

Investigaciones realizadas por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) para contribuir al control de la epidemia de COVID 19

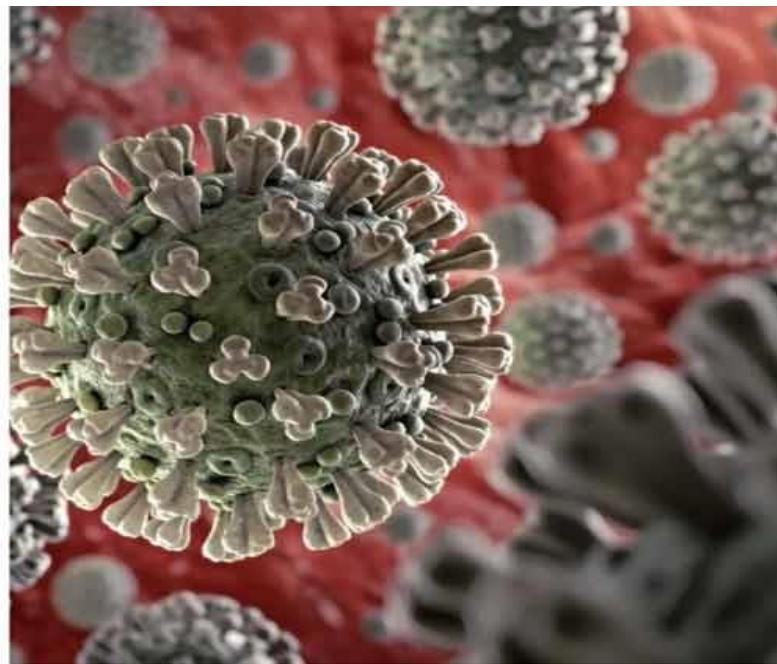


**Dr. Gerardo Guillén
CIGB, La Habana, Cuba**

Investigaciones en curso

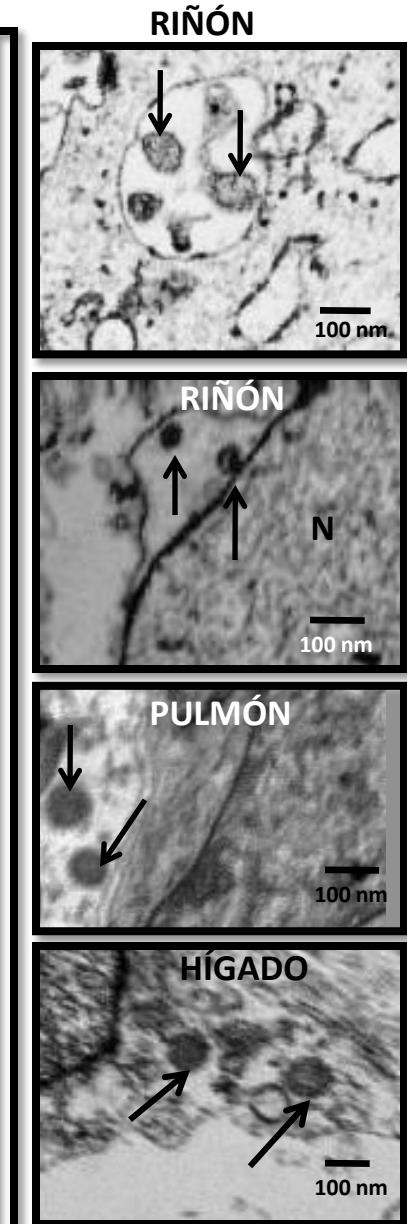
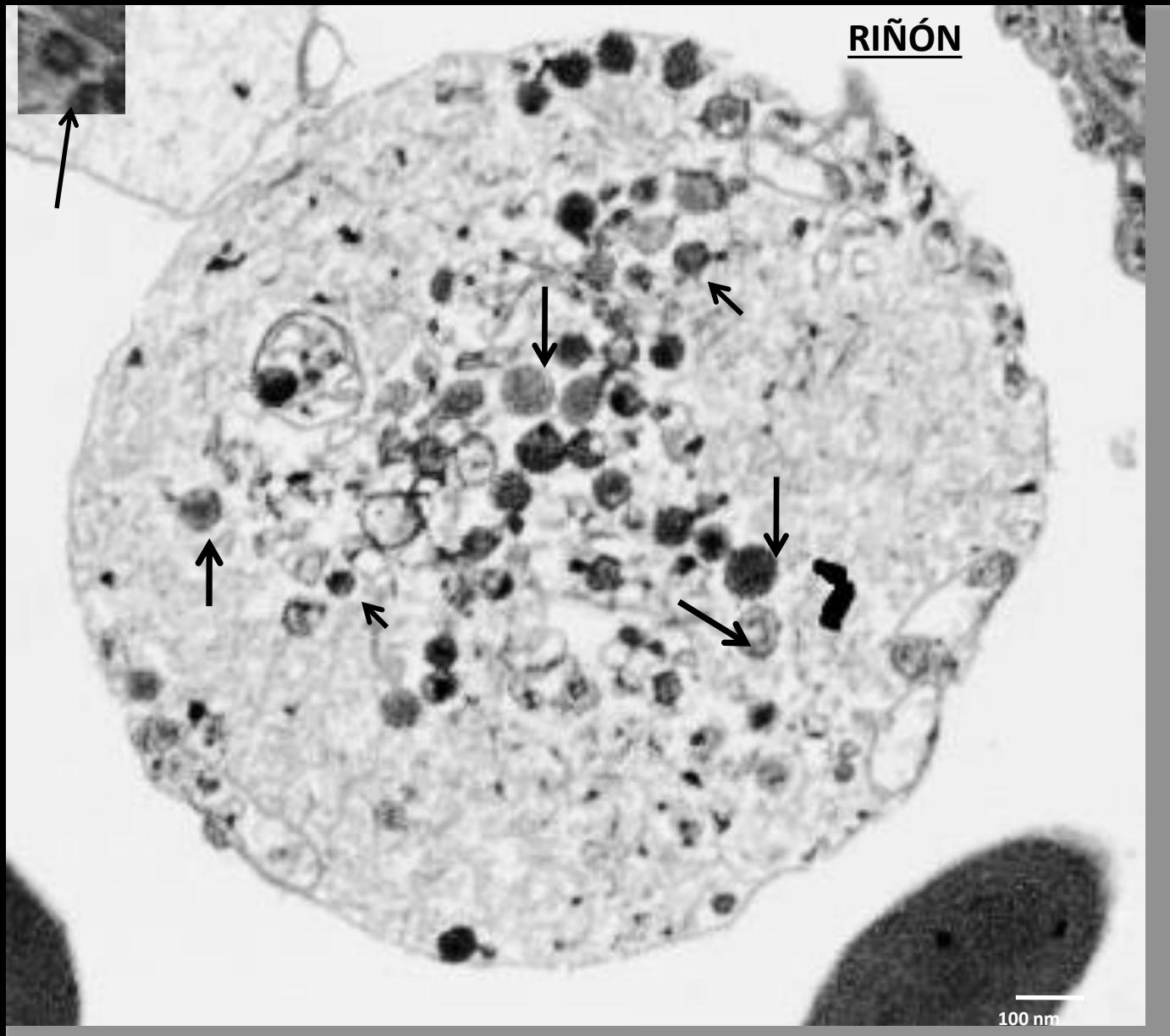
- 1. Estudios de Microscopía Electrónica a muestras de anatomía patológica y muestras de aislamientos virales.**
- 2. Estudio clínico de vacuna para potenciar la Inmunidad Innata (CIGB 2020)**
- 3. Estudio clínico de comparación de Interferones alfa y alfa + gamma (ESPERANZA)**
- 4. Estudio clínico de evaluación de péptido antiviral (CIGB 325) (ATENEA)**
- 5. Estudio de prueba de concepto de formulación para administración nasal de Interferon alfa.**
- 6. Estudio compasional y generalización de uso del péptido CIGB 258 (Jusvinza) contra la hiperinflamación**
- 7. Araña de transmisión epidemiológica.**
- 8. Estudio de lentes negativizadores.**
- 9. Estudio de comparación de medios de transportación de exudados.**
- 10. Estudio de comparación de hisopos y de evaluación de muestras de saliva en RT-PCR.**
- 11. Estudio de impacto de protocolo cubano de tratamiento en la negativización temprana por RT-PCR.**

Estudios de Microscopía electrónica en necropsias

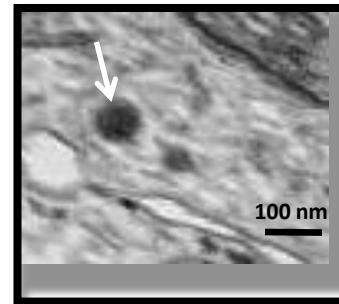
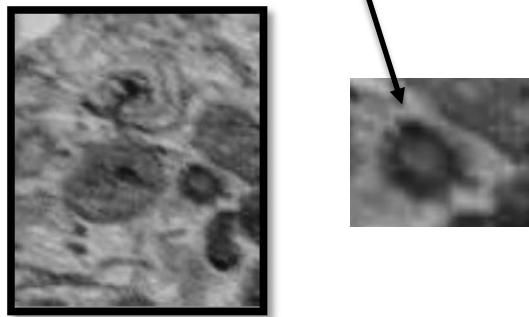
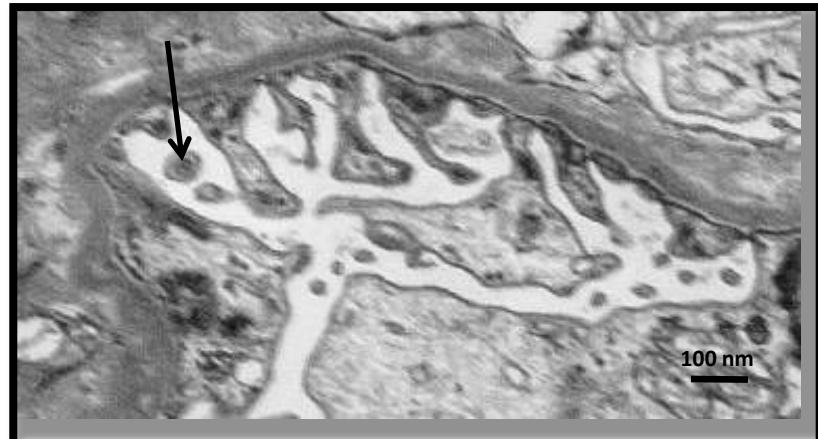
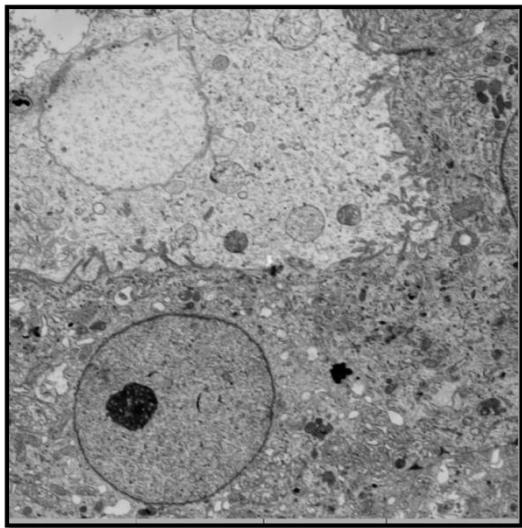


Hospital Dr. Luis Díaz Soto
Centro de Estudios Avanzados (CEA)

Microscopía Electrónica del SARS Cov-2 (70nm-160nm)
Pulmón, Hígado y Riñón



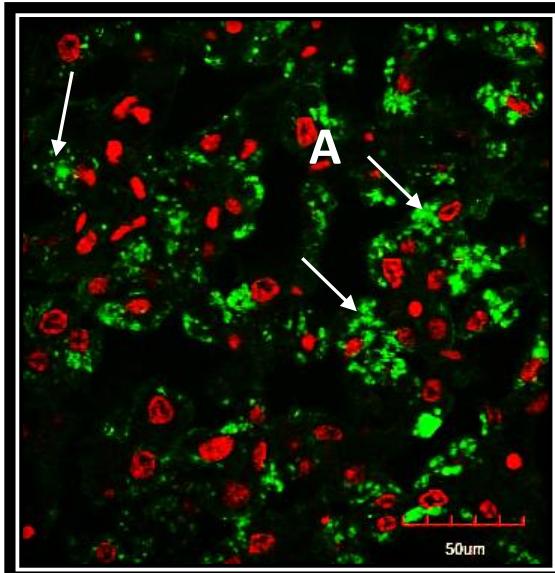
Detección a nivel ultraestructural de las alteraciones observadas en el Riñón



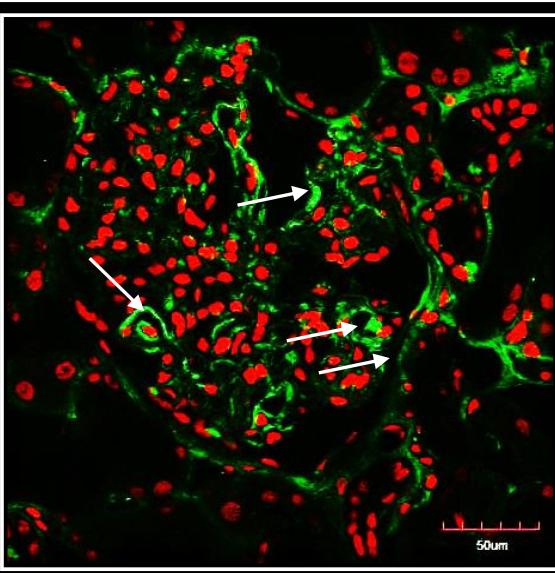
Se observa la presencia de una partícula similar a SARS Cov-2 en el glomérulo, se señala con flechas. Se detecta a mayor magnificación las partículas completas de SARS Cov-2. Barra= 100nm

Microscopía Confocal: Inmunofluorescencia del SARS Cov-2 en necropsias

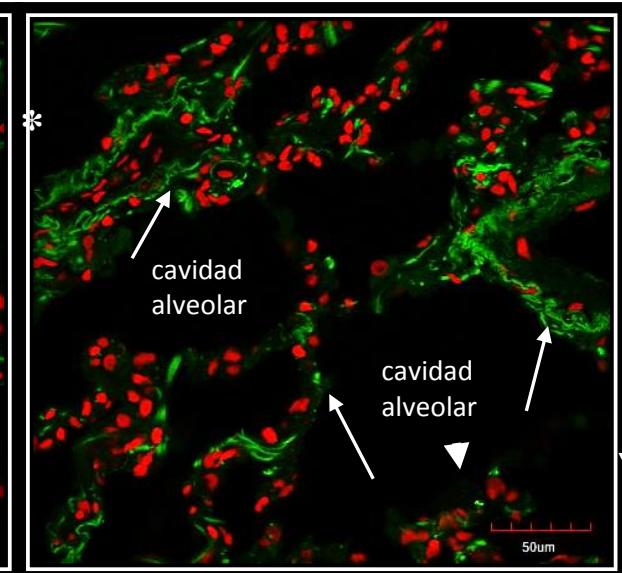
Hígado



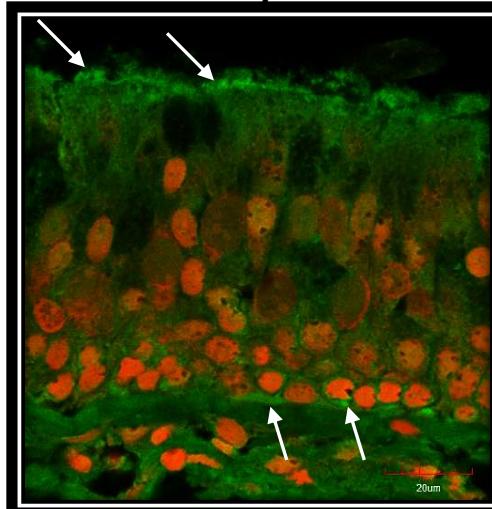
Riñón (Glomérulo)



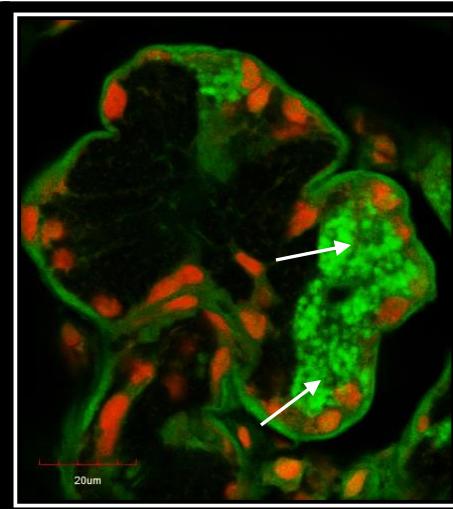
Pulmón



Tráquea



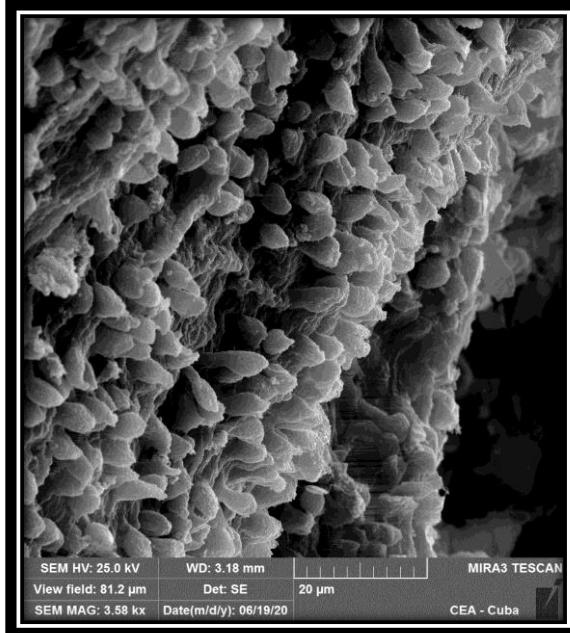
Glándulas en la submucosa



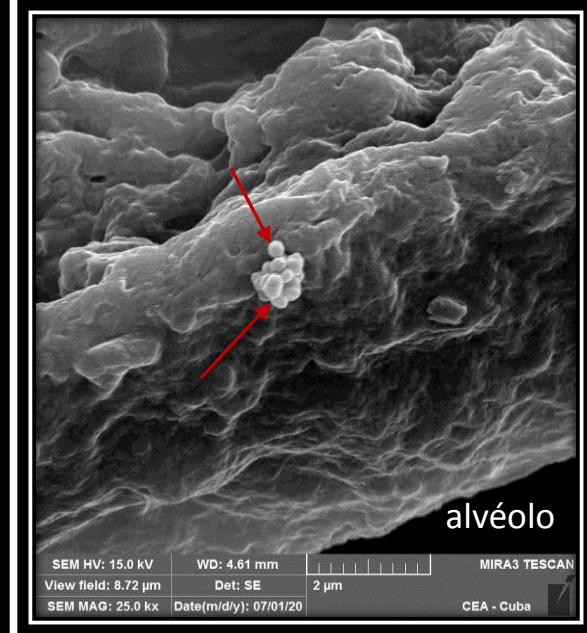
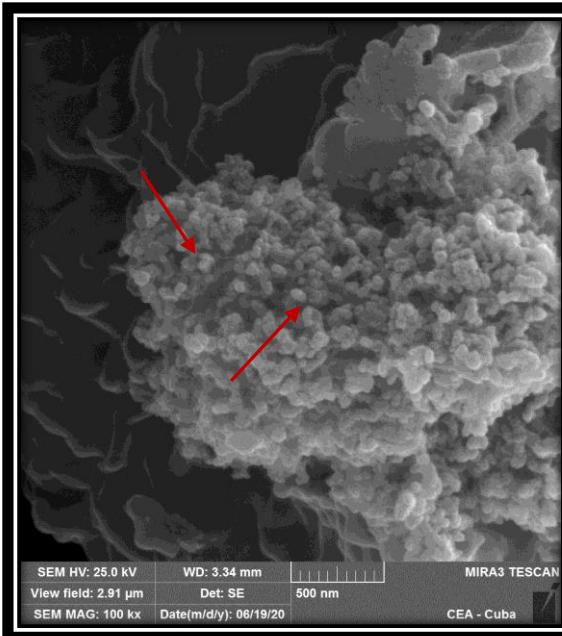
Verde: AcP anti nucleocápside del SARS Cov-2. Rojo: núcleos celulares

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) del SARS Cov-2 en necropsias Pulmón y Tráquea

Superficie apical de la mucosa de la tráquea

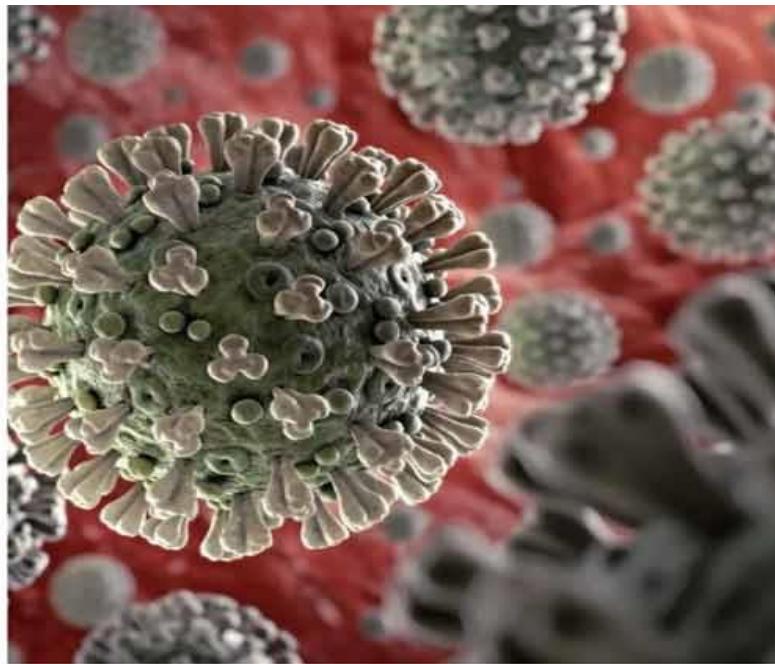


Pulmón:
Superficie de la pared alveolar



Flechas rojas: Conglomerado de SARS Cov-2

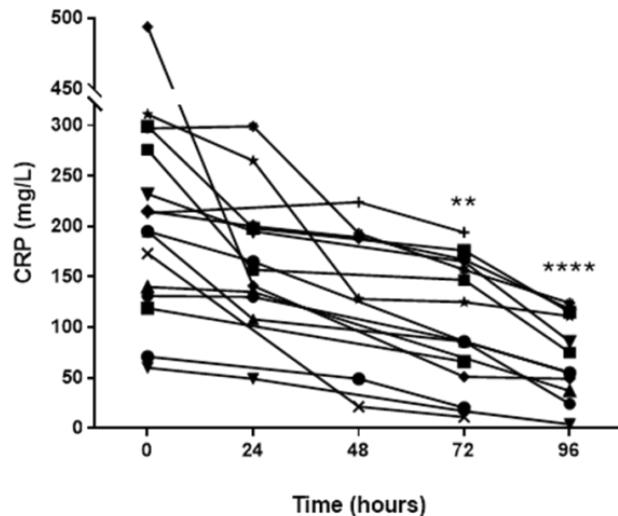
Uso compasional del péptido cigb-258 (Jusvinza) en el tratamiento de pacientes graves y críticos con COVID-19



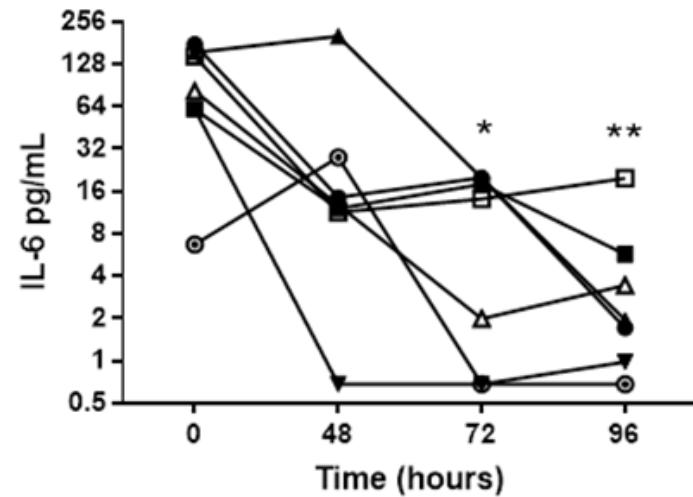
CIGB-258 (Jusvinza): Péptido inmunomodulador de la hiperinflamación o tormenta de citocinas

Estudios básicos, preclínicos y clínicos :

- Reduce la concentración de los mediadores de la inflamación IL-17, INF γ , TNF α , IL-6
- Induce células T reguladoras.
- Concluido estudio clínico Fase I y 187 pacientes incluidos en un estudio fase II contra la artritis reumatoide.



CRP



IL-6

Pacientes tratados compasionalmente con el peptido CIGB-258

Case No.	Sex	Clinical classification	Comorbidities	Respiratory distress at the end of treatment	Clinical outcomes
1	M	Critically ill	Cardiac arrhythmia	Recovered	Alive, discharged from Hospital
2	M	Critically ill	Hypertension Diabetes Obesity	Recovered	Alive, discharged from Hospital
3	M	Critically ill	None	Recovered	Alive, discharged from Hospital
4	F	Critically ill	Hypertension	Recovered	Alive, discharge from Hospital
5^	F	Critically ill	Adrenal gland tumor Diabetes Obesity Cushing's syndrome, Multiple thyroid nodules	Recovered	Alive, discharge from ICU
6^	M	Critically ill	Bladder cancer, Diabetes	Recovered	Alive, discharged from Hospital
7	M	Critically ill	None	Recovered	Alive, discharged from Hospital
8	M	Critical ill	Hypertension bronchial asthma Ischemic heart disease	Recovered	Alive, discharged from Hospital
9	M	Critically ill	Hypertension, Obesity, Bronchial asthma	Recovered	Alive, discharged from Hospital
10	M	Seriously ill	None	Recovered	Alive, discharged from Hospital
11	M	Seriously ill	Hypertension Diabetes Ischemic heart disease	Recovered	Alive, discharged from Hospital
12	F	Seriously ill	Diabetes Ischemic heart disease	Recovered	Alive, discharged from Hospital
13*	M	Critically ill	bronchial asthma	Recovered	Deceased
14*	F	Critically ill	Hypertension	Recovered	Deceased
15*	F	Seriously ill	Glomerulopathy	Recovered	Alive, discharged from Hospital
16	M	Seriously ill	Hypertension	Recovered	Alive, discharged from Hospital

*: Treatment with monoclonal antibody Itolizumab (11).

^: Dose of CIGB-258: 2mg/12 hours M: male; F: Female; ICU: intensive care unit

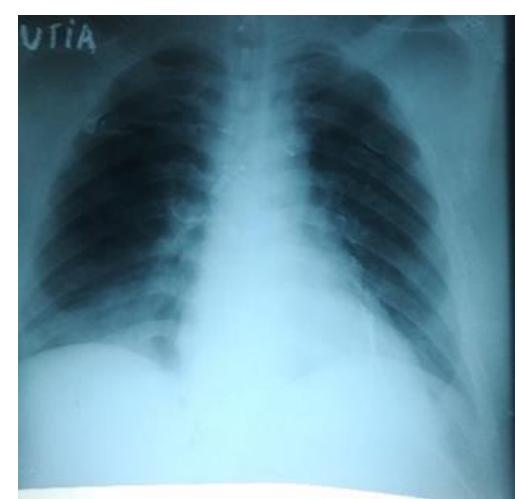
Resolución del distrés respiratorio



Antes



48 h



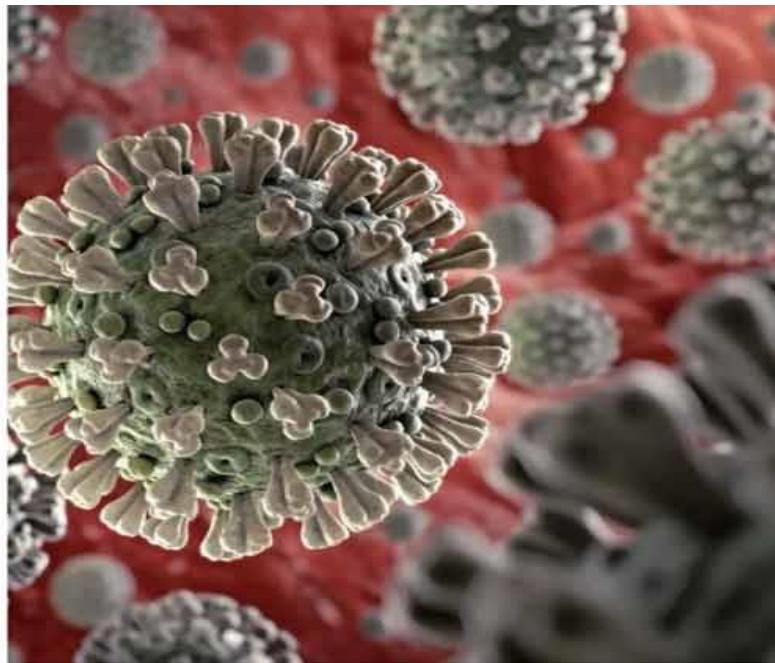
Antes de extubar

Comorbilidades de este paciente: Hipertensión, diabetes, obesidad

Conclusiones

- El tratamiento con el péptido CIGB-258 logra controlar la respuesta hiperinflamatoria en los pacientes con COID-19.
- Se evidencia una disminución del daño del tejido pulmonar sin secuelas radiográficas de fibrosis.
- El péptido CIGB-258 (Jusvinza) recibió un autorizo de uso de emergencia de la autoridad reguladora cubana y forma parte en la actualidad del protocolo terapéutico para el tratamiento de pacientes de COVID-19 en Cuba.

Ensayo Clínico del CIGB 2020 en contactos y sospechosos de infección por SARS-CoV-2



Hospital Dr. Luis Díaz Soto-CIGB

Objetivo General

Evaluar la seguridad y eficacia del tratamiento por vía nasal y sublingual con CIGB 2020 en personas que han sido contactos o sospechosos de infección por SARS-CoV-2.

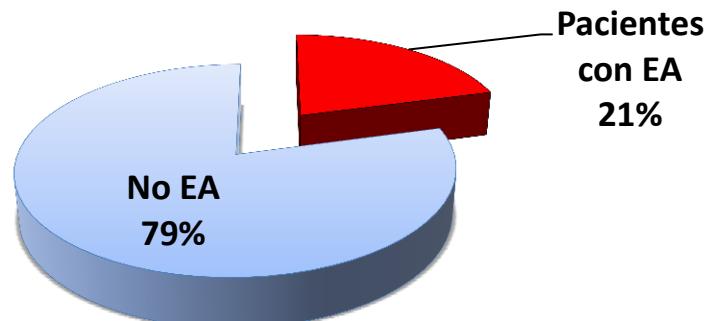
Hipótesis

La vacunación por vías nasal y sublingual que emplea CIGB 2020, un compuesto capaz de inducir la activación de múltiples receptores del sistema inmune innato, -relevantes para la detección del Coronavirus SARS-CoV-2 en las primeras etapas de la infección- permitirá prevenir, detener o incluso revertir los eventos inmuno-patológicos que se generan por el virus y reducir la proporción de pacientes que progresan a estado crítico o terminal.

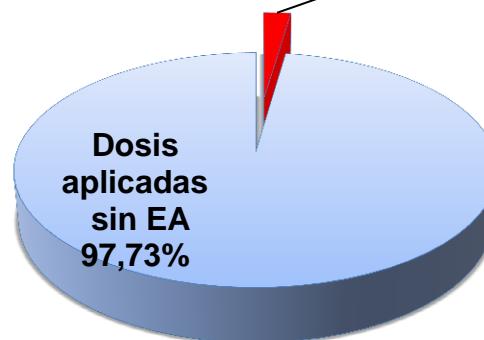
Variable Principal

Activación de marcadores del sistema inmune innato (TLR3, TLR7, TLR8), antes del inicio del tratamiento y en los días 4 y 8.

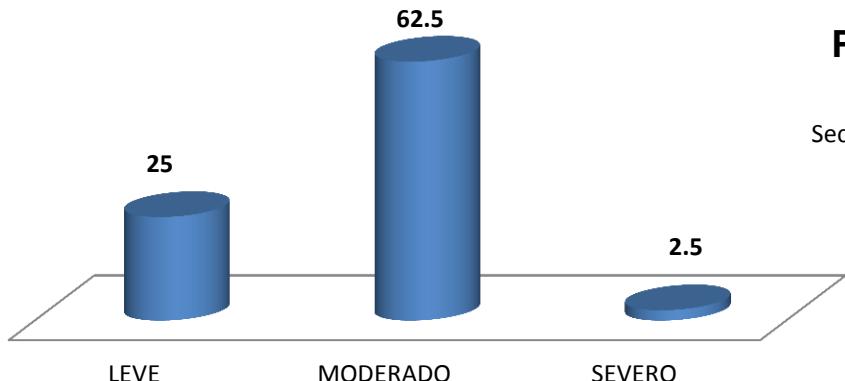
Pacientes con Eventos Adversos (%)



Porcentaje de EA según dosis aplicadas (%)



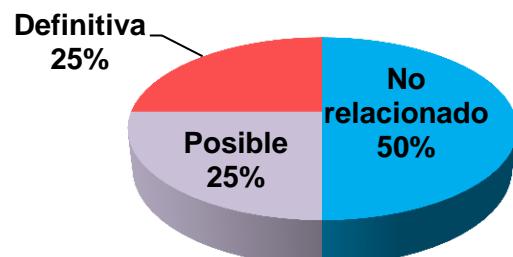
Proporción de EA según intensidad (%)



Porcentaje del tipo de EA según total de dosis (%)



Causalidad de los EA



Un **evento adverso** es cualquier incidente médico desfavorable que ocurre en un sujeto que participa en un ensayo clínico ante la administración de un producto farmacéutico y que no guarda necesariamente una relación causal con el tratamiento.

Análisis del efecto del tratamiento con CIGB2020 sobre la expresión génica de los TLR en raspados oro-faríngeos.

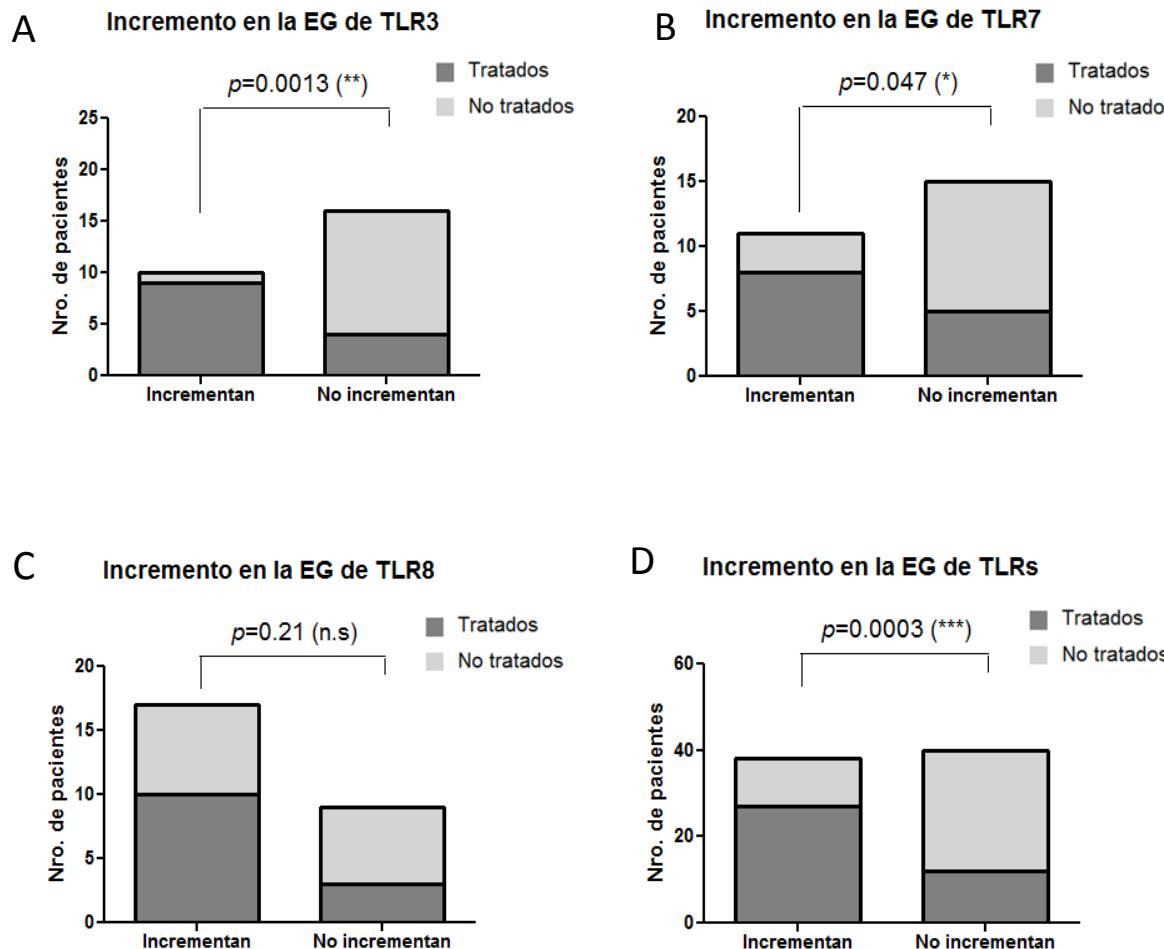


Figura 1. Resultados hasta el 4to día del estudio: Frecuencia de pacientes con efecto estimulador de la expresión génica (EG) entre el día 0 y el día 4, de los receptores A) TLR3, B) TLR7 y C) TLR8 (receptores que detectan ARN) en pacientes tratados con las primeras 3 dosis sublinguales y una dosis intranasal de CIGB2020. Se presenta en D) el análisis global de la estimulación de los tres receptores.

.... Análisis del efecto del tratamiento con CIGB2020 sobre la expresión génica de los TLR en raspados oro-faríngeos.

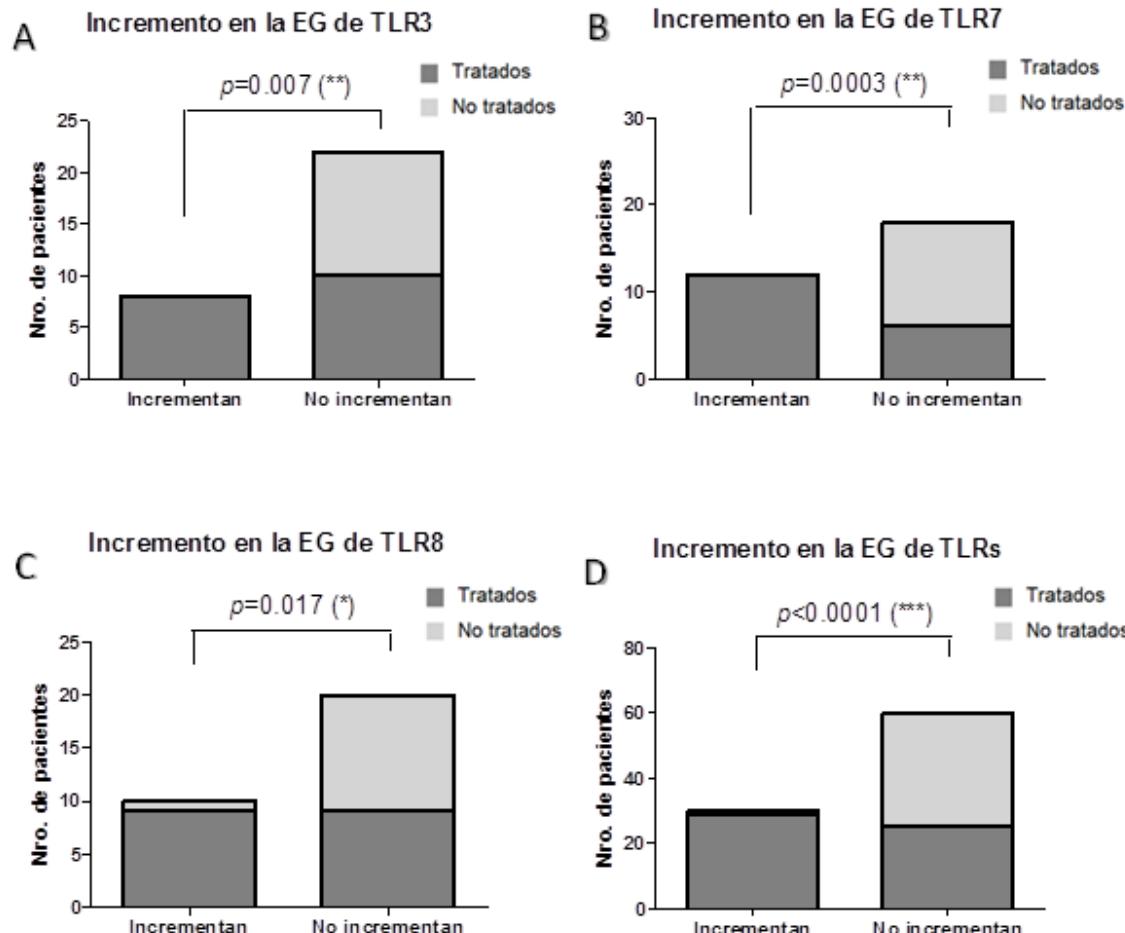
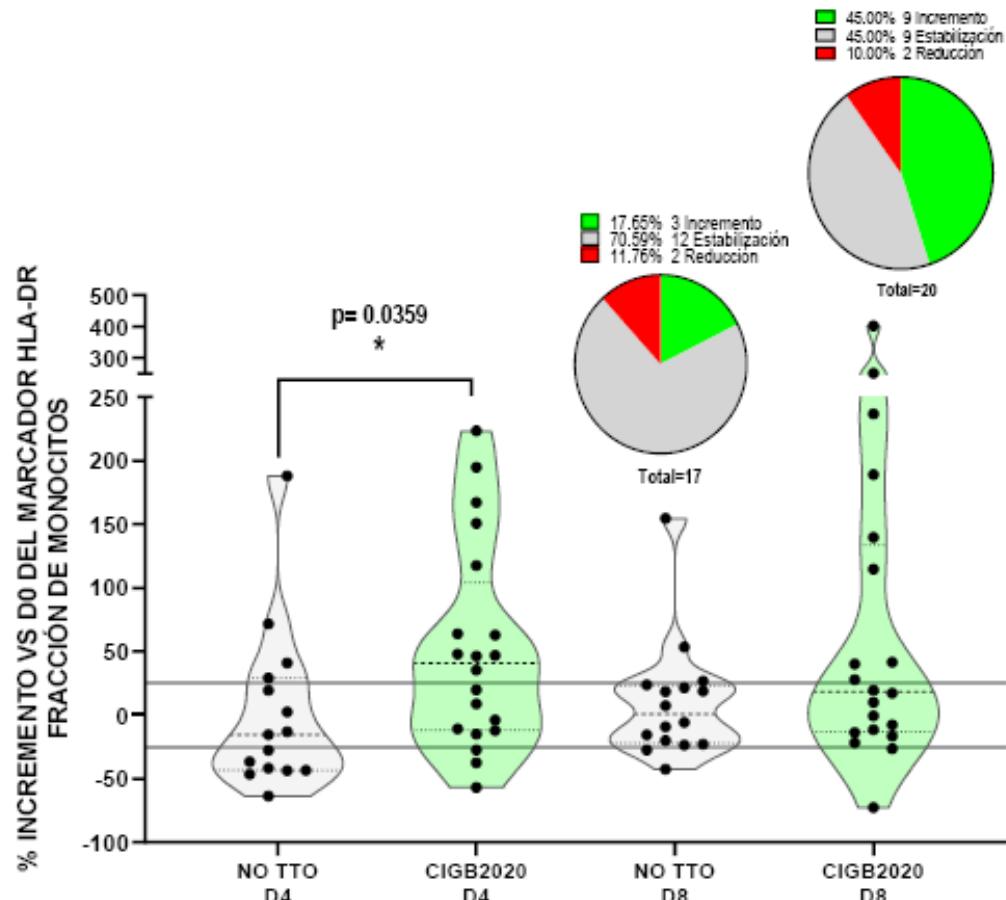


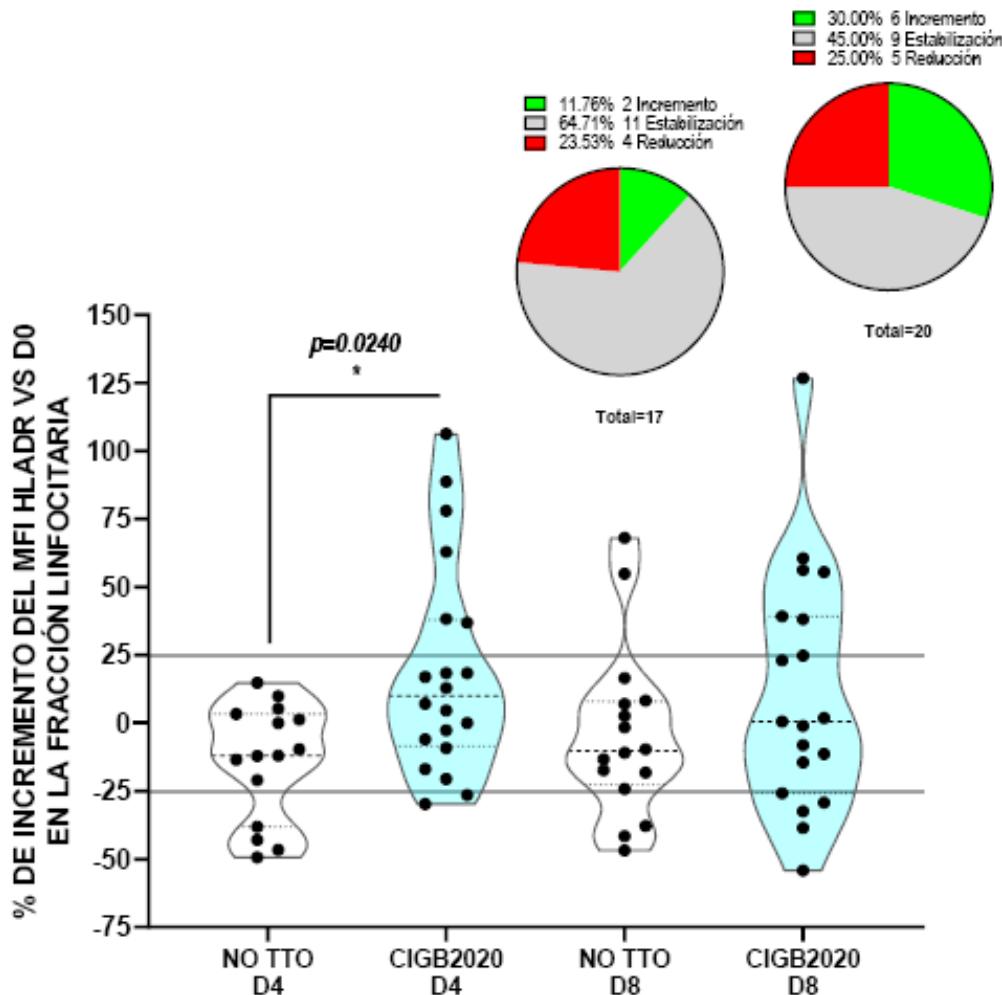
Figura 2. Resultados al 8vo día del estudio: Frecuencia de pacientes con efecto estimulador de la expresión génica (EG) entre el día 0 y el día 4, de los receptores A) TLR3, B) TLR7 y C) TLR8 (receptores que detectan ARN) en pacientes tratados con las primeras 7 dosis sublinguales y dos dosis intranasales de CIGB2020. Se presenta en D) el análisis global de la estimulación de los tres receptores.

Incremento en el tiempo de la expresión del marcador de competencia de Monocitos HLA-DR



Se evidenció un incremento en el porcentaje de pacientes que aumentaron sus niveles de expresión de HLA en el cuarto día en monocitos ($p= 0.0448$)

Incremento en el tiempo de la expresión del marcador de activación linfocitaria HLA-DR

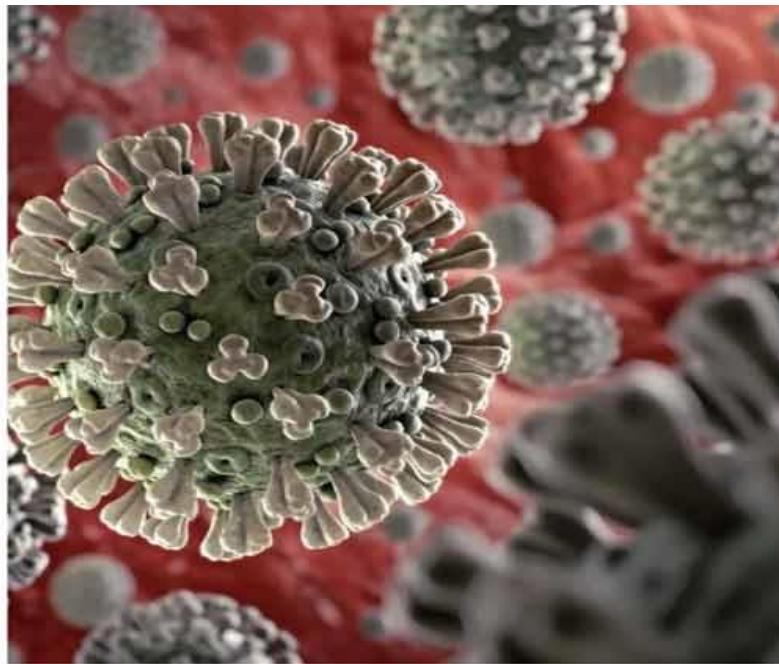


Se evidenció, un incremento en el porcentaje de pacientes que aumentaron sus niveles de expresión de HLA en el cuarto día en linfocitos ($p=0.018$)

Conclusiones

- Al cuarto y octavo día de tratamiento, en pacientes tratados con dosis sublinguales e intranasal de CIGB2020, se pudieron observar incrementos significativos de la expresión génica de los receptores TLR3, TLR7 y TLR8.
- Se evidenció, además, un incremento en el porcentaje de pacientes que incrementaron sus niveles de expresión de HLA en el cuarto día en monocitos ($p= 0.0448$) y linfocitos ($p=0.018$), con tendencia positiva hacia el octavo día en ambos, lo que indicó una mayor preparación potencial de las células del sistema inmune innato para repeler una agresión viral a partir de un incremento en su capacidad presentadora de antígenos y de activación en general.

Aplicación del CIGB 300 como Antiviral en el tratamiento de pacientes con diagnóstico de Covid 19



Características del Ensayo Clínico

**Ensayo Clínico exploratorio , aleatorizado,
controlado**

**GRUPO I
(10 pacientes)**

**Protocolos Nacionales Minsap vs
Covid 19 V4:**

(Cloroquina (250 mg c/12h),
Kaletra (500 mg c/12h),
Interferón alfa (3 MU c/ 48h)

+

CIGB 300 a 2,5 mg/kg

Intravenoso 1 vez por día durante
5 días

Previa admón. de Difenhidramina
40 mg IV

7mo día: Evaluaciones Clínicas /Tomografía/ PCR/ Índices Inflamatorio y
disfunción orgánica

**GRUPO II (grupo Control)
(10 pacientes)**

**Protocolos Nacionales Minsap vs
Covid 19 V4:**

(Cloroquina (250 mg c/12h),
Kaletra (500 mg c/12h),
Interferón alfa (3 MU c/ 48h)

Resultados – Evaluaciones Tomográficas



ANTE

S



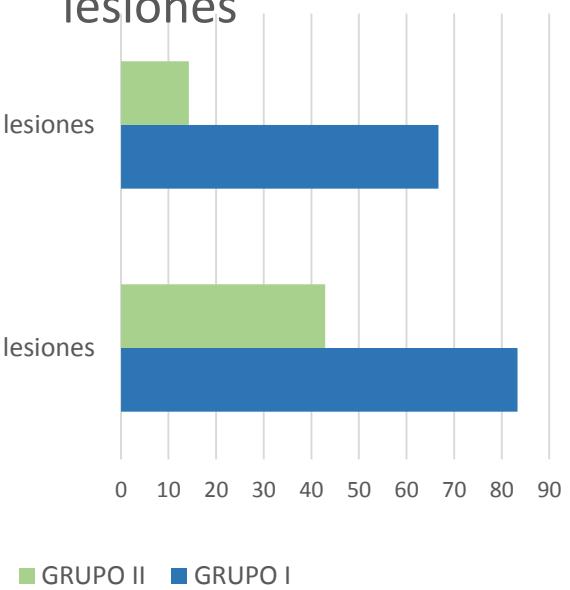
DESPU

ES

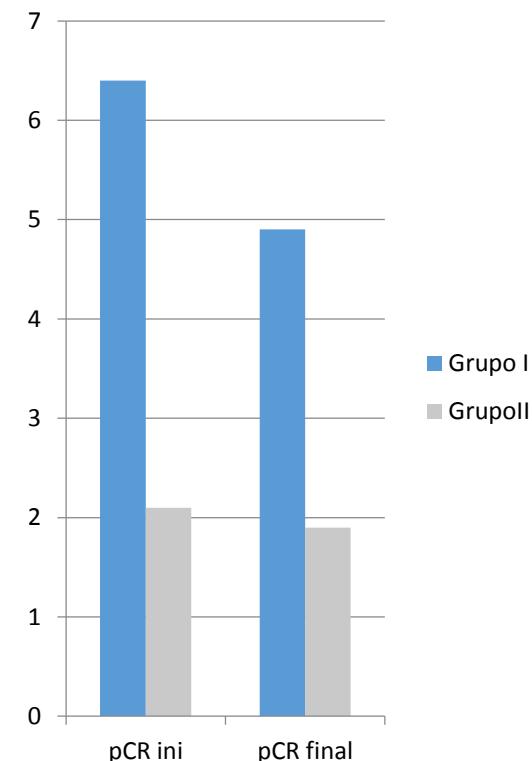
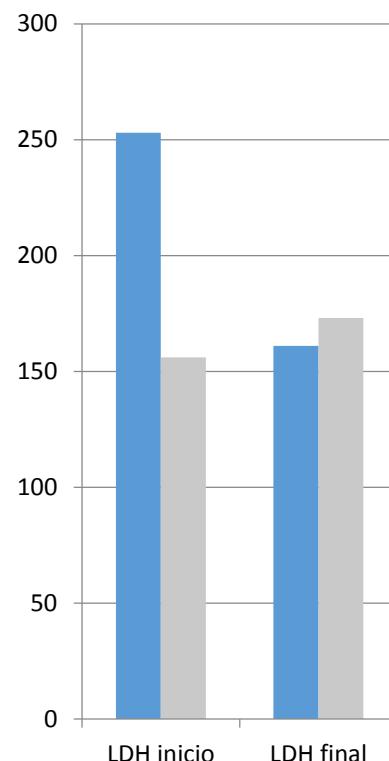
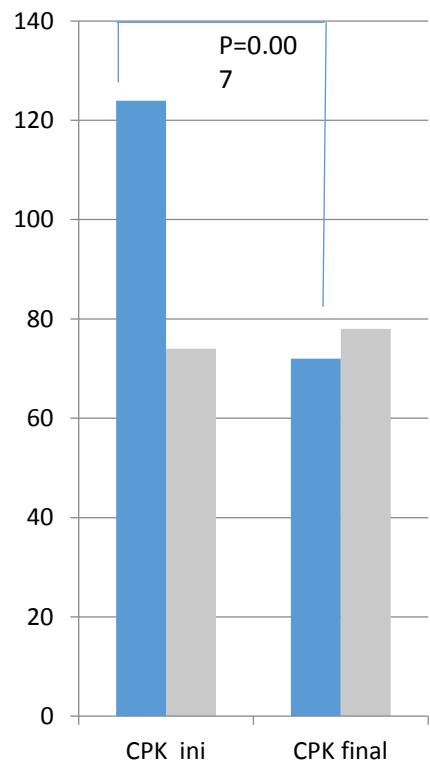
% de pacientes que reduce la
extension y numero de
lesiones

Reducen extension de lesiones

Reducen numero de lesiones



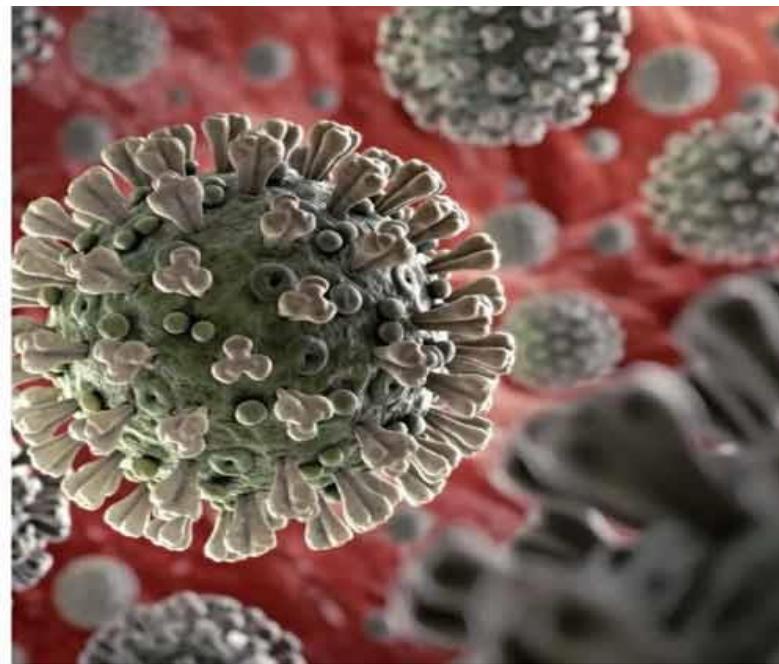
Resultados- Índices inflamatorios (PrCR) y de disfunción orgánica(LDH y CPK)



Conclusión

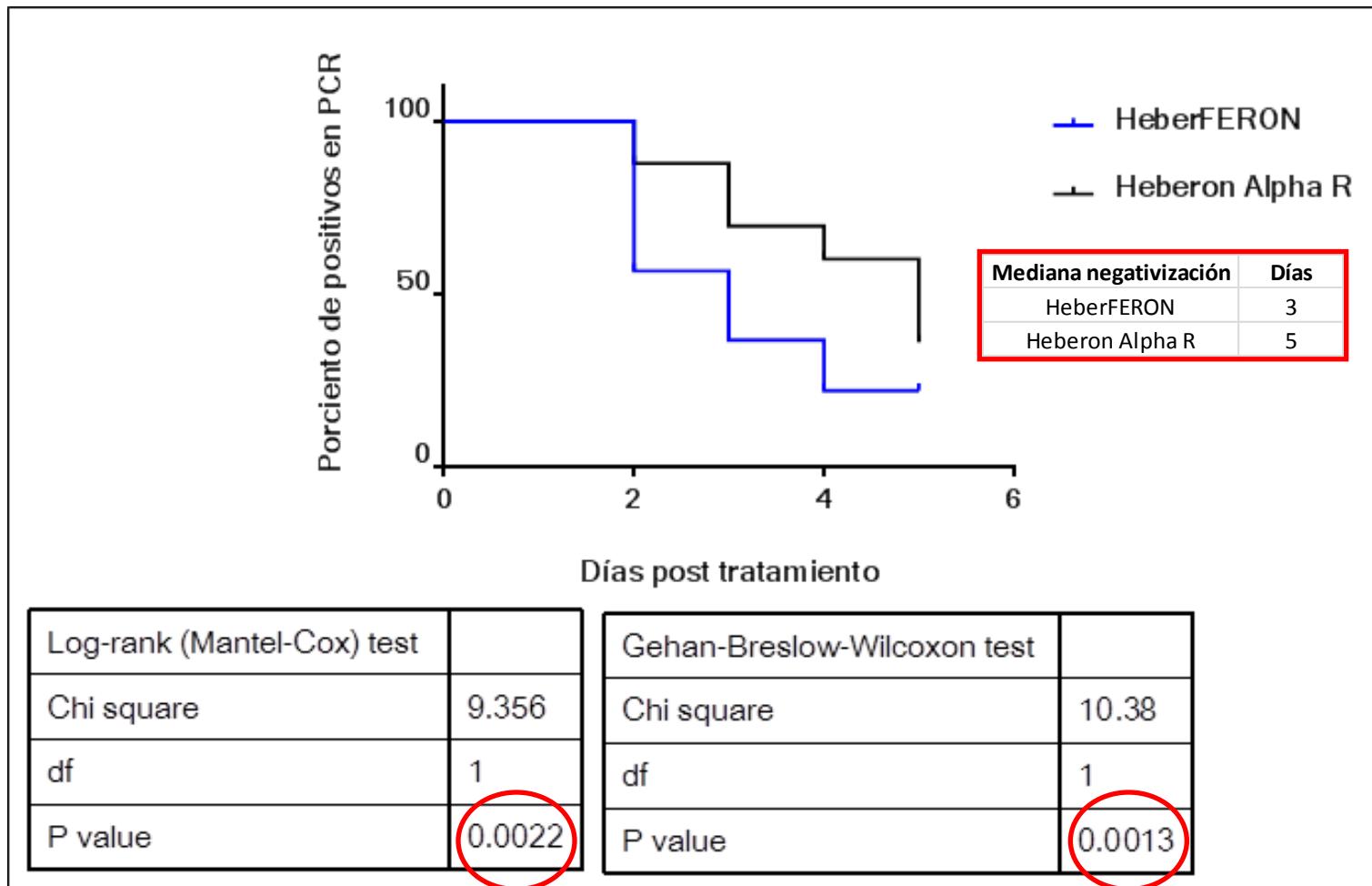
- La aplicación de CIGB 325 resultó segura para los pacientes con COVID 19
- No se encontraron diferencias entre los grupos en cuanto al tiempo hasta la negativización del PCR de Exudados Nasofaringeos.
- La evolución clínico radiológica y de los Índices inflamatorios y de disfunción orgánica sugieren un efecto favorable de la aplicación del CIGB 325 en pacientes con Covid 19
- El Protocolo establecido para el tratamiento de COVID y adicionalmente la aplicación de CIGB 325 permiten un adecuado control de la enfermedad y evitan el progreso a estadios graves de la misma.

Ensayo Clínico de comparación de tratamiento temprano con Heberon (Interferon alfa) y Heberferon (Interferon alfa + gamma)



Negativización en 63 pacientes en el Hospital Luis Diaz Soto

Interferon α 2b (Heberón) Interferón α 2b + Interferón γ (Heberferón)



El análisis se hizo con los datos de qPCR de las 48h, 72h, 96h y 120h

Negativización al Séptimo Día

Total	Positivo/Negativo	%	Promedio Dias
107	35	32.7	12.4
	72	67.3	11.1



Interferon α2b (Heberón) Interferón α2b + Interferón γ (Heberferón)

Resultados de evaluación por RT-PCR al 7mo día del ingreso en el mes de Junio y Julio

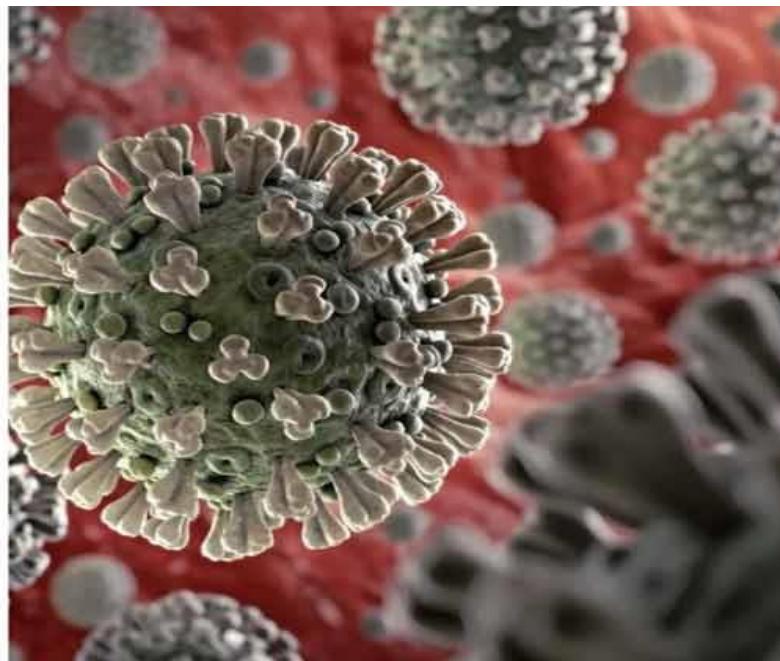
Total de Pacientes	145
Positivos	64 (44%)
Negativos	81 (56%)



Conclusión

- **Se demuestra el efecto de la administración temprana del Interferon alfa y de la combinación de Interferones alfa + gamma en el tratamiento del SASR-CoV-2 y la negativización temprana al virus evitando el paso a una condición severa de la enfermedad.**

Estudio de prueba de concepto en humanos de una formulación nasal de Interferon Alfa (Nasalferon)



Diseño del estudio

12 Voluntarios sanos sin previa administración de Interferón (IFN)

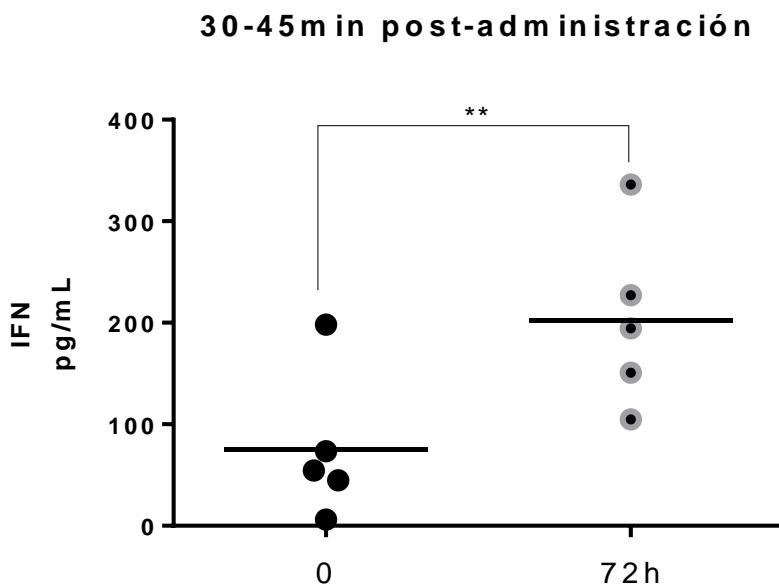
Nasalferon (20,000,000 UI en 2 mL): Interferon Alfa 2b recombinante en formulación nasal

Administración: Una gota (0,05 mL) en c/fosa nasal (0.5 M UI), 2 veces al día c/12 horas diariamente.

Muestras de raspado orofaríngeo: T0 y T1 (72 horas de la primera aplicación)

Muestras de sangre: T0 y T1 (72 horas de la primera aplicación)

Detección de IFN en sangre



Voluntario	Medición de IFN alfa					
	Tiempo 0	Tiempo 72h	pg/mL	UI/mL	dif	Tiempo*
AA	186.5	33.6	149.9	26.9	-37	60
DD	33.1	5.2	0.0	0.0	-33	95
DQ	227.3	41.0	508.8	92.0	281	60
GG	198.1	35.7	336.0	60.7	138	30
GL	44.9	7.4	194.5	35.0	150	30
HM	73.4	12.7	227.3	41.0	154	45
IG	6.0	0.0	150.8	27.0	145	30
LA	177.6	31.9	496.2	89.7	319	60
MLO	66.8	11.5	0.0	0.0	-67	80
MP	205.2	37.0	122.9	21.9	-82	60
RB	191.0	34.4	85.4	15.0	-106	60
SC	112.9	20.1	73.4	12.7	-40	60
WR	54.5	9.2	104.7	18.6	50	45

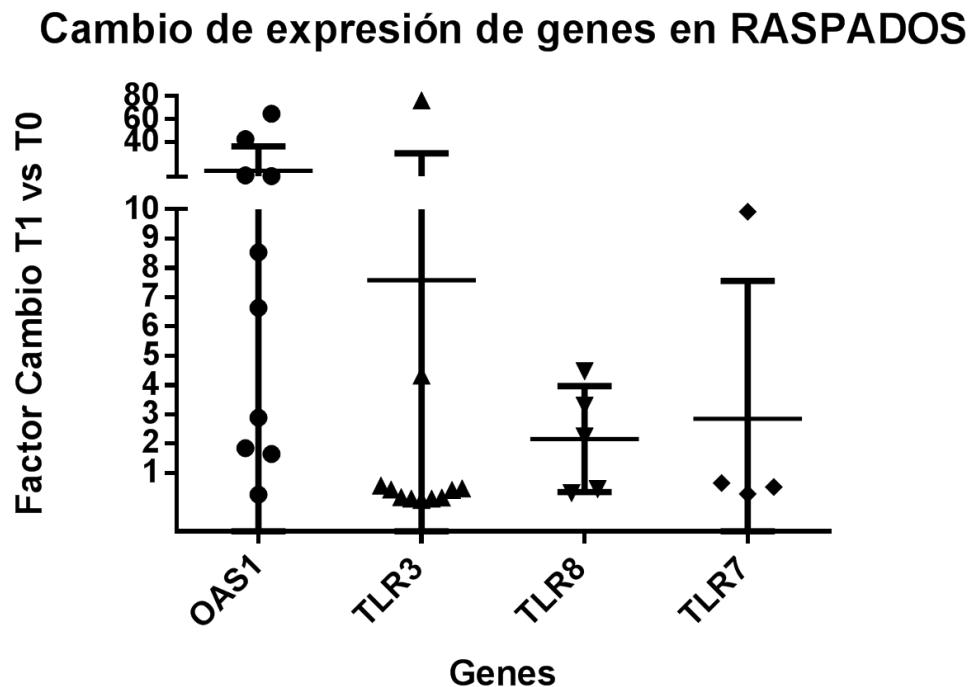
* tiempo entre administración de Nasalferon y la extracción

Se detecta incremento de la concentración de interferón en sangre en los 5 voluntarios que la muestra se tomó a los 30-45 min de la administración nasal realizada a los tres días del inicio de la aplicación.

En los que demoró una hora o más la toma de muestras, no resultó significativo.

Media aritmética de incremento de los genes en raspados orofaríngeos

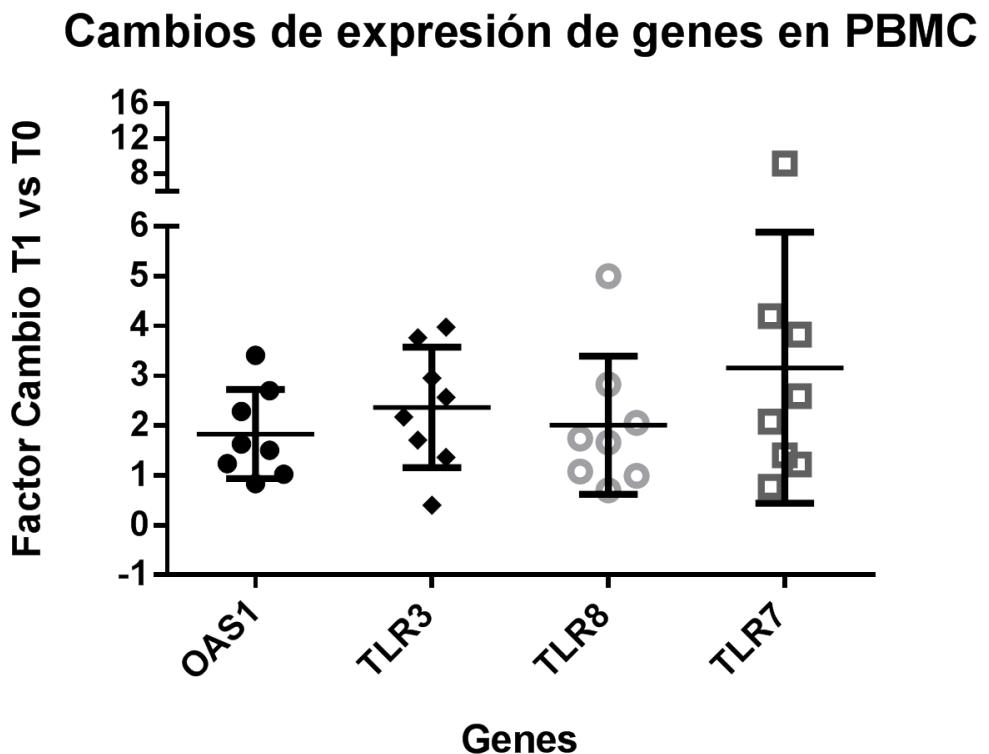
- Alta inducción de biomarcador OAS1, relacionado con el efecto antiviral.
- Se observan incrementos de biomarcadores relacionados con la respuesta inmunitaria TLR3, 7 y 8 en varios voluntarios.



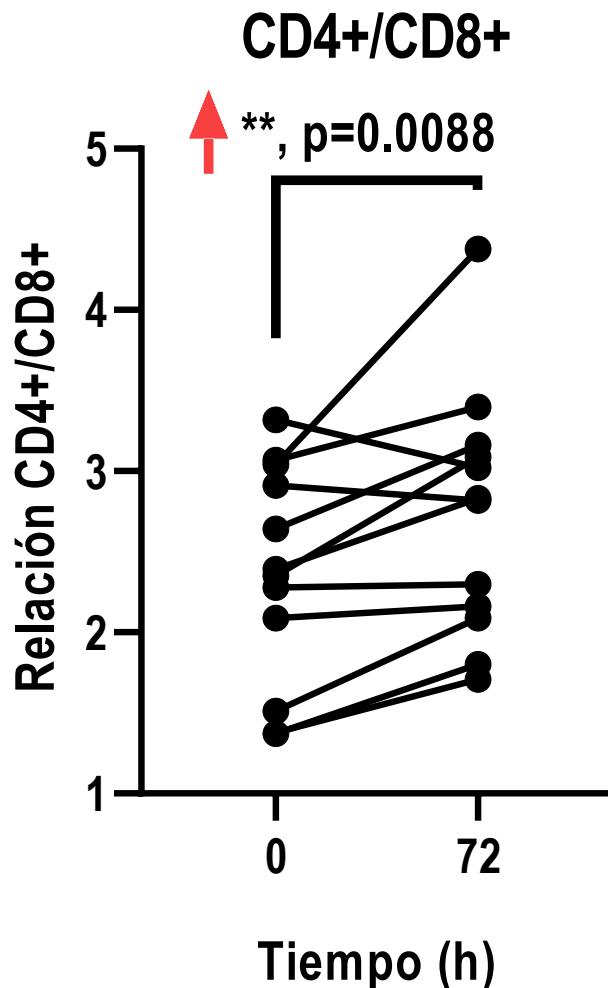
Media aritmética de incremento de los genes en linfocitos de sangre periférica

Se incrementa la expresión de todos los genes hasta una media aritmética de:

- OAS1 (1,8)
- TLR3 (2,3)
- TLR7 (3,1)
- TLR8 (2,0)

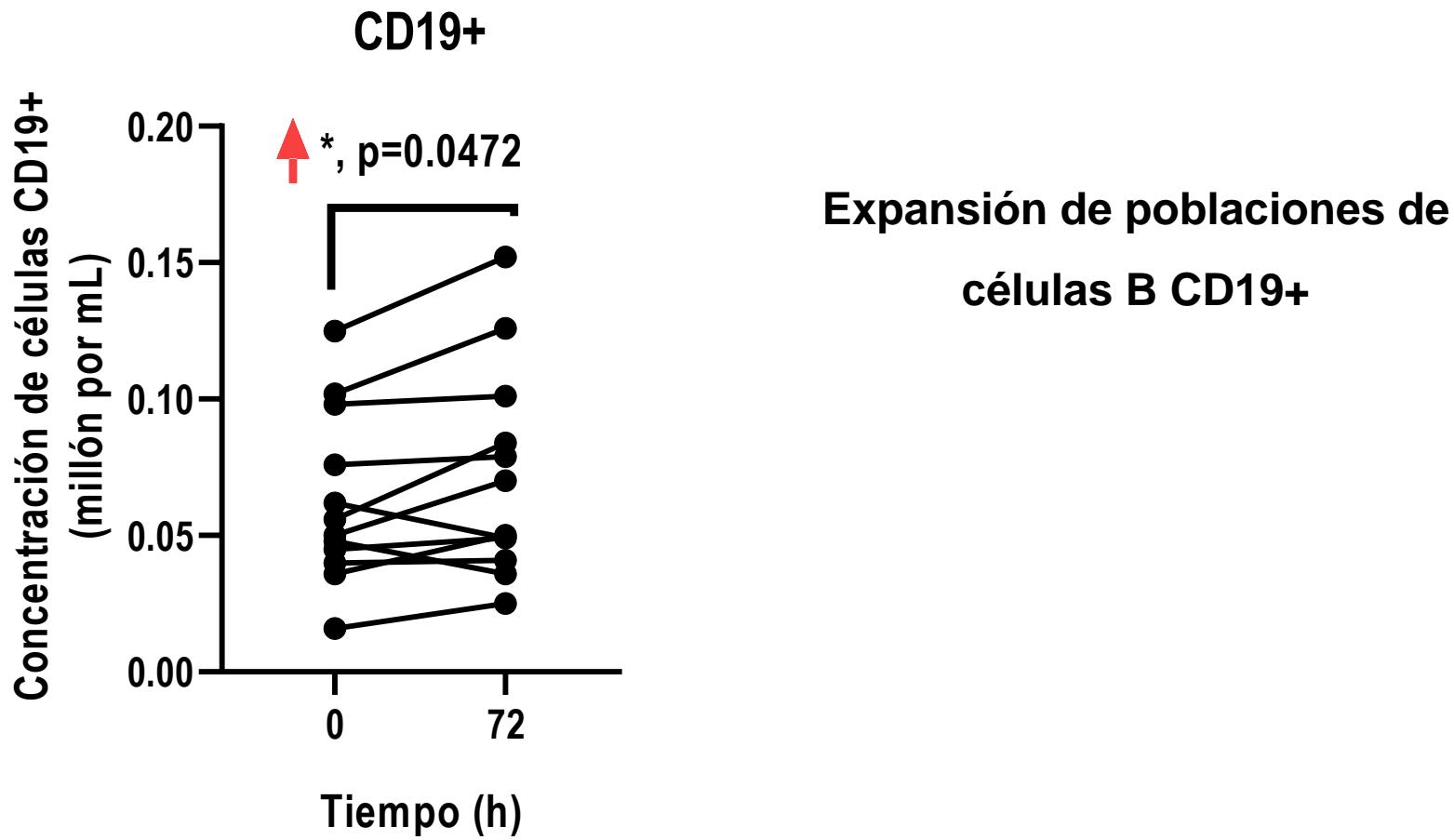


Incremento de la capacidad de desarrollar una respuesta efectiva contra los patógenos

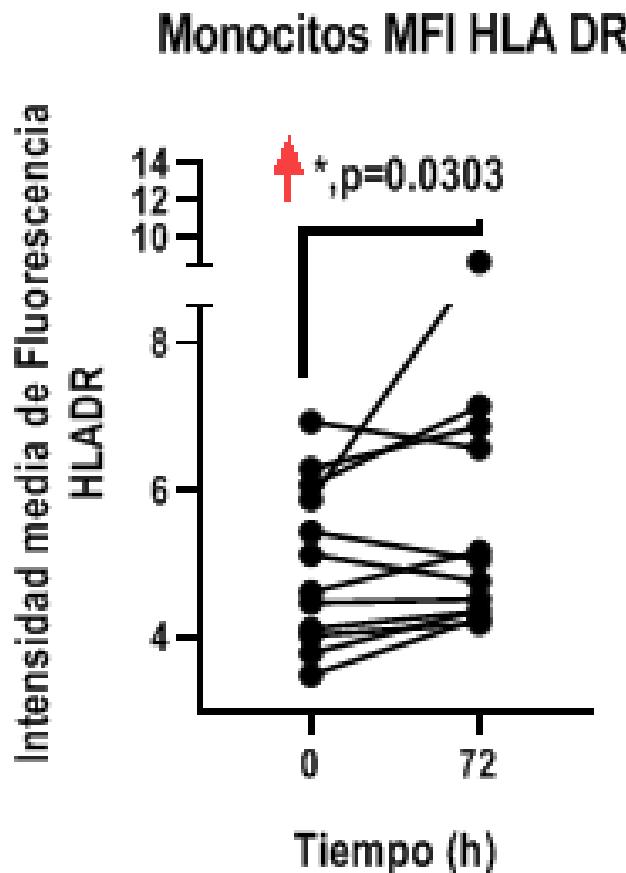


Se incrementa la relación de células T CD4+/CD8+ que favorece el desarrollo de una respuesta efectiva vs contra patógenos. Sin una reducción de significación en las concentraciones de células CD8+

Efecto significativo sobre el incremento de la concentración de la población de células B



Efecto significativo sobre la activación de los Monocitos (células presentadoras de los antígenos del patógeno al sistema inmunitario)



A las 72 horas ocurre una activación de los monocitos circulantes al incrementarse en ésta su expresión de HLADR

Conclusiones

- **Se demuestra el paso del Interferón a la sangre, detectándose los máximos niveles de concentración en sangre a los 30-45 minutos de la administración nasal.**
- **Se evidencia incrementos de los marcadores de respuesta antiviral e inmunitaria innata a nivel de la mucosa orofaríngea y en linfocitos de sangre periférica.**
- **Se detectan incrementos significativos de marcadores de activación de respuesta humoral y celular en sangre.**

Impacto de los resultados

Modificaciones al protocolo nacional de tratamiento a la COVID-19

- **Introducción del Heberferon (Interferon alfa + gamma) en sustitución del Interferon alfa en el tratamiento de los pacientes adultos.**
- **Empleo del péptido CIGB 258 (Jusvinza) en pacientes críticos, graves y de cuidado.**
- **Introducción del PCR el 9no día para el alta médica.**

Autores:

CIGB

1. Maria del Carmen Dominguez
2. Mabel Hernández Cedeño
3. Silvio Perea Rodriguez
4. Idania Baladron Castrillo
5. Pablo Arsenio Días Reyes
6. Maria Mercedes Vazquez Marcos
7. Julio Cesar Aguilar
8. Jorge Aguiar Santiago
9. Zurina Cinza Estevez
10. Hilda Elisa Garay Perez
11. Viviana Falcón Cama
12. Eduardo Pentón Arias
13. Iraldo Bello Rivero
14. Yaquelin Duncan
15. Claudia Martinez
16. Iván Campa Legra
17. Cristobal González Losada
18. Luis Gabriel González Lodeiro
19. Gilda Lemos Perez
20. Monica Bequet Romero
21. Camila Canaan-Haden Ayala
22. Isabel Gonzalez Moya
23. Yssel Mendoza Mari
24. Iris Valdes Prado
25. Julio Raúl Fernández
26. Hamlet Camacho
27. Dania Vazquez Blomquist
28. Gerardo Guillén Nieto
29. Lab. Analítico, Lab. PCR y Lab. de Síntesis de péptidos.

Hospital Luis Diaz Soto

1. Rafael Venegas
2. Abraham Ismael Beato Canfux
3. Idelsis Esquivel-Moynelo
4. Teresita Montero Gonzalez
5. Lien Laguna Oliva
6. Lab. Microbiología y Lab. Clínico Hospital Luis Diaz Soto.

