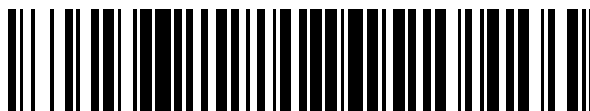


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 530**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/198** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

**A61P 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2009 PCT/US2009/032824**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009 WO09099998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2009 E 09707788 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2247297**

54 Título: **Tratamiento terapéutico para afecciones pulmonares**

30 Prioridad:

**31.01.2008 US 25157**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.07.2019**

73 Titular/es:

**VANDERBILT UNIVERSITY (100.0%)  
1207 17th Avenue South, Suite 105  
Nashville, TN 37212, US**

72 Inventor/es:

**SUMMAR, MARSHALL, L.;  
BARR, FREDERICK, E.;  
FIKE, CANDICE, D. y  
ASCHNER, JUDY, L.**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 719 530 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Tratamiento terapéutico para afecciones pulmonares

5 CAMPO TÉCNICO

La materia aquí descrita se refiere al tratamiento de la displasia broncopulmonar (DBP), tal como en lactantes.

10 ANTECEDENTES

10 La displasia broncopulmonar (DBP) aparece normalmente en bebés, en particular bebés prematuros, y se caracteriza como una lesión aguda de los pulmones por ventilación de oxígeno y/o ventilación mecánica, que da lugar a la interferencia con o la inhibición del desarrollo alveolar y vascular pulmonar (Jobe et al. (2001) *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1723-1729). En modelos animales, el NO inhalado mejora tanto el intercambio de gases como el desarrollo estructural de pulmón, pero el uso de esta terapia en bebés en riesgo de DBP es controvertido (Ballard et al (2006) *N Engl J Med* 355: 343-353).

20 Los bebés con enfermedad pulmonar crónica y cardiopatía congénita cianótica con frecuencia sufren de hipoxia. Debido a sus efectos sobre arterias pulmonares existentes y en desarrollo, la hipoxia crónica provoca cambios progresivos en la función y la estructura de la circulación pulmonar. Shimoda L, et al, *Physiol Res* (2000) 49: 549-560; Subhedar, NV, *Acta Paediatr suppl* (2004) 444: 29-32. En última instancia, la hipoxia crónica da lugar a hipertensión pulmonar severa que culmina en insuficiencia cardíaca del lado derecho y muerte.

25 Nelin, et al. (2004) *FASEB Journal* 18 (4-5): A327, describe que la producción de NO se ve afectada en los pulmones de los lechones expuestos a hipoxia crónica. Nelin, página 524. Nelin informa que la vasoconstricción debido a hipoxia aguda en pulmones aislados de cerdo es atenuada por la perfusión del pulmón aislado con arginina a una concentración de 1 mM. El enfoque de Nelin es la comparación de los efectos de la L-arginina y D-arginina.

30 Fike, et al. (2000) *Journal of Applied Physiology* 88 (5): 1797-1803 informa de que la perfusión con L-arginina a una concentración de 10 mM mejora la hipertensión pulmonar en los pulmones de lechones expuestos a hipoxia crónica. Fike, página 1800, la Tabla 3. El objetivo de la administración de L-arginina para el tratamiento de la hipertensión pulmonar, tal como se describe en Fike, es aumentar los niveles de NO. Fike, página 1802.

35 Mitani, et al. (1997) *Circulation* 96 (2): 689-697 informa que la L-arginina mejoró los cambios asociados con la hipertensión pulmonar en modelos de rata de hipertensión, sugerido para ser debido a la modificación de la producción de NO endógeno. Mitani, p. 694. Mitani informa estudios sobre dos modelos de daño pulmonar utilizando ratas adultas tratadas con (1) la hipoxia crónica o (2) monocrotalina. Mitani observó los efectos de la "paradoja de la arginina" que reduce la eficacia de la arginina.

40 Fagan, et al. (1999) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254 (1): 100-103 da a conocer que la hipoxia crónica da lugar a una menor liberación de NO y puede contribuir a la aparición de hipertensión pulmonar. Fagan observa que los niveles plasmáticos de arginina, el sustrato para la sintasa de óxido nítrico (NOS) no fueron significativamente diferentes durante la hipoxia, lo que indica que los niveles de arginina en plasma se mantienen a concentraciones normales durante la exposición hipóxica. Fagan, página 102.

45 McCaffrey, et al. (1995) *Biology of the Neonate* 67 (4): 240-243 contempla el tratamiento de la hipertensión pulmonar en los recién nacidos mediante la administración intravenosa de L-arginina en un bolo de 2,87 mmoles/kg. McCaffery advierte que, "[el] propósito de este estudio piloto fue evaluar la seguridad y eficacia de la administración intravenosa de L-arginina en bebés con hipertensión pulmonar persistente." Id., 240-241. McCaffery señala que, "la eficacia ... debe ser confirmada en ensayos controlados con placebo que también deberían evaluar la seguridad y los beneficios de un régimen de dosis múltiples de L-arginina." Id., 243.

50 La divulgación de Smith, et al. (2006) *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 132 (1): 58-65 señala la reducción de la presión de retorno en el corazón para permitir que el corazón se someta a reparación. Smith sugiere que la administración de citrulina es eficaz para "prevenir la hipertensión pulmonar después de la operación". En consecuencia esta especulación se limita al tratamiento post-operatorio de un subconjunto de pacientes de cirugía cardíaca congénita. Smith, página 64.

60 Romero, et al. (2006) *Cardiovascular Drug Reviews* 24 (3-4): 275-290 sugieren que la citrulina es prometedora como complemento terapéutico en enfermedades asociadas con deficiencias de arginina. Romero, página 277. Al igual que Smith, Romero sugiere que los suplementos de citrulina pueden tener efectos beneficiosos para el tratamiento de enfermedades en las que la suplementación con arginina es eficaz. Estas enfermedades incluyen, entre otras, la hipertensión sistémica y la disfunción cardiovascular. Romero, páginas 284-285.

65 Ballard, et al. (2006) *New England Journal of Medicine*, vol. 355, no. 4, p. 343-353 describe que el NO inhalado conduce a una mejora en la DBP.

En consecuencia, estrategias para el tratamiento de enfermedades pulmonares, tales como DBP y la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica, y adicionalmente, tal como en bebés, representan una necesidad largamente necesaria y continua en la técnica.

5

## CARACTERÍSTICAS

La materia aquí divulgada proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de citrulina eficaz para su uso en el tratamiento de sujetos con riesgo de sufrir o que sufren displasia broncopulmonar (DBP).

10

En algunas realizaciones, la composición se formula para administración oral, administración intravenosa o una combinación de las mismas.

15

Habiéndose indicado un objeto de la materia aquí divulgada, otros objetos resultarán evidentes a medida que avanza la descripción, cuando se tome en relación con los dibujos y ejemplos que se acompañan como mejor se describe más adelante.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20

La Figura 1 es un esquema del ciclo de la urea.

La Figura 2 es un diagrama de flujo de los procedimientos de estudio seguido en los Ejemplos.

25

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra mediciones de la presión arterial pulmonar promedio en lechones de control (n = 6), con hipoxia crónica (n = 11) y con hipoxia crónica tratados con L-citrulina (n=6). Todos los valores son el promedio  $\pm$  SEM. \*diferente del control; \*Diferente de hipoxia crónica; p <0,05, ANOVA con el test de comparación post-hoc.

30

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra la resistencia vascular pulmonar calculada en lechones de control (n = 6), con hipoxia crónica (n = 11) y con hipoxia crónica tratados con L-citrulina (n = 6). Todos los valores son el promedio  $\pm$  SEM. \*diferente del control; \*Diferente de hipoxia crónica; p <0,05, ANOVA con el test de comparación post-hoc.

35

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra el óxido nítrico exhalado en lechones de control (n = 6), con hipoxia crónica (n = 11) y con hipoxia crónica tratados con L-citrulina (n=6). Todos los valores son el promedio  $\pm$  SEM. \*diferente del control; \*Diferente de hipoxia crónica; p <0,05, ANOVA con el test de comparación post-hoc.

40

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra la acumulación de nitrito/nitrato en perfundido de pulmón en lechones de control (n = 17), con hipoxia crónica (n = 9) y con hipoxia crónica tratados con L-citrulina (n=5). Todos los valores son el promedio  $\pm$  SEM. \*diferente del control; \*Diferente de hipoxia crónica; p <0,05, ANOVA con el test de comparación post-hoc.

45

La Figura 7A es una imagen de una inmunotransferencia para la proteína eNOS resonada para la actina para el tejido pulmonar de lechones de control (n = 3), con hipoxia crónica (n = 3) y con hipoxia crónica tratados con L-citrulina (n = 3).

50

La Figura 7B es un gráfico de barras que muestra la densitometría de eNOS normalizada para actina para el tejido pulmonar de lechones de control (n = 3), con hipoxia crónica (n = 3) y con hipoxia crónica tratados con L-citrulina (n = 3).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

55

Los nacimientos prematuros siguen siendo el principal desafío en obstetricia y neonatología, lo que representa la mayor parte de la mortalidad perinatal y morbilidad neurológica a largo plazo entre los recién nacidos. La DBP es una de las muchas complicaciones que pueden estar asociadas con el parto prematuro. La DBP puede estar asociada con la hospitalización prolongada de un recién nacido prematuro, múltiples reingresos durante los primeros años de vida y retrasos en el desarrollo. Afortunadamente, la DBP es ahora poco frecuente en los bebés de más de 1200 g de peso al nacer o con gestaciones que excedan las 30 semanas (Jobe et al (2001) Am J Respir Crit Care Med 163: 1723-1729). La incidencia de la DBP definida como una necesidad de oxígeno a las 36 semanas de edad postmenstrual es de aproximadamente 30% para bebés con un peso al nacer <1.000 g (Jobe et al (2001) Am J Respir Crit Care Med 163: 1723-1729). Algunos de estos bebés tienen enfermedad pulmonar grave, requiriendo ventilación y/u oxígeno suplementario durante meses o incluso años.

60

65

Múltiples factores contribuyen a la DBP, y probablemente actúan aditiva o sinérgicamente para promover la lesión. La visión tradicional ha sido que la DBP es causada principalmente por lesiones mediadas por oxidantes y ventilación (Jobe et al (2001) Am J Respir Crit Care Med 163: 1723-1729). La ventilación mecánica y el oxígeno

pueden interferir con el desarrollo alveolar y vascular en bebés prematuros y se ha atribuido al desarrollo de DBP (Jobe et al (2001) *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1723-1729). La reducción del número de alvéolos puede dar lugar a una gran disminución en el área superficial, que se ha asociado con una disminución en la microvasculatura pulmonar dismórfica. Estos cambios anatómicos se asocian con aumentos persistentes en los glóbulos blancos de la sangre y los niveles de citocinas en las muestras de las vías respiratorias (Jobe et al (2001) *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1723-1729).

La inflamación también puede desempeñar un papel en el desarrollo de la DBP. Están presentes múltiples factores proinflamatorios y quimiotácticos en los espacios de aire de los bebés prematuros ventilados, y estos factores se encuentran en mayores concentraciones en los espacios de aire de los bebés que posteriormente desarrollan DBP (Jobe et al (2001) *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1723-1729). Otros factores que se consideran importantes para el desarrollo de DBP incluyen: péptidos de tipo bombesina, hiperoxia, hipoxia, mala nutrición, tratamiento con glucocorticoides y la sobreexpresión de las citocinas factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , IL-6 o IL-11 (Jobe et al (2001) *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1723-1729).

Diagnosticar la DBP generalmente comprende el seguimiento de la respiración de un bebé durante las primeras semanas de vida en busca de signos de retraso en el desarrollo pulmonar y una dependencia continua y/o aumentada en la respiración asistida. Las pruebas de diagnóstico que se pueden realizar para ayudar en el diagnóstico de DBP pueden incluir: análisis de oxígeno en sangre, radiografías de tórax, y ecocardiogramas. La DBP tradicionalmente se le ha diagnosticado cuando un bebé requiere oxígeno suplementario a las 36 semanas de edad postmenstrual. Las definiciones más recientes usadas en el diagnóstico y la definición de DBP incluyen criterios específicos para DBP "leve", "moderada" y "grave" (Ryan, RM (2006) *J Perinatology* 26: 207-209).

El tratamiento de la DBP puede incluir un enfoque con múltiple facetas para el tratamiento de los síntomas de la enfermedad y proporcionar a los pulmones de un bebé la oportunidad de desarrollarse. Los tratamientos disponibles actualmente pueden comprender: la administración de surfactante para mejorar la aireación del pulmón, ventiladores mecánicos para compensar la insuficiencia respiratoria, oxígeno suplementario para asegurar el oxígeno adecuado en sangre, medicamentos broncodilatadores para mejorar el flujo de aire en los pulmones, los corticosteroides para reducir la hinchazón y la inflamación de las vías respiratorias, control de fluido a evitar el edema pulmonar, tratamientos para el conducto arterioso permeable, y una nutrición adecuada.

La administración de óxido nítrico a través de la inhalación se ha demostrado que mejora el desarrollo del pulmón en modelos animales bebés (Ballard et al (2006) *N Engl J Med* 355: 343-353). Sin embargo, la administración de NO mediante inhalación es controvertida para sujetos humanos. Así, de acuerdo con algunas realizaciones de la materia dada a conocer aquí, la administración de la citrulina a un sujeto que sufre de DBP para aumentar de este modo la síntesis de NO in vivo puede proporcionar una alternativa a la inhalación de NO como tratamiento para DBP.

Debido a sus efectos sobre arterias pulmonares existentes y en desarrollo, la hipoxia crónica provoca cambios progresivos en la función y estructura de la circulación pulmonar. Shimoda L, et al, *Physiol Res* (2000); 49: 549-560; Subhedar, NV, *Acta Paediatr suppl* (2004); 444: 29-32. En última instancia, la hipoxia crónica da lugar a la hipertensión pulmonar grave que culmina en la insuficiencia cardíaca del lado derecho y la muerte. Actualmente, la terapia para la hipertensión pulmonar en bebés que sufren de trastornos cardiopulmonares crónicos asociadas con hipoxia persistente o episódica se limita en gran medida a la mejora de la enfermedad cardiopulmonar subyacente y los intentos de lograr una oxigenación adecuada. Abman, SH; *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* (2002) 87: F15-F18; Allen, J. y ATS subcommittee AoP, *Am J Respir Crit Care Med* (2003) 168: 356-396; Mupanemunda, RH, *Early Human Development* (1997) 47: 247-262; Subhedar, NV, *Acta Paediatr suppl.* (2004) 444: 29-32.

La citrulina es un intermedio clave en el ciclo de la urea y en la producción de óxido nítrico (NO). En el ciclo de la urea, la citrulina es un precursor para la síntesis de novo de arginina. La arginina se puede desaminar a través de la arginasa para producir urea, que posteriormente puede ser excretada para liberar el cuerpo de nitrógeno residual, en particular amoníaco. Alternativamente, la arginina puede proporcionar la producción de NO a través de la óxido nítrico sintasa. Como tal, la función del ciclo de la urea intacta es importante no sólo para la excreción de amoníaco, sino en el mantenimiento de los niveles tisulares adecuados de arginina, el precursor de NO.

El óxido nítrico es sintetizado por la óxido nítrico sintasa utilizando arginina como sustrato. El factor limitante de la velocidad en la síntesis de NO es la disponibilidad de arginina celular y la fuente preferida de arginina para la síntesis de NO es biosintetizada de novo a partir de citrulina. La ruta sintética in vivo para la arginina comienza con ornitina. La ornitina se combina con fosfato de carbamilo para producir citrulina, que a su vez se combina con aspartato, en presencia de adenosina trifosfato, para producir argininosuccinato. En la etapa final, el fumarato se separa de argininosuccinato, para producir arginina. La vía de degradación para la arginina es por la acción hidrolítica de la arginasa para producir ornitina y urea. Estas reacciones forman el ciclo de la urea. Véase también la Figura 1.

Como alternativa a la degradación para la síntesis de urea, la arginina puede proporcionar el sustrato necesario para la síntesis de NO a través de la óxido nítrico sintasa. Además, la citrulina exógena puede entrar en el ciclo de la urea y preparar la síntesis in vivo de la arginina, que puede preparar posteriormente la síntesis de NO. Por consiguiente,

la administración de la citrulina en sujetos susceptibles o diagnosticados con DBP puede aumentar la síntesis de arginina y, posteriormente, aumentar la producción de NO para evitar de ese modo y/o tratar DBP.

## I. PROCEDIMIENTOS TERAPÉUTICOS

La presente materia divulgada proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de citrulina eficaz para su uso en el tratamiento de sujetos con riesgo de sufrir o que sufren de displasia broncopulmonar. La composición puede formularse para administración oral, administración intravenosa, o una combinación de los mismos.

La presente materia divulgada proporciona composiciones y su uso para tratar DBP en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto a tratar es un sujeto que sufre de una afección aguda asociada con DBP. Los ejemplos representativos de tales condiciones se describen en el presente documento anteriormente.

También se describen en este documento procedimientos y composiciones para el tratamiento de la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica y/o complicaciones asociadas en un sujeto. Una cantidad eficaz de citrulina u otro precursor de NO se administra a un sujeto que padece de la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica y/o complicaciones asociadas y/o en riesgo de sufrir complicaciones asociadas con la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica. El precursor de NO puede ser seleccionado del grupo que incluye, pero no limitado a, la citrulina, un precursor que genera citrulina in vivo, arginina, un precursor que genera arginina in vivo, o combinaciones de los mismos. La citrulina u otro precursor de NO se pueden administrar por vía oral. La citrulina u otro precursor de NO se pueden administrar por vía intravenosa. El sujeto a tratar puede ser un sujeto que sufre de una afección aguda asociada a la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica. Los ejemplos representativos de tales afecciones se describen en el presente documento anteriormente.

El precursor de óxido nítrico anterior puede comprender al menos uno de citrulina, un precursor que genera citrulina in vivo, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y combinaciones de los mismos. Véase la Figura 1. El precursor de óxido nítrico puede seleccionarse del grupo que incluye, pero no limitado a, citrulina, arginina, o combinaciones de los mismos. El precursor de óxido nítrico, tal como citrulina, se puede administrar por vía oral. El precursor de óxido nítrico, tal como citrulina, se puede administrar por vía intravenosa.

En algunas realizaciones, el sujeto sufre de hipocitrulinemia. En algunas realizaciones la hipocitrulinemia se caracteriza por niveles de citrulina en plasma de  $\leq 37 \mu\text{mol/litro}$ , en algunas realizaciones,  $\leq 25 \mu\text{mol/litro}$ , en algunas realizaciones,  $\leq 20 \mu\text{mol/litro}$ , en algunas realizaciones,  $\leq 10 \mu\text{mol/litro}$ , en algunas realizaciones,  $\leq 5 \mu\text{mol/litro}$ .

En algunas realizaciones, el sujeto que sufre de una afección, tal como se describe en el presente documento, sufre de hipocitrulinemia relativa. El término "hipocitrulinemia relativa" se refiere a un estado en que el sujeto que sufre de una afección tiene citrulina en plasma reducida en comparación con un sujeto que no padece de una afección.

Tal como se utiliza aquí, la frase "tratar" se refiere tanto a intervención diseñada para mejorar una afección en un sujeto (por ejemplo, después de la iniciación de un proceso de la enfermedad o después de una lesión), para mejorar las complicaciones relacionadas con la afección en el sujeto, así como a las intervenciones que están diseñadas para prevenir la afección en el sujeto. Dicho de otra manera, el término "tratar" y las variantes gramaticales del mismo deben ser interpretados en sentido amplio para abarcar significados que se refieren a reducir la gravedad de y/o a curar una afección, así como los significados que se refieren a la profilaxis. En este último aspecto, "tratar" puede referirse a "prevenir" en cualquier grado, tal como, pero no limitado a, en un sujeto en riesgo de sufrir una afección, o de otra manera, de aumentar la capacidad del sujeto para resistir el proceso de la afección.

El sujeto tratado con la materia aquí descrita en sus muchas realizaciones es deseablemente un sujeto humano, aunque debe entenderse que los principios de la materia aquí descrita indican que la materia aquí descrita es eficaz con respecto a todas las especies de vertebrados, incluyendo vertebrados de sangre caliente, tales como mamíferos y aves, que pretenden ser incluidos en el término "sujeto". En este contexto, un mamífero se entiende que incluye cualquier especie de mamífero en la que el tratamiento es deseable, tales como, pero no limitado a, especies de mamíferos agrícolas y domésticos.

Por lo tanto, se proporciona el tratamiento de mamíferos, tales como seres humanos, así como aquellos mamíferos de importancia debido al peligro de extinción (tales como los tigres de Siberia), de importancia económica (animales criados en granjas para el consumo por los seres humanos) y/o de importancia social (animales mantenidos como mascotas o en zoológicos) para los humanos, por ejemplo, carnívoros distintos de los humanos (tales como gatos y perros), porcinos (cerdos, puercos y jabalíes), rumiantes (tales como ganado, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos) y caballos. También se proporciona el tratamiento de aves, incluyendo el tratamiento de aquellos tipos de aves que están en peligro de extinción, las mantenidas en zoológicos, así como aves, y más particularmente aves domesticadas, es decir, aves de corral, tales como pavos, pollos, patos, gansos, gallina de Guinea, y similares, ya que también son de importancia económica para los humanos. Por lo tanto, se proporciona el

tratamiento de ganado, incluyendo, pero no limitado a, cerdos domesticados (cerdos y puercos), rumiantes, caballos, aves de corral, y similares.

## II. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

5 Una dosis eficaz de una composición de la materia aquí descrita se administra a un sujeto en necesidad de la misma. Una "cantidad eficaz" es una cantidad de una composición suficiente para producir una respuesta medible (por ejemplo, una respuesta biológica o clínicamente relevante en un sujeto que está siendo tratado). Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones de la materia aquí descrita se pueden variar con el fin de administrar una cantidad del compuesto o compuestos activos que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto particular. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de la actividad de la composición terapéutica, la vía de administración, la combinación con otros fármacos o tratamientos, la gravedad de la afección a tratar, y la condición e historia médica previa del sujeto que está siendo tratado. A modo de ejemplo y no de limitación, las dosis de las composiciones se pueden iniciar a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y para aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. La potencia de una composición puede variar y por lo tanto puede variar una "cantidad eficaz".

Después de la revisión de la descripción de la materia aquí descrita presentada en el presente documento, un experto en la técnica puede adaptar la dosis a un sujeto individual, teniendo en cuenta la formulación particular, el procedimiento de administración a utilizar con la composición y la enfermedad particular tratada. Otros cálculos de la dosis pueden considerar la altura y el peso del sujeto, el sexo, la gravedad y la etapa de los síntomas, y la presencia de condiciones físicas perjudiciales adicionales.

A modo de ejemplos adicionales, la cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto a ser tratado y del modo particular de administración.

La citrulina se administra en algunas realizaciones en una dosis que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg, en algunas realizaciones en una dosis que varía de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 500 mg, y en algunas realizaciones en una dosis que varían de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg. La citrulina se puede administrar también en algunas realizaciones en una dosis que varía de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 30.000 mg, y en algunas realizaciones en una dosis que varía de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1000 mg. Una dosis representativa es 3,8 g/m<sup>2</sup>/día de citrulina (equivalentes molares, PM de L-citrulina 175,2, PM de L-arginina 174,2).

Las soluciones de citrulina intravenosas representativas pueden comprender una solución de 100 mg/ml (10%). Las dosis de citrulina intravenosas representativas pueden comprender 200 mg/kg, 400 mg/kg, 600 mg/kg y 800 mg/kg. En algunas realizaciones, por ejemplo, pero no limitado a, una dosis de 600 o 800 mg/kg, la dosis se puede disminuir en una cantidad que variaba entre 50 mg/kg y 100 mg/kg para mitigar los efectos no deseados observados sobre la presión arterial sistémica. En algunas realizaciones, las dosis se pueden administrar una o más veces durante un período determinado de tiempo, tal como un día.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende una cantidad de citrulina eficaz para elevar el nivel de citrulina en plasma para tratar una afección, tal como se describe aquí, en un sujeto. En algunas realizaciones, el nivel se determina mediante la comparación de los niveles de citrulina en plasma en un sujeto a ser tratado con los observados en un sujeto que no padece la enfermedad. En algunas realizaciones, la cantidad de citrulina es eficaz para elevar el nivel de citrulina en plasma en un sujeto a al menos 5 µmol/litro, opcionalmente al menos 10 µmol/litro, opcionalmente al menos 20 µmol/litro, opcionalmente al menos 25 µmol/litro, y opcionalmente de aproximadamente 37 µmol/litro.

En algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden citrulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un portador farmacéuticamente aceptable en seres humanos. En algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden citrulina en dosis tal como se describe anteriormente.

Una composición de la materia aquí descrita se administra típicamente por vía oral o parenteral en formulaciones de dosificación unitaria que contienen portadores, adyuvantes y vehículos estándar no tóxicos farmacéuticamente aceptables, según se desee. El término "parenteral", tal como se usa en este documento, incluye inyección intravenosa, inyección intraarterial intramuscular, o técnicas de infusión.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se formulan de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol.

Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos, tales como ácido oleico son útiles en la preparación de inyectables. Los vehículos de ejemplo incluyen soluciones salinas neutras tamponadas con fosfato, lactato, Tris y similares.

En una realización representativa, las dosis se pueden administrar a un sujeto varias veces durante un período de tratamiento relevante, incluyendo, pero no limitado, a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dosis.

Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular bajo terapia.

#### EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos se han incluido para ilustrar los modos representativos de la materia aquí descrita. A la luz de la presente descripción y el nivel general de capacidad en la técnica, los expertos entenderán que los siguientes Ejemplos pretenden ser ejemplares únicamente en que numerosos cambios, modificaciones y alteraciones se pueden emplear sin apartarse del espíritu y alcance de la materia aquí descrita.

#### EJEMPLOS 1-4

Los siguientes Ejemplos evalúan si la suplementación oral con L-citrulina durante la exposición de los lechones recién nacidos a 10 días de hipoxia crónica impediría el desarrollo de la hipertensión pulmonar y la reducción concomitante en la producción de NO.

#### PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS EN LOS EJEMPLOS 1-4

##### CUIDADO DE ANIMALES

Se estudiaron un total de 17 lechones hipóxicos y 17 de control. Véase la figura 2. Los animales de control se estudiaron en el día de la llegada de la granja a los 12 días de edad. Los cerdos con hipoxia (2 días de edad) se colocaron en una cámara hipóxica normobárica durante 10 a 11 días. La hipoxia normobárica se proporcionó con aire comprimido y nitrógeno para crear oxígeno inspirado de 8-11% (PO<sub>2</sub> 60-72 Torr) y el CO<sub>2</sub> se mantuvo a 3-6 Torr mediante absorción con la cal sodada. Los animales se controlaron con los pesos diarios y el examen físico dos veces al día. Fueron alimentados ad libitum con sustituto de leche cerda desde un dispositivo de alimentación en la jaula.

##### SUPLEMENTACIÓN CON L-CITRULINA

Seis de los diecisiete lechones hipóxicos fueron suplementados con L-citrulina oral empezando en el primer día de la exposición hipóxica. Ver Figura 2. La suplementación con L-citrulina se proporcionó a una dosis de 0,13 g/kilogramo de peso corporal dos veces al día usando una jeringa para administrar la dosis por vía oral. Si le parecía al personal de estudio que los lechones no habían ingerido la mayor parte de una dosis, se repitió. La L-citrulina se mezcló usando una preparación (Sigma Pharmaceuticals, St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América, 98% de pureza) a una concentración de 0,13 gramos por mililitro de agua destilada y cuando se disolvió completamente pasando esta solución a través de un filtro de 0,20 micras.

##### HEMODINÁMICA IN VIVO

Se midió la hemodinámica in vivo en 6 de los lechones de control y todos los lechones con hipoxia. Véase la Figura 2. Para estas mediciones, los animales se pesaron y a continuación se preanestesiaron con ketamina (15 mg/kg) y acepromazina (2 mg/kg) por vía intramuscular. Se colocaron a continuación una traqueotomía, catéteres venosos y arteriales, y el termistor, tal como se describe previamente usando pentobarbital intravenoso para la sedación. Fike, CD et al, J Appl Physiol (2000) 88: 1797-1803. Se midieron la presión arterial pulmonar, la presión diastólica final ventricular izquierda y el gasto cardíaco. El gasto cardíaco se midió mediante una técnica de termodilución (ordenador para el gasto cardíaco mediante termodilución modelo 9520, Edwards Laboratory, Irvine, California, Estados Unidos de América), utilizando un termistor en el arco aórtico y el catéter de ventrículo izquierdo como puerto de inyección. El gasto cardíaco se midió en la espiración final como la media de tres inyecciones de 3 ml de solución salina normal (0°C). El NO exhalado se midió como se describe a continuación. Durante las mediciones in vivo, los animales fueron ventilados con aire a temperatura ambiente usando un ventilador de tipo pistón en un volumen tidal de 15-20 cc/kg, presión de la espiración final de 2 mmHg y una frecuencia respiratoria de 15-20 respiraciones por minuto.

## MEDICIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO

5 Para la medición de NO exhalado en animales anestesiados, se tomaron muestras del gas de espiración dos a tres veces durante períodos de 3 minutos cada uno y pasaron a través de un analizador de quimioluminiscencia (modelo 270B NOA; Sievers, Boulder, Colorado, Estados Unidos de América) para medir la concentración de NO, tal como se describió previamente. Fike, CD, et al, American Journal of Physiology (Lung, Cellular and Molecular Physiology 18) (1998) 274: L517-L526. La producción de NO exhalado (nmol/min) se calculó utilizando la ventilación por minuto y la concentración de NO exhalado medido.

## 10 PERFUSIONES DE PULMONES AISLADOS

15 Los pulmones fueron aislados y perfundidos in situ con una solución de bicarbonato de Krebs Ringer (KRB) que contenía 5% de dextrano, peso molecular 70.000, a 37°C y se ventilaron con una mezcla de gases normóxicos (21% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) como se ha descrito previamente. Fike, CD et al, J Appl Physiol (2000) 88: 1797-1803. Los pulmones se perfundieron durante 30-60 min hasta que se alcanzó una presión arterial pulmonar estable. A continuación, se extrajeron muestras de perfundido (1 ml) de la cánula atrial izquierda cada 10 minutos durante un período de 60 minutos. Las muestras de perfundido se centrifugaron y el sobrenadante se almacenó a -80°C para el análisis futuro de concentraciones de nitrito/nitrato (NO<sub>x</sub>), tal como se describe a continuación. Al final de la perfusión, se midió el volumen de perfundido que quedaba en el circuito y el depósito. En algunos casos, se recogió el tejido pulmonar inmediatamente después de la perfusión, se congeló con nitrógeno líquido y a continuación se almacenó a -80 grados para la medición posterior del contenido de eNOS, tal como se describe a continuación.

MEDICIÓN DE NO<sub>x</sub>

25 Se utilizó un análisis de quimioluminiscencia descrito previamente para determinar la concentración de NO<sub>x</sub> perfundida (nmol/ml) en cada momento de recogida. Fike, CD et al, J Appl Physiol (2000) 88: 1797-1803; Turley, JE et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2003) 284: L489-L500. Se inyectó el perfundido (20 µl) en la cámara de reacción de un analizador de NO por quimioluminiscencia (modelo 170B NOA, Sievers). La cámara de reacción contenía cloruro de vanadio (III) en HCl 1 M calentado a 90°C para reducir el nitrito y nitrato a gas NO. El gas NO se transportó al analizador utilizando un flujo constante de gas N<sub>2</sub> a través de una trampa de burbujas de gas que contenía NaOH 1 M para eliminar el vapor de HCl. Se generó una curva estándar mediante la adición de cantidades conocidas de NaNO<sub>3</sub> a agua destilada y ensayando, tal como se ha descrito, para las muestras de perfusión.

35 La concentración de NO<sub>x</sub> perfundida (nmol/ml) se calculó para cada momento de recogida multiplicando la concentración perfundida de NO<sub>x</sub> en ese momento de recogida de la muestra por el volumen del sistema (circuito de perfusión + depósito) en el momento de recogida de muestras más la cantidad de NO<sub>x</sub> extraída con todas las muestras anteriores. La velocidad de producción de NO<sub>x</sub> se determinó a partir de la pendiente de una línea de regresión lineal ajustada a la cantidad de NO<sub>x</sub> en el perfundido frente al tiempo durante los primeros 60 minutos del período de recogida.

## 40 MEDICIONES DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA

45 En el día de las mediciones hemodinámicas y/o el estudio de perfusión de pulmón, para animales de control y animales hipóxicos crónicos tratados y no tratados con L-citrulina, se extrajo sangre antes de iniciar el estudio y el plasma se congeló a -80 grados para la determinación posterior de los niveles de aminoácidos. Para los animales hipóxicos tratados con L-citrulina, el momento de obtención de la muestra de sangre fue de aproximadamente 12 horas después de la última dosis de L-citrulina, así que era un nivel mínimo. En algunos de los animales tratados con L-citrulina (n = 3), después de tomar muestras de sangre para un nivel mínimo, se suministró una dosis de L-citrulina a través de sonda nasogástrica. Después de esta dosis, se extrajeron muestras de sangre cada 30 minutos durante 50 90 minutos (la duración de los estudios in vivo). Todas las muestras se centrifugaron, el plasma se recogió y se congeló a -80 grados para análisis de aminoácidos.

55 Las concentraciones de citrulina y arginina en plasma se determinaron mediante análisis de aminoácidos de extractos libres de proteínas. Los aminoácidos se separaron mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando un analizador de aminoácidos Hitachi L8800 (Hitachi USA, San Jose, California, Estados Unidos de América). La calibración del analizador se realizó antes de la prueba de las muestras de los lechones.

## TRANSFERENCIA WESTERN DE ENOS EN TEJIDO PULMONAR

60 Usando una técnica de inmunotransferencia estándar, tal como se describe anteriormente, se analizaron muestras de homogeneizado de pulmón enteros de animales de controles (n = 3), animales hipóxicos sin tratar (n = 3) y animales hipóxicos tratados con L-citrulina (n = 3) para eNOS. Se utilizaron 10 microgramos de proteína total, una dilución de anticuerpo eNOS primarios de 1:500 (transducción de DB) y una dilución de anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante de 1:5000. Fike, C.D., et al, American Journal of Physiology (Lung, Cellular and Molecular Physiology 18) (1998) 274: L517-L526.



CÁLCULOS Y ESTADÍSTICAS

La resistencia vascular pulmonar se calculó a partir de mediciones hemodinámicas in vivo: (presión arterial pulmonar – presión diastólica final ventricular izquierda) ÷ (gasto cardíaco/peso corporal).

Los datos se presentan como promedio ± SE. El ANOVA de una vía con la prueba de comparación post hoc de diferencia mínima significativa protegida de Fisher (PLSD) se utilizó para comparar los datos entre los animales de control, animales hipóxicos sin tratar y animales hipóxicos tratados con L-citrulina. Un valor de p menor de 0,05 se consideró significativo. Meier, U., Pharm Stat (2006) 5: 253-263.

EJEMPLO 1

MEDICIONES HEMODINÁMICAS IN VIVO

Los animales hipóxicos crónicos tratados y no tratados con L-citrulina tuvieron un gasto y peso cardíaco menores y medidas de PDFVI más altas en el día de estudio a los 12-13 días de vida que los lechones de control de edad comparables (Tabla 1). Las mediciones de presión aórtica y los índices de gases en sangre fueron similares (paO<sub>2</sub> fue de 74 ± 5 Torr en lechones de control, 74 ± 8 Torr en lechones hipóxicos no tratadas y 78 ± 7 Torr en lechones hipóxicos tratados con L-citrulina; paCO<sub>2</sub> fue de 39 ± 2 en el lechones de control, 41 ± 4 en lechones hipóxicos no tratados y 30 ± 1,0 en lechones hipóxicos tratados con L-citrulina) entre los grupos. Cabe destacar que, tal como se muestra en la Figura 3, los animales hipóxicos tratados con L-citrulina tenían una presión arterial pulmonar significativamente más baja que los animales hipóxicos no tratados (valor de p de 0,01). Las presiones arteriales pulmonares no fueron diferentes entre los controles normóxicos y los animales hipóxicos tratados con L-citrulina (p = 0,08).

Además, tal como se muestra en la Figura 4, la resistencia vascular pulmonar calculada en aquellos animales hipóxicos tratados con L-citrulina (0,071 ± 0,003) fue significativamente más baja que la de los animales hipóxicos no tratados (valor de p de 0,001). Además, las resistencias vasculares pulmonares fueron similares en animales hipóxicos tratados con L-citrulina y controles normóxicos (valor de p de 0,07).

EJEMPLO 2

SALIDA DE NO EXHALADO Y NOX<sup>-</sup> PERFUNDIDO

Tal como se muestra en la Figura 5, la salida de NO exhalado en los animales de controles y animales hipóxicos tratados con L-citrulina fue más alta que la salida de NO exhalado en animales hipóxicos no tratados (valores de p de 0,001 y 0,032 respectivamente). Sin embargo, la salida de NO exhalado no fue diferente entre los animales de control y animales hipóxicos tratados con L-citrulina (p = 0,124).

Tal como se muestra en la Figura 6, los pulmones de animales de control (p = 0,02) y animales hipóxicos tratados con L-citrulina (p = 0,04) tenían velocidades de acumulación de NOx<sup>-</sup> significativamente más altas que los pulmones de los animales hipóxicos no tratados. Además, no hubo diferencia en la velocidad de acumulación de NO<sup>-</sup> entre los pulmones de animales hipóxicos tratados con L-citrulina y controles normóxicos.

EJEMPLO 3

AMINOÁCIDOS EN PLASMA

Tal como se muestra en la Tabla 2, aunque no alcanzó una significación estadística (p = 0,05), los niveles plasmáticos de L-citrulina en lechones hipóxicos crónicos no tratados fueron menores que los niveles de L-citrulina en lechones hipóxicos tratadas. Además, cuando se representa noventa minutos después de una dosis, los niveles de L-citrulina en animales hipóxicos tratadas fueron casi dos veces los de los animales hipóxicos crónicos no tratados (p = 0,001). Sin embargo, independientemente del momento en que se extrajo la muestra, los niveles de arginina en plasma no fueron mayores en animales hipóxicos crónicos tratados con L-citrulina en comparación con los animales hipóxicos no tratados.

EJEMPLO 4

TRANSFERENCIA WESTERN PARA PROTEÍNA ENOS EN PULMÓN

Tal como se muestra en las figuras 7A y 7B, la cantidad de proteína eNOS presente en el tejido pulmonar de los animales de control fue significativamente mayor que la presente en los pulmones de animales hipóxicos no tratados. Además, la cantidad de proteína eNOS presente en el tejido pulmonar de lechones hipóxicos tratados con L-citrulina no fue significativamente diferente de la de los animales hipóxicos no tratados y fue significativamente menor que los niveles de proteína eNOS en los animales de control.

TABLA 1

DATOS PARA LECHONES DE CONTROL, CRÓNICAMENTE HIPÓXICOS Y CRÓNICAMENTE HIPÓXICOS TRATADOS CON L-CITRULINA					
N = número de animales, los valores son promedios $\pm$ SEM, * p < 0,05 frente a controles, ANOVA con test de comparación post-hoc					
Grupo de tratamiento	Peso a los 12 días de vida (kg)	Presión aórtica (cm H <sub>2</sub> O)	LVEDP (cm H <sub>2</sub> O)	Gasto cardiaco (ml/min/kg)	pH arterial
Controles N = 6	3,94 $\pm$ 0,3	91 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 0,6	414 $\pm$ 43	7,38 $\pm$ 0,05
Hipóxicos crónicos N = 11	2,76 $\pm$ 0,15*	100 $\pm$ 4	7,4 $\pm$ 0,5*	244 $\pm$ 16*	7,38 $\pm$ 0,01
Hipóxicos con citrulina N = 6	2,6 $\pm$ 0,09*	97 $\pm$ 6	7,2 $\pm$ 0,4*	270 $\pm$ 41*	7,36 $\pm$ 0,02

TABLA 2

NIVELES DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA LECHONES DE CONTROL, CRÓNICAMENTE HIPÓXICOS Y CRÓNICAMENTE HIPÓXICOS TRATADOS CON L-CITRULINA		
Grupo de tratamiento	Citrulina	Arginina
Controles N = 10	71 $\pm$ 6,	112 $\pm$ 16
Hipóxico crónico N = 8	111 $\pm$ 23	51 $\pm$ 10*
Hipóxico tratado con L-citrulina: punto mínimo N= 6	161 $\pm$ 5*	39 $\pm$ 10*
Hipóxico tratado con L-citrulina: 90 min N= 3	219 $\pm$ 36*†	43 $\pm$ 5

N = número de animales, los valores son promedio  $\pm$  SEM, \*p < 0,05 vs. controles, † p < 0,05 vs. hipóxicos crónicos no tratados, ANOVA con el test de comparación post-hoc, nivel en plasma citrulina mínima - aproximadamente doce horas después de la dosis de L-citrulina, citrulina 90 min - nivel en plasma 90 minutos después de la administración de la dosis de L-citrulina.

#### DISCUSIÓN DE EJEMPLOS

En los Ejemplos 1-4, se encontró que la suplementación de L-citrulina mejora el desarrollo de hipertensión pulmonar en lechones recién nacidos expuestos a 10 días de la hipoxia crónica. Otros hallazgos de este estudio son que las velocidades de producción de NO exhalado y de acumulación de NO<sub>x</sub> vascular pulmonar son mayores en los lechones hipóxicos tratados con L-citrulina que en lechones hipóxicos no tratados. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la suplementación de L-citrulina aumentó significativamente la producción de NO pulmonar. La cantidad de proteína eNOS no fue mayor en los animales hipóxicos tratados.

Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría particular de operación, el mecanismo por el cual la L-citrulina media un aumento en la producción de NO se cree es aumentando la cantidad de L-arginina disponible como sustrato para eNOS. Los niveles plasmáticos de arginina en los animales tratados con L-citrulina en los presentes ejemplos no aumentaron significativamente en comparación con los animales hipóxicos no tratados. Esta discordancia entre la arginina intracelular y la producción de NO, denominada una "paradoja de arginina", parece estar presente en vista del aumento de la producción de NO a pesar de los niveles de arginina en plasma sin cambios observados con la administración de L-citrulina en los presentes ejemplos. La L-citrulina es un intermedio del ciclo de la urea metabolizada a la arginina mediante una vía de reciclaje de dos enzimas, la argininosuccinato sintasa (AS) y la argininosuccinato liasa (AL). Se ha encontrado que estas dos enzimas, AS y AL, están cosituadas con eNOS en las células endoteliales pulmonares. Boger, RH, Curr Opin Clin Nutr and Met Care (2008) 11: 55-61. Se cree que estas enzimas juntas producen un grupo subcelular separado de arginina utilizado exclusivamente para la síntesis de NO. Los niveles de arginina en tejido y plasma no pueden medir con precisión este grupo subcelular.

La L-citrulina también podría haber mejorado la producción de NO y la función eNOS mediante mecanismos adicionales. De nuevo, aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría particular de operación, otra potencial acción de L-citrulina en los presentes ejemplos es la prevención de la disociación de eNOS mediante el mantenimiento de los niveles adecuados de su sustrato de arginina.

De nuevo, aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría particular de operación, la L-citrulina podría también haber afectado a la biodisponibilidad de NO mediante la compensación del aumento de la degradación de NO. Durante la exposición a la hipoxia crónica, la producción de superóxido podría aumentar de fuentes enzimáticas distintas de eNOS, tales como NADPH oxidasa. Liu, et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2006) 290: L2-

L10. Esta producción de exceso de superóxido podría haber interactuado directamente con el NO para reducir su producción local. En este caso, es posible que el suministro de L-citrulina permitió una producción de NO suficiente para compensar la reducción mediada por superóxido.

5 En resumen, los presentes ejemplos muestran que la L-citrulina mejora la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica en los lechones recién nacidos. También se proporciona evidencia de que la eficacia de la citrulina es debido al aumento de la producción de NO. Por lo tanto, la L-citrulina es una terapia útil en los recién nacidos en riesgo de desarrollar hipertensión pulmonar debido a la hipoxia crónica o intermitente sin resolver.

10 REFERENCIAS

Las referencias que figuran a continuación, así como todas las referencias citadas en la memoria se incorporan aquí por referencia en la medida en que complementan, explican, proporcionan una base o enseñan metodología, técnicas y/o composiciones empleadas en el presente documento.

15 Jobe et al. (2001) Am J Respir Crit Care Med 163: 1723-1729.  
Ballard et al. (2006) N Engl J Med 355: 343-353.  
Ryan, RM (2006) J Perinatology 26: 207-209.  
Número de solicitud de patente de Estados Unidos publicada US-2004-0235953-A1, publicada el 25 de noviembre  
20 de 2004.  
Nº de publicación de la solicitud de patente internacional PCT nº WO 2005/082042, publicada el 9 de septiembre de  
2005.  
Patente de Estados Unidos No. 6.343.382.  
Patente de Estados Unidos No. 6.743.823

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad de citrulina eficaz para usar en el tratamiento de sujetos con riesgo de sufrir o que sufren displasia broncopulmonar.
2. Composición para usar, según la reivindicación 1, en la que la composición se formula para administración oral, administración intravenosa o una combinación de las mismas.
- 10 3. Composición para usar, según la reivindicación 1, en la que el sujeto es un bebé.
4. Composición para usar, según la reivindicación 3, en la que el bebé es un recién nacido prematuro.
- 15 5. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la citrulina se administra en una dosis que varía de 100 mg a 30.000 mg.
6. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la citrulina se administra en una dosis que varía de 250 mg a 1.000 mg.
- 20 7. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el sujeto padece hipocitrulinemia **caracterizada por** niveles de citrulina en plasma de  $\leq 37 \mu\text{mol/litro}$ .
- 25 8. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la cantidad de citrulina es eficaz para elevar el nivel de citrulina en plasma en un sujeto a al menos  $5 \mu\text{mol/litro}$ , opcionalmente al menos  $10 \mu\text{mol/litro}$ , opcionalmente al menos  $20 \mu\text{mol/litro}$ , opcionalmente al menos  $25 \mu\text{mol/litro}$ , y opcionalmente  $37 \mu\text{mol/litro}$ .

Figura 1

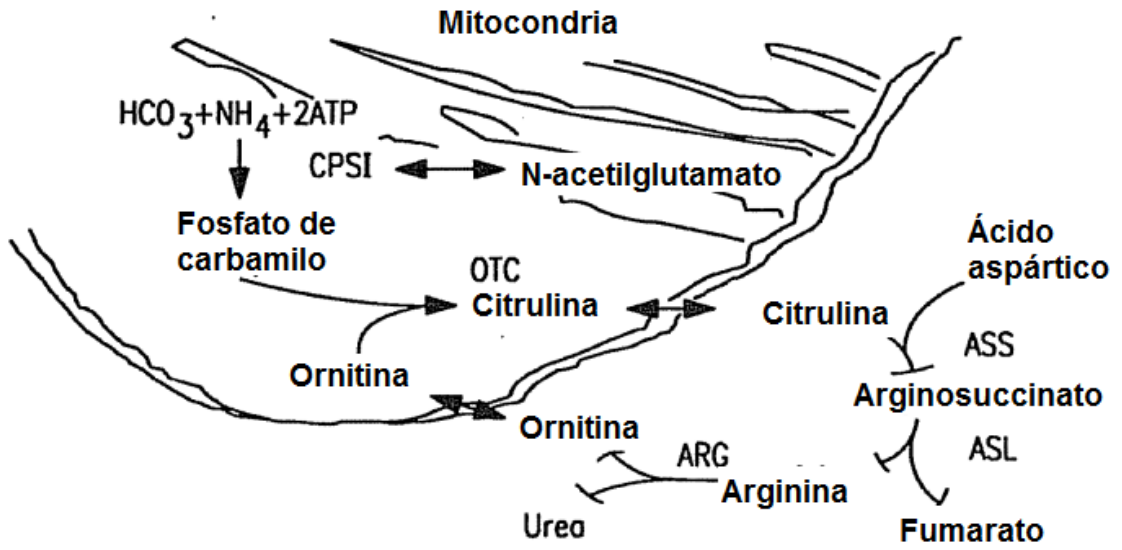
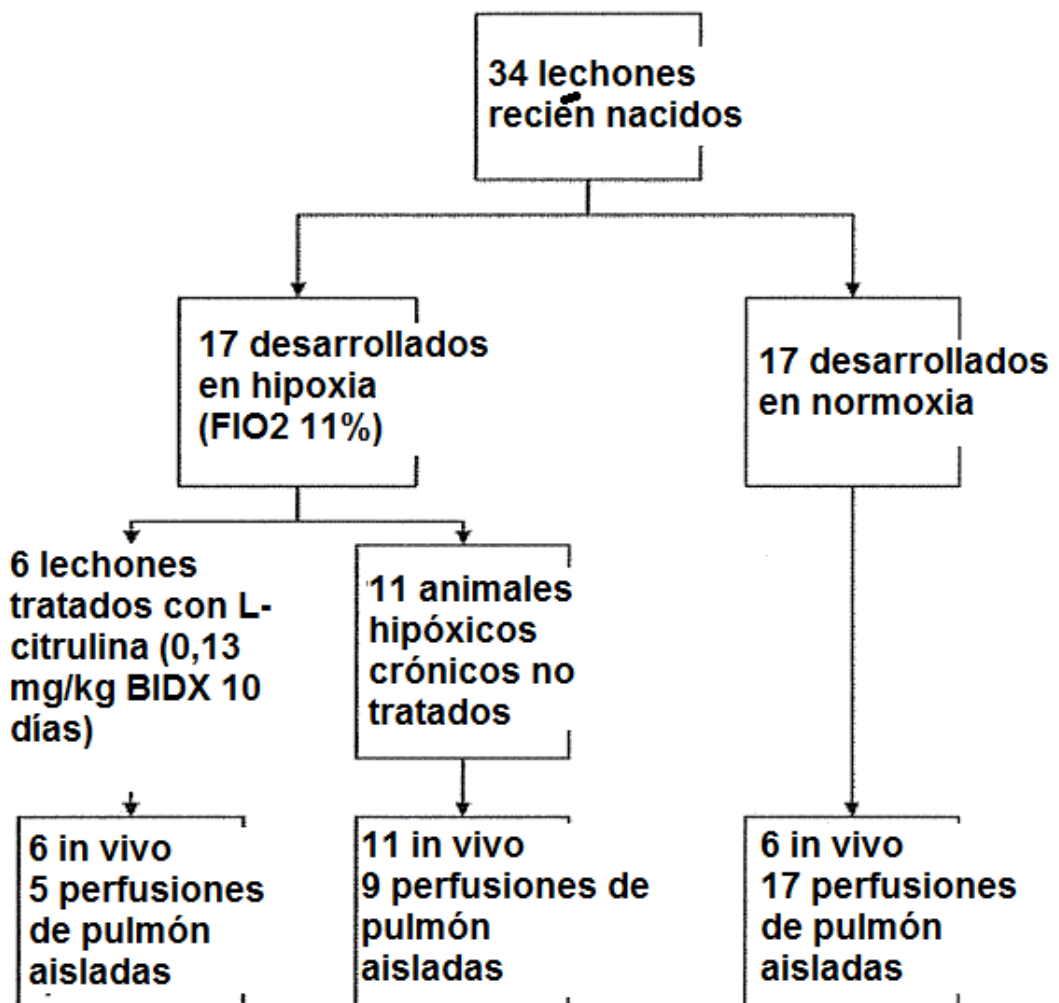


Figura 2



**Figura 3**

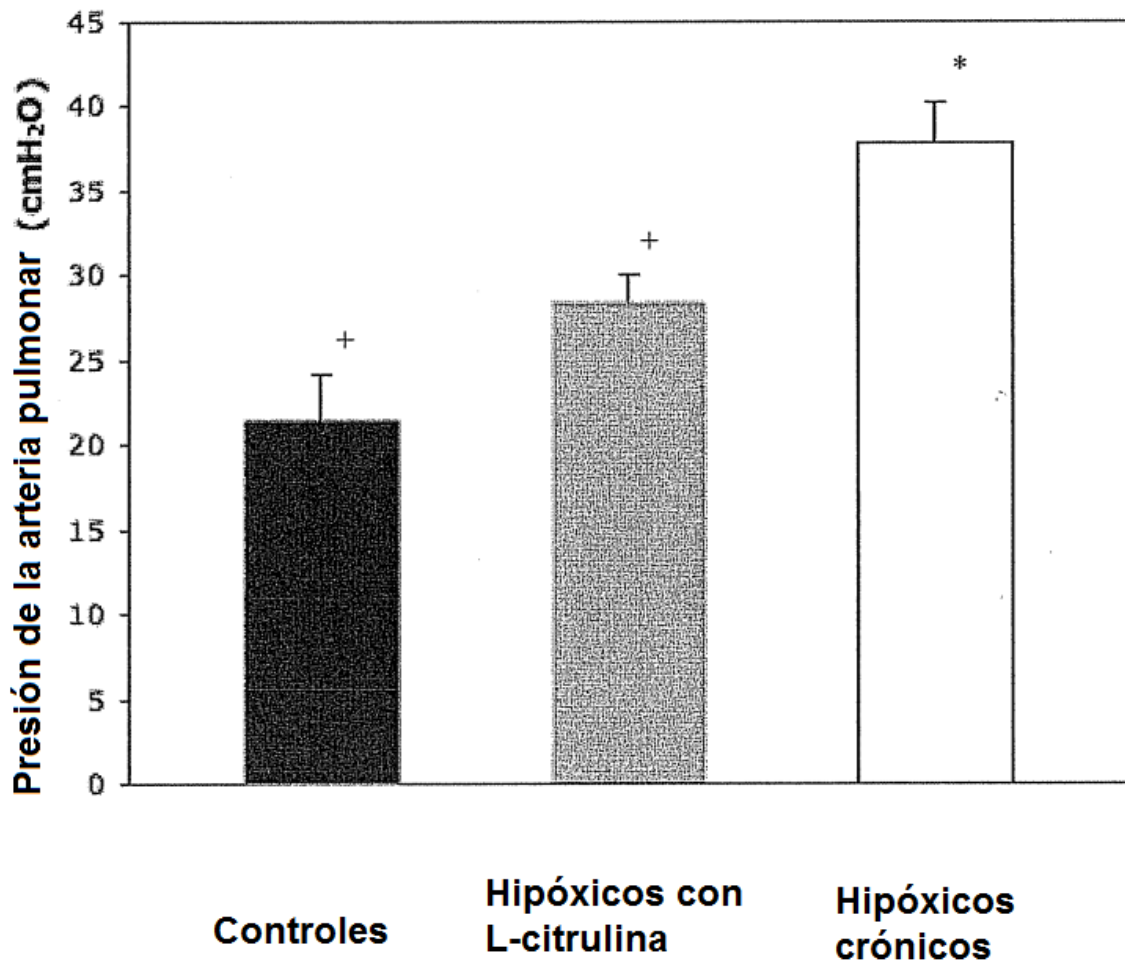


Figura 4

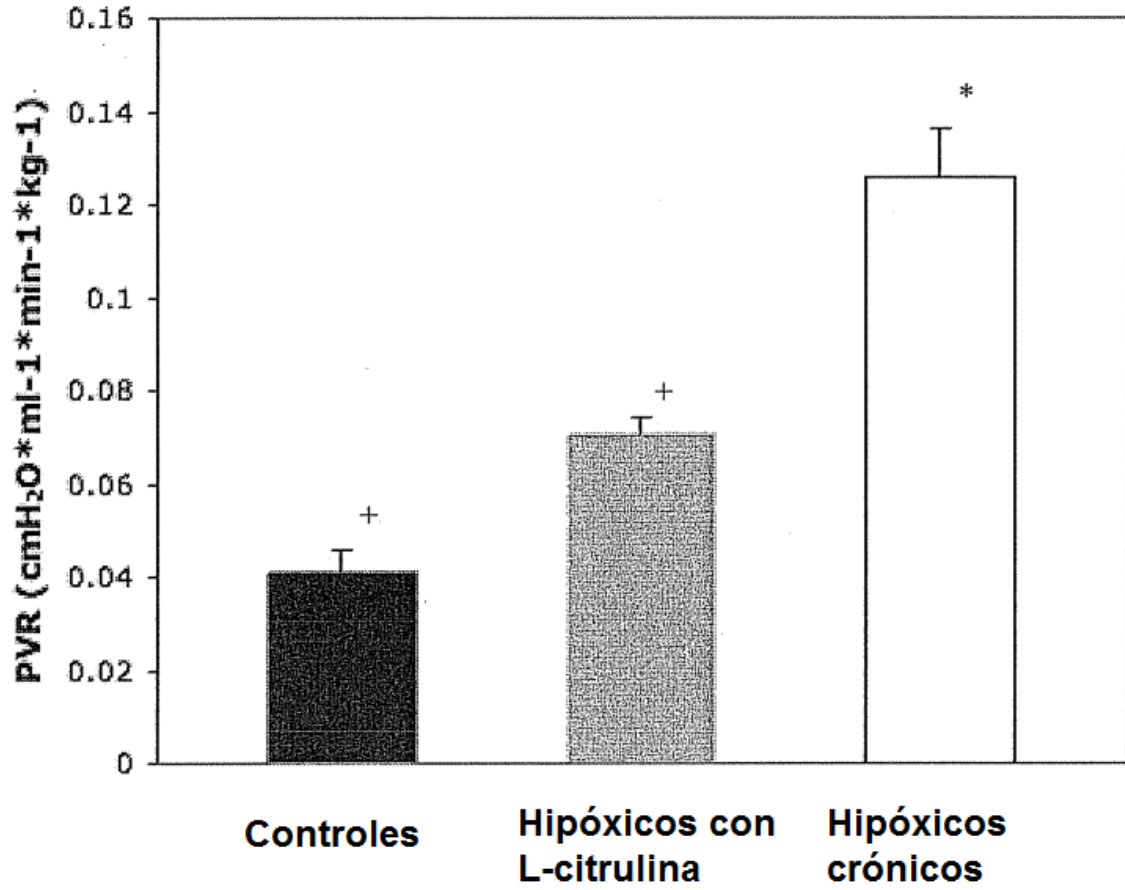




Figura 5

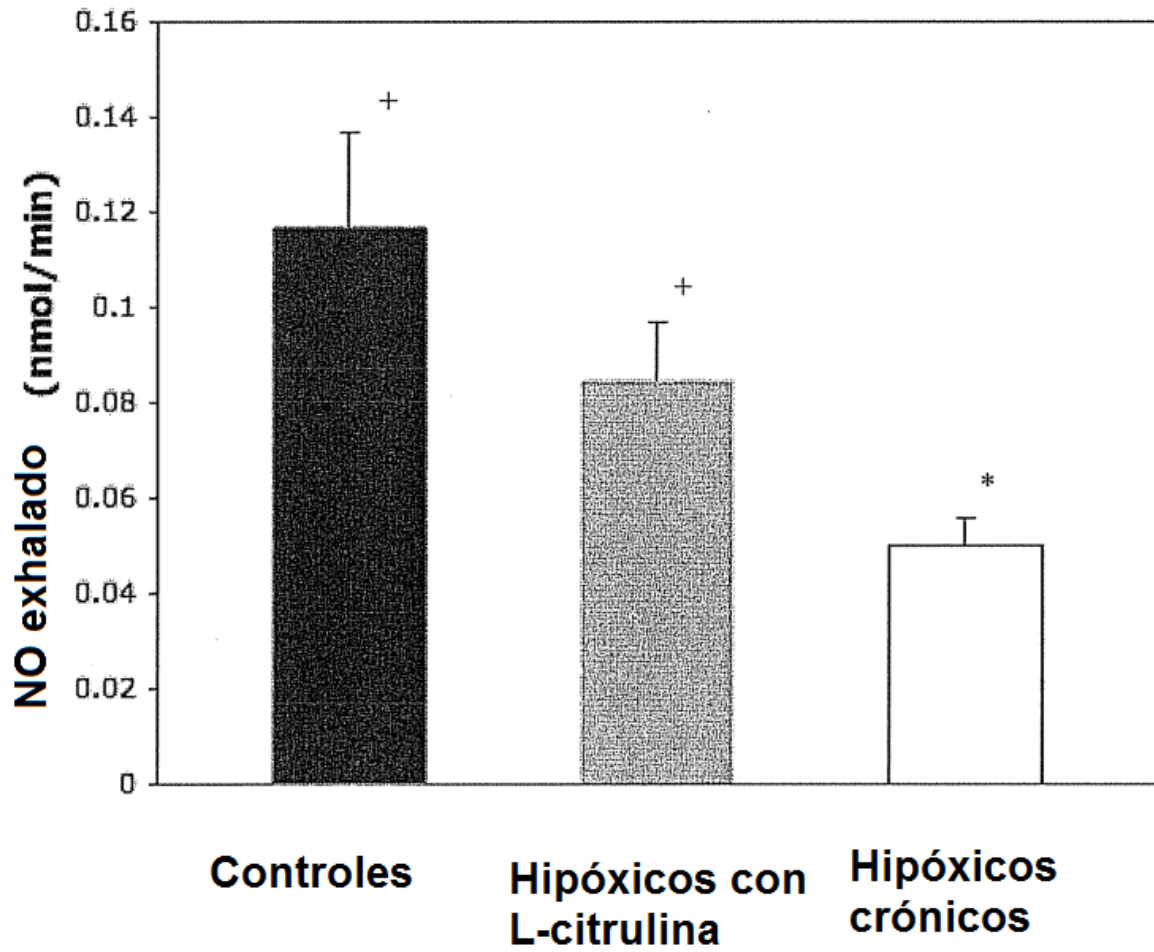


Figura 6

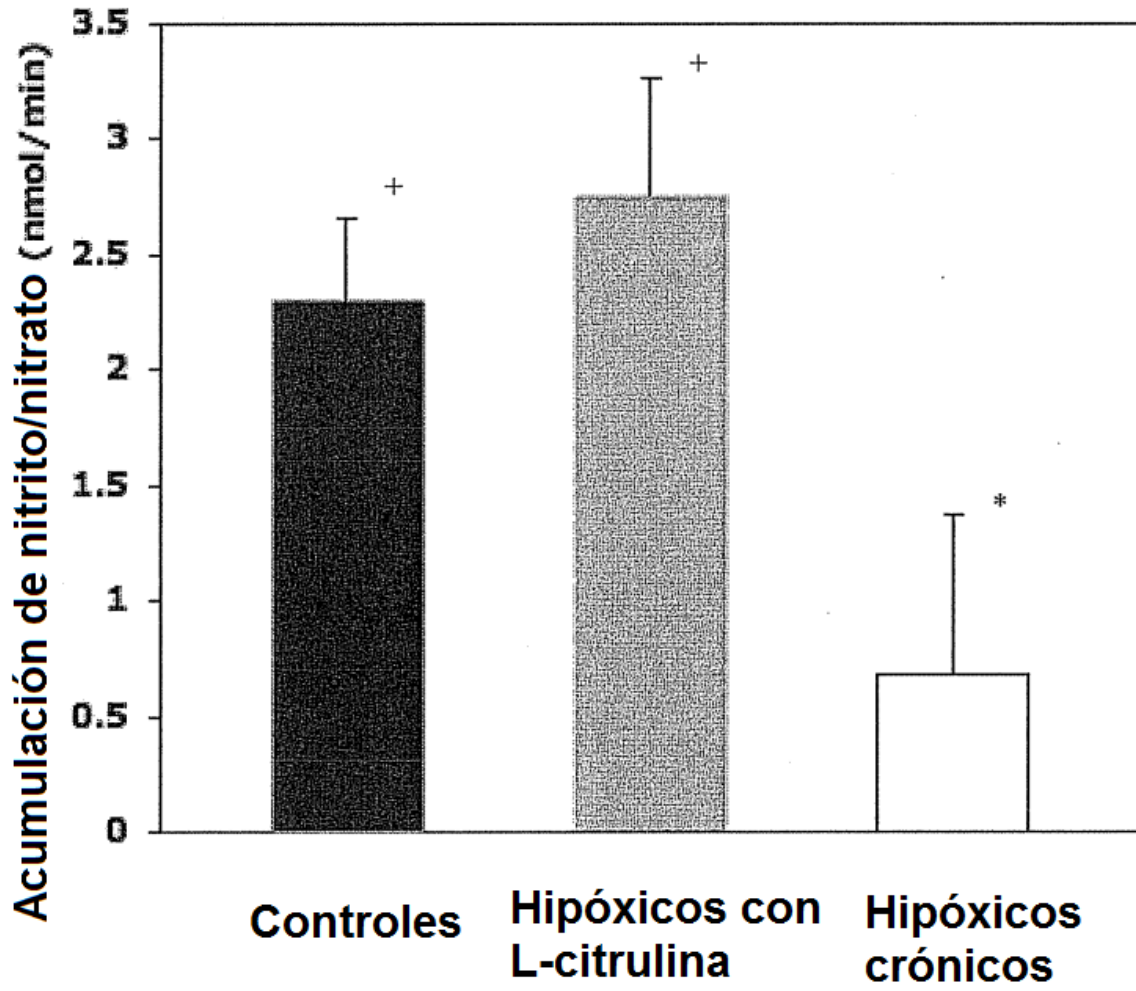
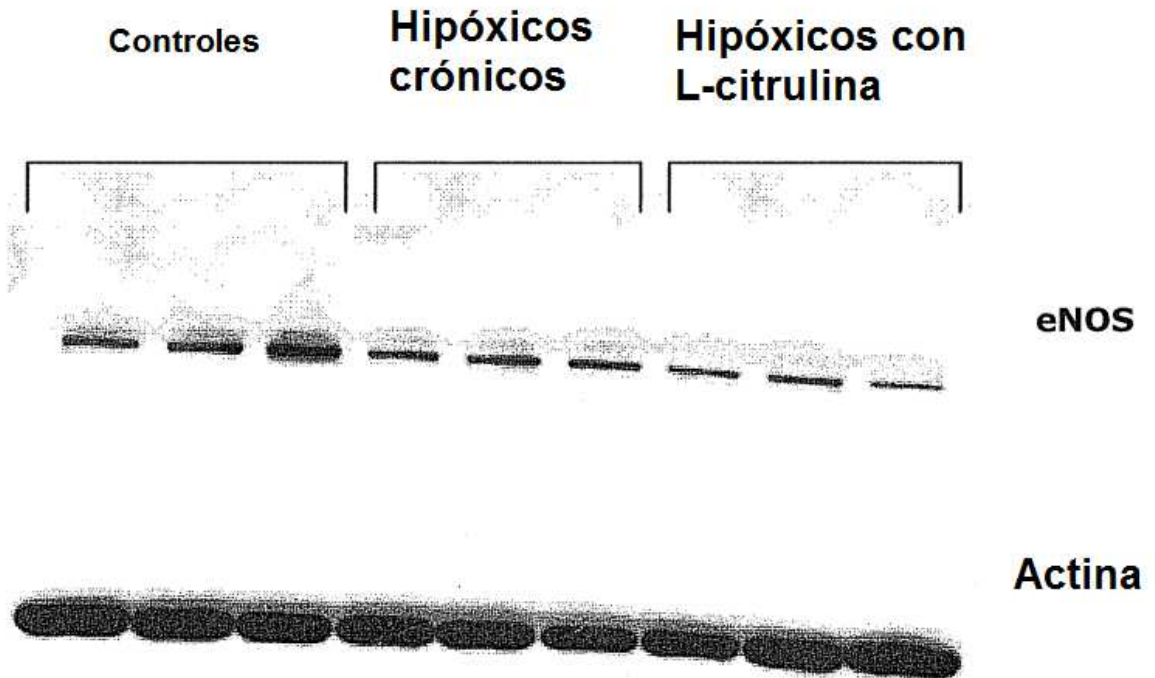


Figura 7A



**Figura 7B**

