

Экспериментальное изучение хронической токсичности пегилированного интерферона лямбда-1

Л.А. Олейник, К.И. Ершов, В.Е. Забанова, Г.И. Байкалов, К.И. Бахарева, М.С. Солдатова, А.О. Кушнарченко, А.А. Муллагалиев, А.Д. Рыбакова

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Интерфероны лямбда (ИФН-λ), известные как интерфероны III типа (ИФН III типа), демонстрируют значительные перспективы в области антивирусной защиты. ИФН-λ схожи в своей антивирусной активности с ИФН I типа, но имеют уникальные механизмы индукции и функционирования благодаря специфичному расположению своих рецепторов. Рецепторы I типа экспрессируются в большинстве клеток с ядром, рецепторы ИФН-λ (IFN-λR1 или IL-28Rα) в основном обнаруживаются в эпителиальных клетках. ИФН-λ позиционируются как первая линия защиты при микробных атаках, поэтому создание лекарственных препаратов (ЛП) на их основе представляется весьма перспективным. Уже создан прототип энтерального ЛП на основе ИФН-λ, пегилированного по технологии электронно-лучевого синтеза.

Ц е л ь . В экспериментах *in vivo* изучить общие токсические свойства ЛП ИФН-λ1 при внутрижелудочном пути введения.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . ЛП ИФН-λ1 вводили ежедневно внутрижелудочно в дозах 2.6, 13.0 и 26.0 мкг/кг (1 терапевтическая доза (ТД), 5 ТД и 10 ТД соответственно) крысам и 2.6 и 13.0 мкг/кг (1 ТД и 5 ТД) кроликам один раз в день в течение 180 дней. Дозы ЛП рассчитывались для каждого животного индивидуально, исходя из массы тела. Наблюдение за кроликами осуществлялось в течение введения ЛП (180 дней), а для крыс – дополнительно в течение 30 дней после окончания введения (210 дней). У животных оценивали показатели витальных функций, поведенческие реакции, лабораторные параметры клеточного и биохимического состава крови, результаты электрокардиографии, показатели гемопоэза, патоморфологические признаки.

Р е з у л ь т а т ы . В ходе исследования не наблюдалось летальных исходов. Животные демонстрировали стабильное состояние здоровья, без видимых изменений в аппетите, внешнем виде и поведении. В ходе патоморфологического анализа не обнаружено аномалий, которые могли бы указывать на негативное воздействие вещества. Выявлено достоверное снижение массы и коэффициента массы тимуса и селезенки у крыс, получавших препарат в дозе 26.0 мкг/кг через 180 дней введения по сравнению с соответствующим контролем. Через 30 дней после отмены препарата масса и коэффициент массы тимуса и селезенки нормализовались во всех группах, где наблюдались отклонения. Микроскопическое исследование внутренних органов крыс, получавших максимальную дозу ЛП ИФН-λ1 (26.0 мкг/кг) на протяжении 180 дней, выявило специфические изменения в тимусе и селезенке, при этом анализ тимуса и селезенки у крыс, получавших более низкую дозу ЛП ИФН-λ1 (13.0 мкг/кг), не выявил аналогичных патологических изменений. Это указывает на возможность зависимости токсического воздействия от дозы препарата. Через 30 дней после отмены ЛП ИФН-λ1 масса и коэффициент массы тимуса и селезенки крыс, получавших максимальную дозу ЛП ИФН-λ1, возвращались к нормальным значениям и не отличались от соответствующего контроля. Как и у крыс, так и у кроликов показатели прироста массы тела, периферической крови и состояния костного мозга, биохимические показатели сыворотки крови как у самцов, так и у самок в экспериментальных и контрольных группах на протяжении всего исследования существенно не отличались. Патоморфологическое исследование не обнаружило изменений в таких критически важных органах, как мозг, сердце, легкие, печень и другие, что свидетельствует об отсутствии негативного воздействия лекарства на здоровье и состояние тканей кроликов.

Поступила в редакцию 05.10.2024
Прошла рецензирование 29.10.2024
Принята к публикации 15.11.2024

Автор, ответственный за переписку

Олейник Лариса Алексеевна: НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук». 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
E-mail: larysa.oleynik@gmail.com

Received 05.10.2024
Revised 29.10.2024
Accepted 15.11.2024

Corresponding author

Larisa A. Oleinik: Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2, Timakova str., Novosibirsk, 630060, Russia.
E-mail: larysa.oleynik@gmail.com

З а к л ю ч е н и е . На основании экспериментов *in vivo* по изучению общетоксических свойств ЛП ИФН-λ1 при внутривенном пути введения можно утверждать, что препарат относится к 4-му классу опасности (ГОСТ 12.1.007-76).

Ключевые слова: хроническая токсичность, интерферон лямбда-1, пегилирование.

Образец цитирования: Олейник Л.А., Ершов К.И., Забанова В.Е., Байкалов Г.И., Бахарева К.И., Солдатова М.С., Кушнаренко А.О., Муллағалиев А.А., Рыбакова А.Д. Экспериментальное изучение хронической токсичности пегилированного интерферона лямбда-1 // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(4):90-100. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-4-90-100

An experimental study of PEGylated interferon lambda-1 chronic toxicity

L.A. Oleinik, K.I. Ershov, V.E. Zabanova, G.I. Baikalov, K.I. Bakhareva, M.S. Soldatova, A.O. Kushnarenko, A.A. Mullagaliev, A.D. Rybakova

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . Lambda interferons (IFN-λ), known as type III interferons (type III IFN), demonstrate significant prospects in the field of antiviral defense. IFN-λ are similar in their antiviral activity to type I IFN, but have unique mechanisms of induction and functioning because of the specific location of their receptors. Type I receptors are expressed in most nucleated cells, IFN-λ receptors (IFN-λR1 or IL-28Rα) are mainly found in epithelial cells. IFN-λ are considered as the first line of defense against microbial attacks, therefore, the development of IFN-λ-based drugs seems very promising. A prototype of an IFN-λ-based drug for enteral administration, PEGylated (polyethylene glycol) using electron beam synthesis technology, has already been developed.

A i m . To study the common toxic properties of the intragastrically administered IFN-λ1-based drug in experiments *in vivo*.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The IFN-λ1-based drug was administered daily intragastrically at doses of 2.6, 13.0 and 26.0 μg/kg (1 therapeutic dose (TD), 5 TD and 10 TD, respectively) to rats and 2.6 and 13.0 μg/kg (1 TD and 5 TD) to rabbits once a day for 180 days. The doses of the drug were calculated for each animal individually, based on body weight. Rabbits were followed-up during the drug administration (180 days), and rats – additionally for 30 days after the end of administration (210 days). In animals, vital signs, behavioral reactions, laboratory parameters of cellular and biochemical composition of blood, electrocardiography data, hematopoiesis parameters, pathomorphological signs were assessed.

R e s u l t s . No deaths were observed during the study. The animals showed a stable state of health, the absence of visible changes in an appetite, appearance, and behavior. During a pathomorphological examination, no abnormalities were found that could indicate a negative effect of the substance. A significant decrease in the mass and mass coefficient of the thymus and spleen was revealed in rats receiving the drug at a dose of 26.0 μg/kg after 180 days of administration compared with the corresponding control. The thymus and spleen mass and the mass coefficient of the thymus and spleen normalized 30 days after drug withdrawal in all groups, where abnormalities were observed. A microscopic examination of the internal organs of rats receiving the highest dose of the IFN-λ1-based drug (26.0 μg/kg) for 180 days revealed specific changes in the thymus and spleen, while analysis of the thymus and spleen in rats receiving a lower dose of the drug (13.0 μg/kg) did not reveal similar pathological changes. This indicates the possibility of dose-dependent toxic effect of the drug. 30 days after the IFN-λ1-based drug withdrawal, the mass and mass coefficient of the thymus and spleen of rats receiving the highest dose of the drug returned to the reference values and did not differ from the corresponding control. Both in rats and rabbits, the indicators of body weight gain, peripheral blood and bone marrow, biochemical parameters of the blood serum in both males and females in the experimental and control groups did not differ significantly throughout the study. The pathomorphological examination found no changes in such crucial organs as the brain, heart, lungs, liver, etc., which indicates the absence of negative effect of the drug on the health and condition of the tissues of rabbits.

C o n c l u s i o n . Based on *in vivo* experiments to study the common toxic properties of IFN-λ1-based drug in the intragastric route of administration, it can be argued that the drug belongs to the 4th hazard class (GOST 12.1.007-76).

Keywords: chronic toxicity, interferon lambda-1, PEGylation.

Citation example: Oleinik L.A., Ershov K.I., Zabanova V.E., Baikalov G.I., Bakhareva K.I., Soldatova M.S., Kushnarenko A.O., Mullagaliev A.A., Rybakova A.D. An experimental study of PEGylated interferon lambda-1 chronic toxicity. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(4):90-100. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-4-90-100

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все больший интерес в терапии и профилактике вирусных заболеваний привлекает интерферон (ИФН) III типа, поскольку его система демонстрирует гораздо более ограниченную картину локализации, ограничиваясь слизистыми оболочками и анатомическими барьерами, что снижает риск возможных побочных эффектов [1, 2]. В то же время именно ИФН III типа первыми индуцируются при вирусной инфекции и являются доминирующими интерферонами в первичном противовирусном ответе [3, 4]. Нарушенные реакции ИФН I и III типа стали ахиллесовой пятой у пациентов с COVID-19 – выработка и активность интерферонов у них были подавлены, в результате чего развивалось тяжелое заболевание, и наблюдался высокий риск критической пневмонии и смертности [5]. В России разработана уникальная технология электронно-лучевого пегилирования, позволившая создать пегилированную форму ИФН- λ_1 , которая имеет высокую биодоступность при энтеральном введении [6, 7]. В АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск, создан лекарственный препарат (ЛП) на основе рекомбинантного ИФН- λ_1 , пегилированного по технологии электронно-лучевого синтеза. Схема получения и последующего пегилирования человеческого генно-инженерного ИФН- λ_1 описана в патенте РФ № 2678332. Высокая гидрофильность полиэтиленгликоля (ПЭГ) значительно влияет на физико-химические свойства белков, модифицированных этим соединением. ПЭГ способен притягивать воду благодаря наличию атомов водорода, которые образуют водородные связи с 2-3 молекулами воды на каждую молекулу ПЭГ. Это создает вокруг пегилированного белка так называемое водное облако, увеличивая его гидродинамический радиус. Такое увеличение радиуса способствует повышению растворимости и биодоступности белка, а также защищает его от разрушения иммунной системой через механизмы фагоцитоза и опсонизации. Изучена противовирусная активность ЛП ИФН- λ_1 в отношении вирусов гепатита С, аденовируса и вируса герпеса, SARS-CoV-2 [8–10]. Установлены параметры фармакокинетики ЛП ИФН- λ_1 при энтеральном пути введения [11]. Создание регистрационного досье ЛП предусматривает тщательное изучение параметров токсичности. Одним из важнейших его компонентов является экспериментальное изучение общетоксического действия в формате исследований хронической токсичности [12].

INTRODUCTION

Currently, type III interferon (IFN) is attracting increasing interest in the treatment and prevention of viral diseases, since its system demonstrates much more limited localization pattern (namely, mucous membranes and anatomical barriers), which reduces the risk of possible side effects [1, 2]. At the same time, it is type III IFNs that are the first to be induced in viral infection and are the dominant interferons in the primary antiviral response [3, 4]. Impaired IFN type I and III reactions became the Achilles heel in patients with COVID-19 – the production and activity of these interferons were suppressed, resulting in severe disease and a high risk of severe pneumonia and mortality [5]. A unique technology of electron beam PEGylation (polyethylene glycol) has been developed in Russia, which made it possible to create a PEGylated form of IFN- λ_1 with high bioavailability in intragastrical administration [6, 7]. In the Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology (Novosibirsk) a recombinant IFN- λ_1 -based drug, PEGylated using electron beam synthesis technology, was developed. The method for obtaining and subsequent PEGylation of the human genetically engineered IFN- λ_1 is described in RF Patent No. 2678332. The high hydrophilicity of PEG significantly affects the physico-chemical properties of proteins modified with this compound. PEG is able to attract water due to the presence of hydrogen atoms which form hydrogen bonds with 2-3 water molecules per each PEG molecule. This creates a so-called water cloud around the PEGylated protein, increasing its hydrodynamic radius. The increase in radius improves the solubility and bioavailability of a protein, and also protects it against destruction by the immune system through the mechanisms of phagocytosis and opsonization. The antiviral activity of the IFN- λ_1 -based drug against hepatitis C virus, adenovirus and herpes virus, SARS-CoV-2 has been studied [8–10]. The pharmacokinetic parameters of the IFN- λ_1 -based drug in enteral administration have been determined [11]. The development of a registration dossier of a drug provide for a thorough study of the parameters of toxicity. One of its most important components is the experimental study of the common toxic effect in the context of chronic toxicity [12].

AIM OF THE RESEARCH

To study the common toxic properties of the intragastrically administered IFN- λ_1 -based drug in experiments *in vivo*.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах *in vivo* изучить общие токсические свойства ЛП ИФН-λ1 при внутрижелудочном пути введения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 120 аутбредных, конвенциональных крысах массой 270–340 г (по 60 самцов и 60 самок) и 24 кроликах массой 2500–3000 г (по 12 самцов, 12 самок) по схемам, представленным в табл. 1 и 2, в следующих дозировках: терапевтическая доза 2.6 мкг/кг, средняя доза 13.0 мкг/кг, высшая доза 26.0 мкг/кг. Контрольная группа крыс включала 30 особей (15 самцов и 15 самок). Контрольная группа кроликов включала 8 особей (4 самца и 4 самки). В течение 180 дней каждому животному ежедневно вводилась доза тестируемого или референтного лекарственного средства внутрижелудочно. Плановая эвтаназия крыс проводилась на 90, 180 и 210-й день эксперимента, кроликов – на 180-й день эксперимента.

В ходе исследования крысам и кроликам препарат вводили внутрижелудочно ежедневно на протяжении 180 дней в дозах соответственно 2.6, 13.0 и 26.0 мкг/кг для крыс, а для кроликов – 2.6 и 13.0 мкг/кг. Дозировка определялась индивидуально для каждого животного, исходя из его массы тела. Препарат готовили, суспендируя в небольшом объеме фосфатно-солевого буфера, при этом максимальный объем инъекции не превышал 4–5 мл. Наблюдение за состоянием животных проводилось в период введения препарата и в течение 30 дней после завершения курса для крыс. Наблюдение за состоянием здоровья животных включало ежедневные осмотры утром и вечером для выявления признаков ток-

MATERIALS AND METHODS

The experiments were carried out on 120 conventional outbred rats weighing 270–340 g (60 males and 60 females) and 24 rabbits weighing 2500–3000 g (12 males and 12 females each) according to the design presented in Tables 1 and 2, in the following dosages: the therapeutic dose is 2.6 µg/kg, the average dose is 13.0 µg/kg, the highest dose is 26.0 µg/kg. The control group of rats included 30 animals (15 males and 15 females). The control group of rabbits included 8 animals (4 males and 4 females). During 180 days, each animal was administered a daily dose of the studied or reference drug intragastrically. Planned euthanasia of rats was performed on the 90th, 180th and 210th days of the experiment, rabbits – on the 180th day.

During the study, the drug was administered intragastrically to rats and rabbits daily for 180 days at doses of 2.6, 13.0 and 26.0 µg/kg for rats and 2.6 and 13.0 µg/kg for rabbits, respectively. The dosage was determined individually for each animal based on its body weight. The drug was prepared by suspending in a small volume of phosphate-buffered saline, while the maximal administered volume did not exceed 4–5 ml. The animals were followed up during drug administration, and for 30 days after withdrawal of the drug in rats. Animal health monitoring included daily examinations in the morning and evening to identify signs of toxicity or deterioration of health, including the fatal outcomes recording. The examinations were performed in the cages or on an open surface when necessary. Regular clinical examinations of animals from all groups were performed every week throughout the study, including the assessment of excretion, state of hair, skin, mucous membranes, appetite, respiration and behavioral reactions. Special attention was paid to

Таблица 1. Дизайн эксперимента по изучению хронической токсичности ЛП ИФН-λ1 на крысах при однократном ежедневном внутрижелудочном введении препарата в течение 180 дней

Table 1. The design of an experiment to study the chronic toxicity of the IFN-λ1-based drug in rats with a single daily intragastric administration for 180 days

Группа Group	Доза ЛП ИФН-λ1, мкг/кг Dose, µg/kg	Количество животных в группе Number of animals in the group					
		90-й день 90th day		180-й день 180th day		210-й день 210th day	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
Контроль / Control	0	5	5	5	5	5	5
Терапевтическая доза Therapeutic dose	2.6	5	5	5	5	5	5
Средняя доза / Average dose	13.0	5	5	5	5	5	5
Высшая доза / Highest dose	26.0	5	5	5	5	5	5

Таблица 2. Дизайн эксперимента по изучению хронической токсичности ИФН- λ 1 на кроликах при ежедневном однократном внутрижелудочном введении препарата в течение 180 дней**Table 2.** The design of an experiment to study the chronic toxicity of the IFN- λ 1-based drug in rabbits with a single daily intragastric administration for 180 days

Группа Group	Доза ЛП ИФН- λ 1, мкг/кг Dose, μ g/kg	Кол-во животных в группе Number of animals in the group	
		♂	♀
Контроль / Control	0	4	4
Терапевтическая доза / Therapeutic dose	2.6	4	4
Высшая доза / Highest dose	13.0	4	4

сичности или ухудшения здоровья, включая фиксацию случаев летального исхода. Осмотры проводились непосредственно в клетках или на открытой поверхности при необходимости. Регулярные клинические осмотры животных из всех групп выполнялись каждую неделю на протяжении всего исследования, включая оценку экскреции, состояния шерсти, кожи, слизистых, аппетита, дыхания и поведенческих реакций. Особое внимание уделялось изменениям в активности, возбудимости, походке и другим визуально заметным признакам.

Для анализа лабораторных показателей и перед выполнением эвтаназии (перед 90, 180, 210-м днем эксперимента) животные оставались без корма на ночь. Температуру тела измеряли за день до эвтаназии с использованием ректального электронного термометра. Лабораторные исследования проводились в несколько этапов. Для крыс на 90, 180, и 210-й день, для кроликов – на 90 и 180-й день. Забор крови у крыс проводился из хвостовой вены, а у кроликов – через краевую ушную вену с использованием микрокувет объемом 0.2 мл для гематологического анализатора Mythic 18 Vet и биохимического анализатора и ионселективного анализатора электролитов. Для оценки костномозгового кроветворения использовался метод подсчета миелокариоцитов из бедренной кости. Почечный метаболизм у крыс анализировался по показателям суточного диуреза, содержания глюкозы, билирубина, кетонов, удельной плотности, скрытой крови, белка, уробилиногена, нитритов, лейкоцитов, а также уровню pH мочи с использованием автоматического анализатора мочи и тест-полосок. Водную нагрузку осуществляли путем внутрижелудочного введения дистиллированной воды, рассчитанной как 2% от массы тела животных.

Функциональное исследование сердечно-сосудистой системы крыс проводилось за день до плановой эвтаназии в каждой из эксперимен-

changes in activity, excitability, gait and other visible signs.

To analyze laboratory parameters and before euthanasia (before the 90th, 180th, 210th day of the experiment), the animals were not fed overnight. Body temperature was measured rectally the day before euthanasia using an electronic thermometer. Lab tests were performed in several stages: for rats, on the 90th, 180th, and 210th day; for rabbits, on the 90th and 180th day. Blood samples in rats was drawn from the tail vein, and in rabbits, through the marginal auricular vein using 0.2 ml micro cuvettes for a Mythic 18 Vet hematological analyzer, and biochemical analyzer, and ion selective-based electrolyte analyzer. To assess bone marrow hematopoiesis, the method of counting myelokaryocytes from the femoral bone was used. Renal metabolism in rats was assessed by the indicators of 24-hour diuresis, glucose, bilirubin, ketones, specific gravity, occult blood, protein, urobilinogen, nitrites, leukocytes, as well as urine pH values using an automated urine analyzer and test strips. The water load was performed by intragastric administration of distilled water calculated as 2% of the body weight of the animals.

A functional study of the cardiovascular system of rats was performed one day before the planned euthanasia in each experimental group. Electrocardiograms (ECG) were recorded on a Poly-Spectrum-8/V device using the standard lead-II at an amplification of 1 mV = 20 mm, and a recording speed of 50 mm/s. Data was processed in Poly-Spectrum program.

The effects on the central nervous system (CNS) of rats were studied by observing their behavior in the open field test.

Pathomorphology and histology. Immediately after the autopsy, the organs were taken for further study. The tissues were fixed, dehydrated, impregnated with paraffin and embedded in paraffin blocks. Using a microtome, serial thin sections of tissues with a thickness no more than 5 μ m were made which

тальных групп. Электрокардиограммы (ЭКГ) записывались с помощью устройства «Поли-Спектр-8/В» во втором стандартном отведении при усилении 1 мВ = 20 мм и скорости записи 50 мм/с. Обработка данных выполнялась в программе «Поли-Спектр».

Изучение влияния на центральную нервную систему (ЦНС) крыс проводилось путем наблюдения за их поведением в экспериментальной установке, известной как «открытое поле».

Патоморфология и гистология. Непосредственно после вскрытия забирали органы для дальнейшего исследования. Ткани фиксировали, дегидратировали, пропитывали парафином и встраивали в парафиновые блоки. С помощью микротомы готовили серийные тонкие срезы тканей толщиной не более 5 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ и оценка морфологического состояния тканей проводились с использованием световой микроскопии, что позволяло детально изучить структурные изменения в образцах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании на крысах, оценивавшим хроническую токсичность ЛП ИФН- λ_1 (дизайн исследования см. в табл. 1), не наблюдалось летальных исходов в течение всего периода тестирования. Животные демонстрировали стабильное состояние здоровья, без видимых изменений в аппетите, внешнем виде и поведении. Регулярные измерения массы тела, а также анализы состояния крови и другие биохимические показатели не выявили значительных отличий между экспериментальными и контрольными группами. Это указывает на отсутствие серьезной токсичности препарата в течение длительного времени его применения.

В проведенном патоморфологическом анализе в рамках исследования хронической токсичности препарата ЛП ИФН- λ_1 на крысах не обнаружено аномалий, которые могли бы указывать на негативное воздействие вещества. Детальный осмотр включал оценку внешнего состояния животных, черепной, грудной, брюшной и тазовой полостей, а также скелетно-мышечной системы. Исследования проводились на 90, 180 и 210-й день после начала применения препарата. Результаты подтвердили хорошую переносимость ЛП ИФН- λ_1 и отсутствие хронической токсичности, что делает его потенциально безопасным для длительного использования.

Взвешивание основных внутренних органов при вскрытии выявило достоверное снижение

were then stained with hematoxylin and eosin. The analysis and assessment of the tissue morphology state were carried out using light microscopy, which allowed to study in detail the structural changes in the samples.

RESULTS AND DISCUSSION

In a rat study evaluating the chronic toxicity of the IFN- λ_1 -based drug (the study design, Table 1), no fatal outcomes were observed during the entire experiment. The animals showed a stable state of health, without visible changes in an appetite, appearance, and behavior. Regular measurements of body weight, as well as hematological and biochemistry tests did not reveal significant differences between the experimental and control groups. This indicates the absence of serious toxicity of the drug over a long term of its use.

During the pathomorphological examination as part of the study of the chronic toxicity of the IFN- λ_1 -based drug, no abnormalities were found in rats that could indicate an adverse effect of the substance. The detailed examination included the assessment of appearance of the animals, state of cranial, thoracic, abdominal and pelvic cavities, as well as the musculoskeletal system. The studies were conducted on the 90th, 180th and 210th day after the start of the drug administration. The results confirmed good tolerability of the drug and the absence of chronic toxicity, making it potentially safe for long-term use.

Weighing of the vital internal organs at autopsy revealed a significant decrease in the mass and mass coefficient of the thymus and spleen in male rats received the drug at a dose of 26.0 $\mu\text{g/kg}$ after 180 days of his administration compared with the corresponding control. In females of this series, the spleen mass and spleen mass coefficient as well as the thymus mass coefficient were also significantly reduced. In addition, the spleen mass coefficient was lower in females in the group of animals that received the drug at a dose of 13.0 $\mu\text{g/kg}$. 30 days after withdrawal of the drug, the mass and mass coefficient of the thymus and spleen returned to the reference values in all groups where abnormalities were observed. The values of the mass and mass coefficient of the other organs did not differ from the control.

The microscopic examination of the internal organs of rats that received the highest dose of the IFN- λ_1 -based drug (26.0 $\mu\text{g/kg}$) for 180 days revealed specific changes in the thymus and spleen. In the thymus, there was a decrease in the number of cells in the cortical and medullary regions, the appearance of Hassall's corpuscles with signs of keratinization and foci of sclerosis. The spleen showed a

массы и коэффициента массы тимуса и селезенки у самцов крыс, получавших препарат в дозе 26.0 мкг/кг, через 180 дней введения ЛП ИФН- λ_1 , по сравнению с соответствующим контролем. У самок в этой серии исследования также были достоверно снижены масса селезенки и коэффициент массы селезенки, а также коэффициент массы тимуса. Кроме того, у самок был снижен коэффициент массы селезенки в группе животных, получавших препарат в дозе 13.0 мкг/кг. Через 30 дней после отмены препарата масса и коэффициент массы тимуса и селезенки нормализовались во всех группах, где наблюдались отклонения. Значения массы и коэффициента массы остальных органов не отличались от контроля.

Микроскопическое исследование внутренних органов крыс, подвергшихся длительному воздействию максимальной дозы ЛП ИФН- λ_1 (26.0 мкг/кг) на протяжении 180 дней, выявило специфические изменения в тимусе и селезенке. В тимусе наблюдалось уменьшение количества клеток в корковой и мозговой зонах, появление тимических телец с признаками ороговения и очагов склероза. Селезенка демонстрировала уменьшение размеров лимфоидных фолликулов, особенно в мантийной зоне, и снижение общей клеточности. В то время как другие органы, включая головной мозг, сердце, легкие, печень и др., не показали морфологических изменений. При этом анализ параметров тимуса и селезенки у крыс, получавших более низкую дозу ЛП ИФН- λ_1 (13.0 мкг/кг), не выявил аналогичных патологических изменений. Это указывает на возможность зависимости токсического воздействия от дозы препарата. Через 30 дней после отмены ЛП ИФН- λ_1 масса и коэффициент массы тимуса и селезенки крыс, получавших максимальную дозу ЛП ИФН- λ_1 , возвращались к нормальным значениям и не отличались от соответствующего контроля. Вероятнее всего, в данном случае имеет место реализация класс-специфических эффектов от введения ЛП ИФН- λ_1 , а именно подавление активности цитоплазматической протеинкиназы и аденилатциклазы.

В исследовании на кроликах, оценивавшем хроническую токсичность ЛП ИФН- λ_1 (дизайн исследования см. в табл. 2), не было отмечено гибели животных, а также изменения их общего состояния и различий в потреблении корма и воды. Как и у крыс, у кроликов показатели прироста массы тела, показатели периферической крови и состояния костного мозга, биохимические показатели сыворотки крови как у самцов,

decrease in the size of lymphoid follicles, especially in the mantle zone, and total cellularity decrease; while other organs, including the brain, heart, lungs, liver, etc., did not show morphological changes. At the same time, the analysis of the thymus and spleen parameters in rats receiving a lower dose of the IFN- λ_1 -based drug (13.0 $\mu\text{g/kg}$) did not reveal similar pathological changes. This indicates the possibility of dependence of toxic effects on the dose of the drug. 30 days after withdrawal of the IFN- λ_1 -based drug, the mass and mass coefficient of the thymus and spleen of rats that received the highest dose of the drug, returned to the reference values and did not differ from the corresponding control. Most likely, in this case, there is a realization of class-specific effects caused by the administration of the IFN- λ_1 -based drug, namely, inhibition of activity of cytoplasmic protein kinase and adenylate cyclase.

In a rabbit study evaluating the chronic toxicity of the IFN- λ_1 -based drug (the study design, Table 2), no deaths of animals were observed, as well as changes in their performance status and differences in food and water consumption. As in rats, in rabbits, body weight gain, peripheral blood and bone marrow parameters, and biochemical blood serum values did not differ significantly in both males and females in the experimental and control groups throughout the study.

A pathomorphological examination of the chronic toxicity of the IFN- λ_1 -based drug, administered intragastrically to rabbits during 180 days every single day, confirmed the absence of macro- and microscopic abnormalities in the organs. Throughout the experiment, animals, including that received the highest dose (13.0 $\mu\text{g/kg}$), did not show changes in such vital organs as the brain, heart, lungs, liver and others, which shows the absence of negative effects of the drug on the health and state of rabbit tissues.

In the course of the pathomorphological examination following long-term administration of the IFN- λ_1 -based drug, the vital parenchymal organs of rabbits were weighed to assess their mass and calculate the organ mass coefficient. The analysis of data on organ mass and mass coefficients did not reveal statistically significant differences between rabbits in the control and experimental groups. These results show that the IFN- λ_1 -based drug does not cause local irritation and does not affect the morphological state of the studied organs, confirming its potential safety for long-term use.

CONCLUSION

The performed study allows us to draw the following conclusions:

так и у самок в экспериментальных и контрольной группах на протяжении всего исследования существенно не отличались.

Патоморфологическое исследование хронической токсичности ЛП ИФН- λ_1 , проведенное в течение 180 дней ежедневного внутрижелудочного введения кроликам, подтвердило отсутствие макро- и микроскопических патологий в органах. На протяжении всего эксперимента у животных, получавших препарат, включая тех, кто получал максимальную дозу (13.0 мкг/кг), не наблюдалось изменений в таких критических важных органах, как мозг, сердце, легкие, печень и другие, что свидетельствует об отсутствии негативного воздействия лекарства на здоровье и состояние тканей кроликов.

В ходе патоморфологического анализа после длительного введения ЛП ИФН- λ_1 проводили взвешивание важных паренхиматозных органов кроликов для оценки их массы и расчета коэффициента массы органов. Изучение данных по массе органов и коэффициентам массы не выявило статистически значимых отличий между кроликами контрольной и экспериментальных групп. Эти результаты свидетельствуют о том, что ЛП ИФН- λ_1 не оказывает местнораздражающего действия и не влияет на морфологическое состояние изучаемых органов, подтверждая его потенциальную безопасность для долгосрочного применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Длительное внутрижелудочное применение ЛП ИФН- λ_1 не приводит к серьезным изменениям здоровья животных. Крысы и кролики получали дозы 2.6, 13.0 и 26.0 мкг/кг и 2.6 и 13.0 мкг/кг соответственно и сохраняли стабильное состояние здоровья без изменений массы тела или ее прироста. Отсутствие случаев смерти животных свидетельствует о безопасности препарата.

2. Профиль безопасности ЛП ИФН- λ_1 подтверждается отсутствием его влияния на функции кроветворения, печень, сердечно-сосудистую и нервную системы, что доказано исследованиями как у крыс, так и у кроликов. Кроме того, не обнаружено воздействия на функциональное состояние почек у крыс.

3. Морфологические анализы головного мозга, сердца, легких, печени, почек и других жизненно важных органов и систем не выявили никаких отклонений от нормы, что указывает на

1. Long-term intragastric administration of the IFN- λ -based drug does not lead to significant changes in animal health. Rats and rabbits that received doses of 2.6, 13.0 and 26.0 $\mu\text{g/kg}$ and 2.6 and 13.0 $\mu\text{g/kg}$, respectively, had a stable state of health without changes in body weight or its gain. The absence of fatal outcomes indicates the safety of the drug.

2. The safety profile of the IFN- λ_1 -based drug is confirmed by the absence of its effect on the functions of hematopoiesis, the liver, cardiovascular and nervous systems, which has been proven by studies in both rats and rabbits. In addition, no effect on the functional state of the kidneys in rats was found.

3. Morphological analyses of the brain, heart, lungs, liver, kidneys and other vital organs and systems did not reveal any abnormalities, which indicates the absence of negative effects of the drug on the body even at high doses administration.

4. A number of pathological signs have been identified. Signs of hypoplasia of the thymus and spleen were revealed (a decrease in mass and mass coefficient due to decreased cellularity of lymphoid tissue of the organs). These signs were in rats that received the IFN- λ_1 -based drug once daily at a highest dose of 26.0 $\mu\text{g/kg}$ for 180 days on the 180th day of the experiment. The additional histological examination of the lymphoid organs of rats that received the drug at a dose of 13.0 $\mu\text{g/kg}$ did not reveal such changes. There were no similar changes in rabbits either.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

отсутствие деструктивного воздействия препарата на организм даже при высоких дозах.

4. Установлено некоторое количество патологических признаков. Выявлены признаки гипоплазии тимуса и селезенки (снижение массы и коэффициента массы за счет уменьшения клеточности лимфоидной ткани органов). Эти признаки наблюдались у крыс, получавших ЛП ИФН- λ_1 однократно ежедневно в максимальной дозе 26.0 мкг/кг в течение 180 дней на 180-й день проведения эксперимента. Дополнительное гистологическое исследование лимфоидных органов крыс, получавших препарат в дозе 13.0 мкг/кг, не выявило подобных изменений. У кроликов подобных изменений также не наблюдалось.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotenko S.V., Durbin J.E. Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location // *J. Biol. Chem.* 2017;292(18):7295-7303. DOI: 10.1074/jbc.R117.777102.
2. O'Brien T.R., Young H.A., Donnelly R.P., Prokunina-Olsson L. Meeting overview: Interferon lambda – disease impact and therapeutic potential // *J. Interferon Cytokine Res.* 2019;39(10):586-591. DOI: 10.1089/jir.2019.0018.
3. Broggi A., Ghosh S., Sposito B. et al. Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition // *Science.* 2020;369(6504):706-712. DOI: 10.1126/science.abc3545.
4. Goel R.R., Wang X., O'Neil L.J. et al. Interferon lambda promotes immune dysregulation and tissue inflammation in TLR7-induced lupus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020;117(10):5409-5419. DOI: 10.1073/pnas.1916897117.
5. Shahbazi M., Amri Maleh P., Bagherzadeh M. et al. Linkage of lambda interferons in protection against severe COVID-19 // *J. Interferon Cytokine Res.* 2021;41(4):149-152. DOI: 10.1089/jir.2020.0187.
6. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В. и др. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // *Медицина и образование в Сибири.* 2013;4:83.
7. Yadav D., Dewangan H.K. PEGYLATION: an important approach for novel drug delivery system // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2021;32(2):266-280. DOI: 10.1080/09205063.2020.1825304.
8. Киншт Д.Н., Мадонов П.Г., Кочнева Г.В. и др. Изучение противовирусной активности перорального лекарственного средства на основе иммобилизованного интерферона λ -1 // *Сибирский научный медицинский журнал.* 2018;38(3):30-34. DOI: 10.15372/SSMJ20180304
9. Кихтенко Н.А., Ильичёва Т.Н., Дурьманов А.Г. и др. Изучение противовирусной активности рекомбинантного человеческого интерферона лямбда 1 на культуре клеток конъюнктивы человека // *Сибирский научный медицинский журнал.* 2021;41(5):31-36. DOI: 10.18699/SSMJ20210504.
10. Мадонов П.Г., Святченко В.А., Легостаев С.С. и др. Изучение противовирусной активности рекомбинантного человеческого интерферона лямбда-1 в отношении SARS-CoV-2 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2021;172(7):65-69. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-7-65-69.
11. Шерстобоев Е.Ю., Олейник Л.А., Жданов В.В. и др. Фармакокинетические параметры при пероральном введении пегилированного ИФН- λ 1 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2022;173(2):188-192. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-173-2-188-192.
12. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Олейник Лариса Алексеевна – младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных моле-

REFERENCES

1. Kotenko S.V., Durbin J.E. Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location. *J. Biol. Chem.* 2017;292(18):7295-7303. DOI: 10.1074/jbc.R117.777102.
2. O'Brien T.R., Young H.A., Donnelly R.P., Prokunina-Olsson L. Meeting overview: Interferon lambda – disease impact and therapeutic potential. *J. Interferon Cytokine Res.* 2019;39(10):586-591. DOI: 10.1089/jir.2019.0018.
3. Broggi A., Ghosh S., Sposito B. et al. Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition. *Science.* 2020;369(6504):706-712. DOI: 10.1126/science.abc3545.
4. Goel R.R., Wang X., O'Neil L.J. et al. Interferon lambda promotes immune dysregulation and tissue inflammation in TLR7-induced lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020;117(10):5409-5419. DOI: 10.1073/pnas.1916897117.
5. Shahbazi M., Amri Maleh P., Bagherzadeh M. et al. Linkage of lambda interferons in protection against severe COVID-19. *J. Interferon Cytokine Res.* 2021;41(4):149-152. DOI: 10.1089/jir.2020.0187.
6. Madonov P.G., Ershov K.I., Dubrovin A.V. et al. Electron-beam modification of preparation of the albuminous nature for improvement their pharmacological properties. *Medicine and Education in Siberia.* 2013;4:83. (In Russ.)
7. Yadav D., Dewangan H.K. PEGYLATION: an important approach for novel drug delivery system. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2021;32(2):266-280. DOI: 10.1080/09205063.2020.1825304.
8. Kinsht D.N., Madonov P.G., Kochneva G.V. et al. Investigation of the antiviral activity of an oral drug preparation based on immobilized interferon λ -1. *Siberian Scientific Medical Journal.* 2018;38(3):30-34. DOI: 10.15372/SSMJ20180304 (In Russ.)
9. Kikhtenko N.A., Ilyicheva T.N., Durymanov A.G. et al. Investigation of the antiviral activity of the recombinant human interferon lambda 1 in human conjunctiva cell culture. *Siberian Scientific Medical Journal.* 2021;41(5):31-36. DOI: 10.18699/SSMJ20210504. (In Russ.)
10. Madonov P.G., Svyatchenko V.A., Legostaev S.S. et al. Evaluation of the anti-viral activity of human recombinant interferon lambda-1 against SARS-CoV-2. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2021;172:53-56. DOI: 10.1007/s10517-021-05330-0.
11. Sherstoboev E.Yu., Oleinik L.A., Zhdanov V.V. et al. Pharmacokinetic parameters of oral pegylated IFN- λ 1. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2022;173:215-218. DOI: 10.1007/s10517-022-05521-3.
12. Mironov A.N. (2012). *Guidelines for Preclinical Studies of Medicines.* Moscow: Grif. Pt 1. (In Russ.)

ABOUT THE AUTHORS

Larisa A. Oleinik – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and

кул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-0336-4227.

Ершов Константин Игоревич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории фармацевтических технологий НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-41399-0360.

Забанова Виктория Евгеньевна – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия.

Байкалов Герман Игоревич – младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-5445-9920.

Бахарева Ксения Игоревна – младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-2054-1659.

Солдатова Марина Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-1050-6921.

Кушнарченко Андрей Олегович – младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-6670-7370.

Муллагалиев Арсен Арсенович – младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и гене-

Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-0336-4227.

Konstantin I. Ershov – Cand. Sci. (Bio.), Senior Researcher, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-41399-0360.

Victoria E. Zabanova – Junior Researcher, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.

German I. Baikarov – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5445-9920.

Ksenia I. Bakhareva – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2054-1659.

Marina S. Soldatova – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-1050-6921.

Andrey O. Kushnarenko – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-6670-7370.

Arsen A. Mullagaliev – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.

Anna D. Rybakova – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian

тики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия.

Рыбакова Анна Дмитриевна – младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-9271-1656.

Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-9271-1656.

