

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

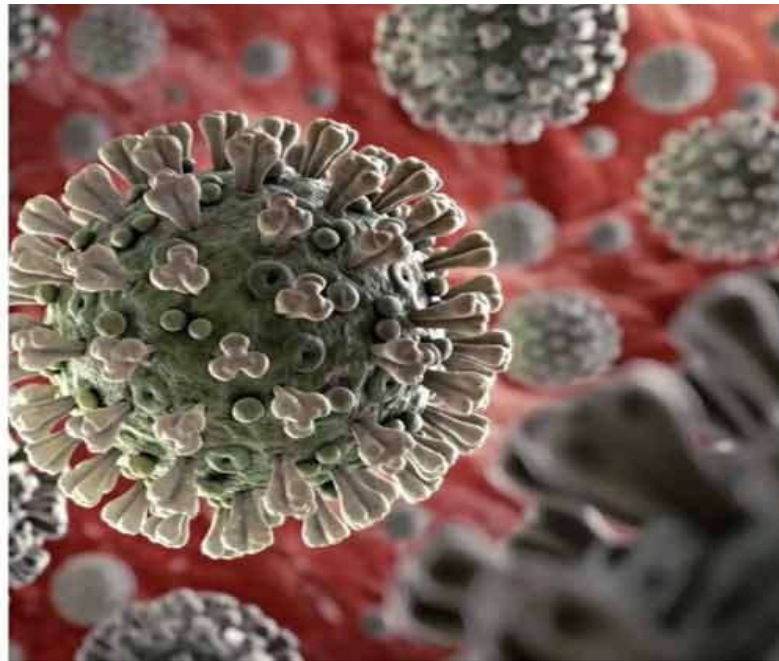


Dr. Gerardo Guillén Nieto
Director de Investigaciones
CIGB, La Habana, Cuba

Investigaciones en curso

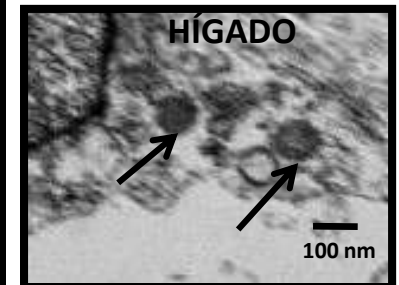
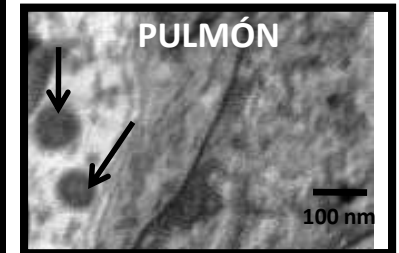
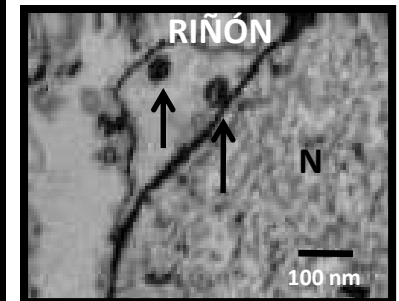
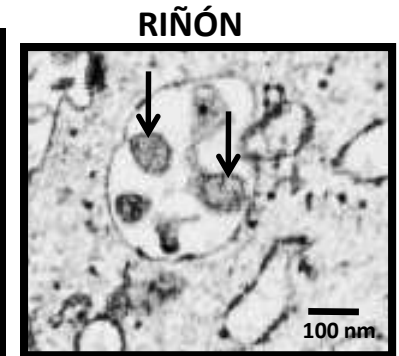
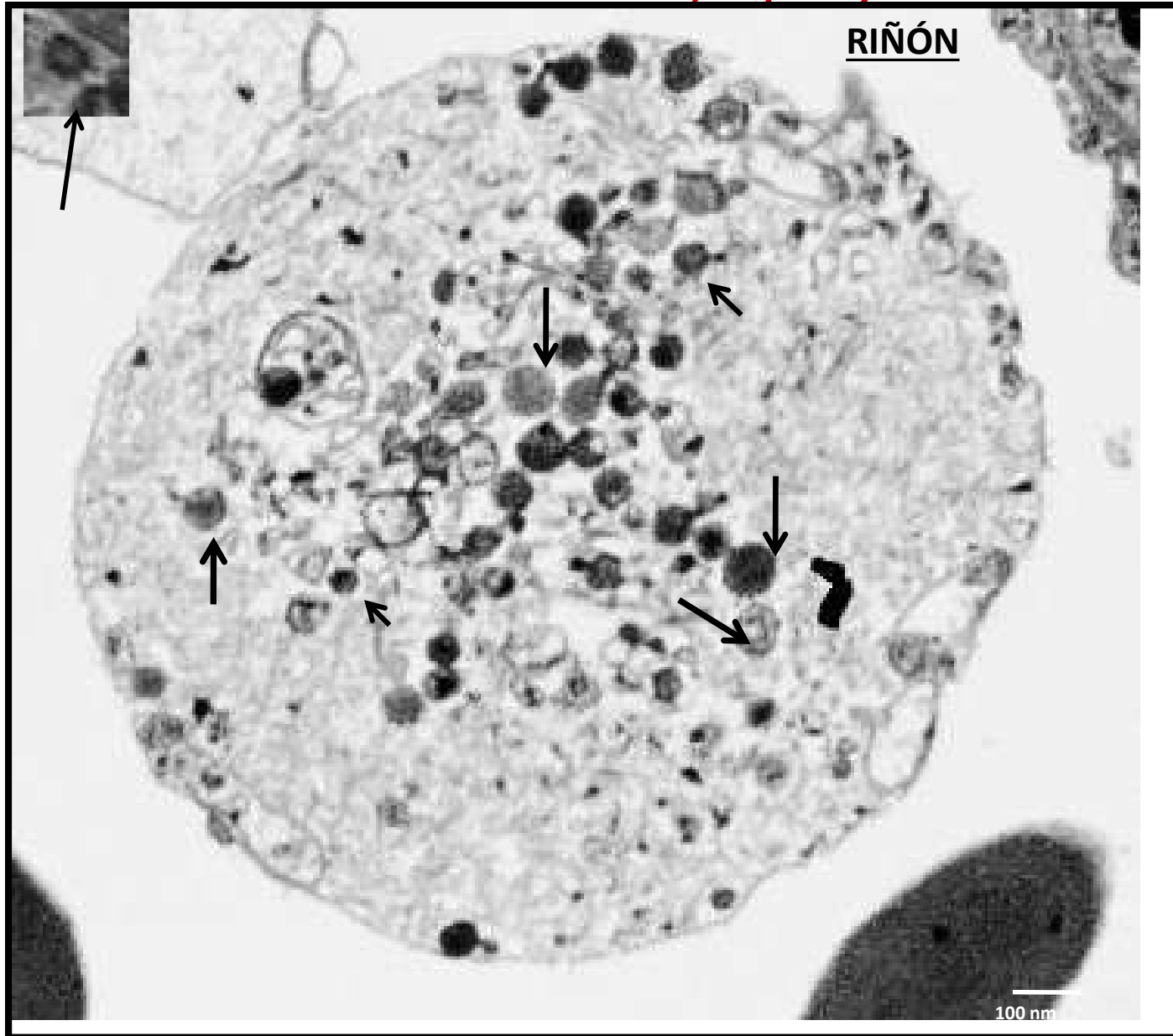
1. Estudios de Microscopía Electrónica a muestras de anatomía patológica y muestras de aislamientos virales.
2. Estudios clínicos de vacuna para potenciar la Inmunidad Innata (CIGB 2020)
3. Estudio clínico de comparación de Interferones alfa y alfa + gamma (ESPERANZA)
4. Estudio clínico de evaluación de péptido antiviral (CIGB 325) (ATENEA)
5. Estudio de prueba de concepto de formulación para administración nasal de Interferon alfa. Nasalferon
6. Estudio compasional y generalización de uso del péptido CIGB 258 (Jusvinza) contra la hiperinflamación
7. Araña de transmisión epidemiológica.
8. Estudio de lentos 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.
12. Estudio con Factor de Transferencia en pacientes con nefropatías. Inst. de Nefrología.
13. Diagnóstico por PCR. Obtención de reactivos biológicos y desarrollo de sistemas diagnóstico.
14. Desarrollo de vacunas vs COVID.

Estudios de Microscopía electrónica en necropsias

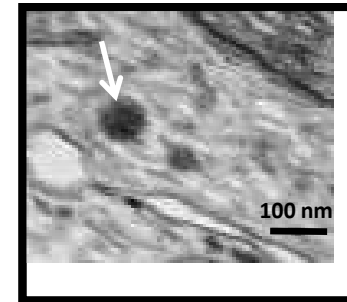
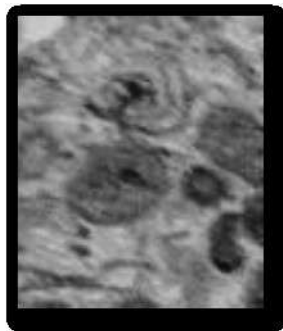
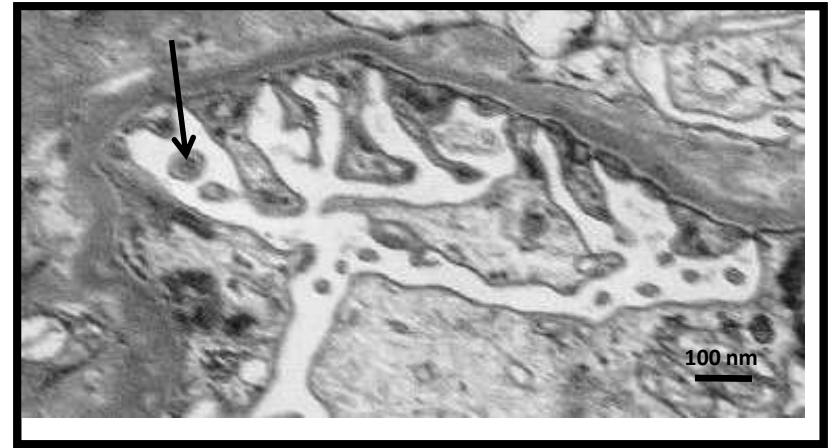
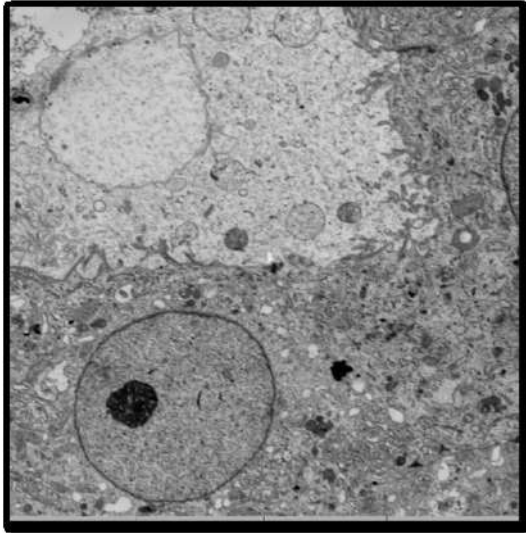


Microscopía Electrónica del SARS Cov-2 (70nm-160nm)

Pulmón, Hígado y Riñón



Detección a nivel ultraestructural de las alteraciones observadas en el Riñón



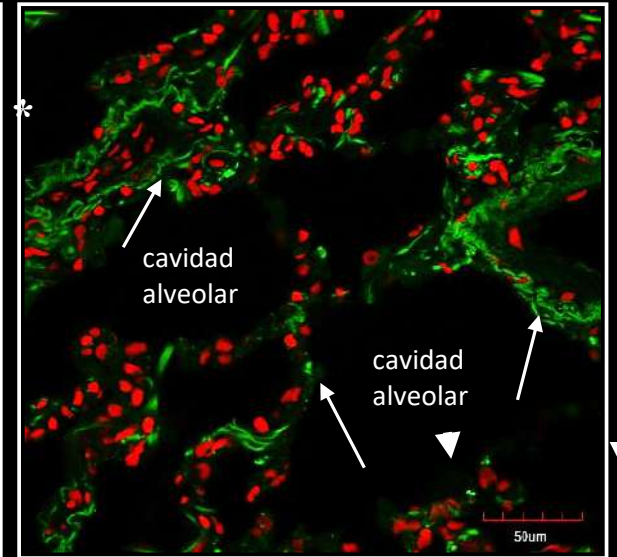
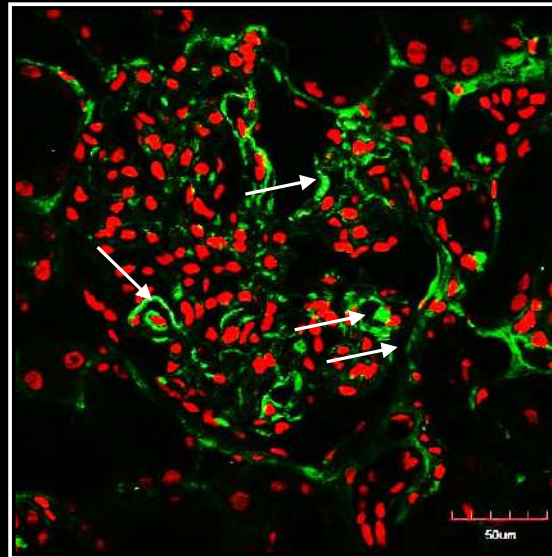
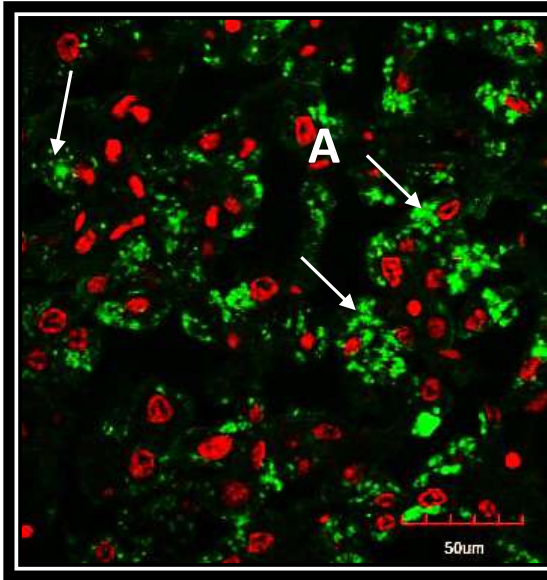
Se observa la presencia de de una partícula similar a SARS Cov-2 en el glomérulo, se señala con flechas. Se detecta a mayor magnificación las partícula completa de SARS Cov-2. **Barra= 100nm**

Microscopía Confocal: Inmunofluorescencia del SARS Cov-2 en necropsias

Hígado

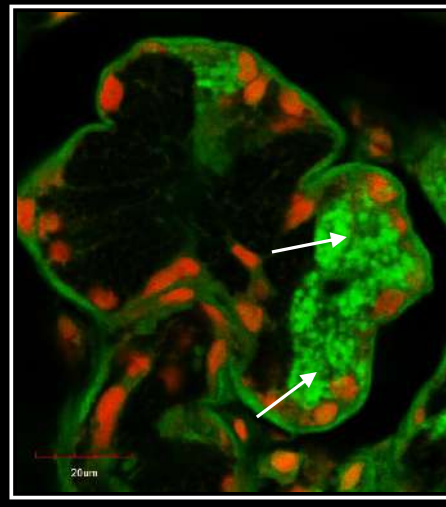
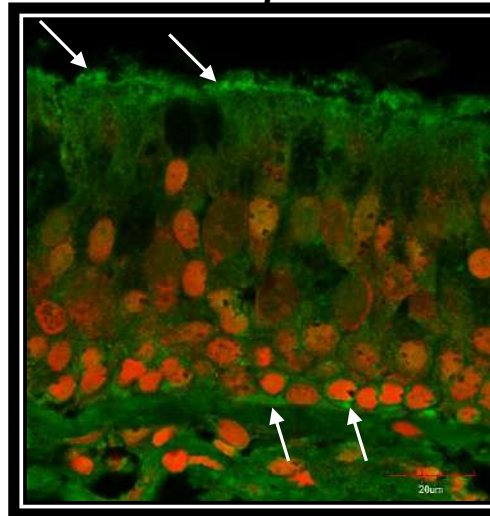
Riñón (Glomérulo)

Pulmón



Tráquea

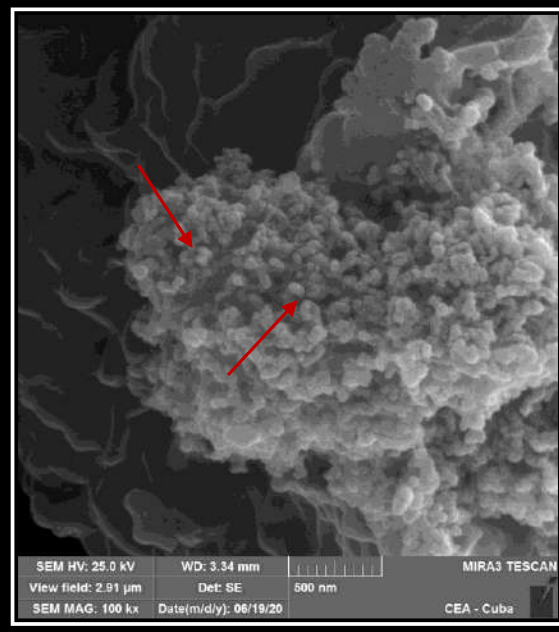
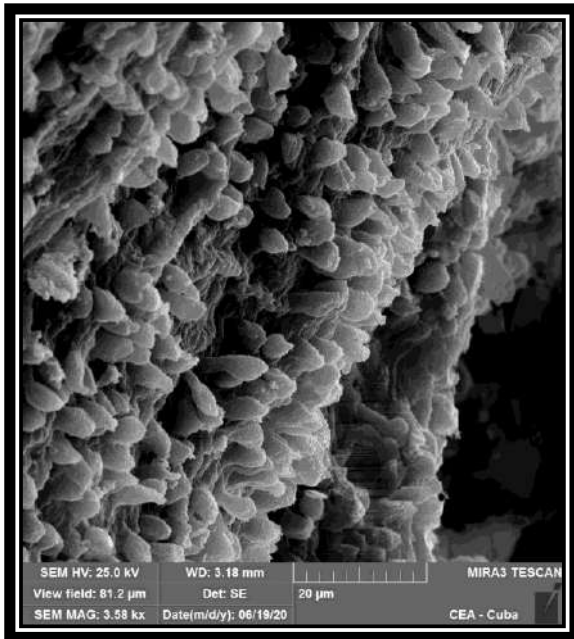
Glándulas en la submucosa



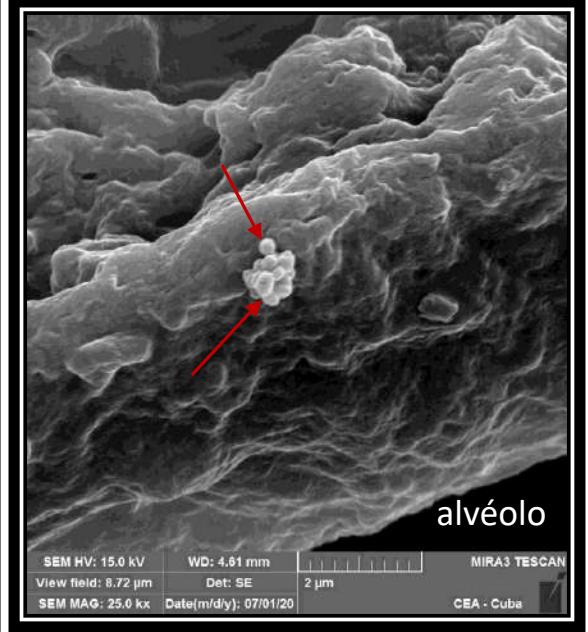
Verde: AcP anti nucleocápside del SARS Cov-2. **Rojo:** núcleos celulares

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

Superficie apical de la mucosa de la tráquea

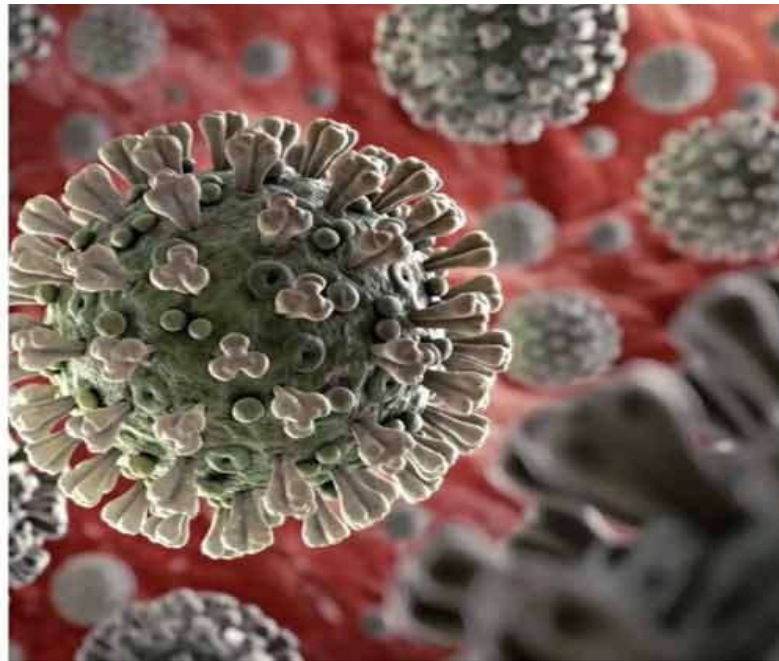


Pulmón:
Superficie de la pared alveolar



Flechas rojas: Conglomerado de SARS Cov-2

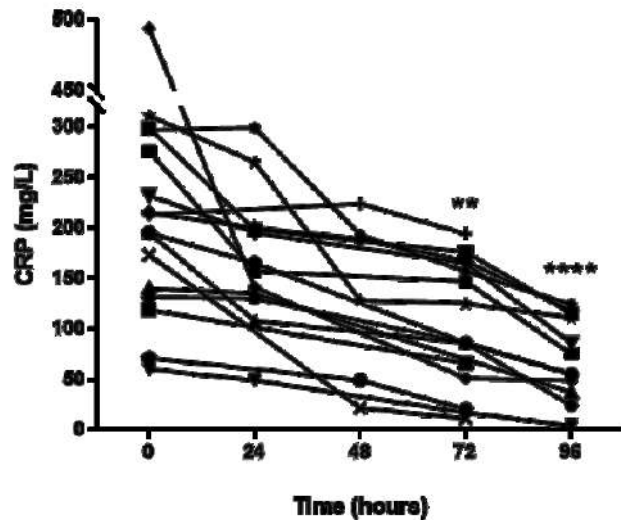
Uso compasional del péptido cigb-258 (Jusvinza) en el tratamiento de pacientes graves y críticos con COVID-19



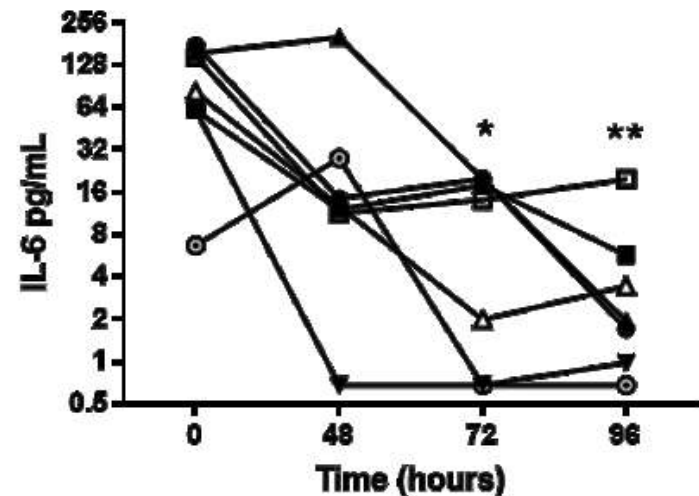
CIGB-258 (Jusvinza): Péptido inmunomodulador de la hiperinflamación o tormenta de citocinas

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



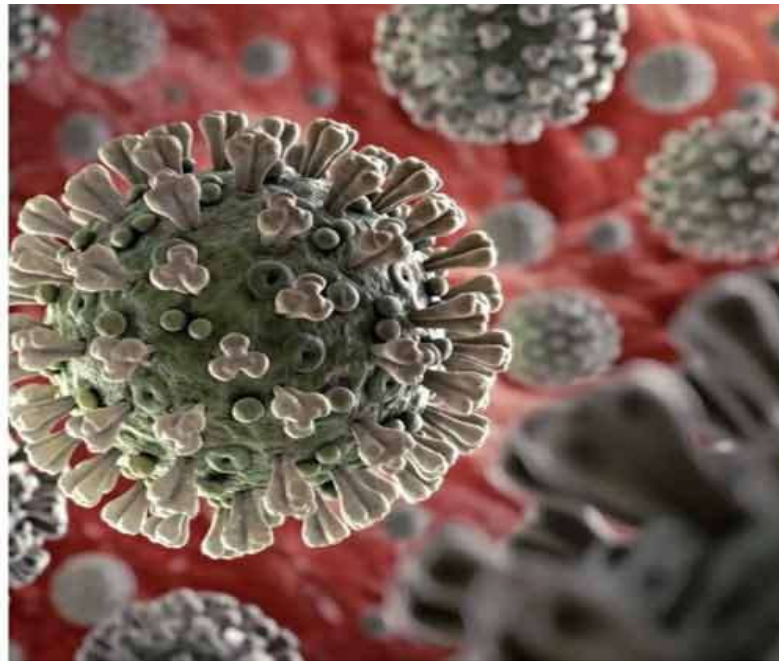
48 h



Antes de extubar

Comorbilidades de este paciente: Hipertensión, diabetes, obesidad

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



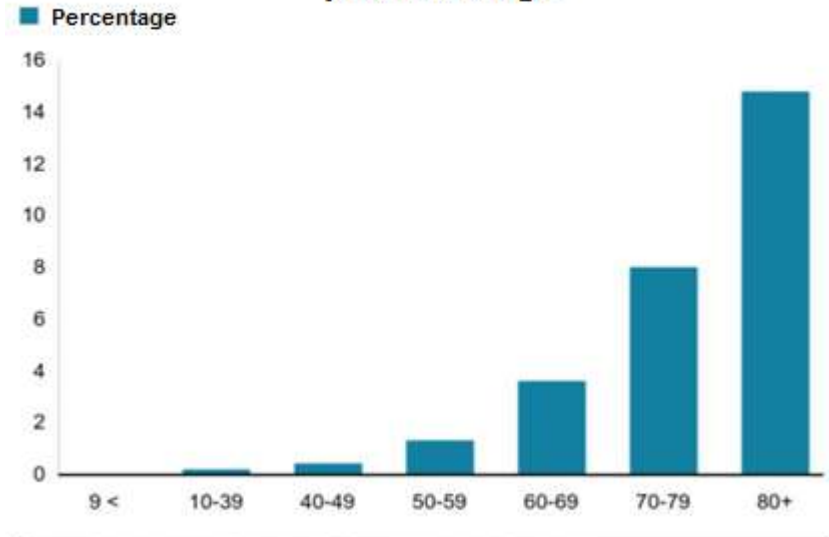
Innate immunity, immune-senescence, viral infections and vaccination

In aged adults the capacity to induce an effective response to infections is impaired



- ✓ Increased mortality
- ✓ Conventional vaccines induces a weak and time limited response.
- ✓ Recurrent diseases are frequent due to the poor immunological response

SARS-CoV2-related mortality according to patient's age

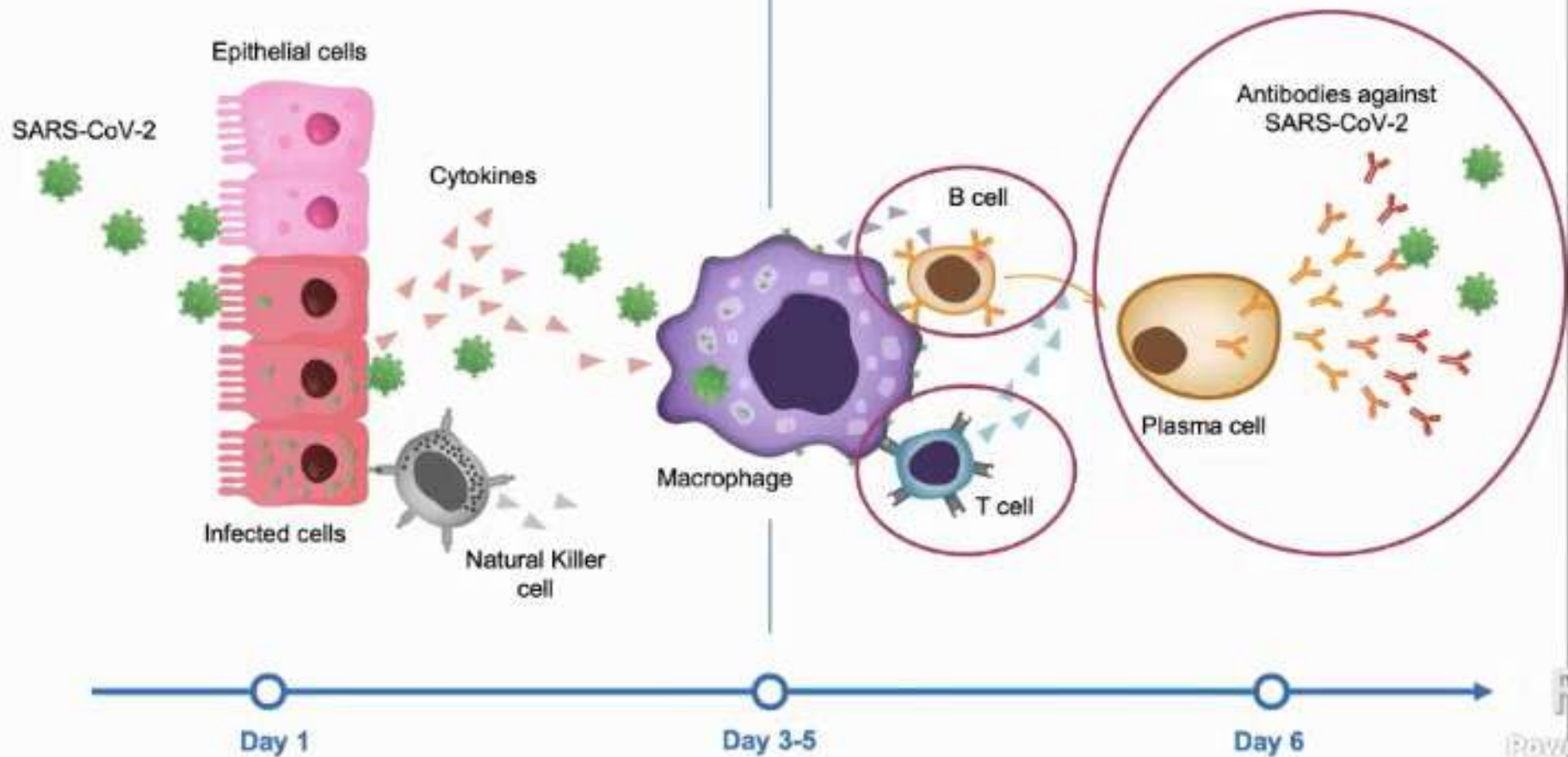


Chinese Center for the Control and Prevention of Diseases

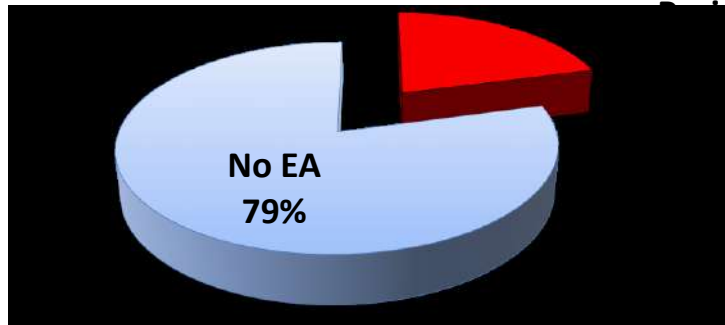
CDC China, Feb 2020

INNATE RESPONSE

ADAPTATIVE RESPONSE



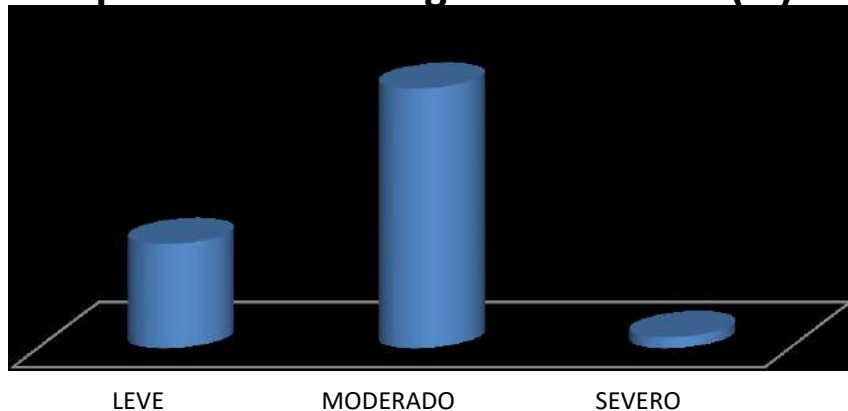
Pacientes con Eventos Adversos (%)



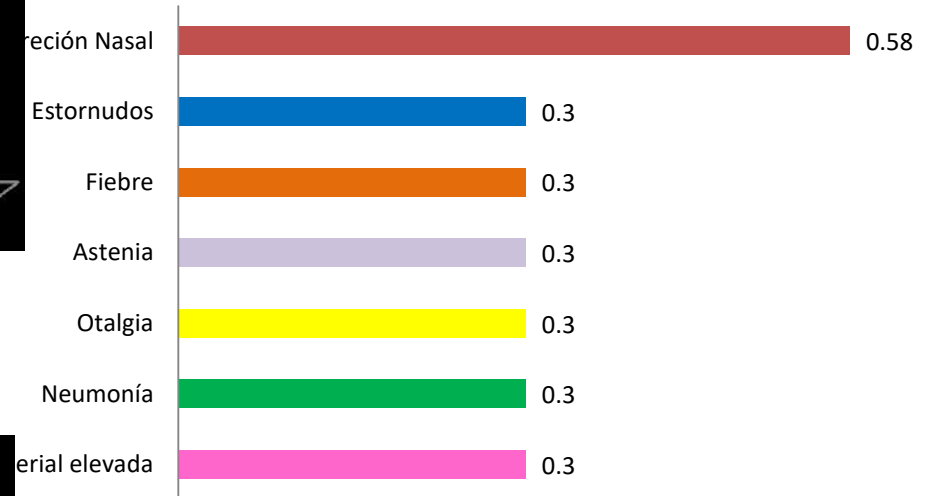
Porcentaje de EA según dosis aplicadas (%)



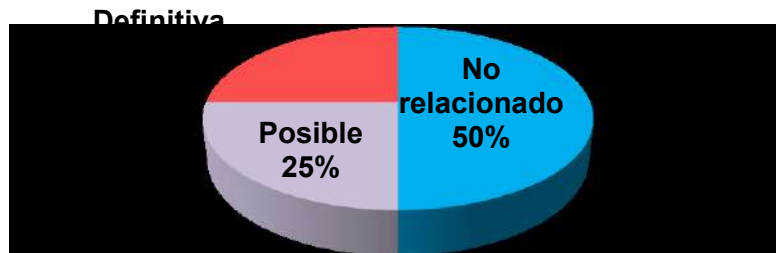
Proporción de EA según intensidad (%)



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



Causalidad de los EA



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.

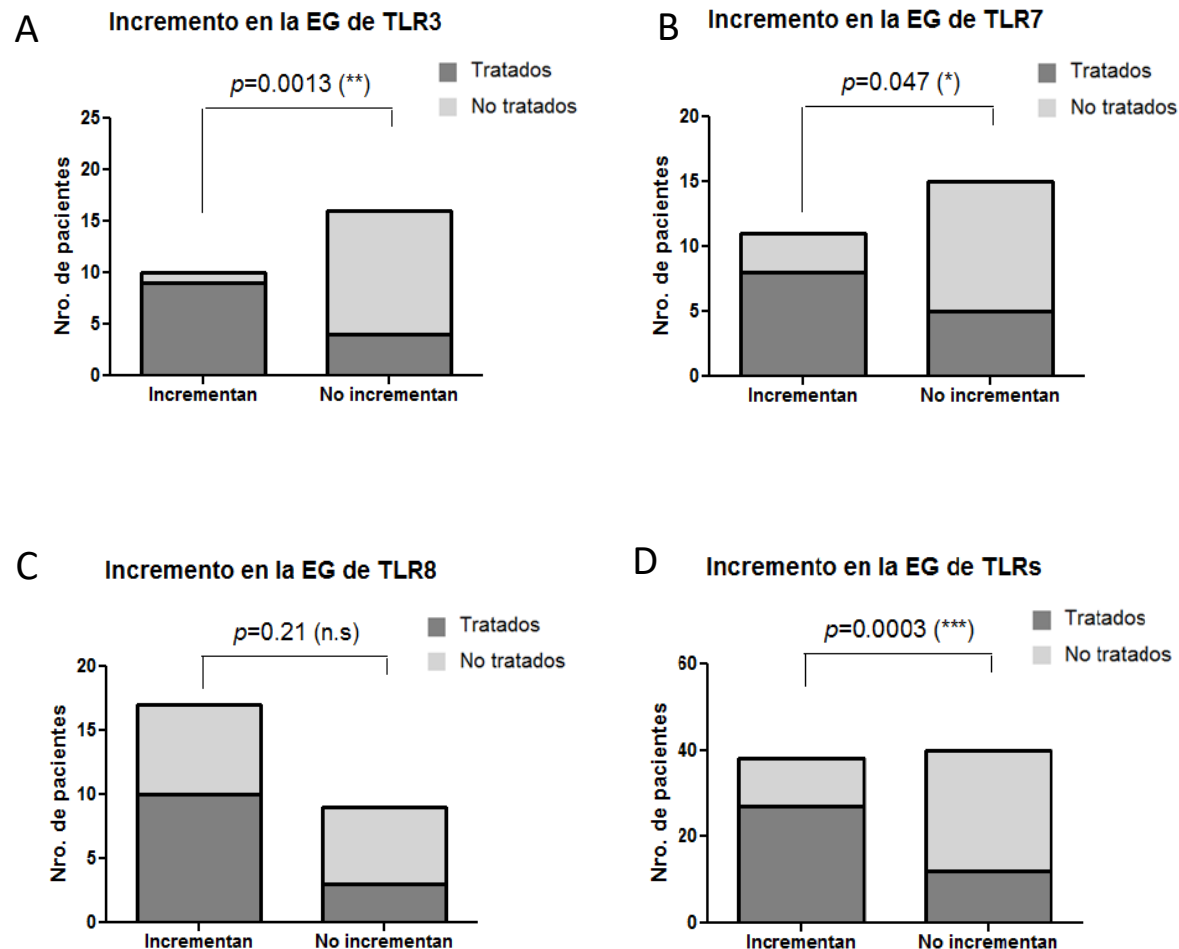


Figura 1. Resultados hasta el 4to día del estudio: Frecuencia de pacientes con efecto estimulador de la expresión génica (EG) entre el día 0 y el día 4, de los receptores A) TLR3, B) TLR7 y C) TLR8 (receptores que detectan ARN) en pacientes tratados con las primeras 3 dosis sublinguales y una dosis intranasal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

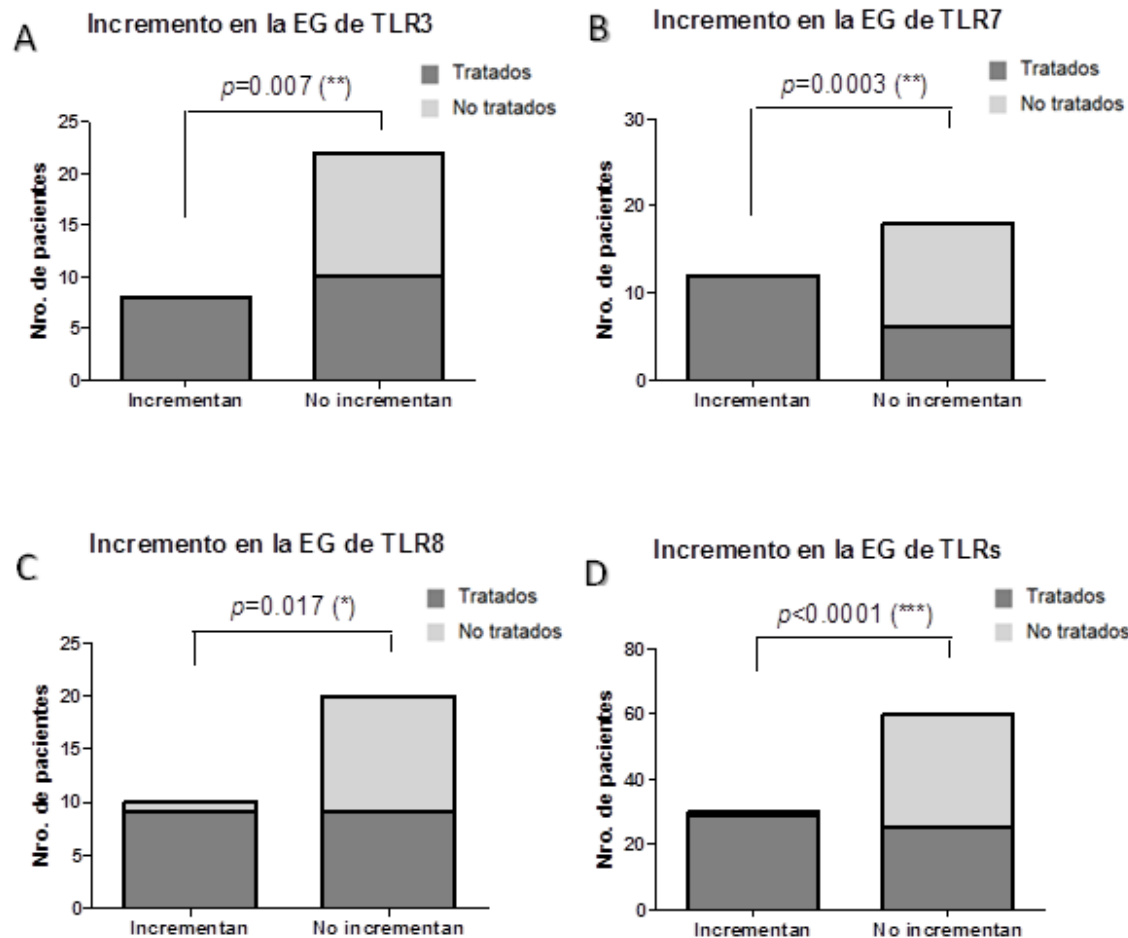
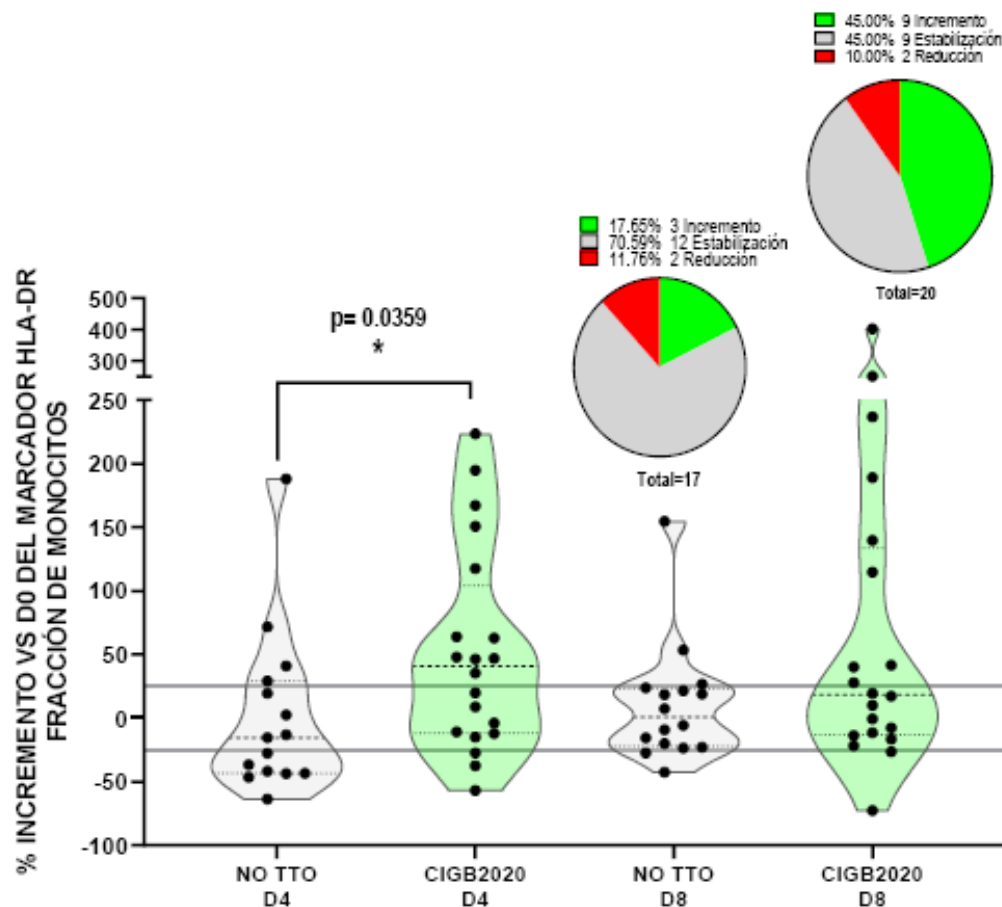


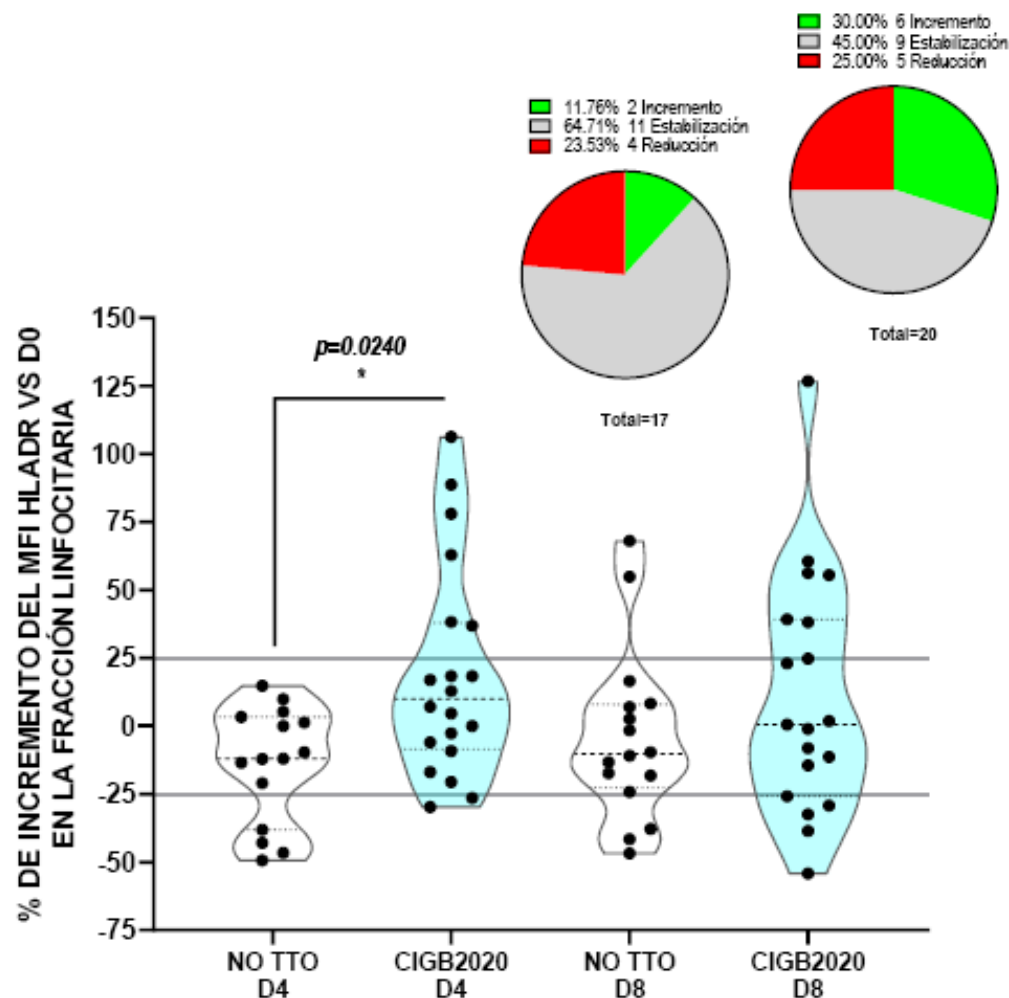
Figura 2. Resultados al 8vo día del estudio: Frecuencia de pacientes con efecto estimulador de la expresión génica (EG) entre el día 0 y el día 4, de los receptores A) TLR3, B) TLR7 y C) TLR8 (receptores que detectan ARN) en pacientes tratados con las primeras 7 dosis sublinguales y dos dosis intranasales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



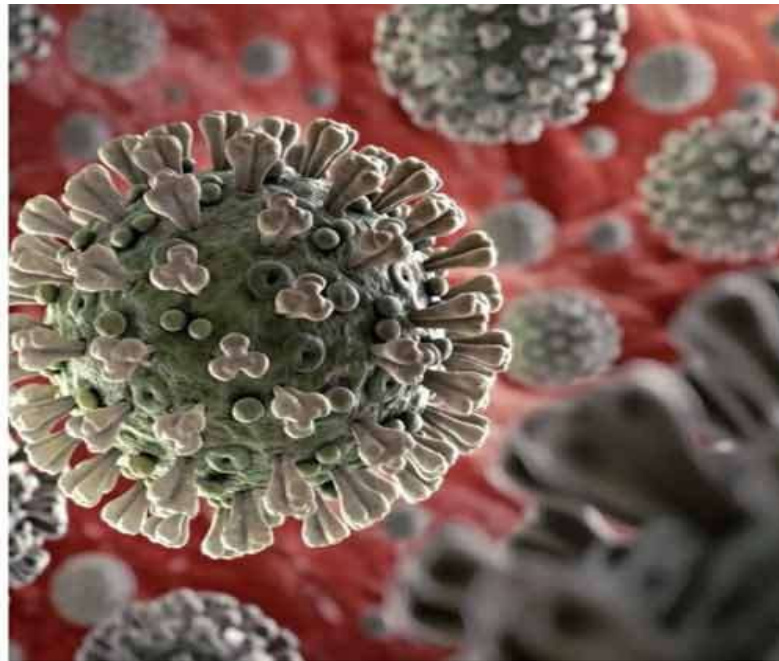
Se evidenció un incremento en el porcentaje de pacientes que aumentaron sus niveles de expresión de HLA en el cuarto día en monocitos ($p = 0.0448$)

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

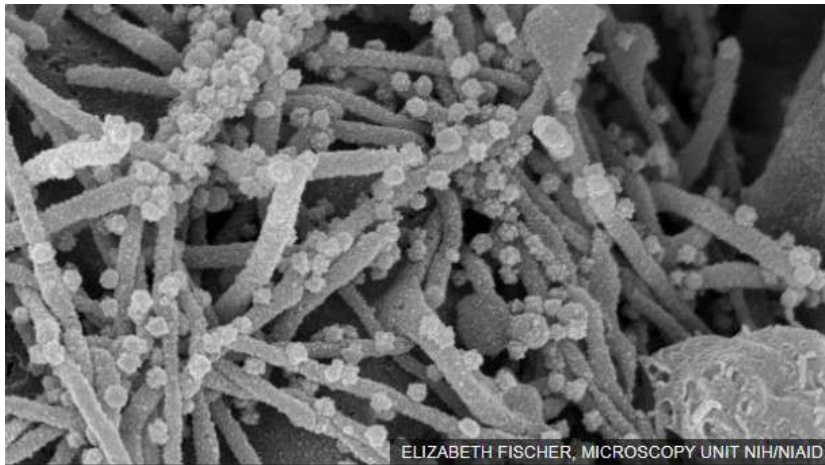


Se evidenció, un incremento en el porcentaje de pacientes que aumentaron sus niveles de expresión de HLA en el cuarto día en linfocitos ($p=0.018$)

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

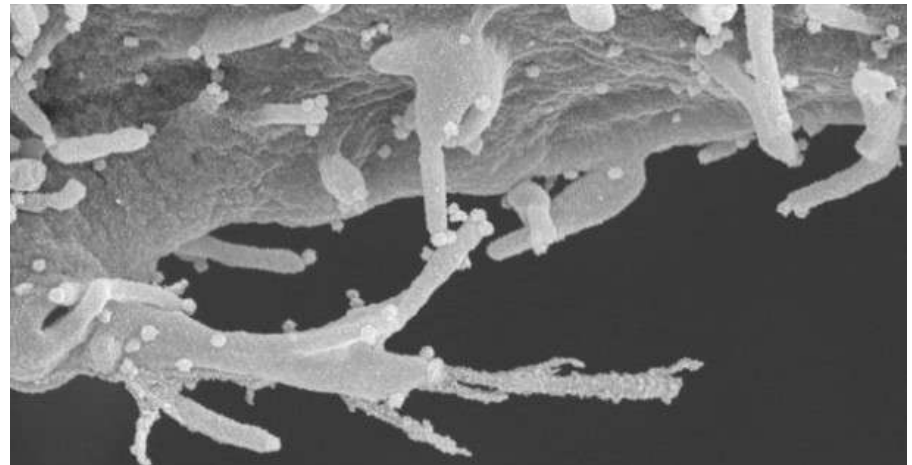


Kinase enzymes are primarily responsible for these modifications in the cell



ELIZABETH FISCHER, MICROSCOPY UNIT NIH/NIAID

El virus utiliza los filopodios para salir de la célula infectada y para infectar otras células cercanas.



ELIZABETH FISCHER, MICROSCOPY UNIT NIH/NIAID

Nunca antes se había visto a la célula humana infectada por el coronavirus con este nivel de detalle.



ELIZABETH FISCHER, MICROSCOPY UNIT NIH/NIAID

La célula infectada, siguiendo las instrucciones del virus (en azul), desarrolla largos tentáculos para infectar otras células.



ELIZABETH FISCHER, MICROSCOPY UNIT NIH/NIAID

Los filopodios no son comunes pero se han visto en otros virus como el de Marburgo.

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

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)

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

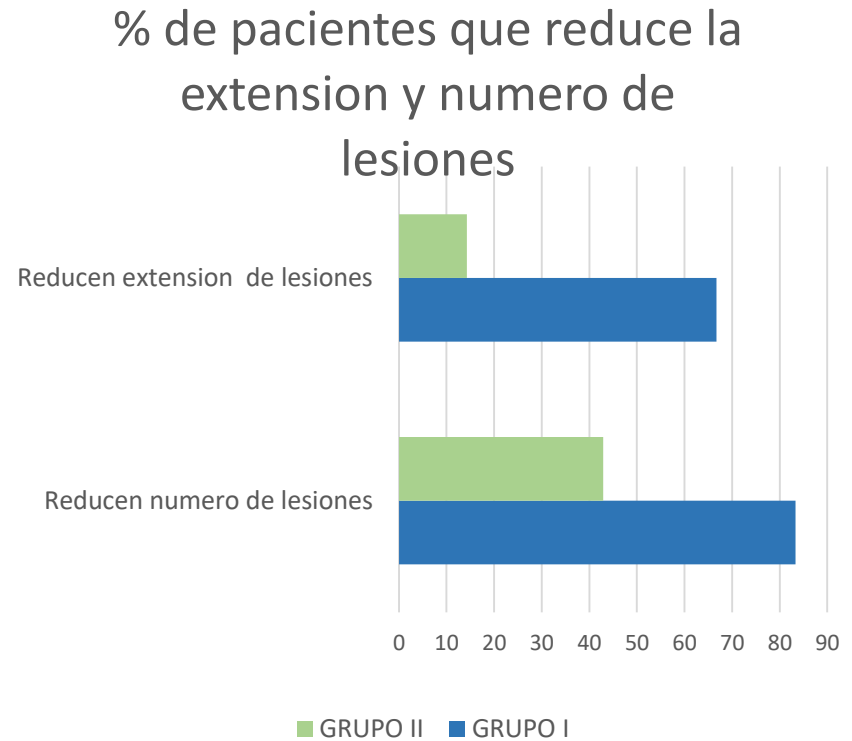
Resultados – Evaluaciones Tomográficas



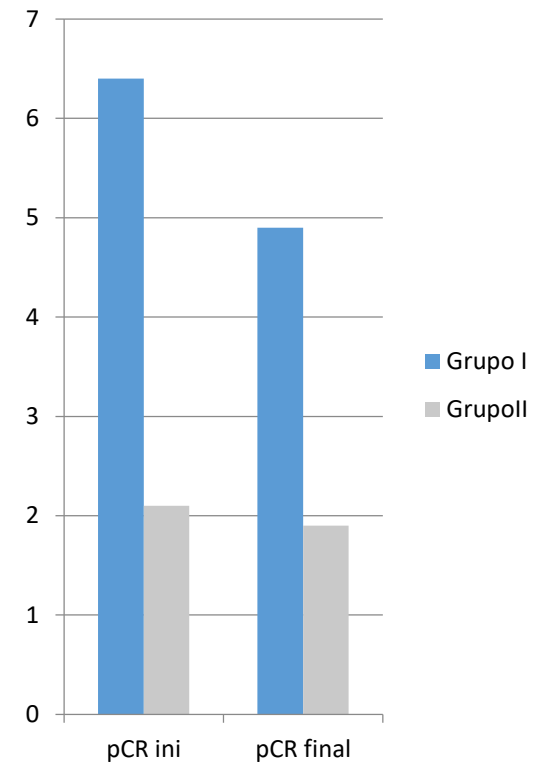
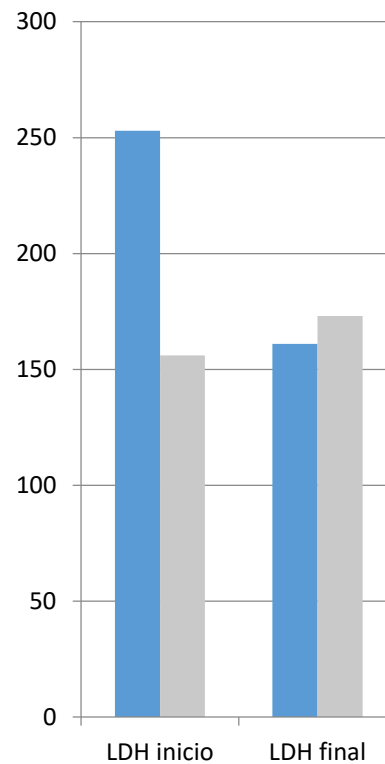
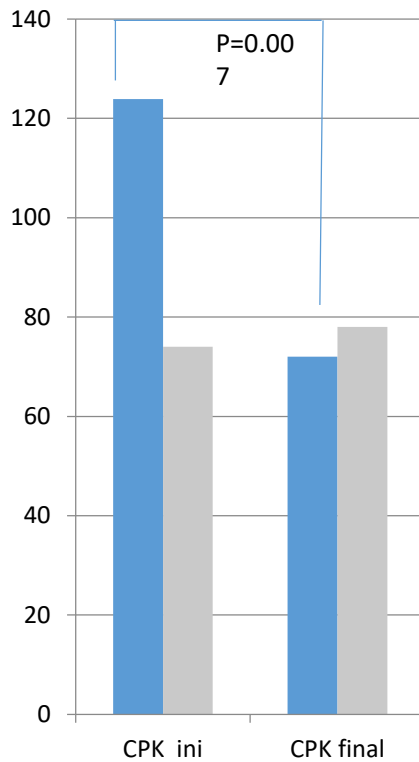
ANTES



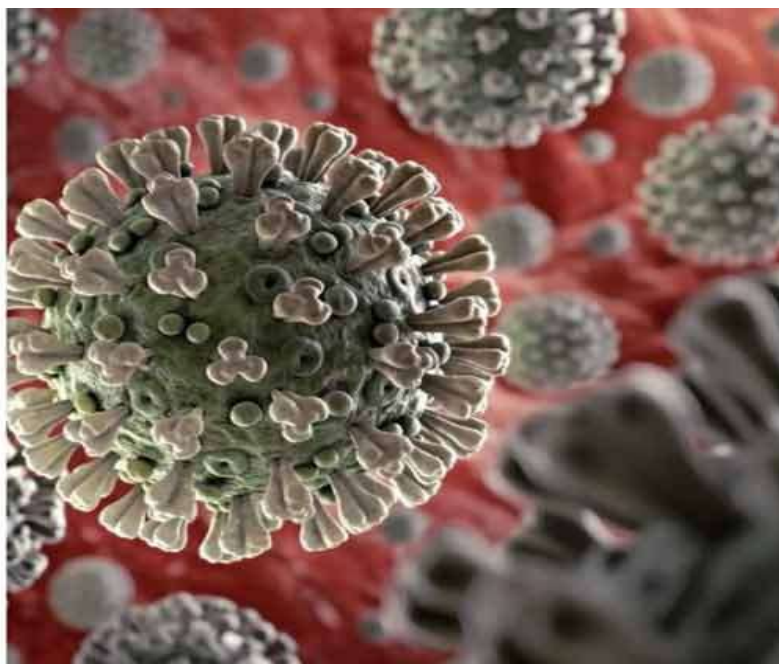
DESPUES



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

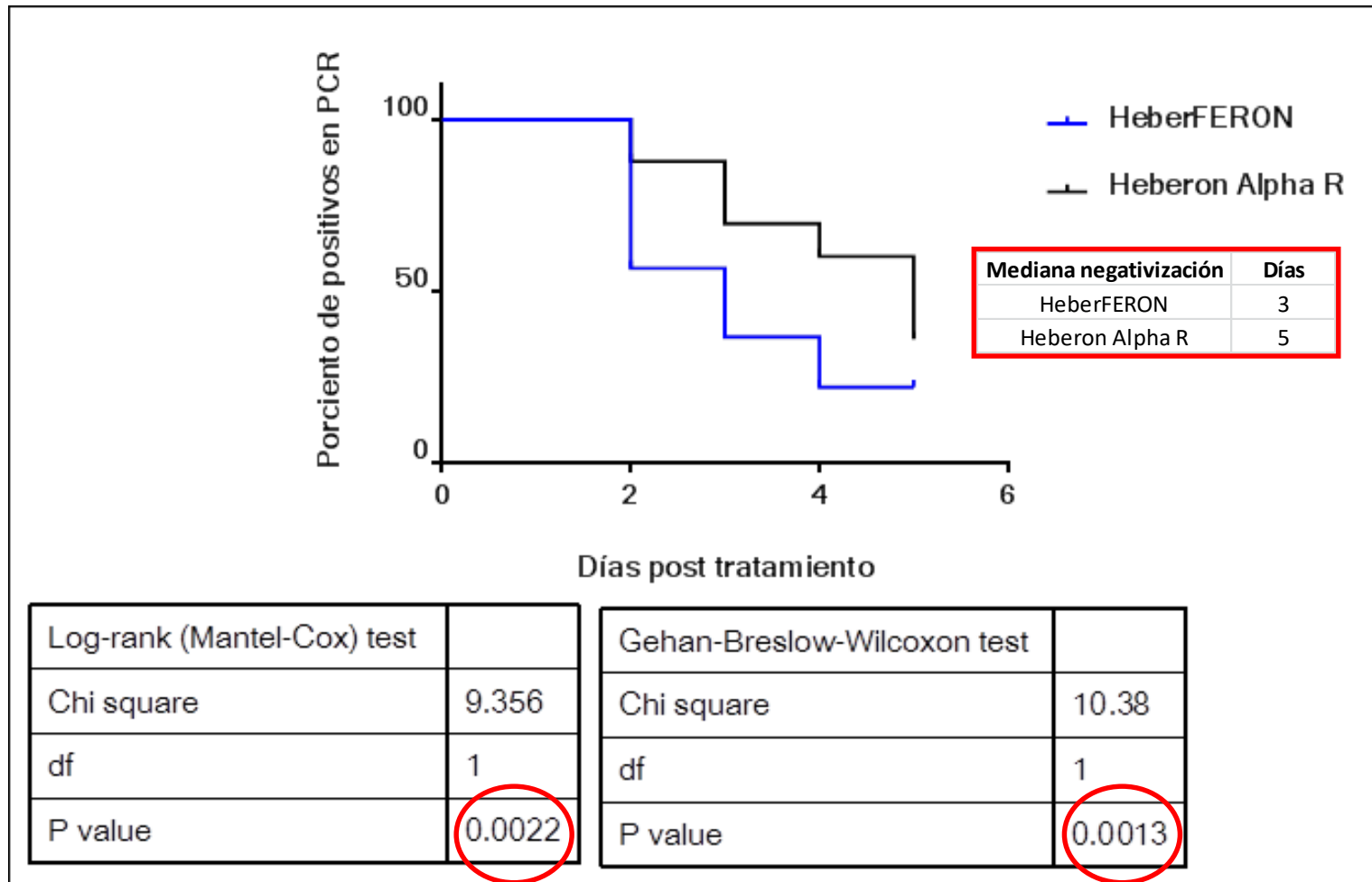


Ensayo Clínico de comparación de tratamiento temprano con Heberon (Interferon alfa) y Heberferon (Interferon alfa + gamma)



Negativización en 63 pacientes en el Hospital Luis Diaz Soto

Interferon $\alpha 2b$ (Heberón) Interferón $\alpha 2b$ + Interferón γ (Heberferón)



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

Interferon $\alpha 2b$ (Heberón)

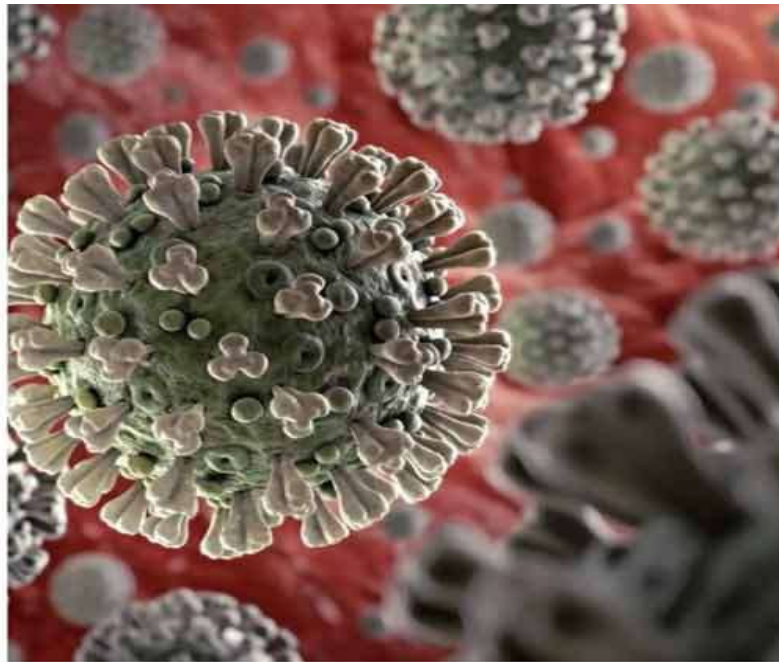
Interferón $\alpha 2b$ + Interferón γ (Heberferón)

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%)



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)

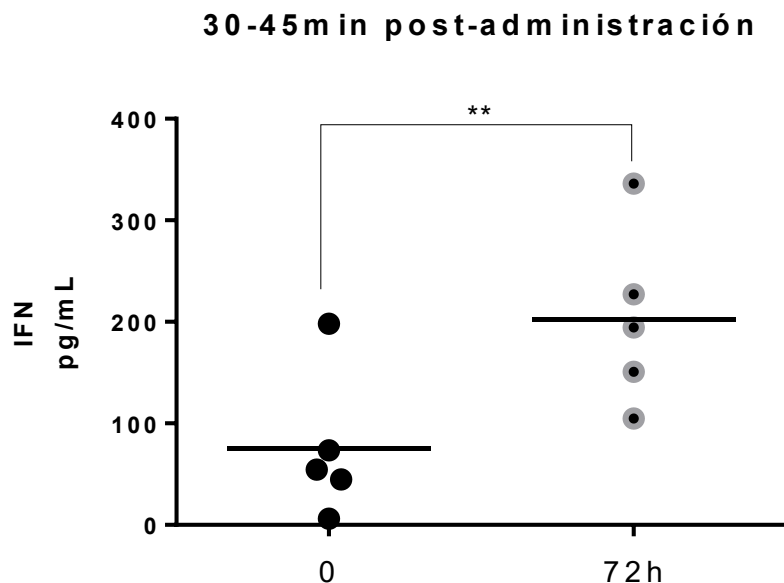
Nasalferon (20,000,000 UI en 2 mL): Interferon Alfa 2b recombinante en formulación nasal

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



	Medición de IFN alfa					
	Tiempo 0	Tiempo 72h				
Voluntario	pg/mL	UI/mL	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						

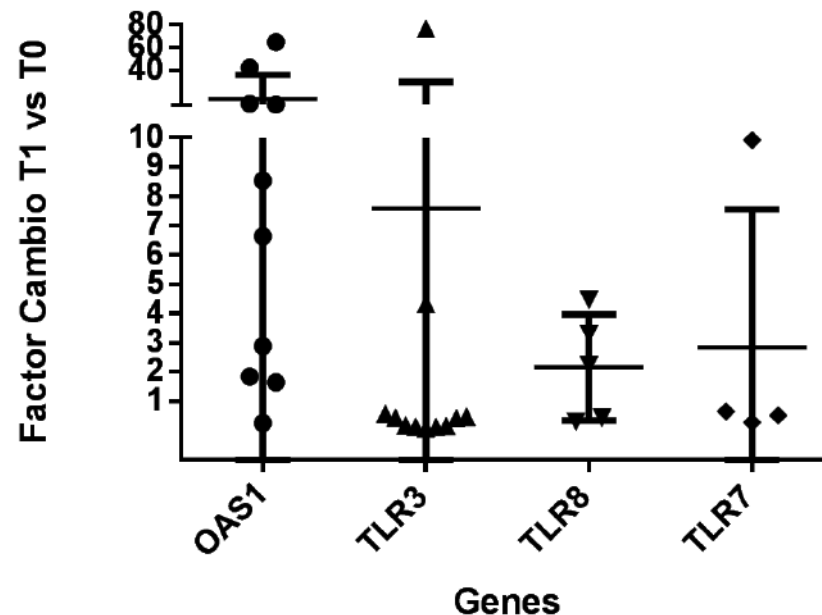
Se detecta incremento de la concentración de interferón en sangre en los 5 voluntarios que la muestra se tomó a los 30-45 min de la administración nasal realizada a los tres días del inicio de la aplicación.

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.

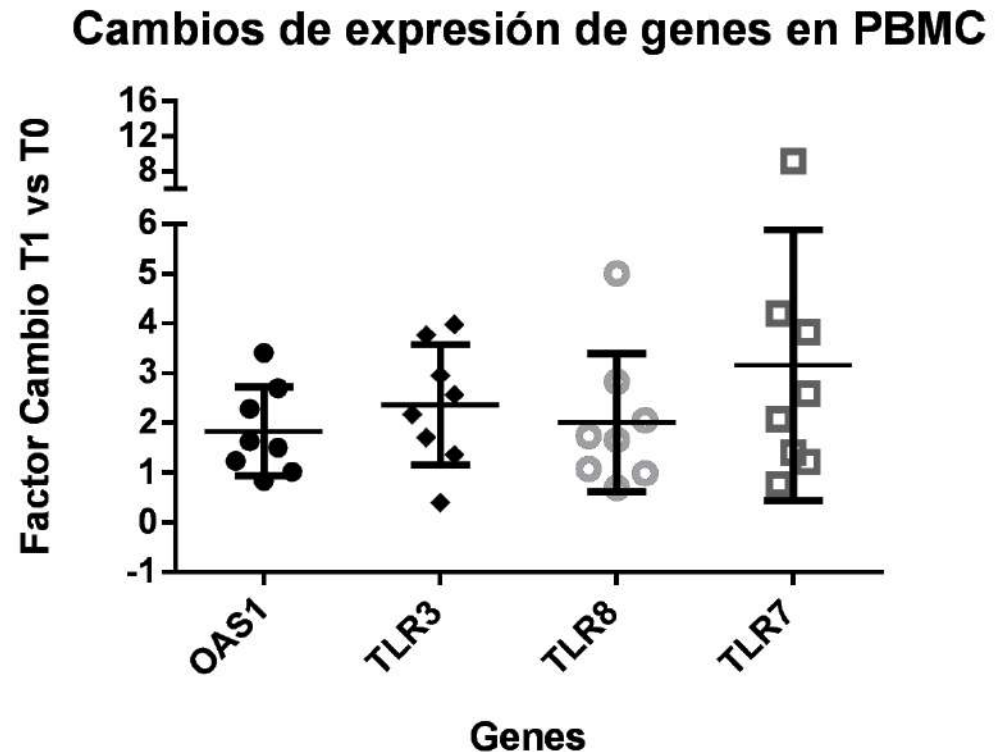
Cambio de expresión de genes en RASPADOS



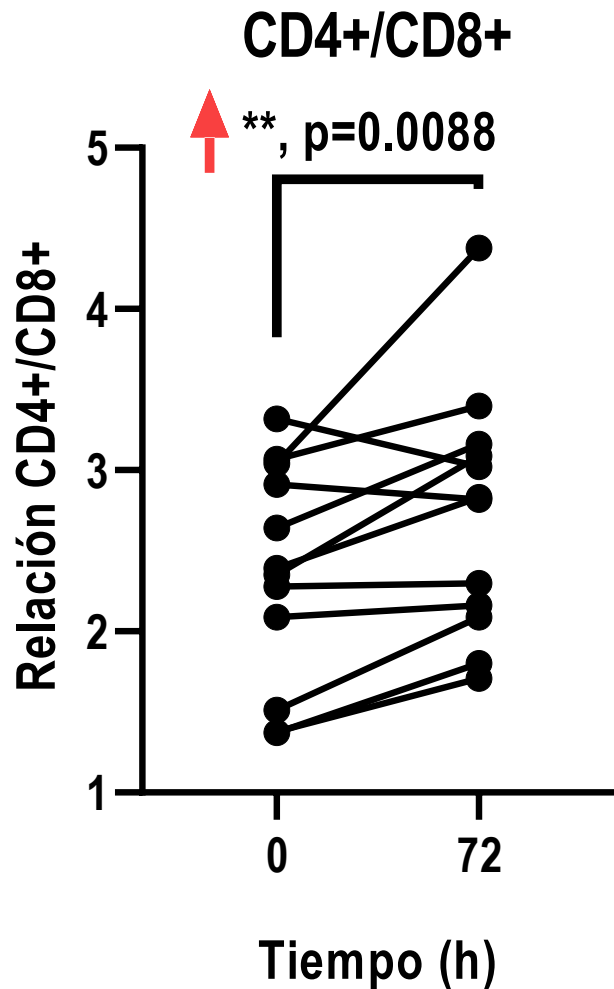
Media aritmética de incremento de los genes en linfocitos de sangre periférica

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)

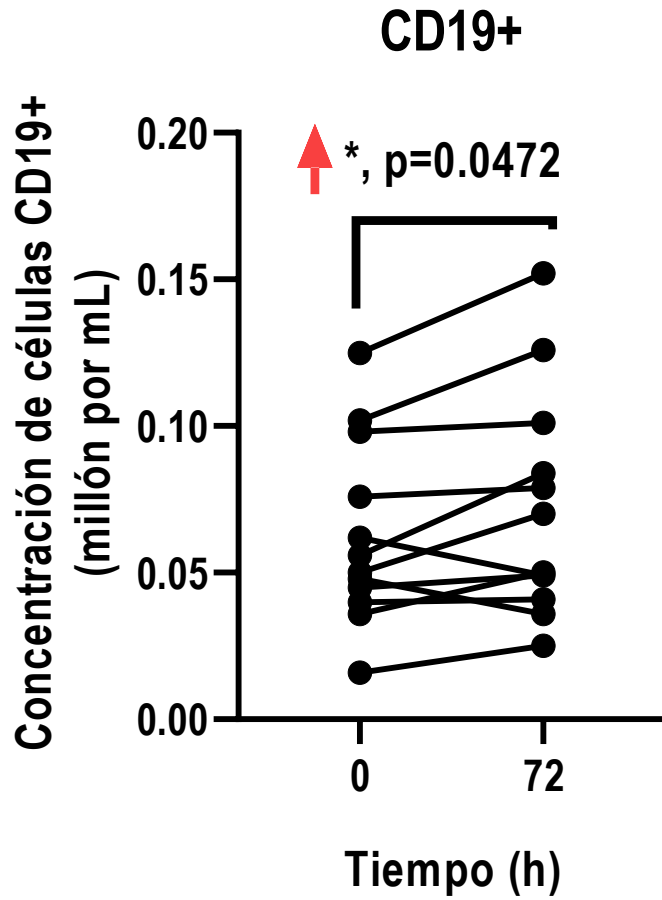


Incremento de la capacidad de desarrollar una respuesta efectiva contra los patógenos



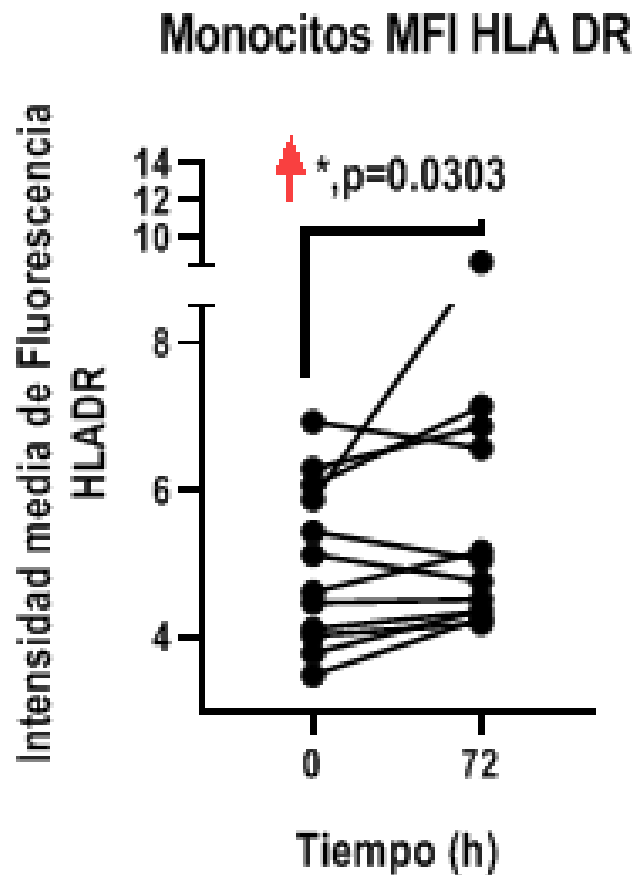
Se incrementa la relación de células T CD4+/CD8+ que favorece el desarrollo de una respuesta efectiva vs contra patógenos. Sin una reducción de significación en las concentraciones de células CD8+

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



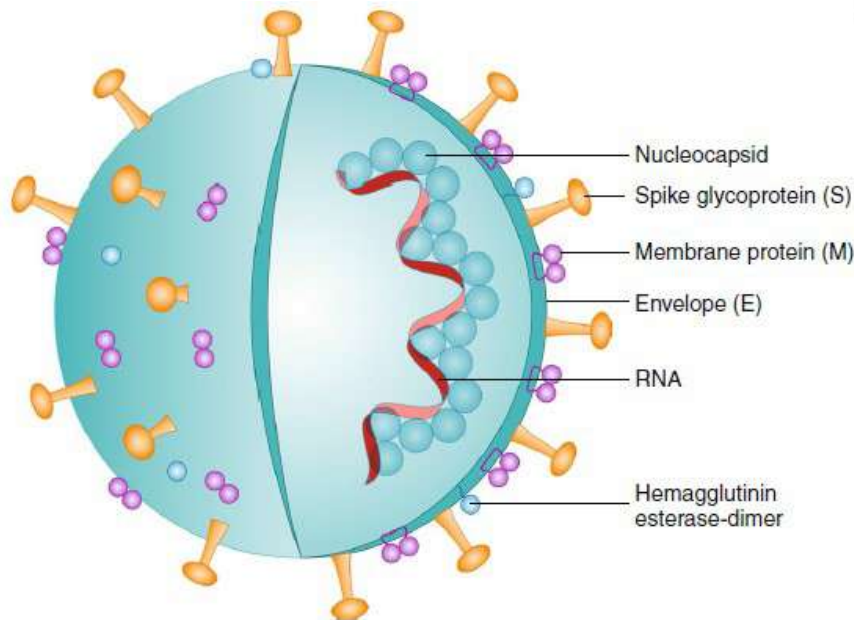
Expansión de poblaciones de
células B CD19+

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

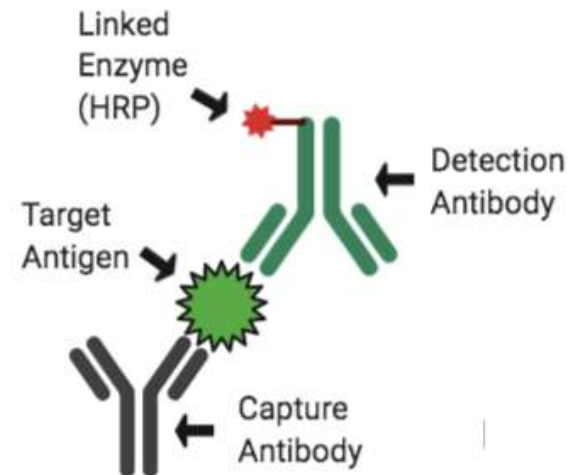
Obtención de reactivos biológicos y desarrollo de sistemas diagnóstico serológico contra el SARS-CoV-2



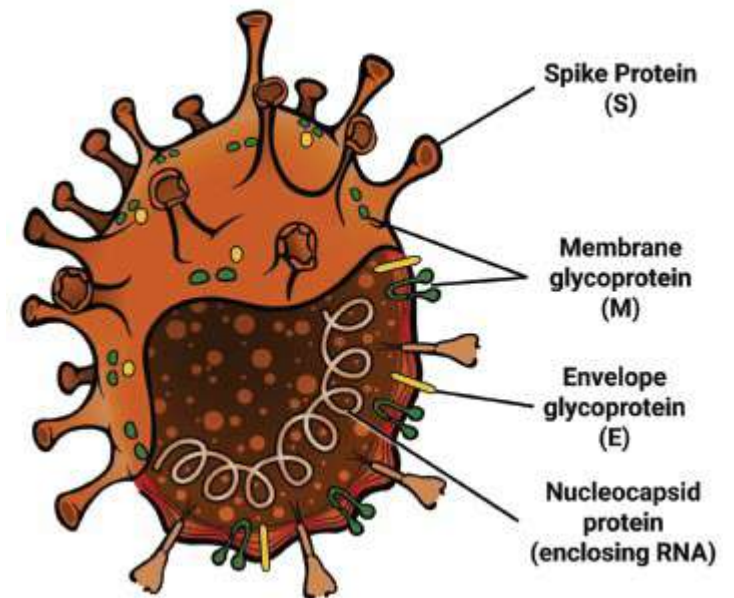
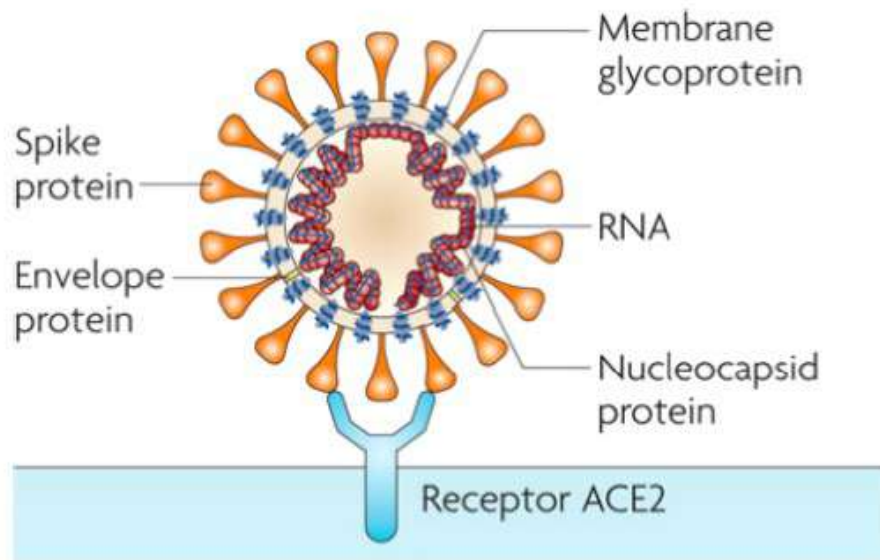
ELISA

(enzyme-linked immunosorbent assay)

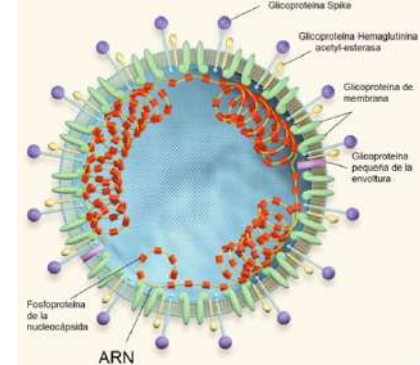
Sandwich ELISA



Proyecto de desarrollo de vacuna específica contra SARS-CoV-2



Más de 288 candidatos vacunales en desarrollo, 52 están en Fase I/II de Clínica, y 10 están en Fase III



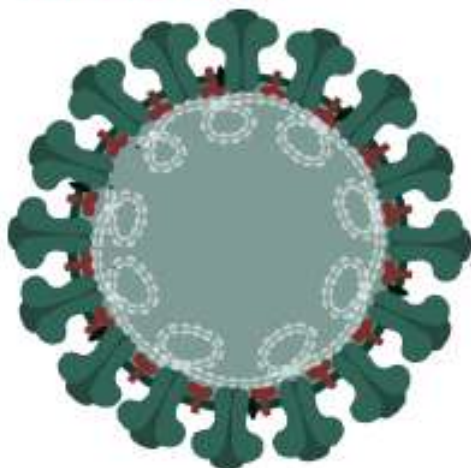
Tipo de Vacuna	Preclinica	Fase I	Fase I/II	Fase II	Fase II/III
Vectores vivos no replicativos	23	4		1	4
Vectores replicativos	17	2	1		
RNA	25	2	2		2
DNA	14	1	4		
Inactivadas	7	1	3		3
Atenuadas	4				
Subunidades o VLP	75	9	5	1	1
Otras	32	3			
Total	199	22	15	2	10

https://vac-lshtm.shinyapps.io/ncov_vaccine_landscape/

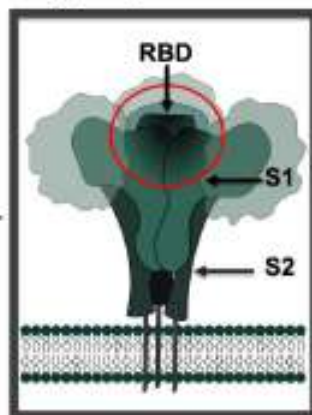
(<https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of68-covid-19-candidate-vaccines>)

GAM-COVID-VAC and GAM-COVID-VAC-Iyo

SARS-CoV-2

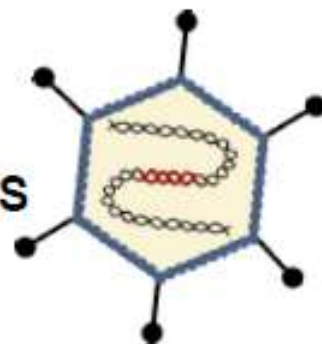


Glycoprotein S



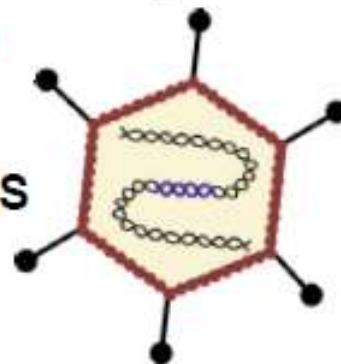
Component 1

rAd26-S



Component 2

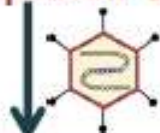
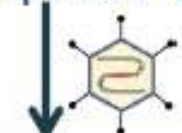
rAd5-S



VACCINATION REGIMEN:

Component 1

Component 2



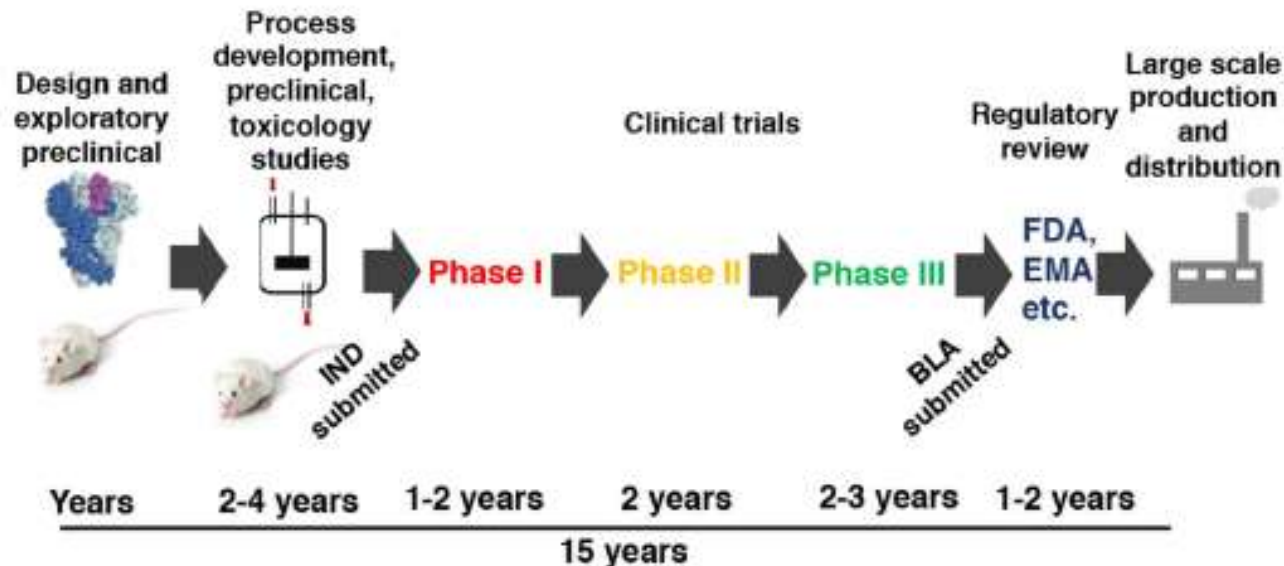
1

21

DAYS

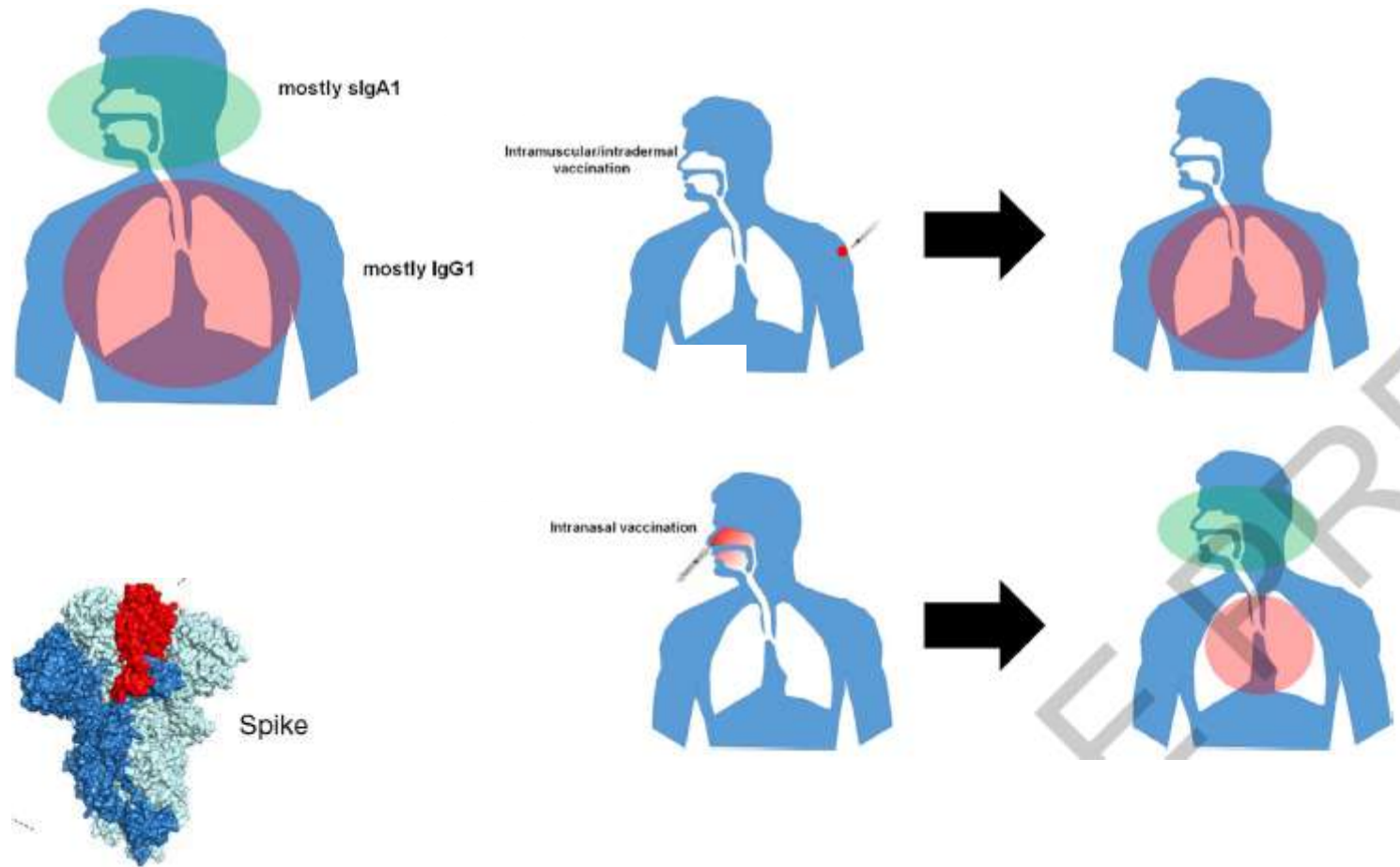
Vaccine	Key compound	Form	Storage
Gam-COVID-Vac	Comp. 1: rAd26-S Comp. 2: rAd5-S	Liquid	-20°C
Gam-COVID-Vac Lyo	Comp. 1: rAd26-S Comp. 2: rAd5-S	Lyophilized	+4°C

Traditional development



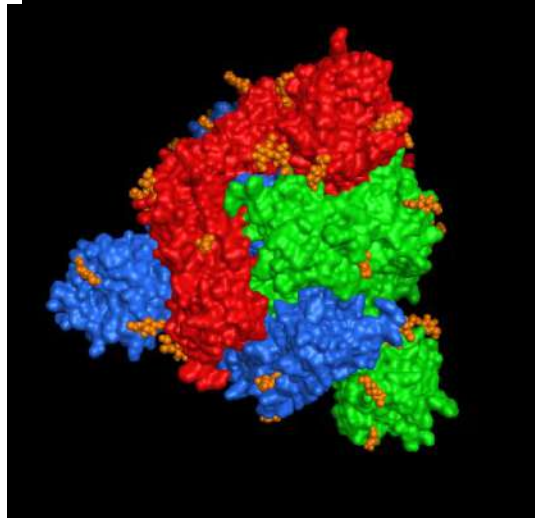
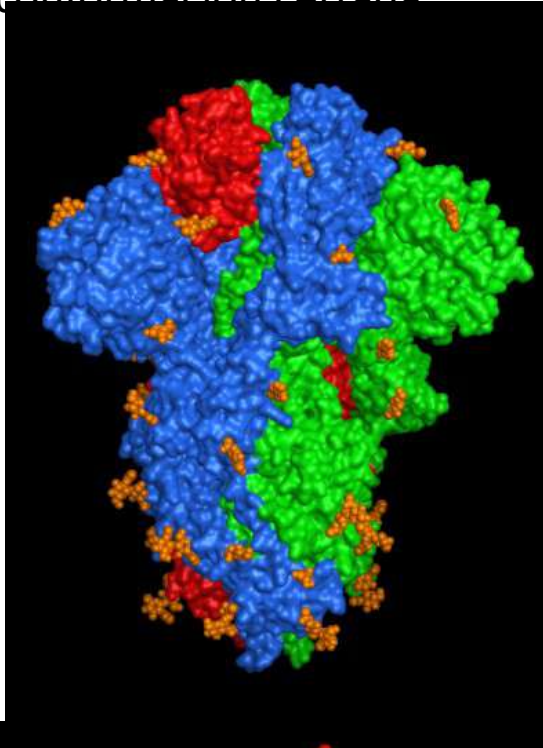
COVID-19 vaccine development



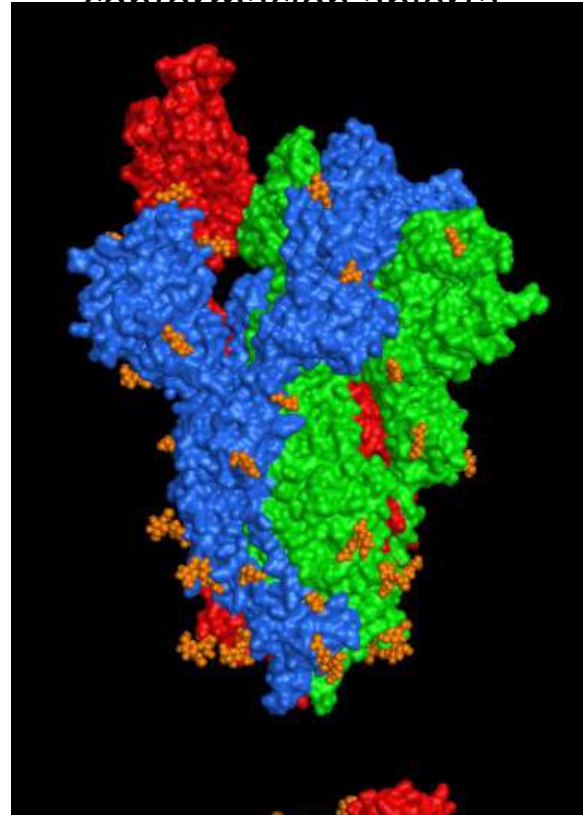


Proteína de la espiga del virus SARS-COV2

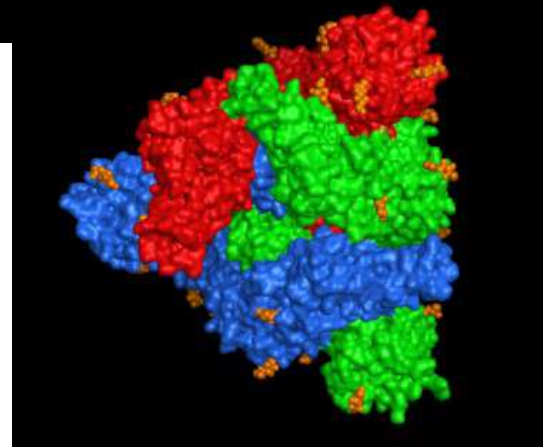
conformación cerrada



conformación abierta



vista lateral



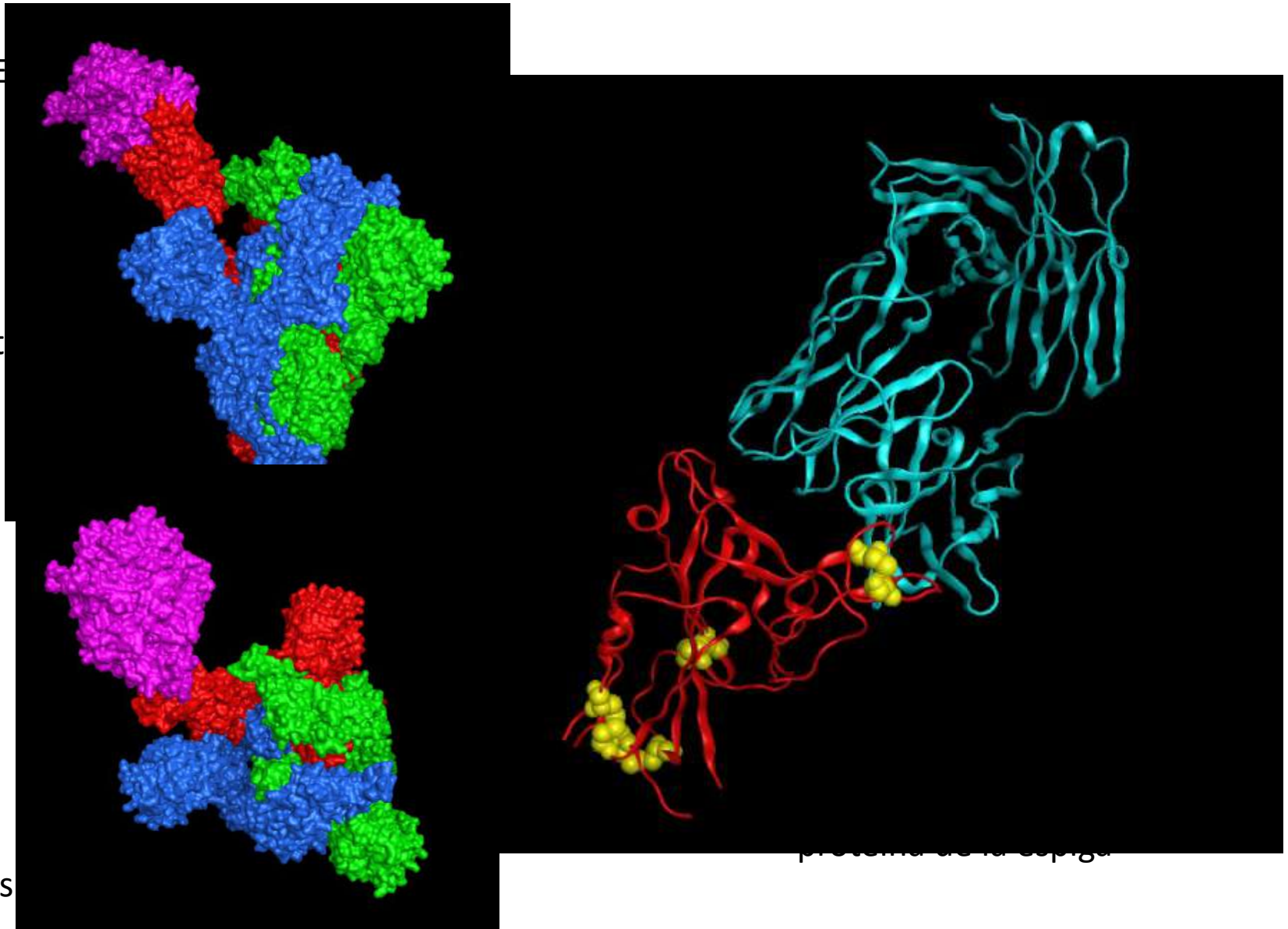
vista superior

Unión al receptor ACE2 y neutralización por anticuerpos

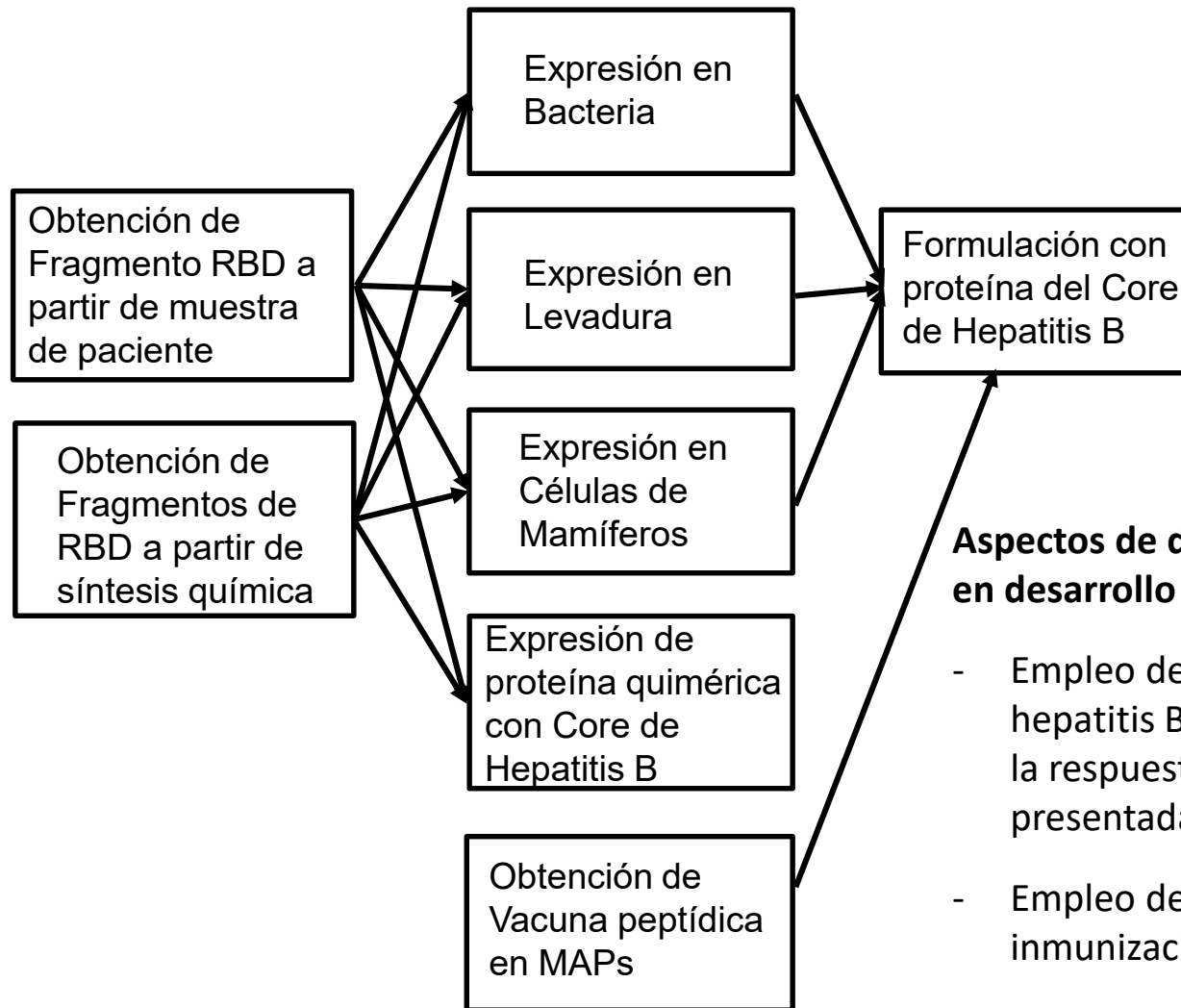
ACE

Vist

Vista s



Estrategias de obtención del candidato vacunal cubano



Aspectos de diferenciación con estrategias en desarrollo en otros países:

- Empleo de la proteína del Core de la hepatitis B con capacidad de potenciar la respuesta inmunológica (Patente ya presentada).
- Empleo de la ruta nasal de inmunización.

Impacto de los resultados en el protocolo de actuación cubano contra el COVID 19

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 y actualmente al 7mo 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.

