(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 288 660**

(51) Int. CI.:

A61M 15/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN T5

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.1991 E 04029366 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.04.2015 EP 1516639**

(54) Título: **Uso de NO para tratar la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido**

(30) Prioridad:

05.12.1990 US 622865
27.09.1991 US 767234

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
29.05.2015

(73) Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION (100.0%)
55 FRUIT STREET
BOSTON, MA 02114, US

(72) Inventor/es:

ZAPOL, WARREN M. y
FROSTELL, CLAES

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 288 660 T5

DESCRIPCIÓN

Uso de NO para tratar la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido

Esta invención se refiere al uso de una mezcla gaseosa que consiste en NO y N_2 para la producción de un medicamento inhalable para invertir la vasoconstricción pulmonar aguda que resulta de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido.

Conceptualmente análoga al estrechamiento de las vías respiratorias del pulmón que se produce en un ataque de asma, la vasoconstricción es un estrechamiento reversible de los vasos sanguíneos atribuible a la contracción del músculo liso de los vasos sanguíneos. Tal vasoconstricción puede conducir a una presión sanguínea anormalmente alta (hipertensión) en la porción afectada del sistema circulatorio.

El sistema circulatorio mamífero consiste en dos sistemas separados, el circuito sistémico y el circuito pulmonar, que son bombeados en tándem por los lados izquierdo y derecho del corazón, respectivamente. La circulación pulmonar transporta la sangre a través de los pulmones, donde recoge oxígeno y libera dióxido de carbono equilibrando las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono gaseoso en los alveolos. La sangre rica en oxígeno vuelve a continuación al lado izquierdo del corazón, desde donde se distribuye a todas las partes del cuerpo a través de la circulación sistémica.

El sistema circulatorio sistémico de un ser humano adulto tiene típicamente una presión arterial sistémica (“SAP”) media de 80-100 mm de Hg, mientras que una presión arterial pulmonar (“PAP”) media típica es aproximadamente 12-15 mm de Hg. La presión capilar pulmonar normal es aproximadamente 7-10 mm de Hg. Considerando la presión osmótica del coloide del fluido intersticial (14 mm de Hg) y la presión osmótica del coloide plasmático (28 mm de Hg), así como la presión del fluido libre intersticial (1-8 mm de Hg), el pulmón normal tiene una presión de filtración media neta de + 1 mm de Hg (Guyton, Textbook of Medical Physiology. 6ª Ed.; W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA (1981), p. 295). Este gradiente de presión casi equilibrado mantiene los alveolos de un pulmón sano libres de fluido que de otra manera podría filtrarse al pulmón desde el sistema circulatorio.

Una elevación de la PAP sobre los niveles normales se denomina “hipertensión pulmonar”. En seres humanos, se dice que existe hipertensión pulmonar cuando la PAP se incrementa en al menos 5 a 10 mm de Hg sobre los niveles normales; se han presentado lecturas de PAP tan altas como de 50 a 100 mm de Hg sobre los niveles normales. Cuando la PAP se incrementa notablemente, el plasma puede escapar de los capilares hacia el intersticio pulmonar y los alveolos: puede resultar acumulación del fluido del pulmón (edema pulmonar), con una disminución asociada en la función pulmonar que en algunos casos puede ser letal.

La hipertensión pulmonar puede ser bien aguda o bien crónica. La hipertensión pulmonar aguda a menudo es un fenómeno potencialmente reversible generalmente atribuible a la constricción del músculo liso de los vasos sanguíneos pulmonares, que puede activarse por condiciones tales como hipoxia (tal como en la enfermedad de grandes altitudes), acidosis, inflamación o embolismo pulmonar. La hipertensión pulmonar crónica se caracteriza por cambios estructurales principales en la vasculatura pulmonar que dan como resultado un área de la sección transversal disminuida de los vasos sanguíneos pulmonares; esta puede estar provocada por, por ejemplo, hipoxia crónica, tromboembolismo o causas desconocidas (hipertensión pulmonar idiopática o primaria).

La hipertensión pulmonar se ha relacionado con varios estados clínicos que amenazan la vida, tales como síndrome de dificultad respiratoria del adulto (“ARDS”) e hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (“PPHN”). Zapol y

otros, Acute Respiratory Failure, p. 241-273, Marcel Dekker, Nueva York (1985); Peckham, J. Ped. 93:1005 (1978). La PPHN, un trastorno que afecta principalmente a niños completamente desarrollados, se caracteriza por resistencia vascular pulmonar elevada, hipertensión arterial pulmonar y derivación de derecha a izquierda de sangre a través del ductus arterioso y el foramen oval persistentes del corazón del recién nacido. Las tasas de mortalidad varían de 12-50%. Fox, Pediatrics 59:205 (1977); Dworetz, Pediatrics 84:1 (1989). La hipertensión pulmonar también puede dar como resultado un estado cardíaco potencialmente letal conocido como "cor pulmonar" o enfermedad cardíaca pulmonar. Fishman, "Pulmonary Diseases and Disorders" 2ª Ed., McGraw-Hill, Nueva York (1988).

Se han realizado intentos para tratar la hipertensión pulmonar administrando fármacos con efectos vasodilatadores sistémicos conocidos, tales como nitroprusida, hidralazina y bloqueadores de canales del calcio. Aunque estos fármacos pueden ser satisfactorios para disminuir la presión sanguínea pulmonar, típicamente ejercen un efecto indiscriminado, disminuyendo no solo la presión sanguínea pulmonar sino también la sistémica. Una gran disminución en la resistencia vascular sistémica puede dar como resultado una peligrosa acumulación de la sangre en la circulación venosa, hipotensión periférica (choque), isquemia ventricular derecha y fallo cardíaco consiguiente. Zapol (1985); Radermacher, Anaesthesiology 68:152 (1988); Vlahakes, circulation 63:87 (1981). Por ejemplo, cuando se administraba nitroprusida intravenosa a 15 pacientes para el tratamiento de la hipertensión pulmonar aguda debida a ARDS, la PAP media disminuía de 29,6 a 24,2 mm de Hg y la resistencia vascular pulmonar (PVR) disminuía en una media de 32%, pero la presión arterial isquémica media se reducía desde 89,6 mm de Hg hasta el nivel inaceptablemente bajo de 70 mm de Hg (Zapol y otros, 1985). La nitroprusida intravenosa no estaba recomendada para el tratamiento clínico de la hipertensión pulmonar, ya que "deteriora notablemente el intercambio gaseoso pulmonar incrementando Q_{VA}/Q_T" (la mezcladura de sangre venosa y arterial a través de una derivación anormal). Radermacher (1988).

Se ha presentado que la relajación fisiológica de los vasos sanguíneos resulta de la liberación de un factor relajante derivado del endotelio (EDRF) no prostanoide muy lábil por células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos. El EDRF estimula la enzima guanilato ciclasa dentro del músculo liso vascular, con el incremento resultante en GMP cíclico que provoca la relajación de este músculo, y que invierte de ese modo la vasoconstricción. Ignarro y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:9265 (1987) y Palmer y otros, Nature 327:524 (1987) identificaron el factor de relajación del músculo liso vascular liberado por el endotelio de arterias y venas como óxido nítrico ("NO"). También se cree que el NO es producido por la descomposición de nitratos orgánicos tales como nitroprusida y trinitrato de glicerilo. Ignarro, Circ. Res. 65:1 (1989); Furchgott, FASEB J. 3:2007 (1989). Higenbottam y otros, Ann. Rev. Resp. Dis. Suppl. 137:107 (1988) midieron los efectos vasodilatadores de NO inhalado en siete pacientes con un estado crónico denominado hipertensión pulmonar primaria. La PAP promedio de estos pacientes cuando respiraban 40 ppm de NO era 56,7 mm de Hg, en comparación con 59,6 mm de Hg cuando respiraban aire sin NO añadido, una diferencia de 2,9 mm de Hg, o aproximadamente 6% de la diferencia ("ΔPAP") entre la PAP de pretratamiento y lo que sería la PAP normal. Higenbottam y otros presentaron un promedio de 9% de reducción en la PVR en estos pacientes durante la inhalación de NO. No se observó una disminución correspondiente en la SAP.

Cuando se expone a oxígeno, el NO gaseoso es inestable y sufre oxidación espontánea hasta NO_2 y óxidos superiores de nitrógeno. Estos óxidos de nitrógeno superiores son tóxicos para el pulmón y pueden producir en altas concentraciones edema pulmonar. El NO es "el ligando que se une más rápidamente a hemoglobina descubierto hasta ahora". Meyer, Eur. Resp. J. 2: 494 (1988). En una solución acuosa diluida expuesta a oxígeno, el NO disuelto tiene una semivida de menos de 10 segundos debido a la oxidación rápida en nitrito y nitrato inorgánico. Ignarro, FASEB J. 3:31 (1989). The Occupational Safety and Health Administration (OSHA) ha fijado el límite de inhalación promedio ponderado en el tiempo para el NO en 25 ppm durante 10 horas. "NIOSH Recommendations for

Occupational Safety and Health Standards", Morbidity and Morality Weekly Report, Vol. 37, Nº S-7, p. 21 (1988).

Sumario de la Invención

La invención se refiere al uso de una mezcla gaseosa que consiste en NO y N_2 para la producción de un medicamento inhalable para invertir la vasoconstricción pulmonar aguda que resulta de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido.

Se dice aquí que un tratamiento vasodilatador pulmonar es "terapéuticamente eficaz" en un paciente dado si puede inducir en un niño transporte de O_2 transpulmonar mejorado, según se mide mediante un incremento de 10% o más de saturación de O_2 arterial corporal superior (preductal).

Los métodos descritos aquí son útiles para invertir la vasoconstricción pulmonar aguda, tal como la que puede resultar de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido. Óxido nítrico gaseoso se administra preferiblemente a un mamífero con vasoconstricción pulmonar de acuerdo con uno o más de los siguientes:

(a) la administración durante al menos tres minutos (más preferiblemente al menos seis minutos);

(b) la administración en ausencia de humo de tabaco;

(c) la concentración inhalada de óxido nítrico es al menos 1 ppm, más preferiblemente al menos 20 ppm, y lo mas preferiblemente al menos 80 ppm, no superando la concentración 180 ppm de ácido nítrico (controlándose tal concentración mediante una técnica tal como quimioluminiscencia);

(d) el óxido nítrico es inhalado como una mezcla que incluye óxido nítrico, oxígeno (O_2) y nitrógeno (N_2) gaseosos, lo más preferiblemente que tiene una F_IO_2 (es decir, proporción de O_2 gaseoso en volumen) de 0,21-0,99, siendo la proporción de O_2 en el aire 0,21; y

(e) la concentración de NO_2 se controla y se mantiene dentro de límites seguros (por ejemplo, menos de 1 ppm).

También se describe en la presente un dispositivo inhalador (preferiblemente suficientemente ligero para considerarse portátil, es decir, menor que 5 kg y más preferiblemente menor de 1 kg), dispositivo que puede ser de un diseño similar a los inhaladores disponibles actualmente para el tratamiento de ataques de asma, y que contiene óxido nítrico gaseoso presurizado. Tal dispositivo incluiría típicamente un recipiente que contiene gas presurizado que contiene al menos 1 ppm (preferiblemente al menos 5 ppa, más preferiblemente al menos 400 ppm y lo más preferiblemente al menos 100 ppa) de óxido nítrico; una carcasa que define una luz y un mecanismo, tal como una válvula liberable que puede funcionar apretando la válvula, para liberar de forma controlable el gas en la luz; estando configurada la luz para dirigir el gas liberado hacia el sistema respiratorio de un paciente. La luz puede incluir un tubo, una máscara o una cámara de rerrespiración tales como los encontrados típicamente en dispositivos inhaladores disponibles actualmente.

La invención descrita aquí proporciona un tratamiento o una terapia preventiva simples, seguros, rápidos y eficaces para invertir la vasoconstricción pulmonar aguda que resulta de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido. Se describe un inhalador portátil equipado con un cartucho de NO comprimido que podría usarse para administrar terapia de inhalación para la vasoconstricción pulmonar bien en un emplazamiento hospitalario o en una situación de campo de emergencia. Tal inhalador puede ser portado, por ejemplo, por una persona con riesgo de

desarrollar hipoxia. Un cartucho de NO comprimido podría estar conectado a un circuito de ventilación y usarse para tratar y estabilizar niños recién nacidos con PPHN durante el traslado desde el hospital en el que se producía el parto hasta uno con una unidad de cuidados intensivos.

El inhalador portátil podría contener un bote de NO comprimido en un gas portador inerte tal como NO_2. Unos pocos de los varios tipos de diseños de inhaladores que se han desarrollado hasta la fecha se analizan en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nº 4.667.668; 4.592.349; 4.534.343 y 4.852.561, cada una de cuyas patentes se incorpora aquí mediante referencia. Otros diseños de inhalador se describen en the Physicians' Desk Reference, 45ª Edición, Edward R. Barnhart, Publisher (1991). Cada uno de estos y otros inhaladores de tipo aerosol pueden adaptarse para ajustarse al aporte de NO gaseoso.

Puesto que el NO gaseoso que entra en la corriente sanguínea es rápidamente inactivado por la combinación con hemoglobina, los efectos vasodilatadores del NO inhalado se limitan a aquellos vasos sanguíneos cercanos al lugar del paso de NO por la corriente sanguínea: es decir, microvasos pulmonares. Por lo tanto, una ventaja importante de los métodos vasodilatadores pulmonares de la invención es que pueden prevenirse o tratarse selectivamente hipertensión pulmonar sin producir una disminución concomitante de la presión sanguínea sistémica hasta niveles potencialmente peligrosos. La invención permite la inversión eficaz de la hipertensión pulmonar sin el riesgo de subperfusión de órganos vitales, acumulación venosa, isquemia y fallo cardíaco que podría acompañar a la vasodilatación sistémica. Tal vasodilatación pulmonar aislada es importante para tratar PPHN en niños recién nacidos, ya que la vasodilatación sistémica agrava la mezcladura no deseada de sangre oxigenada y desoxigenada a través del ductus arterioso o el foramen oval de los recién nacidos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada, la parte experimental, la información y las reivindicaciones siguientes.

Descripción Detallada

Los dibujos se describen en primer lugar.

Dibujos

La Fig. 1 es una gráfica de la curva de respuesta a la dosis de NO para corderos con vasoconstricción pulmonar inducida por U46619.

La Fig. 2 es una gráfica que muestra los efectos de inhalar diversas concentraciones de NO mezclado con O_2, alternando con períodos de respiración de O_2 al 60-70% sin NO añadido, sobre la PAP de corderos que reciben infusiones continuas de U46619.

La Fig. 3 es una grabación de una cinta de registro que ilustra el efecto de hacer que un cordero con vasoconstricción pulmonar inducida por U46619 inhale 80 ppm de NO durante 6 minutos.

La Fig. 4 es una gráfica que muestra los efectos de inhalar diversas concentraciones de NO mezclado con O_2, alternando con períodos de respiración de O_2 al 60-70% sin NO añadido, sobre la resistencia vascular pulmonar (PVR) de corderos que reciben infusiones continuas de U46619.

La Fig. 5 es un par de gráficas que comparan el efecto de 180 ppm de NO inhalado con controles no tratados que

respiran aire sobre la PAP y la PVR de ovejas en las que una reacción de heparina-protamina ha inducido una PAP y una PVR elevadas.

La Fig. 6 es una vista en sección transversal del dispositivo inhalador descrito en la presente.

Terapia de Inhalación de NO para la Vasoconstricción Pulmonar

La invención proporciona por primera vez un método simple, rápido, selectivo y eficaz para invertir la vasoconstricción pulmonar aguda que resulta de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido, sin disminuir concomitantemente la presión sanguínea sistémica del paciente. La hipertensión pulmonar es una manifestación clínica ampliamente extendida, que afecta a diversos grupos de pacientes. El uso de NO inhalado se proporciona de acuerdo con la invención para la PPHN (hipertensión pulmonar persistente del recién nacido).

Método para la administración

NO gaseoso comprimido puede obtenerse de un suministrador comercial tal como Air Products and Chemicals, Inc. (Allentown, PA) o Airco (Murray Hill, NJ), típicamente como una mezcla de 200-800 ppm de NO en N_2 gaseoso puro. Es vital que el NO se obtenga y almacene como una mezcla libre de cualquier O_2 contaminante u otros óxidos superiores de nitrógeno, ya que tales óxidos superiores de nitrógeno (que pueden formarse mediante reacción de O_2 con NO) son potencialmente dañinos para los tejidos pulmonares. Si se desea, la pureza del NO puede demostrarse con análisis de quimioluminiscencia, usando métodos conocidos, antes de la administración al paciente. La mezcla NO-N_2 puede combinarse con aire u O_2 a través de, por ejemplo, rotámetros calibrados que previamente se han validado con un espirómetro. La concentración final de NO en la mezcla de respiración puede verificarse con una técnica química o quimioluminiscente bien conocida para los expertos en la especialidad (por ejemplo, Fontijin y otros, Anal. Chem. 42:575-579, 1970). Cualesquiera impurezas tales como NO_2 pueden lavarse mediante exposición a soluciones de NaOH, Baralyme o sosa-cal. Como un control adicional, también puede determinarse la F_IO_2 de la mezcla gaseosa final. Si se desea, el ventilador puede tener un eliminador de gases añadido a la salida espiratoria para asegurar que no escapen cantidades significativas de NO al ambiente adyacente.

En una situación hospitalaria o de campo de emergencia, podría efectuarse la administración de NO gaseoso, por ejemplo, uniendo un depósito de NO gaseoso comprimido en N_2, y un segundo depósito de oxígeno o una mezcla de oxígeno/N_2, a un inhalador diseñado para mezclar dos fuentes; controlando el flujo de gas desde cada fuente, la concentración de NO inhalado por el paciente puede mantenerse a un nivel óptimo.

El NO puede administrarse a mamíferos que se sospecha que tienen vasoconstricción pulmonar aguda que resulta de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido, a una concentración de 1 ppm a 40 ppm en aire, oxígeno puro u otro gas o mezcla de gases adecuados, durante tanto tiempo como sea necesario. La concentración puede incrementarse hasta de 80 a 180 ppm durante períodos de tiempo cortos: por ejemplo 5 min a 180 ppm de NO, cuando se desea un efecto drástico inmediato.

Determinación de la presión en flujo vascular pulmonar

La presión arterial pulmonar se controla lo más exactamente con un catéter arterial pulmonar (PA) dirigido por flujo, situado percutáneamente a través de una vena de un paciente bajo anestesia local; el flujo PA se mide habitualmente usando dilución térmica a través de tal catéter PA. Existen métodos alternativos para el control no invasivo indirecto: por ejemplo, ultrasonidos cardíacos, control de intervalos de tiempo sistólico y técnicas Doppler

con ventana telemétrica. Estos métodos alternativos de control pueden ser superiores siempre que no sea practicable la cateterización, tal como situaciones de emergencia, en pacientes que no son buenos candidatos para la cateterización o en tratamientos en marcha o protocolos establecidos.

Efecto farmacológico del óxido nítrico

Es probable que el NO inhalado actúe difundiéndose en el espacio vascular adyacente a los alveolos y provocando la relajación del músculo liso vascular pulmonar, permitiendo así un incremento en el flujo sanguíneo pulmonar y el intercambio de gases. Una evidencia preliminar obtenida en cinco seres humanos con fallo respiratorio agudo intenso demuestra que NO (aproximadamente 20 ppm) inhalado durante la ventilación mecánica a lo largo de períodos de hasta un mes reduce tanto la presión arterial pulmonar como Q_{vA}/Q_T (la derivación de derecha a izquierda: una medida de la ineficacia de transporte de oxígeno pulmonar), produciendo de ese modo un incremento marcado de los niveles de oxígeno en sangre de los pacientes. Esto sugiere que la vasodilatación por NO se produce solo en alveolos ventilados y no en alveolos no ventilados o colapsados, en contraste notable con resultados observados después de vasodilatadores administrados intravenosamente tales como nitroprusida. Localizando el aporte de NO en forma gaseosa directamente en los pulmones, el NO disuelto puede ejercer inmediatamente su efecto farmacológico sobre el músculo liso vascular elegido, antes de la inactivación del NO mediante unión a hemoglobina. Al mismo tiempo, la unión rápida de NO a hemoglobina asegura que cualquier acción vasodilatadora del NO inhalado sea solamente un efecto local o selectivo en los vasos sanguíneos del pulmón, sin vasodilatación concomitante aguas abajo en la circulación sistémica.

Dispositivos de inhalación

La terapia de inhalación de la invención se administra preferiblemente mediante el uso de uno de los dispositivos de inhalación descritos en la presente. Uno de tales dispositivos 10 se ilustra en sección transversal en la Fig. 17, que muestra una carcasa 14 que define una cámara 20 en comunicación con una luz 16; un recipiente 12 que contiene gas presurizado que tiene al menos 1 ppm de óxido nítrico disuelto en un propelente licuado o un gas inerte comprimido, recipiente 12 que se monta de forma deslizable en la cámara 20; un mecanismo 18 de válvula activado por presión para liberar de forma controlable el contenido presurizado del recipiente 12 a la luz 16; y, constituyendo un extremo de la luz 16, una cámara 22 de rerrespiración que tiene válvulas 24 de paso único a través de las cuales aire 26 puede entrar en la cámara 22 de rerrespiración, pero a través de las cuales el gas terapéutico no puede escapar. Un paciente utiliza el dispositivo pulsando el extremo 26 superior del recipiente 12 que sobresale de la carcasa 14, deslizando de ese modo el recipiente 12 descendentemente hacia la cámara 20 y oprimiendo el mecanismo 18 de válvula. Esto hace que el contenido presurizado del recipiente 12 se libere a la luz 16 y la cámara 22 de rerrespiración. El paciente inhala entonces una porción del contenido de la cámara 22 de rerrespiración, aspirando aire 28 a través de la válvula 24 de paso único hacia la cámara 22 de rerrespiración para reemplazar la porción del contenido inhalado por el paciente. Una sola dosis del agente terapéutico liberado desde el recipiente 12 hacia la cámara 22 de rerrespiración puede emplear varias respiraciones para que sea suficientemente inhalado por el paciente. El peso total de este dispositivo sería menor que 200 gramos, de modo que sea fácilmente portátil.

Información experimental

Los siguientes datos experimentales de animales y seres humanos y el protocolo aprobado para estudios en seres humanos son presentados como ejemplos en apoyo de la invención.

VASODILATACIÓN PULMONAR

A. Administración de óxido nítrico gaseoso a corderos

i. Métodos

preparación quirúrgica del modelo animal:

Ocho corderos Suffolk que pesaban 25-35 kg se sometieron a toracotomía estéril para colocar un conducto auricular izquierdo, traqueostomía y conducto en la arteria femoral bajo anestesia endotraqueal general con balotano/oxígeno tres días antes del estudio. Después de tres días de recuperación los corderos se sometían a colocación estéril de un catéter de control de la arteria pulmonar con dilución térmica French 7 bajo anestesia local.

Condiciones del estudio:

Corderos no anestesiados despiertos se estudiaron para evitar anestesia general que puede mitigar la vasoconstricción hipóxica. Los corderos se pusieron en una jaula de Babraham y se dejó que bebieran y comieran a voluntad. Se realizaron dos estudios separados dos días sobre cada uno de los seis corderos. Después del estudio los corderos fueron sacrificados con una sobredosis de barbitúrico y sus pulmones se fijaron, se tiñeron y se examinaron mediante microscopio óptico con respecto a cambios patológicos.

Administración de NO a corderos con vasoconstricción pulmonar inducida con U46619:

El primer día del estudio, a corderos que respiraban oxígeno al 60-70% se les administró una infusión de un vasoconstrictor pulmonar patentado, el análogo de endoperóxido estable ácido (5Z,9α,13E,15S)-11,9-(epoximetano)prosta-5,13-dien-1-oico (U46619, The Upjohn Company, Kalamazoo, MI) de tromboxano a una velocidad de 0,4-0,8 μg/kg/min. La traqueostomía se conectó a un circuito que no es de rerrespiración que consiste en una bolsa de reserva de 5 litros y válvulas de paso único para aislar gas inspirado del expirado. El gas expirado se atrapó y se descartó. El gas inspirado era una mezcla precisa de oxígeno y nitrógeno inmediatamente diluida con NO para producir la concentración inspirada correcta. Usando medidores de flujo calibrados volumétricamente, cantidades variables de NO se mezclaron con N_2 para obtener la concentración de NO inspirado deseada a una concentración de oxígeno inspirado (F_IO_2) de 0,6-0,7. La bolsa de reserva se vació después de cada nivel de inhalación de NO. El semitiempo de permanencia de NO en la reserva de gas era 15 segundos o menos para minimizar la conversión en NO_2. El NO se obtuvo de Air Products and Chemicals, Inc., Allentown, PA como una mezcla de 235 ppm de NO en N_2 puro. El análisis por quimioluminiscencia demostraba menos de 12 ppm de N_2 en esta mezcla. Fontijin, Anal. Chem. 27:1903 (1981).

Una curva de respuesta a la dosis de vasodilatador pulmonar que representa cambios en la PAP como una función de la concentración de NO inhalada durante la infusión de U46619 gaseoso producía para ocho corderos que respiraban una serie de mezclas de NO/O_2 crecientes de 5, 10, 20, 40 y 80 ppm de NO durante seis minutos (Fig. 1). Cada nivel de exposición a NO fue seguido por seis minutos de respiración de la mezcla de oxígeno sin NO (Fig. 2). Una segunda exposición a NO se examinó durante períodos similares. Subsiguientemente, un período de control respirando la mezcla de oxígeno se estudió seis minutos después de cesar la infusión de U46619. A cada período de tiempo de tres y seis minutos después de la administración o la interrupción de NO durante el estudio, se midió la presión arterial pulmonar (PAP) media y fásica, la presión auricular izquierda (LAP), la presión arterial sistémica (SAP) y la presión venosa central (CVP). Todas las presiones se registraron en un grabador de cinta de registro de varios canales Hewlett Packard con transductores puestos a cero a presión atmosférica en el punto medio del tórax (por ejemplo, véase la Fig. 3). El gasto cardíaco (CO) se midió mediante dilución térmica como el promedio de dos

determinaciones inyectando 5 ml de lactato de Ringer a 0ºC. La resistencia vascular pulmonar (PVR) y la resistencia vascular sistémica (SVR) se computaron mediante fórmulas estándar; la PVR medida a cada concentración de NO inhalado se muestra en la Fig. 4. Se realizaron análisis estadísticos apropiados y todos los datos se expresaron como media ± error estándar.

Administración de NO a corderos con vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia

Cinco corderos despiertos se estudiaron durante un período de respiración de una mezcla gaseosa hipóxica para inducir hipertensión pulmonar hipóxica aguda. Tres corderos se excluyeron debido a sepsis y fallo cardíaco. Se usaron técnicas de control hemodinámico similares a las descritas anteriormente. Se empleó un circuito que no era de rerrespiración que contenía una bolsa de reserva de 25 litros y la F_IO_2 se redujo hasta 0,06-0,08 para producir una PAP media cercana a 25 mm de Hg a una P_aO_2 cerca de 30 mm de Hg. Se añadieron a continuación bien 40 o bien 80 ppm de NO a la mezcla gaseosa inspirada. Los flujos de gas totales se mantuvieron a 35 l/min para evitar la rerrespiración debida a hiperventilación. La F_IO_2 inspirada se controló con un electrodo (modelo 5590, Hudson Co., Temecala, CA) y se añadió CO_2 puro al gas inspirado para mantener la concentración de CO_2 mareal final a 4,5-6%. Las medidas de la hemodinámica central y el intercambio de gases se obtuvieron en la línea de base, durante la hipoxia, y a los 3 y 6 minutos de respiración de NO durante la hipoxia. Se realizaron comparaciones usando pruebas t apareadas.

ii. Resultados

Dos corderos de control sin infusión de fármaco respiraron 80 ppm de NO a una F_IO_2 de 0,6-0,7. No había cambio de PAP, SAP, CO o SVR medios en estos corderos.

En ocho corderos, los análisis de regresión de la concentración de NO durante la infusión de U46619 frente a SVR, CO o SAP media no mostraban cambio significativo. Sin embargo, todos los niveles de dosis de inhalación de NO producían una reducción instantánea de la vasoconstricción pulmonar y la hipertensión pulmonar provocadas por infusión de U46619 (Figs. 1, 2). El comienzo de la vasodilatación pulmonar se producía segundos después del comienzo de la inhalación de NO. El efecto vasodilatador era casi máximo en menos de 3 minutos (Fig. 3). Cesar de inhalar NO provocaba una vuelta al nivel previo de vasoconstricción en de 3 a 6 minutos. La curva de respuesta de vasodilatador pulmonar NO inhalado de ocho corderos se muestra en la Fig. 1. 5 ppm de NO (una dosis pulmonar inhalada de 0,89 μg/kg/min) reducían significativamente la presión PA, y una respuesta vasodilatadora casi completa se producía inhalando 40 u 80 ppm. Después de considerar la menor reducción a lo largo del tiempo de la PAP de la línea de base durante la infusión de U46619, la comparación de la respuesta vasodilatadora de la segunda exposición a respirar 5, 10 y 20 ppm de NO no demostraba una reducción significativa desde la serie previa de exposiciones (Fig. 2). Un estudio adicional de cuatro corderos que inhalaban 80 ppm de NO a lo largo de una hora durante la infusión de U46619 demostraba vasodilatación pulmonar hasta una PAP normal, volviendo la hipertensión pulmonar después de la inhalación de NO.

Los cinco corderos en los que se había inducido hipertensión pulmonar hipóxica aguda demostraban un incremento notable del gasto cardíaco. En cada caso en el que se añadían 40 u 80 ppm de NO a la mezcla gaseosa hipóxica inspirada, la presión arterial pulmonar volvía hasta niveles de control a pesar del mantenimiento de un gasto cardíaco elevado; la PVR media caía 33% (Tabla 1). La P_aO_2 y la P_vO_2 durante la hipoxia con y sin NO eran similares.

TABLA 1

ALTERACIONES DE LA HEMODINÁMICA Y EL INTERCAMBIO DE GASES

	CONTROL	HYPOXIA	HYPOXIA + 40-80 ppm de NO
F_IO_2	0,21	0,06-0,08	0,06-0,08
P_aO_2 (mm de Hg)	70,8 ± 4,4	28,2 ± 1,4*	31,1 ± 1,7*
P_vO_2 (mm de Hg)	36,8 ± 2,5	16,6 ± 1,8*	19,8 ± 3,2
P_aCO_2 (mm de Hg)	33,9 ± 1,4	38,6 ± 2,6	40,0 ± 2,7
pHa	7,47 ± 0,01	7,42 ± 0,03	7,40 ± 0,03
PAP (mm de Hg)	16,7 ± 0,6	28,3 ± 2,2*	18,7 ± 1,1#
LAP (mm de Hg)	5,2 ± 0,8	6,4 ± 0,5	4,2 ± 1,0
CO (1/min)	4,55 ± 0,13	7,08 ± 0,22*	7,56 ± 0,79*
PVR (mm de Hg/l/min)	2,51 ± 0,11	3,07 ± 0,25	2,01 ± 0,35#
SAP (mm de Hg)	103 ± 6	113 ± 7	106 ± 5#
CVP (mm de Hg)	3,0 ± 1,3	3,5 ± 0,8	2,8 ± 1,6
SVR (mm de Hg/l/min)	21,7 ± 1,4	16,2 ± 0,9*	13,7 ± 1,0*

n=5, media ± E.E.

* el valor p<0,01 difiere del control

el valor p<0,01 de NO+hipoxia difiere de la hipoxia

iii. Experimentos Adicionales

La Fig. 5 ilustra la capacidad de 180 ppm de NO inhalado para prevenir la PAP y PVR elevadas provocadas por la reacción heparina-protamina en nueve ovejas despiertas en comparación con ovejas que respiran aire de control. La reacción heparina-protamina se indujo en estas nueve ovejas administrando en primer lugar heparina (200 U/kg; Elkins-Sinn, Cherry Hill, NJ), seguido cinco minutos más tarde (en el tiempo cero) por protamina (2 mg/kg; Elkins-Sinn). Cada una de estas ovejas también servía como un control. A seis ovejas adicionales se les administró una infusión intravenosa de nitroprusida sódica (40 μg/kg/min de peso corporal; Elkins-Sinn) mientras respiraban aire (datos no mostrados). La dosis inhalada de 180 ppm de NO resultaba capaz de disminuir la PAP inducida por

heparina-protamina en este modelo de ovejas hasta un grado comparable con 40 μg/kg/min de infusión de SNP, y sin la propensión del último fármaco a provocar una hipotensión sistémica notable.

Pulmones de tres corderos que habían respirado 80 ppm de NO durante 180 min se estudiaron mediante microscopio óptico con respecto a la evidencia de cambios morfológicos provocados por respirar NO. No se observaron diferencias significativas entre estos pulmones y los pulmones de control.

B. Protocolo para la administración de NO gaseoso a niños con Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido

Lo siguiente es una descripción de un protocolo experimental aprobado para la administración de NO a recién nacidos en el Massachusetts General Hospital.

Selección de participantes:

Diez pacientes con hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN) se enrolaron en el estudio.

a. Criterios de inclusión

- niños por debajo de 1 semana de edad

- niños con zonas de muestreo de sangre arterial en la distribución pre- y post-ductal

- niños que requieren apoyo de ventilación mecánica

- fallo respiratorio según se define por los criterios de Short, Clin. Perinatol. 14:737-748, 1987

- los niños pueden haber recibido infusiones de vasodilatadores sistémicos y/o tampones (bicarbonato)

b. Criterios de exclusión

- la premadurez según se define por una edad de gestación <37 semanas mediante examen, ultrasonidos maternofetales y fechas

- peso en el nacimiento <2500 g

- hipoplasia pulmonar según se sugiere por una historia de oligohidramnios, hernia diafragmática congénita, escoliosis congénita o características de acuerdo con distrofia toráfica asfixiante

- neumotórax no evacuado a pesar del tubo pectoral

- neumopericardio o neumomediastinio con hipotensión

- lesiones cardíacas y vasculares anatómicas fijas (excluyendo ductus arterioso persistente y foramen oval persistente)

- hemorragia pulmonar activa o conteo de plaquetas <50.000/mm^3

- ultrasonidos craneales en menos de 24 horas de la entrada en el estudio que proporcionan evidencia de hemorragia intracraneal

- hiperviscosidad según se define por un hematocrito venoso ≥ 70% a menos de 24 horas del nacimiento

- sepsis, según se define por cultivos sanguíneos positivos para organismos patógenos

- aquellos que no tienen un consentimiento informado de un progenitor o tutor legal

Procedimiento del estudio

Los pacientes seleccionados se mantuvieron en una posición supina y recibieron 3 μg/kg de fentanilo para la sedación y 0,1 mg/kg de bromuro de pancuronio para la relajación muscular (a no ser que fueran así tratados en la hora previa). El niño será transportado a la sala de cateterización acompañado por un anestesiólogo pediátrico asistente, donde un catéter arterial pulmonar dirigido por flujo se colocará percutáneamente a través de una vena femoral bajo anestesia local. El catéter medirá directamente la presión arterial pulmonar para determinar exactamente el grado de hipertensión pulmonar y la respuesta vasodilatadora a la inhalación de NO. Al volver a la UCI neonatal, la F_IO_2 se ajustará hasta 0,90. Se dejará que el paciente se equilibre durante esa fase de control a lo largo de 20 minutos después de que hubieran cesado todas las intervenciones asistenciales y médicas necesarias. Si no se ha producido mejora, según se define posteriormente, se obtendrá una muestra de sangre arterial de una zona postductal. Se introducirá a continuación NO en nitrógeno en el circuito de respiración mediante flujo continuo. Una válvula de paso único evitará el reflujo de oxígeno en el depósito de NO. Se mantendrán los mismos F_IO_2 (0,90) y caudal. La concentración inicial de NO inspirado será 20 ppm. La mejora se definirá como una P_aO_2 > 100 mm de Hg y una A-aDO_2 de <570 mm de Hg (muestra postductal). Si no se aprecia cambio, la concentración de NO inhalado se incrementará hasta 40 ppm a una F_IO_2 y caudal constantes. Se medirá de nuevo el gas sanguíneo arterial postductal. Si de nuevo no se cumplen los mismos criterios, la concentración de NO se incrementará hasta 80 ppm y se muestreará un tercer gas sanguíneo arterial. El período de respiración para cada concentración de NO durará 10 minutos.

Después de la terminación del periodo de tratamiento, se obtendrá de nuevo sangre para el análisis del gas sanguíneo arterial. También se tomaban muestras antes y después de la exposición a NO para el análisis de niveles de methemoglobina y hemoglobina y el conteo de reticulocitos. Se examinará una gota de sangre con respecto a la evidencia de cuerpos de Heinz. Esto se repetirá 24 horas después del tratamiento para determinar cualesquiera cambios asociados con la respiración de NO. El volumen total de sangre muestreada será menor que 5 ml.

Metodología estadística:

Los datos se determinarán con un análisis de la varianza con medias repetidas de tamaños de grupos desiguales. Winer, “Single factor experiments having repeated measures on the same elements”, en Statistical Principles in Experimental Design, 2ª Ed., NY, McGraw-Hill, (1971), pp. 261-308. La prueba *post hoc* será con una U de Mann-Whitney. La significación se juzgará al nivel de 5%.

C. Resultados de administrar NO a niños con hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN)

Primer sujeto. A través de un uso compasivo, se administró óxido nítrico a un niño que sufría hipertensión pulmonar persistente y enfermedad cardíaca congénita. Como resultado de la ventilación prolongada, la ausencia de una zona

de muestreo de sangre arterial preductal y la existencia del canal auricular-ventricular (AV), el paciente no se incluía en el estudio de PPHN mencionado anteriormente. El paciente era un varón con desarrollo total de 3225 g que había sido tratado con oxigenación con membrana extracorpórea (ECMO) debido a la gravedad de su enfermedad cardíaca congénita e hipoxemia profunda. Se le había retirado la ECMO y se había mantenido intubado y ventilado en la unidad de cuidados intensivos de recién nacidos. Subsiguientemente se volvió progresivamente hipoxémico, según se reflejaba en sus valores de oximetría pulsatoria (POX) postductal. En el momento en el que se llevó al laboratorio de cateterización para confirmar la existencia del canal A-V y para determinar si era necesaria cirugía cardíaca emergente, estaba recibiendo soporte vital médico y ventilatorio máximo y permanecía peligrosamente hipoxémico. Bajo estas circunstancias, se solicitó consentimiento para tratar al paciente con óxido nítrico.

Al llegar al laboratorio de catetererización, el paciente estaba extremadamente cianótico. Fue tratado con fentanilo, oxígeno, hiperventilación y bolos fluidos intravenosos para estabilizarlo antes de administrar NO. Según se muestra en la Tabla 2, la cateterización revelaba hipertensión pulmonar intensa y un canal A-V. La derivación no parecía corregirse con el tratamiento con oxígeno o hiperventilación.

TABLA 2

HEMODINÁMICA Y VALORES DE GAB EN SANGRE PARA TRATAMIENTO CON INHALACIÓN DE UN NIÑO CON PPHN

SALIDA Nº 2	LLEGADA	F_IO_2 1,0	F_IO_2 0,9	NO 20 ppm	NO 40 ppm	NO 80 ppm	SALIDA Nº 1	NO 80 ppm
O_2 SAT (%)								
RA	23	61	67	67	72	74	14	- -
PA	28	69	72	70	74	75	17	- -
POSTDUCTAL	63	74	84	85	74	88	26	85
ART_{19}								
POX 24	-	9	91	91	93	94	21	90
PO_2 ARTERIAL POSTDUCTAL (mmMg):								
ART. 16	30	43	48	46	50	51	21	48

SALIDA Nº 2	LLEGADA	F_IO_2	F_IO_2	NO	NO	NO	SALIDA Nº 1	NO
		1,0	0,9	20 ppm	40 ppm	80 ppm		80 ppm
PRESIÓN MEDIA (cm/g)								
RA 5	6	4	4	5	4			
PA 53	57	52	47	50	52			
ART 47	52	50	45	45	43			
POX = oxímetro pulsatorio								

Se utilizó un regulador para disminuir escalonadamente la presión del NO en un mezclador, lo que permitía ajustar las cantidades relativas de los suministros de 800 ppm de NO/NO_2 y NO_2 al 100%. Tratando al paciente con oxígeno puro, se incrementó el flujo de N_2 a través de un regulador de flujo hacia el circuito inspirador del circuito de respiración hasta que la F_IO_2 era 0,9. Los efectos se muestran en la Tabla 2. Esto proporcionaba una dilución 1:10 del nitrógeno gaseoso. Se usó a continuación el mezclador para ajustar las cantidades relativas de N_2 y NO/NO_2 para proporcionar de 0 a 80 ppm de NO.

Los datos de la Tabla 2 demuestran que la exposición a NO no tenía efecto adverso sobre la presión sanguínea sistémica (“Presión Arterial Media”), aunque inducía un moderado incremento en la saturación arterial, los valores de oximetría pulsatoria y la presión parcial arterial de oxígeno. Esto puede reflejar un efecto estabilizante del gas durante este período. Después de que el óxido nítrico se interrumpiera y se retiraran los catéteres centrales, la saturación arterial y la tensión de oxígeno gaseoso caían precipitadamente. Los valores de RA y PA no podían determinarse, ya que los catéteres se habían retirado. Como otros intentos para resucitar al paciente fallaban, el óxido nítrico se restauró en un intento de mejorar la condición del bebé. Hubo éxito al mejorar la saturación de oxígeno y la tensión de gas sanguíneo. En un intento subsiguiente para retirar al paciente el óxido nítrico, de nuevo el nivel de oxigenación del paciente se deterioraba hasta niveles peligrosamente bajos. El paciente se mantuvo con óxido nítrico y se devolvió a la unidad de cuidados intensivos de recién nacidos.

Mientras estaba en la unidad de cuidados intensivos, se infundió prostaglandina E1 en el paciente en un intento de dilatar la vasculatura pulmonar. A pesar de una dosificación estándar de prostaglandina, el óxido nítrico no podía interrumpirse sin la vuelta de saturaciones de oxígeno peligrosamente bajas. El paciente permanecía con óxido nítrico hasta que podía tratarse con ECMO. Este experimento demuestra la utilidad del óxido nítrico para mejorar el intercambio gaseoso en este paciente con hipertensión pulmonar y enfermedad cardíaca congénita. Sujetos subsiguientes. Dos niños más con PPHN se han tratado mediante inhalación con NO. Tanto tenían una excelente respuesta a respirar NO en 20-80 ppm, mostrando incrementos en la oxigenación preductal, como sobrevivían un largo tiempo. Uno de los niños mostraba una mejora tan rápida con la inhalación de NO solo que se evitaba completamente la ECMO.

D. Resultados de administrar NO a seres humanos con pulmones normales (no constreñidos) e hipóxicos

(constreñidos)

Los efectos de respirar 40 ppm de NO se estudiaron en cinco sujetos voluntarios humanos sanos despiertos que inhalaban diversas mezclas de gas durante períodos de 10 min, con medidas que comenzaban a los 6 min. La Tabla 4 muestra que en sujetos que respiran aire con una concentración de O_2 normal (21% v/v) y cuyos pulmones no estaban por lo tanto vasoconstreñidos, el NO no tiene efecto vasodilatador pulmonar o sistémico.

TABLA 4

EFECTOS DE 40 ppm DE NO SOBRE PULMÓN HUMANO

NO CONSTREÑIDO

		Aire (21% de O_2)	Aire (21% de O_2) + 40 ppm de NO	Aire (21% de O_2)
PAP	mm de Hg	13,7 ± 1,7	14,0 ± 1,8	15,4 ± 2,8
PCWP	mm de Hg	9,1 ± 1,7	10,1 ± 2,5	9,9 ± 2,2
CO	l/min	6,40 ± 0,92	6,40 ± 0,88	6,95 ± 1,18
PVR	mm de Hg·min/l	0,72	0,61	0,79
MAP	mm de Hg	87,4 ± 6,0	88,0 ± 3,7	90,2 ± 5,4
CVP	mm de Hg	5,7 ± 1,4	6,3 ± 1,7	6,1=1,6
PaO_2	mm de Hg	99,6 ± 7,5	94,7 ± 16,3	95,3 ± 14,5
$PaCO_2$	mm de Hg	38 ± 6	38 ± 5	39 ± 4
SaO_2	%	97,6 ± 0,4	96,0 ± 1,0	97,1 ± 1,2

Valores dados como X ± S.D. n=5

En contraste, los mismos sujetos que respiraban un nivel relativamente bajo de oxígeno (12% v/v) exhibían vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia con PAP y PVR elevadas, un efecto que podía invertirse completamente añadiendo 40 ppm de NO a la mezcla gaseosa inhalada (Tabla 5).

TABLA 5

EFECTOS DE 40 PPM DE NO SOBRE EL PULMÓN HUMANO

VASOCONSTREÑIDO HIPÓXICO

		Aire (21% de O_2)	12% de O_2	12% de O_1, *40 ppm de NO	12% de O_2	Aire (21% de O_1)
PAP	mm de Hg	14,3±2,3	19,1±2,6#	13,7±1,7*	15,7±2,2	14 ,5 ± 1,5
PCWPx	mm de Hg	8,8±1,9	8,5±1,3	8,5±2,2	9,2±1,4	9,7 ± 1,9
CO	l/min	6,65±0,95	8,66±1,87	8,37±1,68	8,5±1,9	7,06 ± 1,84,
PVT	mm de Hg·min/l	0,83	1,22	0,62	0,76	0,68
MAP	mm de Hg	88,8±6,9	89,4±8,4	86,0±5,7	84,4±7,6	88, 4 ± 6,3
CVP	mm de Hg	5,9±3,0	5,6±2,2	5,2±2,6	5,0±1,9	6,7 ± 1 ,6
psO_2	mmMg	99±16	67±5	65±5	65±8	91 ± 16
$PaCO_2$	mmMg	40±6	35±3	36±5	33±6	39 ± 6
SaO_2	%	97,5±1,0	85,6±3,6	83,8±5,7	82,6±11	86,8 ± 1,3

n=5, x ± 5,0, el valor de p<0,01 difiere del valor de la primera columna

el valor de p<0,01 difiere de la situación previa

REIVINDICACIONES

1. Uso de una mezcla gaseosa que consiste en NO y N_2 para la producción de un medicamento inhalable para invertir la vasoconstricción pulmonar aguda que resulta de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el NO está presente en dicho medicamento inhalable en una cantidad de al menos 20 ppm y lo más preferiblemente al menos 80 ppm.

3. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la concentración de NO_2 en dicho medicamento inhalable se comprueba y se mantiene en menos de 1 ppm.

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho medicamento inhalable comprende una mezcla que incluye NO, O_2 y N_2, teniendo preferiblemente una F_iO_2 de 0,21-0,99.

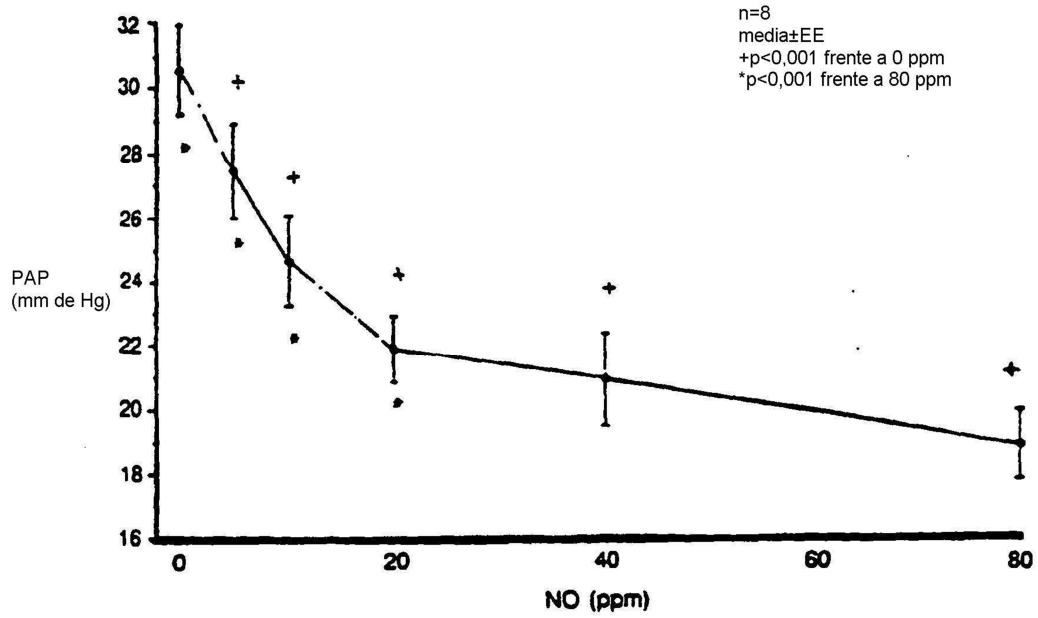


FIG. 1

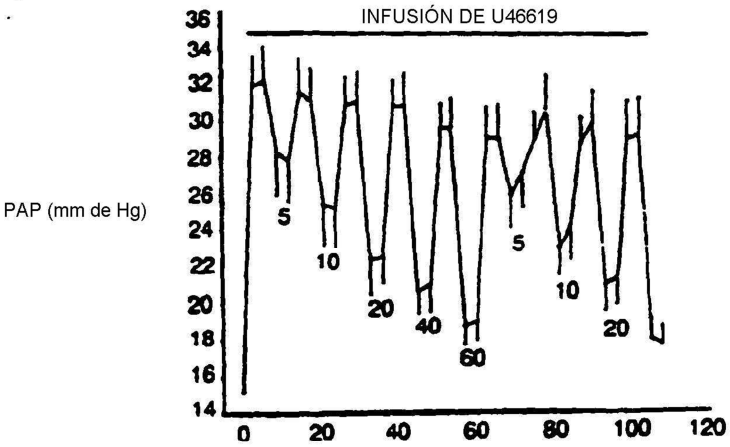
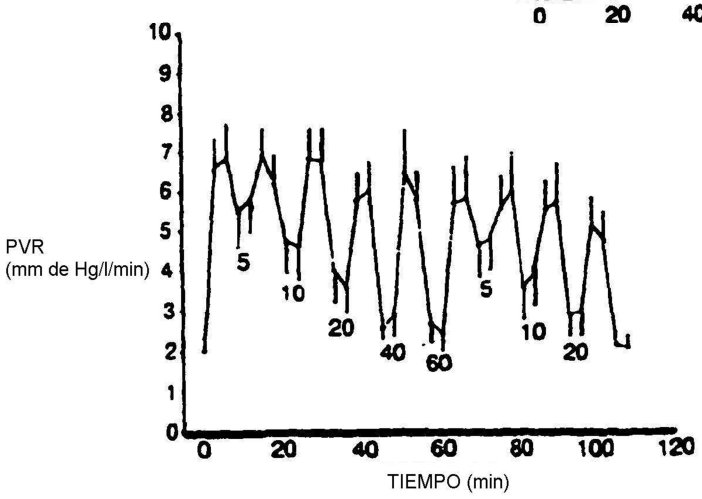


FIG. 2



n=8
media±EE

FIG. 4

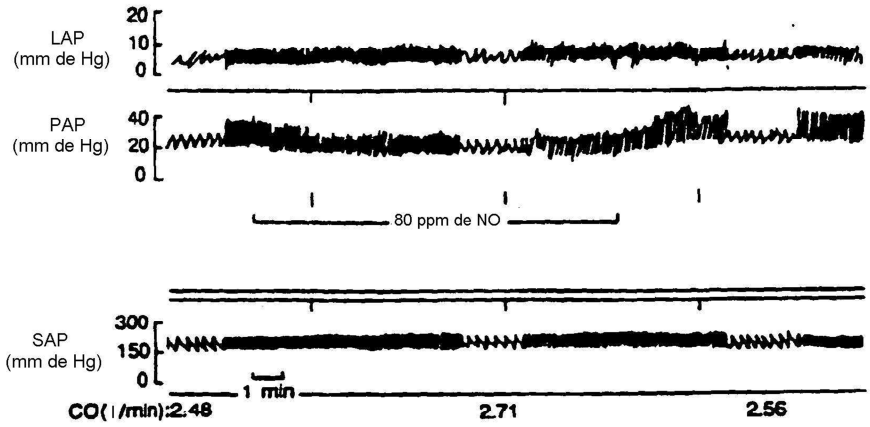

LAP
(mm de Hg)
20
10
0
PAP
(mm de Hg)
40
20
0
80 ppm de NO
SAP
(mm de Hg)
300
150
0
1 min
CO(l/min):2.48
2.71
2.56

FIG. 3

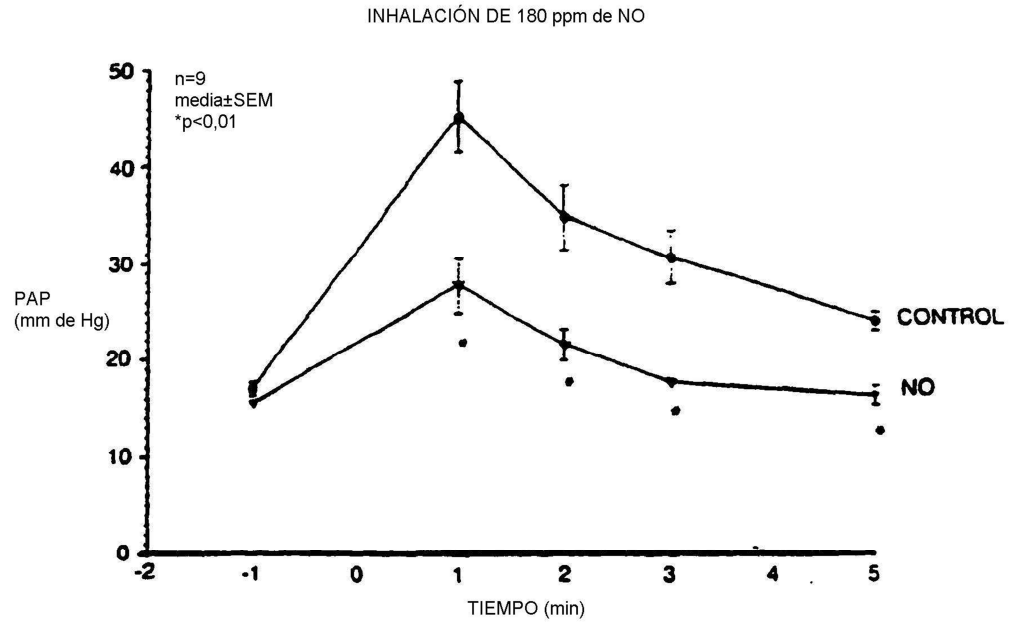

INHALACIÓN DE 180 ppm de NO
n=9
media±SEM
*p<0,01
PAP
(mm de Hg)
50
40
30
20
10
0
-2
-1
0
1
2
3
4
5
TIEMPO (min)
CONTROL
NO

FIG. 5a

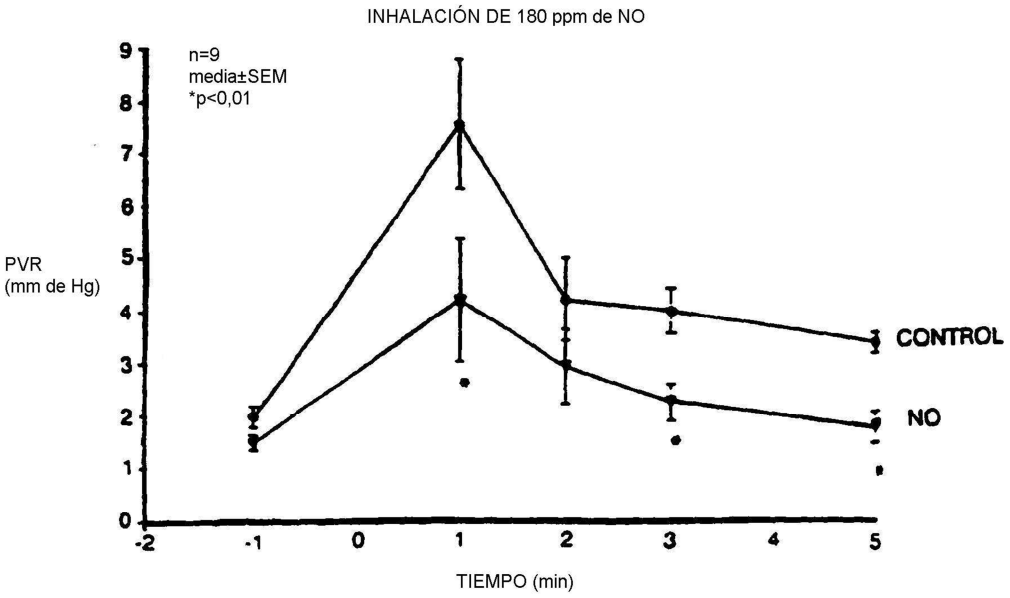

INHALACIÓN DE 180 ppm de NO
n=9
media±SEM
*p<0,01
PVR
(mm de Hg)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-2
-1
0
1
2
3
4
5
TIEMPO (min)
CONTROL
NO

FIG. 5b

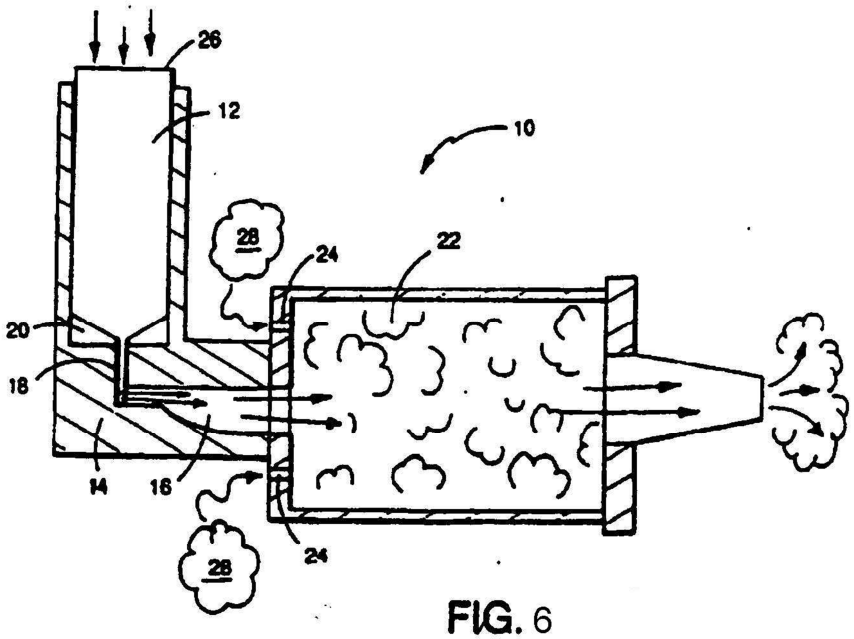


FIG. 6