

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 307 271

a nome: Agios Pharmaceuticals, Inc.

a: Cambridge, MA 02139 - USA

dal titolo: Metodi di utilizzo degli attivatori della piruvato chinasi.

DESCRIZIONE

RIVENDICAZIONE DELLA PRIORITÀ

Questa applicazione rivendica la priorità da U.S.N. 62/174.216 depositato l'11 giugno 2015.

PRECEDENTE

La carenza di piruvato chinasi (PKD) è uno dei difetti enzimatici più comuni negli eritrociti nell'uomo a causa delle mutazioni autosomiche recessive del gene *PKLR* (Zanella, A., et al., *BR J Haematol* **2005**, 130 (1), 11-25). È anche la mutazione enzimatica più frequente nella via glicolitica centrale e solo secondo alla carenza di glucosio-6 fosfato deidrogenasi (G6PD) (Kedar, P., et al., *Clin Genet* **2009**, 75 (2), 157-62) dello shunt dell'esoso monofosfato. Gli eritrociti umani sono unici in quanto nucleano quando maturano. Gli eritociti immaturi hanno nuclei ma durante l'eritropoiesi precoce prima di diventare reticolociti circolanti estrudono nuclei

così come altri organelli come mitocondri, reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi, al fine di fare spazio all'emoglobina che trasporta l'ossigeno. A causa della mancanza di mitocondri, i globuli rossi maturi non utilizzano l'ossigeno che trasportano per sintetizzare economicamente l'adenosina trifosfato (ATP), come fanno le altre cellule differenziate normali. Invece, i globuli rossi dipendono interamente dalla glicolisi anaerobica per il ciclo della nicotinamide adenina dinucleotide (NAD^+) e per la produzione di ATP, viene una fonte di energia essenziale utilizzata in gran parte per azionare le pompe K^+/Na^+ e Ca^{2+} dipendenti dall'ATPasi, al fine di mantenere l'integrità e la duttilità della membrana cellulare durante la navigazione nei vasi sanguigni. Nella patologia PKD, due principali anomalie metaboliche distintive sono la deplezione dell'ATP e il concomitante aumento di 2,3-difosfoglicerato in linea con l'accumulo di intermedi glicolitici superiori. Inoltre, una delle conseguenze della diminuzione dei livelli di ATP e di piruvato è la riduzione del livello di lattato che porta all'incapacità di rigenerare NAD^+ attraverso il lattato deidrogenasi per un ulteriore uso nella glicolisi. La mancanza di ATP disturba il gradiente

cationico attraverso la membrana degli eritrociti, causando la perdita di potassio e acqua, che causa la disidratazione, la contrazione e la crenazione delle cellule, e porta alla distruzione prematura e alla diminuzione della durata dei globuli rossi (RBC). Tali globuli rossi difettosi vengono distrutti nella milza, e l'eccessivo tasso di emolisi nella milza porta alla manifestazione di anemia emolitica. Il meccanismo esatto con cui la PKD sequestra i globuli rossi di nuova maturazione nella milza per ridurre efficacemente l'emivita complessiva dei globuli rossi circolanti non è ancora chiaro, ma studi recenti suggeriscono che la disregolazione metabolica influenza non solo la sopravvivenza cellulare ma anche il processo di maturazione che determina un'eritropoiesi inefficace (Aizawa, S. et al., *Exp Hematol* **2005**, 33 (11), 1292-8). La piruvato chinasi catalizza il trasferimento di un gruppo fosforilico dal fosfoenolpiruvato (PEP) all'ADP, producendo una molecola di piruvato e una molecola di ATP. L'enzima ha un requisito assoluto per i cationi Mg^{2+} e K^+ di guidare la catalisi. La PK funge da ultimo passo critico nella glicolisi perché è una reazione essenzialmente irreversibile in condizioni fisiologiche. Oltre al suo ruolo di sintesi di una

delle due molecole di ATP dal metabolismo del glucosio al piruvato, la piruvato chinasi è anche un importante regolatore del metabolismo cellulare. Controlla il flusso di carbonio nella bassa glicolisi per fornire i principali metaboliti intermedi per alimentare i processi biosintetici, come la via del pentoso-fosfato, tra gli altri, nel mantenere sano il metabolismo cellulare. A causa di queste funzioni critiche, la piruvato chinasi è strettamente controllata sia a livello di espressione genica che di allosteria enzimatica. Nei mammiferi, la piruvato chinasi completamente attivata esiste come enzima tetrameric. Quattro isoenzimi diversi (M1, M2, L e R) sono espressi da due geni separati. L'isozima PKR specifico dell'eritrocite è espresso dal gene *PKLR* ("gene L") situato sul cromosoma 1q21. Questo stesso gene codifica anche l'isozima PKL, che è prevalentemente espresso nel fegato. *PKLR* è costituito da 12 esoni in cui l'esone 1 è specifico per l'eritroide, mentre l'esone 2 è specifico per il fegato. Gli altri due isoenzimi di mammiferi PKM1 e PKM2 sono prodotti dal gene *PKM* ("gene M") mediante eventi di splicing alternativi controllati dalle proteine hnRNP. L'isozima PKM2 è espresso nei tessuti fetali e nelle cellule adulte in proliferazione, come le

cellule tumorali. Sia PKR che PKM2 sono in realtà espressi in proeritroblasti. Tuttavia, dopo la differenziazione e la maturazione eritroidea, PKM2 viene gradualmente diminuito nell'espressione e progressivamente sostituito dal PKR negli eritrociti maturi. Clinicamente, la malattia ereditaria da carenza di PKR si manifesta come anemia emolitica non sferocitica. La gravità clinica di questo disturbo varia da nessun sintomo osservabile nell'emolisi completamente compensata a un'anemia grave potenzialmente letale che richiede trasfusioni croniche e/o splenectomia sin dalla giovane età o durante stress fisiologico o infezioni gravi. La maggior parte delle persone colpite, che sono asintomatiche, paradossalmente a causa di una maggiore capacità di trasferimento dell'ossigeno, non richiedono alcun trattamento. Tuttavia, in alcuni dei casi più gravi, sebbene estremamente rari dal punto di vista della popolazione con una prevalenza stimata di 51 su un milione (Beutler, E. *Blood* **2000**, 95 (11), 3585-8), per questi pazienti non è disponibile alcun trattamento modificante la malattia oltre alle cure palliative (Tavazzi, D. et al., *Pediatr Ann* **2008**, 37 (5), 303-10). Questi pazienti affetti da anemia emolitica non sferocitica ereditaria (HNSHA)

presentano un chiaro bisogno medico insoddisfatto. Mutazioni genetiche eterogenee nella PKR portano alla disregolazione della sua attività catalitica. Dalla clonazione iniziale di PKR e dal rapporto di una mutazione a punto singolo Thr³⁸⁴>MET associato a un paziente HNSHA (Kanno, H. et al., *Proc Natl Acad Sci U SA* **1991**, 88 (18), 8218-21), ci sono ora quasi 200 diverse mutazioni segnalate associate a questa malattia segnalate in tutto il mondo (Zanella, A. et al., *BR J Haematol* **2005**, 130 (1), 11-25; Kedar, P., et al., *Clin Genet* **2009**, 75 (2), 157-62; Fermo, E. et al., *BR J Haematol* **2005**, 129 (6), 839-46; Pissard, S. et al., *BR J Haematol* **2006**, 133 (6), 683-9). Sebbene queste mutazioni rappresentino lesioni genetiche ad ampia gamma che includono anomalie descrittive e trascrittive o traslazionali, il tipo più comune è la mutazione missenso nella regione codificante che in un modo o nell'altro influenza i residui conservati all'interno di domini strutturalmente importanti per la funzione catalitica ottimale della PKR. Il modello di prevalenza della mutazione sembra essere distribuito in modo non uniforme verso specifiche origini etniche. Ad esempio, le sostituzioni del codone più frequenti segnalate per i pazienti nordamericani ed europei sembrano essere Arg⁴⁸⁶>Trp e

Arg⁵¹⁰>Gln, mentre le mutazioni Arg⁴⁷⁹>His, Arg⁴⁹⁰>Trp e Asp³³¹>Gly sono state riscontrate più frequentemente in pazienti asiatici (Kedar, P., et al., *Clin Genet* **2009**, 75 (2), 157-62). Si vedano i documenti Kung Charles et al. "AG-348 Activation of Pyruvate Kinase in Vivo enhances Red Cell Glycolysis in Mice"" e Yang Hua et al. "Phase I Single (SAD) and multiple Ascending dose (MAD) Studies of the Safety, tolerability, pharmacokinetics (PK) and Pyruvate Kinase-R, in Healthy Subjects" in occasione della 56a riunione annuale dell'Am. Chem. Soc. Hematol.; San Francisco, CA, USA 06-09 dic. 2014 ISSN: 0006-4971. Gli inibitori della piruvato chinasi per uso terapeutico sono descritti nel documento WO 2012/151451 A1.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda un Composto 1 da utilizzare in un metodo per il trattamento della carenza di piruvato chinasi (PKD) in un soggetto che ne ha necessità, comprendente la somministrazione orale al soggetto di una dose di 10 mg-60 mg circa o di 60 mg-200 mg circa di Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabili dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare la PKD nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-

carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide. Inoltre, la presente invenzione riguarda anche un Composto 1 da utilizzare in un metodo per trattare la carenza di piruvato chinasi (PKD) in un soggetto che ne ha necessità, comprendente la somministrazione orale al soggetto di una dose di 50 mg-300 mg circa di Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare la PKD nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide. Inoltre, la presente invenzione riguarda un Composto 1 per l'uso in un metodo per il trattamento dell'anemia emolitica comprendente la somministrazione orale a un soggetto che ne ha necessità di una dose di 10 mg-60 mg circa o di 60 mg-200 mg circa di Composto 1 o di un sale o idrato accettabili dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare l'anemia emolitica nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide. Inoltre, la presente invenzione riguarda un Composto 1 da utilizzare in un metodo per trattare l'anemia emolitica in un soggetto che ne ha necessità, comprendente la somministrazione orale al soggetto di

una dose di 50 mg-300 mg circa di Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare l'anemia emolitica nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide. Inoltre, la presente invenzione riguarda un Composto 1 per l'uso in un metodo per il trattamento della talassemia che prevede la somministrazione orale a un soggetto che ne ha necessità di una dose di 10 mg-60 mg circa o di 60 mg-200 mg circa di Composto 1 o un sale o idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare la talassemia nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide. Inoltre, la presente invenzione riguarda un Composto 1 da utilizzare in un metodo di trattamento della talassemia in un soggetto che ne ha necessità, comprendente la somministrazione orale al soggetto di una dose di 50 mg-300 mg circa di Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabili dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare la talassemia nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-

carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide. Inoltre, la presente invenzione riguarda un Composto 1 per l'uso in un metodo per il trattamento dell'anemia falciforme che comprende la somministrazione orale a un soggetto che ne ha necessità di una dose di 10 mg-60 mg circa o di 60 mg-200 mg circa di Composto 1 o di un sale o idrato accettabili dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare l'anemia falciforme, in cui il Composto 1 è N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide. Inoltre, la presente invenzione riguarda un Composto 1 da utilizzare in un metodo per trattare l'anemia falciforme in un soggetto che ne ha necessità, comprendente la somministrazione orale al soggetto di una dose di 50 mg-300 mg circa di Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare l'anemia falciforme nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide. In un aspetto, viene descritto un metodo di valutazione di un soggetto, il cui metodo comprende: la somministrazione al soggetto di N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-

carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide (Composto 1); e l'acquisizione di un valore per il livello del Composto 1, il livello di 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), il livello di adenosina trifosfato (ATP) o l'attività di PKR nel soggetto, per valutare in tal modo il soggetto. In alcune realizzazioni, il valore del livello del Composto 1 viene acquisito analizzando la concentrazione plasmatica del Composto 1. In alcune realizzazioni, il livello di 2,3-DPG viene acquisito analizzando la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG. In alcune realizzazioni, il livello di ATP viene acquisito analizzando la concentrazione ematica di ATP. In alcune realizzazioni, l'attività di PKR viene acquisita analizzando la concentrazione di una marcatura ¹³C nel sangue. Ad esempio, glucosio marcato ¹³C viene somministrato a un soggetto e incorporato in alcuni glicolitici intermedi nel sangue. In alcune realizzazioni, l'analisi viene eseguita mediante analisi di campioni di fluidi corporei, come il sangue, *ad esempio* mediante spettroscopia di massa, *ad esempio* LC-MS. In un altro aspetto, la divulgazione riguarda un metodo di valutazione di un soggetto, in cui il metodo comprende l'acquisizione, *ad esempio* diretta, del valore del livello di un composto N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-

carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1), del livello di 2,3-DPG, del livello di ATP o l'attività di PKR in un soggetto trattato con il Composto 1, per valutare in tal modo il soggetto. In alcune realizzazioni, l'acquisizione comprende la ricezione di un campione dal soggetto. In alcune realizzazioni, l'acquisizione comprende la trasmissione del valore a un'altra parte, *ad esempio* la parte che ha somministrato il Composto 1. In alcune realizzazioni, il valore del livello del Composto 1 viene acquisito analizzando la concentrazione plasmatica del Composto 1. In alcune realizzazioni, il livello di 2,3-DPG viene acquisito analizzando la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG. In alcune realizzazioni, il livello di ATP viene acquisito analizzando la concentrazione ematica di ATP. In alcune realizzazioni, l'attività di PKR viene acquisita analizzando la concentrazione di una marcatura ^{13}C nel sangue. *Ad esempio*, glucosio marcato ^{13}C viene somministrato a un soggetto e incorporato in alcuni glicolitici intermedi nel sangue. In alcune realizzazioni, l'analisi viene eseguita mediante analisi di campioni di fluidi corporei, come il sangue, *ad esempio* mediante spettroscopia di massa, *ad esempio* LC-MS. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1 entro un periodo

pre-selezionato inferiore a 7 giorni, inferiore a 6 giorni, inferiore a 5 giorni, inferiore a 4 giorni, inferiore a 3 giorni, o inferiore a 72 ore prima della valutazione, *ad esempio*, meno di 48 ore, meno di 24 ore, meno di 12 ore, meno di 10 ore, meno di 8 ore, meno di 6 ore, meno di 4 ore, meno di 3 ore, meno di 2 ore, meno di 1,5 ore, meno di 1 ora, meno di 45 minuti, meno di 30 minuti o meno di 15 minuti. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una dose di circa 10 mg-3000 mg, *ad esempio* di circa 10 mg-60 mg, di circa 60 mg-200 mg, di circa 200 mg-500 mg, di circa 500 mg-1200 mg, di circa 1200 mg-2000 mg, o di circa 2000 mg-3000 mg, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una dose di circa 50 mg-300 mg, *ad esempio* circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato, *ad esempio* per via orale, il Composto 1 una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato

somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio* ogni 12 ore circa. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, 60 mg-200 mg ogni 12 ore, 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, 500 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio*, circa 15 mg circa ogni 12 ore, circa 60 mg circa ogni 12 ore, circa 120 mg circa ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio* ogni 24 ore circa. In alcune realizzazioni, al soggetto viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, con una dose di 60 mg-200 mg circa ogni 24 ore, *ad esempio*, circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il metodo comprende il confronto del livello del Composto 1, del livello di 2,3-DPG o del livello di ATP con uno standard di riferimento. In alcune realizzazioni, l'attività di PKR viene acquisita analizzando la concentrazione di una marcatura ¹³C nel sangue. *Ad esempio*, glucosio marcato ¹³C viene somministrato a un

soggetto e incorporato in alcuni glicolitici intermedi nel sangue. In alcune realizzazioni, il valore del livello del Composto 1 viene acquisito analizzando la concentrazione plasmatica del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 è presente in quantità rilevabile nel soggetto almeno 2 ore, almeno 3 ore, almeno 4 ore, almeno 5 ore, almeno 6 ore, almeno 7 ore, almeno 8 ore, almeno 9 ore, o almeno 10 ore dopo la somministrazione al soggetto. In alcune realizzazioni, il livello di 2,3-DPG viene acquisito analizzando la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG. In alcune realizzazioni, il livello di ATP viene acquisito analizzando la concentrazione ematica di ATP. In alcune realizzazioni, l'attività di PKR viene acquisita analizzando la concentrazione di un ^{13}C -label nel sangue. Ad esempio, glucosio marcato ^{13}C viene somministrato a un soggetto e incorporato in alcuni glicolitici intermedi nel sangue. In alcune realizzazioni, l'analisi viene eseguita mediante analisi di campioni di fluidi corporei, come il sangue, *ad esempio* mediante spettroscopia di massa, *ad esempio* LC-MS. In alcune realizzazioni, lo standard di riferimento per il livello del Composto 1, il livello di 2,3-DPG, il livello di ATP o il livello di attività PRK è il livello del Composto 1, il livello

di 2,3-DPG, il livello di ATP, o il livello di attività PRK prima della somministrazione del Composto 1. In alcune realizzazioni, il valore del livello del Composto 1 viene acquisito analizzando la concentrazione plasmatica del Composto 1. In alcune realizzazioni, il livello di 2,3-DPG viene acquisito analizzando la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG. In alcune realizzazioni, il livello di ATP viene acquisito analizzando la concentrazione ematica di ATP. In alcune realizzazioni, l'attività di PKR viene acquisita analizzando la concentrazione di un ^{13}C -label nel sangue. Ad esempio, glucosio marcato ^{13}C viene somministrato a un soggetto e incorporato in alcuni glicolitici intermedi nel sangue. In alcune realizzazioni, l'analisi viene eseguita mediante analisi di campioni di fluidi corporei, come il sangue, *ad esempio* mediante spettroscopia di massa, *ad esempio* LC-MS. In alcune realizzazioni, la concentrazione plasmatica del Composto 1 è compresa tra 10.000 ng/mL e 1 ng/mL circa, *ad esempio* tra 1000 ng/mL e 10 ng/mL circa. In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG è ridotta di almeno il 15% rispetto allo standard di riferimento (*e.g.*, dal 15% al 60% circa). In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG è ridotta

almeno del 15%, almeno del 20%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 35%, almeno del 40%, almeno del 45%, almeno del 2,3%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 50%, almeno del 55%, almeno del 60%. In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG viene ridotta per almeno 4 ore (*ad esempio*, almeno 8 ore circa, almeno 12 ore circa, almeno 16 ore circa, almeno 20 ore circa, almeno 24 ore circa, almeno circa 36 ore, almeno circa 48 ore, almeno circa 72 ore o più). In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG è ridotta di almeno il 15% rispetto allo standard di riferimento (e.g., dal 15% al 60% circa). In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG è ridotta almeno del 15%, almeno del 20%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 35%, almeno del 40%, almeno del 45%, almeno del 2,3%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 50%, almeno del 55%, almeno del 60%, per almeno 4 ore circa (*ad esempio*, almeno 8 ore circa, almeno 12 ore circa, almeno 16 ore circa, almeno 20 ore circa, almeno 24 ore circa, almeno 36 ore circa, almeno circa 48 ore, almeno circa 72 ore o più). In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione di una quantità di Composto 1 sufficiente a fornire una concentrazione nel sangue di

2,3-DPG ridotta almeno del 15% rispetto allo standard di riferimento (*ad esempio*, dal 15% al 60% circa). In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG è ridotta almeno del 15%, almeno del 20%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 35%, almeno del 40%, almeno del 45%, almeno del 2,3%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 50%, almeno del 55%, almeno del 60%. In alcune realizzazioni, una singola somministrazione del Composto 1 è sufficiente per fornire una concentrazione nel sangue di 2,3-DPG ridotta almeno del 15% rispetto allo standard di riferimento (*ad esempio*, dal 15% a 60% circa). In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG è ridotta almeno del 15%, almeno del 20%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 35%, almeno del 40%, almeno del 45%, almeno del 2,3%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 50%, almeno del 55%, almeno del 60%. In un altro aspetto, viene descritto il Composto 1 per l'uso in un metodo di trattamento di un soggetto per un disturbo, *ad esempio* l'anemia emolitica ereditaria non sferocitica; l'anemia falciforme; la talassemia, *ad esempio*, la beta-talassemia; la sferocitosi ereditaria; l'ellitosi ereditaria; la sbetalipoproteinemia; la sindrome di Bassen-Kornzweig; o l'emoglobinuria parossistica

notturna, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità di Composto 1 sufficiente a fornire una concentrazione nel sangue di 2,3-DPG ridotta almeno del 15% rispetto allo standard di riferimento (*ad esempio* dal 15% al 60% circa). In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG è ridotta almeno del 15%, almeno del 20%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 35%, almeno del 40%, almeno del 45%, almeno del 2,3%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 50%, almeno del 55%, almeno del 60%. In alcune realizzazioni, lo standard di riferimento è, *ad esempio*, il livello di 2,3-DPG o il livello di ATP nel sangue, in un essere umano malato, *ad esempio* un essere umano con una malattia metabolica o una malattia del sangue, *ad esempio*, un umano con diagnosi di deficit di piruvato chinasi (PKD). In alcune realizzazioni, lo standard di riferimento è, *ad esempio*, un livello di base, *ad esempio* il livello 2,3-DPG o il livello di ATP nel sangue nel soggetto prima della somministrazione del Composto 1. In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG viene ridotta per almeno 4 ore (*ad esempio*, almeno 8 ore circa, almeno 12 ore circa, almeno 16 ore circa, almeno 20 ore circa, almeno 24 ore circa, almeno circa 36 ore, almeno circa 48 ore, almeno circa 72 ore o

più). In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1 entro un periodo pre-selezionato inferiore a 7 giorni, inferiore a 6 giorni, inferiore a 5 giorni, inferiore a 4 giorni, inferiore a 3 giorni, o inferiore a 72 ore prima della valutazione, *ad esempio*, meno di 48 ore, meno di 24 ore, meno di 12 ore, meno di 10 ore, meno di 8 ore, meno di 6 ore, meno di 4 ore, meno di 3 ore, meno di 2 ore, meno di 1,5 ore, meno di 1 ora, meno di 45 minuti, meno di 30 minuti o meno di 15 minuti. In alcune realizzazioni, il soggetto viene valutato meno di 72 ore, meno di 48 ore, meno di 24 ore, meno di 12 ore, meno di 10 ore, meno di 8 ore, meno di 6 ore, meno di 4 ore, meno di 3 ore, meno di 2 ore, meno di 1,5 ore, meno di 1 ora, meno di 45 minuti, meno di 30 minuti o meno di 15 minuti, dopo la somministrazione del Composto 1. In alcune realizzazioni, una singola somministrazione del Composto 1 è sufficiente per fornire una concentrazione nel sangue di 2,3-DPG ridotta almeno del 15% rispetto allo standard di riferimento (*ad esempio*, dal 15% a 60% circa). In alcune realizzazioni, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG è ridotta almeno del 15%, almeno del 20%, almeno del 25%, almeno del 30%, almeno del 35%, almeno del 40%, almeno del 45%, almeno del 2,3%, almeno del

25%, almeno del 30%, almeno del 50%, almeno del 55%, almeno del 60%. In una realizzazione, la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG è ridotta per almeno 4 ore (*ad esempio*, almeno 8 ore circa, almeno 12 ore circa, almeno 16 ore circa, almeno 20 ore circa, almeno 24 ore circa, almeno 36 ore circa, almeno circa 48 ore, almeno circa 72 ore o più). In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una dose di circa 10 mg-3000 mg, *ad esempio* di circa 10 mg-60 mg, di circa 60 mg-200 mg, di circa 200 mg-500 mg, di circa 500 mg-1200 mg, di circa 1200 mg-2000 mg, o di circa 2000 mg-3000 mg, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una dose di circa 50 mg-300 mg, *ad esempio* circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, al soggetto viene somministrato, *ad esempio* per via orale, il Composto 1 una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad*

esempio ogni 12 ore circa. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, 60 mg-200 mg ogni 12 ore, 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, 500 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio*, circa 15 mg circa ogni 12 ore, circa 60 mg circa ogni 12 ore, circa 120 mg circa ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio* ogni 24 ore circa. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di 60 mg-200 mg circa ogni 24 ore, *ad esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. In un altro aspetto, viene rivelato il Composto 1 per l'uso in un metodo di trattamento di un soggetto per una malattia, *ad esempio* l'anemia emolitica ereditaria non sferocitica; l'anemia falciforme; la talassemia, *ad esempio* la beta-talassemia; la sferocitosi ereditaria; l'ellitosi ereditaria; l'abetalipoproteinemia; la sindrome di Bassen-Kornzweig; o l'emoglobinuria parossistica notturna, in cui il metodo comprende la

somministrazione per via orale al soggetto di una dose di circa 10 mg-3000 mg, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio* circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, la malattia è l'anemia emolitica ereditaria non sferocitica. In alcune realizzazioni, la malattia è l'anemia falciforme. In alcune realizzazioni, la malattia è la talassemia, *ad esempio* la beta-talassemia. In alcune realizzazioni, la malattia è la sferocitosi ereditaria. In alcune realizzazioni, la malattia è l'ellittocitosi ereditaria. In alcune realizzazioni, la malattia è l'abetalipoproteinemia. In alcune realizzazioni, la malattia è la sindrome di Bassen-Kornzweig. In alcune realizzazioni, la malattia è l'emoglobinuria parossistica notturna. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione al soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di circa 50 mg-300 mg, *ad esempio* di circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una

o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, ad esempio per via orale, due volte al giorno, *ad esempio* circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio* di 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, di 60 mg-200 mg circa ogni 12 ore, di 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, di 500 mg-1000 mg ogni 12 ore circa, *ad esempio* circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, ad esempio per via orale, una volta al giorno, *ad esempio*, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di 60 mg-200 mg circa ogni 24 ore, *ad esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. I metodi di trattamento descritti nel presente documento possono comprendere anche varie fasi di valutazione prima e/o dopo il trattamento con il Composto 1. In alcune realizzazioni, prima e/o dopo il trattamento con il Composto 1, il metodo comprende ulteriormente la fase di valutazione dei parametri PK

e PD (*ad esempio*, la concentrazione plasmatica del Composto 1, di 2,3-DPG e/o di ATP). Questa valutazione può essere ottenuta mediante l'analisi di campioni di liquido corporeo, come il sangue, *ad esempio* mediante spettroscopia di massa, *ad esempio* LC-MS. In un altro aspetto, viene descritta un'unità di dosaggio orale del Composto 1, in cui l'unità di dosaggio orale è composta da 10 mg-3000 mg circa, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, l'unità di dosaggio orale è composta da 50 mg-300 mg circa, *ad esempio* da circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In un altro aspetto, la divulgazione è un metodo di valutazione di un soggetto, in cui il metodo che comprende la somministrazione al soggetto di N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide (Composto 1) e l'acquisizione di informazioni relative al verificarsi di un evento avverso (AE) per valutare in tal modo il soggetto. In una realizzazione, l'evento avverso è

selezionato tra cefalea, nausea, vomito e infezione delle vie respiratorie superiori. In una realizzazione, l'evento avverso è la nausea. In una realizzazione, l'evento avverso è il vomito. In una realizzazione, l'evento avverso è l'infezione delle vie respiratorie superiori. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, ad esempio per via orale, una dose di circa 10 mg-3000 mg, ad esempio di circa 10 mg-60 mg, di circa 60 mg-200 mg, di circa 200 mg-500 mg, di circa 500 mg-1200 mg, di circa 1200 mg-2000 mg, o di circa 2000 mg-3000 mg, ad esempio, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, ad esempio per via orale, una dose di circa 50 mg-300 mg, ad esempio circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato, ad esempio per via orale, il Composto 1 una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, ad esempio per via orale, due volte al giorno, ad esempio ogni 12 ore circa. In alcune realizzazioni, il

Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, 60 mg-200 mg ogni 12 ore, 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, 500 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio*, circa 15 mg circa ogni 12 ore, circa 60 mg circa ogni 12 ore, circa 120 mg circa ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, al soggetto è stato somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio* ogni 24 ore circa. In alcune realizzazioni, al soggetto viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, con una dose di 60 mg-200 mg circa ogni 24 ore, *ad esempio*, circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. Inoltre, viene descritto (1) il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico da utilizzare in un metodo per aumentare la durata dei globuli rossi (RBC) che ne hanno necessità, comprendente il contatto con sangue

con una quantità effettiva di: (1) il Composto 1 o un farmaco sale accettabile; (2) la composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) la composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione al soggetto per via orale di una dose di circa 10 mg-3000 mg, *ad esempio* di 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione al soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di circa 50 mg-300 mg, *ad esempio* di circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio*, circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al

soggetto con una dose di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio* di 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, di 60 mg-200 mg circa ogni 12 ore, di 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, di 500 mg-1000 mg ogni 12 ore circa, *ad esempio* circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio*, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di circa 60 mg-200 mg ogni 24 ore, *ad esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. Inoltre, viene indicato (1) il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico per un metodo di regolazione dei livelli di 2,3-difosfoglicerato, *ad esempio* mediante la riduzione di livelli di 2,3-difosfoglicerato nel sangue ove necessario, in cui il metodo prevede di

mettere a contatto il sangue con una quantità effettiva di (1) Composto 1 o di un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente Composto 1 o un suo sale e un vettore; o (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione orale al soggetto di una dose di 10 mg-3000 mg circa, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione a un soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di 50 mg-300 mg circa, *ad esempio*, circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio* circa ogni 12 ore. In alcune

realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, ad esempio di 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, di 60 mg-200 mg circa ogni 12 ore, di 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, di 500 mg-1000 mg ogni 12 ore circa, ad esempio circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato, ad esempio per via orale, una volta al giorno, ad esempio, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, ad esempio per via orale, con una dose di circa 60 mg-200 mg ogni 24 ore, ad esempio, circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. In un altro aspetto, viene descritto (1) il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico per un trattamento di un soggetto, in cui il metodo comprende: la somministrazione al soggetto una quantità efficace dal punto di vista

terapeutico (1) del Composto 1 o di un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) di una composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico; e l'acquisizione di un valore per il livello del Composto 1, il livello di 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), il livello di adenosina trifosfato (ATP) o dell'attività di PKR nel soggetto, così trattare il soggetto. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione orale al soggetto di una dose di 10 mg-3000 mg circa, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione a un soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di 50 mg-300 mg circa, *ad esempio*, circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1

viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio* circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio* di 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, di 60 mg-200 mg circa ogni 12 ore, di 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, di 500 mg-1000 mg ogni 12 ore circa, *ad esempio* circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio*, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di circa 60 mg-200 mg ogni 24 ore, *ad esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il valore del livello del Composto 1 viene acquisito analizzando la concentrazione plasmatica del Composto 1. In alcune realizzazioni, il livello di 2,3-DPG viene acquisito analizzando la concentrazione nel sangue di 2,3-DPG. In alcune

realizzazioni, il livello di ATP viene acquisito analizzando la concentrazione ematica di ATP. In alcune realizzazioni, l'attività di PKR viene acquisita analizzando la concentrazione di un ^{13}C -label nel sangue. Ad esempio, glucosio marcato ^{13}C viene somministrato a un soggetto e incorporato in alcuni glicolitici intermedi nel sangue. In alcune realizzazioni, l'analisi viene eseguita mediante analisi di campioni di fluidi corporei, come il sangue, *ad esempio* mediante spettroscopia di massa, *ad esempio* LC-MS. In un altro aspetto, viene descritto (1) il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico da utilizzare per un metodo di trattamento della carenza di piruvato chinasi (PKD) in un soggetto che ne ha necessità, in cui il metodo comprende la somministrazione al soggetto di una quantità efficace dal punto di vista terapeutico (1) del Composto 1 o di un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) di una composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; oppure

(3) di una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico, in modo da trattare la PKD nel soggetto. In alcune realizzazioni, prima, durante e/o dopo il trattamento con (1) il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; con (2) la composizione comprendente Composto 1 o un suo sale e un vettore; oppure con (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico, il metodo comprende inoltre la fase di valutazione dei livelli del Composto 1 o dei livelli di uno o più intermedi nel percorso della glicolisi, *ad esempio* la valutazione dei livelli di 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), di adenosina trifosfato (ATP) o di un altro intermedio nella via della glicolisi. In alcune realizzazioni, il metodo comprende l'attivazione di uno o più isoenzimi di piruvato chinasi, *ad esempio* uno o più isoenzimi tra PKR, PKM2 e/o PKL. In alcune realizzazioni, il metodo comprende l'attivazione dell'isozima selvatico di tipo PKR e/o di un isozima mutante di PKR. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione al soggetto per

via orale di una dose di circa 10 mg-3000 mg, ad esempio di 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, ad esempio, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione a un soggetto, ad esempio per via orale, di una dose di 50 mg-300 mg circa, ad esempio, circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, ad esempio per via orale, due volte al giorno, ad esempio, circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di circa 10 mg-1000 mg ogni 12 ore, ad esempio circa 10 mg-60 mg ogni 12 ore, circa 60 mg-200 mg ogni 12 ore, circa 200 mg-500 mg ogni 12 ore, circa 500 mg-1000 mg ogni 12 ore, ad esempio, circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, ad

esempio per via orale, una volta al giorno, ad *esempio*, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, ad *esempio* per via orale, con una dose di circa 60 mg-200 mg ogni 24 ore, ad *esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. In un altro aspetto, viene descritto (1) il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente del Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico per l'uso in un metodo di attivazione della piruvato chinasi in un soggetto che ne ha necessità, in cui il metodo comprende la somministrazione al soggetto di una quantità efficace dal punto di vista terapeutico (1) del Composto 1 o di un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) di una composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) di una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico,

per attivare in tal modo la piruvato chinasi nel soggetto. In alcune realizzazioni, il metodo comprende l'attivazione di uno o più isoenzimi di piruvato chinasi, *ad esempio* uno o più isoenzimi tra PKR, PKM2 e/o PKL. In alcune realizzazioni, il metodo comprende l'attivazione dell'isozima selvatico di tipo PKR e/o di un isozima mutante di PKR. In alcune realizzazioni, l'isozima mutante PKR è selezionato tra G332S, G364D, T384M, G37E, R479H, R479K, R486W, R532W, R510Q, I90N, e R490W. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione al soggetto per via orale di una dose di circa 10 mg-3000 mg, *ad esempio* di 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione a un soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di 50 mg-300 mg circa, *ad esempio*, circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato

il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio* circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio* di 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, di 60 mg-200 mg circa ogni 12 ore, di 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, di 500 mg-1000 mg ogni 12 ore circa, *ad esempio* circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio*, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di circa 60 mg-200 mg ogni 24 ore, *ad esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. Inoltre, viene descritto (1) il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico per l'uso in un metodo di

trattamento dell'anemia emolitica ereditaria non sferocitica comprendente la somministrazione a un soggetto che ne ha necessità di una quantità efficace dal punto di vista terapeutico (1) di Composto 1 o di un farmaco accettabile sale; (2) di una composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) di una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico. In alcune realizzazioni, prima, durante e/o dopo il trattamento con (1) il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) la composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) la composizione farmaceutica comprendente Composto 1 o sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico, il metodo comprende inoltre la fase di valutazione del livello del Composto 1, o dei livelli di uno o più intermedi nella via della glicolisi, *ad esempio* la valutazione dei livelli di 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), di adenosina trifosfato (ATP) o di un altro intermedio nella via della glicolisi. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione orale al soggetto di una dose di 10 mg-3000 mg circa, *ad esempio* 10 mg-60 mg

circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione al soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di circa 50 mg-300 mg, *ad esempio* di circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio* circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio* di 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, di 60 mg-200 mg circa ogni 12 ore, di 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, di 500 mg-1000 mg ogni 12 ore circa, *ad esempio* circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio*, circa ogni 24 ore. In

alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di 60 mg-200 mg circa ogni 24 ore, *ad esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. Inoltre, viene descritto (1) il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico per l'uso in un metodo di trattamento dell'anemia falciforme comprendente la somministrazione a un soggetto che ne ha bisogno di una quantità efficace dal punto di vista terapeutico (1) del Composto 1 o di un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) della composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) della composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico. In alcune realizzazioni, prima, durante e/o dopo il trattamento con (1) il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2)

la composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) la composizione farmaceutica comprendente Composto 1 o sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico, il metodo comprende inoltre la fase di valutazione del livello del Composto 1, o dei livelli di uno o più intermedi nella via della glicolisi, *ad esempio* la valutazione dei livelli di 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), di adenosina trifosfato (ATP) o di un altro intermedio nella via della glicolisi. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione al soggetto per via orale di una dose di circa 10 mg-3000 mg, *ad esempio* di 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione a un soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di 50 mg-300 mg circa, *ad esempio*, circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al

giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio*, circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di circa 10 mg-1000 mg ogni 12 ore, *ad esempio* circa 10 mg-60 mg ogni 12 ore, circa 60 mg-200 mg ogni 12 ore, circa 200 mg-500 mg ogni 12 ore, circa 500 mg-1000 mg ogni 12 ore, *ad esempio*, circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio*, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di circa 60 mg-200 mg ogni 24 ore, *ad esempio*, circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore. Inoltre, viene descritto (1) il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di

vista farmaceutico da utilizzare in un metodo di trattamento dell'anemia emolitica (*ad esempio*, anemia emolitica cronica causata da carenza di fosfoglicerato chinasi, *Blood Cells Mol Dis*, 2011; 46(3):206) che comprende la somministrazione ad un soggetto che ne ha bisogno di una quantità efficace sotto il profilo terapeutico (1) del Composto 1 o di un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) di una composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) di una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico. In alcune realizzazioni, prima, durante e/o dopo il trattamento con (1) il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) la composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) la composizione farmaceutica comprendente Composto 1 o sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico, il metodo comprende inoltre la fase di valutazione del livello del Composto 1, o dei livelli di uno o più intermedi nella via della glicolisi, *ad esempio* la valutazione dei livelli di 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), di adenosina trifosfato

(ATP) o di un altro intermedio nella via della glicolisi. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione orale al soggetto di una dose di 10 mg-3000 mg circa, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione al soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di circa 50 mg-300 mg, *ad esempio* di circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio* circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di circa 10 mg-1000 mg ogni 12 ore, *ad esempio* circa 10 mg-60 mg ogni 12 ore, circa 60 mg-200 mg ogni 12 ore, circa 200 mg-500 mg ogni 12 ore, circa 500 mg-1000 mg ogni 12 ore, *ad esempio*, circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg

ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio*, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di 60 mg-200 mg circa ogni 24 ore, *ad esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore. Inoltre, viene descritto (1) il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico per l'uso in un metodo di trattamento della talassemia (ad esempio, beta-talassemia), della sferocitosi ereditaria, dell'ellitocitosi ereditaria, dell'abetalipoproteinemia (o sindrome di Bassen-Kornzweig), dell'emoglobinuria parossistica notturna, anemia emolitica acquisita (*ad esempio* anemia congenita (*ad esempio*, enzimi)), o anemia di malattie croniche che comportano la somministrazione a un soggetto che ne ha bisogno di una quantità

efficace dal punto di vista terapeutico di (1) N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1) o di un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente Composto 1 o un suo vettore; o (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico. In alcune realizzazioni, prima, durante e/o dopo il trattamento con (1) il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) la composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) la composizione farmaceutica comprendente Composto 1 o sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico, il metodo comprende inoltre la fase di valutazione del livello del Composto 1, o dei livelli di uno o più intermedi nella via della glicolisi, ad esempio la valutazione dei livelli di 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), di adenosina trifosfato (ATP) o di un altro intermedio nella via della glicolisi. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione al soggetto per via orale di una dose di circa 10 mg-3000 mg, ad esempio di 10 mg-60 mg

circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione a un soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di 50 mg-300 mg circa, *ad esempio*, circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio*, circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di circa 10 mg-1000 mg ogni 12 ore, *ad esempio* circa 10 mg-60 mg ogni 12 ore, circa 60 mg-200 mg ogni 12 ore, circa 200 mg-500 mg ogni 12 ore, circa 500 mg-1000 mg ogni 12 ore, *ad esempio*, circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio*, circa ogni 24 ore. In

alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di 60 mg-200 mg circa ogni 24 ore, *ad esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore. Inoltre, viene descritto (1) il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente il Composto 1 o un sale e un vettore; oppure (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un suo sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico da utilizzare in un metodo per il trattamento di malattie o condizioni associate a un aumento dei livelli di 2,3-difosfoglicerato (*ad esempio*, malattie del fegato) (Am J Gastroenterol, 1987;82(12):1283) e Parkinson (J. Neurol, Neurosurg, e Psychiatry 1976,39:952) che comprende la somministrazione ad un soggetto che ne ha bisogno di una quantità efficace sotto il profilo terapeutico (1) del Composto 1 o di un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico; (2) una composizione comprendente Composto 1 o un sale e un vettore; o (3) una composizione farmaceutica comprendente il Composto 1 o un sale accettabile dal punto di vista farmaceutico e un vettore accettabile dal punto di vista

farmaceutico. In alcune realizzazioni, il metodo prevede la somministrazione orale al soggetto di una dose di 10 mg-3000 mg circa, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa, 60 mg-200 mg circa, 200 mg-500 mg circa, 500 mg-1200 mg circa, 1200 mg-2000 mg circa, o 2000 mg-3000 mg circa, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione al soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di circa 50 mg-300 mg, *ad esempio* di circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio*, circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto di 10 mg-1000 mg circa ogni 12 ore, *ad esempio* 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore, 60 mg-200 mg circa ogni 12 ore, 200 mg-500 mg circa ogni 12 ore, 500 mg-1000 mg ogni 12 ore, *ad esempio*, circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune

realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, ad esempio per via orale, una volta al giorno, ad esempio, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto, ad esempio per via orale, con una dose di 60 mg-200 mg circa ogni 24 ore, ad esempio, circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore. Un composto N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1) e le composizioni comprendente il Composto 1 descritte nel presente documento sono attivatori allosterici di mutanti PKR e isoforme con attività inferiori rispetto al tipo selvatico, pertanto, sono utili per i metodi della presente invenzione. Tali mutazioni in PKR possono influenzare l'attività enzimatica (efficienza catalitica), le proprietà regolatorie (modulazione mediante fruttosio bisfosfato (FBP)/ATP) e/o la termostabilità dell'enzima. Esempi di tali mutazioni sono descritti nel documento Valentini et al, JBC 2002. Alcuni esempi di mutanti attivati dai composti qui descritti includono G332S, G364D, T384M, G37E, R479H, R479K, R486W, R532W, R510Q, I90N, e R490W. Senza vincoli teorici, il Composto 1 influenza le attività dei mutanti PKR attivando mutanti PKR non reattivi

FBP, ripristinando la termostabilità ai mutanti con una stabilità ridotta, o ripristinando l'efficienza catalitica ai mutanti alterati. Il Composto 1 è anche un attivatore del tipo selvatico PKR. Per aumentare la vita utile dei globuli rossi, N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1) e la composizione o composizione farmaceutica qui descritti vengono aggiunti direttamente al sangue intero o all'ematocrito per via extracorporea o essere forniti direttamente al soggetto (*ad esempio*, al paziente) (*ad esempio*, mediante somministrazione i.p., i.v., i.m., orale, inalazione (somministrazione via aerosol), transdermica, sublinguale e altre vie di somministrazione). Senza vincoli teorici, il Composto 1 aumenta la vita utile dei globuli rossi, contrastando così l'invecchiamento del sangue immagazzinato, influenzando il tasso di rilascio di 2,3-DPG dal sangue. Una diminuzione del livello di concentrazione di 2,3-DPG induce uno spostamento verso sinistra della curva di dissociazione dell'ossigeno-emoglobina e sposta l'equilibrio allosterico verso R, o stato ossigenato, producendo così un'inibizione terapeutica della polimerizzazione intracellulare che sta alla base della falce aumentando l'affinità dell'ossigeno

dovuta alla deplezione di 2,3-DPG, stabilizzando così l'ossiemoglobina più solubile. Di conseguenza, in una realizzazione, il Composto 1 è utile come agente anti-falcemico. In un'altra realizzazione, per regolare il 2,3-difosfoglicerato, *ad esempio* i ridurre i livelli di 2,3-difosfoglicerato, il Composto 1 viene aggiunto direttamente al sangue intero o all'ematocrito per via extracorporea o viene fornito direttamente al soggetto (*ad esempio*, al paziente) (*ad esempio*, mediante somministrazione i.p., i.v., i.m., orale, inalazione (somministrazione via aerosol), transdermica, sublinguale e altre vie di somministrazione).

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

FIG. 1 mostra grafici a linee che mostrano l'attività PKR (a sinistra), i livelli di ATP (al centro) e i livelli di 2,3-DPG (a destra) nel sangue intero di topi C57/BL6 trattati con una singola dose di N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-sulfonammide (Composto 1) a quattro livelli di dose (1 mpk, 10 mpk, 50 mpk e 150 mpk). *Riga superiore*: Dati grezzi per attività PKR, livello ATP e valutazioni a livello 2,3-DPG; *Riga centrale*: Variazioni percentuali di ciascun marcatore per ogni dose normalizzata al veicolo trattato; *Riga inferiore*: Correlazione

farmacocinetica/farmacodinamica tra l'esposizione al Composto 1 nel plasma e ciascun marcatore.

FIG. 2 mostra grafici a linee che mostrano l'attività PKR (a sinistra), i livelli di ATP (al centro) e i livelli di 2,3-DPG (a destra) nel sangue intero di topi C57/BL6 trattati con dosi multiple (13 dosi, BID) di un composto N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-sulfonammide (Composto 1) a quattro livelli di dose (1 mpk, 10 mpk, 150 mpk, 50. *Riga superiore*: Dati grezzi per attività PKR, livello ATP e valutazioni di livello 2,3-DPG; *Riga centrale*: Variazioni percentuali di ciascun marcatore per ogni dose normalizzata al veicolo trattato; *riga inferiore*: Correlazione

farmacocinetica/farmacodinamica tra l'esposizione al Composto 1 nel plasma e ciascun marcatore.

FIG. 3 illustra uno schema per la determinazione dell'attività del flusso PK nei topi. Ai topi C57/BL6 vengono somministrate 13 dosi (BID) di N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide (Composto 1, 100 mpk) e i campioni di sangue intero sono stati prelevati nel tempo. I campioni di sangue sono stati immediatamente incubati a 37°C in presenza di glucosio [U-¹³C₆] e i metaboliti sono stati estratti e

quantificati. I dati risultanti sono sottoposti a un modello di flusso cinetico per determinare la variazione complessiva del flusso di carbonio attraverso la reazione di PKR.

FIG. 4 illustra un riepilogo del numero di soggetti che hanno subito eventi avversi (AEs) per gruppo di trattamento nello studio SAD, compreso il set di analisi della sicurezza sia per il periodo di alimentazione che per quello a digiuno.

FIG. 5 illustra un grafico a linee che mostra i profili medi di concentrazione-tempo di un composto N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1) nel plasma umano dopo una singola dose per via orale di 30 mg, 120 mg, 360 mg, 700 mg, 1400 mg, e 2500 mg.

FIG. 6 illustra i valori dei parametri farmacocinetici (PK) del Composto 1 N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide a seguito di una singola dose per via orale (studio SAD).

FIG. 7 mostra un grafico a linee che mostra i profili di concentrazione media-tempo di 2,3-DPG nel sangue umano dopo una singola dose per via orale di placebo, con dosi di 30 mg, 120 mg, 360 mg, 700 mg, 1400 mg e 2500 mg del composto N-(4-

(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1). FIG. 8 mostra un grafico a linee che mostra i profili di concentrazione media nel sangue-tempo di 2,3-DPG a seguito di dosi orali multiple di placebo, 120 mg e 360 mg di N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1) per le coorti 1 e 2 nello studio MAD.

FIG. 9 mostra un grafico a linee che mostra i profili di concentrazione media nel sangue-tempo dell'ATP a seguito di dosi orali multiple di placebo, 120 mg e 360 mg di N-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1) per le coorti 1 e 2 nello studio MAD.

FIG. 10A mostra un grafico a linee che mostra la variazione rispetto ai profili di concentrazione-tempo di riferimento di 2,3-DPG a seguito di dosi orali multiple di placebo, 15 mg (q12h), 60 mg (q12h), 120 mg (q12h), 360 mg (q12h), 700 mg (q12h) di un composto N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1), o una singola dose di Composto 1 di 120 mg (q24h).

FIG. 10B illustra un grafico a linee che mostra la variazione rispetto ai profili di concentrazione-tempo basali dell'ATP a seguito di dosi orali multiple di

placebo, 15 mg (q12h), 60 mg (q12h), 120 mg (q12h), 360 mg (q12h), 700 mg (q12h) di un composto N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1), o una singola dose di Composto 1 di 120 mg (q24h).

FIG. 11 è uno schema che illustra lo studio di fase 2 descritto negli esempi qui riportati. BID (q12h) = due volte al giorno (ogni 12 ore); DRT = team di revisione dei dati; PKR = isoforma dei globuli rossi piruvato chinasi; TBD = da determinare; w = settimane.

FIG. 12 è uno schema che illustra la reazione enzimatica della piruvato chinasi R (PKR) e il modo in cui diverse valutazioni farmacodinamiche (PD) contribuiscono a una comprensione meccanicistica dell'azione del Composto 1.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

I dettagli di costruzione e la disposizione dei componenti indicati nella descrizione seguente o illustrati nei disegni non sono intesi come limitanti. Le realizzazioni possono essere implementate o eseguite in vari modi. Inoltre, la fraseologia e la terminologia utilizzati nel presente documento hanno uno scopo descrittivo e non devono essere considerati limitanti. L'uso di "compresi", "comprendenti" o "aventi", "contenenti", "che includono" e relativi

varianti, comprende gli elementi elencati successivamente e i loro equivalenti, nonché gli elementi aggiuntivi. Nel presente documento, il termine "trattare" significa diminuire, sopprimere, attenuare, diminuire, arrestare, o stabilizzare lo sviluppo o la progressione di una malattia/disturbo (*ad esempio*, anemia emolitica non sferocitica ereditaria; anemia falciforme; talassemia, come beta-talassemia; sferocitosi ereditaria; ellitosi ereditaria; sbetalipoproteinemia; sindrome di Bassen-Kornzweig; o emoglobinuria parossistica notturna), ridurre la gravità della malattia/disturbo (*ad esempio*, anemia emolitica ereditaria non sferocitica; anemia falciforme; talassemia, come beta-talassemia; sferocitosi ereditaria; ellitosi ereditaria; sbetalipoproteinemia; sindrome di Bassen-Kornzweig; o emoglobinuria parossistica notturna) o migliorare i sintomi associati alla malattia/disturbo (*ad esempio*, anemia emolitica ereditaria non sferocitica; anemia falciforme; talassemia, come beta-talassemia; sferocitosi ereditaria; ellitosi ereditaria; sbetalipoproteinemia; sindrome di Bassen-Kornzweig; o emoglobinuria parossistica notturna). Nel presente documento, quando ci si riferisce una quantità di N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-

carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1) efficace per trattare una malattia, o una "quantità efficace dal punto di vista terapeutico" si riferisce a una quantità di composto efficace, dopo somministrazione di dosi singole o multiple a un soggetto, nel trattamento di una cellula, o nel curare, alleviare, attenuare o migliorare un soggetto con una malattia in misura superiore a quella prevista in assenza di tale trattamento. Nel presente documento, la quantità di dosaggio si riferisce alla base libera del Composto 1 o di un sale o solvato accettabile dal punto di vista farmaceutico (ad esempio, idrato). Nel presente documento, il termine "soggetto" è inteso come essere umano. I soggetti umani esemplari includono un paziente umano (indicato come un paziente) con un disturbo, *ad esempio* una malattia descritta nel presente documento o un soggetto normale. Nel presente documento, il termine "acquisire" o "acquisizione" si riferisce all'ottenimento di un'entità fisica (*ad esempio*, un campione, *ad esempio* un campione di sangue o un campione di plasma sanguigno), o un valore, *ad esempio* un valore numerico, mediante "acquisizione diretta" o "acquisizione indiretta" dell'entità fisica o del valore. Per "acquisizione diretta" si intende

l'esecuzione di un processo (*ad esempio*, un metodo analitico) per ottenere l'entità fisica o il valore. Per "acquisizione indiretta" si intende la ricezione dell'entità fisica o del valore da un'altra parte o fonte (*ad esempio*, un laboratorio di terze parti che ha acquisito direttamente l'entità fisica o il valore). L'acquisizione diretta di un valore comprende l'esecuzione di un processo che include un cambiamento fisico in un campione o in un'altra sostanza, *ad esempio* l'esecuzione di un processo analitico che comprenda un cambiamento fisico in una sostanza, *ad esempio*, un campione, l'esecuzione di un metodo analitico, come un metodo descritto nel presente documento, *ad esempio* mediante analisi di campioni di fluidi corporei, come il sangue, *ad esempio* mediante spettroscopia di massa, *ad esempio* LC-MS.

Metodi di Trattamento

Viene descritto il Composto 1 per l'uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione di una malattia, condizione o disturbo come descritto nel presente documento (*ad esempio*, trattamento) comprendente la somministrazione ad un soggetto che ha necessità di N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1). In alcuni casi, la malattia è selezionata tra anemia

emolitica non sferocitica ereditaria; anemia falcifforme; talassemia, come la beta-talassemia; sferocitosi ereditaria; ellitosi ereditaria; sbetalipoproteinemia; sindrome di Bassen-Kornzweig; o emoglobinuria parossistica notturna. N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1) e le composizioni qui descritte possono essere somministrate a cellule in coltura, *ad esempio in vitro o ex vivo, o a un soggetto, ad esempio in vivo*, per un soggetto trattare, prevenire e/o diagnosticare una serie di malattie, compresi quelli descritti di seguito.

Composizioni e vie di somministrazione

Le composizioni qui delineate includono il composto N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1), nonché altri agenti terapeutici, se presenti, in quantità efficaci per ottenere una modulazione della malattia o dei sintomi della malattia, compresi quelli descritti nel presente documento. Il termine "vettore o coadiuvante accettabile dal punto di vista farmaceutico" si riferisce a un vettore o coadiuvante che può essere somministrato a un paziente insieme al Composto 1, e che non distrugge la sua attività

farmacologica ed è atossico se somministrato in dosi sufficienti per somministrare una quantità terapeutica del composto. I vettori, i coadiuvanti e i veicoli che possono essere utilizzati nelle composizioni farmaceutiche qui descritte comprendono, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, scambiatori di ioni, allumina, stearato di alluminio, lecitina, sistemi di somministrazione di farmaci auto-emulsionanti (SEDDS) come il succinato di polietilenglicole d- α -tocoferolo 1000, tensioattivi utilizzati in forme farmaceutiche di dosaggio quali Tweens o altre matrici polimeriche simili, proteine sieriche, quali albumina sierica umana, sostanze tampone come fosfati, glicina, acido sorbico, sorbato di potassio, miscele parziali di gliceridi di acidi grassi vegetali saturi, acqua, sali o elettroliti, quali solfato di protamina, idrogenofosfato di disodio, idrogenofosfato di potassio, cloruro di sodio, sali di zinco, silice colloidale, trisilicato di magnesio, pirrolidone di polivinile, sostanze a base di cellulosa, glicole polietilenico, carbossimetilcellulosa di sodio, poliacrilati, cere, polimeri di blocco di polietilene-poliossipropilene, polietilenglicole e grasso di lana. Le ciclodestrine come α -, β - e γ -ciclodestrina o i derivati modificati chimicamente come le

idrossicalchilciclodestrine, comprese le 2- e 3-idrossipropil- β -ciclodestrine, o altri derivati solubilizzati possono essere utilizzati in modo vantaggioso per migliorare la somministrazione di composti delle formule qui descritte. Le composizioni farmaceutiche qui descritte possono essere somministrate per via orale in qualsiasi forma di dosaggio accettabile per via orale, comprese, a titolo esemplificativo, capsule, compresse, emulsioni e sospensioni acquose, dispersioni e soluzioni. Nel caso delle compresse per uso orale, i vettori comunemente utilizzati includono il lattosio e l'amido di mais. In genere vengono aggiunti anche agenti lubrificanti, come lo stearato di magnesio. Per la somministrazione orale sotto forma di capsula, i diluenti utili includono il lattosio e l'amido di mais essiccato. Quando le sospensioni acquose e/o le emulsioni sono somministrate per via orale, il principio attivo può essere sospeso o sciolto in una fase oleosa è combinato con agenti emulsionanti e/o sospesi. Se lo si desidera, possono essere aggiunti alcuni dolcificanti e/o aromatizzanti e/o coloranti. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato per via orale al soggetto con una dose di circa 10 mg-3000 mg, ad esempio di circa 10 mg-60 mg, circa 60 mg-200 mg, circa

200 mg-500 mg, circa 500 mg-1200 mg, circa 1200 mg-2000 mg, o circa 2000 mg-3000 mg, *ad esempio*, circa 30 mg, circa 120 mg, circa 360 mg, circa 700 mg, circa 1400 mg, circa 2500 mg. In alcune realizzazioni, il metodo comprende la somministrazione a un soggetto, *ad esempio* per via orale, di una dose di 50 mg-300 mg circa, *ad esempio*, circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg, circa 300 mg, del Composto 1. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato una o due volte al giorno. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, due volte al giorno, *ad esempio*, circa ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene somministrato al soggetto con una dose di circa 10 mg-1000 mg ogni 12 ore, *ad esempio* circa 10 mg-60 mg ogni 12 ore, circa 60 mg-200 mg ogni 12 ore, circa 200 mg-500 mg ogni 12 ore, circa 500 mg-1000 mg ogni 12 ore, *ad esempio*, circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore, circa 360 mg ogni 12 ore, circa 700 mg ogni 12 ore. In alcune realizzazioni, viene somministrato il Composto 1, *ad esempio* per via orale, una volta al giorno, *ad esempio*, circa ogni 24 ore. In alcune realizzazioni, il Composto 1 viene

somministrato al soggetto, *ad esempio* per via orale, con una dose di 60 mg-200 mg circa ogni 24 ore, *ad esempio* circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore. Quando le composizioni qui fornite comprendono una combinazione di Composto 1 e uno o più agenti terapeutici o profilattici aggiuntivi, sia il composto che l'agente addizionale devono essere presenti a livelli di dosaggio compresi tra l'1 e il 100% circa, e più preferibilmente tra il 5 e il 95% del dosaggio normalmente somministrato in un regime di monoterapia. Gli agenti aggiuntivi possono essere somministrati separatamente, nell'ambito di un regime a dose multipla, dai composti qui descritti. In alternativa, tali agenti possono far parte di una singola forma di dosaggio, mescolati con il Composto 1 in un'unica composizione. Possono essere necessarie dosi inferiori o superiori a quelle di cui sopra. I dosaggi specifici e i regimi di trattamento per qualsiasi particolare paziente dipenderanno da una varietà di fattori, tra cui l'attività del composto specifico impiegato, l'età, il peso corporeo, lo stato di salute generale, il sesso, la dieta, il tempo di somministrazione, il tasso di escrezione, la combinazione di farmaci, la gravità e il decorso della malattia, la condizione o

sintomi, la disposizione del paziente alla malattia, la condizione o sintomi, e il giudizio del medico curante. In caso di miglioramento delle condizioni del paziente, è possibile somministrare, se necessario, una dose di mantenimento di un composto, una composizione o una combinazione ivi forniti. Successivamente, il dosaggio o la frequenza di somministrazione, o entrambi, possono essere ridotti, in funzione dei sintomi, a un livello al quale viene mantenuta la condizione migliorata quando i sintomi sono stati ridotti al livello desiderato. I pazienti possono, tuttavia, richiedere un trattamento intermittente a lungo termine in caso di recidiva dei sintomi della malattia.

Selezione e Monitoraggio del Paziente

Il composto N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1) può attivare PKR selvaggio e/o PKR mutanti. Alcuni esempi di mutanti attivati dai composti qui descritti includono G332S, G364D, T384M, G37E, R479H, R479K, R486W, R532W, R510Q, I90N, e R490W. Di conseguenza, un paziente e/o soggetto possono essere selezionati per il trattamento utilizzando il Composto 1 valutando prima il paziente e/o il soggetto per determinare se il soggetto presenta una mutazione in PKR (per esempio,

una delle mutazioni descritte nel presente documento), e se il soggetto è determinato che è portatore di una mutazione in PKR; quindi, ha bisogno di attivazione dell'attività del PKR mutante, e quindi opzionalmente somministrare al soggetto il Composto 1. Un soggetto può essere valutato come portatore di una mutazione in PKR utilizzando metodi noti nella tecnica. Il soggetto può anche essere monitorato, ad esempio dopo la somministrazione del Composto 1. Nelle rivendicazioni, il soggetto può essere monitorato per valutare alcuni parametri PK/PD del Composto 1, come i livelli del Composto 1, i livelli di 2,3-DPG o i livelli di ATP.

ESEMPI

Esempio 1. Sintesi di N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide (Composto 1)

La sintesi del Composto 1 è stata effettuata seguendo la procedura descritta nel Brevetto statunitense n. 8.785.450.

Esempio 2. N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide (Composto 1)

L'Attivazione della Piruvato Chinasi In Vivo Migliora la Glicolisi degli Eritrociti nei Topi

La carenza di piruvato chinasi (PKD) è un'enzimopatia autosomica recessiva che è la causa più comune di

anemia emolitica non sferocitica ereditaria (HNSHA). La PKD è una malattia rara caratterizzata da un'emolisi cronica che dura tutta la vita e da gravi comorbilità. Si ipotizza che una produzione di energia insufficiente per mantenere l'omeostasi della membrana eritrocitaria promuova l'emolisi cronica. Il trattamento è generalmente palliativo, concentrandosi sull'anemia risultante, e non ci sono farmaci approvati che mirano direttamente alla piruvato chinasi mutata. Il Composto 1 è un attivatore allosterico dell'isoforma dei globuli rossi della piruvato chinasi (PKR) che è recentemente entrato in studi clinici di fase I in volontari sani normali. Il Composto 1 aumenta l'efficienza catalitica e migliora la stabilità proteica di uno spettro di proteine mutanti PKR espresse ricombinamente associate alla PKD. Gli eritrociti della PKD sono caratterizzati da alterazioni del metabolismo associate a glicolisi deficitaria, tra cui un accumulo del 2,3-DPG intermedio glicolitico a monte e una carenza del prodotto PKR adenosina trifosfato (ATP). Il flusso di PKR, *ad esempio* la velocità del flusso di carbonio attraverso la reazione enzimatica di PKR, è stato esaminato in campioni di sangue di pazienti PKD o donatori WT mediante incubazione di sangue intero con

un tracciante isotopico stabile, glucosio [$U-^{13}C_6$]. In vari momenti dopo l'aggiunta di glucosio [$U-^{13}C_6$], il metabolismo è stato interrotto e i metaboliti sono stati estratti. Le dimensioni dei pool di metaboliti e l'incorporazione dell'etichetta ^{13}C nei glicolitici intermedi sono state monitorate tramite LC/MS. Il tasso di incorporazione dell'etichetta è risultato significativamente più lento nei globuli rossi dei pazienti con PKD, in linea con la diminuzione dell'attività glicolitica. Il trattamento ex vivo dei globuli rossi di PKD con il Composto 1 induce cambiamenti del metabolismo coerenti con l'aumento dell'attività glicolitica, compresi livelli ridotti di 2,3-DPG, livelli aumentati di ATP e livelli aumentati di attività enzimatica della PKR. L'effetto del Composto 1 sul metabolismo degli eritrociti in vivo è stato valutato nei topi. I topi C57/BL6 sono stati dosati mediante sonda orale con una singola dose o con dosi multiple (13 dosi, BID) del Composto 1 per 7 giorni. I livelli di dose testati erano 1 mpk, 10 mpk, 50 mpk e 150 mpk. Dopo l'ultima dose, i topi sono stati sottoposti a prelievo per valutare l'esposizione al farmaco e i marcatori farmacodinamici, inclusi i livelli di 2,3-DPG e ATP e l'attività della PKR. È stato dimostrato che il Composto 1 è un composto con

un buon comportamento, con un aumento proporzionale alla dose nell'esposizione, sia negli studi a dose singola che in quelli a dose multipla. Una singola dose del Composto 1 ha determinato un aumento dose-dipendente dei livelli di attività della PKR (FIG. 1, a sinistra), in concomitanza con la riduzione dei livelli di 2,3-DPG (FIG. 1, a destra). Non si sono verificati cambiamenti significativi nei livelli di ATP dopo una singola somministrazione del Composto 1 (FIG. 1, al centro). Negli studi a dose multipla sono state osservate variazioni simili nell'attività di PKR (FIG. 2, a sinistra) e livelli di 2,3 DPG (FIG. 2, a destra). A differenza dello studio a dose singola, si è osservato che i livelli di ATP nello studio a dose multipla aumentano notevolmente in base alla dose (FIG. 2, centro). Le correlazioni farmacocinetiche/farmacodinamiche risultanti tra l'esposizione al Composto 1 nel plasma e ciascun marcatore farmacodinamico (attività del PKR e livelli di ATP e 2,3-DPG) per gli studi a dose singola e a dose multipla evidenziano ulteriormente queste osservazioni (FIGG. 1 e 2, pannelli inferiori). L'effetto del Composto 1 sul flusso PKR è stato valutato nel sangue intero da topi trattati con il Composto 1. C57BL/6 topi sono stati dosati mediante

sonda orale con il Composto 1 a 100 mpk BID per 13 dosi totali. Il sangue intero è stato incubato con glucosio [$U-^{13}C_6$] a 37°C e sono state valutate le dimensioni del pool di metaboliti e la velocità di incorporazione dell'etichetta di ^{13}C negli intermedi glicolitici. I dati sono stati successivamente analizzati utilizzando un modello matematico di flusso cinetico per quantificare la variazione complessiva del flusso di carbonio attraverso la reazione di PKR. Utilizzando questo modello, è stato determinato che il trattamento con il Composto 1 ha aumentato significativamente il flusso glicolitico attraverso la reazione PKR, come illustrato schematicamente in FIG. 3. In generale, questi dati dimostrano che il Composto 1 non solo si lega e attiva in vivo l'enzima PKR, ma questa attivazione enzimatica induce una maggiore attività del percorso glicolitico nei globuli rossi, che si traduce in profondi cambiamenti nel metabolismo cellulare, come si riflette in un aumento drastico dei livelli di ATP e nella riduzione dei livelli di 2,3-DPG. Poiché il Composto 1 ha una potenza simile rispetto all'enzima WT PKR rispetto agli enzimi PKR mutanti testati in vitro, questi dati supportano l'ipotesi che il trattamento con il Composto 1 possa migliorare in modo analogo l'attività glicolitica nei

pazienti con PKD e quindi correggere la patologia sottostante della PKD.

Esempio 3. Studi Clinici sulla Sicurezza, Tollerabilità, Farmacocinetica (PK) e Farmacodinamica (PD) di un Attivatore di Piruvato Chinasi R in Soggetti Sani

Il Composto 1 è un nuovo attivatore allosterico di piccole molecole di prima classe del PK-R che si rivolge direttamente al difetto metabolico sottostante della PKD. Studi preclinici hanno dimostrato che il Composto 1 aumenta l'attività sia di tipo selvatico che di vari enzimi PK-R mutati. L'obiettivo principale di questi studi su dosi ascendenti singole e multiple, randomizzati, in doppio cieco, controllati con placebo (SAD e MAD), è quello di identificare una dose sicura e farmacodinamicamente attiva e un programma per l'uso del Composto 1 in studi clinici successivi in soggetti con carenze di piruvato chinasi.

Metodi

Nello studio monodose crescente (SAD), uomini e donne sani (potenziale non in età fertile) di età compresa tra 18-60 anni sono stati randomizzati in modo da ricevere una singola dose orale del Composto 1 o placebo (P). I principali criteri di esclusione includevano la carenza di glucosio 6-fosfato

deidrogenasi, la donazione di sangue, la perdita di sangue superiore a 500 ml o la trasfusione di sangue o plasma verificatisi entro tre mesi dallo screening. Sono state valutate sei coorti, ciascuna contenente 8 soggetti (6 soggetti che ricevono Composto 1, 2 soggetti che ricevono placebo (P)), a partire da 30 mg nella coorte 1 seguita rispettivamente da 120 mg, 360 mg, 700 mg, 1400 mg e 2500 mg nelle coorti 2-6. Nello studio a dose multipla crescente (MAD), 2 coorti (120 mg BID e 360 mg BID) di 8 soggetti ciascuno (6 soggetti che ricevono il Composto 1, 2 soggetti che ricevono placebo (P)) hanno completato 14 giorni di somministrazione e 2 settimane di follow-up. In entrambi gli studi, le valutazioni della sicurezza includevano eventi avversi (AEs), parametri vitali, ECG e parametri di laboratorio clinico. Sono stati prelevati campioni di sangue seriali per la valutazione dei parametri PK e PD (2,3-DPG e ATP) pre-dose e successivamente a intervalli regolari a dosi multiple in entrambi gli studi SAD e MAD. Nello specifico, le concentrazioni plasmatiche del Composto 1 e le concentrazioni ematiche di 2,3-DPG e ATP sono state analizzate con metodi di spettrometria di massa tandem. Lo studio MAD è stato completato valutando la sicurezza, la tollerabilità e la

farmacocinetica/farmacodinamica (PK/PD) del Composto 1 in volontari sani e identificando un programma di dosaggio per studi futuri in pazienti con carenze di PK. Uno studio di fase 1, a centro singolo, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo (ClinicalTrials.gov NCT02149966) è stato condotto in uomini e donne sani (18-60 anni), in 6 coorti sequenziali (ciascuna coorte: n=6 Composto 1, n=2 placebo). I soggetti hanno ricevuto due volte al giorno dosi orali del Composto 1 da 15 mg a 700 mg (q12h), o 120 mg una volta al giorno (q24hr) per 14 giorni con follow-up fino al giorno 29. Sono stati monitorati eventi avversi (AEs), parametri di laboratorio, ECG e parametri vitali. Le concentrazioni plasmatiche del Composto 1 e dei livelli di 2,3-DPG e ATP nel sangue intero sono state misurate in campioni ematici seriali per la valutazione PK/PD. I livelli ormonali sono stati monitorati a causa di dati preclinici che suggeriscono una potenziale modulazione.

Risultati

Studio a Dose Singola Crescente (SAD)

Nel SAD, tutti i 48 soggetti partecipanti hanno completato lo studio, che includeva 47 maschi e 1 femmina. Questi soggetti rappresentavano una varietà di razze ed etnie (15 Bianchi, 31 Neri, 1 Asiatici, 1

Nativi Hawaiani o altre Isole del Pacifico, in cui 7 soggetti si identificano come Ispanici o Latini) e l'età media era di circa 40 anni. L'Analisi dei dati sulla sicurezza ha indicato che 19/48 (39%) soggetti che hanno ricevuto il Composto 1 o il placebo (P) in condizioni di digiuno e/o di alimentazione hanno subito almeno 1 evento avverso emergente (AE) durante lo studio (FIG. 4). Tutte gli eventi avversi erano di gravità lieve o moderata (Grado 1 e 2) e le più comuni erano nausea (n=5; 10%) e cefalea (n=8; 17%). Nelle 2 coorti MAD completate (13 maschi; 3 femmine; età media 44 anni) 8/16 (50%) dei soggetti che hanno ricevuto il Composto 1 o placebo hanno sperimentato 11 eventi avversi. Tutte gli eventi avversi erano lievi (n=10) o moderati (n=1) e i più frequenti erano lividi da venipuntura. In entrambi gli studi non sono stati riscontrati casi gravi di eventi avversi, interruzioni dovute a eventi avversi o tossicità limitanti la dose. La dose Massima Tollerata non è stata raggiunta nello studio SAD e l'aumento della dose è continuato nello studio MAD. Nelle coorti SAD 1-6, l'esposizione a dosi singole di Composto 1 è aumentata in modo proporzionale alla dose (C_{max} plasmatica media, AUC_{0-12hr} e AUC_{0-72hr}) (FIG. 5). L'assorbimento è stato rapido, con una T_{max} mediana di 0,75-4,0 ore. I valori dei parametri

farmacocinetici del Composto 1 per ciascuna coorte SAD sono riepilogati in FIG. 6. Come previsto, il Composto 1 ha avuto una rapida fase di distribuzione o eliminazione durante le prime 12 ore successive alla somministrazione, con un'emivita apparente di circa 2-4 ore (FIG. 5). L'emivita terminale apparente media ($t_{1/2}$) variava tra 17,5-20,5 ore o 50-80 ore, quando le concentrazioni erano state misurate rispettivamente per 72 o 120 ore (FIG. 6). Inoltre, è stata osservata una diminuzione dose-dipendente della concentrazione del marcatore farmacodinamico 2,3-DPG nell'arco di 24 ore dopo l'esposizione al Composto 1 (con una diminuzione del 48%), che è tornata a livelli placebo dopo 72 ore (FIG. 7). I risultati Preliminari hanno indicato che il cibo ha un effetto minimo sull'esposizione al Composto 1.

Studio a Dose Multipla Crescente (MAD)

Nello studio MAD, i risultati farmacocinetici per le coorti 1 e 2 al giorno 1 erano coerenti con quelli dello studio SAD. Tuttavia, i valori dei parametri farmacocinetici del Composto 1 erano inferiori al giorno 14 rispetto a quelli del giorno 1, suggerendo che dosi multiple del Composto 1 possono causare un aumento del tasso di metabolismo del farmaco. La diminuzione dell'esposizione al giorno 14 è coerente

con i dati preclinici che suggeriscono che il Composto 1 è un induttore moderato del citocromo P450 3A4 (CYP3A4), che è la via principale del metabolismo ossidativo del Composto 1. Analogamente, sono state osservate riduzioni dei livelli di 2,3-DPG anche dopo la somministrazione della dose finale nelle coorti 1 e 2 dello studio MAD. Le concentrazioni di 2,3-DPG nel sangue sono ritornate ai livelli del placebo tra le 48 e le 72 ore dopo l'ultima dose (FIG. 8). Nello studio SAD sono stati riscontrati aumenti minimi dei livelli di ATP nel sangue dopo una singola dose di Composto 1. Al contrario, i livelli di ATP nel sangue nei giorni 8-14 dei soggetti delle coorti 1 e 2 nello studio MAD sono aumentati considerevolmente e i livelli sono rimasti elevati per 72 ore dopo l'ultima dose (FIG. 9). Nelle 6 coorti sequenziali, sono stati selezionati 48 soggetti (42 maschi e 6 femmine) con un'età media di 41,5 anni (25-60). I dati finali sulla sicurezza non in cieco hanno mostrato ≥ 1 eventi avversi in 16 soggetti su 36 (44%) trattati con il Composto 1 e 4 su 12 (33%) soggetti placebo (P). Sono stati osservati eventi avversi correlati al trattamento ≥ 1 in 11 dei 36 soggetti (31%) trattati con il Composto 1 e 3 dei 12 soggetti placebo (25%). Tutti gli eventi avversi correlati al trattamento erano lievi o moderati (solo

1 evento di grado 3) in termini gravità e spesso reversibili nonostante il dosaggio continuato. Gli eventi avversi correlati al Composto 1 più frequenti erano nausea e cefalea, 5 dei 36 soggetti (14%) per ciascuno (P: 0/12 (0%) nausea; cefalea 1 su 12 (8%)). Si sono verificati eventi avversi gastrointestinali in soggetti trattati con il Composto 1 solo alla dose più elevata, 700 mg q12h. Si è verificato un evento avverso di Grado 3 (Composto 1 (700 mg q12h), test di funzionalità epatica elevati (LFT) che si sono risolti dopo l'interruzione del trattamento). Ci sono state quattro interruzioni del Composto 1: a causa di eventi avversi in 2 soggetti (eruzione farmacologica di grado 2, 60 mg q12h; LFT elevati di Grado 3, 700 mg q12h) e 2 soggetti hanno ritirato il consenso (entrambi hanno sperimentato nausea di Grado 1/2 e vomito di Grado 1/1, entrambi a 700 mg q12h). La dose più alta ben tollerata è stata di 360 mg q12h (le dosi tra 360 e 700 non sono state esplorate). L'esposizione plasmatica del Composto 1 era dipendente dalla dose con variabilità da bassa a moderata nei parametri PK del Composto 1 e del suo metabolita. Si è verificata una diminuzione dose-dipendente nel 2,3-DPG e un aumento dell'ATP con la stabilizzazione degli effetti a 360 mg q12h. La diminuzione di 2,3-DPG è stata

robusta dopo la Dose 1, mentre l'aumento dell'ATP si è verificato gradualmente ed è stato fortemente evidente al Giorno 8. Variazione rispetto al riferimento in 2,3-DPG e ATP stabilizzata rispettivamente a ~300 µg/ml (diminuzione del 50%) e ~175 µg/ml (aumento del ~50%) (rispettivamente FIGG. 10A e 10B). Dopo la dose finale del giorno 14, 2,3-DPG è tornato a livelli simili al riferimento tra 72 e 120 ore (FIG. 10A). I livelli di ATP sono rimasti elevati per 120 ore dopo la dose (FIG. 10B). Il Composto 1 aveva un profilo di sicurezza favorevole ed era ben tollerato in soggetti sani in base ad analisi preliminari su soggetti che hanno ricevuto una dose singola fino a 2500 mg o dosi multiple BID fino a 360 mg per un massimo di 14 giorni. Il Composto 1 ha inoltre dimostrato un profilo PK desiderabile, con rapido assorbimento, bassa variabilità PK ed esposizione dose-proporzionale con effetto PD, come dimostrato su 2,3-DPG e ATP. Nello studio SAD non sono stati riscontrati eventi avversi gravi, interruzioni dovute a eventi avversi o tossicità limitanti la dose, e finora non sono stati riscontrati eventi avversi gravi nello studio MAD. Le variazioni dose-dipendenti dei livelli ematici di ATP e 2,3-DPG osservate in questi studi sono coerenti con l'aumento dell'attività

della via glicolitica, che rappresenta l'effetto farmacodinamico previsto del Composto 1. Questi dati sono coerenti con gli studi preclinici effettuati su topi descritti nell'esempio 2. Poiché il Composto 1 ha un'attività biochimica approssimativamente equipotente contro gli enzimi PKR di tipo selvatico e mutanti, i dati supportano l'ipotesi che il Composto 1 possa essere in grado di migliorare l'attività glicolitica nei globuli rossi dei pazienti con PKD per affrontare la causa sottostante delle malattie. Come mostrato in FIG. 10A, si è verificata una diminuzione di 2,3-DPG nel sangue con il Composto 1. I livelli ematici medi di 2,3-DPG sono generalmente diminuiti rispetto al basale nel periodo di 12 ore post-dose successivo alla prima dose del Composto 1 in tutti i livelli di dose studiati. Il tasso di diminuzione dei livelli di 2,3-DPG è stato più lento a dosi inferiori. Una grande frazione della diminuzione si è verificata dopo la prima dose e la diminuzione ha raggiunto la sua massima estensione entro 7 giorni dalla somministrazione. Sono state osservate riduzioni relative alla dose nei livelli di 2,3-DPG con dosi crescenti di Composto 1 a basse dosi di 15 e 60 mg di Composto 1 q12h e ha raggiunto una stabilizzazione nei livelli di dose da 120 a 700 mg q12h, con riduzioni

aggiuntive minime con dosi più elevate. La riduzione massima dei livelli di 2,3-DPG è stata di circa 300 µg/mL, con una diminuzione di circa il 50%. La concentrazione di 2,3-DPG è tornata ai valori di riferimento entro 72 ore dalla dose finale del Composto 1. Come mostrato in FIG. 10B, si è verificato un aumento dell'ATP nel sangue con il Composto 1. I livelli di ATP sono aumentati durante la somministrazione di dosi multiple del Composto 1. Qualsiasi effetto del Composto 1 sui livelli di ATP nelle 12 ore successive alla prima dose è stato minimo. L'aumento dei livelli di ATP ha raggiunto la sua massima estensione entro 10 giorni dalla somministrazione. Aumenti dei livelli di ATP sono stati osservati con l'aumento delle dosi di AG-348 a basse dosi di 15 e 60 mg AG-348 q12h e hanno raggiunto una stabilizzazione nei livelli di dose da 120 a 700 mg, con aumenti aggiuntivi minimi con dosi più elevate. L'aumento massimo dei livelli di ATP è stato di circa 175 µg/mL, con un aumento di circa il 50%. La concentrazione di ATP è rimasta elevata per 120 ore dopo la dose finale del Composto 1.

Esempio 4. Studi Clinici sulla Sicurezza, l'Efficacia, la Farmacocinetica (PK) e la Farmacodinamica (PD) di un Attivatore di Piruvato Chinasi-R (PKR) in Soggetti

con Carenza di Piruvato Chinasi

Questo esempio descrive una Fase 2, in aperto, a due bracci, multicentrici, randomizzati, uno studio a dose variabile del Composto 1 in pazienti adulti con carenza di piruvato chinasi (carenza di PK). Questo è il primo studio da condurre in pazienti con carenza di PK. L'obiettivo principale di questo studio è quello di valutare la sicurezza e la tollerabilità fino a 24 settimane di somministrazione del Composto 1 in pazienti con carenza di PK.

Metodi

In questa fase 2 dello studio con vari dosaggi in aperto, a due bracci, multicentrico, randomizzato, i pazienti adulti (maschi e femmine) con carenza di piruvato chinasi ricevono dosi multiple del Composto 1 per un massimo di 24 settimane. La carenza di piruvato chinasi nei pazienti è confermata dal dosaggio enzimatico di piruvato chinasi eritrocitaria (RBC). Alla settimana 25, i pazienti che tollerano in sicurezza il Composto 1 e dimostrano l'attività clinica del Composto 1 possono essere idonei a passare a uno studio di estensione della sicurezza separato per continuare il trattamento. I pazienti che terminano il trattamento alla fine di 24 settimane o prima saranno sottoposti a valutazione di follow-up 4

settimane dopo l'ultima dose del farmaco dello studio. I pazienti con tossicità sospetta di essere correlata al farmaco dello studio continueranno il follow-up fino a quando l'evento avverso (AE) non si risolve, viene dichiarato cronico o il paziente non segue il follow-up.

Selezione Paziente

I pazienti vengono sottoposti a screening prima della randomizzazione e del giorno 1 del periodo di trattamento per soddisfare determinati criteri. I pazienti inclusi nello studio sono adulti (*ad esempio*, di età pari o superiore a 18 anni) che hanno un'anamnesi/diagnosi di deficit di piruvato chinasi e che sono anemici ma non dipendenti dalla trasfusione.

Randomizzazione e Dosaggio

Inizialmente, fino a 25 pazienti sono randomizzati in aperto, su base 1:1, per ciascuno dei due bracci, *ad esempio* 25 pazienti per braccio. Nel Braccio 1, vengono somministrate due dosi due volte al giorno (BID) del Composto 1: 300 mg di Composto 1 somministrato per via orale ogni 12 ore (q12h) (BID), *ad esempio*, con un minimo di 10 ore tra una dose e l'altra. Nel Braccio 2, 50 mg del Composto 1 vengono somministrati per via orale q12h (BID). (Si veda la FIG. 11) a partire dal Giorno 1, il dosaggio

è continuo (*ad esempio*, non ci sono periodi di riposo). Il Composto 1 viene fornito come capsula da 25 mg o 100 mg (equivalente a base libera) del Composto 1. Il numero di capsule per dose varia in base al gruppo di dose assegnato. I pazienti riceveranno più dosi orali (PO) di Composto 1 nell'arco di un periodo di trattamento di 24 settimane.

Valutazione dei Pazienti

La sicurezza sarà monitorata su base continuativa, *ad esempio* a intervalli regolari o *ad hoc*, se necessario. Ad *esempio*, vengono monitorati eventi avversi (AEs), parametri vitali (VS), laboratorio clinico (ematologia, chimica clinica, coagulazione, analisi delle urine) ed elettrocardiogrammi (ECG) dei pazienti dello studio. Inoltre, vengono valutati i dati PK/PD disponibili e indicatori di attività clinica (*ad esempio*, sono valutate le variazioni dallo standard di riferimento in termini di emoglobina (Hb)).

Valutazioni Farmacocinetiche e Farmacodinamiche

Le valutazioni farmacocinetiche includono il campionamento seriale del sangue per la determinazione dei profili concentrazione-tempo del Composto 1 e vengono condotte, *ad esempio*, dopo la prima dose e la dose del mattino del 15° Giorno. Ad *esempio*, si ottengono livelli di valle aggiuntivi del Composto 1.

Il Composto 1 viene analizzato utilizzando saggi per determinare le concentrazioni nel plasma. I parametri farmacocinetici del Giorno 1 e del Giorno 15 vengono calcolati utilizzando metodi standard non compartimentali basati sulle concentrazioni plasmatiche osservate del Composto 1. Le valutazioni farmacodinamiche includono il prelievo ematico seriale per la determinazione dei livelli di ATP e 2,3-DPG. Il prelievo ematico seriale per la determinazione dei livelli di ATP e 2,3-DPG è condotto, *ad esempio*, dopo la prima dose e la dose del mattino del 15° Giorno, e saranno ottenuti ulteriori livelli di concentrazione di ATP e 2,3-DPG. ATP e 2,3-DPG vengono analizzati utilizzando saggi per determinare le concentrazioni nel sangue intero. I parametri farmacodinamici del Giorno 1 e del Giorno 15 vengono calcolati in base alle concentrazioni di ATP e 2,3-DPG nel sangue intero osservate. In alcuni casi, le valutazioni includono la determinazione dell'attività di PKR, la proteina di PKR e i saggi del flusso glicolitico. I campioni di sangue vengono valutati in base all'attività della PKR nei globuli rossi e la valutazione del flusso glicolitico nel sangue intero viene eseguita mediante marcatura *ex vivo* con glucosio ¹³C. Il sangue viene valutato anche in base ai livelli di proteine

PKR totali. I livelli di metaboliti aggiuntivi sono valutati anche nei campioni di sangue per chiarire ulteriormente il meccanismo e gli effetti dell'attivazione della PKR da parte del Composto 1. Esempi di marcatori PD sono mostrati nella FIG. 12. L'enzima PKR catalizza la reazione PEP-piruvato, con la formazione concomitante di ATP. Il legame del Composto 1 al tetramero PKR può essere valutato mediante un saggio biochimico ex vivo di lisati cellulari di pazienti trattati con il Composto 1. I livelli di proteine PKR nel sangue intero vengono valutati mediante saggi Western blot o ELISA quantitativo (o altri saggi simili). Il saggio PKR Flux misura la variazione del flusso di carbonio dal glucosio attraverso la reazione di PKR al piruvato dopo il trattamento con il Composto 1. Questo metodo si distingue dall'impegno del bersaglio misurato dal saggio di attività della PKR perché è condotto in cellule intatte e quindi è una misura più diretta e funzionale dell'attività della via. Il saggio del flusso PKR viene eseguito incubando il sangue del paziente prelevato di recente a 37°C con glucosio etichettato con $^{13}\text{C}_6$. Le frazioni dalla reazione di incubazione vengono prelevate nel tempo e congelate rapidamente. L'analisi successiva mediante

spettrometria di massa rivela la velocità di incorporazione dell'etichetta in intermedi glicolitici, tra cui DHAP, 2,3-DPG, 3-PG e PEP. I dati vengono adattati mediante modellazione matematica per quantificare il flusso di carbonio attraverso la reazione di PKR. Un aumento del flusso di carbonio attraverso la reazione di PKR indica l'efficacia del Composto 1. L'impegno del bersaglio del Composto 1 e la stimolazione dell'attività della via glicolitica sono stati mostrati in modelli preclinici e studi clinici volontari sani per determinare l'accumulo di ATP e l'esaurimento del metabolita a monte 2,3-DPG. Pertanto, un aumento dei livelli di ATP e/o una diminuzione dei livelli di 2,3-DPG indicano l'efficacia del Composto 1. I livelli di questi metaboliti possono essere misurati mediante spettrometria di massa da campioni di sangue intero congelati. In alcuni casi, l'analisi esposizione-risposta viene eseguita per valutare la relazione tra esposizione al Composto 1 e effetti PD con cambiamenti negli indicatori dell'attività clinica (*ad esempio*, variazioni dei livelli di Hb). Possono essere riesaminati dati/osservazioni aggiuntivi o alternativi diversi da quelli sopra elencati. In base alle revisioni, è possibile implementare una o più delle

seguenti fasi:

- aggiunta di 1 nuovo braccio di dose (Braccio 3) per selezionare fino a 25 pazienti con una dose da determinare; la dose per il Braccio 3 può essere inferiore o superiore alle dosi del braccio 1 e del braccio 2, ma non superiore a 360 mg q12h; e il regime di dose può essere meno frequente di q12h.

Sono stati descritti diversi aspetti di diverse realizzazioni, ma resta inteso che varie modifiche e miglioramenti saranno evidenti agli esperti nella tecnica. Di conseguenza, la descrizione e i disegni di cui sopra sono presentati solo a titolo esemplificativo.

RIVENDICAZIONI

1. Un Composto 1 da utilizzare in un metodo per il trattamento della carenza di piruvato chinasi (PKD) in un soggetto che ne ha bisogno, comprendente la somministrazione al soggetto per via orale di una dose compresa tra 10 mg e circa 60 mg o tra 60 mg e circa 200 mg del Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabili dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare in tal modo la PKD nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-

carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide.

2. Un Composto 1 da utilizzare in un metodo per il trattamento della carenza di piruvato chinasi (PKD) in un soggetto che ne ha bisogno, comprendente la somministrazione orale al soggetto di una dose di 50 mg-300 mg circa del Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare in tal modo la PKD nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide.

3. Il Composto 1 da utilizzare in un metodo di rivendicazione 1 o 2, in cui il metodo comprende l'attivazione della piruvato chinasi R, o in cui il metodo comprende l'attivazione di un isozima mutante di PKR.

4. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui il metodo comprende l'attivazione di un isozima PKR mutante.

5. Il Composto 1 da utilizzare in un metodo per il trattamento dell'anemia emolitica comprendente la somministrazione per via orale a un soggetto che ne ha bisogno di una dose di 10 mg-60 mg circa o 60 mg-200 mg circa del Composto 1 o di un sale o di un idrato

farmaceuticamente accettabile una o due volte al giorno per trattare l'anemia emolitica nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide.

6. Un Composto 1 da utilizzare in un metodo per il trattamento dell'anemia emolitica in un soggetto che ne ha bisogno, comprendente la somministrazione orale al soggetto di una dose di 50 mg-300 mg circa del Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare l'anemia emolitica nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide.

7. Il Composto 1 da utilizzare in un metodo della rivendicazione 5 o 6, in cui l'anemia emolitica è anemia emolitica ereditaria non sferocitica.

8. Il Composto 1 da utilizzare in un metodo per il trattamento della talassemia che prevede la somministrazione orale a un soggetto che ne ha necessità di una dose di 10 mg-60 mg circa o 60 mg-200 mg circa del Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una volta o due volte al giorno per trattare la talassemia nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(4-

(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolin-8-solfonammide.

9. Un Composto 1 da utilizzare in un metodo di trattamento della talassemia in un soggetto che ne ha bisogno, comprendente la somministrazione orale al soggetto di una dose di 50 mg-300 mg circa del Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare la talassemia nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide.

10. Il Composto 1 da utilizzare in un metodo della rivendicazione 7 o 8, in cui la talassemia è la beta-talassemia.

11. A Composto 1 da utilizzare in un metodo per il trattamento dell'anemia falciforme che comprende la somministrazione orale a un soggetto che ne ha bisogno una dose di 10 mg-60 mg circa o di 60 mg-200 mg circa del Composto 1 o di un sale o idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare l'anemia falciforme, in cui il Composto 1 è N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide.

12. Un Composto 1 da utilizzare in un metodo per il trattamento dell'anemia falciforme in un soggetto che

ne ha bisogno, comprendente la somministrazione orale al soggetto di una dose di 50 mg-300 mg circa del Composto 1 o di un sale o di un idrato accettabile dal punto di vista farmaceutico una o due volte al giorno per trattare l'anemia falciforme nel soggetto, in cui il Composto 1 è N-(4-(4-(ciclopropilmetil)piperazina-1-carbonil)fenil)chinolina-8-solfonammide.

13. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle indicazioni 1, 5, 8 e 11, in cui il metodo comprende la somministrazione orale al soggetto una o due volte al giorno di una dose di circa 10 mg-60 mg del Composto 1.

14. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle indicazioni 1, 5, 8 e 11, in cui il metodo comprende la somministrazione orale al soggetto una o due volte al giorno di una dose di circa 60 mg-200 mg del Composto 1.

15. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende somministrare per via orale al soggetto una o due volte al giorno una dose di circa 30 mg, o circa 120 mg del Composto 1.

16. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende la somministrazione al soggetto una

o due volte al giorno di una dose di circa 50 mg, circa 75 mg, circa 100 mg, circa 125 mg, circa 150 mg, circa 175 mg, circa 200 mg, circa 225 mg, circa 250 mg, circa 275 mg o circa 300 mg del Composto 1.

17. Il Composto 1 da utilizzare in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende la somministrazione del Composto 1 una volta al giorno.

18. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende la somministrazione del Composto 1 due volte al giorno.

19. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende la somministrazione di una dose di circa 50 mg due volte al giorno del Composto 1.

20. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende la somministrazione di una dose di circa 100 mg due volte al giorno del Composto 1.

21. Il Composto 1 da utilizzare in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende la somministrazione al soggetto di una dose di Composto 1 di circa 15 mg ogni 12 ore, circa 60 mg ogni 12 ore, circa 120 mg ogni 12 ore.

22. Il Composto 1 da utilizzare in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende la somministrazione al soggetto di una dose di Composto 1 di circa 10 mg-60 mg circa ogni 12 ore o di circa 60 mg-200 mg ogni 12 ore.

23. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende la somministrazione al soggetto di una dose di Composto 1 di circa 60 mg-200 mg ogni 24 ore.

24. Il Composto 1 per l'uso in un metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il metodo comprende la somministrazione al soggetto di una dose di Composto 1 di circa 90 mg ogni 24 ore, circa 120 mg ogni 24 ore, circa 150 mg ogni 24 ore, circa 180 mg ogni 24 ore, o circa 200 mg ogni 24 ore.

Didascalìa delle figure:

FIG. 1

Attività; vettore; dati grezzi attività; tempo dopo l'ultima dose; sangue intero; ... di attività del vettore; ... di tutto; simulato; osservato; esposizione attività netta; composto; ... a ...

FIG. 2, 2continua

Attività; vettore; attività ... (proteina); tempo dopo l'ultima dose; sangue intero; simulato; osservato; attività (... di tutto); attività netta; composto; ... a ...

FIG. 3A

dosi del Composto; metabolismo del campione e interruzione del metabolismo nel tempo; prelievo; acido piruvico; incubazione del glucosio a; etichettato; vettore non etichettato; composto non etichettato; frazione del pool; etichettatura frazionata; alla ...

FIG. 3B

Dalla ...; estrazione di metaboliti & analisi; piruvato; composto; flusso (cellule); veicolo; quantificazione del flusso.

FIG. 4

Evento avverso; placebo; Composto; qualsiasi; grado;

che porta alla sospensione; più comuni (soggetti in entrambi i gruppi); cefalea; nausea; vomito; infezione delle vie respiratorie superiori; correlata al trattamento; più comuni correlati al trattamento (soggetti in entrambi i gruppi); ... a ...; considerati possibilmente o probabilmente correlati al trattamento sono stati valutati utilizzando criteri terminologici per gli eventi avversi del National Cancer Institute, versione.

FIG. 5

Concentrazione plasmatica del Composto; tempo; profili concentrazione-tempo medi del Composto nel plasma umano dopo una singola dose per via orale.

FIG. 6

Dose; media geometrica (media geometrica). Tranne ... che è mediana (minima, massima) e ... che è media aritmetica ... per ogni dose livello; campioni prelevati in ...; ... da ... a ...; da ... estrapolati all'infinito; clearance apparente; concentrazione massima; emivita apparente di eliminazione terminale; tempo di massima concentrazione osservata; volume apparente di distribuzione.

FIG. 7

Placebo; composto; concentrazione ematica osservata; media; diminuzione rispetto ai valori di riferimento;

tempo.

FIG. 8

concentrazione nel sangue; periodo di dosaggio;
placebo; composto; diminuzione rispetto ai valori di
riferimento; media; tempo (giorni).

FIG. 9

Concentrazione nel sangue; periodo di dosaggio;
placebo; composto; aumento rispetto ai valori di
riferimento; media; tempo (giorni).

FIG. 10A

Variazione rispetto alla concentrazione ematica
basale; placebo; composto; tempo (giorno); modifica
rispetto ai profili concentrazione-tempo basali di ...
e ... nel sangue a seguito di dosi multiple del Composto.

FIG. 10B

Variazione dalla concentrazione ematica ... al basale;
placebo; composto; tempo (giorno).

FIG. 11

Screening; randomizzazione; braccio; periodo di
trattamento; dose/regime del braccio (opzionale);
stratificato dal genotipo; revisioni (settimane);
massimo per braccio; può selezionare 1 o più delle
seguenti opzioni per ogni revisione; continuare il
trattamento e selezione nei bracci esistenti senza
modifiche; aggiungere il terzo braccio (fino a ...

pazienti) con una dose/programmazione da definire, ma non superare ...; terminare o sospendere la selezione in qualsiasi braccio aperto (braccio); riassegnare la dose e la programmazione dei pazienti in un braccio terminato in modo che corrispondano alla dose e al programma di un altro braccio dello studio; implementare restrizioni specifiche del genotipo per la selezione in uno o più bracci per garantire la rappresentazione di pazienti con genotipi di maggiore rilevanza clinica.

FIG. 12

Marcatori farmacodinamici; attività/livello di proteine; flusso; livelli di metaboliti; piruvato.

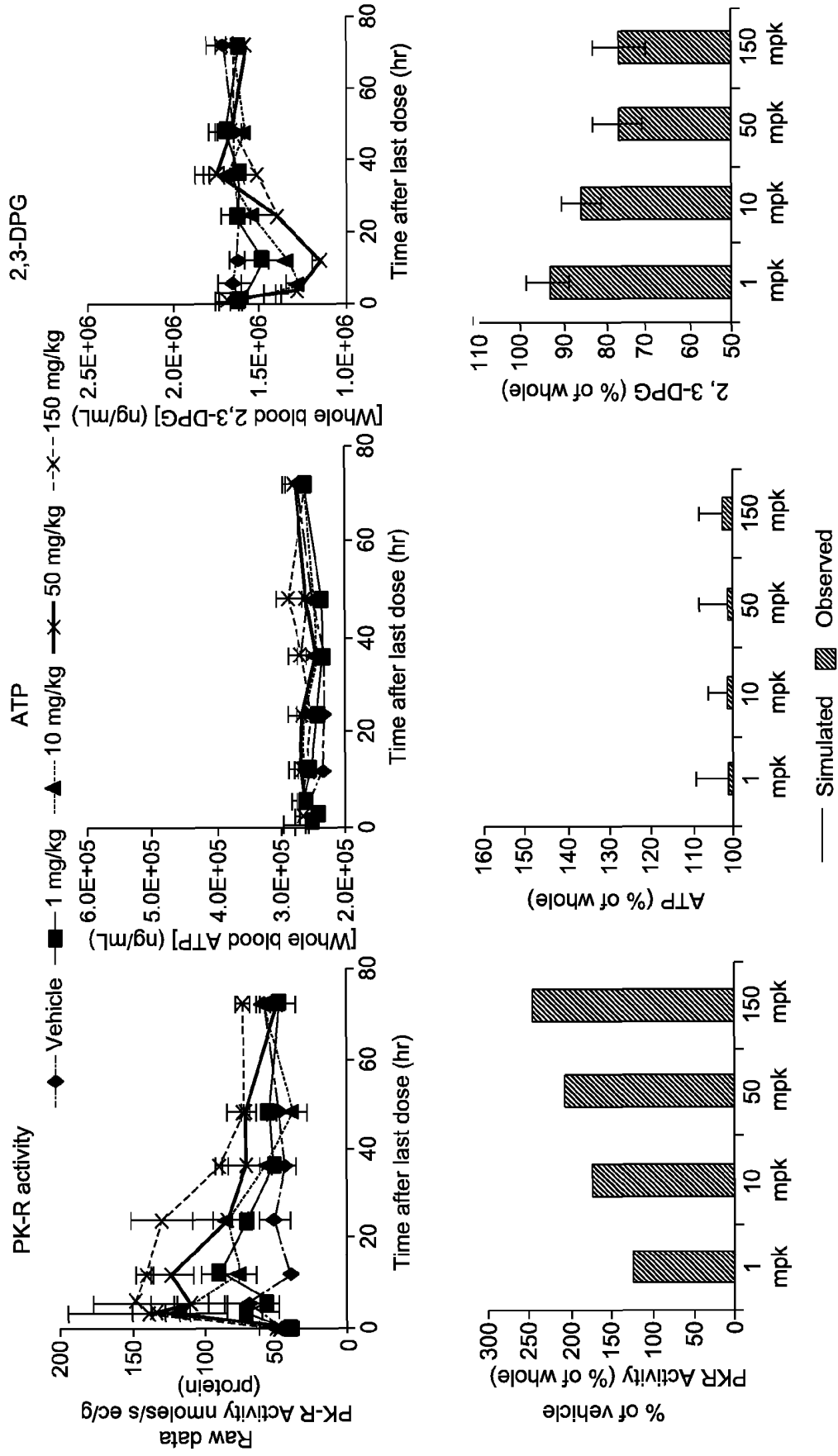


Figure 1

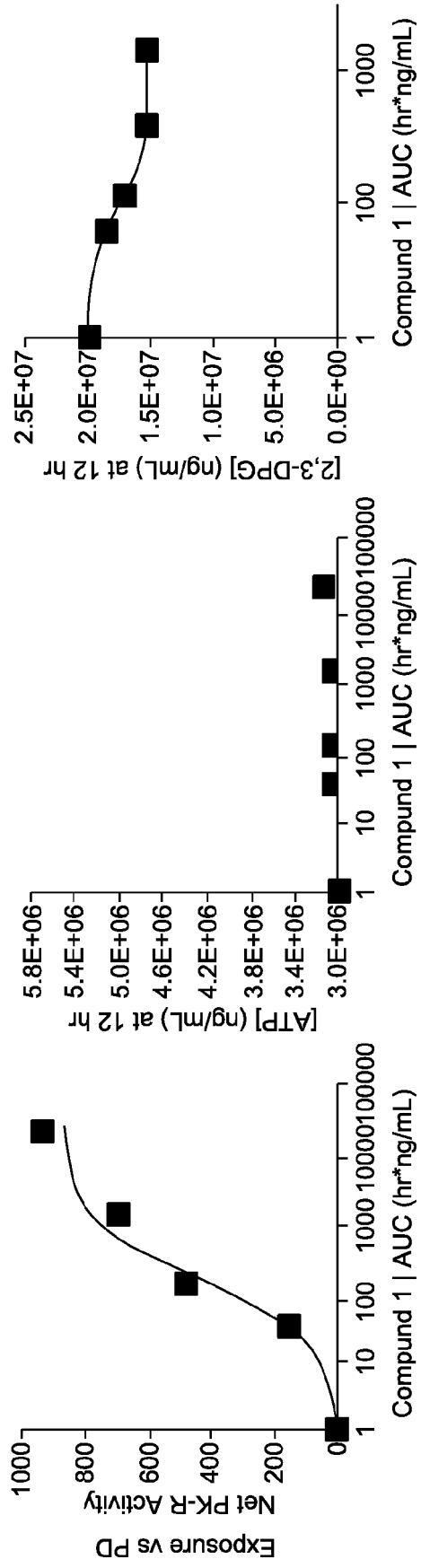


Figure 1
(Continued)

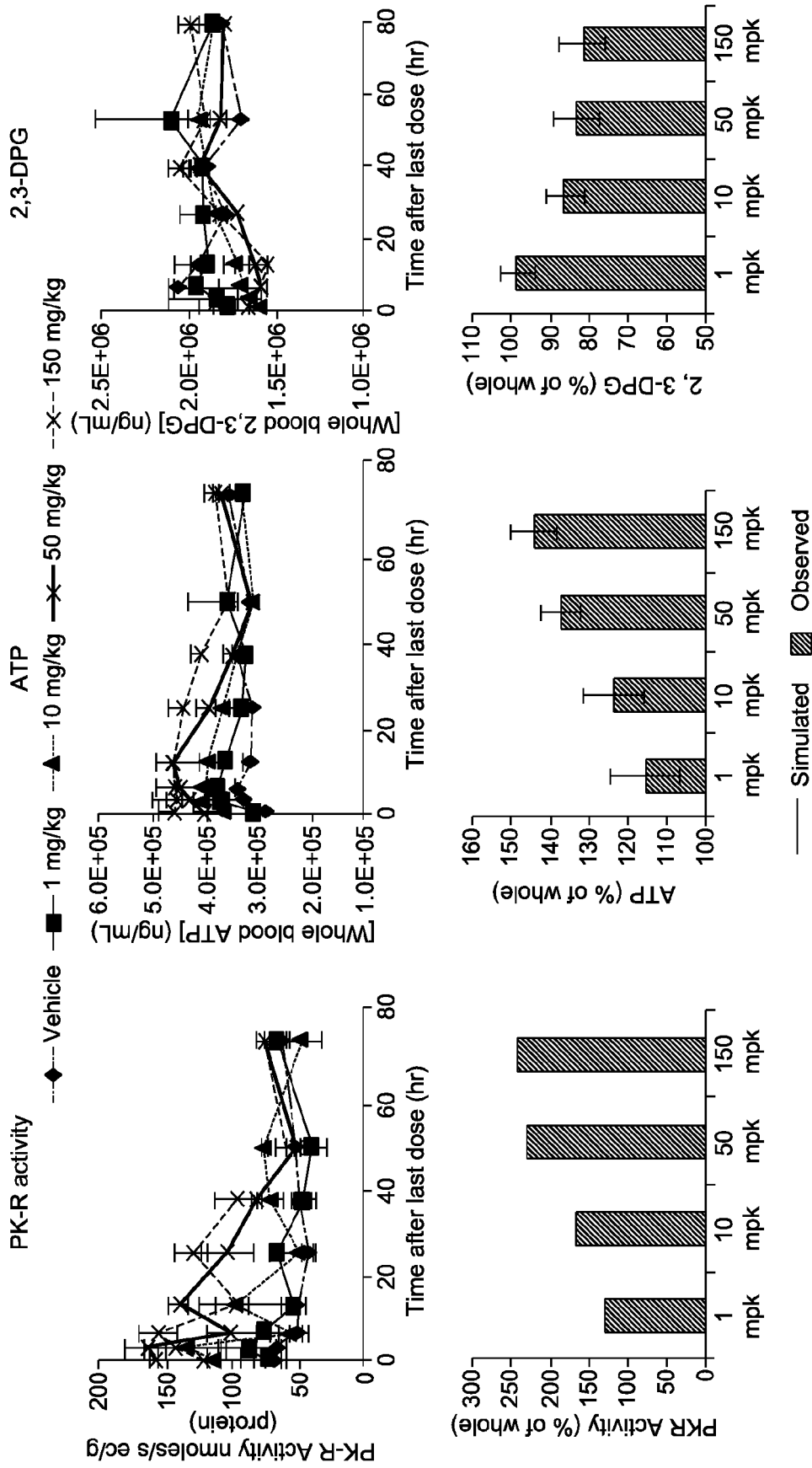


Figure 2

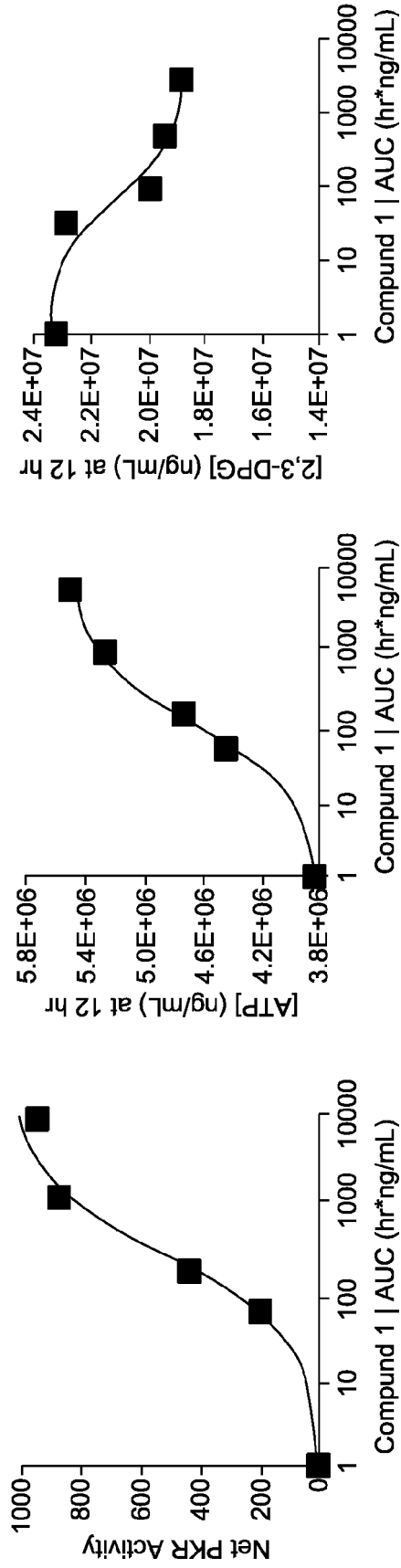


Figure 2
(Continued)

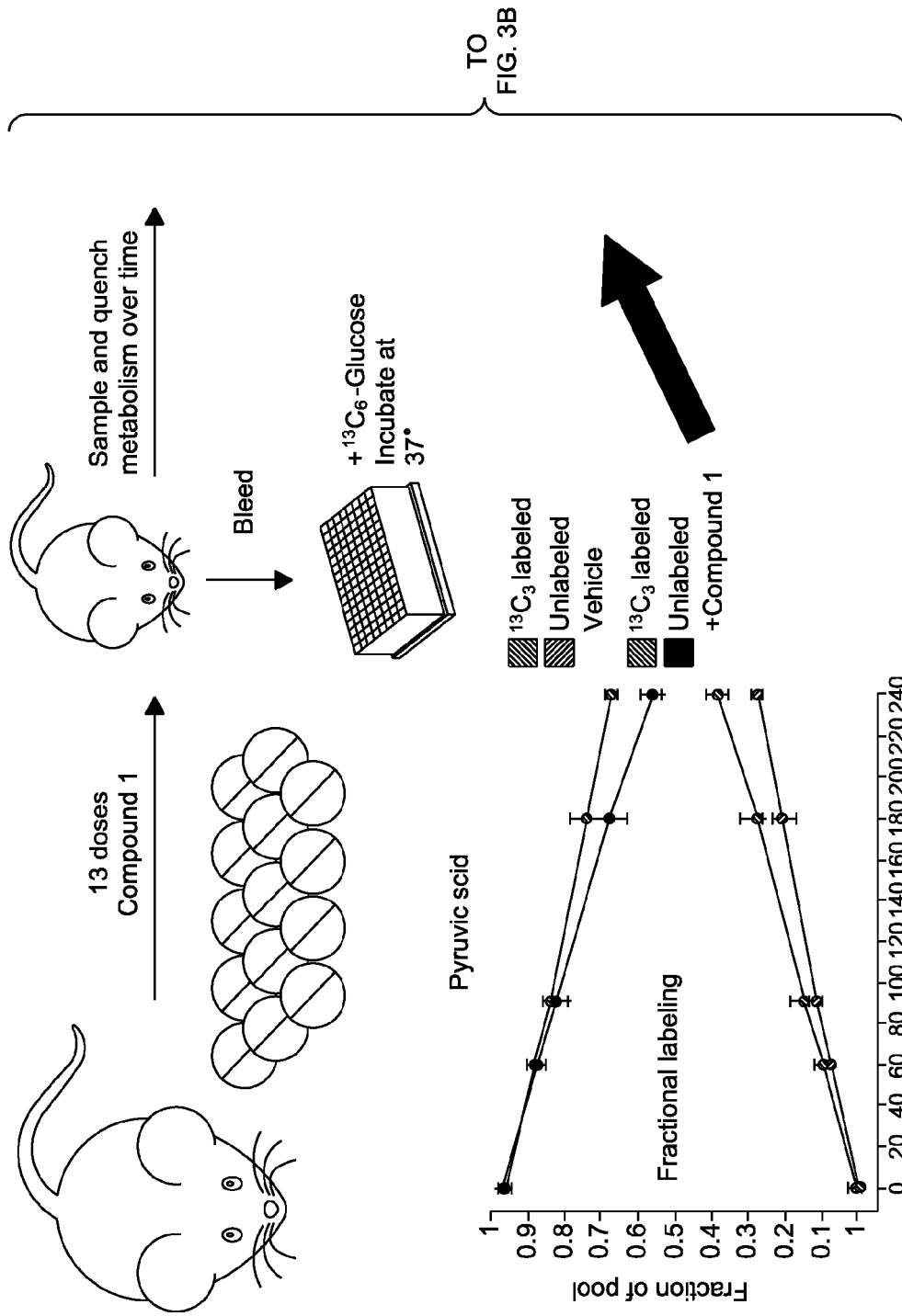


Figure 3A

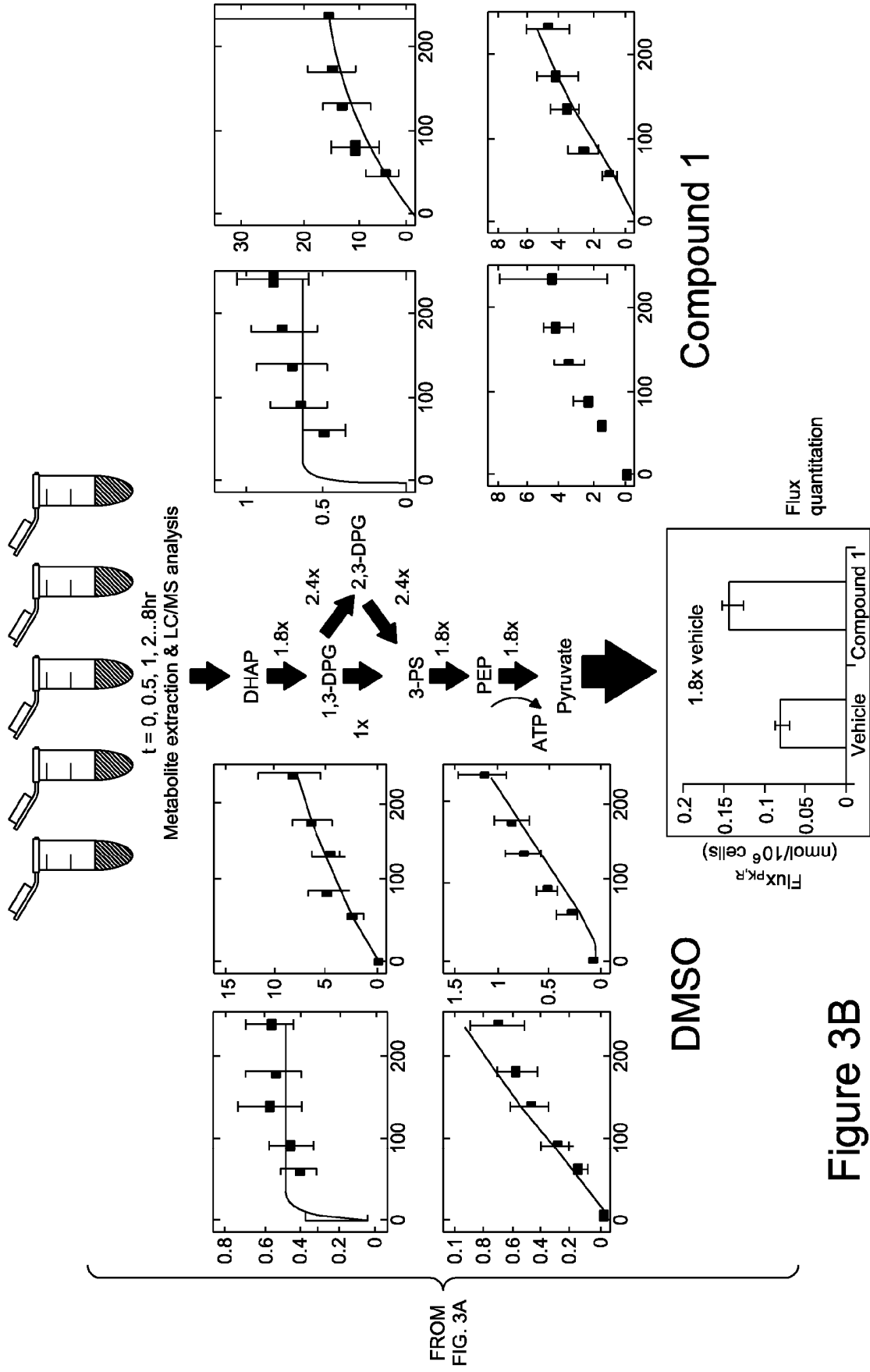


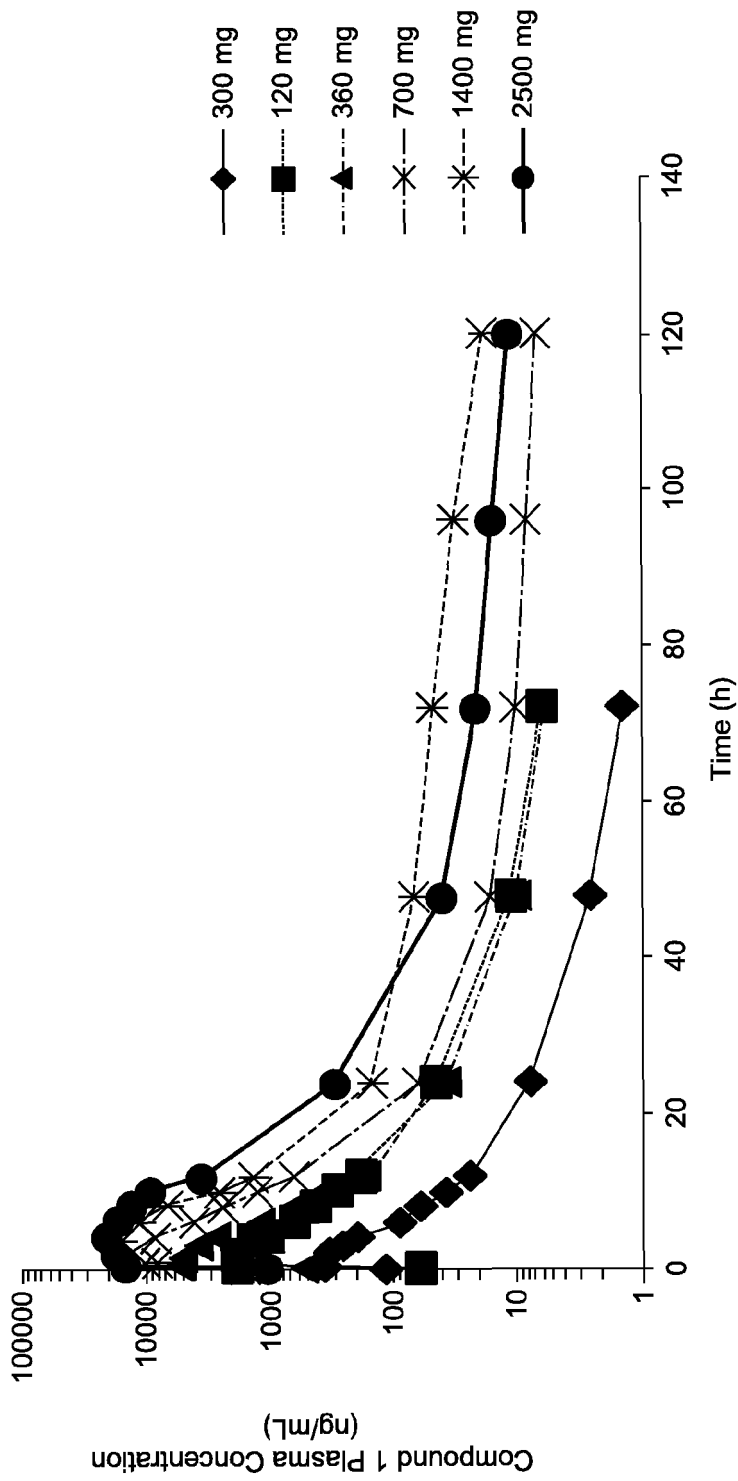
Figure 3B

FROM FIG. 3A

Adverse event	Placebo (n=12)	Compound 1 (n=36)
Any AE, n (%)	4 (33.3)	16 (44.4)
Grade \geq 3	0	0
Any SAE, n (%)	0	0
AE leading to discontinuation, n (%)	0	0
Most common AEs (\geq 2 subjects in either group), n (%)		
Headache	3 (25.0)	5 (13.9)
Nausea	0	5 (13.9)
Vomiting	0	2 (5.6)
Upper respiratory tract infection	0	2 (5.6)
Treatment-related AE ^a , n (%)	2 (16.7)	11 (30.6)
Most common treatment-related AES ^a (\geq 2 subjects in either group), n (%)		
Headache	3 (25.0)	4 (11.1) 1 at 30 mg, 2 at 1400 mg, 1 at 2500 mg
Nausea	0	5 (13.9) 1 at 1400 mg, 4 at 2500 mg
Vomiting	0	2 (5.6) 2 at 2500 mg

^a Judged possibly or probably related to treatment
 AEs were graded using National Cancer Institute Terminology Criteria for Adverse Events, Version 4.03

Figure 4



Mean Concentration-Time Profiles of Compound 1 in Human Plasma Following a Single Oral Dose

Figure 5

Dose (mg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC ₀₋₁₂ (hr +ng/mL)	AUC _{0-∞} (hr +ng/mL)	t _{1/2} (hr)	C _{I/F} (L/hr)	Vz/F (L)
30 ^a	461 (19.3)	0.77 (0.48, 2.00)	1679 (32.0)	2079 (30.8)	19.3 (18.9)	14.4 (30.8)	396 (30.1)
120 ^a	2300 (43.9)	1.01 (0.50, 3.00)	8961 (32.0)	11176 (32.9)	17.8 (18.4)	10.7 (32.9)	271 (46.5)
360 ^a	6637 (26.8)	0.77 (0.50, 2.00)	23501 (12.5)	25944 (10.9)	20.4 (17.6)	13.9 (10.9)	402 (23.8)
700 ^a	12686 (17.7)	1.49 (0.58, 3.03)	61782 (25.9)	68066 (27.9)	79.3 (26.3)	10.3 (27.9)	1148 (29.4)
1400 ^a	17688 (28.1)	2.53 (1.72, 4.03)	113348 (30.0)	131493 (26.7)	50.3 (29.5)	10.6 (26.7)	743 (36.3)
2500 ^a	25477 (24.0)	4.07 (0.48, 6.02)	164122 (30.7)	197795 (36.1)	73.9 (68.5)	12.6 (36.1)	1163 (72.0)

Geometric mean (geometric mean CV%). except T_{max} which is median (minimum, maximum) and t_{1/2} which is arithmetic mean (CV%)

N=6 for each dose level

^aSamples collected through 72 hr

^bSamples collected through 120 hr

AUC_{0-12hr} = AUC from 0 to 12 hr; AUC_{0-∞} = AUC from 0 extrapolated to infinity; C_{I/F} = apparent clearance; C_{max} = maximum concentration;

t_{1/2} = apparent terminal elimination half-life; T_{max} = time of maximum observed concentration; Vz/F = apparent volume of distribution

Figure 6

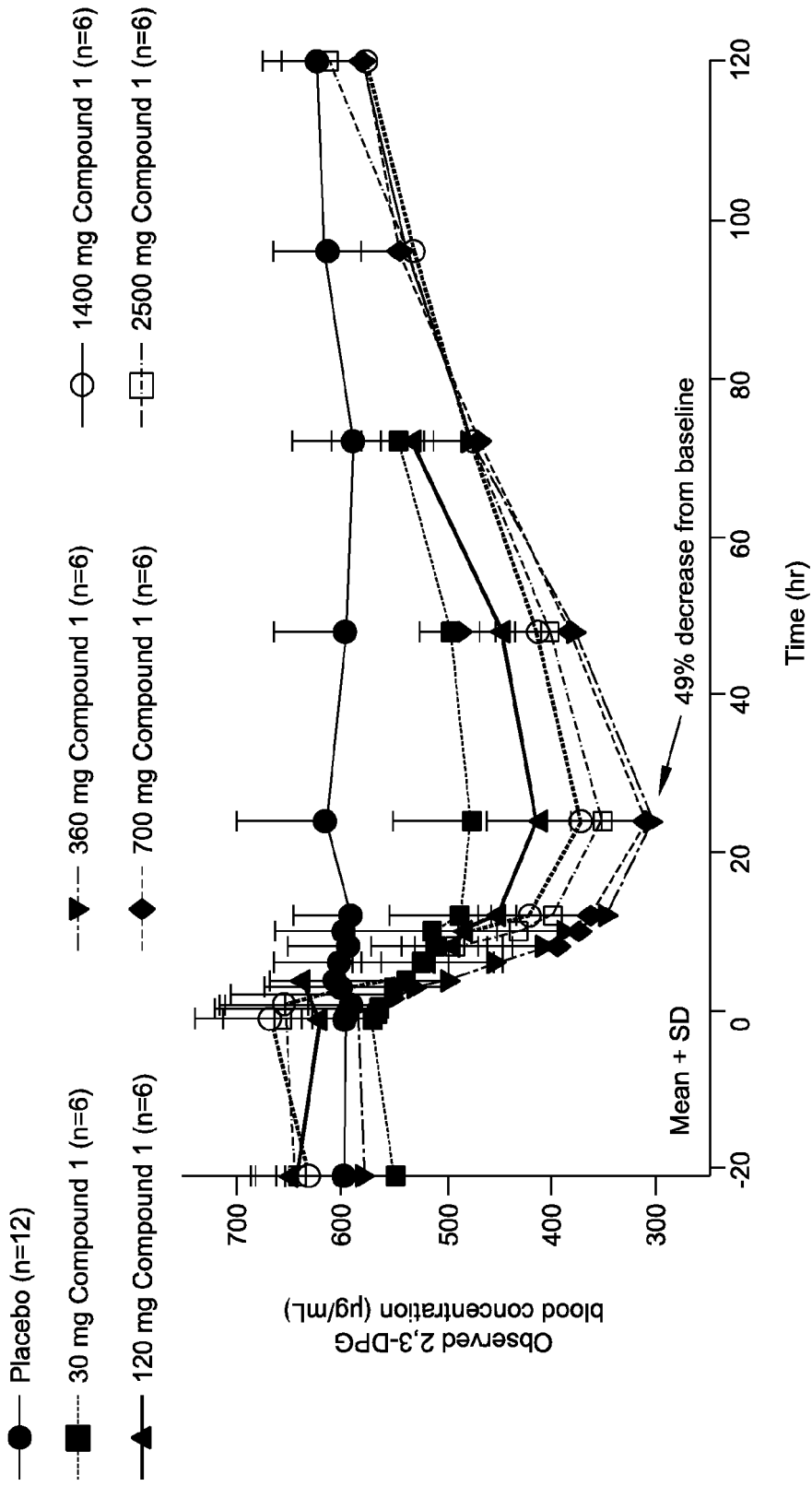


Figure 7

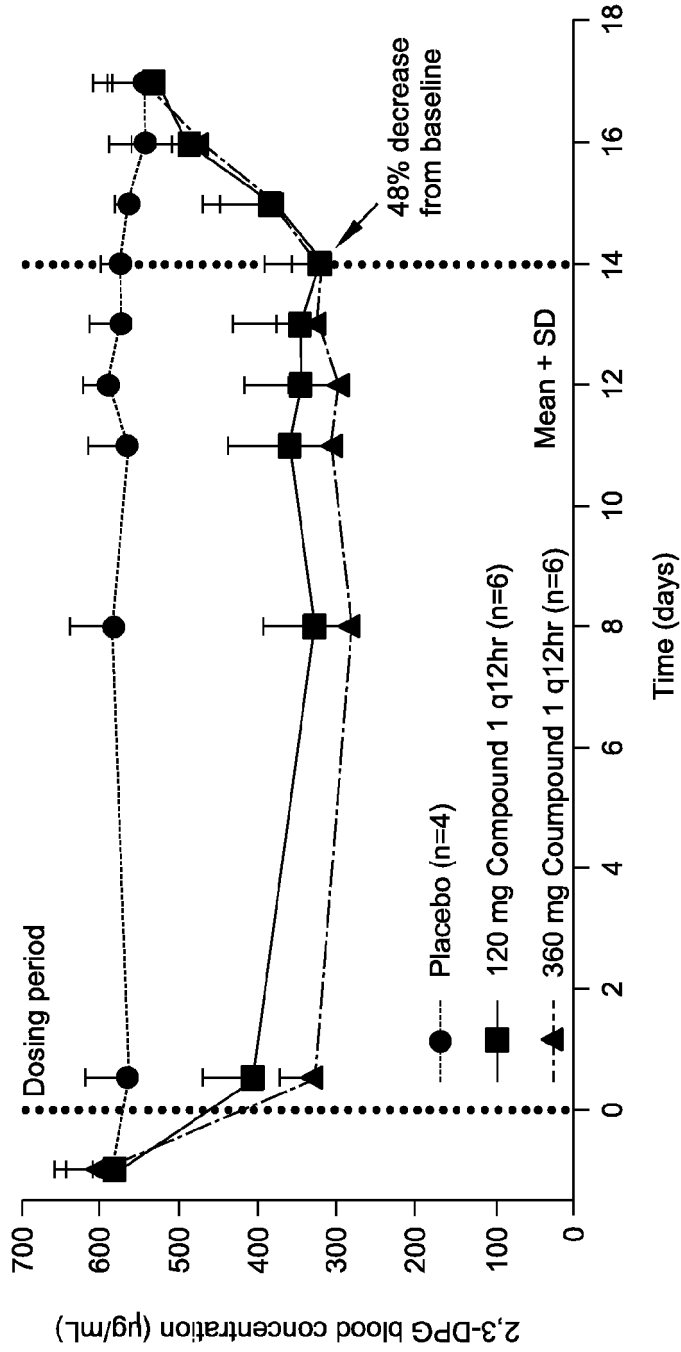


Figure 8

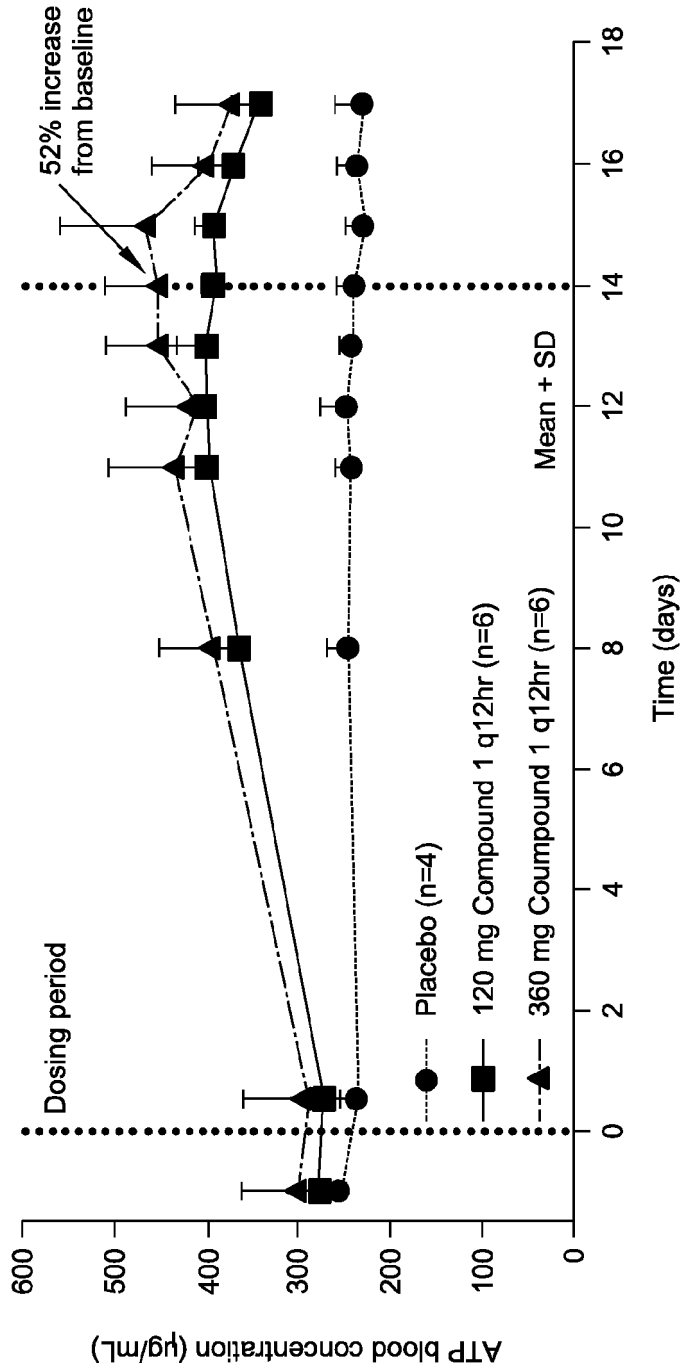
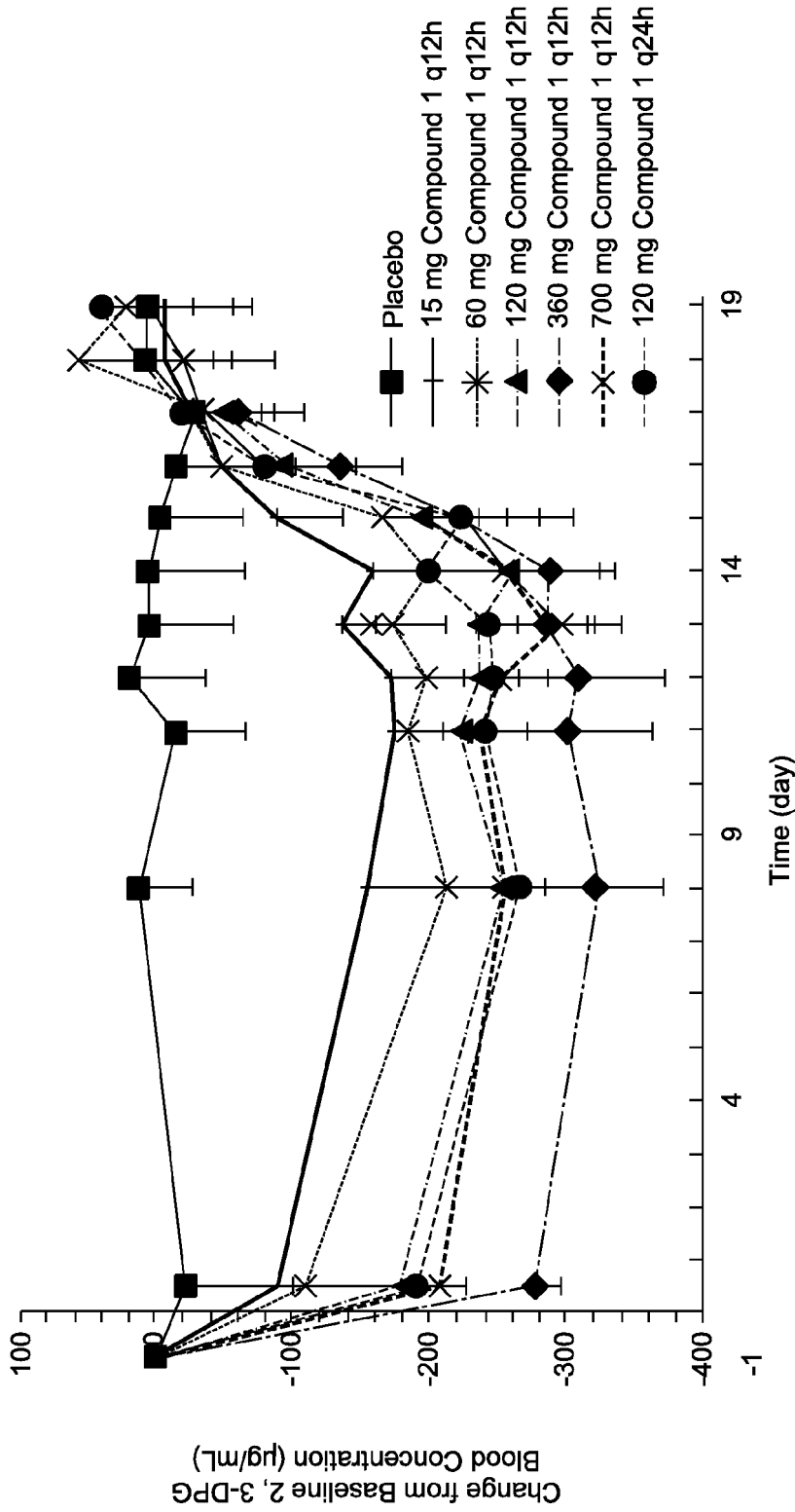


Figure 9



Change from Baseline Concentration-Time Profiles of 2, 3-DPG and ATP in Blood following Multiple Doses of Compound 1

Figure 10A

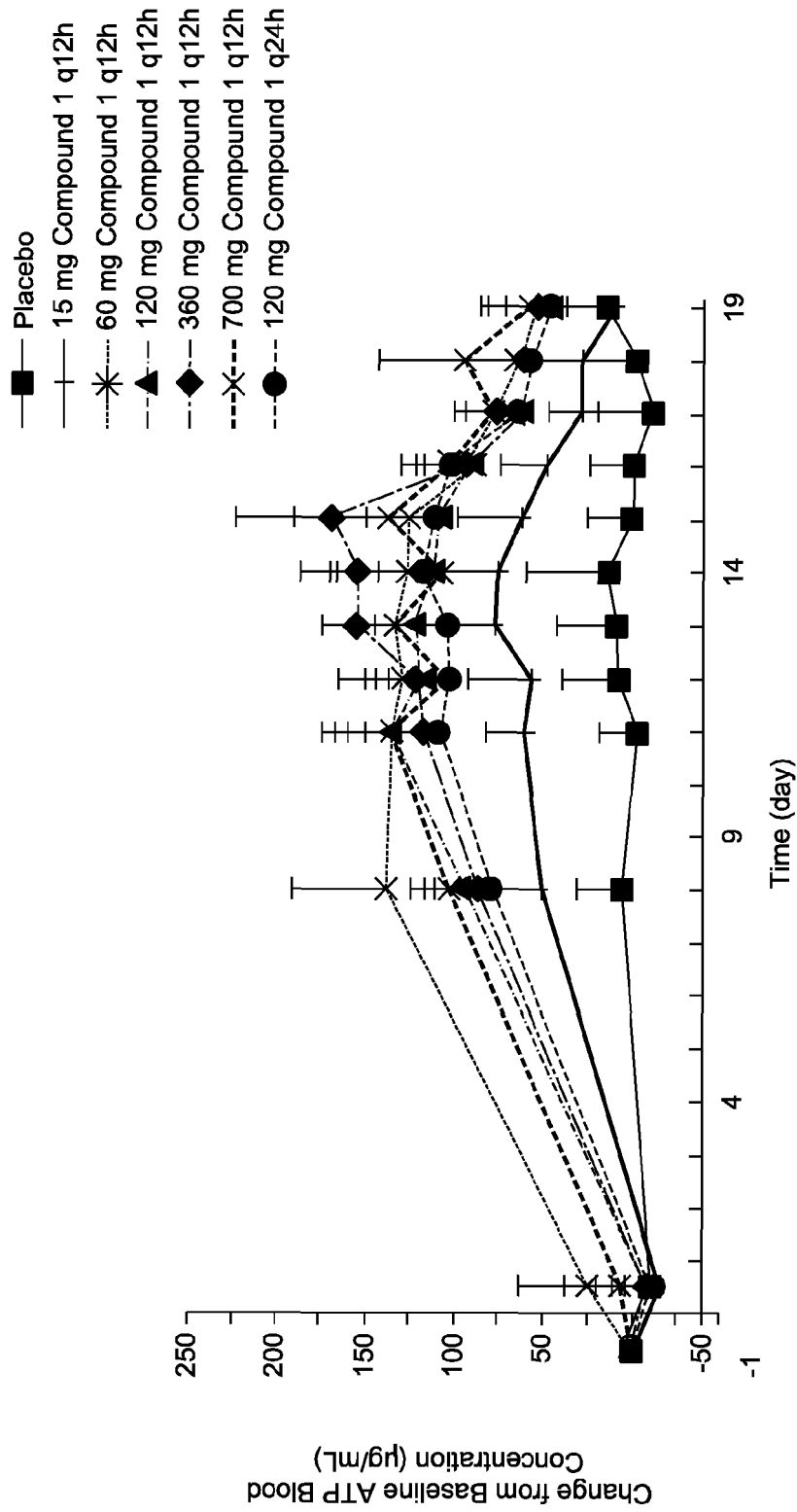


Figure 10B

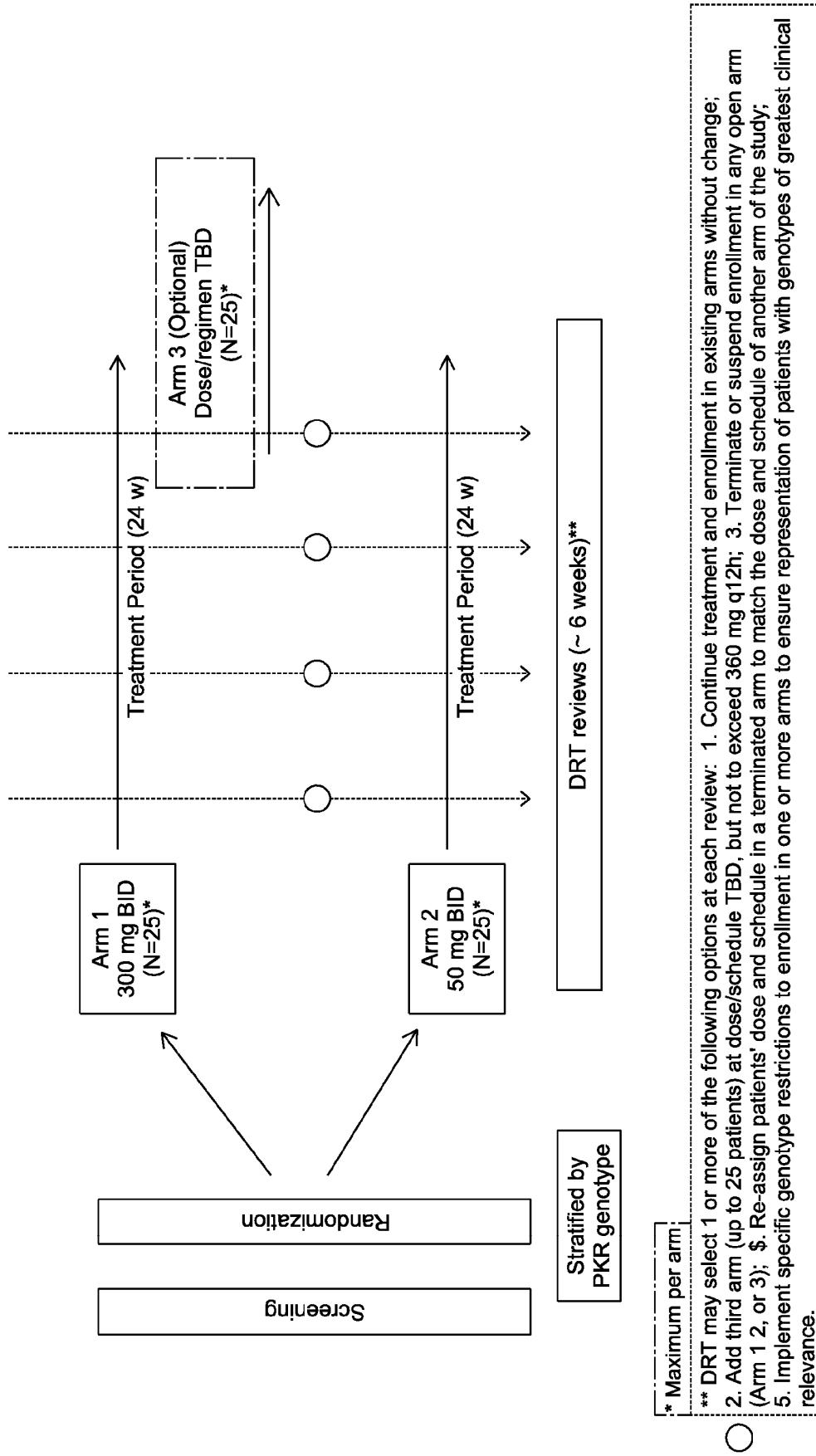


Figure 11

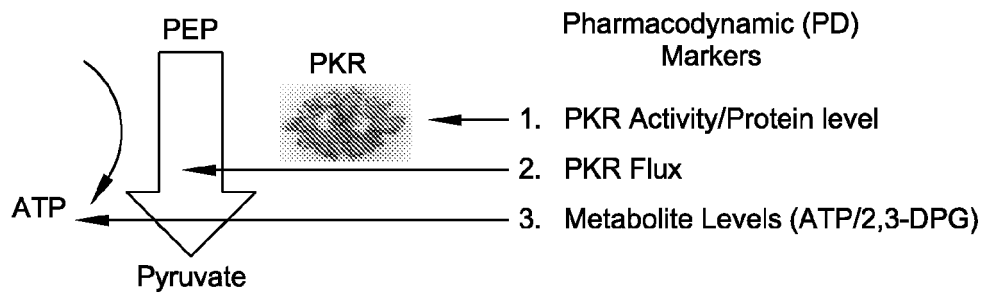


Figure 12