

ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE CITRULINA DURANTE LA CIRUGÍA**REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES DE PATENTES RELACIONADAS**

5 [01] La presente solicitud de patente reivindica prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/186 085, presentada el 29 de junio de 2015, cuya divulgación se incorpora a la presente en su totalidad.

10 CAMPO DE LA INVENCION

[02] La presente invención hace referencia, en líneas generales, al campo de mantenimiento del tono vascular pulmonar en los pacientes durante la cirugía y después de la cirugía.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION***Óxido nítrico***

20 [03] El óxido nítrico (NO) endógeno cumple una función en la regulación del tono vascular pulmonar. Nelin, et ál. *Pediatr_Res* (1994) 35: 20-24; Lipsitz, et ál. *J Pediatr Surg* (1996) 31: 137-140. Isoformas diferentes de la enzima de óxido nítrico sintasa (NOS) sintetizan el óxido nítrico. La NOS endotelial (eNOS) es una enzima
25 constitutiva responsable de la producción dependiente de calmodulina de calcio de niveles de referencia de NO. La NOS inducible (iNOS) cataliza la producción independiente de calcio de grandes cantidades de NO en respuesta a determinadas citocinas y estímulos inflamatorios. Una tercera forma de NOS es NOS neuronal (nNOS) y
30 actúa como un neurotransmisor tanto en el sistema nervioso central como periférico. Las células endoteliales generan NO endógeno a partir de arginina. Palmer, et ál. *Biochem Biophys Res Commun* (1988)

153: 1251-6; Moncada, et ál. *N Engl J Med* (1993) 329: 2002-12.

[04] El ciclo de la urea hepática cumple una función en la producción de dos precursores de óxido nítrico: arginina y citrulina.
 5 Pearson, et ál. *New England Journal of Medicine* (2001) 344: 1832-1838. Las primeras dos etapas del ciclo de la urea hepática, llevadas a cabo por la carbamil fosfato sintetasa I (CPSI) y ornitina transcarbamilasa (OTC), producen citrulina. Estas dos enzimas se ubican en la mitocondria del hígado y los intestinos, y el resto de
 10 la vía se encuentra distribuida a través del cuerpo, lo que incluye el endotelio vascular pulmonar. *Summar J Inher Metab Dis* (1988) 21(S1): 30-39. La citrulina, un aminoácido, es el primer intermedio del ciclo de la urea. Luego de que la citrulina se transporta intracelularmente a través de un transportador de membrana selectivo,
 15 las enzimas argininosuccinato sintetasa (AS) y argininosuccinato liasa (AL) la convierten rápidamente en arginina.

[05] Luego de la reacción limitante de la velocidad catalizada por CPSI, otras tres enzimas del ciclo de la urea participan en la
 20 formación de arginina (Figura 1). En la siguiente etapa del ciclo de la urea, ornitina transcarbamilasa (OTC) combina carbamil fosfato y ornitina para formar citrulina. La citrulina se transporta de la mitocondria al citoplasma. La argininosuccinato sintetasa (AS) es la primera de las enzimas del ciclo de la urea citoplasmática y combina
 25 citrulina con aspartato para formar argininosuccinato. Ver la Figura 1. La argininosuccinato liasa (AL) escinde fumarato del argininosuccinato para formar arginina. Ver la Figura 1.

Citrulina y el ciclo de la urea

30

[06] Las enzimas del ciclo de la urea, ácido argininosuccínico sintetasa (AS) y ácido argininosuccínico liase (AL), participan en la

vía de regeneración de NO en los tejidos endoteliales (Figura 1). El suministro de sustrato para esta vía de NO proviene de la producción de citrulina como parte de la función normal del ciclo de la urea.

5 [07] La arginina es un aminoácido básico sintetizado de forma predominante mediante el ciclo de la urea (Figura 1). Las concentraciones intracelulares de arginina son muchas veces mayores que las concentraciones plasmáticas en circulación, pero la función de NOS parece ser regulada por las concentraciones de arginina en
10 plasma. La teoría actual propone que este fenómeno se debe a la colocalización intracelular del transportador de arginina, CAT-1, y eNOS en la membrana plasmática. La absorción de CAT-1 de arginina en plasma se canaliza directamente en la síntesis de NO a través de eNOS, al tiempo que los almacenamientos de arginina intracelular se
15 compartimentalizan por separado y no se encuentran disponibles. Tanto la arginina como la citrulina se pueden administrar por vía oral. Sin embargo, los intestinos presentan un ciclo de urea parcialmente intacto y la arginasa convierte gran parte de la arginina de dieta en urea. En voluntarios normales, la L-citrulina oral aumenta las
20 concentraciones de arginina en circulación más que la arginina oral.

[08] La CPSI (carbamoil fosfato sintetasa I) humana es la enzima limitante de la velocidad que cataliza la primera etapa comprometida de ureagénesis en el ciclo de la urea hepática (Figura 1). Este ciclo
25 comprende el sistema del cuerpo para eliminar desechos nitrogenados producidos por el metabolismo de la proteína endógena y exógena. La CPSI es muy específica para el tejido, con función y producción localizadas en el hígado y los intestinos. La CPSI, producto de un gen nuclear, se sintetiza en el citoplasma y se transporta a la
30 mitocondria, donde se escinde en su forma monomérica de 160 kDa madura. La enzima combina amoníaco y bicarbonato con carbamil fosfato con el consumo de 2 ATP y el cofactor de n-acetil-glutamato (NAG)

necesario. Rubio, et ál. *Biochemistry* (1981) 20: 1969-1974; Rubio, et ál. *Biochemica Biophysica Acta* (1981) 659: 150-160. La CPSI madura es de naturaleza modular y contiene 2 regiones principales. Cabe destacar el dominio de unión al cofactor de NAG cerca del extremo carboxilo de la enzima. Sin la unión a NAG, la enzima permanece inerte, lo que resulta en hiperamonemia y ninguna producción de citrulina.

[09] Más de 60 mutaciones de CPSI resultan en la alteración de la función de la enzima. *Summar J Inher Metab Dis* (1988) 21(S1): 30-39. Un polimorfismo común se encuentra cerca del extremo 3' del ARNm de CPSI (45% de heterocigosidad). El análisis de secuencia de este cambio revela una transversión de C en A en la base 4332, lo que cambia el código de triplete de ACC a AAC. Esto genera una sustitución de asparagina por treonina en el aminoácido 1405 (a la que se hace referencia como T1405N). El genotipo de T1405N se asocia a la hipertensión pulmonar, un riesgo de tono vascular pulmonar elevado en lactantes y niños sometidos a corrección de sus defectos cardíacos congénitos e hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN). Pearson, et ál. *N Engl J Med* (2001) 344(24): 1832-8; Canter, et ál. *Mitochondrion* (2007) 7(3): 204-10.

[010] Al examinar los valores de arginina y citrulina con relación a los alelos de T1405N, los lactantes con el genotipo CC tuvieron niveles de arginina y citrulina menores que los lactantes con el genotipo AA. Solo los valores de arginina alcanzaron significancia estadística con un valor p de 0.011. Los lactantes heterocigotos (genotipo AC) tuvieron niveles intermedios de arginina y citrulina, los que no fueron estadísticamente diferentes de aquellos de cualquier grupo homocigoto. Ver la Figura 2.

[011] La CPSI es la etapa limitante de la velocidad en el ciclo de la

urea, pero los polimorfismos en otras enzimas del ciclo de la urea también pueden afectar el flujo del ciclo de la urea y la disponibilidad de arginina. Por ejemplo, los polimorfismos en las enzimas OTC, AS, AL y eNOS, tanto independientemente como en combinación con T1405N de CPSI, pueden afectar el tono vascular pulmonar postoperatorio en lactantes y niños que se someten a cirugía de defecto cardíaco congénito.

[012] El genotipo de T1405N de CPSI afecta los resultados pulmonares postoperatorios, tales como hipertensión pulmonar grave, duración de ventilación mecánica y duración de estadía en la UCI. Por lo tanto, se puede esperar que el complemento de los niveles de citrulina en circulación de acuerdo con los métodos descritos en la presente mejore los resultados pulmonares postoperatorios para un paciente con el genotipo de T1405N de CPSI que se somete a cirugía cardíaca al mantener el tono vascular pulmonar postoperatorio.

Tono vascular pulmonar

[013] El mayor tono vascular pulmonar postoperatorio (PVT) es un aumento de la contracción del músculo liso en las paredes del vaso. El mayor PVT es una complicación común luego de reparar diversos defectos cardíacos congénitos. Steinhorn, et ál. *Artificial Organs* (1999) 23: 970-974; Schulze-Neick, et ál. *J_Thorac Cardiovasc Surg* (2001) 121: 1033-1039. Se cree que la patofisiología de mayor PVT postoperatorio está involucrada en la disfunción celular endotelial vascular pulmonar. Steinhorn, et ál. *Artificial Organs* (1999) 23: 970-974. Se han llevado a cabo estudios limitados sobre los efectos que tiene el *bypass* cardiopulmonar (CPB) en la función endotelial pulmonar. En un estudio de 10 lactantes que se someten a CPB para la reparación de defectos congénitos, el complemento del precursor de NO, arginina, mejoró la disfunción endotelial pulmonar. Schulze-

Neick, et ál. *Circulation* (1999) 100: 749-755. En estudios con animales, se reduce la producción de células endoteliales de NO luego del *bypass* cardiopulmonar, pero sigue siendo un factor de control fundamental con respecto al tono vasomotor pulmonar. Kirshbom, et ál.

5 *J thorac Cardiovasc Surg* (1996) 111: 1248-1256.

[014] El mayor tono vascular pulmonar (por ejemplo, contracción excesiva) se asocia a malos resultados luego de procedimientos quirúrgicos cardíacos específicos para defectos cardíacos congénitos.

10 Steinhorn, et ál. *Artificial_Organs* (1999) 23: 970-974; Russell, et ál. *Anesthesia and__Analgesia* 1998; 87:46-51; Yagahi, et ál. *Artificial Organs* 1998; 22:886-891; Zobel, et ál. *J. of Cardiovascular Surgery* 1998; 39:79-86; Bandla, et ál. *Chest* 1999; 116: 740-747; Gamillscheg, et ál. *J. of Cardiovascular Surgery* 1997; 15 113:435-442; Petrossian, et ál. *J. of Cardiovascular Surgery* 1999; 117:688-695; Amodeo, et ál. *J. of Cardiovascular__Surgery* 1997; 114:1020-1031; Gentles, et ál. *J. of__Cardiovascular Surgery* 1997; 114:376-391; Freeman, et ál. *Pediatr Cardiol* 1995; 16:297-300; Luciani, et ál. *Ann Thorac__Surg* 1996; 61:800-805; Nakajima, et ál. 20 *Pediatr Cardiol* 1996; 17:104-107; Swoonswang, et ál. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:753-757; Weinstein, et ál. *Circulation* 1999; 100S: II-167-II-170; Ishino, et ál. *J. of Cardiovascular Surgery* 1999; 117:920-930; Adatia, et ál. *J. of Cardiovascular Surgery* 1996; 112:1403-1405; Mosca, et ál. *J. of Cardiovascular__Surgery* 2000; 25 119:1110-1118. En cierta medida, el tipo de defecto cardíaco determina el riesgo de aumento de tono vascular pulmonar.

[015] **Reparación de AVSD y VSD:** Los pacientes de riesgo más elevado de hipertensión pulmonar postoperatoria tienen defectos cardíacos asociados al flujo sanguíneo pulmonar excesivo, tal como un defecto del tabique auriculoventricular (AVSD) o un defecto del tabique interventricular (VSD) no restringido grande. El exceso de 30

circulación pulmonar sostenido puede causar hipertrofia e hiperreactividad del músculo liso vascular pulmonar. Antes de la cirugía, estos pacientes suelen padecer insuficiencia cardíaca congestiva y poco aumento de peso. La reparación quirúrgica se programa tan pronto como sea posible para los neonatos con el fin de reducir esta complicación postoperatoria.

[016] **Procedimientos de Glenn bidireccional y Fontan modificado:** Los pacientes con lesiones de ventrículo únicas requieren procedimientos quirúrgicos cuyo éxito depende del mantenimiento del bajo tono vascular pulmonar postoperatorio. La corrección en etapas de una única lesión de ventrículo requiere una serie de tres procedimientos quirúrgicos destinados a separar las circulaciones pulmonares y sistémicas. El primero de estos procedimientos se suele llevar a cabo en el período neonatal y es una derivación de Blalock-Taussig para aquellos pacientes con un ventrículo derecho hipoplásico o una etapa 1 de procedimiento de Norwood para aquellos pacientes con síndrome del corazón izquierdo hipoplásico. La segunda cirugía es una derivación de Glenn bidireccional en la que se desvía el flujo de la vena cava superior (SVC) directamente a la arteria pulmonar. La tercera y última etapa es un procedimiento de Fontan modificado en el que se desvía el flujo de la vena cava inferior (IVC) a la arteria pulmonar, de forma que completa la separación de las circulaciones pulmonares y sistémicas. Con los procedimientos de Glenn y Fontan, el flujo sanguíneo pulmonar es completamente pasivo y depende de un gradiente de presión adecuado entre el sistema venoso (presión SVC e IVC) y la presión de la arteria pulmonar (PA). Cualquier elevación del tono vascular pulmonar en el período postoperatorio inmediato puede llevar a una reducción del flujo sanguíneo pulmonar y una posterior reducción del rendimiento cardíaco. A largo plazo, el tono vascular pulmonar elevado luego de estos procedimientos puede llevar a efusiones pleurales persistentes, requisito de prolongación para

tubos de drenaje en pleura o mediastino, ventilación prolongada y estadías prolongadas en la UCI. Petrossian, et ál. *J. of Cardiovascular Surgery* 1999; 117:688-695; Amodeo, et ál. *J. of Cardiovascular Surgery* 1997; 114:1020-1031; Gentles, et ál. *J. of Cardiovascular Surgery* 1997; 114:376-391.

[017] **Procedimiento de cambio arterial:** La transposición de las grandes arterias (TGA) es una lesión cardíaca compleja que requiere corrección quirúrgica en el período neonatal inmediato. El momento del procedimiento de transposición arterial para la corrección de la TGA toma especialmente en cuenta problemas del tono vascular pulmonar. Freeman, et ál. *Pediatr Cardiol* 1995; 16:297-300; Luciani, et ál. *Ann Thorac Surg* 1996; 61:800-805; Nakajima, et ál. *Pediatr Cardiol* 1996; 17:104-107; Swoonswang, et ál. *J AmColl Cardiol* 1998; 32:753-757. Habitualmente, la cirugía no se lleva a cabo hasta los 5-7 días de edad, cuando el tono vascular pulmonar perinatal se haya reducido parcialmente. Debido a que el ventrículo derecho es el ventrículo sistémico antes de la corrección quirúrgica, se suelen tolerar bien las elevaciones postoperatorias en la resistencia vascular pulmonar y la presión arterial pulmonar no se suele medir. Sin embargo, si el tono vascular pulmonar postoperatorio aumenta, esto puede explicar parcialmente por qué algunos lactantes con anatomía favorable y tiempos de *bypass* reducidos igualmente tienen un período postoperatorio complicado.

25

[018] El tono vascular pulmonar puede ser un problema perioperatorio importante, incluso para los pacientes que no se encuentran en riesgo de hipertensión arterial pulmonar. Los protocolos para mantener el tono vascular pulmonar postoperatorio (es decir, reducir o eliminar cualquier aumento de PVT) pueden ser útiles en la reducción de la necesidad de ventilación mecánica prolongada, estadía en la UCI y hospitalización. Por lo tanto, es necesario en la técnica un sistema

30

más eficiente para el mantenimiento del tono vascular pulmonar en un paciente durante y después de la cirugía.

RESUMEN DE DIVERSAS MODALIDADES DE LA INVENCION

5

[019] La presente invención provee un método para mantener el tono vascular pulmonar en un paciente que se somete a cirugía por un defecto cardíaco, donde el método comprende tres etapas de (a) administración de citrulina al paciente en el inicio de la cirugía, 10 (b) administración de citrulina al paciente durante la cirugía y (c) infusión de citrulina en el paciente luego de la cirugía. Este método es particularmente beneficioso cuando el defecto cardíaco se asocia al flujo sanguíneo pulmonar excesivo y/o cuando la cirugía requiere *bypass* cardiopulmonar. Este método se puede utilizar cuando el 15 defecto cardíaco es un defecto del tabique interauricular y, en particular, cuando el defecto del tabique interauricular es un defecto del tabique arterial grande. Este método se puede utilizar cuando el defecto cardíaco es un defecto del tabique interventricular, en particular cuando el defecto del tabique 20 interventricular es un defecto del tabique interventricular no restringido grande. Este método se puede utilizar cuando el defecto cardíaco es una única lesión ventricular, tal como una única lesión ventricular reparada mediante procedimientos de Glenn o Fontan. Este método se puede utilizar cuando la cirugía es un procedimiento de 25 transposición arterial.

[020] En muchas modalidades del método de la presente invención, el bolo de citrulina al inicio de la cirugía es de alrededor de 100-300 mg/kg de citrulina, preferentemente de alrededor de 150 mg/kg de 30 citrulina. En muchas modalidades del método de la presente invención, la citrulina administrada durante la cirugía se agrega a la filtración. En algunas modalidades preferidas, la citrulina

administrada durante la cirugía se agrega al fluido de reemplazo de hemoconcentración. La citrulina agregada durante la cirugía se puede agregar a alrededor de 100-300 $\mu\text{mol/L}$, preferentemente, la citrulina se agregó a alrededor de 200 $\mu\text{mol/L}$. En muchas modalidades del método de la presente invención, un bolo de citrulina también se administra alrededor de 15-45 minutos luego de la cirugía, preferentemente alrededor de 30 minutos luego de la cirugía. En modalidades particulares de la presente invención, un bolo de citrulina se puede administrar alrededor de 30 minutos luego de la extubación del *bypass* cardiopulmonar (CPB). En cualquiera de estas modalidades, el bolo de citrulina luego de la cirugía puede ser de alrededor de 20 mg de citrulina/kg. Cuando se administra la infusión de citrulina al paciente luego de la cirugía de acuerdo con varias modalidades de la presente invención, la citrulina se puede administrar con infusión al paciente durante alrededor de 48 horas. En muchas modalidades, la infusión es de alrededor de 9 mg/kg/hora.

[021] El método de la presente invención provee citrulina para la administración perioperatoria y, normalmente, la citrulina se administra por vía intravenosa. En la mayoría de las modalidades de la presente invención, el nivel de citrulina en plasma del paciente quirúrgico se mantiene por encima de 30 $\mu\text{mol/L}$. Preferentemente, el nivel de citrulina en plasma del paciente se eleva por encima de alrededor de 37 $\mu\text{mol/L}$, más preferentemente, el nivel de citrulina en plasma del paciente se eleva por encima de alrededor de 100 $\mu\text{mol/L}$. En modalidades particulares, el nivel de citrulina en plasma del paciente se eleva por encima de alrededor de 100 $\mu\text{mol/L}$ después de la cirugía, preferentemente, el nivel de citrulina en plasma del paciente se eleva a alrededor de 100-200 $\mu\text{mol/L}$ después de la cirugía y el nivel de citrulina en plasma del paciente se puede elevar hasta 48 horas después de la cirugía.

[022] Los pacientes quirúrgicos tratados de acuerdo con el método de la presente invención pueden tener menos alrededor de 6 años, incluso pueden tener menos de alrededor de 10 días. En modalidades particulares, el paciente tratado de acuerdo con la presente invención se encuentra en riesgo de hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN).

[023] En una modalidad particular, la presente invención provee un método para mantener el tono vascular pulmonar en un paciente que se somete a cirugía para un defecto cardíaco que comprende: (a) administración de alrededor de 150 mg/kg de citrulina al paciente en el inicio de la cirugía, (b) administración de citrulina al paciente a 200 μ mol/L hasta el fluido de filtración y hemoconcentración utilizado durante la cirugía y (c) infusión de 9 mg/kg/hora de citrulina en el paciente luego de la cirugía durante alrededor de 4-48 horas. En una modalidad alternativa, la presente invención provee un método para mantener los niveles de citrulina en plasma en un paciente que se somete a cirugía para un defecto cardíaco que comprende: (a) administración de alrededor de 150 mg/kg de citrulina al paciente en el inicio de la cirugía, (b) administración de citrulina al paciente a alrededor de 200 μ mol/L hasta el fluido de filtración y hemoconcentración utilizado durante la cirugía y (c) infusión de alrededor de 9 mg/kg/hora de citrulina en el paciente luego de la cirugía durante alrededor de 4-48 horas.

Breve descripción de las figuras

[024] La **Figura 1** ilustra el ciclo de la urea hepática.

[025] La **Figura 2** ilustra el efecto del genotipo de los polimorfismos de CPSI (CC, AC y AA) en los niveles de citrulina y arginina en plasma. Estos son polimorfismos de CPSI que resultan en el genotipo

de T1405N.

[026] La **Figura 3** ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de protocolo para mantener el tono vascular pulmonar postoperatorio en la cirugía cardíaca.

[027] La **Figura 4** ilustra la reducción de NO y precursores de NO, arginina y citrulina, en pacientes con hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN).

10

[028] La **Figura 5** ilustra la reducción de los niveles de arginina en plasma a partir del *bypass* cardiopulmonar (*bypass* CP).

[029] Las **Figuras 6A-B** ilustran la reducción de los niveles de citrulina en plasma y suero a partir del *bypass* cardiopulmonar.

[030] La **Figura 7** ilustra la reducción de los niveles de óxido nítrico (NO) en plasma a partir del *bypass* cardiopulmonar.

[031] La **Figura 8** ilustra la reducción de los niveles de arginina en pacientes con y sin aumento de tono vascular pulmonar (PVT- y PVT+) antes de la cirugía, después de la cirugía y 12, 24 y 48 horas después de la cirugía.

[032] Las **Figuras 9A-C** ilustran los niveles de citrulina en plasma en pacientes con administración de un bolo de citrulina y sin ella. Los pacientes recibieron una dosis de citrulina (50, 100 o 150 mg/kg) antes de la cirugía y después de la cirugía.

[033] La **Figura 10** ilustra un modelo PK y parámetros PK.

[034] La **Figura 11A** ilustra los niveles citrulina promedio en

lactantes con la administración de citrulina por vía intravenosa (citrulina IV) en el transcurso de 60 horas o sin ella.

[035] La **Figura 11B** ilustra los niveles arginina promedio en
5 lactantes con la administración de citrulina por vía intravenosa (citrulina IV) en el transcurso de 60 horas o sin ella.

[036] La **Figura 12** ilustra los niveles de citrulina en plasma en
10 pacientes a los que se les administra una dosis de citrulina (50, 100 o 150 mg/kg) después de la cirugía en el transcurso de 12 horas.

[037] La **Figura 13** ilustra los niveles de citrulina en plasma en
15 pacientes a los que se les administra una dosis de citrulina (50, 100 o 150 mg/kg) después de la cirugía combinada con una infusión intravenosa de citrulina (9 mg/kg/hora) en el transcurso de 16 horas.

[038] La **Figura 14A** ilustra los niveles de citrulina promedio en lactantes en el transcurso de 60 horas.

20 [039] La **Figura 14B** ilustra los niveles de citrulina de nueve lactantes individuales en el transcurso de 60 horas.

[040] La **Figura 15** ilustra la duración de la ventilación postoperatoria con dosis diferentes de citrulina.

25

[041] La **Figura 16** ilustra el efecto de citrulina en el rendimiento respiratorio en la cirugía de reparación de defectos cardíacos congénitos.

30 [042] La **Figura 17** ilustra el índice inotrópico promedio de pacientes tratados que reciben citrulina (citrulina) contra aquellos sin citrulina (placebo).

[043] La **Figura 18A** ilustra la presión sanguínea sistólica y diastólica de pacientes que reciben citrulina (citrulina) contra aquellos sin citrulina (placebo). No hubo cambios significativos en la presión sanguínea sistólica y diastólica de pacientes que reciben citrulina.

[044] La **Figura 18B** ilustra la presión arterial promedio de pacientes que reciben citrulina (citrulina) contra aquellos sin citrulina (placebo). No hubo cambios significativos en la presión arterial promedio de pacientes que reciben citrulina.

[045] La **Figura 19** ilustra la mediana de niveles de citrulina en plasma en pacientes que reciben el bolo de citrulina preoperatorio, perioperatorio y postoperatorio.

[046] La **Figura 20** es el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de la duración de la ventilación mecánica invasiva desde la finalización de la cirugía hasta la última extubación. (Excluye la reintubación, censurada.) Los pacientes que reciben citrulina mostraron una duración reducida de ventilación mecánica. Las diferencias en la ventilación mecánica fueron estadísticamente significativas mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon ($p = 0.0222$) y mediante el análisis ANOVA ($p = 0.0317$).

[047] La **Figura 21** ilustra un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de la extensión de tiempo con agentes inotrópicos. Análisis univariado (valor p): prueba de suma de rangos de Wilcoxon (0.0727), prueba t (0.097).

[048] La **Figura 22** ilustra un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de la extensión de tiempo con agentes inotrópicos. Análisis

univariado (valor p): prueba de suma de rangos de Wilcoxon (0.0727), prueba t (0.0987).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODALIDADES PREFERIDAS

5

[049] La invención provee un método para mantener el tono vascular pulmonar (por ejemplo, evitar PVT excesivo) durante la cirugía y después de la cirugía al mantener los niveles de citrulina en plasma. Se puede lograr un nivel de citrulina en plasma perioperatorio sostenido $>100 \mu\text{mol/L}$ hasta 48 horas después de la cirugía mediante los métodos descritos en la presente. De manera sorprendente, los inventores descubrieron que el complemento de citrulina perioperatoria intravenosa aumenta los niveles de metabolitos de óxido nítrico (NO) y arginina en plasma postoperatorios y previene el aumento del tono vascular pulmonar postoperatorio, lo que lleva a una reducción de la duración de la ventilación mecánica invasiva postoperatoria. Además, de forma sorprendente, los inventores descubrieron que un nivel de citrulina en plasma perioperatorio sostenido de al menos $100 \mu\text{mol/L}$ hasta 48 horas después de la cirugía reduce o previene las elevaciones postoperatorias en el tono vascular pulmonar y acorta la duración de la ventilación mecánica postoperatoria. La mejora del tono pulmonar postoperatorio del paciente reduce costos y libera personal y equipamiento para otros usos.

25

[050] Los métodos descritos en la presente pueden utilizar L-citrulina intravenosa para la prevención de secuelas clínicas de lesiones pulmonares agudas inducidas por el *bypass* cardiopulmonar (CPB) en pacientes pediátricos que se someten a cirugía por defectos cardíacos congénitos. El *bypass* cardiopulmonar causa una respuesta inflamatoria sistémica caracterizada clínicamente por el compromiso agudo de la función cardiovascular y pulmonar. Apostolakis et ál.

30

(2010) *Journal of Cardiac Surgery* 25(1): 47-55; Huffmyer y Groves (2015) «Pulmonary Complications of Cardiopulmonary Bypass». *Best Practice & Research Clinical Anesthesiology*. Sin embargo, por una cantidad de razones médicas y fisiológicas, los pacientes pediátricos sometidos a CPB durante la reparación quirúrgica de defectos cardíacos congénitos son más susceptibles a esta cascada y a un riesgo médico mayor por su causa que los pacientes adultos. Kozik y Tweddell (2006) *The Annals of Thoracic Surgery* 81(6): S2347-S2354; Shekerdemian (2009) *Heart* 95(15): 1286-1296; Schure (2010) *Southern African Journal of Anesthesia and Analgesia* 16(1): 46-51. Es posible utilizar la reducción de manifestaciones clave de lesiones pulmonares inducidas por CPB agudas, a saber, la necesidad postoperatoria de ventilación mecánica y terapia con agentes inotrópicos, para medir la efectividad clínica.

Lesión inducida por bypass cardiopulmonar

[051] Una cantidad de factores indican que los pulmones se encuentran en riesgo de lesiones durante el CPB. El principal entre estos es la activación superficial de neutrófilos y otros leucocitos, complemento y citocinas (proinflamatorias y antiinflamatorias), entre otros, y una cascada inflamatoria sistémica asociada. Apostolakis et ál. (2010) *Journal of Cardiac Surgery* 25(1): 47-55; Schure (2010) *Southern African Journal of Anesthesia and Analgesia* 16(1): 46-51. El grado de daño del pulmón por la respuesta inflamatoria mediada por la activación por contacto de leucocitos durante la circulación extracorpórea puede variar en gravedad, de cambios microscópicos sin consecuencia clínica alguna a un síndrome de filtración capilar o, en el peor de los casos, insuficiencia respiratoria aguda.

[052] La lesión pulmonar se manifiesta de varias maneras y puede implicar tanto tejidos de pulmón vascular como parenquimal. Los

efectos parenquimales del CPB se reflejan en alteraciones en el funcionamiento pulmonar, más comúnmente, con relación a un aumento de agua en los pulmones. El impacto de esto en el paciente es un requisito para el aumento del soporte de respiración y una reducción de la capacidad de los pulmones para cumplir con su función en el intercambio de gas. Los efectos vasculares se manifiestan en cambios en la resistencia vascular pulmonar, lo que a su vez afecta la función del ventrículo derecho. Esta afección constituye, de hecho, la hipertensión arterial pulmonar. Los pulmones se encuentran en una posición particular en la circulación y, por lo tanto, pueden ser vulnerables a distintos mecanismos de lesión. Los leucocitos en circulación que producen mediadores inflamatorios luego del contacto con superficies en el aparato de CPB o mediante el daño directo causado por el equipamiento de CPB son responsables de solo parte del daño inflamatorio que puede ocurrir en el pulmón. Clark (2006) *Perfusion* 21(4): 225-228. El pulmón también es una fuente importante de células inflamatorias, así como una diana para el daño causado por esas mismas células. Las consecuencias de los efectos mecánicos e inflamatorios en el pulmón son la reducción de la capacidad residual funcional, reducción del cumplimiento y deterioro del intercambio de gas. Estos cambios se asocian en última instancia a mayor resistencia vascular pulmonar y presión arterial pulmonar.

[053] Los factores de inflamación y mecánicos no son los únicos factores que causan el deterioro de la función pulmonar con relación al *bypass* cardiopulmonar (CPB). Cuando se somete un paciente a *bypass*, los pulmones sufren una reducción repentina y significativa de la perfusión a través de la arteria pulmonar. Durante el *bypass* total, los pulmones solo reciben flujo de nutrientes de la circulación arterial bronquial. Este efecto isquémico del CPB se suma a su efecto inflamatorio para producir la disfunción pulmonar clínica. Parece que el CPB de bajo flujo produce peores lesiones

pulmonares que el paro circulatorio, lo que sugiere que la interacción entre los componentes inflamatorios e isquémicos es compleja. Tanto los factores inflamatorios como isquémicos dañan el endotelio pulmonar.

5

[054] La lesión pulmonar inducida por CPB lleva a problemas cardiopulmonares significativos. La respuesta inflamatoria lleva a la constricción de la vasculatura pulmonar y sistémica. La constricción lleva a una mayor carga de trabajo del ventrículo derecho y el
10 ventrículo izquierdo. La respuesta inflamatoria también lleva a un edema pulmonar y al deterioro del cumplimiento pulmonar y la función pulmonar postoperatoria. Los tratamientos estándares para estas complicaciones postoperatorias incluyen ventilación mecánica hasta que la función pulmonar vuelva a la normalidad y soporte inotrópico
15 hasta que el tono vascular sistémico y pulmonar vuelva a la normalidad, los que, finalmente, reducen la carga de trabajo del ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo. La ventilación mecánica y el soporte inotrópico son terapias que, por lo tanto, pueden ser biomarcadores eficaces de lesiones pulmonares inducidas por el CPB
20 agudas. Además, la ventilación mecánica prolongada puede llevar algunas veces a otras morbilidades que incluyen lesiones pulmonares asociadas al respirador, neumonía asociada al respirador (VAP), infecciones de torrente sanguíneo asociadas a la línea central (CLABSI) y estadías en la unidad de cuidados intensivos incluso más
25 extensas. La prevención de lesiones pulmonares asociadas a CPB agudas y sus secuelas es, por lo tanto, una meta terapéutica deseable.

Pacientes con CHD pediátricos

30 [055] Los niños que se someten a cirugía por defectos cardíacos congénitos son especialmente susceptibles a desarrollar una lesión pulmonar aguda inducida por CPB debido a diferencias dependientes de

la edad en la respuesta inflamatoria y la sensibilidad elevada de sus sistemas orgánicos inmaduros a lesiones, así como también diferencias distintivas entre CPB pediátrico y de adulto. Kozik y Tweddell (2006) *The Annals of Thoracic Surgery* 81(6): S2347–S2354. En particular, afecta a neonatos y lactantes debido al tamaño de circuito extracorpóreo relativamente grande, la sensibilización sanguínea y la necesidad de aumento de velocidades de flujo que resultan en una exposición mayor de la sangre a la superficie externa. Schure (2010) *Southern African Journal of Anesthesia and Analgesia* 16(1): 46–51.

10

[056] Para la cirugía cardíaca congénita, el circuito extracorpóreo se puede ajustar a un amplio rango de grupos etarios y variaciones de tamaños, de lactantes prematuros de 1.5 kg a adolescentes o adultos de >100 kg. Los lactantes y niños tienen volúmenes de sangre en circulación más pequeños, tasas de consumo de oxígeno más elevadas y, usualmente, lechos vasculares pulmonares muy reactivos. Además, los recién nacidos y lactantes tienen termorregulación lábil y sistemas orgánicos inmaduros con múltiples implicaciones para la tolerancia isquémica y la respuesta inflamatoria. Muchas reparaciones complejas requieren un campo de operación sin sangre, el que puede ser difícil de conseguir en presencia de derivaciones intracardiáticas o extracardiáticas, colaterales aortopulmonares o el aumento de otro modo del regreso venoso pulmonar. Schure (2010) *Southern African Journal of Anesthesia and Analgesia* 16(1): 46–51

25

[057] Las diferencias entre CPB de adulto y pediátrico se ilustran en la

30

[058] Tabla 1: Visión general en forma tabular de las diferencias entre CPB pediátrico y de adulto (Schure 2010)

	Parámetro	Paciente adulto	Paciente pediátrico
5	Volumen de sangre estimado	65 ml/kg (4-5 litros por 70 kg)	< 10 kg: 85 ml/kg (285 ml por 3 kg)

10	Efectos de dilución en volumen de sangre	25 - 33%	100 - 200%
	Adición de sangre entera o glóbulos rojos empaquetados al agente de sensibilización	Rara vez	A menudo
	Consumo de oxígeno	2-3 ml/kg/min	6-8 ml/kg/min
15	Flujo de CPB completo	50-75 ml/kg/min	150-200 ml/kg/min por < 3 kg
	Temperatura de CPB mínima	Rara vez < 25-32°C	Comúnmente 15- 20°C
20	Uso de paro circulatorio total o perfusión de bajo flujo regional	Raro:	Común:
	Presiones de perfusión	50-80 mmHg	20-50 mmHg
	Gestión de ácido base	Estad. alfa principal.	Estad. alfa y/o estad. pH
25	PaCO2 medida	30-45 mmHg	20-80 mmHg
	Hipoglucemia por regulación de glucosa	Rara vez (lesión hepática importante)	Común, almac. reducidos
30	Hiperoglucemia	Común, tratado con insulina	Menos común, riesgo de aumento de hipoglucemia

[059] Con la posible excepción de casos secundarios de ASD, en los que la recuperación es relativa y consistentemente potente, hasta el momento no existe característica de paciente o biomarcador conocido entre los pacientes con CHD pediátricos vinculados a la probabilidad de ALI inducida por CPB clínicamente significativa. Esto parece ocurrir en aproximadamente 1/3 de cirugías de CHD pediátricos. Russell y Zwass (1998) *Anesthesia & Analgesia* 16(1): 25-27.

[060] El estado funcional y estructural del lecho vascular pulmonar cumple una función fundamental en la presentación y el rendimiento de los niños con enfermedad cardiovascular congénita. Sin embargo, es en el período postoperatorio inmediato que estos pacientes pediátricos son más vulnerables a lesión pulmonar aguda inducida por CPB. La lesión pulmonar aguda inducida por CPB representa una interacción compleja entre la afección preoperatoria del paciente (cabe destacar la edad al momento de la reparación, tipo de lesión y presencia de un síndrome) y la alteración inevitable en el medio de péptido endócrino y vasoactivo que resulta de la cirugía cardíaca. Los factores importantes que llevan a una mejor vasoconstricción son el *bypass* cardiopulmonar, hipotermia y paro circulatorio con algún grado de isquemia asociada. Las lesiones cardíacas residuales y las secuelas de la respuesta de estrés, hipoxia, metabólica y acidosis respiratoria pueden contribuir a desequilibrios adicionales que favorecen la vasoconstricción pulmonar. Muchas de las manifestaciones de lesiones pulmonares agudas asociadas al CPB se pueden explicar total o parcialmente mediante la disfunción endotelial, lo que provee de una vez una posible hipótesis unificadora, así como también una posible diana terapéutica. La lesión pulmonar aguda asociada al CPB también puede llevar a secuelas cardíacas adversas importantes. La respuesta inflamatoria luego de la cirugía por CHD se asocia comúnmente a la interacción ventricular-vascular anómala, con vasoconstricción sistémica y poscarga elevada, así como también con

lesión de miocardio con deterioro de función sistólica y diastólica. En una proporción de pacientes, estas manifestaciones hemodinámicas pueden llevar a graves consecuencias de bajo rendimiento cardíaco. Shekerdemian (2009) *Heart* 95(15): 1286–1296.

5

[061] Las secuelas cardíacas y pulmonares graves de lesiones pulmonares agudas son clínicamente importantes para el rendimiento. Estas secuelas son factores de riesgo de estadías extensas en unidades de cuidados intensivos y de riesgo de vida. La labilidad del
10 tono vascular pulmonar es común en recién nacidos y lactantes luego de la cirugía por CHD. Esto puede resultar extremadamente problemático luego de las reparaciones biventriculares en pacientes que presentaron flujo pulmonar no restringido preoperatorio (defectos del tabique grandes, tronco arterial común) o hipertensión venosa
15 pulmonar (drenaje venoso pulmonar anómalo obstruido). La inestabilidad de la resistencia vascular pulmonar también es común luego de la cirugía paliativa en pacientes con una circulación funcionalmente univentricular, lo que incluye operaciones de tipo Norwood, una derivación de arteria sistémica a pulmonar o una banda
20 arterial pulmonar. Mientras que las intervenciones terapéuticas optimizan la administración de oxígeno sistémica a través de sus influencias directas en el miocardio y vasculatura sistémica, la manipulación del tono vascular pulmonar puede cumplir una función importante en la optimización de la circulación de niños que se
25 someten a cirugía por enfermedad cardíaca. Shekerdemian (2009) *Heart* 95(15): 1286–1296.

[062] La citrulina, con su mecanismo de acción, pretende ser un tratamiento preventivo para reducir el riesgo de desarrollo de las
30 secuelas de la lesión pulmonar aguda asociada al CPB y, por lo tanto, influir de forma positiva en la recuperación postoperatoria de pacientes pediátricos que se someten a cirugía por defectos cardíacos

congénitos.

Modo de acción

5 [063] Sin limitarse a una teoría particular, el inventor sugiere que cuando se somete a un paciente a un *bypass* cardiopulmonar (CPB), se induce una respuesta inflamatoria sistémica que se caracteriza clínicamente por alteraciones en la función cardiovascular y pulmonar. Como parte de esta respuesta, la constricción de
10 vasculatura pulmonar y sistémica lleva a mayor carga de trabajo del ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo. Además, la respuesta inflamatoria lleva a un edema pulmonar y al deterioro del cumplimiento pulmonar y la función pulmonar postoperatoria. Los tratamientos estándares para estas complicaciones postoperatorias
15 incluyen ventilación mecánica hasta que la función pulmonar vuelva a la normalidad y soporte inotrópico hasta que el tono vascular sistémico y pulmonar vuelva a la normalidad, con una consecuente reducción de la carga de trabajo del ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo.

20

[064] En múltiples estudios de observación y clínicos se ha demostrado que los niveles de citrulina y arginina en plasma se reducen de forma precipitada y no se recuperan hasta 48 horas después del *bypass* cardiopulmonar para la cirugía cardíaca congénita. Debido
25 a los mecanismos de transporte intracelular y el procesamiento intracelular, la citrulina es el sustrato definitivo para la producción endógena de óxido nítrico. Barr et ál. (2003) *The Journal of Pediatrics* 142(1): 26-30; Smith et ál. (2006) *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 132(1): 58-65; Barr et ál. (2007)
30 *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 134(2): 319-326.

[065] Se cree que la patofisiología de mayor tono vascular pulmonar

(PVT) postoperatorio, una complicación conocida luego de la reparación de una diversidad de defectos cardíacos congénitos, involucra la disfunción celular endotelial vascular pulmonar.

5 [066] El óxido nítrico (NO) endógeno también cumple una función crítica en la regulación del tono vascular pulmonar. Como parte del trabajo en el procesamiento de desechos nitrogenados defectuoso, se ha descubierto que el ciclo de la urea hepática cumple una función muy importante en la producción de dos precursores de óxido nítrico,
10 a saber, arginina y citrulina.

[067] La citrulina es un aminoácido de origen natural y el primer intermedio en el ciclo de la urea (Figura 1), así como también un precursor de la arginina y el óxido nítrico (NO). Luego de que la
15 citrulina se transporta intracelularmente a través de un transportador de membrana selectivo, las enzimas argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL) la convierten rápidamente en arginina.

20 [068] Células endoteliales vasculares producen óxido nítrico, un vasodilatador potente, en respuesta a muchos estímulos diferentes. El óxido nítrico se propaga de la célula endotelial vascular a la célula del músculo liso vascular, donde activa la guanilato ciclasa, lo que lleva a mayores niveles intracelulares GMP cíclica (cGMP). En aumento
25 de cGMP, a su vez, lleva a la relajación de la célula del músculo liso vascular y al aumento del flujo sanguíneo. La extremadamente corta semivida de NO permite una vasorregulación muy estrecha. La citrulina se transporta de la mitocondria al citoplasma. La argininosuccinato sintetasa (ASS) es la primera de las enzimas del
30 ciclo de la urea citoplasmática y combina citrulina con aspartato para formar argininosuccinato. La argininosuccinatoliasa (ASL) escinde fumarato del argininosuccinato para formar arginina.

[069] Las primeras dos etapas del ciclo de la urea hepática, las que llevan a cabo la carbamil fosfato sintetasa I (CPSI) y ornitina transcarbamilasa (OTC), se limitan al hígado y los intestinos, y el resto de la vía se encuentra distribuida a través del cuerpo, lo que incluye el endotelio vascular pulmonar. *Summar* (1998) *Journal of Inherited Metabolic Disease* 21(1): 30–39. De hecho, las enzimas del ciclo de la urea, ácido argininosuccínico sintetasa (ASS) y ácido argininosuccínico liasa (ASL), participan en la vía de regeneración de NO en los tejidos endoteliales (Figura 1). El suministro de sustrato nuevo para esta vía de NO proviene únicamente de la producción de citrulina como parte de la función normal del ciclo de la urea. Por lo tanto, existe un vínculo teórico entre la producción de NO y la función del ciclo de la urea. La carbamil fosfato sintetasa I (CPSI) cataliza la primera etapa que determina la velocidad del ciclo de la urea.

[070] Un estudio llevado a cabo por Barr reveló que el *bypass* cardiopulmonar reduce de forma significativa varios intermedios del ciclo de la urea y los metabolitos de óxido nítrico luego de la reparación de VSD y AVSD no restringido, lo cual podría tener implicaciones clínicas significativas. Barr et ál. (2003) *The Journal of Pediatrics* 142(1): 26–30. Los pacientes que se someten a estos procedimientos cardíacos específicos se encuentran en riesgo de resistencia vascular pulmonar postoperatoria elevada causada por el exceso de flujo sanguíneo pulmonar preoperatorio. Una reducción en la disponibilidad de óxido nítrico y sus precursores podría aumentar el riesgo de esta complicación postoperatoria.

[071] Cabe destacar el hallazgo de que los niveles de citrulina y arginina se redujeron en el período postoperatorio. La citrulina es el primer intermedio en el ciclo de la urea luego de la enzima

limitante de la velocidad, carbamil fosfato sintetasa I. La citrulina también atraviesa membranas celulares y mitocondriales fácilmente y, por lo tanto, se puede transportar a otros órganos en el cuerpo. En el endotelio vascular pulmonar, la citrulina se puede convertir luego en arginina y posteriormente, en óxido nítrico. Debido a que la mayoría de la arginina en circulación proviene de la de síntesis del ciclo de la urea y no de fuentes alimenticias, la disponibilidad de la citrulina es crítica para mantener el suministro adecuado de arginina para la producción de ácido nítrico.

10

[072] La arginina es el sustrato para la producción de óxido nítrico mediante óxido nítrico sintetasa. También se descubrió que la arginina no se redujo inmediatamente después de la cirugía, sino que se redujo de forma significativa 12, 24 y 48 horas luego de la cirugía. La leve demora en la reducción de los niveles de arginina en comparación con los niveles de citrulina puede reflejar la síntesis continua de arginina a partir de precursores disponibles antes de la cirugía.

15

20

[073] Los niveles de citrulina y arginina continúan su reducción 48 horas luego de la cirugía. Muchos de estos pacientes se habían recuperado clínicamente de su cirugía y estuvieron listos para ser transferidos de la PCCU a las 48 horas. Los niveles reducidos de citrulina y arginina más allá de este momento pueden indicar que estos pacientes siguen en riesgo de mayor resistencia vascular pulmonar, en especial si están fisiológicamente estresados con hipoxia.

25

30

[074] Por último, los niveles de metabolitos de óxido nítrico se redujeron a lo largo del período postoperatorio. La patofisiología de la producción reducida de óxido nítrico en defectos cardíacos congénitos se debe parcialmente a la disfunción celular endotelial

vascular pulmonar. Sin embargo, se han llevado a cabo estudios limitados sobre los efectos específicos del *bypass* cardiopulmonar en la función endotelial pulmonar. En un estudio de 10 lactantes que se someten a *bypass* cardiopulmonar para la reparación de defectos
5 congénitos, se demostró que el complemento del precursor de óxido nítrico, L-arginina, mejora parcialmente la disfunción endotelial pulmonar. En estudios con animales, se reduce la producción celular endotelial de óxido nítrico luego del *bypass* cardiopulmonar, pero aún así es un gran contribuyente para el tono vasomotor pulmonar. Barr et
10 ál. (2003) *The Journal of Pediatrics* 142(1): 26–30.

[075] Se ha demostrado que la L-arginina intravenosa reduce tanto las presiones pulmonares como sistémicas. Esta respuesta global no sería tolerada en pacientes antes de la cirugía cardíaca si ya fueran
15 propensos a estados de rendimiento cardíaco bajo. El mantenimiento de concentraciones elevadas de arginina en plasma también es problemático debido a la poca biodisponibilidad y el rápido metabolismo mediante arginasa intestinal y citosólica. Por el contrario, la administración de citrulina por vía intravenosa (IV) es
20 más eficaz en el mantenimiento de concentraciones de L-arginina en plasma que la administración de arginina en voluntarios saludables. La citrulina no tiene toxicidad reconocida y se utiliza como terapia de reemplazo para niños con defectos en el ciclo de la urea. Por lo tanto, el complemento de citrulina I.V. es un método útil para
25 aumentar la síntesis de arginina y óxido nítrico, y mantener los niveles de metabolitos de arginina, citrulina y óxido nítrico en plasma en el período postoperatorio. Smith et ál. (2006) *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 132(1): 58–65; Barr et ál. (2007) *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 134(2):
30 319–326.

Posología

[076] Los ensayos de complementación utilizaron citrulina por vía oral en una dosis de 1.9 g/m² por dosis administrada antes del *bypass* cardiopulmonar, después de la cirugía, tras la admisión a la unidad de cuidados intensivos y cada 12 horas en las horas 12, 24 y 36. Smith 2006. La citrulina por vía oral se toleró bien sin evidencia de eventos adversos significativos (tal como hipotensión sistémica). Además, se observó que los pacientes que presentaron un nivel de citrulina en plasma de 12 horas >37 µmol/L (el rango superior de niveles normales) no desarrollaron aumento de PVT. Desafortunadamente, no todos los pacientes que recibieron citrulina por vía oral alcanzaron estos niveles. Estas observaciones ayudaron a diseñar estudios posteriores con citrulina intravenosa. Barr et ál. (2007) *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 134(2): 319-326.

[077] En un estudio con aumento de dosis dirigido a un nivel en plasma sostenido de alrededor de 100 µmol/L, se observó que la citrulina intravenosa tiene una semivida bastante corta que requiere un protocolo de administración de fármacos de bolo clásico e infusión continua. Los estudios posteriores confirmaron que la administración IV de citrulina generó niveles de citrulina en plasma sostenidos de aproximadamente 100 µmol/L de la siguiente manera: un bolo intravenoso de citrulina de 150 mg/kg o placebo al inicio del *bypass* cardiopulmonar, la adición de L-citrulina a una concentración de 200 µmol/L tanto al fluido de sensibilización del circuito de *bypass* como al fluido de hemofiltración utilizados durante el *bypass* cardiopulmonar y, luego, un bolo de citrulina de 20 mg/kg, 30 minutos después de la extubación del *bypass* cardiopulmonar, seguido inmediatamente por el inicio de una infusión continua de 9 mg/kg/hora durante 48 horas.

Hemofiltración y diálisis pueden eliminar citrulina de forma involuntaria

[078] En un gran estudio prospectivo de observación de niños que se someten a cirugía cardíaca congénita, los niveles de arginina y citrulina en plasma se redujeron de forma significativa luego de la cirugía y no regresaron a los niveles de referencia preoperatorios en un plazo de hasta 48 horas.

[079] El aumento de tono vascular pulmonar puede ser un problema perioperatorio en niños que se someten a cirugía cardíaca congénita, incluso para pacientes que no se consideraban en riesgo significativo de hipertensión arterial pulmonar grave antes de la cirugía. Se llevaron a cabo estudios de seguridad clínica y farmacocinéticos que muestran que tanto la citrulina oral como intravenosa se toleran bien y sin efectos secundarios adversos en lactantes y niños que se someten a la reparación de defectos cardíacos congénitos. Un ensayo pequeño, aleatorizado, posterior y controlado por placebo de citrulina reveló que la citrulina se toleró bien, sin eventos adversos. Sin embargo, en algunos pacientes, la eliminación significativa de citrulina ocurrió durante la hemofiltración y diálisis llevadas a cabo durante el *bypass* cardiopulmonar. En estudios previos de posibles factores de riesgo genéticos para mayor PVT, se observó que el genotipo de un polimorfismo importante en la enzima del ciclo de la urea, carbamil fosfato sintetasa 1 (T1405N de CPSI), afecta el riesgo de tono vascular pulmonar elevado en lactantes y niños que se someten a reparación quirúrgica de defectos cardíacos congénitos y en recién en riesgo de hipertensión pulmonar postoperatoria (PPHN). Además, se observó que todos los pacientes, independientemente de genotipo de polimorfismo, presentaron una reducción significativa en los niveles en plasma de intermedios claves del ciclo de la urea, los que incluyen citrulina y arginina.

Estas asociaciones impulsaron a los inventores a investigar complementos perioperatorios con citrulina.

[080] Los ensayos de complementación iniciales utilizaron citrulina oral a una dosis de 1.9 g/kg antes del *bypass* cardiopulmonar, inmediatamente después de la cirugía y cada 12 horas, lo cual continúa durante 48 horas después de la cirugía. La citrulina por vía oral se toleró bien sin evidencia de eventos adversos significativos (tal como hipotensión sistémica). Además, se observó que los pacientes que presentaron un nivel de citrulina en plasma de 12 horas >37 $\mu\text{mol/L}$ (el rango superior de niveles normales) no desarrollaron aumento de PVT.

[081] Desafortunadamente, no todos los pacientes que recibieron citrulina por vía oral alcanzaron estos niveles. Estas observaciones ayudaron a diseñar estudios posteriores con citrulina intravenosa. En un estudio con aumento de dosis dirigido a un nivel en plasma sostenido de alrededor de 100 $\mu\text{mol/L}$, los inventores observaron que la citrulina intravenosa tiene una semivida bastante corta. Para resolver este problema, los inventores desarrollaron un protocolo de administración de fármacos de combinación de bolo e infusión continua. El protocolo combinado de un bolo de 150 mg/kg al inicio de la cirugía, seguido 4 horas después de la cirugía con una infusión continua de 9 mg/kg/hora, resultó en niveles sostenidos de citrulina en plasma de aproximadamente 100 $\mu\text{mol/L}$. No se observaron efectos adversos.

[082] En Vanderbilt, se han tratado 77 pacientes conforme a este protocolo. Se interrumpió el estudio para preparar un ensayo controlado por placebo multicéntrico más grande. El análisis de los datos de dichos 77 pacientes reveló que una mayoría que recibió citrulina no llegó al nivel de citrulina en plasma diana sostenido

terapéutico de alrededor de 100 $\mu\text{mol/L}$, principalmente debido a la remoción de citrulina previamente desconocida mediante filtración y hemoconcentración producida durante el *bypass* cardiopulmonar.

5 Citrulina y *bypass* cardiopulmonar

[083] El complemento de citrulina perioperatoria intravenosa aumenta los niveles de metabolitos de óxido nítrico (NO) y arginina en plasma postoperatorios y evita el aumento del tono vascular pulmonar postoperatorio, lo que lleva a una reducción de la duración de la ventilación mecánica invasiva postoperatoria. Los inventores desarrollaron un protocolo mejorado para mantener el tono vascular pulmonar durante y después de la cirugía, el que puede comprender la administración de un bolo intravenoso de citrulina de 150 mg/kg al comienzo del *bypass* cardiopulmonar (CPB), la adición de L-citrulina a una concentración de 200 $\mu\text{mol/L}$ al fluido de reemplazo de hemoconcentración o filtración utilizado durante el *bypass* cardiopulmonar, un bolo de citrulina de 20 mg/kg 30 minutos después de la extubación del CPB, inmediatamente seguido por el inicio de una infusión continua de 9 mg/kg/h durante 48 horas.

[084] Este protocolo corregido fue diseñado para mantener un nivel de citrulina en plasma terapéutico sostenido por encima del umbral diana de alrededor de 100-200 $\mu\text{mol/L}$ desde el inicio del *bypass* cardiopulmonar, durante la cirugía y hasta alrededor de 48 horas después de la cirugía.

[085] No se requiere acceso IV independiente para la citrulina. La formulación de citrulina es isotónica y puede correr a través de una vía IV periférica o un catéter venoso central. La citrulina es un aminoácido y, por lo tanto, a efectos de compatibilidad, se puede tratar como nutrición parenteral. Además, la citrulina es compatible

con fluidos utilizados para la hemoconcentración o filtración durante el *bypass* cardiopulmonar.

[086] Con referencia a la **Figura 3**, un ejemplo de diagrama de flujo ilustra un método para mantener el tono vascular pulmonar que comprende la administración de citrulina a un paciente durante la cirugía.

[087] Con referencia a la Figura 3, durante la etapa preoperatoria, se puede administrar un bolo de citrulina de 150 mg/kg al paciente 100. Durante la cirugía, es posible administrar citrulina a una concentración de 200 $\mu\text{mol/L}$ al fluido de reemplazo de filtración o hemoconcentración durante la cirugía 200. Durante la etapa postoperatoria, se puede administrar un bolo de citrulina de 20 mg/kg 300 y este se puede seguir de una infusión continua de 9 mg/kg/hora durante 48 horas 400.

Formulaciones de citrulina

[088] La citrulina (ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)pentanoico) $[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3]$ es un aminoácido. Es posible la elaboración de la solución de citrulina para la administración IV mediante métodos conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kakimoto, et ál. (1971) *Appl Microbiol* 22(6): 992-999.

Métodos de uso

[089] Es posible administrar la citrulina durante un procedimiento quirúrgico. La dosis adecuada puede incluir un bolo intravenoso de citrulina de 150 mg/kg al comienzo del *bypass* cardiopulmonar, la adición de L-citrulina a una concentración de 200 $\mu\text{mol/L}$ al fluido de filtración y hemoconcentración utilizados durante el *bypass*

cardiopulmonar, y un bolo de 20 mg/kg de citrulina 30 minutos después de la extubación del *bypass* cardiopulmonar, inmediatamente seguido de una infusión continua de 9 mg/kg/h durante 48 horas. El fluido de reemplazo de filtración o hemoconcentración se puede proveer como un fluido estándar (por ejemplo, Plasmalyte) con citrulina agregada para lograr una concentración de citrulina de 200 $\mu\text{mol/L}$. Las dosis se pueden administrar mediante un catéter intravenoso central que se colocará luego de la inducción de anestesia o a través del circuito de *bypass*.

10

[090] Un paciente puede recibir una infusión de citrulina por una vía intravenosa para mantener el nivel de citrulina en plasma. Un protocolo para mantener el tono vascular pulmonar durante la cirugía puede comprender la administración de un bolo intravenoso de citrulina (por ejemplo, de 150 mg/kg) al comienzo del *bypass* cardiopulmonar (CPB), la adición de citrulina (por ejemplo, a una concentración de 200 $\mu\text{mol/L}$) al fluido de reemplazo de filtración o hemoconcentración utilizado durante la cirugía, opcionalmente, *bypass* cardiopulmonar, un bolo de citrulina (por ejemplo, 20 mg/kg) 30 minutos después de la extubación del CPB, inmediatamente seguida por el inicio de una infusión continua (por ejemplo, 9 mg/kg/h) durante 48 horas.

20

25

[091] El bolo intravenoso de citrulina al comienzo del *bypass* cardiopulmonar (CPB) puede ser de alrededor de 100-300 mg/kg. El bolo intravenoso de citrulina al comienzo del *bypass* cardiopulmonar (CPB) puede ser de alrededor de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 mg/kg. En un modo preferido, el bolo intravenoso de citrulina al comienzo del *bypass* cardiopulmonar (CPB) puede ser de alrededor de 150 mg/kg.

30

[092] Es posible agregar citrulina a una concentración de alrededor

de 100-300 $\mu\text{mol/L}$ al fluido de reemplazo de hemoconcentración o filtración durante la cirugía, lo que, opcionalmente, incluye *bypass* cardiopulmonar. Es posible agregar citrulina a una concentración de alrededor de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 $\mu\text{mol/L}$ al fluido de reemplazo de hemoconcentración o filtración durante la cirugía, opcionalmente, durante el *bypass* cardiopulmonar. En un modo preferido, es posible agregar citrulina a una concentración de alrededor de 200 $\mu\text{mol/L}$ al fluido de reemplazo de hemoconcentración o filtración durante la cirugía, opcionalmente, durante el *bypass* cardiopulmonar.

[093] El bolo de citrulina administrado 30 minutos después de la extubación, usualmente, luego del *bypass* cardiopulmonar, puede ser de alrededor de 10-30 mg/kg. Se puede administrar un bolo de citrulina de alrededor de 10, 15, 20, 25 o 30 mg/kg poco después del fin del *bypass* cardiopulmonar, usualmente 30 minutos después de la extubación. En un modo preferido, se puede administrar un bolo de citrulina de alrededor de 20 mg/kg, usualmente 30 minutos después de extubación, luego de *bypass* cardiopulmonar.

[094] La infusión continua puede ser de alrededor de 5-15 mg/kg/h de citrulina, alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 mg/kg/h de citrulina. En un modo preferido, la infusión continua puede ser de alrededor de 9 mg/kg/hora de citrulina.

[095] De manera alternativa, es posible administrar citrulina oralmente a una dosis de alrededor de 5-15 g/kg, es decir, alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 g/kg de citrulina. En un modo preferido, la dosis oral de citrulina puede ser de alrededor de 9 g/kg de citrulina.

[096] Es posible mantener el nivel diana de citrulina en plasma en alrededor de 50-300 $\mu\text{mol/L}$. Por ejemplo, es posible mantener el nivel de citrulina en plasma en alrededor de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 o 300 $\mu\text{mol/L}$. En un modo preferido, es posible mantener el nivel de citrulina en plasma en alrededor de 100 $\mu\text{mol/L}$.

[097] La citrulina se puede proveer en formas de dosificación unitarias. Por ejemplo, se puede proveer la citrulina en un recipiente que contiene 300 mg de citrulina estéril formulada para inyección. Esta se puede reconstituir para su uso con 6 mL de agua estéril y se puede diluir adicionalmente con aproximadamente 5.9 mL de solución de NaCl estéril al 0.9% (Ph. Eur.) hasta un volumen total de 12 mL y una concentración de 300 mg/12 mL (es decir, 25 mg/mL). La citrulina se puede formular para inyección a una concentración de 10-40 mg/mL, por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mg/mL. La citrulina se puede proveer como un producto farmacológico como 500 mg de citrulina estéril para inyección en 10 mL de agua estéril. Esta se puede utilizar para la infusión de pacientes con cloruro de sodio 0.9% (Ph. Eur.

[098] En una modalidad, se administra al paciente un bolo de 150 mg/kg de citrulina el día de la cirugía, mediante la adición 200 $\mu\text{mol/L}$ de citrulina a los fluidos de reemplazo de hemoconcentración y filtración. Alrededor de 30 minutos después de la cirugía, se administra un bolo de 20 mg/kg de citrulina y se inicia una infusión intravenosa continua de citrulina de 9 mg/kg/hora (por ejemplo, en un plazo de 5-10 minutos, preferentemente inmediatamente después de la administración del bolo) y se mantuvo durante 6-48 horas, preferentemente, 48 horas.

[099] Por ejemplo, es posible administrar un bolo de L-citrulina de 150 mg/kg al comienzo del *bypass* cardiopulmonar (CPB) con citrulina a

una concentración de 200 $\mu\text{mol/L}$ que se agrega al fluido de hemoconcentración y filtración utilizado durante el CPB, es posible administrar un bolo de 20 mg/kg de L-citrulina 30 minutos después de la extubación del CPB inmediatamente seguida por una infusión continua de 9 mg/kg/h de L-citrulina durante 48 horas. Las dosis se pueden administrar mediante un catéter IV central que se puede colocar luego de la inducción de anestesia o a través del circuito de *bypass*. No es necesario acceso IV independiente para la administración de este fármaco. La citrulina es isotónica y se puede administrar ya sea mediante un catéter venoso central o IV periférico. La citrulina es un aminoácido y, por lo tanto, a efectos de compatibilidad, se trata el fármaco como nutrición parenteral. De manera adicional, es compatible con fluidos utilizados para hemoconcentración o filtración durante el CPB.

Parámetros postoperatorios

[0100] Es posible evaluar el resultado clínico de los pacientes tratados con citrulina intravenosa conforme a la necesidad y la extensión de ventilación mecánica postoperatoria, la incidencia de aumento de PVT postoperatorio mediante ecocardiogramas, los niveles enzimáticos hepáticos y de creatinina en suero, el índice inotrópico, la extensión y el volumen del drenaje de tubo torácico, la extensión de la estadía en la unidad de cuidados intensivos (UCI), la extensión de la hospitalización y/o la tasa de supervivencia.

[0101] **Ventilación mecánica postoperatoria:** La duración de la ventilación mecánica invasiva postoperatoria es el tiempo en horas de separación entre el *bypass* cardiopulmonar y la extubación endotraqueal. Una reducción del tiempo con ventilación mecánica invasiva postoperatoria es un resultado postoperatorio positivo.

[0102] **Incidencia de aumento de PVT postoperatorio mediante ecocardiograma:** El aumento de PVT se define como una presión ventricular derecha (RV) $> \frac{1}{2}$ presión arterial sistémica. Si el PVT no cambiara en comparación con un grupo de control, sería un resultado postoperatorio positivo.

[0103] **Enzimas hepáticas y creatinina en suero:** Es posible registrar a diario los niveles de CBC, creatinina y electrolitos en suero desde el ingreso a la PCCU hasta el alta de la PCCU. De manera adicional, es posible determinar las enzimas hepáticas en los períodos de referencia, 24 horas y 28 días/alta. Si los niveles de CBC, creatinina y electrolitos en suero son comparables a un grupo de control, esto representará un resultado postoperatorio positivo.

[0104] **Índice inotrópico:** Se debe monitorear la dosis postoperatoria de agente inotrópico a partir del momento de ingreso a la PCCU con el siguiente sistema de calificación:

Dopamina (mcg/kg/min) $\times 1$

más Dobutamina (mcg/kg/min) $\times 1$

más Milrinona (mcg/kg/min) $\times 10$

más Epinefrina (adrenalina) (mcg/kg/min) $\times 100$

más fenilefrina (mcg/kg/min) $\times 100$

más norepinefrina (noradrenalina) (mcg/kg/min) $\times 100$

= índice inotrópico total

Vea, por ejemplo, Hoffman et ál. *Circulation* (2003) 107: 996-1002. Una reducción del índice inotrópico sería un resultado postoperatorio positivo.

[0105] **Extensión y volumen del drenaje del tubo torácico:** Es posible registrar la extensión postoperatoria total en horas y el volumen

total del drenaje del tubo cardíaco en cc antes de que el equipo quirúrgico suspenda los tubos torácicos. Una reducción de la extensión de tiempo postoperatorio y/o el volumen total del drenaje del tubo torácico, en comparación con un grupo de control, representaría un resultado postoperatorio positivo.

[0106] **Extensión de la estadía en la UCI:** Es posible calcular la extensión de la UCI de dos formas: (1) como cantidad total de días postoperatorios en la UCI o unidad de cuidados intermedios hasta que el equipo médico indica que el paciente está listo para ser transferido a un área de cuidados no intensivos y (2) como cantidad total de horas postoperatorias que el paciente requiere ventilación mecánica o asistencia continua mediante vasodilatadores o agentes inotrópicos. Una reducción de la extensión de la estadía en la UCI conforme a cualquiera de dichas medidas representaría un resultado postoperatorio positivo.

[0107] **Extensión de la hospitalización:** Es posible calcular la extensión de la hospitalización como la cantidad total de días luego de la cirugía hasta el alta del hospital. Una reducción de la extensión de la hospitalización sería un resultado postoperatorio positivo.

[0108] **Supervivencia:** Es posible registrar tanto una supervivencia postoperatoria de 28 días como la supervivencia al alta del hospital. El aumento de la supervivencia luego de 28 días desde la cirugía representaría un resultado postoperatorio positivo.

[0109] Sorprendentemente, los inventores descubrieron que la administración de L-citrulina intravenosa perioperatoria reduce las secuelas de las lesiones pulmonares inducidas por el *bypass* cardiopulmonar agudo tal como lo demuestra la reducción de la

necesidad postoperatoria de ventilación mecánica y terapia inotrópica en sujetos pediátricos sometidos a reparación de defectos cardíacos congénitos.

5 [0110] Aunque se ha descrito la invención en cierto detalle a modo
ilustrativo y de ejemplo a efectos de claridad de comprensión, se
debería entender que es posible poner en práctica determinados
cambios y modificaciones comprendidos por el alcance de las
reivindicaciones adjuntas. Se pretende que el alcance de las
10 reivindicaciones adjuntas comprende las modificaciones de los modos
anteriormente descrito para llevar a cabo la invención que se
comprenderán a la luz de la divulgación anterior o que resultarán
evidentes con la práctica o la implementación rutinarias de la
invención a expertos en cirugía, bioquímica, medicina, fisiología y/o
15 campos relacionados.

[0111] Todas las publicaciones (por ejemplo, bibliografía diferente
de patentes), patentes, publicaciones de solicitudes de patentes y
solicitudes de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva
20 son indicios del nivel de conocimiento de los expertos en la técnica
a la que hace referencia la presente invención. Todas dichas
publicaciones (por ejemplo, bibliografía diferente de patentes),
patentes, publicaciones de solicitudes de patentes y solicitudes de
patentes se incorporan a la presente mediante esta referencia en la
25 misma medida que si se indicara que cada publicación, patente,
publicación de solicitud de patente o solicitud de patente se
incorpora de forma específica e individual mediante esta referencia.

[0112] Los ejemplos contenidos en la presente se ofrecen a modo de
30 ilustración y no de modo taxativo.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1**NIVELES DE ARGININA, CITRULINA Y NITRATO EN PLASMA Y RIESGO DE PPHN**

5

[0113] Los recién nacidos que desarrollaron PPHN presentaron niveles inferiores de arginina, citrulina y nitrato en plasma en comparación con lactantes sin PPHN. Se midieron los metabolitos NO (NOx) en plasma con la reacción de Griess modificada en diez recién nacidos. De ellos, 5 fueron PPHN+ y 5 fueron PPHN-. Los casos PPHN+ presentaron un nivel significativamente mejor de NOx, ($p = 0.006$) (Figura 4). Los recién nacidos con PPHN presentaron niveles significativamente menores de arginina y citrulina en plasma en un análisis de aminoácidos (Figura 4). No existieron diferencias significativas en los niveles de cualesquiera otros aminoácidos individuales entre ambos grupos. La cantidad de sujetos fue demasiado pequeña como para evaluar las relaciones entre los niveles de aminoácido y NOx y el genotipo. Estos datos muestran que los lactantes con PPHN tienen productos e intermedios del ciclo de urea reducidos.

20

EJEMPLO 2**FUNCIÓN DEL CICLO DE LA UREA EN LACTANTES Y NIÑOS SOMETIDOS A BYPASS
CARDIOPULMONAR PARA CORREGIR DEFECTOS CARDÍACOS CONGÉNITOS**

25

[0114] Se estudió la prevalencia del tono vascular pulmonar postoperatorio aumentado y el estado de la función del ciclo de la urea en lactantes y niños sometidos a cirugía cardíaca. Durante un período de 20 meses, se estudiaron 169 lactantes y niños que requirieron uno de los 6 procedimientos quirúrgicos específicos para corregir sus defectos cardíacos congénitos. Véase la Tabla 1. Luego

30

de obtener el consentimiento de los padres, se extrajeron muestras de sangre de todos los pacientes para determinar el genotipo antes de la cirugía y se recabó sangre para realizar análisis de aminoácidos en 5 momentos diferentes (antes de la cirugía, inmediatamente después de la cirugía, 12 horas, 24 horas y 48 horas después de la cirugía). Todos los pacientes, excepto por aquellos sometidos a la etapa 1 del procedimiento de Norwood, para determinar el aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio (PVT+) definido como una media de presión PA >20 mmHg. Se definieron los lactantes sometidos a la etapa 1 del procedimiento de Norwood como PVT+ si presentaron un requisito clínico de NO inhalado utilizado para saturaciones arteriales <60% con presiones sistémicas adecuadas.

[0115] La Tabla 1 muestra la edad promedio para cada uno de los seis procedimientos y la extensión de la exposición a *bypass* cardiopulmonar. De los 169 pacientes, 56 (33.1%) desarrollaron evidencia clínica de aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio (PVT+). Muchos de dichos pacientes requirieron intervención clínica que incluyó sedación, parálisis e hiperventilación. Se trataron 33 pacientes con NO inhalado (NO+).

Tabla 1: Tipo de procedimiento quirúrgico llevado a cabo en la población de estudio

Procedimiento	n.º	Edad (meses)	CPB (minutos)	PVT+	NO+
Derivación de Bidir Glenn	42	6.4 ± 2.5	84 ± 36	18 (42.9%)	10 (23.8%)
Etapa I de Norwood	33	0.8 ± 0.8	112 ± 32	14 (42.4%)	9 (27.3%)
Cierre de VSD	36	8.5 ± 11.9	91 ± 21	15 (41.7%)	1 (2.8%)
Reparación de AVSD	24	5.2 ± 2.5	111 ± 27	12 (50%)	3 (12,5%)
Transposición arterial	18	0.6 ± 1.3	157 ± 38	6 (33.3%)	2 (11.1%)
Modificación de Fontan-Kreutzer	16	<u>24.8 ± 18.8</u>	<u>94 ± 25</u>	<u>4 (25%)</u>	<u>3 (18,8%)</u>
Cant. total de pacientes	169	6.8 ± 10.6	104 ± 37	56 (33.1%)	33 (19.5%)

[0116] Los lactantes y niños sometidos a cirugía cardíaca exhibieron un aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio y estado de función del ciclo de urea.

Efecto del bypass cardiopulmonar en la función del ciclo de la urea

[0117] Se analizaron metabolitos de óxido nítrico en plasma e intermedios del ciclo de la urea perioperatorios para evaluar si un *bypass* cardiopulmonar reduciría la función del ciclo de la urea y la disponibilidad de NO. Se tomaron muestras de plasma de cada uno de los 169 pacientes en 5 momentos perioperatorios y se analizaron mediante cromatografía de intercambio catiónico con un analizador de aminoácidos Beckmann 7300 (Beckmann, Palo Alto, CA). Se utilizaron arginina y citrulina como marcadores primarios del flujo del ciclo de la urea. Se utilizaron los niveles de metabolito de óxido nítrico en

plasma como una medida indirecta de disponibilidad de NO mediante un ensayo colorimétrico con reactivos de Griess modificados y lecturas de absorbancia a 540 nm. Todos los pacientes requirieron *bypass* cardiopulmonar para corregir sus defectos cardíacos. En la población de estudio, el *bypass* cardiopulmonar provocó una reducción significativa de los niveles promedio de arginina en todos los momentos postoperatorios en comparación con los niveles preoperatorios (Figura 5). Se observó una reducción similar en los niveles de citrulina promedio (Figura 6A-B). También se redujeron los niveles de metabolitos de NO en plasma inmediatamente después de la cirugía, pero exhibieron un aumento parcial 12 y 24 horas, antes de volver a los niveles preoperatorios a 48 horas (Figura 7). Por el contrario, el *bypass* no tuvo efecto en los aminoácidos totales no involucrados en el ciclo de la urea. Debido a que los aminoácidos no involucrados en el ciclo de la urea no se vieron afectados, estos datos sugieren que el efecto en la función del ciclo de la urea y la síntesis del sustrato de NO puede durar hasta alrededor de 48 horas después de la cirugía.

[0118] En pacientes que posteriormente desarrollaron un aumento de PVT postoperatorio (PVT+), se observó una reducción de los niveles de arginina en plasma en comparación con pacientes sin aumento de PVT (PVT-). Figura 8. No se realizaron observaciones similares respecto a metabolitos de NO y citrulina.

[0119] Conforme a una regresión lineal, la extensión del *bypass* cardiopulmonar no tuvo efecto alguno en los niveles de metabolitos de NO, citrulina y arginina en cualquier momento postoperatorio.

Resumen de resultados clínicos

[0120] Este estudio demuestra que el *bypass* cardiopulmonar utilizado

para la corrección de defectos cardíacos congénitos provoca una reducción significativa de la función del ciclo de la urea con una reducción importante de la disponibilidad de precursores para la síntesis de óxido nítrico. El *bypass* cardiopulmonar utilizado para la corrección quirúrgica de defectos cardíacos congénitos provocó una reducción medianamente significativa de la disponibilidad de precursores de óxido nítrico en el ciclo de la urea y los niveles de óxido nítrico medidos de forma indirecta mediante metabolitos de NO en plasma. Debido a que los aminoácidos no involucrados en el ciclo de la urea no se vieron afectados, un efecto en la función del ciclo de la urea y la síntesis del sustrato de NO puede durar hasta 48 horas después de la cirugía. Los pacientes con aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio presentaron una reducción más significativa de los niveles de arginina que aquellos con tono normal.

[0121] Un estudio independiente demostró que el genotipo T1405N de CPSI influye en el riesgo de aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio. Los niveles de arginina fueron significativamente diferentes entre genotipos T1405N de CPSI 48 horas después de la cirugía.

EJEMPLO 3

COMPLEMENTO DE CITRULINA INTRAVENOSA AUMENTA LOS NIVELES DE ARGININA EN PLASMA

[0122] El objetivo fue evaluar la seguridad de la citrulina intravenosa y su efecto sobre los niveles de arginina en suero en cerdos jóvenes. Se utilizó un total de 9 cerdos Duroc de 5-21 días de edad con un peso mínimo diana de 4 kg. Se sometió a todos los cerdos jóvenes a anestesia y traqueotomía. Se colocaron líneas centrales en

la arteria femoral y la vena femoral, y se controló de forma continua la hemodinámica. Se administró citrulina (600 mg/kg IV) a 5 cerdos jóvenes. Se administró solución salina a los animales de control. Se extrajeron los aminoácidos del suero antes y una hora después de cada administración de citrulina.

[0123] Se observaron picos de los niveles de arginina en suero 1-2 horas después de la administración de citrulina intravenosa, se mantuvieron por encima de la referencia tres horas después y fueron significativos en todos los momentos en comparación con los controles ($p < 0.001$). No se observó inestabilidad hemodinámica. Vea las Tablas 2-3.

Tabla 2: Niveles de arginina ($\mu\text{mol/L}$) luego de citrulina intravenosa

Grupo de tratamiento (n=5)	Referencia	1 hora después	2 horas después	3 horas después
L-Citrulina (600 mg/kg)	131.5	535.0	559.8	498.4
Control (solución salina)	89.6	103.0	118.1	136.7
Valor p	0.1582	<0.001	<0.001	<0.001

Tabla 3: Presiones arteriales sanguíneas promedio (mmHg) luego de citrulina intravenosa

Grupo de tratamiento (n=4)	Predosis	1 hora después	2 horas después	3 horas después
L-Citrulina (600 mg/kg)	67.0	67.4	64.8	62.2
Control (solución salina)	53.2	58.7	55.7	54.7

$p > .05$ en todos los momentos

[0124] Por consiguiente, la administración intravenosa de citrulina lleva a un aumento constante de los niveles de arginina y citrulina

en plasma.

EJEMPLO 4

5 COMPLEMENTO DE CITRULINA ORAL PEROPERATORIO EN NIÑOS SOMETIDOS A CIRUGÍA CARDÍACA CONGÉNITA

[0125] El fin de este estudio fue evaluar la absorción y demostrar la seguridad de la citrulina oral como una posible alternativa a la citrulina IV. Se asignó de forma aleatoria la recepción de 5 dosis de
10 citrulina oral (1.9 gramos/kg) contra placebo a 40 pacientes con uno de los 5 diagnósticos quirúrgicos anteriormente identificados. La primera dosis se administró inmediatamente antes de la cirugía y la segunda dosis, inmediatamente al llegar a la UCI pediátrica luego de
15 la cirugía, seguida por 3 dosis cada 12 horas. Los niveles de citrulina en plasma fueron significativamente mayores en el grupo de citrulina (36 contra 26 $\mu\text{mol/L}$, $p = 0.013$), lo que demuestra una absorción adecuada.

20 **Tabla 4: Niveles en suero 12 horas después de la cirugía con PHTN y sin ella**

Nivel de citrulina en suero 12 horas después de la cirugía	Sin PHTN	+ PHTN
<37 $\mu\text{mol/L}$	18 pacientes	9 pacientes
>37 $\mu\text{mol/L}$	12 pacientes	0 pacientes
valor $p = 0.036$ (test exacto de Fisher)		

30

[0126] El estudio no se potenció de forma adecuada para detectar un efecto sobre la *incidencia* de la hipertensión pulmonar postoperatoria

(PHTN). Sin embargo, los pacientes con nivel de citrulina en plasma $>37 \mu\text{mol//L}$ no desarrollaron hipertensión pulmonar.

EJEMPLO 5

5

ADMINISTRACIÓN DE CITRULINA DURANTE CIRUGÍA

[0127] El objetivo inicial fue evaluar la seguridad y la farmacocinética de tres dosis de citrulina intravenosa en niños sometidos a reparación quirúrgica de defectos cardíacos congénitos específicos. La administración de citrulina intravenosa tuvo un riesgo teórico de hipotensión arterial sistémica. Se definió una reducción adversa de presión arterial promedio como una reducción de más del veinte por ciento respecto a la referencia. Se calculó la presión arterial promedio postoperatoria de referencia como el promedio de medidas de presión sanguínea arterial tomadas cada 5 minutos durante los 30 minutos inmediatamente previos a la administración de la dosis o infusión postoperatoria. Entonces, se configuró el monitor que se encuentra junto a la cama para emitir una alerta si se llega a una reducción del 20% en cualquier momento en el período de estudio de 48 horas.

[0128] Las dosis originales seleccionadas fueron 200, 400 y 600 mg/kg con base en datos de estudios animales previos. El diseño de estudio original fue un estudio de 4 grupos con las 3 dosis y un placebo de control. Se registraron cinco pacientes y el Comité de control y seguridad de datos (DSMB) observó que los niveles plasmáticos logrados con dichas dosis fueron muy elevados, aunque no se observaron efectos adversos. Posteriormente, se cambió el diseño del estudio a un ensayo abierto con aumento de dosis a partir de 50 mg/kg y se aumentó la dosis en intervalos de 50 mg/kg. Cada paciente recibió 2 dosis: una dosis en el quirófano luego del inicio

del *bypass* cardiopulmonar y una dosis 4 horas después, en la unidad de cuidados intensivos. Los datos se resumen en las Figuras 9A-C.

[0129] Los pacientes 6 y 8 recibieron 50 mg/kg de citrulina intravenosa y presentaron un pico de nivel de citrulina de aproximadamente 220 $\mu\text{mol/L}$ y un nivel mínimo a 4 horas de 40 $\mu\text{mol/L}$. No se observaron efectos adversos. Dicho mínimo se encontró muy por debajo del intervalo de 80-100 $\mu\text{mol/L}$ y, posteriormente, se aumentó la dosis. Los pacientes 9 y 10 recibieron 100 mg/kg de citrulina intravenosa y presentaron un pico de nivel de citrulina de 375 $\mu\text{mol/L}$ y un mínimo a 4 horas de 50 $\mu\text{mol/L}$. Nuevamente, no se observaron efectos adversos. Dicho mínimo también se encontró muy por debajo del intervalo de 80-100 $\mu\text{mol/L}$ y, posteriormente, se aumentó la dosis. Los pacientes 13-16 recibieron 150 mg/kg de citrulina intravenosa y presentaron un pico de nivel de citrulina de 660 $\mu\text{mol/L}$ y un mínimo a 4 horas de 80 $\mu\text{mol/L}$. Dicho mínimo a 4 horas se encontró en el intervalo de 80-100 $\mu\text{mol/L}$ y no se aumentó adicionalmente la dosis. Se resumen el perfil farmacocinético de dichas 3 dosis de citrulina en la Figura 10.

20

[0130] Se calculó que la semivida fue de aproximadamente 85 minutos, lo que fue demasiado breve para proceder sin dosificación intermitente. Luego del modelado farmacocinético, se cambió el diseño del estudio a una dosis en bolo de 150 mg/kg administrada en el quirófano en *bypass* cardiopulmonar, seguida 4 horas después de una infusión continua de 9 mg/kg/hora durante 48 horas. Se inscribieron 9 pacientes más. Se ilustran los niveles plasmáticos promedio de citrulina y arginina en los pacientes en estudio (+IV citrulina) en comparación con los pacientes en cohorte de observación (-IV citrulina) en las Figuras 11A-B.

30

[0131] Se produjo un evento adverso significativo, pero no se

relacionó al uso de citrulina IV. El paciente desarrolló un paro
bradicárdico aproximadamente 8 horas después de una reparación de
AVSD no precedida por hipotensión sistémica. El paciente requirió
OMEC emergente durante 48 horas y, posteriormente, se recuperó
5 totalmente y se autorizó su alta el día 22 de su hospitalización. El
DSMB estudió el caso y determinó que no era probable que el evento
adverso significativo se vinculara a la administración de citrulina.

[0132] Con base en dichos datos, se determinó que la citrulina
10 intravenosa era segura y que la combinación de un bolo de 150 mg/kg
administrado en *bypass* cardiopulmonar al inicio de la cirugía seguida
4 horas después por una infusión continua de 9 mg/kg/h puede mantener
el tono vascular después de la cirugía.

15 EJEMPLO 6

FARMACOCINÉTICA DE L-CITRULINA INTRAVENOSA PERIOPERATORIA EN NIÑOS SOMETIDOS A CIRUGÍA CARDÍACA CONGÉNITA

20 [0133] Con el fin de determinar la eliminación de una única dosis en
bolo de citrulina IV y la frecuencia de dosis óptima, se utilizó un
diseño de aumento de dosis con tres concentraciones de citrulina IV:
50, 100 y 150 mg/kg. La dosis de citrulina se administró en el
quirófano inmediatamente después de la canulación y el inicio del
25 *bypass* cardiopulmonar. El objetivo general fue lograr un nivel de
citrulina sostenido de 100 $\mu\text{mol/L}$ o más hasta cuatro horas después de
la dosis inicial. Se seleccionó el momento a cuatro horas para
permitir que se completara el procedimiento quirúrgico y que el
paciente volviera a la UCI luego de la cirugía antes de la
30 administración de dosis adicionales. Se ilustran los datos de
citrulina compuesta en la Figura 12.

[0134] A partir de dichos datos, se determinó que la dosis óptima era 150 mg/kg dado que generó niveles a cuatro horas de cerca de 100 μ mol/L. No se observaron efectos adversos, lo que incluye hipotensión por la administración de cualesquiera concentraciones de citrulina IV.

[0135] Sin embargo, a partir de los datos anteriores también se determinó que la semivida de las dosis en bolo de citrulina IV fue de aproximadamente 60-90 minutos y requeriría al menos 4 horas de dosificación, lo que es impráctico incluso en un entorno de UCI. El modelado farmacocinético sugirió que se podría lograr un nivel de citrulina sostenido de aproximadamente 100 μ mol/L mediante una dosis en bolo de 150 mg/kg de citrulina IV administrada al comienzo de la cirugía luego del inicio del *bypass* cardiopulmonar y seguida, 4 horas después, por una infusión continua de 9 mg/kg/h. Se ilustra el modelado farmacocinético de este régimen en la Figura 13.

[0136] Entonces, se inscribieron pacientes con dicho protocolo revisado de una combinación de una dosis en bolo de 150 mg/kg en el quirófano en CPB y se inició una infusión continua de 9 mg/kg/h en la UCI pediátrica 4 horas después de la dosis en bolo inicial. Se encuentran disponibles los datos de citrulina de 9 pacientes y se presentan en las Figuras 14A-B.

EJEMPLO 7

ESTUDIO DE CITRULINA INTRAVENOSA

[0137] Un estudio de citrulina intravenosa llevado a cabo fue un estudio doble ciego aleatorio controlado por placebo cuyo resultado clínico primario es la extensión de la ventilación mecánica postoperatoria y, en segundo lugar, la incidencia de la hipertensión

pulmonar postoperatoria entre los 2 grupos de tratamiento (citrulina contra placebo).

[0138] Se inscribió un total de 77 pacientes en el hospital
5 Vanderbilt Children's Hospital. Se analizaron los pacientes con base en el cronograma quirúrgico. Con base en dicho cronograma, se analizaron los pacientes sometidos a una de las 5 cirugías cardíacas planificadas incluidas incluidos en este estudio (en este momento, se excluyen los pacientes sometidos al procedimiento de Norwood conforme
10 a la recomendación del DSMB).

[0139] Se interrumpió el estudio para preparar un ensayo controlado por placebo multicéntrico más grande. El análisis de los datos de dichos 77 pacientes reveló que una mayoría que recibió citrulina no
15 llegó al nivel de citrulina en plasma diana sostenido terapéutico de 100 $\mu\text{mol/L}$ principalmente debido a la remoción de citrulina mediante hemofiltración producida durante el *bypass* cardiopulmonar. Dichas técnicas de hemofiltración cambiaron durante el estudio y los investigadores no estaban al tanto de dichos cambios.

20

EJEMPLO 8

PROTOCOLO PARA ADMINISTRACIÓN DE CITRULINA PARA CIRUGÍA CARDÍACA

25 [0140] El modelo farmacocinético original supuso un sistema cerrado. En ausencia de metabolismo significativo y emisión de orina durante la cirugía, el modelo supuso que los niveles terapéuticos logrados por el bolo original de citrulina se mantendrían durante la extensión de la cirugía. Sin embargo, en un punto desconocido temprano en el
30 transcurso del estudio, la práctica de perfusión cambió para incorporar intercambio cristaloide y ultrafiltración agresiva durante el desarrollo de la cirugía. Esto significó que la ultrafiltración

eliminó de forma eficaz la citrulina de la circulación, de forma que, al evaluar los niveles de citrulina, virtualmente ninguno de los pacientes había logrado niveles de fármacos terapéuticos.

5 [0141] Se llevó a cabo el estudio de este ejemplo para evaluar un protocolo de dosificación corregido diseñado para lograr y mantener niveles de citrulina terapéuticos ante la ultrafiltración y el reemplazo de cristaloides. Aunque, aparentemente, se cumplió con el punto final farmacocinético, esta presentación de datos se centra en
10 los parámetros de eficacia evaluados como criterios de valoración secundarios. El estudio reclutó 22 pacientes asignados al azar en cantidades iguales de 11 pacientes a grupos de placebo y de citrulina.

15 *Resultados*

[0142] Se reconoció temprano en el desarrollo del estudio que uno de los dos centros participantes extubó de forma rutinaria a todos los pacientes en el quirófano inmediatamente después de la interrupción
20 del *bypass* cardiopulmonar. Esto impidió utilizar la duración de la ventilación mecánica como un punto final. En su lugar, se aplicó un análisis posterior con la duración de todas las formas de soporte de ventilación como punto final posible. La Figura 15 demuestra que el grupo de control con placebo tiene una distribución aproximadamente
25 bimodal de tiempos de ventilación, en el que algunos de los niños mantienen el soporte respiratorio durante períodos extensos de tiempo. En contraste, los niños tratados con citrulina, salvo por una excepción, exhibieron una distribución unimodal con duraciones reducidas de soporte respiratorio. Las diferencias entre los grupos
30 de placebo y citrulina no llegaron a ser significativas, pero exhibieron una tendencia fuerte cuando se aplicó un test de Satterthwaite. En contraste, el análisis de la tabla de contingencia

que se ilustra en la Figura 16 logró un límite de importancia. En general, se considera que los resultados representan una tendencia fuerte.

5 **TABLA 5: Análisis de tabla de contingencia de efectos de citrulina conforme a la duración del soporte respiratorio**

Duración del soporte respiratorio	Placebo	Citrulina
≤ 50 horas	3	7
> 50 horas	8	2

10 [0143] Los parámetros cardiovasculares proveen revelaciones adicionales. La Figura 17 muestra que los pacientes con citrulina exhibieron índices inotrópicos marcadamente mejores de forma inesperada, en particular, de 15 a 18 horas luego del ingreso a la UCI. La presión sanguínea sistólica presentó una elevación transitoria leve en el grupo de citrulina alrededor de 20 horas luego de interrumpir el *bypass*, aunque las presiones diastólicas fueron esencialmente idénticas entre ambos grupos. Figura 18A. La presión arterial promedio exhibió un leve aumento transitorio en el grupo de citrulina, tal como se ilustra en la Figura 18B, que refleja el cambio de presión sistólica. Debido a la naturaleza de la elevación de la presión sanguínea sistólica y la elevación de la presión arterial, el aumento de la presión sistólica sugiere una posible necesidad menor de agentes inotrópicos que lo esperada.

30 [0144] La duración del soporte respiratorio total parece ser un punto final viable para el estudio de citrulina para evitar que la hipertensión pulmonar aguda complique la cirugía de reparación cardíaca congénita. No se observaron efectos adversos a los parámetros hemodinámicos.

EJEMPLO 9**FORMULACIÓN DE CITRULINA**

5

[0145] Es posible producir citrulina estéril en primer lugar como un polvo a granel no estéril con un proceso de fermentación bacteriana (*Streptococcus faecalis*) de arginina, seguido de etapas de separación y extracción. Entonces, se reconstituye el polvo a granel no estéril y se somete a etapas de reducción de endoxinas y filtración estéril seguidas de cristalización, secado y micronización en un entorno aséptico. Luego, se utiliza el polvo a grane como «materia prima» para el relleno aséptico de viales de cristal para producir el fármaco terminado que se reconstituye con un diluyente estéril antes de su uso.

10

[0146] Cada vial estéril de citrulina para inyección puede contener alrededor de 300 mg de polvo de citrulina estéril. Es posible reconstituir cada vial con 6 mL de agua estéril para inyección, USP y se diluye adicionalmente con alrededor de 5.9 mL de cloruro de sodio al 0.9%, USP hasta un volumen de 12 mL y una concentración de 300 mg/12 mL = 25 mg/1 mL. Ejemplos de infusiones a pacientes pueden ser en cloruro de sodio al 0.9%, USP a administrar a una concentración de alrededor de 25 mg/mL.

20

25

EJEMPLO 10

**FARMACOCINÉTICA (PK) Y SEGURIDAD DE ADMINISTRACIÓN DE L-CITRULINA IV
A NIÑOS Y LACTANTES SOMETIDOS A BYPASS CARDIOPULMONAR (CPB) PARA
REPARACIÓN QUIRÚRGICA DE DEFECTOS CARDÍACOS CONGÉNITOS**

30

[0147] Se llevó a cabo un estudio ciego aleatorio multicéntrico

controlado por placebo de fase IB para determinar la farmacocinética (PK) y la seguridad de la administración de L-citrulina IV a niños y lactantes sometidos a *bypass* cardiopulmonar (CPB) para la reparación quirúrgica de defectos cardíacos congénitos.

5

[0148] El objetivo principal del estudio fue determinar si un protocolo corregido de administración de L-citrulina (IV) perioperatoria logró un nivel de citrulina en plasma de $>100 \mu\text{mol/L}$ en el grupo al que se administró citrulina y comparar los niveles de citrulina en el grupo de placebo durante el seguimiento de niños sometidos a reparación quirúrgica de un defecto del tabique interauricular (ASD) y/o un defecto del tabique interventricular (VSD) o un defecto del tabique auriculoventricular (AVSD) parcial o total.

15

[0149] Analizar el perfil de seguridad de citrulina fue un objetivo de seguridad y establecer el impacto de la citrulina en los resultados clínicos postoperatorios fue un objetivo secundario.

20

[0150] Se inscribieron y se trataron 22 (veintidós) pacientes. Los pacientes recibieron infusiones del fármaco experimental o placebo de acuerdo con un protocolo de dosificación fijo a partir del inicio del CPB hasta 48 horas después de la operación o hasta la extracción de la vía arterial. La participación en el estudio finalizó con el alta o el día 28, lo que sucediera primero. Se diseñó el régimen de dosificación para mantener los niveles de citrulina en plasma ante hemofiltración extendida.

25

[0151] Los niveles de concentración de citrulina en plasma representaron la variable PK primaria y se evaluaron en muestras de sangre extraídas en 7 momentos perioperatorios. Las variables PK secundarias fueron las concentraciones de metabolitos de óxido

30

nítrico (NO) y arginina en el mismo conjunto de muestras. Se compararon los valores PK entre grupos.

5 [0152] Los sujetos recibieron un bolo de citrulina IV de 150 mg/kg o placebo al inicio del CPB, seguido de la adición de L-citrulina a una concentración de 200 μ mol/L o placebo al fluido de reemplazo de filtración o hemoconcentración utilizado durante el CPB. Se administró un bolo de citrulina de 20 mg/kg 30 después de la extubación del CPB, inmediatamente seguida de una infusión continua
10 de 9 mg/kg/h de citrulina o placebo durante 48 horas.

[0153] Las evaluaciones de seguridad primaria incluyeron el monitoreo hemodinámico para identificar la hipotensión clínicamente significativa con límites específicos de edad. Se recabó información
15 de eventos adversos y se registraron hemorragias postoperatorias.

[0154] Se llevaron a cabo evaluaciones de seguridad, de laboratorio y clínicas adicionales desde la referencia hasta el alta, y las variables clínicas secundarias incluyeron: ventilación mecánica
20 postoperatoria, duración del soporte respiratorio total, mejora hemodinámica, PVT postoperatoria mediante ecocardiograma, creatinina en suero y enzimas hepáticas, índice inotrópico, duración del uso de tubo torácico, extensión de la estadía en la unidad de cuidados intensivos, extensión de la hospitalización y supervivencia.

25

[0155] En este momento, el análisis de los resultados de estudio se encuentra en las etapas finales, pero no se ha completado todo el control de calidad, lo que significa que los datos que se encuentran más adelante pueden cambiar en menor medida.

30

[0156] No obstante, los análisis anteriormente detallados demostraron lo siguiente ya sea como preferible al uso de una

variable compuesto que comprende las duraciones más extensas de cada uno de dichos parámetros como sustituto de la duración de la estancia en la unidad de cuidados intensivos. El motivo de dicha preferencia es que variables externas, tales como el momento del día y la disponibilidad de camas, pueden influir en la duración real de la estadía en la UCI. Los pacientes que recibieron el fármaco experimental exhibieron duraciones compuestas menores de ventilación mecánica y terapia inotrópica que los pacientes que recibieron placebo. Por lo tanto, tal como se evaluó mediante la variable de marcador de sustituto compuesto, los pacientes que recibieron el fármaco experimental estuvieron listos para recibir el alta de la UCI antes que los pacientes que recibieron placebo. El protocolo de dosificación corregido logró niveles de citrulina en plasma constantemente sobre el nivel diana de 100 $\mu\text{mol/L}$, tal como se ilustró anteriormente en la Figura 19. Los pacientes que recibieron citrulina exhibieron una duración reducida de ventilación mecánica tal como se ilustra en la Figura 20.

[0157] Se observaron algunas diferencias en la práctica clínica entre sitios respecto a la ventilación mecánica. Un sitio tendió a extubar pacientes en el quirófano sin registrar el momento de extubación para dichos pacientes. A efectos de análisis, se fijó la duración de la ventilación mecánica postoperatoria en cero para dichos pacientes. Cuando se estratificaron dichos pacientes conforme al tratamiento, se observó que se extubó a los 6 pacientes (100%) que recibieron L-citrulina intravenosa en el quirófano, en comparación con solamente 2 de los 6 pacientes (33%) en el grupo de placebo.

[0158] Tal como con la extensión de tiempo de ventilación mecánica, la duración de la terapia inotrópica presentó diferencias marcadas entre los dos grupos de tratamiento, tal como se ilustra en la Figura 21.

[0159] En la Figura 21, se definen datos como el tiempo entre el momento de inicio y el momento de terminación del uso de agentes inotrópicos. Todos los índices inotrópicos totales 0 o faltantes
5 antes del primer índice medido se fijan en 0 y, por consiguiente, no se consideran como con agentes inotrópicos. Se considera el índice inotrópico total, el que se calcula con base en dopamina, dobutamina, milrinona, epinefrina, fenilefrina y norepinefrina. Se fija en 0 horas (no censurados) la extensión de tiempo con agentes inotrópicos
10 de los pacientes que no reciben agentes inotrópicos.

[0160] Tal como se mencionó anteriormente, la interrupción de la ventilación mecánica y de la terapia con agente inotrópico son las dos determinantes principales de que el paciente se encuentra listo
15 para el alta de la unidad de cuidados intensivos. Una variable compuesta que comprende (para cada sujeto) el mayor de los dos parámetros (duración de ventilación mecánica o de terapia inotrópica) puede servir como un sustituto eficaz y preciso de la duración de la estadía en la unidad de cuidados intensivos. La Figura 22 muestra las
20 diferencias en la variable compuesta cuando se comparan los grupos de citrulina y placebo. Los pacientes que recibieron el fármaco experimental exhibieron duraciones compuestas menores de ventilación mecánica y terapia inotrópica que los pacientes que recibieron placebo. Por lo tanto, tal como se evaluó mediante la variable de
25 marcador de sustituto compuesto, los pacientes que recibieron el fármaco experimental estuvieron listos para recibir el alta de la UCI pediátrica antes que los pacientes que recibieron placebo. Además de indicar un período más breve en la UCI pediátrica, un período de ventilación mecánica más breve reduce el riesgo agregado de daño
30 físico.

[0161] Además de lograr los niveles de citrulina en plasma deseados,

este estudio logró resultados estadísticamente significativos y casi significativos que demuestran diferencias dependientes del tratamiento con citrulina en la duración de la ventilación mecánica y la terapia inotrópica entre los grupos tratados y de control en un grupo pequeño de 22 sujetos.

[0162] La duración de la ventilación mecánica invasiva postoperatoria se deriva como el tiempo en horas de separación entre el *bypass* cardiopulmonar y la extubación endotraqueal. Si un paciente requirió reintubación en un plazo de 24 horas desde la extubación, se sumó el tiempo de reintubación en el análisis principal. En un segundo análisis, no se incluyó el tiempo de reintubación.

[0163] La duración promedio de ventilación mecánica invasiva que incluye el tiempo de reintubación fue claramente más extensa en el grupo de placebo que en el grupo de tratamiento con citrulina, en los que los pacientes tratados con citrulina requieren solamente un promedio de 5 horas de ventilación invasiva y los pacientes tratados con placebo requirieron 37 horas (Tabla 8). La diferencia no llegó a tener importancia significativa en análisis ANOVA, más probablemente debido a la gran variación de duraciones en el grupo de placebo. Sin embargo, cuando se excluyó el tiempo de reintubación, la diferencia entre grupos también fue importante y se logró importancia estadística en ANOVA ($p = 0.0317$). Se observó la importancia estadística de ambos análisis en la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon.

[0164] La interrupción de la ventilación de presión positiva y la terapia con agente inotrópico son las dos determinantes principales de que el paciente se encuentra listo para el alta de la unidad de cuidados intensivos. En conjunto, como una variable compuesta que comprende la mayor de la duración de soporte de ventilación de

presión positiva o de terapia inotrópica, pueden servir como un sustituto eficaz de la duración de la estadía en una unidad de cuidados intensivos. Esta última variable está sometida a factores de confusión que la pueden prolongar accidentalmente, tal como la falta de disponibilidad de camas.

[0165] En resumen, los datos de este estudio demuestran que el régimen de dosificación administrado logró el punto final farmacocinético. Además, a pesar del tamaño extremadamente pequeño de muestra del estudio, este estudio demostró diferencias claras dependientes del tratamiento en favor de L-citrulina en la duración de la ventilación mecánica y la terapia inotrópica entre los grupos tratados y de control. En combinación en una variable compuesta, los resultados demuestran la eficacia terapéutica clínicamente significativa de la citrulina en el momento de alta de la unidad de cuidados intensivos. Por lo tanto, los resultados de este estudio indican que el tratamiento con citrulina IV puede cumplir una función beneficiosa en la prevención de secuelas de lesiones pulmonares inducidas por el CPB.

[0166] Aunque la invención se describió en conexión con dicha modalidad preferida, no se limita a esto, sino que únicamente la limitará el alcance de las reivindicaciones que se encuentran a continuación.

REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

- 5 1. Un método para mantener el tono vascular pulmonar en un paciente sometido a cirugía por un defecto cardíaco que comprende:
- (a) la administración de citrulina al paciente al inicio de la cirugía,
- (b) la administración de citrulina al paciente durante la cirugía y
- 10 (c) la infusión de citrulina al paciente después de la cirugía.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho defecto cardíaco se asocia con un flujo sanguíneo pulmonar excesivo.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho defecto cardíaco es un defecto del tabique interauricular.
4. El método de la reivindicación 3, en el que dicho defecto del tabique interauricular es un defecto del tabique arterial grande.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho defecto cardíaco es un defecto del tabique interventricular.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho defecto del tabique interventricular es un defecto del tabique ventricular (VSD) no restringido grande.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho defecto cardíaco es una única lesión ventricular.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, en el que la única lesión ventricular se repara mediante procedimientos de Glenn y Fontan.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha cirugía es un procedimiento de transposición arterial.

5 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha cirugía es *bypass* cardiopulmonar.

10 11. El método de la reivindicación 10, en el que el *bypass* cardiopulmonar pretende reparar un defecto de tabique auriculoventricular (AVSD) parcial o total.

12. El método de la reivindicación 10, en el que el *bypass* cardiopulmonar pretende reparar un defecto de tabique interauricular ostium primum (primum ASD).

15

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el bolo de citrulina al inicio de la cirugía es de alrededor de 100-300 mg/kg de citrulina.

20 14. El método de la reivindicación 12, en el que el bolo de citrulina al inicio de la cirugía es de alrededor de 150 mg/kg de citrulina.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que se administra citrulina durante la cirugía al filtrado.

25

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que se administra citrulina durante la cirugía al fluido de reemplazo de hemoconcentración.

30 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que se agrega la citrulina a alrededor de 100-300 $\mu\text{mol/L}$.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que se agrega la citrulina a alrededor de 200 $\mu\text{mol/L}$.

5 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que se administra un bolo de citrulina alrededor de 15-45 minutos después de la cirugía.

20. El método de la reivindicación 19, en el que se administra un bolo de citrulina alrededor de 30 minutos después de la cirugía.

10

21. El método de la reivindicación 20, en el que el bolo de citrulina es de alrededor de 20 mg/kg de citrulina.

15

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que se administra un bolo de citrulina alrededor de 30 minutos después de la extubación del *bypass* cardiopulmonar (CPB).

20

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que el paciente recibe una infusión de citrulina después de la cirugía durante alrededor de 48 horas.

24. El método de la reivindicación 23, en el que la infusión es de alrededor de 9 mg/kg/hora.

25

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que la citrulina se administra de forma intravenosa.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que la citrulina se administra de forma perioperatoria.

30

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que se administra un bolo de citrulina al inicio del procedimiento

quirúrgico.

28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que el bolo de citrulina es de alrededor de 150 mg/kg.

5

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que la citrulina se agrega a alrededor de 200 $\mu\text{mol/L}$ el fluido de hemoconcentración y filtración utilizado durante la cirugía.

10 30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que se administra un bolo de alrededor de 20 mg/kg de citrulina luego de la extubación del *bypass* cardiopulmonar.

15 31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que, luego de la extubación del *bypass* cardiopulmonar, se administra una infusión continua de 9 mg/kg/h de citrulina, opcionalmente, durante alrededor de 48 horas.

20 32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que se administra un bolo de 150 mg/kg de citrulina al inicio de la cirugía, seguido de una infusión continua de 9 mg/kg/hora de citrulina 4 horas después de la cirugía.

25 33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en el que el paciente tiene un genotipo de T1405N en el gen de CPSI de CC, AC, AA o una combinación.

34. El método de la reivindicación 33, en el que el paciente tiene un genotipo de T1405N en el gen de CPSI de CC.

30

35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en el que se eleva el nivel de citrulina en plasma del paciente por encima de

alrededor de 37 $\mu\text{mol/L}$.

36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en el que se eleva el nivel de citrulina en plasma del paciente por encima de
5 alrededor de 100 $\mu\text{mol/L}$.

37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en el que se eleva el nivel de citrulina en plasma del paciente por encima de alrededor de 100 $\mu\text{mol/L}$ después de la cirugía.

10

38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en el que se eleva el nivel de citrulina en plasma del paciente a alrededor de 100-200 $\mu\text{mol/L}$ después de la cirugía.

15 39. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en el que se eleva el nivel de citrulina en plasma del paciente durante hasta 48 horas después de la cirugía.

20 40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-39, en el que el paciente tiene menos de alrededor de 6 años.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-39, en el que el paciente tiene menos de alrededor de 10 días.

25 42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-39, en el que el paciente se encuentra en riesgo de padecer de hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN).

30 43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-39, en el que el paciente se encuentra en riesgo de sufrir lesiones pulmonares.

44. Un método para mantener el tono vascular pulmonar en un paciente

sometido a cirugía por un defecto cardíaco que comprende:

(a) la administración de alrededor de 150 mg/kg de citrulina al paciente al inicio de la cirugía,

5 (b) la administración de citrulina al paciente a alrededor de 200 $\mu\text{mol/L}$ al fluido de hemoconcentración y filtración utilizado durante la cirugía, y

(c) la infusión de alrededor de 9 mg/kg/hora de citrulina al paciente luego de la cirugía durante alrededor de 4-48 horas.

10 45. Un método para mantener los niveles de citrulina en plasma en un paciente sometido a cirugía por un defecto cardíaco que comprende:

(a) la administración de alrededor de 150 mg/kg de citrulina al paciente al inicio de la cirugía,

15 (b) la administración de citrulina al paciente a alrededor de 200 $\mu\text{mol/L}$ al fluido de hemoconcentración y filtración utilizado durante la cirugía, y

(c) la infusión de alrededor de 9 mg/kg/hora de citrulina al paciente luego de la cirugía durante alrededor de 4-48 horas.

RESUMEN

Un método para administrar citrulina a un paciente durante la cirugía sin filtración de la hemólisis.

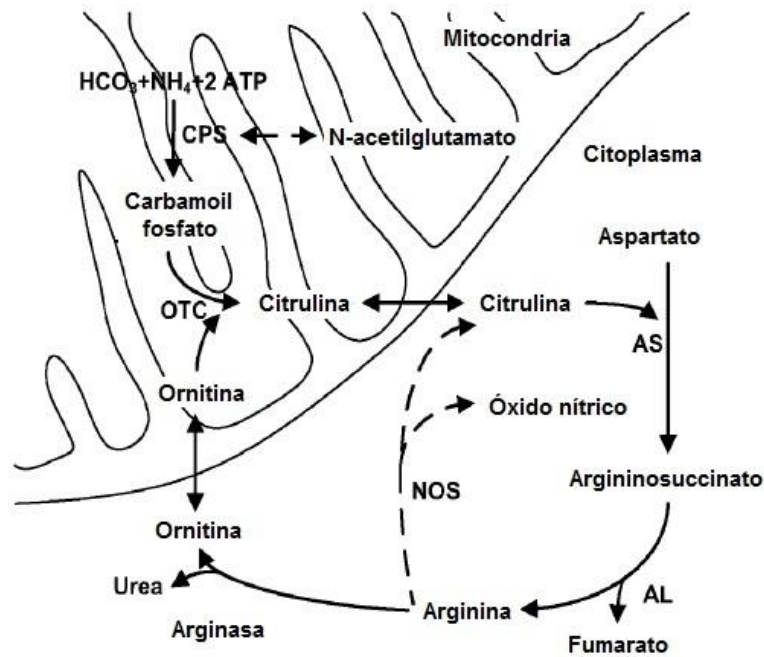


FIG. 1

Efecto del genotipo en arginina y citrulina

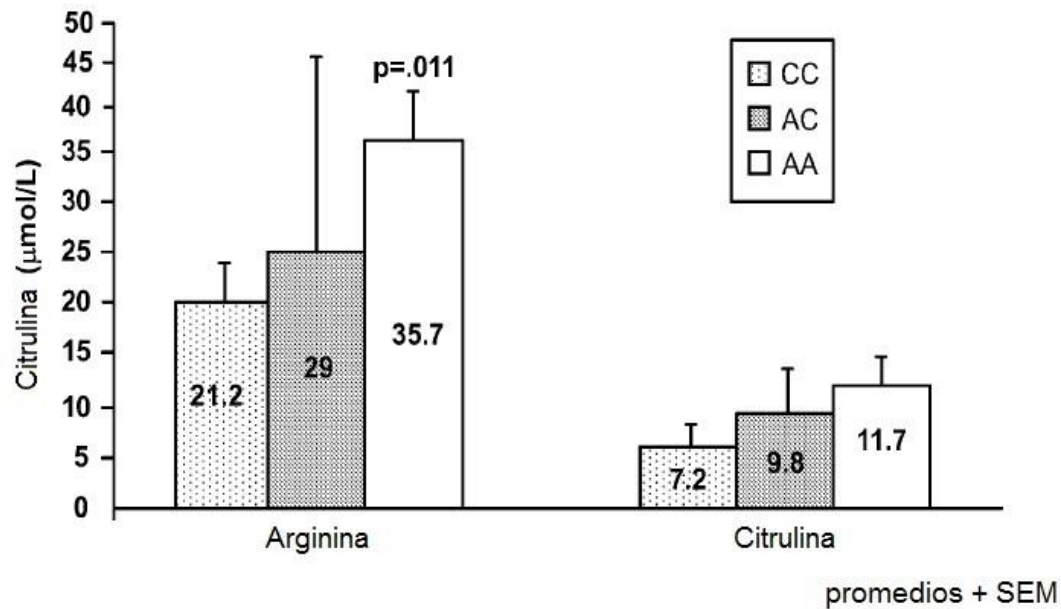


FIG. 2

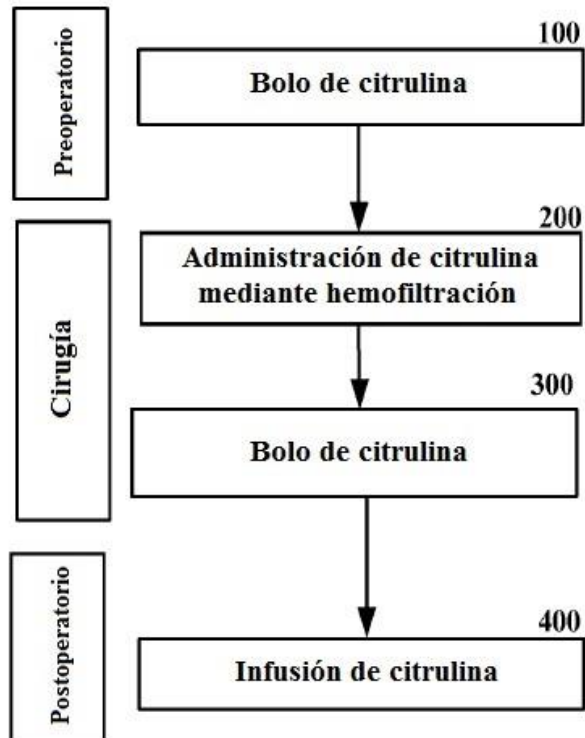


FIG. 3

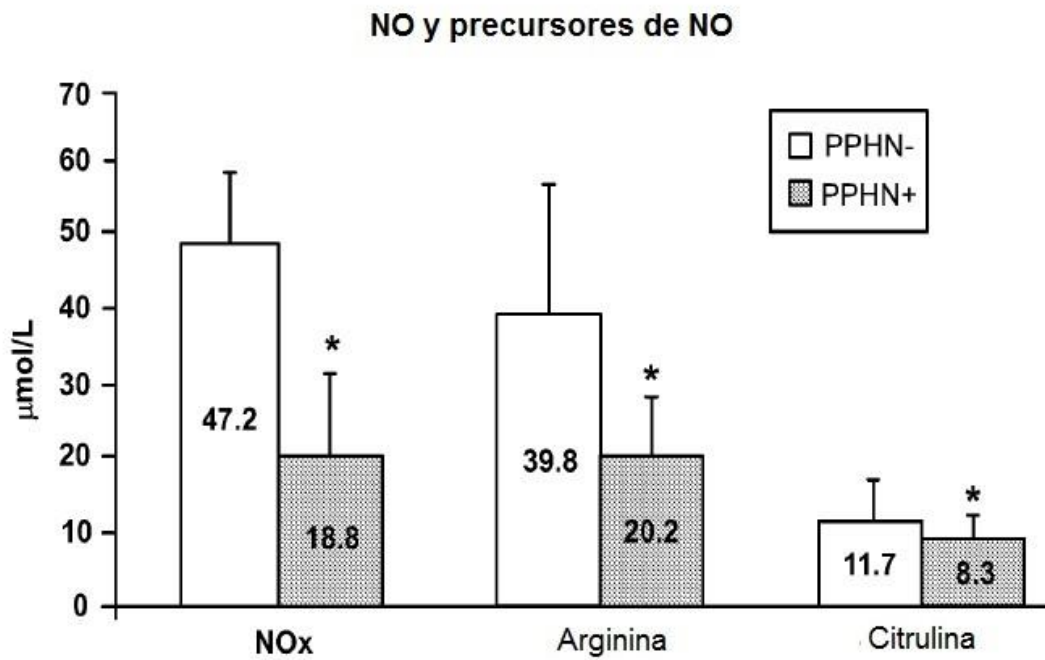
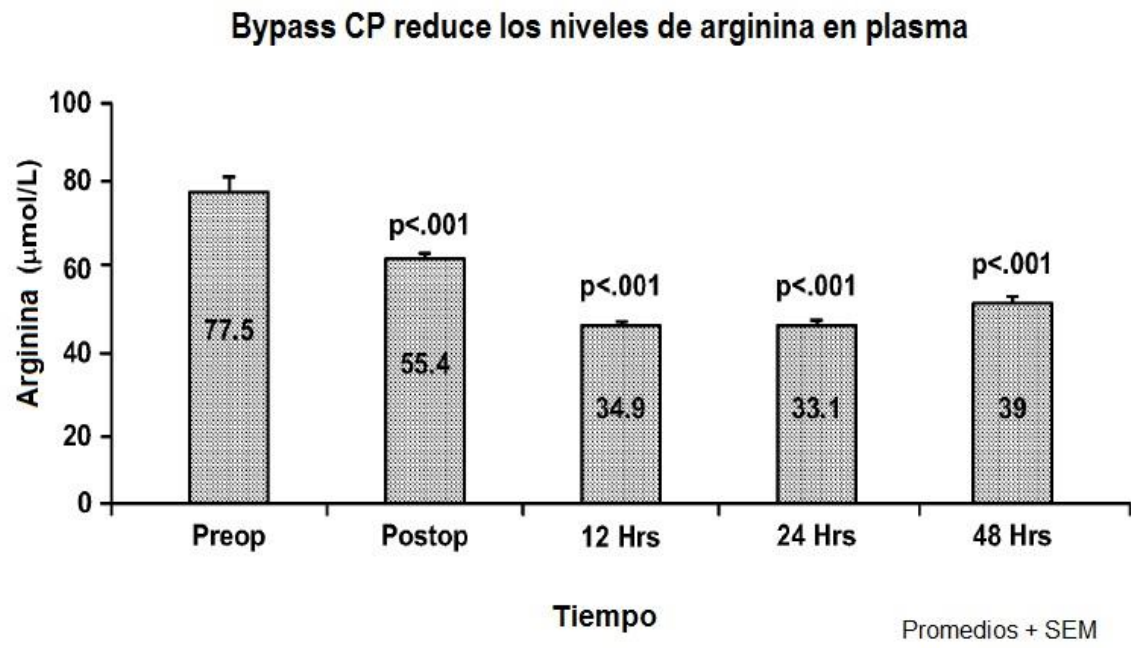
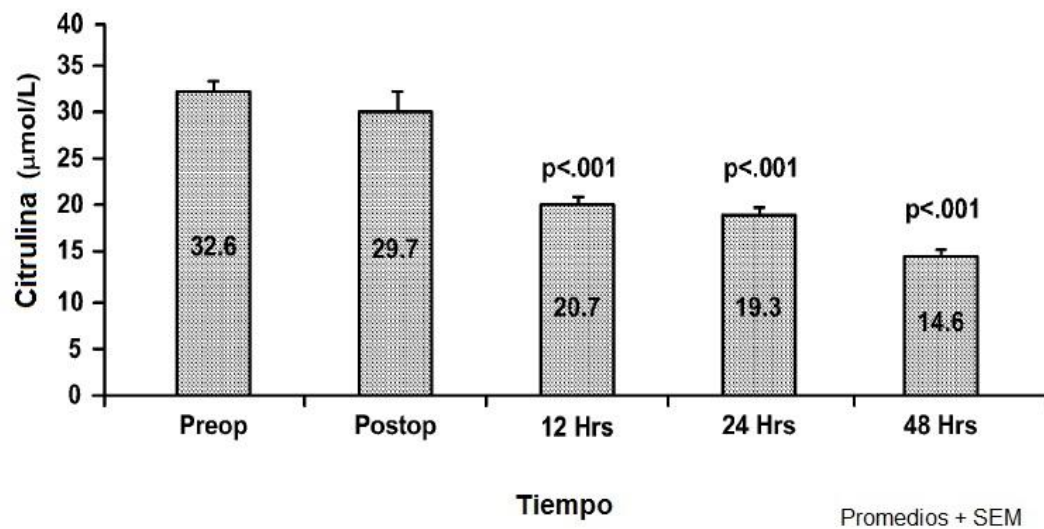
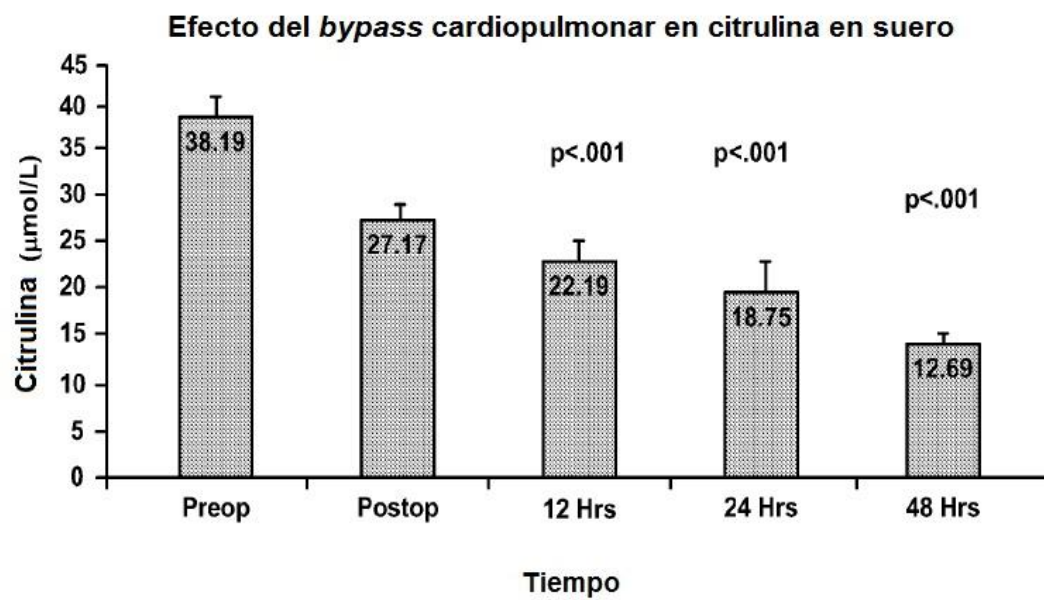


FIG. 4

**FIG. 5**

Bypass CP reduce los niveles de citrulina en plasma**FIG. 6A****FIG. 6B**

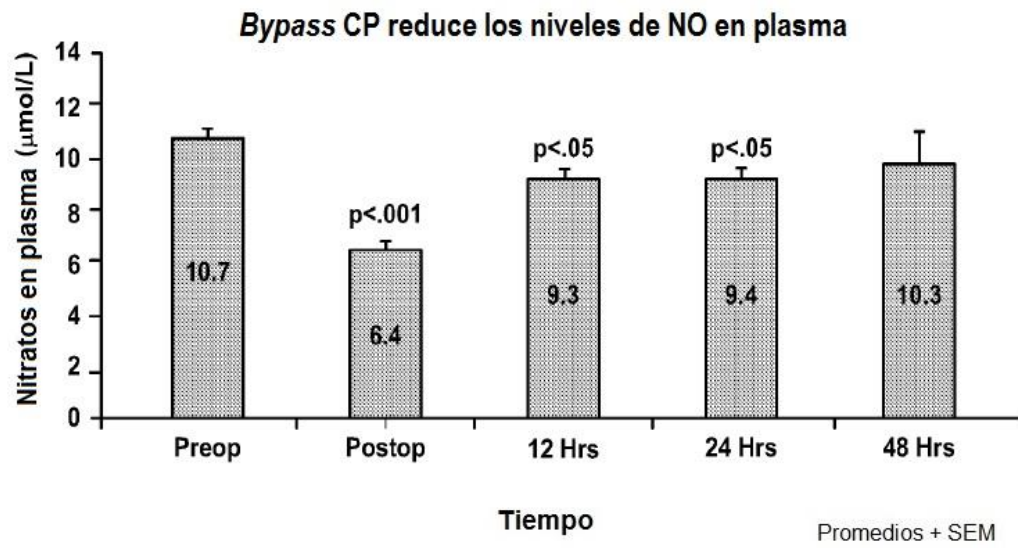


FIG. 7

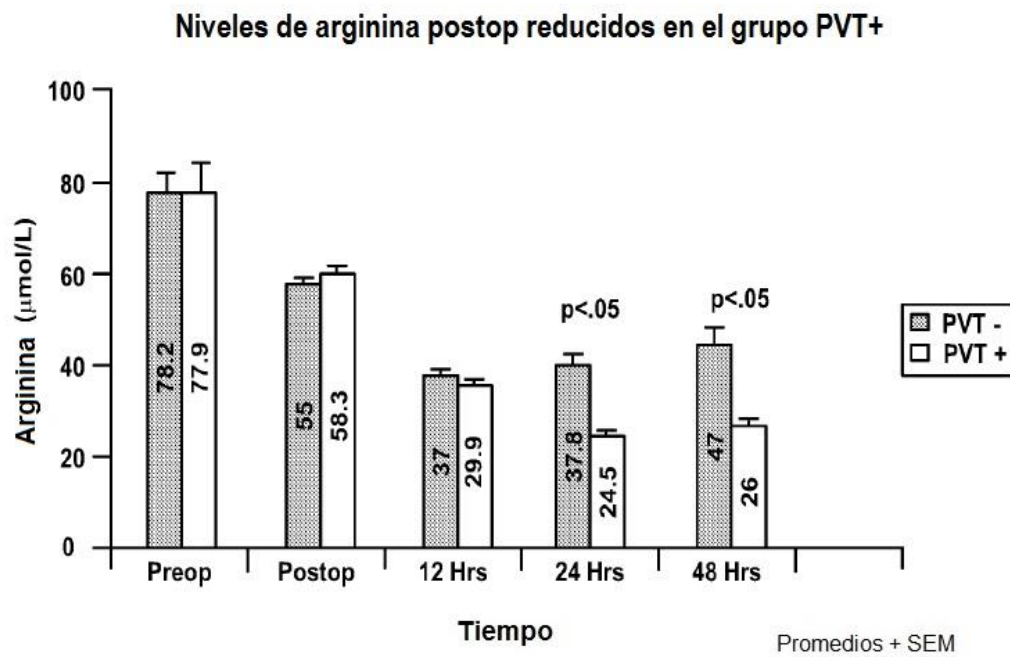


Fig. 8

FIG. 9A

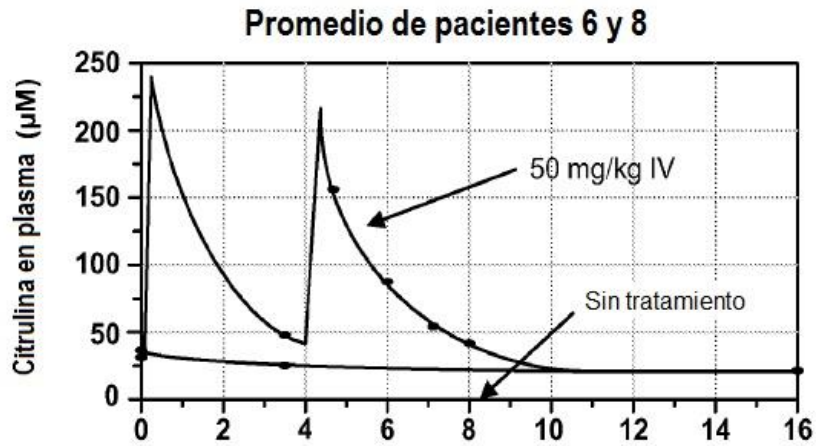


FIG. 9B

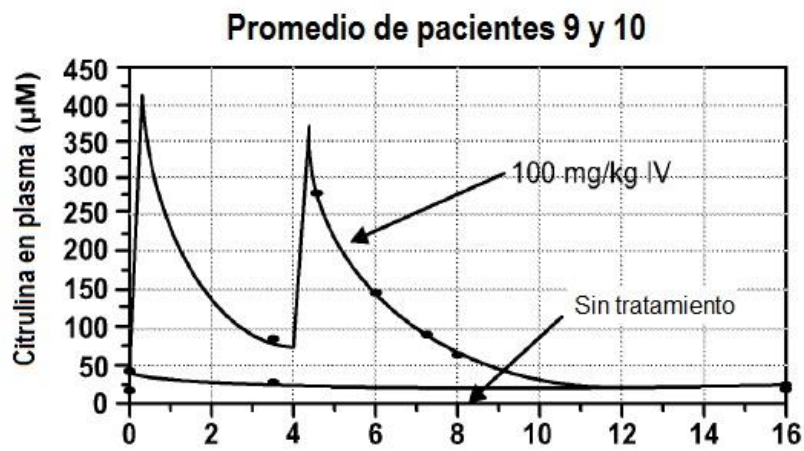
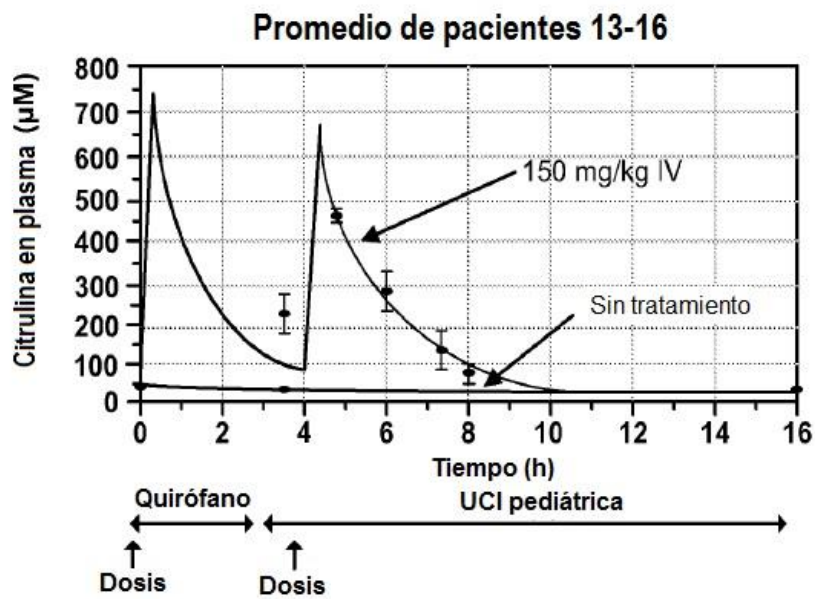
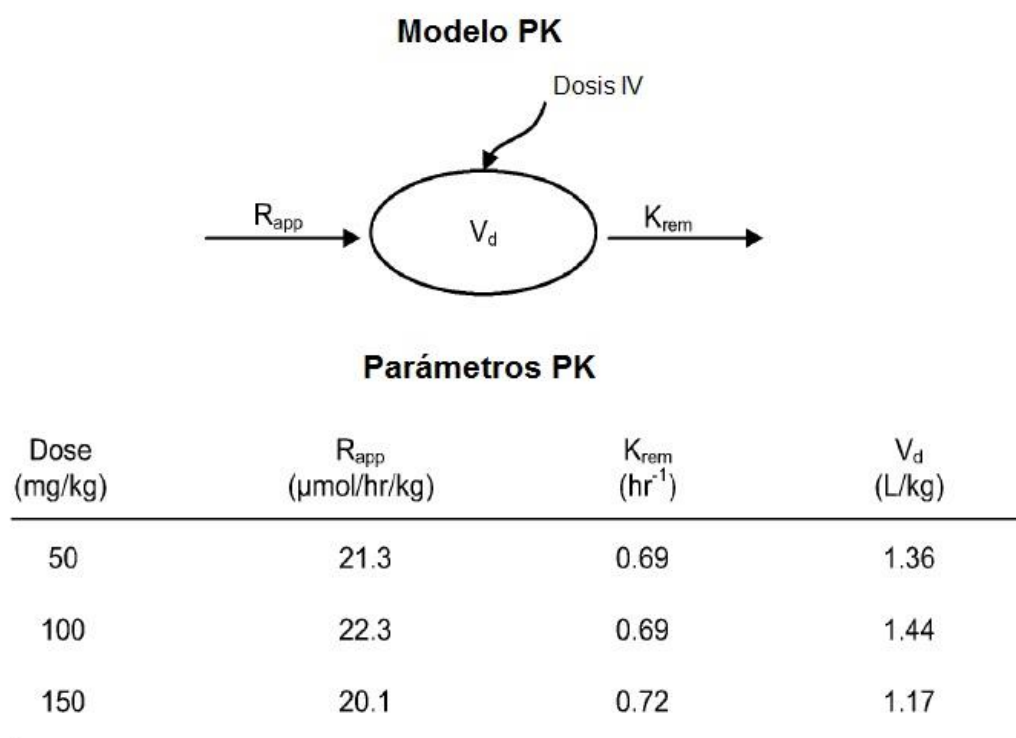


FIG. 9C



**FIG. 10**

Niveles de citrulina promedio en lactantes

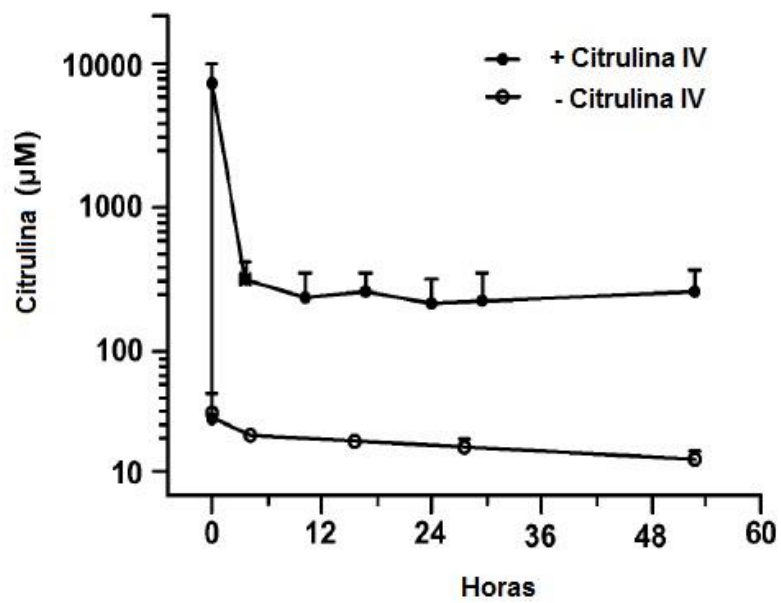


FIG. 11A

Niveles de arginina promedio en lactantes

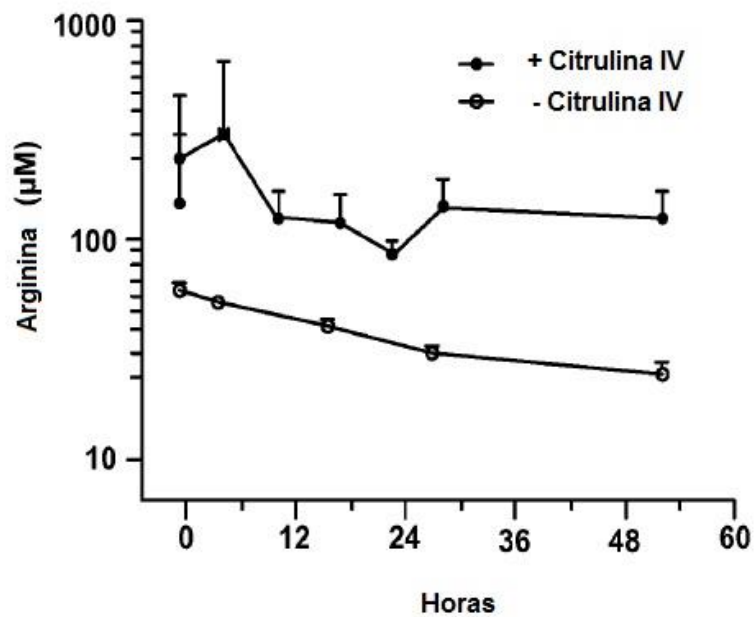


FIG. 11B

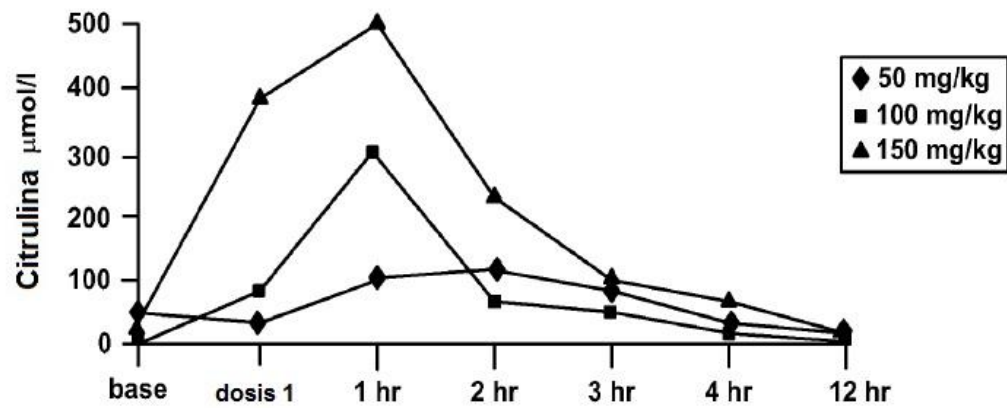


FIG. 12

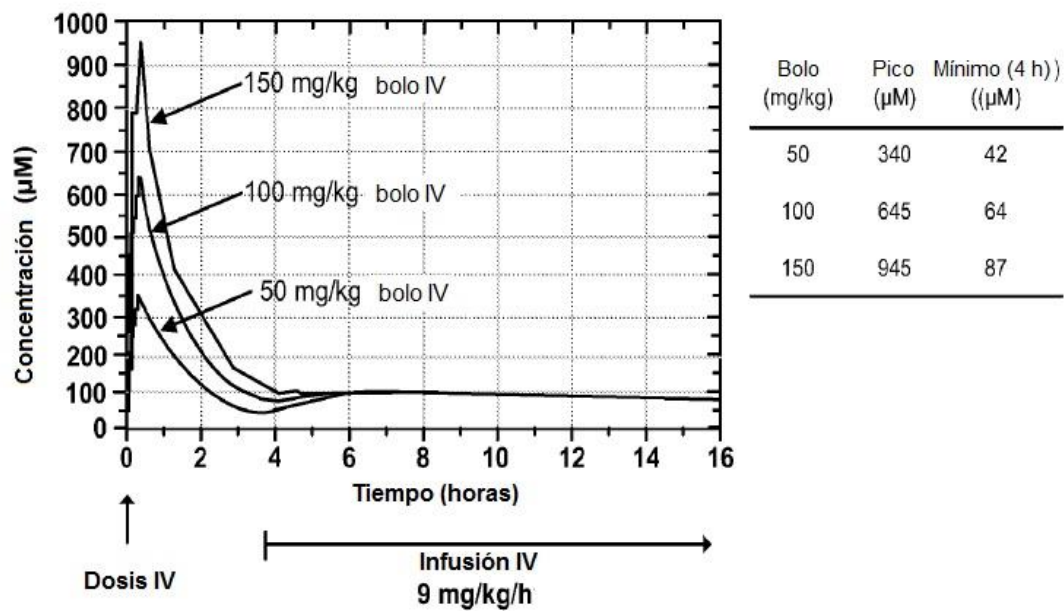


FIG. 13

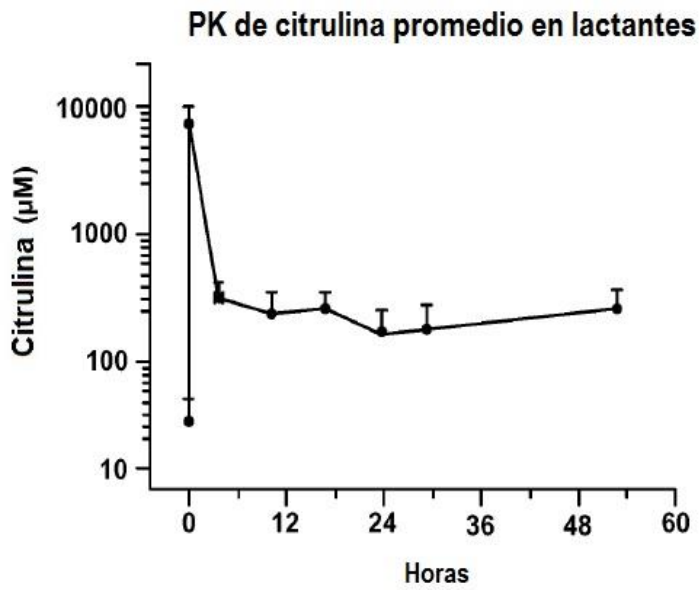


FIG. 14A

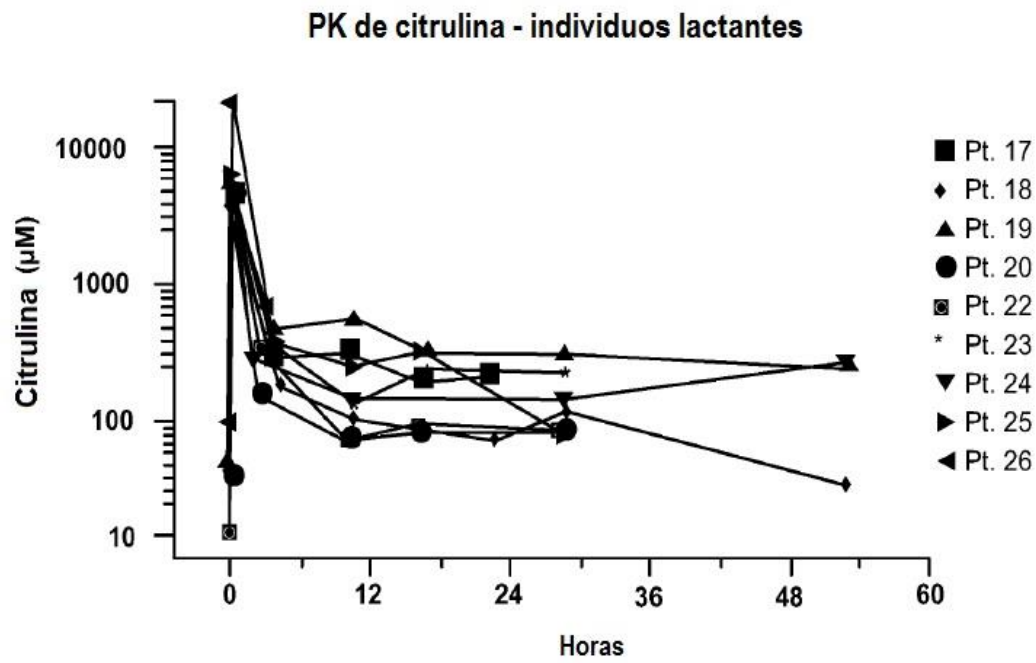
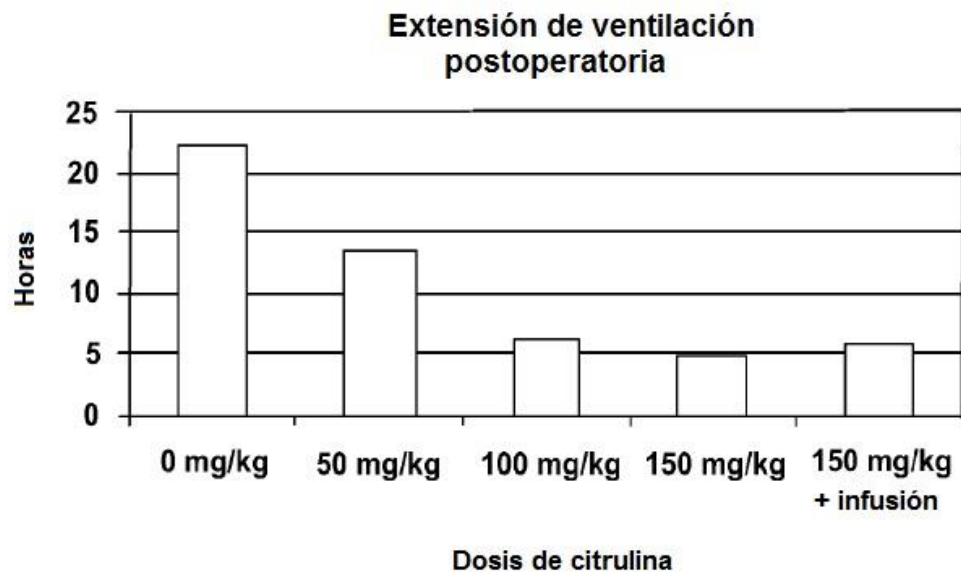
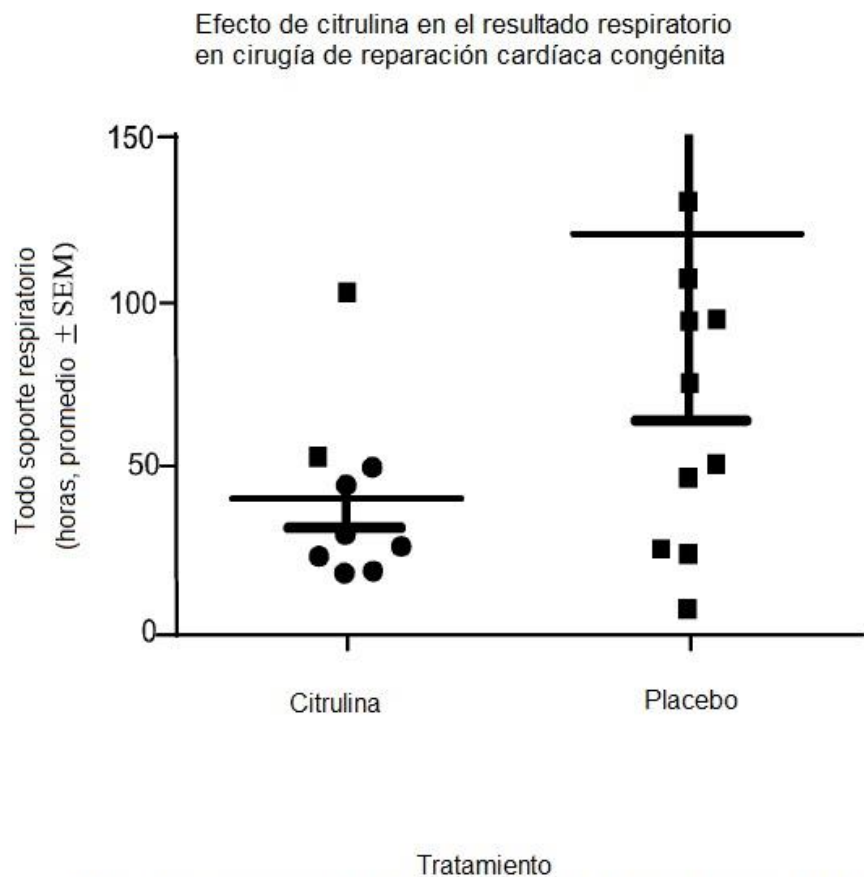
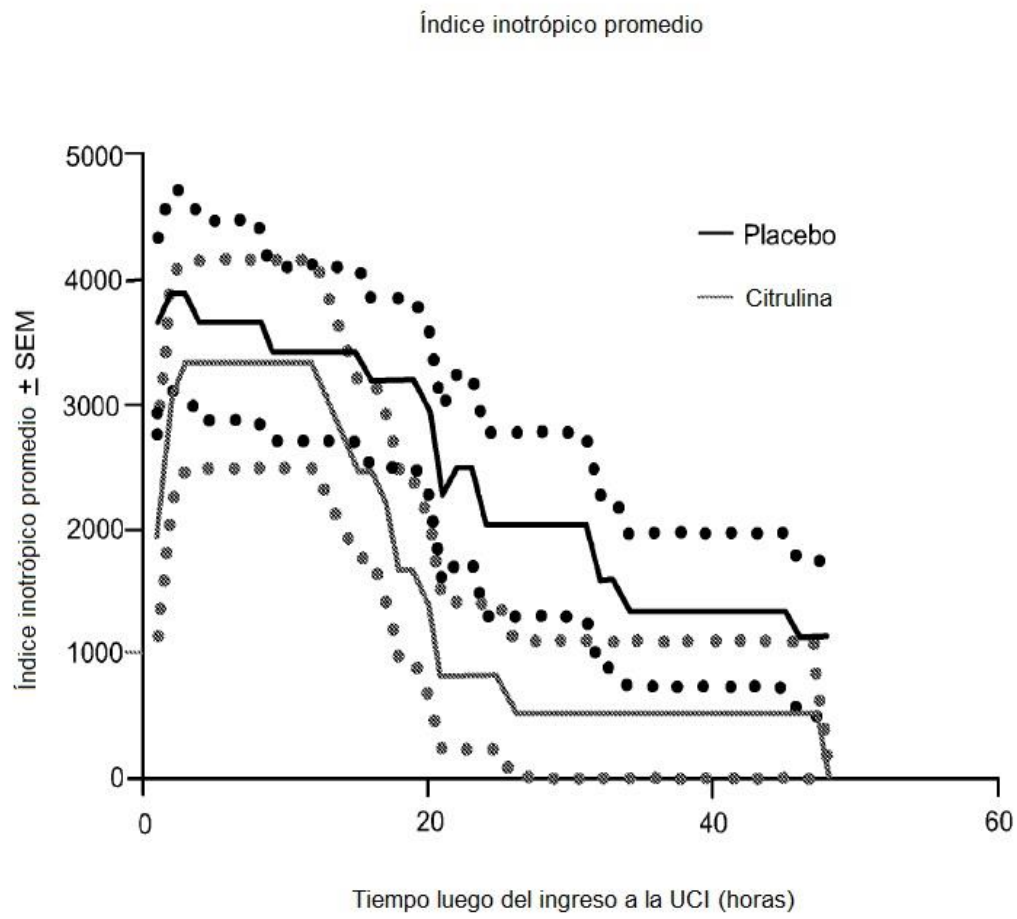


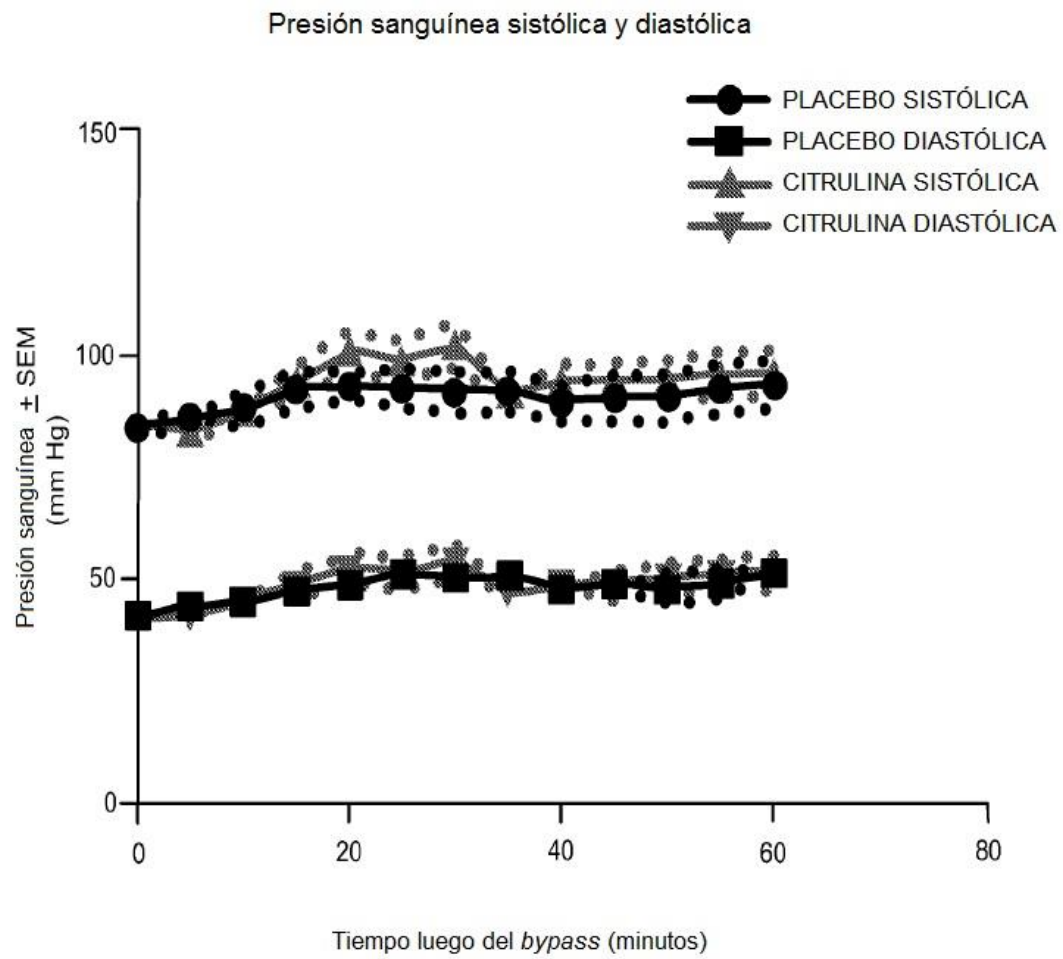
FIG. 14B

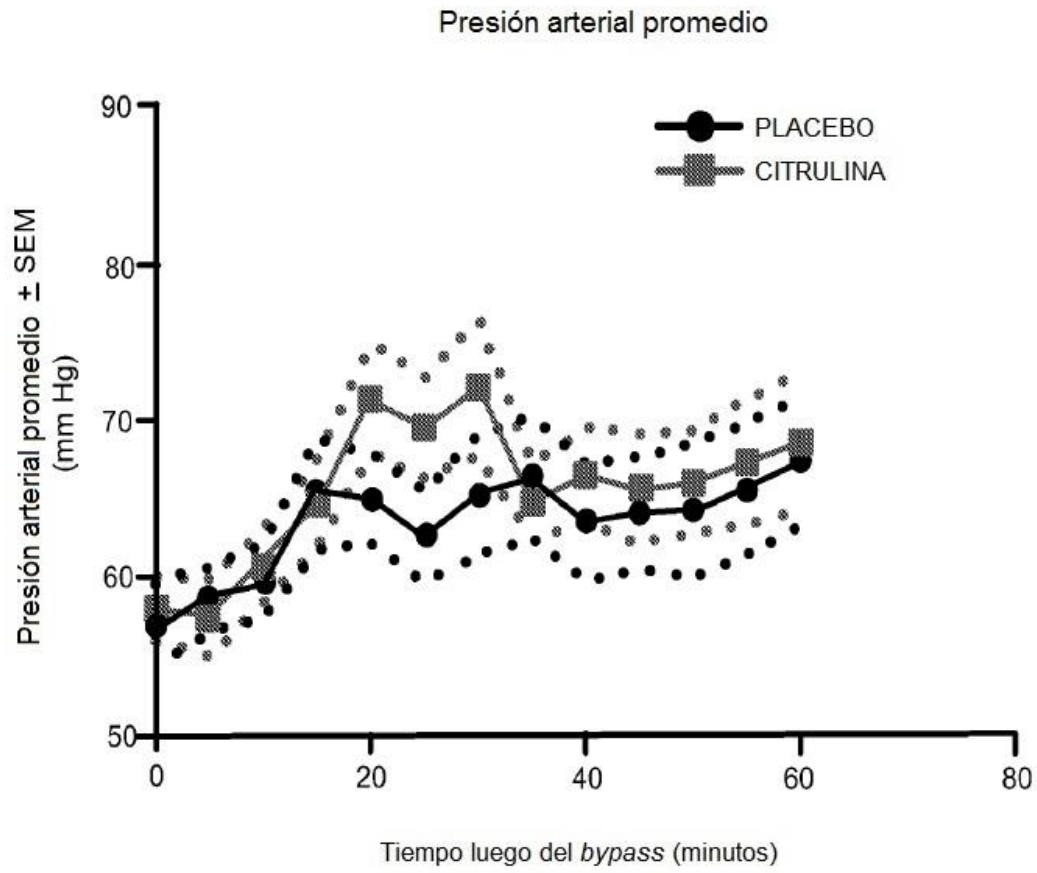
**FIG. 15**

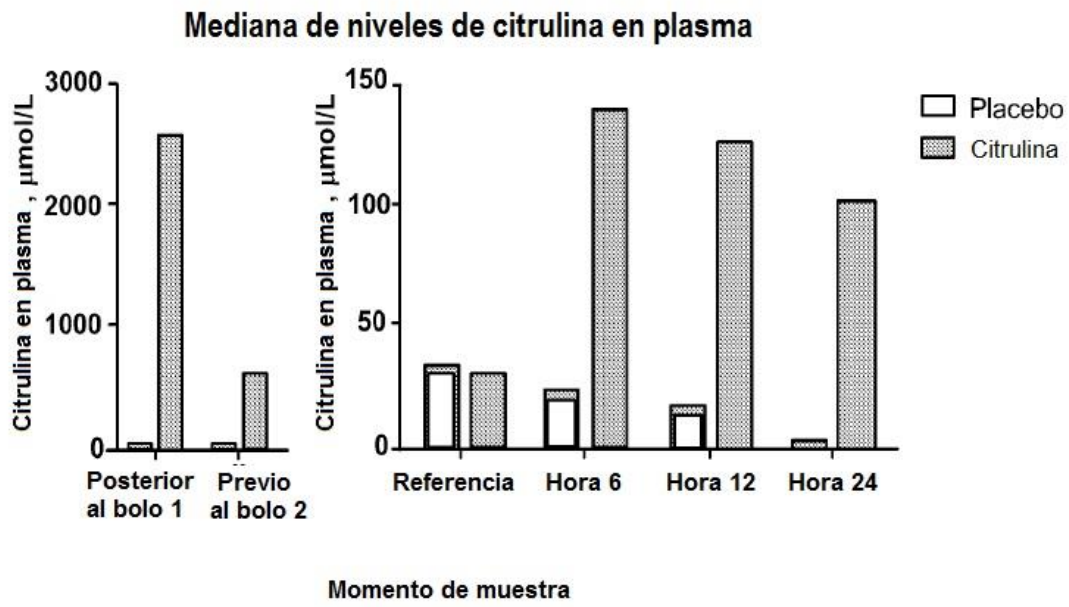
Nota: 1 dato se encuentra fuera de los límites del eje (placebo, 672 h)
 $P = 0.1911$ test de Satterthwaite, $n = 20$ pacientes utilizables

FIG. 16

**FIG. 17**

**FIG. 18A**

**FIG. 18B**

**FIG. 19**

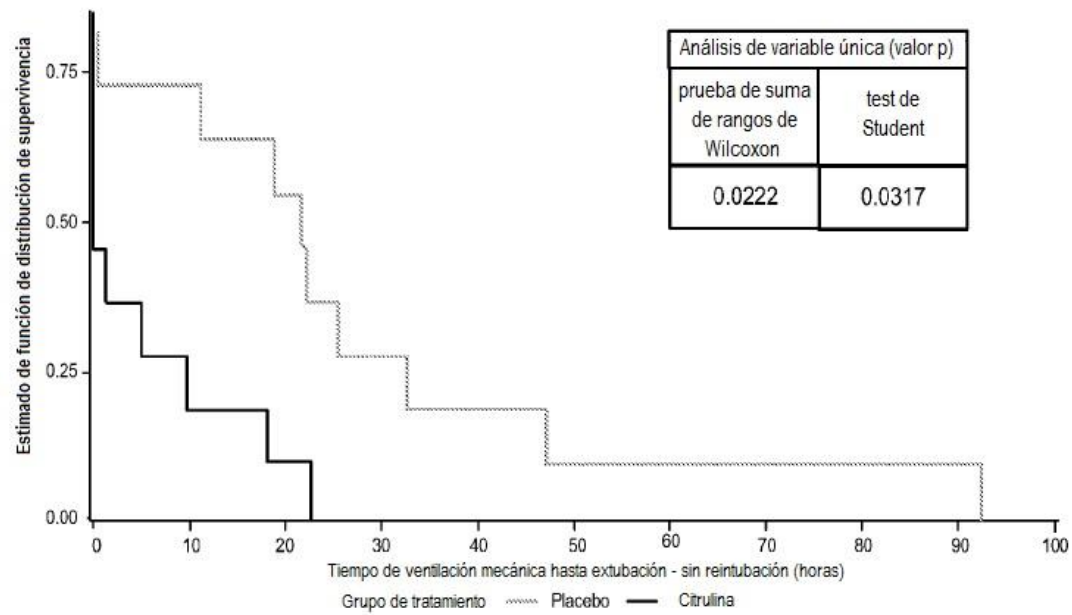
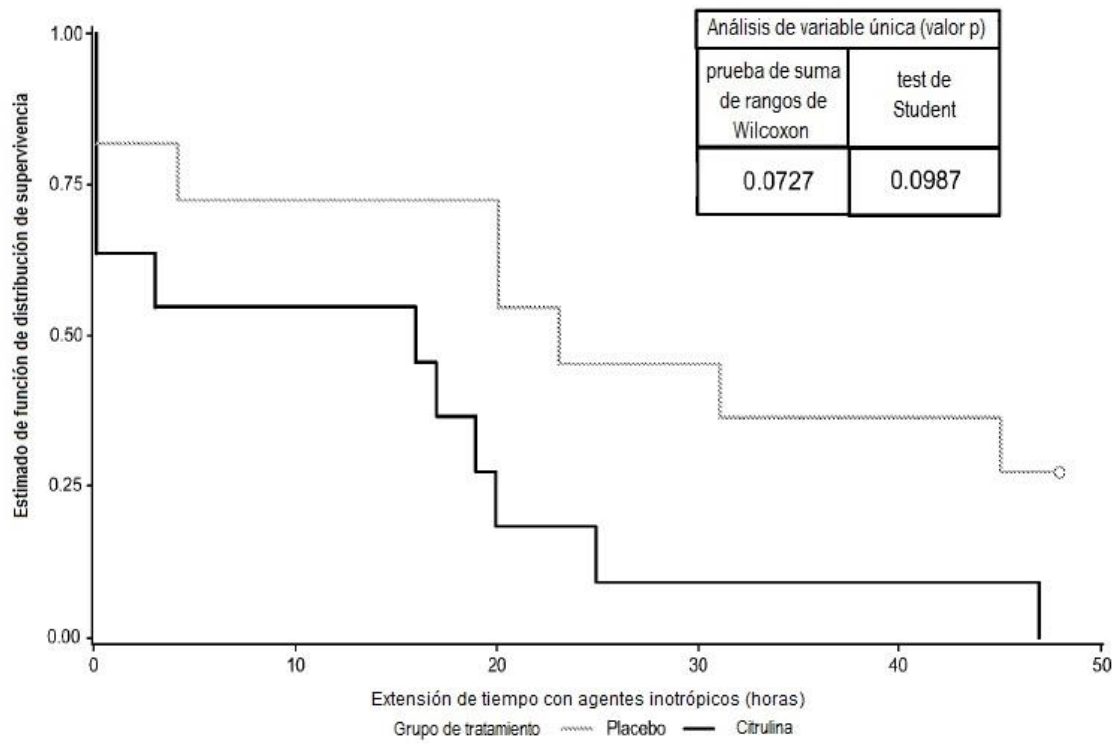
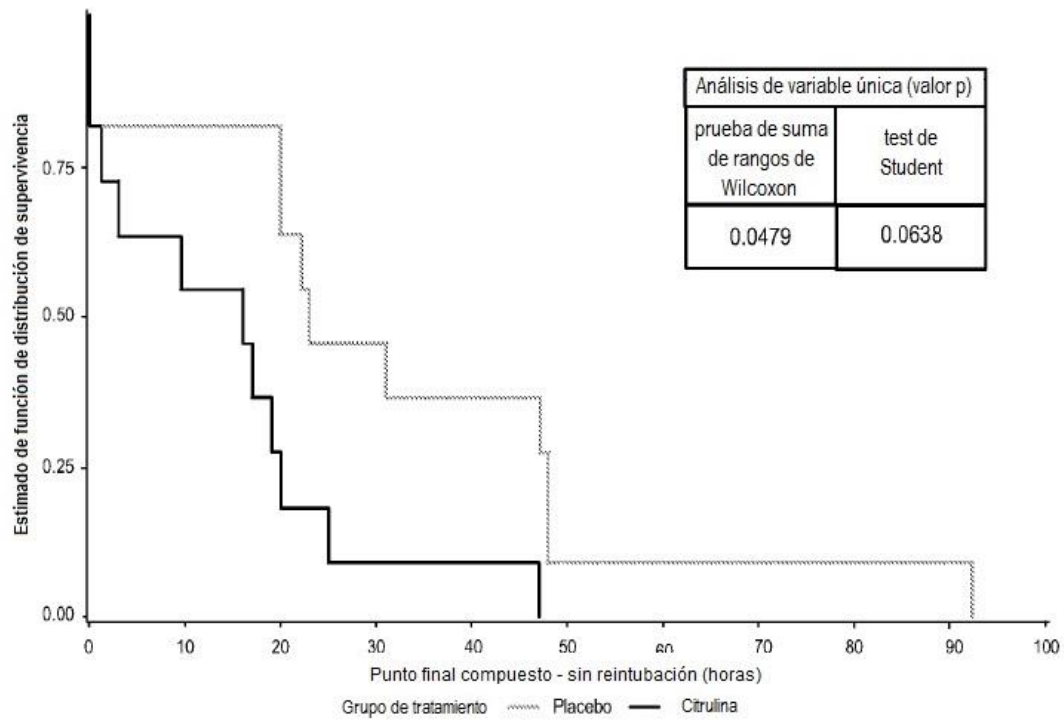


FIG. 20

**FIG. 21**

**FIG. 22**