

Uso de Colágeno-Polivinilpirrolidona en la inflamación y
fibrosis pulmonar en pacientes infectados por el virus
SARS-CoV2 (Covid-19)

5

CAMPO TÉCNICO

Antecedentes

En el momento actual el mundo se encuentra en una emergencia sanitaria por la presencia de una infección masiva por el virus SARS-CoV2.

10 A pesar de todos los esfuerzos de la comunidad médica y científica en materia de salud, no se ha encontrado un tratamiento curativo o bien, que destruya al virus.

Con base en lo anterior se han hecho innumerables esfuerzos por ayudar a los pacientes afectados por este padecimiento

15 para corregir el estado patológico y sus posibles secuelas. La infección provocada por el virus SARS-CoV2 produce la destrucción celular masiva en el pulmón y otros órganos, que se acompaña por un estado de hiperinflamación, lo que causa como secuela la fibrosis pulmonar en los pacientes recuperados y la muerte en aquellos pacientes con falla
20 multiorgánica.

En un esfuerzo por controlar el proceso inflamatorio que conduce a la destrucción alveolar y la fibrosis, con la consecuente pérdida de la función del órgano respiratorio,
25 se está evaluando el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-receptor de IL-6 (tocilizumab) y el uso de células mesenquimales precursoras.

El común denominador de estos trabajos es modular la respuesta inflamatoria, con lo que se acorta el período de
30 estado y potencialmente, se limita el desarrollo de la fibrosis pulmonar.

También se está evaluando el papel de algunos inmunosupresores tales como los corticosteroides, la colchicina, los inhibidores de la vía de señalización

35 JAK/STAT como un recurso para modular la respuesta inmune. Tomando como base la información anterior, el empleo de un

inmunorregulador, más que un inmunosupresor, como el COLÁGENO-POLIVINILPIRROLIDONA, (Fibroquel marca registrada; clave SSA: 010 000 3999), que tiene un mecanismo de acción que de manera relevante: modula negativamente la expresión de la IL-1 β , IL-8, TNF- α , TGF- β 1, IL-17, Cox-1, moléculas de adhesión leucocitaria (ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1), incrementa sensiblemente los mediadores y mecanismos moduladores de la inflamación (expresión de IL-10 y el número de células T reguladoras); así mismo, disminuye la fibrosis tisular, resultaría relevante en el control de la tormenta de citocinas que se presenta debido a la hiperinflamación provocada por el síndrome de activación macrofágica (linfocitosis hemofagocítica secundaria). Es importante destacar que la colágena-polivinilpirrolidona (colágena-PVP) fue protegida en la patente Mexicana No. 264 089 y sus contrapartes tanto en Europa como en otras jurisdicciones. La patente '089 describe y reclama el uso de colágena-PVP para modular la inflamación articular crónica, en la cual se discuten detalladamente todos los análisis de la artritis reumatoide (AR) y la osteoartritis (OA) desde distintos enfoques que abarcan aspectos clínicos, patológicos, histológicos, biomecánicos, bioquímicos e inmunológicos de los tejidos de la cavidad articular afectada y muy particularmente, se estudiaron tanto la AR como la OA considerándolos procesos inflamatorios autoinmunes y no autoinmunes, respectivamente; se propuso un fármaco a base de colágena-PVP para usarse en el tratamiento de dichos padecimientos y se analizaron sus interacciones celulares en el cuerpo humano para evitar efectos secundarios indeseables tales como la toxicidad e inmunogenicidad y buscando alternativas para evitar la cirugía.

El mecanismo regulador de la inflamación ejercido por la colágena polimerizada tipo I se encuentra sustentado en 2 modelos: el primero, de inflamación no-autoinmune [modelo de osteoartritis (OA)] y el segundo, de inflamación

autoinmune [modelo de artritis reumatoide (AR)]

Modelo de inflamación no-autoinmune (OA) y autoinmune (AR):

Se realizaron co-cultivos de cartílago y sinovia de 9
5 pacientes con AR y 8 pacientes con OA sometidos a reemplazo
por prótesis de cadera o rodilla (Tabla 1). El tejido
articular se cultivó con (a) RPMI (control), (b) colágena
polimerizada tipo I al 1%, durante 7 días. Se recolectaron
los sobrenadantes y tejidos de los días 1 y 7. En los
10 sobrenadantes de cultivo se cuantificó la concentración de
IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ mediante ELISA y
los resultados se normalizaron con la concentración de
proteínas totales. Por medio de histoquímica se evaluó la
expresión de IL-1 β e TNF- α .

15 Los datos demográficos y clínicos de los pacientes se
detallan en la Figura 1.

*Síntesis de citocinas pro-inflamatorias en los co-cultivos
de cartílago y sinovia de pacientes con AR u OA.*

Un gran número de citocinas (pro- y anti-inflamatorias) y
20 factores de crecimiento están involucrados en la
fisiopatogenia de la OA y la AR. Entre las citocinas pro-
inflamatorias que han demostrado tener un papel pivote en
el desarrollo de estas enfermedades se encuentran la IL-1 β
y el TNF- α . La adición de colágena polimerizada tipo I a los
25 co-cultivos de AR u OA disminuyó la expresión tisular de
TNF- α vs. los controles en el tejido sinovial (Fig. 2).

Figura 2. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en la
expresión de TNF- α . (A) Células inmunorreactivas a TNF- α en
30 el tejido sinovial de los co-cultivos. (B) Células
inmunorreactivas TNF- α + en el cartílago de los co-cultivos.
Artritis reumatoide (AR): panel de la izquierda.
Osteoartritis (OA): panel de la derecha. Basal: tejido en
condiciones basales. Control Día 7: tejido control cultivado
35 con RPMI durante 7 días y que no recibió ningún tratamiento.

Cada cultivo fue realizado por triplicado para cada condición, de los cuales al menos se analizaron dos secciones de cada uno de los tejidos. Los resultados se expresan como el promedio $\pm$ error estándar (ESM) del porcentaje de células inmunorreactivas en 9 co-cultivos de pacientes con AR y 8 con OA. * $p \leq 0.002$.

Niveles de citocinas pro-inflamatorias en los sobrenadantes de co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con AR u OA.

Asimismo, la adición de colágena polimerizada tipo I a los co-cultivos de AR u OA disminuyó la expresión de IL-1 β y TNF- α vs. los controles en los sobrenadantes al día 7 de cultivo (Fig. 3 y Fig. 4, respectivamente).

Figura 3. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión de IL-1 β en los sobrenadantes de los co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con artritis reumatoide (AR) u osteoartritis (OA). Los datos representan el promedio $\pm$ DE de 9 co-cultivos de cartílago y tejido sinovial de pacientes con AR y de 8 co-cultivos de pacientes con OA. Cada cultivo fue realizado por triplicado para cada condición. Los resultados fueron normalizados con la concentración de proteínas totales del sobrenadante, determinada por el micrométodo de Folin-Löwry. AR: panel de la izquierda. OA: panel de la derecha. Basal: tejido en condiciones basales. Control Día 7: tejido control cultivado con RPMI durante 7 días y que no recibió ningún tratamiento. * $p \leq 0.008$.

Figura 4. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión de TNF- α en los sobrenadantes de los co-cultivos de cartílago y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) u osteoartritis (OA). Los datos representan el promedio $\pm$ DE de 9 co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con AR y de 8 co-cultivos de pacientes con OA. Cada cultivo fue realizado por triplicado para cada

condición. Los resultados fueron normalizados con la concentración de proteínas totales del sobrenadante, determinada por el micrométodo de Folin-Löwry. AR: panel de la izquierda. OA: panel de la derecha. Basal: tejido en condiciones basales. Control Día 7: tejido control cultivado con RPMI durante 7 días y que no recibió ningún tratamiento* $p \leq 0.008$.

Un patrón similar se observó en relación a la concentración de IL-8 en los sobrenadantes de los co-cultivos (Fig. 5). Sin embargo, la mayor disminución se determinó en los co-cultivos de tejidos de pacientes con AR tratados con colágena polimerizada tipo I. No se determinaron niveles detectables de IL-12 e IFN- γ en los cultivos.

Figura 5. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión de IL-8 en los sobrenadantes de los co-cultivos de cartílago y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) u osteoartritis (OA). Los datos representan el promedio $\pm$ DE de 9 co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con AR y de 8 co-cultivos de pacientes con OA. Cada cultivo fue realizado por triplicado para cada condición. Los resultados fueron normalizados con la concentración de proteínas totales del sobrenadante, determinada por el micrométodo de Folin-Löwry. AR: panel de la izquierda. OA: panel de la derecha. Basal: tejido en condiciones basales. Control Día 7: tejido control cultivado con RPMI durante 7 días y que no recibió ningún tratamiento.* $p \leq 0.006$.

Niveles de factores anti-inflamatorios en los sobrenadantes de co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con AR u OA.

La adición de colágena polimerizada tipo I a los co-cultivos de AR u OA aumentó la concentración de IL-10 entre 10 y 25 veces en los sobrenadantes de los co-cultivos, a niveles estadísticamente significativos al día 7 vs. el día 1 de cultivo (Fig. 6).

Figura 6. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión de IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos de cartílago y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) u osteoartritis (OA). Los datos representan el promedio $\pm$ DE de 9 co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con AR y de 8 co-cultivos de pacientes con OA. Cada cultivo fue realizado por triplicado para cada condición. Los resultados fueron normalizados con la concentración de proteínas totales del sobrenadante, determinada por el micrométodo de Folin-Löwry. AR: panel de la izquierda. OA: panel de la derecha. Basal: tejido en condiciones basales. Control Día 7: tejido control cultivado con RPMI durante 7 días y que no recibió ningún tratamiento. $*p \leq 0.006$.

Expresión génica de las citocinas pro- y anti-inflamatorias en los tejidos de los co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con AR u OA.

La evaluación de la expresión génica de citocinas pro- y anti-inflamatorias mostró que la colágena polimerizada tipo I adicionada a los co-cultivos de tejido articular de pacientes con AR, reguló negativamente la transcripción de genes tales como el de TNF- α e IL-23 (Fig. 7A, B) y positivamente el de células T reguladoras, FOXP3, a niveles estadísticamente significativos con respecto al control (Fig. 7B).

Figura 7. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión génica de citocinas y factores pro- y anti-inflamatorios en los tejidos de los co-cultivos de cartílago y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR). (A) Cuantificación de la expresión génica de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 y (B) cuantificación de la expresión génica de IL-23 y Foxp3 mediante RT-PCR en tejidos de membrana sinovial y cartílago co-cultivados durante 7 días. Las barras muestran el promedio $\pm$ DE de los niveles de transcritos

de las muestras normalizados a través de la expresión del gen constitutivo GAPDH determinado por $2\Delta\Delta Ct$. Los datos representan el promedio $\pm$ DE de 9 co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con AR. Cada cultivo fue realizado por triplicado para cada condición. Basal: tejido en condiciones basales. Control Día 7: tejido control cultivado con RPMI durante 7 días y que no recibió ningún tratamiento. Valores de $*p \leq 0.05$ fueron considerados como significativos. Mientras que la adición de colágena polimerizada tipo I a los co-cultivos de tejido articular de pacientes con OA indujo una regulación negativa de la expresión génica de TNF- α y positiva de Foxp3 a niveles estadísticamente significativos con respecto al control (Fig. 8).

Figura 8. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión génica de citocinas y factores pro- y anti-inflamatorios en los tejidos de los co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con Osteoartritis (OA). (A) Cuantificación de la expresión génica de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, (B) IL-23 y Foxp3 mediante RT-PCR en tejidos de membrana sinovial y cartílago co-cultivados durante 7 días. Las barras muestran el promedio $\pm$ DE de los niveles de transcritos de las muestras normalizados a través de la expresión del gen constitutivo GAPDH determinado por $2\Delta\Delta Ct$. Los datos representan el promedio $\pm$ DE de 8 co-cultivos de pacientes con OA. Cada cultivo fue realizado por triplicado para cada condición. Basal: tejido en condiciones basales. Control Día 7: tejido control cultivado con RPMI durante 7 días y que no recibió ningún tratamiento. Valores de $*p \leq 0.05$ fueron considerados como significativos.

En el presente estudio demostramos que la adición de la colágena polimerizada tipo I a los co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con AR disminuyó a nivel génico y proteico la síntesis de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , IL-8, IL-23 y TNF- α lo cual podría estar

directa o indirectamente relacionado con el incremento observado en los mecanismos reguladores de la inflamación, mediados por el aumento en los niveles de IL-10 y la expresión génica de Foxp3 en células T reguladoras.

5 En ambas enfermedades, la membrana sinovial más no el cartílago parece ser el tejido que contribuye de manera más importante en la síntesis de los factores solubles pro-inflamatorios.

10 La acción de la colágena polimerizada tipo I parece depender del estadio de activación celular como se ha demostrado por Jou I-M, et al, 2005 y Furuzawa-Carballeda et al, 2003 ya que la adición de la colágena atelopectídica polimérica tipo I a las células en reposo no induce ninguna respuesta, es
15 decir no tiene ningún efecto.

Los resultados obtenidos concuerdan con el análisis de diversas proteínas de matriz extracelular que han sido empleadas como moléculas potencialmente terapéuticas en modelos animales de:

20 a) enfermedades autoinmunes, como la AR en la que se han evaluado péptidos sintéticos de fibronectina para inhibir o interrumpir la infiltración de células inflamatorias a la cavidad articular (Hines KL, 1994; Wahl SM, 1994), o bien la trombospondina-1 (TSP-1) y la
25 angiostatina (fragmentos de plasminógeno) como una estrategia para inhibir la angiogénesis (Yin G, 2002; Jou I-M, 2005).

b) Supresión o inhibición del crecimiento tumoral y la metástasis, tal es el caso de la endostatina (fragmentos
30 de colágena XVIII)-angiostatina y el Tie-2 soluble que incrementa la supresión del crecimiento tumoral prostático y del melanoma (Scappaticci FA, 2001; Raikwar SP, 2005) o los complejos de endostatina con ADN dentro de liposomas catiónicos para prevenir la metástasis del
35 osteosarcoma (Peterszegi G, 1998; Pasco S, 2003; Honerbeck W, 2003; Maquart FX, 2004; Bellon F, 2004; Duca L, 2004;

Pasco S, 2004; Maquart FX, 2005).

Concluyendo, la colágena polimerizada tipo I induce la regulación negativa de la expresión de algunas citocinas pro-inflamatorias, estimula la producción de citocinas anti-inflamatorias y la expresión de Foxp3 en células T reguladoras, favoreciendo los mecanismos de modulación negativa de la inflamación.

Modelo de inflamación autoinmune (AR). Evaluación del efecto regulador de la inflamación, inductor de la tolerancia inmunológica y del mecanismo de acción de la colágena polimerizada tipo I en un modelo murino de artritis inducida por colágena (CIA)

El objetivo del estudio consistió en evaluar si la aplicación intramuscular de la colágena polimerizada tipo I o la colágena polimerizada tipo I combinada con metotrexato (MTX) era capaz de prevenir el establecimiento, o la progresión de la artritis inducida por inyección de colágena en roedores (CIA). El efecto se determinó a nivel clínico, histológico y molecular comparando los resultados con el tratamiento estándar de oro: el MTX.

Para ello se llevaron a cabo 3 modelos:

Modelo de Toxicidad. Veintiún ratones macho de la cepa DBA1/OlaHsd de 8 semanas de edad se trataron con 100 μ l de (a) placebo (amortiguador de citratos), (b) colágena tipo I polimerizada, (c) MTX (2.5mg/kg), (d) colágena polimerizada tipo I (b) con MTX (c) (vol:vol), por semana durante seis semanas. Tres animales fueron sacrificados en la semana sexta y tres en la décimo tercera semana. Se obtuvieron el bazo, los ganglios, el tejido articular, hígado, pulmones, riñones y corazón con el fin de valorar el infiltrado inflamatorio, las poblaciones celulares predominantes y la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias.

Modelo Artritis Temprana. Cincuenta ratones con las mismas características fueron inmunizados en la base de la cola con 100 μ g de colágena tipo II de pollo emulsificada en adyuvante

completo de Freund. El refuerzo se aplicó en el día 21 en la base de la cola con 100 µg de colágena tipo II emulsificada con el adyuvante incompleto de Freund. El mismo día del refuerzo se aplicaron vía intramuscular, los
5 tratamientos (a-d) cada semana durante seis semanas. Tres animales fueron sacrificados en la semana sexta y tres en la décimo tercera semana. Se obtuvieron el bazo, los ganglios, el tejido articular, hígado, pulmones, riñones y corazón con el fin de valorar el infiltrado inflamatorio,
10 las poblaciones celulares predominantes y la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias.

Modelo Artritis Establecida. Se indujo la artritis como en el modelo anterior en 50 ratones y los tratamientos se aplicaron vía intramuscular, después de 2 semanas del
15 refuerzo, cada semana durante 6 semanas. Tres animales fueron sacrificados en la semana octava y tres en la décimo quinta semana. Se obtuvieron el bazo, los ganglios, el tejido articular, hígado, pulmones, riñones y corazón con el fin de valorar el infiltrado inflamatorio, las
20 poblaciones celulares predominantes y la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias.

Evaluación histológica. El infiltrado inflamatorio y la arquitectura tisular se evaluó por H&E y tinción tricrómica de Massón y el contenido de proteoglicanos, con la técnica
25 de PAS.

Evaluación citométrica. Mediante FACS se determinó el porcentaje de las poblaciones de células Th1 (CD4⁺/IFN-γ⁺), Th2 (CD4⁺/IL-4⁺), Treg (CD4⁺/FOXP3⁺) Th17 (CD4⁺/IL-17⁺) y células dendríticas (CD4⁻/CD11c⁺) en las células del bazo.

30 *Efecto de la colágena polimerizada tipo I y la mezcla de colágena polimerizada tipo I con metotrexato (MTX) en el modelo de toxicidad.*

Ninguno de los tratamientos evaluados en el estudio produjo toxicidad en los ratones. Se evaluó mediante análisis
35 macroscópico e histopatológico de riñones, corazón, pulmones, bazo, ganglios linfáticos y patas traseras. Todos

los tejidos analizados tenían una arquitectura normal. No se observaron infiltrados inflamatorios u otras anormalidades.

Análisis histopatológico del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana (preventivo) y de larga evolución (tardío o paliativo).

El análisis histopatológico se realizó en las patas traseras de ratones con CIA, por dos investigadores de forma cegada. Las imágenes representativas de secciones de tejido articular teñidas con H&E y PAS de los grupos con CIA, tratados con (a) placebo, (b) la colágena tipo I polimerizada, (c) MTX se presentan en la Figura 9. Los ratones con CIA mostraron artritis típica, que es caracterizada por una infiltración extensa de células inflamatorias, hiperplasia sinovial, pérdida del espacio articular y erosión ósea. El tratamiento con la colágena polimerizada tipo I disminuyó el grado de inflamación y preservó la estructura articular. Mientras que el tratamiento con la colágena atelopectídica tipo I polimerizada/MTX resultó en una reducción significativa de los infiltrados inflamatorios y la recuperación de la arquitectura tisular. El MTX indujo algunas anormalidades tisulares, como la presencia de nódulos (tejido de fibrina amorfa) y un tejido de reparación de la lesión de baja calidad, así como infiltrados inflamatorios. El efecto de las diferentes condiciones se mantuvo hasta el segundo sacrificio (Fig. 10).

Figura 9. Efecto paliativo de la colágena polimerizada tipo I en el daño histológico en ratones con CIA. Tinción de hematoxilina y Eosina y PAS. (A) Sección representativa del primer sacrificio. (B) Sección representativa del segundo sacrificio. La magnificación o amplificación de las histologías corresponde a 100X.

Efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana (preventivo) y de larga evolución (tardío

o paliativo) en el porcentaje de subpoblaciones de células T CD4+ del bazo.

El porcentaje de células Th17 del bazo en los ratones sin CIA (controles) fue de ~1.3%, mientras que en los ratones con CIA en el modelo de artritis temprana fue de 2.5% y 4.3%, para el primero y segundo sacrificio, respectivamente (Fig. 10A y B) y de 2.4% y 3.6%, para el primer y segundo sacrificio, respectivamente en el modelo de artritis de larga evolución (Fig. 10C y D).

La colágena polimerizada tipo I (b), el MTX (c) y la combinación de ambos (d), produjeron una reducción sostenida y estadísticamente significativa, que mantuvo los niveles de células pro-inflamatorias, Th17, en intervalos considerados como normales, tanto en el modelo de artritis temprana durante el primer y segundo sacrificio (1.0-1.4% y 0.9-1.35%, respectivamente, Fig. 10A y B), como en el modelo de artritis de larga evolución durante el primer y segundo sacrificio (0.5-0.45% y 0.9-1.45%, respectivamente, Fig. 10C y D).

El número de células Th2 circulantes se modificó únicamente durante el primer sacrificio con el tratamiento de colágena polimerizada tipo I **(b)** en el modelo de artritis temprana (Fig. 10D).

Cabe destacar que el tratamiento de la artritis temprana y de larga evolución con la colágena polimerizada tipo I (b) y la mezcla combinada con MTX (d) indujo el incremento de células T reguladoras Foxp3+ a niveles estadísticamente significativos comparados con los de los ratones con artritis tratados con el (a) placebo o vehículo, y mayores que los ratones sanos tanto en el primer como en el segundo sacrificio (Fig. 10A, B, C y D). Mientras que el (c) MTX indujo una reducción significativa en el porcentaje de estas células en ambos modelos.

Con respecto a las células reguladoras, antes conocidas como células T supresoras (5% a 15% de las células T CD4+ periféricas y tisulares en individuos sanos), éstas ejercen

inmunosupresión extrínseca celular y tolerancia a antígenos propios y extraños. Las Tregs modulan el curso natural de las respuestas inmunes, protegiendo a los tejidos de la inflamación al limitar el daño y evitar la autoinmunidad.

5 Suprimen las respuestas inmunológicas al producir granzimas y perforinas, agotando IL-2, secretando moléculas supresoras como IL-19 y TGF- β 1 y disminuyendo las funciones de las células presentadoras de antígeno (APC), además promueven la anergia o apoptosis de las células T efectoras. Como tal,

10 las Tregs juegan un papel importante en la reparación de los tejidos y la homeostasis.

Figura 10. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana (preventivo) y de larga

15 evolución (tardío o paliativo) en el porcentaje de subpoblaciones de células T CD4⁺ del bazo. (A) Células del bazo obtenidas ex vivo en el modelo de artritis temprana durante el primer sacrificio. (B) Células del bazo obtenidas ex vivo en el modelo de artritis temprana durante el segundo

20 sacrificio. (C) Células de bazo obtenidas ex vivo en el modelo de artritis de larga evolución durante el primer sacrificio. (D) Células del bazo obtenidas ex vivo en el modelo de artritis de larga evolución durante el segundo sacrificio. La producción intracelular de IL-17A, IL-4, IFN- γ y Foxp3 por las células T CD4⁺ se detectó por citometría de flujo. Los resultados son representativos de 6 ratones

25 analizados en cada grupo. La línea punteada horizontal representa los valores normales promedio obtenidos de ratones sin CIA (n = 3). Los datos representan el promedio

30 $\pm$ ESM. *p < 0.05.

Efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana (preventivo) y de larga evolución (tardío o paliativo) en el porcentaje de células dendríticas CD4⁻/CD11c⁺ del bazo.

35 Las células CD11c son células dendríticas que unen la respuesta inmune innata con la adaptativa, a través del

reclutamiento de células efectoras inmunes como las células NK, NKT (células T asesinas naturales) y los neutrófilos. Además, las células dendríticas tienen como principal función la de presentar antígenos y dirigir la respuesta inmune. En el modelo de artritis temprana, las células CD11c se presentaron en un porcentaje menor y estadísticamente significativo en los tres tratamientos con respecto al control durante el segundo sacrificio (Figura 11A). Mientras que en el modelo de artritis establecida, las células CD11c se presentaron en un porcentaje menor y estadísticamente significativo en los tres tratamientos con respecto al control, tanto en el primero como en el segundo sacrificio (Figura 11C,D).

Figura 12. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana (preventivo) y de larga evolución (tardío o paliativo) en el porcentaje de células CD11c⁺ del bazo. (A) Células del bazo obtenidas ex vivo en el modelo de artritis temprana durante el primer sacrificio. (B) Células del bazo obtenidas ex vivo en el modelo de artritis temprana durante el segundo sacrificio. (C) Células de bazo obtenidas ex vivo en el modelo de artritis de larga evolución durante el primer sacrificio. (D) Células del bazo obtenidas ex vivo en el modelo de artritis de larga evolución durante el segundo sacrificio. La expresión del CD11c se detectó por citometría de flujo. Los resultados son representativos de 6 ratones analizados en cada grupo. La línea punteada horizontal representa los valores normales promedio obtenidos de ratones sin CIA (n = 3). Los datos representan el promedio $\pm$ ESM. *p < 0.05

Efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana (preventivo) y de larga evolución (tardío o paliativo) sobre el factor de transcripción NF- κ B.

Inferimos que el mecanismo de acción de la colágena polimerizada tipo I podría estar dado a través de la regulación del factor de transcripción NF- κ B y AP-1. En

particular, NF- κ B regula la expresión de enzimas proinflamatorias, citocinas, quimiocinas, inmunorreceptores y moléculas de adhesión celular, así como la apoptosis. A la luz de este conocimiento, se analizaron la expresión de NF- κ Bp65 y de su inhibidor I κ B α en esplenocitos ex vivo (Fig. 12).

En los ratones con CIA, el porcentaje de esplenocitos NF- κ B+ e I κ B α + fue mayor, mientras que el de NF- κ B+/I κ B α + fue menor con respecto a los ratones sin CIA y a los tratamientos administrados, especialmente el de la colágena polimerizada tipo I o la mezcla combinada con MTX tanto en el modelo de artritis temprana como en el de larga evolución (Fig. 12). El porcentaje de los complejos de NF- κ B+ con su inhibidor I κ B α + se incrementan a un nivel estadísticamente significativo en aquellos grupos de ratones con artritis temprana y de larga evolución bajo los tratamientos con colágena polimerizada tipo I (tratamiento b) y MTX con colágena polimerizada tipo I (tratamiento d), lo que sugiere una regulación negativa del factor de transcripción y en consecuencia de la inflamación.

Figura 12. Efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana (preventivo) y de larga evolución (tardío o paliativo) en la expresión de NF- κ B e I κ B- α ex vivo en los esplenocitos. (A) Células de bazo de ratones del modelo de artritis temprana durante el primer sacrificio. (B) Esplenocitos obtenidos inmediatamente después del segundo sacrificio. (C) Células de bazo de ratones del modelo de artritis de larga evolución durante el primer sacrificio. (D) Esplenocitos obtenidos inmediatamente después del segundo sacrificio. Los niveles intracelulares de las células NF- κ Bp65 e I κ B α se detectaron por citometría de flujo. Los resultados son representativos de 6 ratones analizados en cada grupo. La línea punteada horizontal representa los valores normales promedio obtenidos de ratones (n = 3) sin CIA. Los datos representan

la media $\pm$ SEM. * $p < 0.05$.

Efectos adversos.

- No hubo evidencia de eventos adversos después de la inyección de placebo o los diferentes tratamientos a lo
- 5 largo del estudio. El único evento adverso observado fue dolor que duró menos de 15 minutos en el sitio de inyección. Concluyendo, con el modelo de toxicidad se pudo comprobar que no hubo daño a los órganos analizados, ni toxicidad alguna con ninguna de las condiciones evaluadas.
- 10 En el estudio se demostró que tanto la (b) colágena tipo I polimerizada, como monoterapia, así como la combinación de la (d) colágena tipo I polimerizada con MTX exhiben efectos tanto preventivos como paliativos en el modelo de CIA, a través de la regulación negativa de la presentación
- 15 antigénica (disminución de la población CD11c⁺), de la subpoblación de células Th17 (1.5-2.0X y 3.0-4.0X, respectivamente) y la regulación positiva de células Tregs (5.0-6.0X y 5.5-6.0, respectivamente). El mecanismo de acción parece estar directamente relacionado con la
- 20 regulación del factor de transcripción NF- κ B.
- La articulación de los ratones con CIA tratados con la (b) la colágena polimerizada tipo I mantuvo una arquitectura tisular semejante a la normal, sin infiltrados inflamatorios, erosiones óseas o pérdida del espacio
- 25 articular, así como el contenido de proteoglicanos. Los tratamientos a base de colágena polimerizada tipo I fueron seguros y eficaces. No se presentaron efectos adversos.
- En vista de dicho antecedente, es claro que un fármaco capaz de modular a los mediadores solubles pro- y anti-
- 30 inflamatorios, así como el número de células efectoras pro-inflamatorias y de células reguladoras de la inflamación, pueda ser útil para tratar distintos procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos, así como autoinmunes y no autoinmunes, de corta o larga evolución. No obstante, no es
- 35 posible simplemente asumir que el fármaco funciona eficientemente en todos los casos de inflamación, por tanto,

es un objeto de la invención evaluar el efecto clínico e inmunológico de la administración intramuscular de la colágena tipo I polimerizada, en la tormenta de citocinas en pacientes con enfermedad leve a grave y potencialmente
5 semi-crítica por Covid-19.

Es otro objeto de la invención valorar el uso del fármaco de la invención mediante el curso clínico de pacientes diagnosticados con Covid-19.

Es aun otro objeto de la invención evaluar el efecto clínico
10 del uso del fármaco de colágena tipo I polimerizada, administrada por vía intramuscular en pacientes diagnosticados con infección por Covid-19 de leve a semi-crítica.

Es otro objeto de la invención proponer un esquema
15 terapéutico del fármaco de colágena tipo I polimerizada, administrada por vía intramuscular en pacientes diagnosticados con infección por Covid-19 de leve a moderada (Tabla 1; criterios del 1-4).

Es otro objeto de la invención proponer un esquema
20 terapéutico del fármaco de colágena tipo I polimerizada, administrada por vía intramuscular en pacientes diagnosticados con infección por Covid-19 de grave a semi-crítica (Figura 1, Tabla 1; criterios del 5-6).

Es otro objeto de la invención demostrar que la colágena-
25 PVP es un fármaco que tiene un efecto regulador de la tormenta de citocinas tanto en estadios tempranos como tardíos de la infección provocada por SARS-CoV2 (COVID-19). Otro objeto de la invención es fundar experimentalmente y demostrar que la colágena-PVP es un fármaco que pueda usarse
30 en el proceso hiperinflamatorio observado en la infección provocada por el virus SARS-CoV2 (Covid-19) con efectos francamente positivos y muy importante, sin efectos colaterales indeseables como se ha demostrado desde hace más de veinte años.

35 Un objeto adicional de la invención es evaluar a nivel inmunológico, el efecto de la administración intramuscular

de la colágena tipo I polimerizada en pacientes con enfermedad moderada a grave por SARS-CoV2 (Covid-19).

Demostrar que la colágena tipo I polimerizada administrada por la vía intramuscular modifica la fibrosis post-neumonía por SARS-CoV2 (Covid-19), evitando que el paciente desarrolle las secuelas fibróticas, sin producir efectos adversos (basados en los resultados de las investigaciones previas).

Cabe mencionar que la colágena tipo I polimerizada ha sido desarrollada en México por investigadores mexicanos y su estudio ha sido avalado y apoyado por el CONACyT en diversas ocasiones (CONACyT SALUD 2002-01-7421; CONACyT SALUD 2003-C01- 127/B1; CONACyT SALUD 2004-C01-65; INNOVAPYME C0003 2012-01), por lo cual, tiene como sustento diversos estudios que son relevantes para la presente crisis de salud en México y el mundo.

Breve Descripción de la Invención

El uso del fármaco de la invención, es decir, el uso de colágena polivinilpirrolidona (colágena-PVP) fue administrado por la vía intramuscular, debido a su efecto sistémico, ya que podría regular negativamente la expresión de citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión leucocitaria, e incrementar tanto la IL-10, como el número de células T reguladoras, lo que puede derivar en importantes beneficios para el tratamiento de la fase hiperinflamatoria que presentan los pacientes con SARS-CoV2 (Covid-19).

Si este fármaco es administrado por la vía intramuscular podría modificar la fibrosis post-neumonía por SARS-CoV2 (Covid-19), al prevenir el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, evitando de esta forma que el paciente desarrolle las secuelas fibróticas, sin producir efectos adversos (basados en los resultados de las investigaciones previas).

Lo anterior se evaluó como tratamiento coadyuvante en un

ensayo piloto de dos brazos, uno con administración intramuscular de 1.5 ml del principio activo y otro con 1.5 ml vehículo, durante 3 días cada 12 horas y durante 4 días cada 24 horas para hacer un total de 7 días de tratamiento con una dosis total de 15 ml de Colágena-PVP en pacientes con neumonía leve a moderada por Covid-19 (Tabla 1; categoría 1 a 4). La mejoría clínica, los cambios en los niveles de la inflamación sistémica y mediadores solubles proinflamatorios, así como la fibrosis se evaluaron a los 7 y 14 días postratamiento. Asimismo, también se evaluó el efecto de la administración intramuscular de 1.5 ml del principio activo, durante 7 días cada 12 horas para hacer un total de 21 ml de Colágena-PVP en pacientes con neumonía grave a semi-crítica por Covid-19 (Tabla 1; categoría 5 a 6).

Clasificación de la gravedad de la neumonía por Covid-19

Categoría de gravedad	Descripción
1	No hospitalizado, sin limitación de actividades
2	No hospitalizado, pero con limitación de actividades y/o requerimiento de oxígeno suplementario
3	Hospitalizado, pero sin requerimiento de oxígeno suplementario ni de atención médica continua (permanece hospitalizado para aislamiento)
4	Hospitalizado, sin requerimiento de oxígeno suplementario, pero requiere de atención médica continua
5	Hospitalizado, requiere oxígeno suplementario
6	Hospitalizado, requiere ventilación mecánica no invasiva o puntas de alto flujo
7	Hospitalizado, requiere VMI o ECMO
8	Muerte

Beigel JH, 2020

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una Tabla con Datos Demográficos y Clínicos en AR y OA.

5 La Figura 2 es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión de TNF- α .

La Figura 3 es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión de IL-1 β en los sobrenadantes de los co-cultivos de cartílago y sinovia de
10 pacientes con artritis reumatoide (AR) u osteoartritis (OA).

La Figura 4 es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión de TNF- α en los sobrenadantes de los co-cultivos de cartílago y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) u
15 osteoartritis (OA).

La Figura 5 es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión de IL-8 en los sobrenadantes de los co-cultivos de cartílago y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) u
20 osteoartritis (OA).

La Figura 6 es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión de IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos de cartílago y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) u
25 osteoartritis (OA).

La Figura 7 es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión génica de citocinas y factores pro- y anti-inflamatorios en los tejidos de los co-cultivos de cartílago y tejido sinovial de pacientes con
30 artritis reumatoide (AR).

La Figura 8A es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en la expresión génica de citocinas y factores pro- y anti-inflamatorios en los tejidos de los co-cultivos de cartílago y sinovia de pacientes con
35 Osteoartritis (OA).

La Figura 8B es una gráfica del efecto de la colágena

polimerizada tipo I en la expresión génica de citocinas y Foxp3 en OA.

La Figura 9 es un cuadro del efecto paliativo de la colágena polimerizada tipo I en el daño histológico en ratones con CIA. Tinción de hematoxilina y Eosina y PAS. (A) Sección
5 representativa del primer sacrificio. (B) Sección representativa del segundo sacrificio. La magnificación o amplificación de las histologías corresponde a 100X.

La Figura 10A y 10 B es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana
10 (preventivo) en el porcentaje de subpoblaciones de células T CD4+ del bazo, en un primer y en un segundo sacrificio (7 y 56 días) post-Tx, respectivamente.

La Figura 10C y 10D es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis de larga
15 evolución (tardío o paliativo) en el porcentaje de subpoblaciones de células T CD4+ del bazo, en un primer y en un segundo sacrificio (7 y 35 días) post-Tx, respectivamente.

La Figura 11A es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de CIA temprana FACS de
20 células dendríticas y Linfocitos esplénicos en un primer sacrificio a los 7 días post-Tx.

La Figura 11B es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de CIA temprana FACS de
25 células dendríticas y Linfocitos esplénicos en un segundo sacrificio a los 56 días post-Tx.

La Figura 11C es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de CIA avanzada FACS de
30 células dendríticas y Linfocitos esplénicos en un primer sacrificio a los 7 días post-Tx.

La Figura 11D es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de CIA avanzada FACS de
35 células dendríticas y Linfocitos esplénicos en un segundo sacrificio a los 35 días post-Tx.

La Figura 12A es una gráfica del efecto de la colágena

polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana (preventivo) en un primer sacrificio a los 7 días post-Tx.

La Figura 12B es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de artritis temprana (preventivo) en un segundo sacrificio a los 56 días post-Tx.

Figura 12C es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de larga evolución (modelo paliativo) en el porcentaje de células CD11c+ del bazo en un primer sacrificio a los 7 días post-Tx.

La Figura 12D es una gráfica del efecto de la colágena polimerizada tipo I en el modelo de larga evolución (modelo paliativo) en el porcentaje de células CD11c+ del bazo en un segundo sacrificio a los 35 días post-Tx.

LA Figura 13 es una representación gráfica de la evaluación sintomatológica de una paciente de 60 años con obesidad, fumadora pasiva y diagnosticada con COVID-19 (RT-PCR+), con una gravedad de la enfermedad nivel 4-5 durante el tratamiento usando colágena polimerizada tipo I en función del tiempo.

La Figura 14 es una representación gráfica de la evaluación de una paciente de 55 años, con hipertensión y obesidad, con COVID-19 (RT-PCR+), con una gravedad de la enfermedad nivel 4-5 durante el tratamiento mediante el uso con colágena polimerizada tipo I.

La Figura 15 es una representación gráfica de la evaluación de un paciente de 52 años, con obesidad y diagnosticado con COVID-19 (RT-PCR+), con una gravedad de la enfermedad nivel 4-5 durante el tratamiento con colágena polimerizada tipo I.

La Figura 16 es una representación gráfica de la evaluación de un paciente de 60 años, sin comorbilidades, fumador activo y diagnosticado con COVID-19 (RT-PCR+), con una gravedad de la enfermedad nivel 4-5 durante el tratamiento usando colágena polimerizada tipo I.

La Figura 17 es una representación gráfica de la evaluación

de una paciente de 56 años, con diabetes e hipertensión y diagnosticada con COVID-19 (RT-PCR+), con una gravedad de la enfermedad nivel 4 durante el tratamiento mediante el uso de colágena polimerizada tipo I.

- 5 La Figura 18 es una representación gráfica de la evaluación del comportamiento sintomatológico grupal de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento (7 días) y postratamiento (7 días) con colágena polimerizada tipo I. La Figura 19 es una representación gráfica de la evaluación del comportamiento sintomatológico grupal de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento (7 días) y postratamiento (7 días) con colágena polimerizada tipo I.
- 10 La Figura 20 es una mujer de 51 años con sobrepeso, sin morbilidades y diagnosticada con COVID-19 (RT-PCR+), con una gravedad de la enfermedad nivel 4 durante el tratamiento mediante el uso de colágena polimerizada tipo I.
- 15 La Figura 21 es una representación gráfica de la evaluación de un paciente masculino de 51 años, sin morbilidades adicionales, diagnosticado con COVID-19 (RT-PCR+), durante el tratamiento mediante el uso de colágena polimerizada tipo I.
- 20 I.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- La presente invención se refiere al uso intramuscular de colágena polimerizada tipo I para modificar la fibrosis post-neumonía por Covid-19, al prevenir el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, evitando de esta forma que el paciente desarrolle las secuelas fibróticas, sin producir efectos adversos.
- 25 El uso de colágena polimerizada tipo I se evaluó como tratamiento coadyuvante en un ensayo piloto de dos brazos, uno con administración intramuscular de 1.5 ml del principio activo y otro con 1.5 ml vehículo, durante 3 días cada 12 horas y durante 4 días cada 24 horas para hacer un total de 7 días de tratamiento con una dosis total de 15 ml de Colágena-PVP en pacientes con neumonía leve a moderada por
- 35

Covid-19 (Tabla 1; categorías 1 a 4).

En una segunda modalidad de la invención se usa 1.5 ml del principio activo y otro con 1.5 ml vehículo, durante 7 días cada 12 horas para hacer un total de 21 ml de Colágena-PVP en pacientes con neumonía grave a semi-crítica por Covid-19 (Tabla 1; categoría 5 a 6).

La mejoría clínica, los cambios en los niveles de la inflamación sistémica y mediadores solubles proinflamatorios, así como la fibrosis se evaluaron a los 7 y 14 días postratamiento.

El uso intramuscular de colágena polimerizada por vía intramuscular cada 12 h durante 3 días y después cada 24 h durante 4 días en pacientes con enfermedad leve a grave por Covid-19 o cada 12 h durante 7 días en pacientes con enfermedad grave a semi-crítica por Covid-19 se funda en el esquema de tratamiento propuesto para la artritis reumatoide activa; (Furuzawa-Carballeda J, 2006).

En todos los casos se registró una mejoría clínica. La mejoría clínica se reportó individualmente (Figuras 13 a 17) y de manera grupal (Figuras 18 a 19), tomando en cuenta los siguientes parámetros: porcentaje de SpO2, temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, intervalos de tos, dolor torácico, cefalea, disnea, odinofagia, anosmia, la pérdida del sentido del gusto, la presencia artralgiyas y mialgias.

Descripción de los Síntomas antes, durante y después del tratamiento

La sintomatología fue de presentación variable en cuanto a intensidad y frecuencia (Figuras 13-17). Al momento del diagnóstico, todos los pacientes presentaron desaturación, cefalea y alteraciones de la frecuencia respiratoria, el 80% presentaron fiebre, alteraciones en la frecuencia cardíaca, tos, disnea, odinofagia, alteraciones en el sentido del gusto, artralgiyas y mialgias. Únicamente el 40% de los pacientes manifestaron anosmia. Ninguno de los pacientes

refirió dolor torácico.

Los cambios en los niveles de la inflamación sistémica y mediadores solubles proinflamatorios, así como la fibrosis se evaluaron a los 7 y 14 días postratamiento para determinar el nivel de mejoría.

Ejemplos de pacientes con enfermedad de leve a moderada A 5 pacientes (3 mujeres), con una edad promedio de 56.0 ± 3.4 (intervalo: 52-60), con enfermedad leve-moderada, con síntomas, sin y con requerimiento de oxígeno para mantener la $SpO_2 > 92\%$, con datos radiográficos o tomográficos de infiltrados pulmonares, se registraron las principales comorbilidades que representan factores de riesgo para enfermedad más grave (Figuras 13-17) y mediante el uso de colágena-PVP intramuscular se determinó su evolución clínica.

Medicación concomitante

El tratamiento se estandarizó para todos los pacientes con azitromicina 500 mg/24 h; oseltamivir 75 mg/12 h; enoxaparina 40 mg/24 h; adimod 800 mg/12 h; paracetamol 1 gr/8 h; moxifloxacino 400 mg/24 h.

Administración de la colágena polimerizada tipo I

Descripción de los Síntomas antes, durante y después del tratamiento

La sintomatología fue de presentación variable en cuanto a intensidad y frecuencia (Figuras 13-17). Al momento del diagnóstico, todos los pacientes presentaron desaturación, cefalea y alteraciones de la frecuencia respiratoria, el 80% presentaron fiebre, alteraciones en la frecuencia cardíaca, tos, disnea, odinofagia, alteraciones en el sentido del gusto, artralgias y mialgias. Únicamente el 40% de los pacientes manifestaron anosmia. Ninguno de los pacientes refirió dolor torácico.

A excepción de un paciente, que inició el tratamiento con colágena polimerizada tipo I al día 5 posterior al

diagnóstico de COVID-19, en los restantes se inició el mismo día del diagnóstico.

En todos los casos tratados con la colágena polimerizada tipo I, a los 7 días se determinó un aumento en la SpO₂ (89 al 93%), la desaparición de la fiebre, las alteraciones en la frecuencia cardíaca y en la odinofagia. El 20% de los pacientes persistió con alteraciones de la frecuencia respiratoria, cefalea, anosmia y artralgias. En el 40% de los pacientes persistió la tos, mialgias y pérdida del sentido del gusto. El 60% de los pacientes persistió con disnea (Figuras 13-17).

Al día 14, es decir 7 días postratamiento con la colágena polimerizada tipo I, se determinó un aumento en la pSO₂ (90 al 94%), y en un 20% de los pacientes se presentaron alteraciones leves de la frecuencia cardíaca, tos y pérdida del sentido del gusto. Los demás síntomas desaparecieron (Figuras 13-17).

Figura 13. Evaluación sintomatológica de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento usando colágena polimerizada tipo I. A) La figura y tabla pertenece a una paciente de 60 años diagnosticada con COVID-19 (RT-PCR+), fumadora pasiva con obesidad y una gravedad de la enfermedad nivel 4-5. Los síntomas tales como B) pSO₂, C) temperatura, D) frecuencia cardíaca, E) frecuencia respiratoria, F) tos productiva o no productiva, G) dolor torácico, H) cefalea, I) disnea, J) odinofagia, K) anosmia, L) pérdida del sentido del gusto, M) artralgias y N) mialgias, son reportados durante 14 días posteriores al inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I. La fecha del diagnóstico fue el 29/04/2020 y el inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I fue el 09/05/2020.

Figura 14. Evaluación sintomatológica de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento mediante el uso con colágena polimerizada tipo I. A) La figura y tabla pertenece a una

paciente de 55 años diagnosticada con COVID-19 (RT-PCR+), con hipertensión y obesidad, y una gravedad de la enfermedad nivel 4-5. Los síntomas tales como B) pSO₂, C) temperatura, D) frecuencia cardíaca, E) frecuencia respiratoria, F) tos productiva o no productiva, G) dolor torácico, H) cefalea, I) disnea, J) odinofagia, K) anosmia, L) pérdida del sentido del gusto, M) artralgias y N) mialgias, son reportados durante 14 días posteriores al inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I. La fecha del diagnóstico fue el 04/04/2020 y el inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I fue el 04/05/2020.

Figura 15. Evaluación sintomatológica de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento con colágena polimerizada tipo I. A) La figura y tabla pertenece a un paciente de 52 años diagnosticado con COVID-19 (RT-PCR+), con obesidad, y una gravedad de la enfermedad nivel 4-5. Los síntomas tales como B) pSO₂, C) temperatura, D) frecuencia cardíaca, E) frecuencia respiratoria, F) tos productiva o no productiva, G) dolor torácico, H) cefalea, I) disnea, J) odinofagia, K) anosmia, L) pérdida del sentido del gusto, M) artralgias y N) mialgias, son reportados durante 14 días posteriores al inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I. La fecha del diagnóstico fue el 10/02/2020 y el inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I fue el 11/05/2020.

Figura 16. Evaluación sintomatológica de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento con colágena polimerizada tipo I. A) La figura y tabla pertenece a un paciente masculino, de 60 años diagnosticado con COVID-19 (RT-PCR+), fumador activo sin comorbilidades, y una gravedad de la enfermedad nivel 4-5. Los síntomas tales como B) pSO₂, C) temperatura, D) frecuencia cardíaca, E) frecuencia respiratoria, F) tos productiva o no productiva, G) dolor torácico, H) cefalea, I) disnea, J) odinofagia, K) anosmia,

L) pérdida del sentido del gusto, M) artralgias y N) mialgias, son reportados durante 14 días posteriores al inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I. La fecha del diagnóstico fue el 10/05/2020 y el inicio del
5 tratamiento con colágena polimerizada tipo I fue el 10/05/2020.

Figura 17.

10 Evaluación sintomatológica de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento mediante el uso de colágena polimerizada tipo I. **A)** La figura y tabla pertenece a una paciente de 60 años diagnosticada con COVID-19 (RT-PCR+), con diabetes e hipertensión, y una gravedad de la enfermedad
15 nivel 4. Los síntomas tales como **B)** pSO₂, C) temperatura, D) frecuencia cardiaca, E) frecuencia respiratoria, F) tos productiva o no productiva, G) dolor torácico, H) cefalea, I) disnea, J) odinofagia, K) anosmia, L) pérdida del sentido del gusto, M) artralgias y N) mialgias, son reportados
20 durante 14 días posteriores al inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I. La fecha del diagnóstico fue el 09/05/2020 y el inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I fue el 11/05/2020.

25 *Efectos adversos*

No se detectaron efectos adversos, a excepción de dolor en el sitio de la aplicación, el cual persistió por 5-15 minutos.

30 Conforme a todos los Ejemplos anteriores, el uso de colágena polimerizada tipo I o colágena-PVP como coadyuvante terapéutico en la hiperinflamación y la tormenta de citocinas provocada por el COVID-19 en el grupo de pacientes analizados demostró que al final del tratamiento y durante
35 el seguimiento de 7 días, los pacientes presentaron un aumento en la SpO₂ y ninguno requirió de oxígeno para

mantener la saturación >90% (Figura 18). Ninguno de los pacientes presentó el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, ni requirió de hospitalización. Ningún paciente murió. Lo anterior sugiere que la colágena polimerizada tipo I ejerce un potente efecto regulador de la inflamación a nivel sistémico. No se determinaron complicaciones relacionadas con la infección por SARS-CoV2, ni debido al uso de la colágena-PVP. En todos los pacientes desapareció la disnea, la cefalea y se normalizó la frecuencia respiratoria y la temperatura (Figuras 18 y 19). Asimismo, desaparecieron la odinofagia, la anosmia, las artralgiyas y las mialgias (Figura 19), todo lo anterior sin producir efectos adversos, a excepción del dolor en el sitio de la aplicación.

15

Figura 18. Comportamiento sintomatológico grupal de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento (7 días) y postratamiento (7 días) con colágena polimerizada tipo I. A) pSO₂, B) Temperatura, C) Frecuencia cardíaca, D) Frecuencia respiratoria, E) Disnea, F) Cefalea. La intensidad se reporta como Ninguna = 0, Leve, tolerable = 1, Moderada, molesta = 2 y Grave, inhabilitante = 3. Los datos representan el promedio $\pm$ el error estándar de los pacientes tratados (n=5).

25

Figura 19. Comportamiento sintomatológico grupal de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento (7 días) y postratamiento (7 días) con colágena polimerizada tipo I. A) Tos, B) Odinofagia, C) Pérdida del gusto, D) Anosmia, E) Artralgiyas, F) Mialgias. La intensidad se reporta como Ninguna = 0, Leve, tolerable = 1, Moderada, molesta = 2 y Grave, inhabilitante = 3. Los datos representan el promedio $\pm$ el error estándar de los pacientes tratados (n=5).

35

Ejemplos de pacientes con enfermedad de grave a semi-crítica

En 2 pacientes (1 mujer), con una edad promedio de 51.0 ± 0.0 , con enfermedad grave-semicrítica, con síntomas, con requerimiento de oxígeno para mantener la $SpO_2 > 92\%$, con datos radiográficos de infiltrados en ambos pulmones, se registraron las principales comorbilidades que representan factores de riesgo para enfermedad más grave (Figuras 20 y 21) y mediante el uso de 1.5 ml de colágena-PVP intramuscular cada 12 h durante 7 días, se determinó su evolución clínica.

10 *Medicación concomitante*

El tratamiento se estandarizó con azitromicina 500 mg/24 h por 6 días; ivermectina 12 mg cada 24 h por 2 días.

15 *Descripción de los Síntomas antes, durante y después del tratamiento*

La sintomatología fue de presentación variable en cuanto a intensidad y frecuencia (Figuras 20 y 21). Al momento del diagnóstico, los pacientes presentaron desaturación, alteraciones de la frecuencia respiratoria, fiebre, alteraciones en la frecuencia cardíaca, disnea, alteraciones en el sentido del gusto y artralgias.

Los pacientes iniciaron tardíamente el tratamiento con colágena polimerizada tipo I (entre 10 y 15 días después del inicio de los síntomas).

25 En ambos casos tratados con la colágena polimerizada tipo I, a los 7 días se determinó un aumento en la SpO_2 (entre el 91 y 94%), la desaparición de la fiebre, las alteraciones en la frecuencia cardíaca, en la frecuencia respiratoria, la cefalea y las artralgias.

30 *Efectos adversos*

No se detectaron efectos adversos, a excepción de dolor en el sitio de la aplicación, el cual persistió por 5-15 minutos.

35 *Figura 20. Evaluación sintomatológica de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento mediante el uso de colágena*

polimerizada tipo I. A) La figura y tabla pertenece a una paciente de 51 años diagnosticada con COVID-19 (RT-PCR+), con sobrepeso, fumadora activa y una gravedad de la enfermedad nivel 6. Los síntomas tales como B) pSO_2 , C) temperatura, D) frecuencia cardiaca, E) frecuencia respiratoria, F) tos productiva o no productiva, G) dolor torácico, H) cefalea, I) disnea, J) odinofagia, K) anosmia, L) pérdida del sentido del gusto, M) artralgias y N) mialgias, son reportados durante los 7 días del tratamiento con colágena polimerizada tipo I. La fecha del diagnóstico fue el 18/05/2020 y el inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I fue el 04/06/2020.

Figura 21. Evaluación sintomatológica de los pacientes con COVID-19 durante el tratamiento mediante el uso de colágena polimerizada tipo I. A) La figura y tabla pertenece a un paciente de 51 años diagnosticado con COVID-19 (RT-PCR+), fumador activo y una gravedad de la enfermedad nivel 6. Los síntomas tales como B) pSO_2 , C) temperatura, D) frecuencia cardiaca, E) frecuencia respiratoria, F) tos productiva o no productiva, G) dolor torácico, H) cefalea, I) disnea, J) odinofagia, K) anosmia, L) pérdida del sentido del gusto, M) artralgias y N) mialgias, son reportados durante los 7 días del tratamiento con colágena polimerizada tipo I. La fecha del diagnóstico fue el 23/05/2020 y el inicio del tratamiento con colágena polimerizada tipo I fue el 04/06/2020.

Habiéndose descrito la invención como antecede se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

1. Uso de colágena polimerizada tipo I cada 12 h durante 3 días, luego de los 3 días, cada 24 h durante 4 días para tratar la tormenta de citocinas, la inflamación y fibrosis pulmonar en pacientes infectados por el virus SARS-CoV2 (Covid-19) con enfermedad leve a moderada.

2. Uso de colágena polimerizada tipo I cada 12 h durante 7 días, para tratar la tormenta de citocinas, la inflamación y fibrosis pulmonar en pacientes infectados por el virus SARS-CoV2 (Covid-19) con enfermedad grave a semi-crítica.

3. El uso de colágena polimerizada tipo I de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, en donde la colágena polimerizada tipo I está formulada para ser administrable vía intramuscular.

4. El uso de colágena polimerizada tipo I de conformidad con la reivindicación 1, en donde la colágena polimerizada tipo I está formulada para ser administrable vía intramuscular en una dosis de 1.5 ml del principio activo durante 3 días cada 12 horas y durante 4 días cada 24 horas para hacer un total de 7 días de tratamiento con una dosis total de 15 ml de Colágena-PVP en pacientes con neumonía por Covid-19.

5. El uso de colágena polimerizada tipo I de conformidad con la reivindicación 2, en donde la colágena polimerizada tipo I está formulada para ser administrable vía intramuscular en una dosis de 1.5 ml del principio activo durante 7 días cada 12 con una dosis total de 21 ml de Colágena-PVP en pacientes con neumonía por Covid-19.

6. El uso de colágena polimerizada tipo I de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, para generar cambios en los niveles de la inflamación sistémica y mediadores solubles proinflamatorios, así como la fibrosis que pueden determinarse a los 7 y 14 días postratamiento.

7. El uso de colágena polimerizada tipo I de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, en donde en el

momento del diagnóstico a cada paciente COVID-19 positivo se le evalúo desaturación, cefalea y alteraciones de la frecuencia respiratoria, fiebre, alteraciones en la frecuencia cardíaca, tos, disnea, odinofagia, alteraciones
5 en el sentido del gusto, artralgias y mialgias, anosmia y dolor torácico para determinar mejoría clínica.

8. El uso de colágena polimerizada tipo I de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, en donde en estadios avanzados de la enfermedad por COVID-19 se le
10 evalúo desaturación, cefalea y alteraciones de la frecuencia respiratoria, fiebre, alteraciones en la frecuencia cardíaca, tos, disnea, odinofagia, alteraciones en el sentido del gusto, artralgias y mialgias, anosmia y dolor torácico para determinar mejoría clínica.

15 9. El uso de colágena polimerizada tipo I de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, está formulada para no producir efectos adversos.