemie mieloidi (Roy et al., 2021). Questa isoforma è oggetto di studi per un possibile utilizzo in moderne strategie terapeutiche come verrà illustrato dettagliatamente nel capitolo 5.
- FR γ (FOLR3): forma solubile secreta, tipica dei tessuti ematopoietici (midollo osseo), con probabile funzione di messaggero (Shulpekova et al., 2021).

La distribuzione e l'affinità di queste isoforme variano significativamente tra i vari tessuti, con maggiore espressione nei tessuti con un elevato metabolismo e in quelli che mostrano una significativa attività di proliferazione e differenziazione cellulare (Shulpekova et al., 2021).

Gli FR mediano l'ingresso dei folati tramite endocitosi recettore-mediata e ATP-dipendente. Il legame è stabilito da una rete di ponti idrogeno, interazioni elettrostatiche (legami ionici) e forze di Van der Waals. L'affinità di legame recettore-folato è garantita da residui di amminoacidi quali arginina e acido aspartico che bloccano la molecola di folato in una conformazione specifica. Il legame avviene a pH fisiologico (7.4) in microdomini della membrana chiamati caveole; la membrana si inflette creando una sacca chiamata endosoma in cui l'ambiente si acidifica (pH 5.5-6.5) tramite pompe protoniche ATPasi. Questa variazione porta alla rottura dei ponti idrogeno stabiliti a pH neutro e favorisce un cambiamento di conformazione del recettore che rilascia il folato nel citoplasma, permettendo quindi al recettore di tornare in superficie per essere riutilizzato in un nuovo ciclo. L'abbassamento del pH nell'endosoma causa la protonazione di gruppi funzionali del recettore e del ligando (Gonzalez et al., 2024) (Shulpekova et al., 2021). Il sistema è autoregolato per mantenere l'omeostasi intracellulare: grazie alla loro altissima affinità ai folati, gli FR possono catturarli anche a basse concentrazioni extracellulari. Una volta raggiunto un livello di folati intracellulari sufficiente, l'attività dei recettori diminuisce per prevenire un accumulo eccessivo.

Le conseguenze di una sovraespressione degli FR dipendono dallo stadio della patologia: nelle fasi pre-neoplastiche l'apporto di folati può svolgere una funzione protettiva, contribuendo alla stabilità genomica e alla riparazione del DNA danneggiato, ma nei tumori conclamati, le cellule accelerano la sintesi di DNA e RNA poiché ricevono più folati, sostenendo così una replicazione cellulare più rapida (Shulpekova et al., 2021).

Questi recettori, in particolare l'FR α , rappresentano un eccellente bersaglio selettivo per lo studio di strategie di medicina di precisione. L'uso di questi target specifici ha lo scopo di ottimizzare il profilo di

sicurezza dei farmaci, migliorando sia la loro efficacia che la prognosi del paziente.

- **Proton-Coupled Folate Transporter (PCFT)**

Il PCFT (trasportatore di folati accoppiato a un protone) è una proteina cruciale per il mantenimento dei corretti livelli di folati nell'organismo.

Il PCFT funziona come un "simportatore" elettrogenico, sfruttando il gradiente di concentrazione dei protoni attraverso la membrana cellulare per spostare simultaneamente protoni e folato nella stessa direzione. Per bilanciare la carica elettrica, il trasportatore trasferisce un numero di protoni superiore rispetto agli anioni bivalenti di folato (Shulpekova et al., 2021).

Il processo di trasporto avviene attraverso un ciclo sequenziale di cambiamenti conformazionali in cui il trasportatore lega e rilascia i protoni e il folato:

- Fase 1: Il ciclo inizia quando un protone si lega alla proteina. Nello specifico, la protonazione dei residui di istidina e acido glutammico innesca il cambiamento conformazionale della proteina necessario al processo, rendendo il sito di legame più ricettivo, cioè aumentando la sua affinità per il folato.
- Fase 2-3: Il legame del folato, carico negativamente, alla forma protonata di PCFT è mediato da interazioni elettrostatiche e legami a idrogeno. Questo legame provoca l'occlusione del complesso (ovvero il complesso si chiude attorno alle molecole), seguita da un ulteriore cambiamento conformazionale che apre il trasportatore verso l'interno della cellula.
- Fase 4-5: il folato e il protone vengono rilasciati nel citoplasma in modo sequenziale, con il rilascio del folato che precede quello del protone.

- Fase 6: Il trasportatore torna alla conformazione originale “aperta verso l’esterno” (outward-open), pronto per un nuovo ciclo di trasporto (Zhao et al., 2017) (Zhao & Goldman, 2013).

Il PCFT è espresso massivamente nelle membrane apicali di duodeno, digiuno prossimale e rene (Zhao & Goldman, 2013).

La relazione tra localizzazione e funzione è resa evidente dal microambiente: l’elevata acidità dell’intestino tenue prossimale fornisce la forza motrice ideale per l’assorbimento (Gonen & Assaraf, 2012). A conferma della dipendenza ambientale, lo studio di (Shulpekova et al., 2021) evidenzia come l’affinità per i folati sia ottimale in un intervallo di pH tra 5.5 e 7.3 annullandosi totalmente a pH fisiologico (7.4). A valori di pH neutro, infatti, la concentrazione protonica troppo bassa non consente il mantenimento dello stato protonato dei residui di istidina, impedendo la funzionalità del trasportatore. Lo studio conclude che, sebbene il PCFT sia simile al RFC per la sua capacità di legare sia il 5-metil-THF che il 5-formil-THF, se ne differenzia per la sua dipendenza dal pH.

Oltre al ruolo nell’assorbimento intestinale, il PCFT svolge una seconda funzione cruciale come sistema di esportazione endosomiale: la sua localizzazione sulla membrana degli endosomi gli consente infatti di mediare il recupero dei folati internalizzati tramite i recettori FR (Shulpekova et al., 2021).

Tuttavia, è importante sottolineare che, nonostante la loro versatilità, né il PCFT né l’RFC sono in grado di trasportare le forme poliglutammate, siano esse folati naturali o farmaci antifolato (Zhao et al., 2017).

Nei capitoli successivi verranno descritti sia alcuni farmaci antifolati progettati per utilizzare queste proteine come vie di accesso alla cellula, consentendo l’azione terapeutica, sia farmaci di nuova generazione per i

quali queste proteine rappresenteranno il bersaglio molecolare diretto del trattamento.

1.4. Sistemi di efflusso e trasportatori di anioni organici

L'organismo regola l'omeostasi dei folati attraverso vari sistemi di trasporto a livello cellulare. Mentre PCFT e FR mediano l'ingresso dei folati, l'omeostasi è regolata anche attraverso sistemi di efflusso.

L'RFC agisce come un trasportatore bidirezionale: è noto principalmente per l'assorbimento, ma rappresenta anche il primo snodo per il movimento dei folati verso l'esterno della cellula. Ad integrare l'azione dell'RFC interviene la famiglia delle proteine ABC (ad esempio MRP1–5) che agiscono come pompe di efflusso, usando energia sotto forma di ATP per espellere dalla cellula sia i folati, che sostanze tossiche e farmaci.

Il gruppo dei trasportatori di anioni organici (OAT), gestisce invece lo spostamento sia dei folati presenti naturalmente nell'organismo sia delle sostanze antifolato (farmaci o molecole che ne inibiscono l'azione). In ambito renale, si osserva una raffinata specializzazione: mentre gli OAT-K1 e OAT-K2 sulla membrana apicale dei tubuli renali gestiscono il movimento bidirezionale (in entrata e in uscita), contribuendo all'eliminazione delle sostanze tossiche attraverso l'urina, i trasportatori OAT1, OAT2 e OAT3 regolano la fuoriuscita dei folati dal rene verso il flusso sanguigno, completando così il ciclo di ricircolo renale dei folati (Shulpekova et al., 2021).

1.5. Carenza e implicazioni cliniche

L'integrità dei sistemi di trasporto è fondamentale per prevenire la carenza di folati. Tale deficit non deriva necessariamente da un malfunzionamento biochimico dei trasportatori, ma può dipendere da un apporto dietetico inadeguato, patologie da malassorbimento intestinale, fabbisogno aumentato (tipico della gravidanza), interazioni farmacologiche.

La carenza di folati rappresenta un noto fattore di rischio per lo sviluppo di patologie croniche, tra cui patologie cardiovascolari, neurologiche e oncologiche oltre ad anomalie fetali (Hou & Matherly, 2014).

In ambito oncologico, esiste una stretta connessione a livello molecolare tra la carenza di folati ed i processi cancerogeni (Shulpekova et al., 2021). Bassi livelli di folati influenzano l'instabilità del DNA, lo stress ossidativo e la proliferazione cellulare fuori controllo, mentre un apporto ottimale esercita un ruolo protettivo riducendo il rischio di alterazioni cellulari pre-cancerose (Ebara, 2017).

(Czeizel et al., 2013) evidenziano la gravità delle conseguenze alle quali può portare la carenza di folati:

- alterazioni epigenetiche: essendo i folati donatori di gruppi metilici, i quali permettono la metilazione delle citosine del DNA, una carenza ne causerebbe instabilità con conseguente errore genetico e trasformazione neoplastica.
- anemia megaloblastica: il folato è essenziale per la sintesi della timina che è alla base della corretta duplicazione del DNA. Il blocco del DNA impedisce dunque la mitosi, causando questa patologia.
- iperomocisteinemia: l'omocisteina è tossica in quanto induce stress ossidativo.

È pertanto fondamentale assicurarsi un apporto sufficiente di folati tramite l'alimentazione o l'integrazione, prestando attenzione a non mascherare un'eventuale carenza di vitamina B12, la quale potrebbe portare a gravi danni neurologici se non diagnosticata tempestivamente (Ebara, 2017)

1.6. Percorso metabolico e dinamiche dei folati

Gli studi pubblicati da (Zhao et al., 2017) (Zhao et al., 2009) hanno permesso di chiarire il percorso metabolico dei folati, dall'ingestione alimentare all'incorporazione definitiva nelle macromolecole.

- **Assorbimento intestinale:** I folati assunti con la dieta, principalmente derivati poliglutammati dei folati ridotti, vengono assorbiti nell'intestino, dove sono prima convertiti in monoglutammati, dall'enzima glutammato carbossipeptidasi II. Parallelamente, con la diffusione di integratori e l'arricchimento artificiale, una porzione crescente di folati viene introdotta direttamente sotto forma di acido folico monoglutammatato.

Nel duodeno e nel digiuno prossimale l'assorbimento intracellulare è mediato dal trasportatore PCFT, la cui attività è ottimizzata dal microambiente acido (pH 5.8–6.0), mentre il trasportatore RFC ha un'attività quasi irrilevante in questa fase (il suo funzionamento ottimale richiede un pH di 7.4).

Successivamente, il folato viene espulso dalla parte opposta della cellula, per essere immesso nel flusso sanguigno, tramite la proteina MRP3.

- **Metabolismo e accumulo epatico:** i folati si dirigono quindi verso il fegato attraverso la vena porta. Qui vengono assorbiti negli epatociti con una notevole efficienza nel trasporto in condizioni di acidità, che conferma la forte attività del PCFT nel fegato, supportata dai trasportatori di anioni organici (OAT). Negli epatociti, i folati vengono riconvertiti in derivati poliglutammati grazie all'enzima folilpoliglutammatato sintetasi (FPGS). Tale forma, non essendo substrato per i trasportatori di efflusso (RFC, PCFT o MRP), permette al fegato di fungere da principale riserva corporea.
- **Distribuzione e Ciclo Enteroepatico:** La mobilizzazione delle riserve richiede una nuova idrolisi in monoglutammati. Questi possono successivamente seguire il ciclo enteroepatico oppure essere immessi nella circolazione sistemica. Una volta immessi nel plasma, i folati circolano legati prevalentemente all'albumina per essere distribuiti ai vari tessuti a seconda delle necessità cellulari.
- **Recupero renale:** L'ultima stazione del percorso è rappresentata dai reni, dove i folati vengono riassorbiti quasi interamente nei tubuli prossimali

tramite i recettori per i folati (FR α /FR β). Questo sofisticato sistema di recupero garantisce che meno dell'1% dei folati filtrati venga eliminato con l'urina.

2. Il metabolismo del carbonio a un atomo e il suo controllo enzimatico

Una volta internalizzati attraverso i sistemi di trasporto sopra descritti, i folati entrano nel compartimento citosolico o mitocondriale della cellula dove verranno convertiti nelle loro forme attive, dando inizio alle reazioni del metabolismo monocarbonioso.

2.1. Il metabolismo del carbonio a un atomo

Il metabolismo del carbonio a un atomo, anche noto come metabolismo 1C o FOCM (Folate-mediated One-Carbon Metabolism), è un processo cellulare indispensabile per il corretto funzionamento e la replicazione delle cellule.

La sua funzione principale consiste nel ridistribuire i gruppi carboniosi — che provengono da specifici amminoacidi definiti “input” (serina e glicina) — per generare diversi “output” (nucleotidi e altre molecole), essenziali sia per la sintesi di DNA e RNA, che per il mantenimento dello stato di ossidazione/riduzione e per la regolazione genetica ottimali delle cellule (Bunyard et al., 2025) (Shuvalov et al., 2017).

I folati sono fondamentali in questo processo perché fungono da trasportatori e donatori dinamici delle unità monocarboniose (nelle loro forme metiliche, formiliche o metileniche), modulando così ogni fase del ciclo.

Le unità monocarboniose presenti nella cellula si legano covalentemente agli atomi di azoto N5 e N10 presenti nell'anello pteridinico del THF. Quando il THF accetta un gruppo monocarbonioso (1C), subisce alterazioni strutturali che ne modificano lo stato di ossidazione, generando diverse forme funzionali — come il 10-formil-THF, il 5,10-metilene-THF, il 5-metil-THF e il 5-formil-THF (Shuvalov et al., 2017)— che agiscono poi come donatori specifici di atomi di carbonio, a seconda delle necessità metaboliche della cellula.

- **Ciclo della Timidina:** Il THF si lega a un gruppo metilenico diventando 5,10-metilen-THF, che viene convertito in diidrofolato (DHF) durante la sintesi del DNA. Questo passaggio è catalizzato dall'enzima timidilato sintasi (TS), che trasforma il deossiridina monofosfato (dUMP) in deossitimidina monofosfato (dTMP), la timidina, un precursore essenziale per la replicazione e la riparazione del DNA. Questa reazione comporta l'ossidazione del folato ridotto; pertanto, per preservare l'equilibrio metabolico della cellula, è indispensabile che il DHF venga costantemente rigenerato in tetraidrofolato (THF) attraverso l'azione della diidrofolato reduttasi (DHFR) (Ducker & Rabinowitz, 2017).
- **Ciclo della Metilazione:** Il 5,10-metilen-THF può essere ridotto dall'enzima MTHFR in 5-metil-THF, (questa reazione irreversibile utilizza NADPH come donatore di elettroni) (Ducker & Rabinowitz, 2017). Come precedentemente illustrato, questa è la forma circolante principale di folato attivo che cede il suo gruppo metilico per convertire l'omocisteina in metionina, tramite l'azione dell'enzima metionina sintetasi (MS), con la Vitamina B12 come cofattore. Questo ciclo è essenziale per i processi di metilazione (regolazione genica e sintesi proteica) (Shuvalov et al., 2017).
- **Sintesi delle Purine:** Altri derivati del THF (come il 10-formil-THF) forniscono atomi di carbonio (C2 e C8) per la costruzione delle basi

puriniche (adenina e guanina), componenti fondamentali sia del DNA che del RNA (Friedman & Cronstein, 2019).

2.2 Regolazione enzimatica e implicazioni cliniche

In questi cicli, i metaboliti del folato sono protagonisti. L'intero processo avviene tramite la complessa rete di reazioni precedentemente descritte, catalizzate da una serie di enzimi chiave, presenti sia nel citoplasma che nei mitocondri, tra cui spiccano SHMT, MTHFR, MTHFD, TS e DHFR. L'efficienza di queste reazioni è garantita in particolare dall'azione di due di questi enzimi che ne regolano il flusso e la disponibilità di precursori.

- **La diidrofolato reduttasi (DHFR)**

Si tratta di un enzima monomero (Pabis et al., 2018) appartenente alla classe delle ossidoriduttasi, diffuso in quasi tutti gli organismi viventi. La sua funzione principale consiste nel catalizzare la reazione redox che permette la conversione del folato in tetraidrofolato (THF) attraverso la riduzione del diidrofolato (DHF).

L'enzima DHFR è formato da otto foglietti β : sette paralleli e l'ottavo antiparallelo. Questa conformazione permette uno scheletro rigido. Nei loop dei foglietti si incastrano quattro α -eliche. Uno di questi loop è il sito di legame per il substrato e altri due servono per il legame del coenzima NADPH (cofattore) (Raimondi et al., 2019). Il loop 1 o Met20 permette di stabilizzare il NADPH in modo che possa trasferire il suo idruro all'atomo di carbonio C6 dell'anello pteridinico del DHF. Importante è la presenza nel sito attivo dell'amminoacido Glu 30 che interagisce con il substrato, facendogli assumere una conformazione tale per cui l'idruro viene accettato (Sehrawat et al., 2023).

La reazione catalizzata dalla DHFR è fondamentale per la produzione dei cofattori necessari alla sintesi di DNA, RNA e amminoacidi (Bailey & Ayling, 2009). Occorre sottolineare che la DHFR umana ha un'efficienza

contenuta, che limita la capacità dell'organismo di convertire l'acido folico di sintesi in tetraidrofolato (THF). Pertanto, dosaggi elevati di integrazione possono condurre rapidamente alla saturazione enzimatica, determinando la comparsa di acido folico non metabolizzato (UMFA) nel sangue e nelle urine, con potenziali rischi per la salute che meritano attenzione. Alcune ricerche indicano che concentrazioni sovralfisiologiche di acido folico potrebbero infatti:

- favorire la crescita di lesioni pre-cancerose
- occultare i segni ematologici di un deficit di vitamina B12
- ridurre l'efficienza immunitaria

(Bailey & Ayling, 2009)

Considerando la sua rilevanza nel rigenerare i folati ridotti, la DHFR rappresenta un bersaglio terapeutico cruciale. Infatti, la struttura del metotrexato, uno dei primi antifolati sviluppati, è stata progettata proprio per colpire la DHFR.

- **La timidilato sintasi (TS)**

Si tratta di un enzima fondamentale per la biosintesi de novo della timidina. Infatti, l'inibizione di questo processo impedisce alla cellula di replicarsi, portandola alla cosiddetta "morte per carenza di timina" (Bonin et al., 2022).

La TS umana è un omodimero, costituito da monomeri che contengono sia un dominio ampio e conservato che accoglie il sito di legame per il folato, sia un dominio più piccolo per l'identificazione del substrato (A. Al-Karmalawy et al., 2026)

La TS catalizza la conversione del deossitimidina monofosfato (dUMP) in deossitimidina monofosfato (dTMP). Il cofattore 5,10-metilen-tetraidrofolato trasferisce il suo gruppo metilene, partecipando alla

formazione del dTMP Tramite una metilazione riduttiva. Il cofattore dona anche due atomi di idrogeno diventando diidrofolato (DHF).

Importante è il residuo di cisteina (Cys195) ubicato in un loop flessibile, il quale permette il trasferimento del gruppo metilene. Nello specifico, la Cys195 si deve collocare all'interno del sito attivo e legarsi covalentemente con il carbonio C6 del dUMP. L'uracile contenuto nel dUmp È stabilizzato tramite legami a idrogeno con Asn226 e Asp218, mentre il gruppo fosfato si lega con residui di arginina provenienti da entrambi i monomeri.

Il prodotto della reazione è il dTMP Che diventa precursore della deossitimidina trifosfato (dTTP), necessario per la replicazione e la riparazione del DNA(A. Al-Karmalawy et al., 2026) .

L'attività della TS influisce direttamente sull'equilibrio del metabolismo dei folati, determinando la direzione del flusso metabolico: un incremento della sua attività privilegia la sintesi del DNA, mentre una maggiore attività dell'enzima metilen-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR) favorisce la formazione di metionina e i processi di metilazione genomica (Hubner et al., 2007).

Per questo motivo, la TS umana (hTS) rappresenta un bersaglio farmacologico d'elezione nella terapia antitumorale. L'inibizione di questo enzima impedisce infatti la replicazione del DNA, bloccando selettivamente la crescita delle cellule a rapida proliferazione (Bonin et al., 2022).

Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi farmaci in grado di inibire la hTS, tra cui il 5-fluorouracile, il raltitrexed e il pemetrexed (Deschamps et al., 2017).

In conclusione, la comprensione dell'importanza dell'azione enzimatica nel metabolismo monocarbonioso ha permesso di identificare proprio gli enzimi come bersagli terapeutici per lo sviluppo di strutture chimiche nella progettazione di farmaci antifolati.

L'evoluzione successiva delle strategie di sviluppo farmaceutico porterà con il tempo a progettare nuove strutture chimiche partendo da uno scheletro molecolare e apportando progressivamente delle modifiche/sostituzioni funzionali mirate a colpire bersagli più o meno selettivi, fino a creare delle molecole all'avanguardia con le quali si potranno attuare terapie personalizzate in base alle caratteristiche del tumore e le esigenze del paziente.

3. Metotrexato: antagonista dei folati e farmaco multitasking

3.1. Scoperta degli antifolati

Gli antifolati sono tra i primi antimetaboliti che vennero studiati. Si tratta di farmaci che imitano il comportamento dei folati con lo scopo di bloccare la sintesi del DNA. La loro introduzione nella pratica clinica risale agli anni 1940 grazie a Sydney Farber e Yellapragada Subbarow, che svilupparono analoghi dell'acido folico e dimostrarono che questi antimetaboliti inibiscono la crescita cellulare. Farber capì che bloccando i folati era possibile contrastare la proliferazione delle cellule leucemiche e iniziò le prime sperimentazioni. Nel 1947 con l'uso dell'aminopterina si raggiunse la prima remissione da leucemia linfoblastica acuta in un bambino. Questo successo segnò l'inizio della chemioterapia moderna (Falzone et al., 2018). Successivamente, l'aminopterina fu sostituita dal metotrexato (Bedoui et al., 2019). Il metotrexato (MTX) presenta infatti tossicità inferiore rispetto all'aminopterina, ma rimane comunque un farmaco caratterizzato da una tossicità abbastanza severa.

3.2. Struttura chimica e meccanismi d'azione

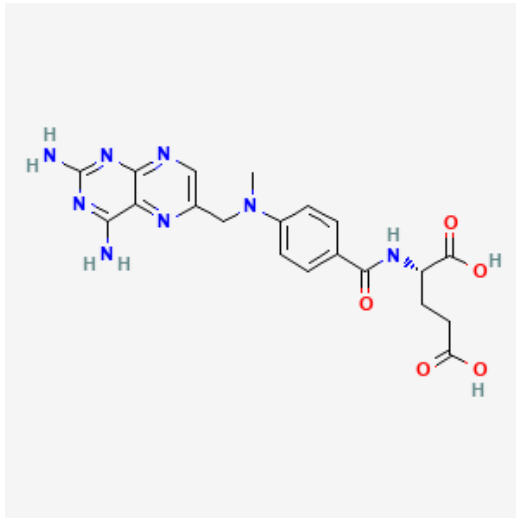


Fig.4 Chemical Structure Depiction

Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Methotrexate. PubChem.

Il metotrexato (MTX), chimicamente noto come acido 4-amino-N10-metilpteroilglutammico, è un antimetabolita dell'acido folico, la cui formula chimica è $C_{20}H_{22}N_8O_5$. La struttura del MTX è molto simile a quella dell'acido folico (FA): è costituito da un nucleo 2,4-diaminopteridina legato all'acido para-amminobenzoico (PABA) collegato a sua volta a un residuo di acido glutammico contenente due gruppi acidi carbossilici altamente ionizzabili (*National Center for Biotechnology Information (NCBI). Methotrexate. PubChem*).

Sono proprio i residui di acido glutammico e l'anello benzenico (presenti nella struttura dell'acido folico ed in quella del metotrexato) che rendono analoghe le due strutture e che spiegano dunque il motivo per cui il trasportatore RFC riconosce erroneamente il metotrexato come proprio substrato naturale, facilitandone l'ingresso all'interno della cellula tumorale (Morey et al., 2021).

La sua solubilità dipende dal pH. Nella struttura è presente un carbonio asimmetrico che genera due stereoisomeri: l'isomero S-MTX è la forma attiva (Karami et al., 2019).

L'MTX trova ampio impiego clinico come agente anticancerogeno e immunosoppressore (Kozmiński et al., 2020) (Sarder et al., 2015).

I suoi principali meccanismi d'azione sono tre:

- Inibizione della diidrofolato reduttasi (DHFR)

La cellula tumorale dipende dalla sintesi ex novo degli acidi nucleici (DNA e RNA) per proliferare rapidamente. L'MTX è quindi stato sviluppato per inibire competitivamente l'enzima diidrofolato reduttasi (DHFR), per la quale ha elevata affinità, grazie al gruppo amminico al posto del gruppo ossidrilico dell'acido folico, che permette la creazione di un legame elettrostatico che l'acido folico non può formare, portando l'affinità del MTX a essere circa 1000 volte superiore a quella dei folati naturali (Kovalev et al., 2022).

Sulla base del meccanismo d'azione della DHFR descritto precedentemente (Raimondi et al., 2019) (Sehrawat et al., 2023), si deduce che l'MTX compete con il folato per il sito attivo dell'enzima. Durante questa fase, il farmaco non impedisce il legame del NADPH al sito attivo della DHFR, ma inibisce il trasferimento dell'idruo proprio perché in posizione 4 dell'anello pteridinico del farmaco si trova il gruppo amminico che sostituisce il gruppo ossidrilico del folato naturale. Questa modifica rende il C6 meno elettrofilo, impedendo il legame dell'idruo e causando pertanto il blocco del processo.

L'inibizione della DHFR interferisce con la formazione del THF, causando l'accumulo di poliglutammati di acido diidrofolico tossici ed una carenza di folati ridotti. Questa carenza ostacola a sua volta la biosintesi di DNA ed RNA, arrestando i processi metabolici indispensabili per

la replicazione. Tale processo si è rivelato efficace nel contrastare la proliferazione delle cellule neoplastiche (Kovalev et al., 2022).

Sebbene l'MTX non sia stato progettato con lo scopo di agire come pro-farmaco (cioè un composto che viene convertito nella sua forma attiva solo dopo essere stato assorbito), agisce di fatto come tale. Una volta attraversata la membrana della cellula tumorale/infiammatoria tramite il trasportatore RFC, il composto subisce una poligluttammazione (aggiunta di residui di acido glutammico sul carbossile in posizione gamma), catalizzata dall'enzima FPGS che converte l'MTX in forme poligluttammate, le quali non solo preservano l'attività antifolata per cui il farmaco è stato progettato, ma ne potenziano l'inibizione verso gli enzimi target. I derivati poligluttammati permettono infatti una permanenza intracellulare molto lunga, grazie alla loro struttura voluminosa (dovuta all'aggiunta di residui glutammici) ed all'aumento della carica negativa, e quindi dell'idrofilia (date dagli stessi residui glutammici), caratteristiche che impediscono l'efflusso attraverso la membrana plasmatica e favoriscono quindi l'accumulo nella cellula tumorale (Chan & Cronstein, 2002).

I principali benefici generati dalla poligluttammazione del MTX (che saranno mantenuti anche negli antifolati di seconda generazione) sono:

- Efficacia prolungata
- Specificità: le cellule con un elevato metabolismo dei folati (come quelle infiammatorie o tumorali) accumulano più poligluttammati e subiscono pertanto un blocco enzimatico maggiore.
- Potenziamento dell'inibizione: il metotrexato convertito in poligluttammati ha un'affinità molto più elevata per gli enzimi bersaglio del metabolismo dei folati.

- Inibizione di Timidilato Sintasi (TS)

Questo enzima è un bersaglio indiretto per l'effetto antitumorale del MTX, che inibisce la sintesi delle pirimidine proprio attraverso il blocco della timidilato sintetasi, impedendo quindi la sintesi del DNA.

Sulla base del meccanismo d'azione della TS descritto precedentemente (A. Al-Karmalawy et al., 2026), si deduce che il metotrexato (MTX) si comporta come un inibitore competitivo del cofattore naturale 5,10-metilen-tetraidrofolato, avendo le forme poligluttammate elevata affinità per la TS.

Tuttavia, la struttura del farmaco è priva del metilene necessario al trasferimento. La mancata metilazione del dUMP Blocca la conversione in dTMP (e provoca carenza di dTTP), causando un accumulo intracellulare di dUMP e dUTP. In definitiva viene bloccata la polimerizzazione del DNA, inducendo la cellula a incorporare in modo errato dUTP Nelle nuove catene. I sistemi di riparazione tentano quindi di rimuovere l'uracile, ma la mancanza di dTTP Porta alla frammentazione del DNA e alla morte per carenza di timina (Rollins & Lindley, 2005) (A. Al-Karmalawy et al., 2026).

-Inibizione di AICAR trasformilasi

L'inibizione di questo enzima è fondamentale per l'effetto antinfiammatorio del MTX. L'inibizione della DHFR indotta direttamente dal farmaco riduce le riserve di 10-formil-THF (il quale serve per la costruzione delle basi puriniche). La carenza di questo cofattore impedisce quindi l'azione dell'enzima AICAR trasformilasi, provocando l'accumulo di AICAR, una sostanza che blocca l'attività degli enzimi adenosina deaminasi (ADA) e AMP deaminasi. Questo determina, sia a livello intracellulare che extracellulare, un aumento di AMP e di adenosina, un potente mediatore antinfiammatorio in grado di ridurre la

produzione di citochine pro-infiammatorie (Friedman & Cronstein, 2019) (López-Cordero et al., 2022). Il punto chiave dell'azione antinfiammatoria del metotrexato è pertanto proprio l'aumento dei livelli di adenosina extracellulare. L'adenosina interagisce con recettori specifici espressi nelle cellule del sistema immunitario che innescano una cascata di effetti antinfiammatori. Nello specifico, l'attivazione dei recettori A2A e A2B aumenta i livelli intracellulari di adenosina monofosfato ciclico (cAMP), mentre il recettore A3 regola la risposta antinfiammatoria mediante l'inibizione dell'adenilato ciclasi o la stimolazione delle fosfolipasi C e D (Kozmiński et al., 2020). L'effetto più evidente del MTX è la modifica del profilo citochinico tramite:

- la minor produzione dei fattori pro-infiammatori: si riducono TNF- α , IL-12, IL-1, IL-6 e IL-8.

- l'aumento dei fattori antinfiammatori: aumentano IL-4 e IL-10.

- l'inibizione dei mediatori lipidici: viene ostacolata la sintesi di prostaglandine e leucotrieni, riducendo ulteriormente la cascata infiammatoria (Friedman & Cronstein, 2019) (Kozmiński et al., 2020).

L'efficacia antinfiammatoria del metotrexato deriva da meccanismi che influenzano sia i mediatori dell'infiammazione che l'attività delle cellule immunitarie. Ad oggi il meccanismo preciso con cui l'MTX funziona come antinfiammatorio e riduca questi mediatori rimane oggetto di studio (Chan & Cronstein, 2002).

Il meccanismo tradizionale del MTX come antinfiammatorio è associato all'accumulo di adenosina, ma un'ipotesi dello studio di (Bedoui et al., 2019) mostra come l'MTX blocchi la risposta infiammatoria tramite il legame diretto della IL-1 β al proprio recettore cellulare, senza alterare la citochina (IL-1 β) stessa. Questo effetto sembra essere legato all'inibizione della sintesi di purine e pirimidine. A conferma dell'ipotesi, la

somministrazione di acido folinico o di timidina permette di invertire l'effetto inibitorio del farmaco.

In particolare, il metotrexato esercita un'azione mirata anche sui monociti e sui macrofagi, responsabili della sintesi delle citochine proinfiammatorie come IL-1 β e TNF- α . Nelle patologie come l'artrite reumatoide, l'attività di queste cellule viene intensificata dai recettori Fc γ delle IgG in presenza di complessi immunitari (come il fattore reumatoide), incrementando lo stato infiammatorio cronico; l'MTX attenua il processo flogistico alla base, controllando questi fattori (Bedoui et al., 2019).

3.3. Versatilità clinica e applicazioni terapeutiche

Il metotrexato si distingue per un meccanismo d'azione pleiotropico, i suoi effetti variano in base al dosaggio somministrato (Kozmiński et al., 2020). Nello specifico, a dosi elevate prevale l'effetto antiproliferativo dovuto all'inibizione della DHFR con conseguente blocco della sintesi del DNA nelle cellule in fase S, mentre a dosaggi più bassi il farmaco agisce come modulatore dell'infiammazione (Pathak et al., 2018) (López-Cordero et al., 2022).

- Poiché l'impiego ad alte dosi (HD-MTX) del farmaco presenta un intervallo terapeutico ridotto, il monitoraggio costante dei livelli ematici è indispensabile per prevenire gravi complicanze (tra cui la nefrotossicità), ulteriormente amplificate in pazienti che assumono regolarmente altri medicinali. In questo contesto, risultano cruciali per neutralizzare l'eccesso di tossicità sistemica gli aggiustamenti posologici, la supplementazione con acido folico (FA), l'adozione di protocolli di 'salvataggio' con acido folinico (leucovorin rescue) o, nei casi più gravi, l'interruzione della terapia (Pesenti et al., 2021) (Kozmiński et al., 2020).

- Nel regime a basso dosaggio (LD-MTX) utilizzato principalmente nelle patologie infiammatorie e autoimmuni, è invece importante la modulazione dell'adenosina, per inibire la sintesi di citochine pro-infiammatorie (quali IL-12, TNF- α , IL-6, IL-8) e la produzione di ossido nitrico (López-Cordero et al., 2022). A conferma della prevalenza dell'azione antinfiammatoria rispetto a quella citotossica nel regime LD-MTX, si osserva una mancanza di correlazione tra l'efficacia del trattamento e la comparsa di tossicità cellulare. Questo suggerisce che l'antagonismo dei folati sia marginale mentre la modulazione dell'adenosina rappresenti il fondamento dell'efficacia del trattamento LD-MTX (Chan & Cronstein, 2002) (López-Cordero et al., 2022).

Applicazioni terapeutiche: l'MTX viene comunemente utilizzato, anche in combinazione con altri farmaci, per il trattamento di molte neoplasie, (come per esempio diversi tipi di leucemia, osteosarcomi, tumori della mammella e altri tipi di tumore), oltre che per il trattamento di forme gravi e resistenti di malattie autoimmuni come artrite reumatoide o sclerosi multipla.

Inoltre, parallelamente al suo impiego come principio attivo, la ricerca recente ha evidenziato la potenzialità del MTX in ambito biotecnologico. Grazie al suo sistema di trasporto, l'MTX può essere utilizzato come vettore molecolare: associandolo ad altri principi attivi l'MTX può essere veicolato selettivamente verso bersagli che sovraesprimono un trasportatore specifico (Kozmiński et al., 2020).

Il “drug targeting”, così come il trasporto selettivo di farmaci antitumorali, utilizzano proprio questo meccanismo d'azione

3.4 Proprietà farmacocinetiche del metotrexato: dall'assorbimento all'eliminazione

Essendo un analogo strutturale dell'acido folico, l'MTX presenta elevata ionizzazione e idrofilia; perciò la sua biodisponibilità e biodistribuzione dipendono da un sistema di trasporto attivo. In particolare, l'assorbimento a livello intestinale è mediato da PCFT, mentre l'ingresso nelle cellule avviene principalmente attraverso RFC-1. L'endocitosi mediata tramite gli FR rappresenta invece un meccanismo di ingresso secondario (Kozmiński et al., 2020).

Il farmaco in circolo si diffonde negli spazi extracellulari e si accumula in organi specifici, in particolare fegato e reni (Hamed et al., 2022). L'MTX in circolo non viaggia libero: circa la metà del farmaco (tra il 40% e il 57%) si lega alle proteine plasmatiche, in particolare all'albumina. Solo la parte non legata (libera) è farmacologicamente attiva e capace di entrare nelle cellule o essere filtrata dai reni. La quota legata alle proteine funge da riserva temporanea ma è momentaneamente inerte (Pesenti et al., 2021).

L'espulsione dalle cellule è mediata dai trasportatori MRP (appartenenti alla famiglia ATP-binding cassette), il cui ruolo è fondamentale nel regolare l'efficacia del trattamento (Bedoui et al., 2019).

I reni rappresentano la via principale di eliminazione del MTX.

A basso dosaggio (LD-MTX) ha un'emivita plasmatica tra le 4,5 e le 10 ore, con una percentuale di farmaco stimata tra il 70% e il 90% che viene escreto nelle urine non modificato. Invece in seguito a somministrazione endovenosa ad alte dosi (HD-MTX) circa il 90% del principio attivo viene espulso intatto nelle urine entro un arco di 154 ore. (Bedoui et al., 2019) (Pesenti et al., 2021).

Nonostante l'eliminazione renale sia la principale, il metotrexato è soggetto anche a una quota di eliminazione epatica (Pesenti et al., 2021); il farmaco viene metabolizzato in 7-idrossimetotrexato (7-OH-MTX) e nel

metabolita minore DAMPA (acido 2,4-diamino-N10-metilpteroico) che possono poi essere convertiti in derivati poliglutammati. I residui di glutammato vengono rimossi dall'enzima gamma-glutamyl idrolasi (GGH) (Hamed et al., 2022). Successivamente l'MTX e i suoi metaboliti sono immessi nella bile e raggiungono il tratto intestinale, permettendo un ricircolo enteroepatico che rappresenta una via aggiuntiva all'eliminazione renale, capace di prolungare la permanenza del farmaco nell'organismo (Bedoui et al., 2019).

3.5. Effetti collaterali e profilo di tossicità del metotrexato

La tossicità del MTX è da attribuirsi innanzitutto alla scarsa selettività del sistema di trasporto, in quanto l'RFC è espresso sia nei tessuti sani che nei tessuti tumorali, trasportando quindi il farmaco nei vari tessuti senza distinguere tra sano e patologico. Questa mancanza di selettività determina un accumulo di farmaco anche nei tessuti sani causando tossicità sistemica, limitandone l'efficacia terapeutica.

Nonostante il metotrexato sia considerato un farmaco dalla validità terapeutica consolidata, il suo impiego è infatti associato a effetti collaterali. Le reazioni avverse più frequenti riguardano il tratto gastrointestinale (nausea, vomito, inappetenza). Questi effetti incidono negativamente sul paziente, e sono frequentemente la causa per cui il trattamento viene abbandonato. Queste complicanze derivano da uno stato di carenza di folati dovuto all'uso del farmaco e possono essere limitate attraverso la somministrazione di acido folico o folinico (Bedoui et al., 2019).

La tossicità epatica e la nefrotossicità rappresentano invece le complicanze cliniche più critiche. Il danno al fegato può variare dall'innalzamento delle transaminasi a patologie severe e croniche. I fattori che possono contribuire a questo danno sono la deplezione delle riserve di folati nel fegato, la permanenza dei metaboliti poliglutammati del MTX con

potenziale tossicità epatica a lungo termine e il rilascio di adenosina che stimola i processi di fibrogenesi causati dal blocco del metabolismo dell'AICAR (Hamed et al., 2022).

Essendo la via renale la principale via di eliminazione, qualsiasi alterazione del funzionamento renale può compromettere la clearance del farmaco, determinandone un accumulo nel sangue e innalzando il rischio di tossicità sistemica. Il danno è attribuito alla precipitazione di cristalli di MTX e del suo metabolita 7-OH-MTX all'interno dei tubuli. La solubilità dei cristalli dipende fortemente dal pH dell'ambiente in cui si trovano perché l'MTX e il 7-OH-MTX sono acidi deboli. La nefrotossicità si manifesta attraverso alterazioni della vascolarizzazione renale e fenomeni di ipertrofia dei tubuli. L'alcalinizzazione delle urine per migliorare la solubilità del farmaco e prevenirne la deposizione solida nel rene aiuta a ridurre i rischi di tossicità (Hamed et al., 2022).

In conclusione, nonostante la validità e l'ampio impiego del metotrexato, i suoi effetti collaterali obbligano ad un costante controllo clinico sia epatico che renale.

L'integrazione di acido folico o folinico permette inoltre di contrastare la tossicità senza compromettere l'azione del farmaco. Nella pratica clinica, l'uso dell'acido folinico per contrastare gli effetti avversi del MTX (leucovorin rescue) è la procedura standard in oncologia mentre viene evitato in reumatologia: l'acido folinico (leucovorina) essendo una forma già attiva di folato, può competere con l'MTX per l'ingresso nelle cellule. Pertanto, a dosi elevate, riduce la tossicità ma riduce anche l'incremento di adenosina ed il conseguente effetto terapeutico del MTX a basso dosaggio (Chan & Cronstein, 2002) (Friedman & Cronstein, 2019).

3.6. Meccanismi di resistenza al metotrexato

Le cellule neoplastiche possono essere per natura resistenti o possono acquisire resistenza al MTX. Infatti, l'efficacia del trattamento nel tempo può diminuire. (Bertino et al., 1996) (Guo et al., 1999).

Le cellule infiammatorie invece, non sviluppano generalmente resistenza:

- nel regime LD-MTX il dosaggio è ridotto
- il meccanismo d'azione del farmaco non provoca il blocco della replicazione cellulare
- essendo queste cellule a rapido turnover, non accumulano le mutazioni che causano resistenza

I meccanismi di resistenza non sono esclusivi al metotrexato, ma alcuni risultano condivisi con gli analoghi degli antifolati di seconda generazione che verranno analizzati nei capitoli successivi:

- ridotto assorbimento del farmaco causato da ipoespressione di RFC o PCFT.
- aumentato efflusso dovuto alla maggior attività delle pompe di efflusso MDR
- sovraespressione o mutazioni di DHFR o TS che ne riducono l'affinità per il farmaco.
- ipoespressione o mutazioni di FPGS che impediscono una corretta poligluttammazione
(Fotoohi et al., 2004)

Sia per mitigare la potenziale resistenza che per ridurre la tossicità indotta dal farmaco, diversi studi hanno dimostrato l'utilità di associare vitamine liposolubili al metotrexato.

L'assunzione di vitamina A è stata collegata ad un minor sviluppo di tumori. Tra i metaboliti attivi il più importante in questo campo è l'acido retinoico (ATRA) che regola la proliferazione cellulare, la

differenziazione e l'apoptosi. Infatti, la somministrazione di vitamina A durante il trattamento con MTX fa sì che le cellule tumorali siano più predisposte a ricevere farmaci antifolati come il MTX e ne riducano una potenziale resistenza. Inoltre, la vitamina A supporta la regolazione della risposta immunitaria.

La vitamina D, associata al metotrexato, ne migliora l'assorbimento nelle cellule neoplastiche, contribuisce a ridurre gli effetti collaterali e a modulare l'infiammazione.

La vitamina E, se combinata con MTX, può aiutare a contenere la tossicità epatica oltre ad esercitare un'azione di protezione antiossidante (Kakkadath et al., 2025).

Sebbene vengano attuate diverse strategie di mitigazione, le evidenze sopra riportate confermano che terapie di lunga durata con MTX sono spesso accompagnate da sviluppo di tossicità e resistenze, legate ai limiti imposti dalla struttura e dal meccanismo catalitico del farmaco.

4. Antifolati di seconda generazione

Alla luce dei limiti associati all'impiego del metotrexato, l'obiettivo della progettazione degli antifolati di seconda generazione è di ovviare alle sue criticità, mediante l'ottimizzazione della relazione struttura–attività (SAR), puntando a migliorare da un lato la selettività verso gli enzimi target per ottenere una terapia più mirata, di potenza maggiore e tossicità ridotta, e dall'altro lato a superare i suoi meccanismi di resistenza.

Sia il metotrexato ad alte dosi, che i derivati di seconda generazione (pralatrexato, pemetrexed, raltitrexed) vengono usati esclusivamente per l'attività antineoplastica (Visentin et al., 2012). Solo il metotrexato viene invece usato, a basse dosi, anche nelle patologie autoimmuni.

Gli antifolati di nuova generazione sono classificati in due categorie sulla base della loro struttura e delle modalità di trasporto cellulare: gli “antifolati classici” quali raltitrexed, pralatrexato e pemetrexed, e gli “antifolati non classici” come piritrexim, trimetrexate, talotrexin e nolatrexed (Gonen & Assaraf, 2012).

Gli antifolati classici, di cui analizziamo le caratteristiche più nel dettaglio, sono derivati dal folato (di cui il metotrexato è il capostipite). Si tratta quindi di analoghi strutturali che presentano una coda di glutammato. Al contrario, gli antifolati non classici sono privi del residuo glutammico (Raimondi et al., 2019).

Nonostante la struttura degli antifolati mimi quella dei folati naturali, sono state apportate delle modifiche chimiche alla struttura dei farmaci di seconda generazione per facilitare ulteriormente il riconoscimento enzimatico (Gonen & Assaraf, 2012).

Grazie agli sviluppi della progettazione farmaceutica, Pralatrexato (PDX), Raltitrexed (RTX) e Pemetrexed (PMX), sono centinaia di volte più affini per gli enzimi bersaglio (TS, DHFR, GARFT, AICARFT)(Powell & Dudek, 2009).

4.1. Pralatrexato (C₂₃H₂₃N₇O₅)

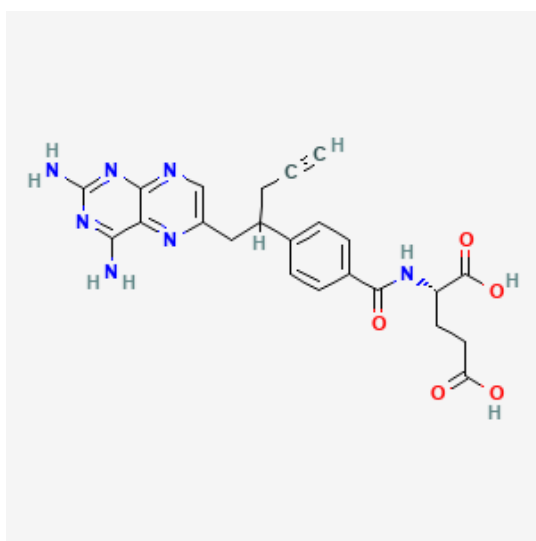


Fig.5 Chemical Structure Depiction. Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Pralatrexate. PubChem.

Il pralatrexato (PDX) è un analogo 10-deazaaminopteridico del MTX (Izbicka et al., 2009).

La sua struttura conserva il nucleo pteridinico degli antifolati di prima generazione, ma con un gruppo 4-ammino, elemento essenziale per il suo riconoscimento da parte della DHFR (Wood & Wu, 2015). Una modifica strutturale si riscontra in posizione 10, dove l'azoto viene sostituito da un carbonio (C10) legato a una catena propargilica (-CH₂-C≡CH). (*National Center for Biotechnology Information (NCBI). Pralatrexate. PubChem*). La catena propargilica è meno ingombrante e più idrofobica rispetto al gruppo metile del MTX, permette quindi un migliore orientamento nel sito attivo dell'enzima FPGS, così da facilitare la reazione di attacco nucleofilo

del primo residuo di glutammato (Visentin et al., 2013). La catena propargilica potenzia inoltre l'ingresso del farmaco nella cellula in quanto aumenta l'affinità per il trasportatore RFC (Visentin et al., 2012).

Il PDX (nella sua forma poligluttammata) esercita la sua azione citotossica durante la fase S del ciclo cellulare. Agisce come inibitore competitivo della diidrofolato reduttasi (DHFR), legandosi con maggiore affinità rispetto al folato, suo substrato naturale (Serova et al., 2011).

Questo legame è potenziato dalla protonazione dell'azoto N1 dell'anello pteridinico, che permette la formazione di un ponte salino tra farmaco ed enzima.

Una peculiarità del pralatrexato, rispetto ad altri antifolati, è la capacità di formare molto più rapidamente i poligluttammati nelle cellule tumorali rispetto ai tessuti sani. Strutturalmente questa caratteristica è da ricondurre alla catena propargilica che conferisce alla molecola l'idrofobicità che la rende significativamente più affine alla DHFR rispetto al metotrexato o ad altri folati (Serova et al., 2011). La rapida poligluttammazione consente di ottenere effetti antiproliferativi anche con trattamenti di breve durata. In studi sperimentali, il PDX si è dimostrato 25 volte più potente del MTX in esposizione continua e fino a 375 volte più potente in trattamenti brevi (Visentin et al., 2013).

Applicazioni terapeutiche: il pralatrexato può essere utilizzato sia in monoterapia sia in combinazione per il trattamento di diversi tumori. È stato il primo farmaco approvato dalla FDA per il trattamento del linfoma periferico a cellule T (PTCL) refrattario o recidivante (O'Connor et al., 2011). In questa patologia, il farmaco, grazie al suo profilo strutturale e al suo meccanismo d'azione, ha effettivamente ottenuto un miglioramento del tasso di risposta obiettiva (ORR) (Hong et al., 2019).

Risulta interessante evidenziare la prospettiva promettente di questo farmaco, sul quale si concentrano ricerche sullo sviluppo di strategie terapeutiche combinate, ad esempio con Gemcitabina. Ad oggi, l'efficacia di queste associazioni è oggetto di studio (Casanova et al., 2011).

4.2. Pemetrexed (C₂₀H₂₁N₅O₆)

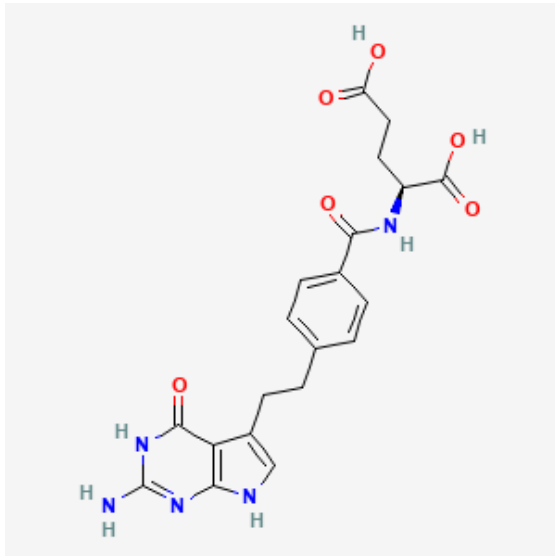


Fig.6 Chemical Structure Depiction. Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Pemetrexed. PubChem

La struttura del pemetrexed (PMX) presenta un nucleo pirrolo [2,3-*d*] pirimidinico e una catena laterale costituita da un ponte etilenico che connette il nucleo centrale a un gruppo benzamidico. (*National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2026). Pemetrexed. PubChem*). La molecola conserva l'anello benzenico e la catena terminale del glutammato, entrambi fondamentali per il suo riconoscimento da parte degli RFC e per la successiva poligluttamazione.

Il PMX è caratterizzato da un meccanismo d'azione multitarget (MTA multitargeted Antifolate) che lo distingue dai classici inibitori enzimatici (Rollins & Lindley, 2005). La sua efficacia deriva dalla sua capacità di inibire contemporaneamente diversi enzimi del metabolismo del folato. Sebbene la timidilato sintasi (TS) rappresenti il bersaglio primario, il

farmaco colpisce anche i seguenti target secondari: DHFR, GARFT e AICARFT (Powell & Dudek, 2009).

La capacità multitarget del PMX è stata specificatamente studiata nella sua struttura chimica inserendo il nucleo pirrolo [2,3-*d*]-pirimidinico, affine ai suoi principali enzimi bersaglio.

Una volta che il pemetrexed entra all'interno della cellula tumorale tramite RFC agisce (nella sua forma poligluttammata) come un analogo del cofattore della TS, il 5,10-metilentetraidrofolato. Il nucleo pirrolo-pirimidinico con il gruppo 4-oxo del farmaco essendo un isostero del sistema pteridinico dei folati, permette agli amminoacidi del sito attivo della TS di riconoscere il farmaco (Rollins & Lindley, 2005).

Il processo di inibizione della TS è il medesimo del MTX, ed accomuna anche il pemetrexed ed il raltitrexed, avendo tutti questi farmaci la TS in comune come enzima target. La differenza tra pemetrexed e raltitrexed consiste nell'isostero del sistema pteridinico dell'acido folico: nel raltitrexed sarà il nucleo chinazolinico con il suo gruppo 4-oxo mentre nel pemetrexed sarà il nucleo pirrolo [2,3-*d*] pirimidinico con il suo gruppo 4-oxo.

Il pemetrexed si distingue invece dal metotrexato principalmente per due caratteristiche farmacocinetiche: l'efficienza della poligluttammazione e l'affinità per i trasportatori. Innanzitutto, il PMX viene convertito in forme poligluttammate molto più rapidamente rispetto al MTX (grazie al nucleo pirrolo [2,3-*d*] pirimidinico con il suo gruppo 4-oxo), anche a basse concentrazioni (Powell & Dudek, 2009). Di conseguenza, mentre l'MTX raggiunge rapidamente uno stato stazionario (plateau), il PMX continua ad accumularsi nella cellula progressivamente, prolungando così sia la sua emivita intracellulare che la sua azione inibitoria sugli enzimi bersaglio (Gonen & Assaraf, 2012).

In secondo luogo, il PMX mostra (rispetto al MTX) un'affinità molto più elevata per il trasportatore PCFT (grazie al ponte etilenico), la cui affinità per i folati è ottimale in ambiente acido, tipico del microambiente delle cellule tumorali verso le quali il farmaco è indirizzato. Tale caratteristica rappresenta un vantaggio terapeutico fondamentale: in caso di resistenza dovuta a difetti del trasportatore RFC, il pemetrexed può comunque penetrare nella cellula tramite il PCFT (Rollins & Lindley, 2005).

Applicazioni terapeutiche: Una delle principali indicazioni terapeutiche del pemetrexed riguarda il trattamento del mesotelioma pleurico maligno (MPM). L'associazione sinergica tra pemetrexed e cisplatino ha rappresentato una tappa fondamentale nella gestione del tumore, apportando un miglioramento del decorso rispetto all'uso del solo cisplatino, prolungando la sopravvivenza dei pazienti (Goudar, 2008).

Il vantaggio di questa terapia combinata con antifolato prevale sui rischi connessi alla tossicità dei farmaci. È quindi diventato, in seguito a vari studi, il trattamento di prima linea per il MPM (Rollins & Lindley, 2005). Questo esempio conferma l'importanza che rivestono non solo le monoterapie, ma anche le terapie di combinazione, che associano due strutture chimiche al fine di potenziare l'efficacia e ridurre l'insorgenza di possibili resistenze.

4.3. Raltitrexed (C₂₁H₂₂N₄O₆S)

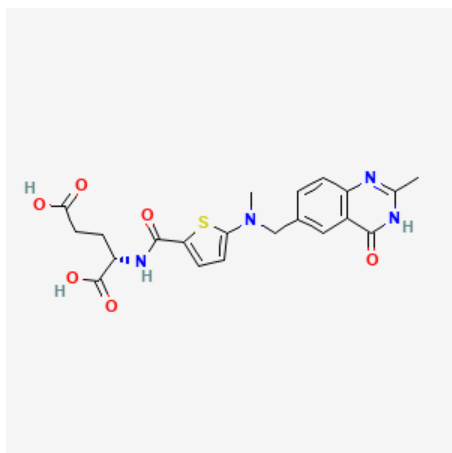


Fig.7 Chemical Structure Depiction. Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Raltitrexed. PubChem.

Il Raltitrexed (RTX) è il primo antifolato classico di seconda generazione a essere stato sviluppato (Visentin et al., 2012).

La molecola presenta un nucleo chinazolin-4-one, al posto del classico sistema pteridinico, oltre ad un anello tiofenico. (*National Center for Biotechnology Information (NCBI). Raltitrexed. PubChem.*).

Il nucleo chinazolin-4-one, mimando l'anello pteridinico del tetraidrofolato (THF), permette al farmaco di occupare il sito attivo del cofattore dell'enzima TS con un'affinità molto elevata che rende l'RTX un inibitore della TS potente e specifico (Van Cutsem et al., 2002).

Il meccanismo d'azione del RTX è identico a quello del PMX: provoca l'inibizione della sintesi di DNA e la morte cellulare per carenza di timina. La differenza tra i due farmaci consiste fondamentalmente nell'isosteria del nucleo pteridinico dell'acido folico. È proprio grazie alla presenza del gruppo 4-oxo nella struttura di RTX (e di PMX) che questi due derivati sono molto più efficaci rispetto al MTX. Infatti, l'MTX, con il suo gruppo 4-ammino, risulta essere meno efficace nell'inibizione della TS rispetto alla sua azione sulla DHFR.

A differenza del pemetrexed, il contributo del PCFT nel trasporto del raltitrexed è irrilevante per la minor capacità di legame del farmaco a questo trasportatore (Visentin et al., 2012).

Applicazioni terapeutiche: Il raltitrexed è impiegato prevalentemente nella terapia del carcinoma del colon-retto avanzato (CRC). L'attuale standard terapeutico per il CRC in stadio avanzato si basa sull'uso del 5-fluorouracile (5-FU) in combinazione con la leucovorina (LV) come modulatore, spesso associati a oxaliplatino o irinotecan. Tuttavia, considerando i tassi di risposta poco soddisfacenti e la tossicità significativa, il raltitrexed rappresenta una valida alternativa terapeutica. Il 5 fluoro-uracile ha un meccanismo d'azione più complesso del RTX, interferendo sia con la sintesi del DNA sia con quella dell'RNA della cellula tumorale (Van Cutsem et al., 2002). Inoltre il 5-FU può indurre cardiotossicità (Köhne et al., 1998). La sua ridotta tossicità sistemica lo rende un valido sostituto. Di conseguenza si può affermare che il raltitrexed rappresenta un'opzione conveniente e collaudata per la terapia del CRC (Van Cutsem et al., 2002).

4.4. Meccanismi di resistenza e tossicità dei derivati di seconda generazione

I meccanismi di resistenza agli antifolati classici sono sostanzialmente comuni, perché questi farmaci possiedono una struttura chimica molto simile, condividono l'ingresso cellulare tramite il medesimo sistema di trasporto (RFC) e dipendono dalla poligluttammazione per l'attivazione e la ritenzione intracellulare, oltre che per la loro maggiore efficacia (Powell & Dudek, 2009).

Si tratta dei seguenti meccanismi:

- Ridotta attività della FPGS: che si traduce in una ridotta poligluttammazione perché l'enzima non riesce più a formare il legame ammidico γ -glutammilico tra il farmaco e il glutammato successivo (Izbicka et al., 2009).
- Elevati livelli intracellulari di folati naturali: i folati endogeni (tetraidrofolato e derivati) competono con l'antifolato sia per il sito di legame degli enzimi target (inibizione competitiva), sia per il sito attivo di FPGS, portando allo spiazzamento del farmaco (Powell & Dudek, 2009).
- Alterazione del trasportatore RFC: mutazioni o down-regulation di RFC riducono l'ingresso del farmaco monogluttammato (Visentin et al., 2012).
- Aumento dell'efflusso causato dalle pompe MRP2 e MRP5 (Rollins & Lindley, 2005) e conseguente riduzione della concentrazione intracellulare del farmaco.
- Azione della folilpoligluttammato idrolasi (GGH / FPGH): enzima lisosomiale che idrolizza i legami γ -glutammilici, rimuovendo i residui glutammici (Rollins & Lindley, 2005).
- Mutazione/amplificazione del bersaglio enzimatico (Visentin et al., 2012).

Questi meccanismi rappresentano le cause principali per cui, nonostante l'efficacia di questi farmaci ed il miglioramento clinico nelle prime fasi del trattamento, molti pazienti sviluppano sul lungo periodo una farmacoresistenza che comporta la perdita di efficacia del trattamento.

Anche nell'ambito della tossicità, gli effetti avversi degli antifolati classici sono simili e possono pertanto essere definiti come tossicità di classe.

La tossicità di questi antifolati è dovuta al fatto che le cellule sane a rapida proliferazione (midollo osseo, mucosa gastrointestinale, cute) dipendono dagli stessi enzimi e cofattori sfruttati dai tumori. Gli antifolati vanno ad

inibire gli enzimi chiave del metabolismo dei folati: DHFR (per MTX e pralatrexate) TS (per raltitrexed e pemetrexed) e GARFT / AICARFT (target secondario per pemetrexed). L'inibizione blocca la produzione di dTMP e purine. Per questo motivo, sia le cellule tumorali che quelle sane a rapido turnover, non riuscendo a duplicare il DNA, interrompono la proliferazione. Poiché midollo osseo, mucosa intestinale e pelle si rinnovano costantemente, sono questi tessuti a manifestare i danni per primi: mielosoppressione, mucosite, tossicità GI e rash (Wood & Wu, 2015) (Powell & Dudek, 2009).

Dal punto di vista biochimico, sono i residui di acido glutammico ad influire sulla tossicità degli antifolati nei tessuti a rapido turnover a causa dell'accumulo intracellulare necessario per la loro efficacia sulle cellule tumorali (ma che provocano tossicità sulle cellule sane).

Ciononostante, esistono delle peculiarità di ciascun farmaco che è bene sottolineare. La concentrazione di folati fisiologici influenza particolarmente l'attività del raltitrexed e del pemetrexed, meno quella del pralatrexato (grazie alla sua catena propargilica), poiché necessitano della poligluttammazione per essere efficaci.

Se la quantità di folati fisiologici è elevata, la FPGS risulta saturata per cui si riduce competitivamente la poligluttammazione del farmaco, causando una minore attività antitumorale. Al contrario, se la quantità di folati fisiologici è bassa, aumenta il rischio di tossicità: risulta dunque cruciale mantenere un preciso equilibrio dei livelli di folati fisiologici (Visentin et al., 2012).

Per contrastare gli effetti avversi, la somministrazione di integratori di acido folico, vitamina B12 e leucovorina è una strategia basata sulla saturazione dell'enzima FPGS, che permette di proteggere i tessuti sani riducendo la formazione di poligluttammati del farmaco, senza annullare

l'efficacia antitumorale nelle cellule neoplastiche (Gonen & Assaraf, 2012).

Nonostante i progressi nella progettazione di nuove molecole di antifolati e, quindi, di nuovi trattamenti terapeutici, l'insorgenza di resistenze e gli effetti tossici riscontrati nelle terapie con gli antifolati di seconda generazione, hanno evidenziato la necessità di avanzare verso strategie terapeutiche di combinazione, che risultano vantaggiose, come dimostra l'associazione di pemetrexed e cisplatino nel trattamento del mesotelioma pleurico maligno. Sebbene permangano alcune limitazioni legate alla tossicità, senza dubbio l'approccio basato sull'integrazione di diversi meccanismi d'azione si dimostra valido e promettente.

Parallelamente, proseguono gli studi volti allo sviluppo di composti innovativi con l'obiettivo di identificare terapie ancora più efficaci.

5. Le nuove strategie terapeutiche

Sebbene l'impiego simultaneo di molecole con diverse proprietà chimico-fisiche abbiano migliorato l'attività antitumorale, persistono criticità legate alla selettività e alla tossicità sistemica. Di conseguenza, parallelamente alla ricerca nel campo delle terapie combinate, la ricerca si orienta verso lo sviluppo di composti più avanzati e selettivi.

Mentre le terapie convenzionali con farmaci come gli antifolati agiscono principalmente su cellule in rapida proliferazione, senza distinguere cellule sane da cellule tumorali, l'obiettivo delle nuove formulazioni è di indirizzare il farmaco verso bersagli molecolari specifici, al fine di rendere l'attività farmacologica più mirata, efficace e meglio tollerata, considerando sia le caratteristiche del tumore che le condizioni cliniche

del paziente. In questo contesto si inseriscono le nuove strategie terapeutiche.

5.1. Gli anticorpi farmaco-coniugati ADC

L'efficacia di questi composti è dovuta all'elevata affinità biochimica dell'anticorpo verso l'antigene bersaglio. Questo meccanismo di riconoscimento molecolare in cui l'anticorpo funge da vettore, consente di indirizzare il carico citotossico verso le cellule tumorali, limitando gli effetti su quelle sane (Cristea et al., 2024).

Il recettore del folato (FR) ha un ruolo fondamentale nello sviluppo dei tumori, perciò è un bersaglio terapeutico molto promettente anche per approcci di medicina personalizzata (Assaraf et al., 2014). L'espressione degli FR varia tra i tessuti, risultando elevata in quelli con alto metabolismo e proliferazione cellulare. Infatti, la sovra-espressione degli FR favorisce la crescita tumorale, perché aumenta l'assorbimento di folati ed accelera la sintesi di DNA e RNA, promuovendo una rapida proliferazione cellulare (Shulpekova et al., 2021).

FR α (FOLR1) è normalmente limitato a pochi tessuti epiteliali sani, ma è frequentemente sovra-espresso in diversi tumori come carcinomi di ovaio, rene, vescica e polmone (Gonzalez et al., 2024).

FR β (FOLR2), invece, è espresso principalmente in timo, milza e nei macrofagi, con aumento nei processi infiammatori cronici, risultando associato a malattie autoimmuni e infiammatorie (Shulpekova et al., 2021).

Le terapie che mirano al FR offrono quindi opportunità per trattare in modo mirato sia malattie maligne che condizioni non tumorali, con maggiore efficacia e precisione (Assaraf et al., 2014).

- **Il mirvetuximab soravtansine (MIRV)** è un anticorpo monoclonale (mAb) farmaco-coniugato (ADC) ed è stato il primo ad essere autorizzato

dalla FDA per agire contro i recettori $FR\alpha$ nel trattamento del carcinoma ovarico (Liu et al., 2025). L'anticorpo mirvetuximab è stato preferito rispetto ad altri perché è capace di trasportare e rilasciare nelle cellule tumorali che sovraesprimono $FR\alpha$, il farmaco citotossico DM4 (Menon et al., 2026).

Il MIRV, costituito da un anticorpo umanizzato IgG1 (derivato del clone MOv19), è stato progettato per legarsi con alta affinità al $FR\alpha$. La superficie dell'anticorpo presenta numerosi residui di lisina: questi possiedono gruppi amminici primari che fungono da siti nucleofili per l'aggancio del linker. Il linker, contenente un gruppo N-idrossisuccinimide (NHS), reagisce con le ammine delle lisine dell'anticorpo formando un legame ammidico stabile. Inoltre, il linker presenta un gruppo solfonato ($-SO_3^-$) che conferisce idrofilicità all'intero complesso, prevenendo l'aggregazione dovuta alla lipofilia del farmaco citotossico.

Il farmaco citotossico è il maytansinoide DM4, un potente inibitore della polimerizzazione dei microtubuli. Esso è coniugato al linker tramite il suo gruppo tiolico ($-SH$), formando con esso un ponte disolfuro. Questo legame è progettato per essere stabile nel circolo sanguigno, ma instabile all'interno della cellula tumorale, in cui l'ambiente chimico (ricco di glutathione) provoca la rottura del linker, liberando il farmaco (Cristea et al., 2024) (Liu et al., 2025).

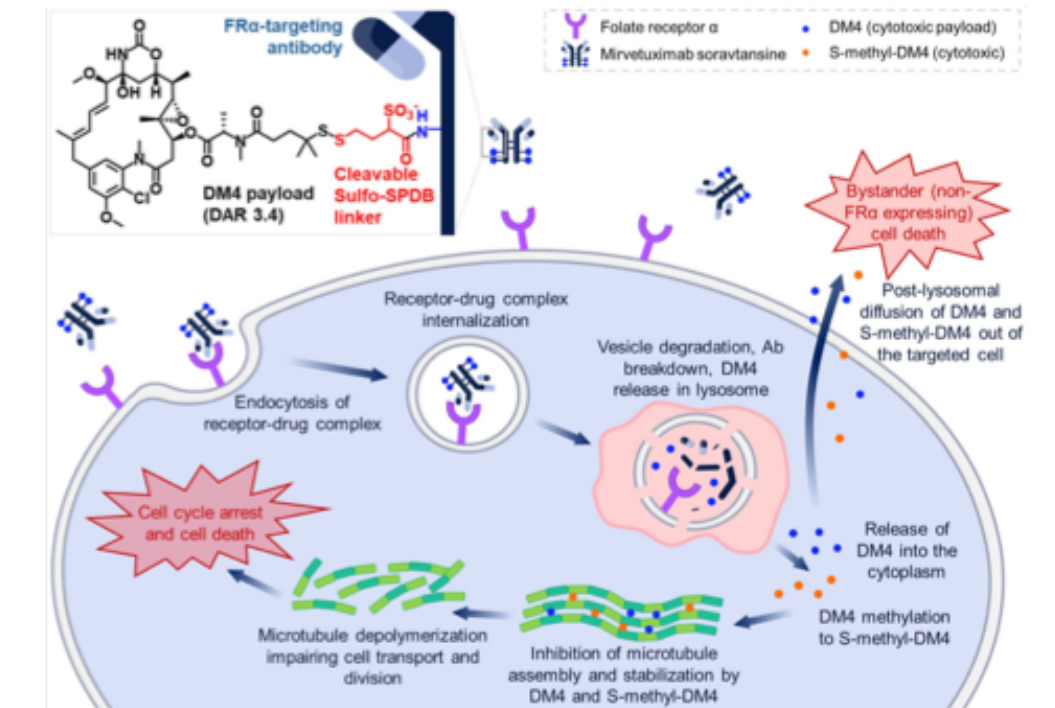


Fig. 8 Meccanismo d'azione di MIRV (Menon et al., 2026)

Meccanismo d'azione: L'anticorpo dell'ADC si lega selettivamente al recettore $FR\alpha$ espresso sulla superficie delle cellule tumorali. In seguito al legame, il complesso viene internalizzato nella cellula tramite endocitosi. Una volta all'interno, il complesso viene trasportato nei lisosomi, dove la componente dell'anticorpo viene degradata. Il rilascio del farmaco citotossico DM4 e del suo metabolita attivo S-metil-DM4 è guidato dal gradiente di glutatione ridotto (GSH). È l'ambiente riducente che porta ad una reazione di scambio tiolo-disolfuro, la quale scinde il linker clivabile, in modo da liberare i metaboliti attivi. Questi, legandosi alla tubulina, inibiscono la polimerizzazione dei microtubuli. Ciò causa il blocco del ciclo cellulare in fase G2/M (prometafase/metafase). Innescando l'apoptosi della cellula tumorale (Bukowski et al., 2024) (Liu et al., 2025).

Sia il DM4 che l'S-metil-DM4 sono lipofili e hanno basso peso molecolare; infatti, possono attraversare le membrane per diffusione passiva. Questo processo permette al farmaco di colpire anche cellule tumorali adiacenti che non interagiscono direttamente con l'anticorpo,

causandone comunque la morte. Questo fenomeno, noto come “effetto bystander” (Menon et al., 2026), aumenta l’efficacia citotossica del farmaco poiché consente un’azione più estesa e, potenzialmente, l’eliminazione dell’intero tumore.

Effetti avversi: Il MIRV è generalmente ben tollerato e si può definire un farmaco sicuro. L’effetto avverso più comune è la tossicità oculare: cheratopatia e visione offuscata sono dovute all’azione citotossica di DM4. Si tratta comunque di un effetto reversibile e gestibile (Liu et al., 2025).

Il MIRV rappresenta un chiaro esempio di medicina personalizzata, poiché sfrutta un design chimico di ADC, in cui il suo profilo strutturale viene adattato alle caratteristiche intrinseche del tumore. Viene infatti usato soprattutto nei tumori solidi che esprimono elevati livelli del recettore. Per questo motivo è importante selezionare accuratamente i pazienti attraverso dei test diagnostici specifici. Tale approccio rappresenta una strategia terapeutica promettente, supportata da evidenze cliniche che dimostrano un significativo incremento della sopravvivenza libera da progressione (Rehim et al., 2024).

L’efficacia clinica del mirvetuximab soravtansine (MIRV) può essere potenziata attraverso protocolli di combinazione: l’associazione tra MIRV e carboplatino sfrutta una complementarità citotossica: il carboplatino danneggia il DNA, mentre il MIRV, tramite il DM4, inibisce la mitosi agendo sui microtubuli. Questa doppia azione su DNA e divisione cellulare prevale sui meccanismi di riparazione della cellula tumorale, inducendo apoptosi in modo più efficace rispetto alla monoterapia (Liu et al., 2025).

Nella combinazione tra MIRV e bevacizumab, il bevacizumab modifica l'ambiente nel tumore: normalizza la vascolarizzazione tumorale, riducendo la pressione interstiziale e favorendo la penetrazione del MIRV nelle cellule tumorali. Questo, insieme all'azione citotossica di MIRV, porta a risposte più efficaci e durature (Rehim et al., 2024).

Meritano di essere menzionate anche le terapie con anticorpo monoclonale specifiche per $FR\beta$ che sappiamo avere una espressione selettiva e specifica nei macrofagi attivati. Questa caratteristica li rende un target perfetto e promettente per il trattamento di malattie autoimmuni e tumori associati a infiammazione (Feng et al., 2011).

Nello studio descritto da (Feng et al., 2011) viene impiegato l'anticorpo m909: la sua elevata selettività per $FR\beta$ rispetto a $FR\alpha$ (che permette un targeting preciso dei macrofagi attivati) unita alla sua capacità di indurre citotossicità anticorpo-dipendente, suggerisce la possibilità di utilizzarlo come terapia diretta, senza il bisogno di associarlo ad altri farmaci. Inoltre, la combinazione con terapie basate sul folato amplia le possibilità terapeutiche, ciò lo rende un target promettente per sviluppare nuove terapie.

Tuttavia, nonostante i risultati clinici promettenti del MIRV restano alcune criticità, come la necessità di selezionare i pazienti, la variabilità dell'espressione del bersaglio tumorale e il possibile sviluppo di resistenze.

5.2. Le cellule CAR-T

Infine, è essenziale includere in questo elaborato, le cellule CAR-T, che rappresentano una delle innovazioni terapeutiche più rilevanti. Anche in questo caso, il recettore $FR\alpha$ costituisce il bersaglio elettivo, confermandosi un target chiave per la medicina di precisione.

Le CAR-T sono linfociti prelevati dal paziente e modificati in laboratorio per riconoscere specificamente le cellule tumorali che presentano l'FR α sulla loro superficie. Il vantaggio principale, è che l'FR α è sovraespresso nei tumori ma quasi assente nei tessuti sani. Questo permette alle cellule CAR-T di colpire con precisione il tumore, limitando i danni involontari agli organi sani (Gonzalez et al., 2024).

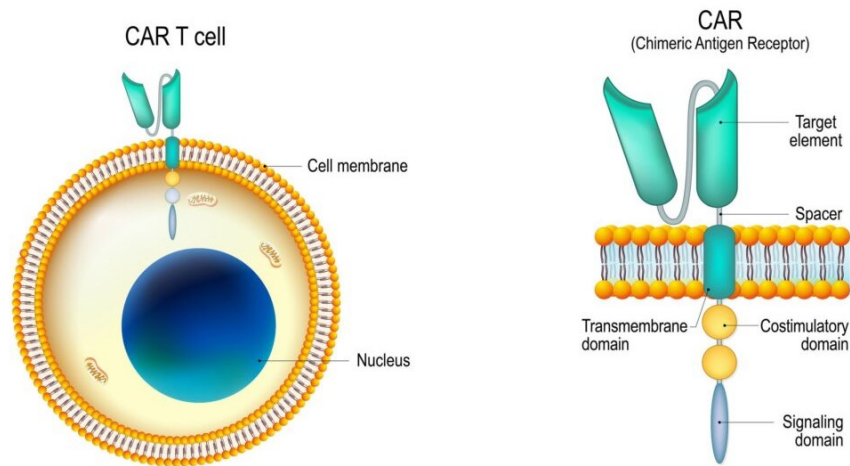


Fig.9 Composizione della proteina CAR (a destra); linfocita T che esprime la CAR sulla sua superficie generando una CAR-T (a sinistra) (immagine tratta da WuXi Biology)

Il design del recettore CAR proteina (Chimeric Antigen Receptor) combina la selettività d'interazione di un anticorpo monoclonale con la citotossicità naturale dei linfociti T, in un'unica struttura: un sistema cellulare ingegnerizzato (CAR-T), che permette una risposta più efficace e duratura rispetto alle terapie con anticorpi tradizionali (Bukowski et al., 2024).

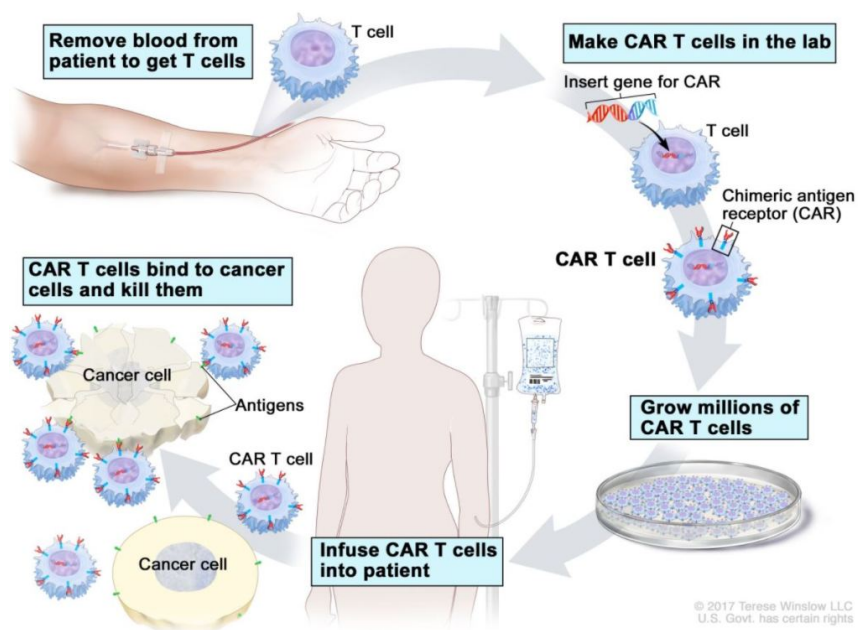


Fig.10 Processo di generazione della cellula CAR-T. (immagine tratta da National Cancer Institute)

Il processo di generazione delle cellule CAR-T inizia con l'isolamento dei linfociti dei pazienti, vengono in un secondo momento modificati utilizzando un vettore lentivirale. Questo virus, prodotto in laboratorio, serve da veicolo per inserire il gene necessario a esprimere il recettore artificiale CAR nel DNA delle cellule T.

Il MOv19-27z è il recettore CAR che permette alle cellule CAR-T di riconoscere il bersaglio FR α . La struttura è composta da tre elementi chiave:

1. Il sensore esterno (scFv MOv19): è un frammento di anticorpo che riconosce con altissima precisione l'antigene FR α . Questo legame sfrutta la capacità del tumore di internalizzare il recettore, permettendo alla cellula CAR-T di colpire la cellula cancerosa dall'interno, preservando i tessuti sani. Il legame tra l'scFv e il recettore FR α è guidato da interazioni non covalenti tra le catene laterali degli amminoacidi.

2. La struttura di supporto (CD8 α): costituita da una sequenza di amminoacidi idrofobici, è una regione che permette al CAR di attaccarsi stabilmente nella membrana plasmatica del linfocita T.

3. Il dominio intracellulare: il dominio CD3 ζ innesca la distruzione della cellula tumorale tramite la fosforilazione dei residui di tirosina. La fosforilazione innescata da CD3 ζ amplifica il segnale, scatenando una risposta citotossica proporzionale alla densità dei recettori presenti. Una volta attivata dalla fosforilazione, la cellula CAR-T espelle nel tumore due tipi di proteine citotossiche: perforine e granzimi. Le perforine creano fori nella membrana del tumore, mentre i granzimi sono proteasi che penetrano nella cellula e ne causano l'apoptosi (Song et al., 2016).

Le CAR-T di prima generazione hanno mostrato dei limiti poiché non riuscivano ad assicurare una risposta prolungata contro il tumore. La ricerca ha quindi sviluppato le CAR-T di seconda generazione che associano domini co-stimolatori, come CD27, accoppiati al dominio di segnalazione CD3 ζ , permettendo ai linfociti di sopravvivere più a lungo e di moltiplicarsi dopo l'incontro con il tumore (Kandalaft et al., 2012).

Le terapie CAR-T sono attualmente utilizzate per la cura di patologie ematologiche. Parallelamente, la ricerca le sta impiegando sperimentalmente per il trattamento dei tumori solidi. Un esempio promettente è l'utilizzo del FR α come target nel trattamento del carcinoma mammario triplo negativo (TNBC). Studi preclinici hanno dimostrato che la terapia con cellule CAR-T anti-FR α induce una regressione tumorale. L'efficacia di questa risposta è proporzionale alla sovraespressione di FR α sulla superficie delle cellule neoplastiche: maggiore è l'espressione del recettore, più l'azione citotossica è significativa (Bukowski et al., 2024).

Per potenziare i risultati, la terapia prevede una fase di linfo-deplezione, una corta chemioterapia preparatoria che serve per favorire l'espansione e la sopravvivenza delle cellule CAR-T (Kandalaft et al., 2012).

Nonostante i risultati incoraggianti, la terapia CAR-T deve affrontare il problema delle recidive e delle resistenze tumorali. Questi ostacoli possono dipendere da mutazioni delle cellule tumorali, difetti strutturali delle CAR-T oppure dall'influenza del microambiente tumorale. Quest'ultimo, caratterizzato da pH acido, svolge un'azione immunosoppressiva che compromette la funzionalità dei linfociti T. L'acidità agisce da barriera alla fosforilazione dei residui di tirosina, impedendo alle CAR-T di attivarsi e attaccare le cellule tumorali.

Per superare questi limiti, la ricerca si sta concentrando sia sul miglioramento del design molecolare delle CAR-T per rafforzarle, che sull'individuazione di nuovi target e sullo sviluppo di meccanismi che modifichino il microambiente tumorale (Gonzalez et al., 2024).

5.3. Vaccini anti-FR α

Gli studi recenti dimostrano come l'efficacia delle cellule CAR-T, abbia favorito lo sviluppo di protocolli di vaccinazioni terapeutiche. I vaccini anti-FR α non si limitano a colpire le cellule neoplastiche, ma hanno l'obiettivo di insegnare al sistema immunitario a riconoscere il recettore per contrastare la malattia nel tempo. Raggiunto lo stadio di remissione, questi vaccini potrebbero rappresentare una terapia di mantenimento, al fine di privare le eventuali cellule residue del folato, evitando così le recidive (Gonzalez et al., 2024).

Questo interessante approccio permette di combinare vaccini antitumorali e terapie CAR-T, con l'obiettivo di ottenere un'azione sinergica al fine di superare le resistenze e migliorare la personalizzazione del trattamento,

proponendo una strategia terapeutica potenzialmente più efficace e meno tossica.

In conclusione, gli sviluppi dell'oncologia moderna stanno superando la chemioterapia citotossica aspecifica, orientandosi verso una medicina di precisione, un'immunoterapia mirata e su misura del paziente.

Conclusione

L'analisi del metabolismo del folato pone le basi per la progettazione degli antifolati, nei quali la struttura molecolare ed il conseguente meccanismo d'azione determinano l'effetto terapeutico attraverso l'interazione con i bersagli selezionati. Gli antifolati di prima generazione, come il metotrexato, hanno mostrato efficacia ma limitazioni legate scarsa selettività, tossicità sistemica e farmacoresistenza, mentre i derivati di seconda generazione, grazie a modifiche strutturali mirate, presentano una migliore affinità per il target, maggiore accumulo intracellulare e ridotta tossicità sistemica.

L'evoluzione del design molecolare e dei sistemi di trasporto ha favorito lo sviluppo di strategie di drug targeting recettoriale dei folati, permettendo di superare le criticità strutturali dei farmaci di precedente generazione.

Il presente lavoro di tesi ha permesso di evidenziare l'importanza del metabolismo del folato come bersaglio d'elezione per la ricerca farmaceutica, che, fin dalla scoperta degli antifolati, ha sviluppato generazioni successive di farmaci sempre più efficaci e strategie terapeutiche innovative attraverso l'ottimizzazione farmacologica basata sulle relazioni struttura-attività (SAR).

Bibliografia:

- A. Al-Karmalawy, A., E. Eissa, M., A. Yousef, T., Khatib, A. O. A., & S. Hawas, S. (2026). Bridging mechanism and design: Modern medicinal chemistry approaches to thymidylate synthase inhibitors. *RSC Advances*, *16*(4), 3564–3579. <https://doi.org/10.1039/D5RA08381H>
- Assaraf, Y. G., Leamon, C. P., & Reddy, J. A. (2014). The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. *Drug Resistance Updates*, *17*(4), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.10.002>
- Bailey, S. W., & Ayling, J. E. (2009). The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(36), 15424–15429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902072106>
- Bedoui, Y., Guillot, X., Sélambarom, J., Guiraud, P., Giry, C., Jaffar-Bandjee, M. C., Ralandison, S., & Gasque, P. (2019). Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(20), 5023. <https://doi.org/10.3390/ijms20205023>
- Bertino, J. R., Göker, E., Gorlick, R., Li, W. W., & Banerjee, D. (1996). Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *STEM CELLS*, *14*(1), 5–9. <https://doi.org/10.1002/stem.140005>
- Bonin, J. P., Sapienza, P. J., & Lee, A. L. (2022). Dynamic allostery in substrate binding by human thymidylate synthase. *eLife*, *11*, e79915. <https://doi.org/10.7554/eLife.79915>
- Bukowski, K., Rogalska, A., & Marczak, A. (2024). Folate Receptor Alpha—A Secret Weapon in Ovarian Cancer Treatment? *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(22), 11927. <https://doi.org/10.3390/ijms252211927>
- Casanova, M., Medina-Pérez, A., Moreno-Beltran, M., Mata-Vazquez, M., & Rueda, A. (2011). Critical appraisal of pralatrexate in the management of difficult-to-treat peripheral T cell lymphoma. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *7*, 401–408. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S22834>
- Chan, E. S., & Cronstein, B. N. (2002). Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Research & Therapy*, *4*(4), 266. <https://doi.org/10.1186/ar419>
- Cristea, M. C., Stewart, D., Synold, T., Ruel, N., Mortimer, J., Wang, E., Jung, A., Wilczynski, S., Konecny, G. E., Eng, M., Kilpatrick, L., Han, E., Dellinger, T.,

- Hakim, A., Lee, S., Morgan, R. J., Wakabayashi, M. T., & Frankel, P. H. (2024). A phase I study of Mirvetuximab Soravtansine and gemcitabine in patients with FRα-positive recurrent ovarian, primary peritoneal, fallopian tube, or endometrial cancer, or triple negative breast cancer. *Gynecologic Oncology*, *182*, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2023.12.017>
- Czeizel, A. E., Dudás, I., Vereczkey, A., & Bánhidly, F. (2013). Folate Deficiency and Folic Acid Supplementation: The Prevention of Neural-Tube Defects and Congenital Heart Defects. *Nutrients*, *5*(11), 4760–4775. <https://doi.org/10.3390/nu5114760>
- Deschamps, P., Réty, S., Bareille, J., & Leulliot, N. (2017). Crystal structure of the active form of native human thymidylate synthase in the absence of bound substrates. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, *73*(Pt 6), 336–341. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17007233>
- Ducker, G. S., & Rabinowitz, J. D. (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism*, *25*(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>
- Ebara, S. (2017). Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies*, *57*(5), 138–141. <https://doi.org/10.1111/cga.12233>
- Falzone, L., Salomone, S., & Libra, M. (2018). Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300>
- Feng, Y., Shen, J., Streaker, E. D., Lockwood, M., Zhu, Z., Low, P. S., & Dimitrov, D. S. (2011). A folate receptor beta-specific human monoclonal antibody recognizes activated macrophage of rheumatoid patients and mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Arthritis Research & Therapy*, *13*(2), R59. <https://doi.org/10.1186/ar3312>
- Fotoohi, K., Jansen, G., Assaraf, Y. G., Rothen, L., Stark, M., Kathmann, I., Gregorczyk, J., Peters, G. J., & Albertioni, F. (2004). Disparate mechanisms of antifolate resistance provoked by methotrexate and its metabolite 7-hydroxymethotrexate in leukemia cells: Implications for efficacy of methotrexate therapy. *Blood*, *104*(13), 4194–4201. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1493>
- Friedman, B., & Cronstein, B. (2019). Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, *86*(3), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.07.004>
- Gonen, N., & Assaraf, Y. G. (2012). Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resistance Updates*, *15*(4), 183–210. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.07.002>

Gonzalez, T., Muminovic, M., Nano, O., & Vulfovich, M. (2024). Folate Receptor Alpha—A Novel Approach to Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1046. <https://doi.org/10.3390/ijms25021046>

Goudar, R. K. (2008). Review of pemetrexed in combination with cisplatin for the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Therapeutics and Clinical Risk Management, Volume 4*, 205–211. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S1603>

Guo, W., Healey, J. H., Meyers, P. A., Ladanyi, M., Huvos, A. G., Bertino, J. R., & Gorlick, R. (1999). Mechanisms of Methotrexate Resistance in Osteosarcoma. *Clinical Cancer Research*, 5(3), 621–627.

Hamed, K. M., Dighriri, I. M., Baomar, A. F., Alharthy, B. T., Alenazi, F. E., Alali, G. H., Alenazy, R. H., Alhumaidi, N. T., Alhulayfi, D. H., Alotaibi, Y. B., Alhumaidan, S. S., Alhaddad, Z. A., Humadi, A. A., Alzahrani, S. A., & Alobaid, R. H. (2022). Overview of Methotrexate Toxicity: A Comprehensive Literature Review. *Cureus*, 14(9), e29518. <https://doi.org/10.7759/cureus.29518>

Hong, X., Song, Y., Huang, H., Bai, B., Zhang, H., Ke, X., Shi, Y., Zhu, J., Lu, G., Liebscher, S., & Cai, C. (2019). Pralatrexate in Chinese Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma: A Single-arm, Multicenter Study. *Targeted Oncology*, 14(2), 149–158. <https://doi.org/10.1007/s11523-019-00630-y>

Hou, Z., & Matherly, L. H. (2014). Biology of the Major Facilitative Folate Transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Current topics in membranes*, 73, 175–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800223-0.00004-9>

Hubner, R. A., Liu, J.-F., Sellick, G. S., Logan, R. F. A., Houlston, R. S., & Muir, K. R. (2007). Thymidylate synthase polymorphisms, folate and B-vitamin intake, and risk of colorectal adenoma. *British Journal of Cancer*, 97(10), 1449–1456. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604056>

Izbicka, E., Diaz, A., Streeper, R., Wick, M., Campos, D., Steffen, R., & Saunders, M. (2009). Distinct mechanistic activity profile of pralatrexate in comparison to other antifolates in in vitro and in vivo models of human cancers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(5), 993–999. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-0954-4>

Kakkadath, M., Naidu, D., Kanthlal, S. K., & Sharun, K. (2025). Combating Methotrexate Resistance in Cancer Treatment: A Review on Navigating Pathways and Enhancing Its Efficacy With Fat-Soluble Vitamins. *Scientifica*, 2025(1), 8259470. <https://doi.org/10.1155/sci5/8259470>

Kandalaf, L. E., Powell, D. J., & Coukos, G. (2012). A phase I clinical trial of adoptive transfer of folate receptor-alpha redirected autologous T cells for recurrent

ovarian cancer. *Journal of Translational Medicine*, *10*, 157.
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-157>

Karami, F., Ranjbar, S., Ghasemi, Y., & Negahdaripour, M. (2019). Analytical methodologies for determination of methotrexate and its metabolites in pharmaceutical, biological and environmental samples. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *9*(6), 373–391. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.06.001>

Köhne, C.-H., Thuss-Patience, P., Friedrich, M., Daniel, P. T., Kretzschmar, A., Benter, T., Bauer, B., Dietz, R., & Dörken, B. (1998). Raltitrexed (Tomudex): An alternative drug for patients with colorectal cancer and 5-fluorouracil associated cardiotoxicity. *British Journal of Cancer*, *77*(6), 973–977.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1998.160>

Kovalev, I. S., Zyryanov, G. V., Santra, S., Majee, A., Varaksin, M. V., & Charushin, V. N. (2022). Folic Acid Antimetabolites (Antifolates): A Brief Review on Synthetic Strategies and Application Opportunities. *Molecules*, *27*(19), 6229.
<https://doi.org/10.3390/molecules27196229>

Koźmiński, P., Halik, P. K., Chesori, R., & Gniazdowska, E. (2020). Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(10), 3483.
<https://doi.org/10.3390/ijms21103483>

Liu, Y., Chen, X., Evan, T., Esapa, B., Chenoweth, A., Cheung, A., & Karagiannis, S. N. (2025). Folate receptor alpha for cancer therapy: An antibody and antibody-drug conjugate target coming of age. *mAbs*, *17*(1), 2470309.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2025.2470309>

López-Cordero, S., Sáenz-Dávila, B., & Tirado-Sánchez, A. (2022). Low-dose methotrexate use in skin diseases: An old drug with new purposes. *Revista Médica Del Hospital General de México*, *85*(2), 7944.
<https://doi.org/10.24875/HGMX.21000065>

Mai, J., Wu, L., Yang, L., Sun, T., Liu, X., Yin, R., Jiang, Y., Li, J., & Li, Q. (2023). Therapeutic strategies targeting folate receptor α for ovarian cancer. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1254532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1254532>

Menon, R., Bako, E., Liu, S., Stec, J., Thakur, S., Deutschman, E., Ab, O., & Jain, S. (2026). Mirvetuximab Soravtansine: Mechanism of Action, Clinical and Translational Science. *Clinical and Translational Science*, *19*(1), e70447.
<https://doi.org/10.1111/cts.70447>

- Morey, J., Llinás, P., Bueno-Costa, A., León, A. J., & Piña, M. N. (2021). Raltitrexed-Modified Gold and Silver Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy: Cytotoxicity Behavior In Vitro on A549 and HCT-116 Human Cancer Cells. *Materials*, *14*(3), 534. <https://doi.org/10.3390/ma14030534>
- Pabis, A., Risso, V. A., Sanchez-Ruiz, J. M., & Kamerlin, S. C. (2018). Cooperativity and flexibility in enzyme evolution. *Current Opinion in Structural Biology*, *48*, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.020>
- Pathak, A., Purkayastha, A., Gupta, A., Guleria, B., & Rathore, A. (2018). *High Dose Methotrexate in Oncological Practice: A Review and Update on Recent Trends in Administration and Management of Toxicity*.
- Pérez-Carreón, K., Martínez, L. M., Videa, M., Cruz-Angeles, J., Gómez, J., & Ramírez, E. (2023). Effect of Basic Amino Acids on Folic Acid Solubility. *Pharmaceutics*, *15*(11), 2544. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112544>
- Pesenti, G., Foppoli, M., & Manca, D. (2021). A minimal physiologically based pharmacokinetic model for high-dose methotrexate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *88*(4), 595–606. <https://doi.org/10.1007/s00280-021-04305-2>
- Powell, S. F., & Dudek, A. Z. (2009). Tailoring treatment of nonsmall cell lung cancer by tissue type: Role of pemetrexed. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, *2*, 21–37. <https://doi.org/10.2147/pgpm.s3977>
- Raimondi, M. V., Randazzo, O., La Franca, M., Barone, G., Vignoni, E., Rossi, D., & Collina, S. (2019). DHFR Inhibitors: Reading the Past for Discovering Novel Anticancer Agents. *Molecules*, *24*(6), 1140. <https://doi.org/10.3390/molecules24061140>
- Rehim, S., Yuan, S., & Wang, H. (2024). Mirvetuximab Soravtansine in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, *19*(12), e0310736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0310736>
- Rollins, K. D., & Lindley, C. (2005). Pemetrexed: A multitargeted antifolate. *Clinical Therapeutics*, *27*(9), 1343–1382. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.09.010>
- Roy, A. G., Robinson, J. M., Sharma, P., Rodriguez-Garcia, A., Poussin, M. A., Nickerson-Nutter, C., & Powell, D. J. (2021). Folate Receptor Beta as a Direct and Indirect Target for Antibody-Based Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 5572. <https://doi.org/10.3390/ijms22115572>
- Sarder, A., Rabbani, M. G., Chowdhury, A. S. M. H. K., & Sobhani, M. E. (2015). Molecular Basis of Drug Interactions of Methotrexate, Cyclophosphamide and 5-

Fluorouracil as Chemotherapeutic Agents in Cancer. *Biomedical Research and Therapy*, 2(02), 196–206. <https://bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/39>

Sehrawat, R., Rathee, P., Khatkar, S., Akkol, E., Khayatkashani, M., Nabavi, S., & Khatkar, A. (2023). Dihydrofolate Reductase (DHFR) Inhibitors: A Comprehensive Review. *Current medicinal chemistry*, 30. <https://doi.org/10.2174/0929867330666230310091510>

Serova, M., Bieche, I., Sablin, M.-P., Pronk, G. J., Vidaud, M., Cvitkovic, E., Faivre, S., & Raymond, E. (2011). Single agent and combination studies of pralatrexate and molecular correlates of sensitivity. *British Journal of Cancer*, 104(2), 272–280. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606063>

Shulpekova, Y., Nechaev, V., Kardasheva, S., Sedova, A., Kurbatova, A., Bueverova, E., Kopylov, A., Malsagova, K., Dlamini, J. C., & Ivashkin, V. (2021). The Concept of Folic Acid in Health and Disease. *Molecules*, 26(12), 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules26123731>

Shuvalov, O., Petukhov, A., Daks, A., Fedorova, O., Vasileva, E., & Barlev, N. A. (2017). One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy. *Oncotarget*, 8(14), 23955–23977. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15053>

Sobral, A. F., Cunha, A., Silva, V., Gil-Martins, E., Silva, R., & Barbosa, D. J. (2024). Unveiling the Therapeutic Potential of Folate-Dependent One-Carbon Metabolism in Cancer and Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9339. <https://doi.org/10.3390/ijms25179339>

Song, D.-G., Ye, Q., Poussin, M., Chacon, J. A., Figini, M., & Powell, D. J. (2016). Effective adoptive immunotherapy of triple-negative breast cancer by folate receptor-alpha redirected CAR T cells is influenced by surface antigen expression level. *Journal of Hematology & Oncology*, 9, 56. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0285-y>

Van Cutsem, E., Cunningham, D., Maroun, J., Cervantes, A., & Glimelius, B. (2002). Raltitrexed: Current clinical status and future directions. *Annals of Oncology*, 13(4), 513–522. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf054>

Visentin, M., Diop-Bove, N., Zhao, R., & Goldman, I. D. (2014). The Intestinal Absorption of Folates. *Annual review of physiology*, 76, 251–274. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153251>

Visentin, M., Unal, E. S., Zhao, R., & Goldman, I. D. (2013). The membrane transport and polyglutamation of pralatrexate, a new-generation dihydrofolate reductase

inhibitor. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 72(3), 597–606.
<https://doi.org/10.1007/s00280-013-2231-9>

Visentin, M., Zhao, R., & Goldman, I. D. (2012). The Antifolates. *Hematology/oncology clinics of North America*, 26(3), 629–ix.
<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2012.02.002>

Wood, G. S., & Wu, J. (2015). Methotrexate and Pralatrexate. *Dermatologic clinics*, 33(4), 747–755. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.05.009>

Zhao, R., Aluri, S., & Goldman, I. D. (2017). The proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) and the syndrome of systemic and cerebral folate deficiency of infancy: Hereditary folate malabsorption. *Molecular Aspects of Medicine*, 53, 57–72.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.09.002>

Zhao, R., Diop-Bove, N., Visentin, M., & Goldman, I. D. (2011). Mechanisms of Membrane Transport of Folates into Cells and Across Epithelia. *Annual Review of Nutrition*, 31(Volume 31, 2011), 177–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145133>

Zhao, R., & Goldman, I. D. (2013). Folate and Thiamine Transporters mediated by Facilitative Carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and Folate Receptors. *Molecular aspects of medicine*, 34(0), 10.1016/j.mam.2012.07.006.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.006>

Zhao, R., Min, S. H., Wang, Y., Campanella, E., Low, P. S., & Goldman, I. D. (2009). A role for the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) in folate receptor-mediated endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4267–4274.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M807665200>

Zheng, Y., & Cantley, L. C. (2019). Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 216(2), 253–266. <https://doi.org/10.1084/jem.20181965>

Sitografia:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Folic-Acid>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methotrexate>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pemetrexed>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pralatrexate>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Raltitrexed>

<https://wuxibiology.com/solutions/therapeutic-modalities/car-t-cell-therapy/>

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/car-t-cell-therapy>