

Рекомендовано д. фарм. н., професором О. А. Рубан

УДК 615.456.1:616—097:001.891

DOI: 10.24959/sphhcj.17.76

М. В. РИБАЛКІН

Національний фармацевтичний університет

## МЕТОДОЛОГІЯ СТВОРЕННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ КАНДИДОЗУ

Кандидоз є одним із найпоширеніших захворювань сучасності. Вже багато років для лікування кандидозу використовують одні й ті самі протигрибкові лікарські засоби, до яких поступово гриби виробляють стійкість. Одним зі шляхів вирішення проблеми ефективного лікування кандидозу є використання вакцин, які мають низку вагомих переваг у порівнянні з іншими протигрибковими лікарськими засобами. На сьогодні на фармацевтичному ринку повністю відсутні вакцини проти кандидозу.

**Мета:** обґрунтування загальної концепції створення нової вакцини на основі грибів роду *Candida*.

**Матеріали та методи.** Розробка нової вакцини має ґрунтуватися на загальному методологічному підході до фармацевтичної розробки з урахуванням вимог до лікарської форми. Для того щоб визначити загальну концепцію для створення нової вакцини, були окреслені такі напрямки досліджень: розробка нової вакцини на основі інактивованих клітин грибів роду *Candida* і створення нової вакцини на основі білків та полісахаридів грибів роду *Candida*.

**Результати дослідження.** Для забезпечення ефективності та безпечності вакцини усі фармацевтичні і технологічні фактори, які впливають на вакцину, мають бути теоретично й експериментально обґрунтовані. До них належать: характер та кількість активних речовин, технологічні параметри одержання та змішування активних речовин, фізико-хімічні та біологічні властивості активних і допоміжних речовин, обладнання.

**Висновки.** На основі загального методологічного підходу до фармацевтичної розробки обґрунтовано методологію та розроблено план експериментальних досліджень зі створення ін'єкційного розчину вакцини для попередження та лікування кандидозу на основі клітин грибів роду *Candida*.

**Ключові слова:** вакцина; методологія; алгоритм досліджень; технологія.

M. V. RYBALKIN

### THE METHODOLOGY OF CREATING A VACCINE AGAINST CANDIDIASIS

Candidiasis is one of the most common diseases of our time. For many years to treat candidiasis the same antifungal drugs, to which the fungi gradually develop resistance, have been used. One of the ways to solve the problem of effective treatment of candidiasis is to use vaccines, which have a number of significant advantages compared to other antifungal drugs. Currently, there are no vaccines against candidiasis at the pharmaceutical market.

**Aim.** To substantiate the general concept for creation of a new vaccine based on *Candida* fungi.

**Materials and methods.** Development of a new vaccine should be combined on a common methodological approach to pharmaceutical development taking into account the requirements for a dosage form. In order to determine the general concept for creation of a new vaccine the following areas of research have been outlined: development of a new vaccine based on inactivated cells of *Candida* genus fungi and creation of a new vaccine for the renewal of proteins and polysaccharides of fungi of *Candida* genus fungi.

**Results.** To provide the effectiveness and safety of the vaccine all pharmaceutical and technological factors that affect the vaccine should be theoretically and experimentally substantiated. They include the nature and the amount of active substances, technological parameters for preparation and mixing of active substances, the physicochemical and biological properties of active substances and excipients, equipment. In order to provide the therapeutic effectiveness of the vaccine the biopharmaceutical studies to determine antibody titers and efficacy in the prevention and treatment of candidal infection were conducted.

**Conclusions.** Thus, on the basis of the universal methodological approach to pharmaceutical development the methodology has been substantiated; the plan for experimental studies on creating the solution of the vaccine for injection to prevent and treat candidiasis on the basis of fungal cells of *Candida* genus has been developed.

**Key words:** vaccine; methodology; research algorithm; technology.

H. B. РЫБАЛКИН

### МЕТОДОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КАНДИДОЗА

Кандидоз является одним из самых распространенных заболеваний современности. Уже много лет для лечения кандидоза используют одни и те же противогрибковые препараты, к которым грибы постепенно вырабатывают устойчивость. Одним из путей решения проблемы эффективно-го лечения заболеваний кандидоза является использование вакцин, которые имеют ряд весомых преимуществ по сравнению с другими противогрибковыми препаратами. Сегодня на фармацевтическом рынке полностью отсутствуют вакцины против кандидоза.

**Цель:** обоснование общей концепции для создания новой вакцины на основе грибов рода *Candida*.

**Материалы и методы.** Разработка новой вакцины должна объединяться на общем методологическом подходе к фармацевтической разработке с учетом требований к лекарственной форме. Для того чтобы определить общую концепцию для создания новой вакцины, были очерчены следующие направления исследований: разработка новой вакцины на основе инактивированных клеток грибов рода *Candida* и создание новой вакцины на основе белков и полисахаридов грибов рода *Candida*.

**Результаты исследования.** Для обеспечения эффективности и безопасности вакцины все фармацевтические и технологические факторы, которые влияют на вакцину, должны быть теоретически и экспериментально обоснованы. К ним относятся: характер и количество активных веществ, технологические параметры получения и смешивания активных веществ, физико-химические и биологические свойства активных и вспомогательных веществ, оборудования. Для того чтобы обеспечить терапевтическую эффективность вакцины, проведены биофармацевтических исследования по определению титров антител и эффективности при предупреждении и лечении кандидозной инфекции.

**Выводы.** На основе всеобщего методологического подхода к фармацевтической разработке мы обосновали методологию и разработали план экспериментальных исследований по созданию инъекционного раствора вакцины для предупреждения и лечения кандидоза на основе клеток грибов рода *Candida*.

**Ключевые слова:** вакцина; методология; алгоритм исследований; технология.

**Постанова проблеми.** Лікарі в усьому світі упродовж останнього десятиліття фіксують зростання кількості хворих на кандидоз [1-2]. За останні роки на фармацевтичному ринку з'явилось багато протигрибкових лікарських засобів (ЛЗ) як вітчизняного, так і закордонного виробництва. Однак усі вони є дженериками і містять одні й ті самі діючі речовини, що використовуються уже багато років [3]. Що, зі свого боку, призвело до втрати чутливості грибів роду *Candida* [4].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Альтернативним методом боротьби з кандидозною інфекцією, на думку багатьох дослідників, є створення вакцини. Зараз за кордоном активно проводяться дослідження з розробки вакцин проти кандидозу. Іноземні дослідники пропонують різні варіанти вакцин: із живим ослабленим збудником, з інактивованим збудником, субодичні та полівалентні вакцини на основі різних видів збудника. Заявлені вакцини проходять стадію доклінічних та клінічних випробувань у США [5-6].

**Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми.** Необхідно зазначити, що в Україні на сьогодні не випускається і не зареєстровано жодної вакцини проти кандидамікозу. Отже, актуальним питанням сучасної фармації і медицини є розробка вакцин для попередження та лікування кандидозної інфекції.

**Метою дослідження** є обґрунтування загальної методології для створення нової вакцини на основі грибів роду *Candida*.

**Матеріали та методи.** Розробка нової вакцини має відбуватися відповідно до запропонованого методологічного підходу з урахуванням вимог до лікарської форми.

Для визначення загальної концепції створення нової вакцини були окреслені такі напрямки досліджень:

- розробка нової вакцини на основі інактивованих клітин грибів роду *Candida*;
- розробка нової вакцини на основі білків та полісахаридів грибів роду *Candida*.

**Результати та обговорення.** Першим етапом досліджень зі створення нової вакцини для попередження та лікування кандидозної інфекції була оцінка перспективних вакцин, які розробляються, а також дослідження асортименту протигрибкових ЛЗ, які є альтернативними аналогами на фармацевтичному ринку.

На сьогодні на фармацевтичному ринку немає вакцин проти кандидозу. Для лікування кандидозу використовують протигрибкові ЛЗ, що представлені на фармацевтичному ринку вже багато десятиліть, до яких у збудників поступово формується стійкість.

Перспективним напрямком у боротьбі з кандидозною інфекцією на сьогодні є використання вакцин. Дослідники пропонують різні варіанти вакцин: із живими ослабленими збудниками, з інактивованими клітинами грибів, з окремими фрагментами та продуктами життєдіяльності збудників. На думку автора, перспективним напрямком для створення вакцини проти кандидозу є використання інактивованих та окремих

фрагментів збудників, оскільки використання живих ослаблених клітин грибів небезпечно для пацієнтів, може спровокувати розвиток захворювання та має певні труднощі при стандартизації. Що стосується продуктів життєдіяльності мікроорганізмів, то, за даними літератури, склад білків і полісахаридів у цьому разі відрізняється від складу цих речовин у клітині грибів. Також необхідно зазначити, що використання декількох збудників у складі вакцини перспективніше, ніж використання одного виду грибу, тобто створення комбінованих або полівалентних вакцин перспективніше, ніж створення моновакцин. Для створення комбінованої вакцини були обрані клітини грибів *C. albicans* і *C. tropicalis* як найбільш розповсюджені збудники кандидозу.

Наступним етапом досліджень має бути підтвердження морфологічної ідентичності клітин грибів *C. albicans* і *C. tropicalis* шляхом мікробіологічних досліджень. Далі необхідно обґрунтувати параметри біотехнологічного режиму культивування, тобто визначити оптимальне поживне середовище, температурний режим та час культивування, що забезпечить максимальний вихід біомаси грибів *C. albicans* і *C. tropicalis*.

У подальших дослідженнях необхідно одержати інактивовані клітини грибів, провести дезінтеграцію клітин грибів та виконати імунобіологічні дослідження на тваринах з визначення перспективних діючих і допоміжних речовин, на основі яких буде розроблена вакцина проти кандидозу. На наступній стадії досліджень необхідно обґрунтувати технологічний режим інактивації клітин грибів, тобто визначити оптимальний фізичний або хімічний метод та його параметри: час, температуру, концентрацію хімічного агента та ін. Після визначення методу інактивації клітин грибів необхідно обґрунтувати технологічний режим змішування клітин грибів *C. albicans* і *C. tropicalis* та його параметри. Наступним етапом досліджень мають бути досліди на тваринах з визначення концентрації діючих речовин при використанні окремих і поєднаних інактивованих клітин грибів *C. albicans* і *C. tropicalis*.

Паралельно проводяться дослідження з обґрунтування технологічного режиму

дезінтеграції клітин грибів та його параметрів: часу, температури, інтенсивності та частоти для ультразвуку, концентрації та об'єму суспензії клітин грибів. Для забезпечення достовірних результатів дослідження необхідно провести біохімічні дослідження з визначення білків та полісахаридів. На наступній стадії досліджень потрібно обґрунтувати технологічний режим очищення розчину антигенів та визначити такі параметри, як молекулярна маса та склад білків і полісахаридів. Наступним етапом досліджень мають бути досліди на тваринах з визначення концентрації діючих речовин при використанні окремих та поєднаних розчинів антигенів грибів *C. albicans* і *C. tropicalis*. На основі отриманих даних необхідно обрати перспективну діючу речовину для створення вакцини проти кандидозу.

Методологія розробки раціонального складу і технології вакцини (рис.) залежить від того, яка лікарська форма була обрана. Розчин для ін'єкцій має певні переваги порівняно з іншими формами, оскільки забезпечує ефективність та мінімальні фінансові затрати на його виробництво. До складу ін'єкційного розчину вакцини входять активні та допоміжні речовини (розчинник, консервант, ад'ювант). У подальших дослідженнях необхідно обґрунтувати концентрацію і тип розчинника, консерванта, ад'юванту.

Далі необхідно обґрунтувати технологію вакцини проти кандидозу та розробити методики контролю якості розробленої вакцини. Наступним етапом досліджень має бути визначення умов і термінів зберігання запропонованої вакцини. У подальшому необхідно провести апробацію технології виробництва на фармацевтичному підприємстві та дати фармакоекономічну оцінку вакцині.

Для забезпечення ефективності та безпечності вакцини усі фармацевтичні і технологічні фактори, які впливають на вакцину, мають бути теоретично й експериментально обґрунтовані. До них належать характер та кількість активних речовин, технологічні параметри одержання та змішування активних речовин, фізико-хімічні та імунобіологічні властивості активних і допоміжних речовин, обладнання. Для того щоб

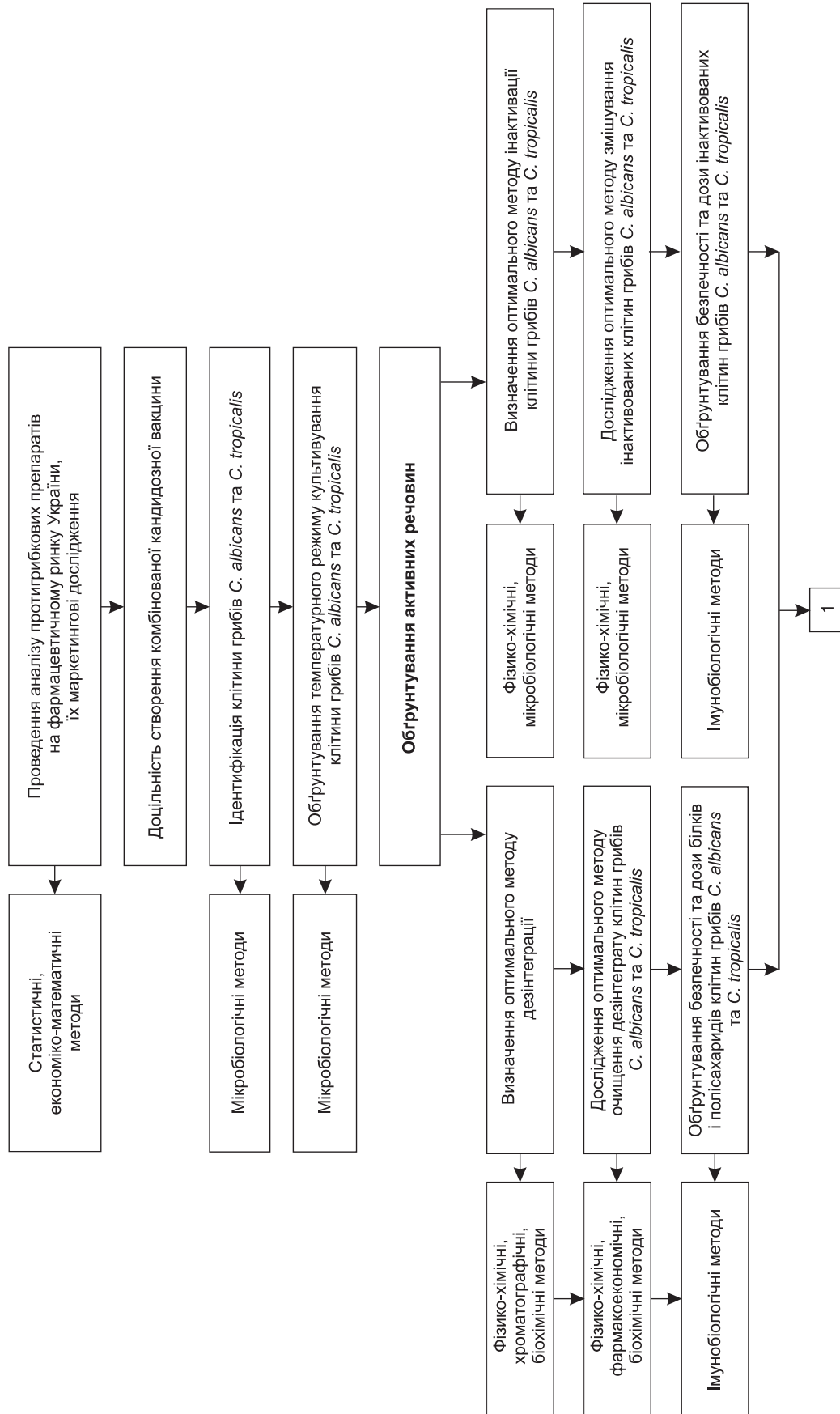
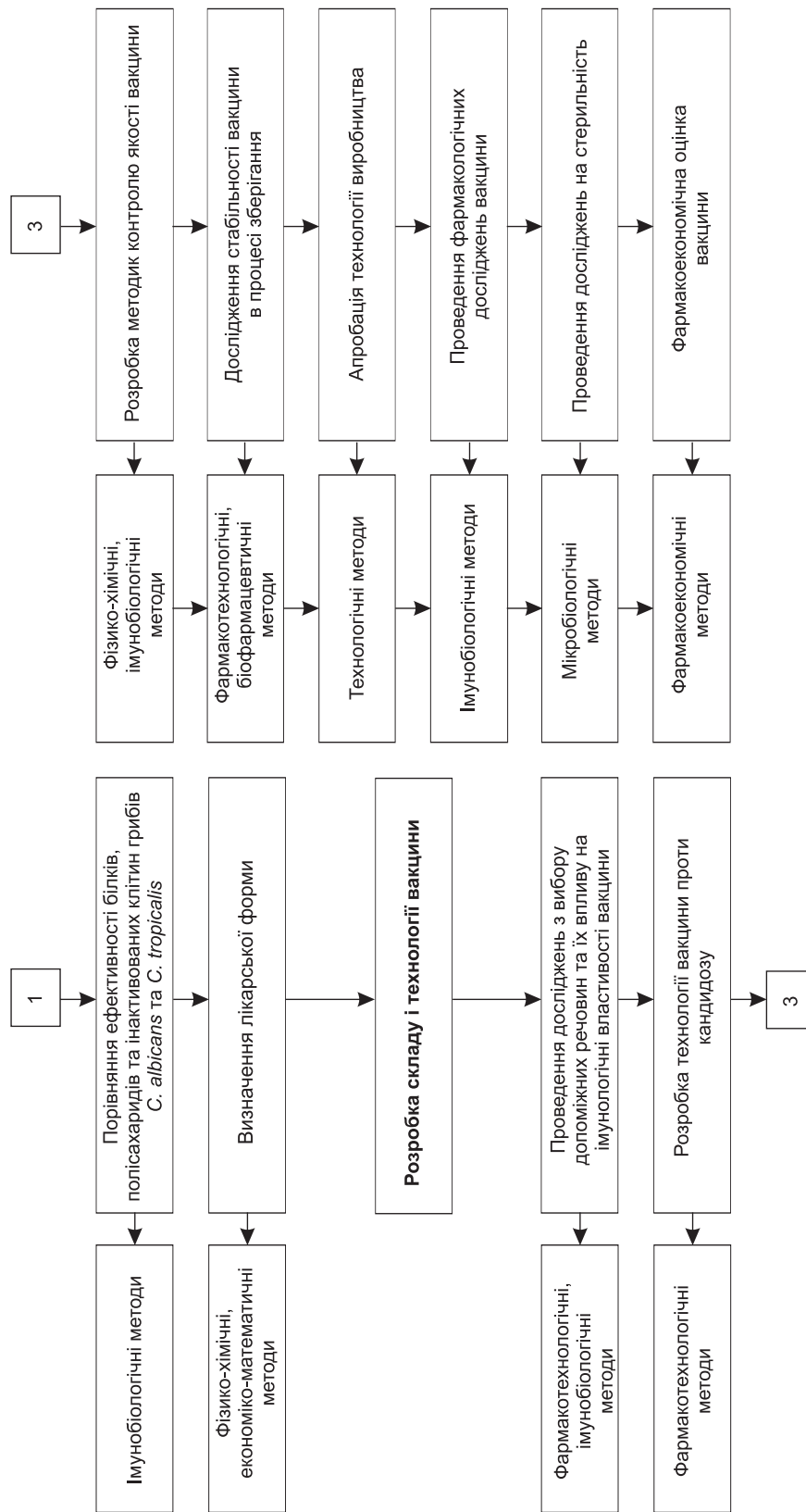


Рис. Методологія створення вакцини



Продовження рис. 1. Методологія створення вакцини

визначити терапевтичну ефективність вакцини, необхідно провести імунобіологічні дослідження з визначення титрів антитіл та ефективності при попередженні та лікуванні кандидозної інфекції.

При проведенні фармакологічних досліджень необхідно встановити фармакологічний тип дії і порівняти розроблену вакцину з потенційними конкурентами за фармакологічним ефектом.

При розробці нової вакцини у формі розчину для ін'єкцій необхідно розглянути основні вимоги до технологічного процесу:

- відтворюваність технології та виключення факторів, які негативно впливають на виробничий процес (підвищена температура, контамінація);
- мінімальна кількість виробничих етапів;
- наявність типового обладнання;
- мінімальна енергоємність технологічного процесу;
- належна система контролю якості в процесі промислового виробництва та зберігання.

Отже, було обґрунтовано методологію та розроблено план експериментальних досліджень зі створення ін'єкційного розчину вакцини для попередження та лікування кандидозу на основі клітин грибів роду *Candida*:

- аналіз етіології, патогенезу та клінічних проявів захворювання на кандидоз;
- аналіз стану фармакотерапії захворюваності на кандидоз;

- аналіз асортименту вакцин проти кандидозу та протигрибкових препаратів на фармацевтичному ринку;
- вибір активних речовин та обґрунтування їх концентрації;
- визначення технологічних параметрів одержання активних речовин;
- обґрунтування лікарської форми запропонованої вакцини;
- розробка раціональної технології для виробництва вакцини у промислових умовах;
- розробка методів аналізу та встановлення основних параметрів якості;
- валідація технологічного процесу та методів стандартизації;
- тестування технології виробництва вакцини проти кандидозу в промислових умовах;
- проведення фармакологічних досліджень вакцини;
- дослідження стабільності вакцини при зберіганні та визначення терміну придатності.

**Висновки.** Розроблено методологію створення вакцини для попередження та лікування кандидозної інфекції на основі клітин грибів роду *Candida*. Також розроблено план експериментальних досліджень вакцини, яка у майбутньому розширить вітчизняний фармацевтичний ринок вакцин.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

#### Перелік використаних джерел інформації

1. Kullberg, B. J. Invasive Candidiasis / B. J. Kullberg, M. C. Arendrup // N Engl J Med. – 2015. – Vol. 373. – P. 1445–1456. doi : 10.1056/nejmra1315399.
2. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review / S. Antinori, L. Milazzo, S. Sollima, M. Galli, M. Corbellino // NCBI. – 2016. – № 34. – P. 21–28. doi : 10.1016/j.ejim.2016.06.029.
3. Маркетингові дослідження ринку протигрибкових лікарських засобів для місцевого застосування / О. І. Тихонов, О. Є. Фролова, О. П. Гудзенко, С. В. Барнатович // Social pharmacy in health care. – 2015. – Т. 2, № 2. – С. 77–81.
4. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America / P. G. Pappas, C. A. Kauffman, D. R. Andes, et al. // Clin Infect Dis. – 2016. – 62:e1.
5. Cassone, A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer / A. Cassone // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11. – P. 884–891. doi : 10.1038/nrmicro3156.
6. Vaccines in the treatment of invasive candidiasis / X. Wang, X. Sui, L. Yan, Y. Wang, Y. Cao, Y. Jiang // Virulence. – 2015. – Vol. 6, № 4. – P. 309–315. doi : 10.4161/21505594.2014.983015.
7. Краснопольский, Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Технология производства иммунобиологических препаратов / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.
8. Crommelin, D. J. A. Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications / D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, B. Meibohm. – 4th ed. – New York : Springer, 2013. – 490 p.

## References

1. Champion, E. W., Kullberg, B. J., Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373 (15), 1445–1456. doi:10.1056/nejmra1315399
2. Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., Corbellino, M. (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*, 34, 21–28. doi: 10.1016/j.ejim.2016.06.029.
3. Tykhonov, O. I., Frolova, O. Ye., Hudzenko, O. P., Barnatovych, S. V. (2015). *Social pharmacy in health care*, 2 (2), 77–81.
4. Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R. et al. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 62:e1.
5. Cassone, A. (2013). Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (12), 884–891. doi: 10.1038/nrmicro3156.
6. Wang, X., Sui, X., Yan, L., Wang, Y., Cao, Y., Jiang, Y. (2015). Vaccines in the treatment of invasive candidiasis. *Virulence*, 6 (4), 309–315. doi: 10.4161/21505594.2014.983015.
7. Krasnopol'skii, Yu. M., Borshchevskaia, M. Y. (2009). *Farmatsevticheskaia biotekhnolohiia. Tekhnolohiia proizvodstva immunobiologicheskikh preparatov*. Kharkov: NTU «KhPI», 352.
8. Crommelin, D. J. A., Sindelar, R. D., Meibohm, B. (2013). *Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications*. (4th ed.). New York: Springer, 490.

---

### Відомості про авторів:

**Рибалкін М. В.**, кандидат фармацевтичних наук, асистент кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет (<http://orcid.org/0000-0001-8887-1086>). E-mail: biotech@nuph.edu.ua

### Information about authors:

**Rybalkin M. V.**, Candidate of Pharmacy (Ph.D.), teaching assistant of the Department of Biotechnology, National University of Pharmacy (<http://orcid.org/0000-0001-8887-1086>). E-mail: biotech@nuph.edu.ua

### Сведения об авторах:

**Рыбалкин Н. В.**, кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры биотехнологии, Национальный фармацевтический университет (<http://orcid.org/0000-0001-8887-1086>). E-mail: biotech@nuph.edu.ua

Надійшла до редакції 13.03.2017 р.