

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**РИБАЛКІН МИКОЛА ВІКТОРОВИЧ**

УДК 615.014; 615.072; 616.594.171.2; 615.371; 616-097

**НАУКОВЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ  
СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ІН'ЄКЦІЙНОГО РОЗЧИНУ  
ВАКЦИНИ «КАНДИДОЦИД» ДЛЯ ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА  
ЛІКУВАННЯ КАНДИДОЗУ**

**15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова  
фармація**

**АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора фармацевтичних наук**

**Харків-2018**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на базі кафедри біотехнології Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України, м. Харків.

**Науковий консультант:** доктор медичних наук, професор  
**ФІЛІМОНОВА НАТАЛІЯ ІГОРІВНА,**  
Національний фармацевтичний університет,  
завідувач кафедри мікробіології, вірусології  
та імунології.

**Офіційні опоненти:** доктор фармацевтичних наук, професор  
**КАЗАРІНОВ МИКОЛА ОЛЕКСАНДРОВИЧ,**  
ДП «Державний науковий центр лікарських  
засобів і медичної продукції»,  
в. о. завідувача лабораторії технології  
готових лікарських засобів, м. Харків;

доктор фармацевтичних наук, доцент  
**КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ ЮРІЙ МИХАЙЛОВИЧ,**  
Національний технічний університет  
«Харківський політехнічний інститут»,  
професор кафедри біотехнології і аналітичної хімії;

доктор фармацевтичних наук, професор  
**МАРТИНОВ АРТУР ВІКТОРОВИЧ,**  
ДУ «Інститут мікробіології та імунології  
імені І. І. Мечникова НАМН України»,  
завідувач лабораторії та клінічного  
відділу молекулярної імунофармакології, м. Харків.

Захист відбудеться 18 травня 2018 р. о 10.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.02 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий 17 квітня 2018 р.

Вчений секретар спеціалізованої  
вченої ради  
доктор фармацевтичних наук, професор

О. В. Посилкіна

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Останнім часом зріс інтерес дослідників до проблеми кандидозів у зв'язку зі збільшенням кількості хворих із цією патологією, що відзначається в усьому світі і має тенденцію до її подальшого зростання. Це пов'язано із впливом різних факторів: зміною екології навколишнього середовища, широким використанням хімічних засобів, нових медичних технологій, пандемією ВІЛ-інфекції та інших супутніх захворювань.

Захворюваність на кандидоз серед населення є досить розповсюдженою як в Україні, так і в усьому світі. За даними ВООЗ, 90 % жителів нашої планети мінімум раз у житті мали грибкові захворювання, з них 70 % становлять жінки, які у 50 % випадків схильні до рецидивів, а 5 % лікарі визнали хронічно хворими. Окрім того, з року в рік захворюваність на кандидоз тільки зростає. Півстоліття тому на кандидоз хворіли лише 5 % людей на планеті. Інвазійні кандидози, а саме кандидемія та гострий дисемінований, або генералізований, кандидоз, характеризуються тяжкістю клінічних проявів та високою летальністю 30–70 %.

Лікарський арсенал вітчизняної мікології при етіотропній фармакотерапії обмежений чотирма групами препаратів, з яких основні представлені антифунгальними антибіотиками і похідними азолу. Антибіотики, як правило, володіють вузьким спектром дії, ефективні стосовно бактеріальної флори, що створює значні незручності в терапії кандидозів, ускладнених бактеріальним компонентом. Похідні азолу також не позбавлені серйозних недоліків. Їх тривале та системне застосування призводить до кумуляції в організмі, викликає пригнічення імунної системи, статевих і надниркових залоз. Крім того, традиційна фармакотерапія мікозів часто призводить до появи резистентних штамів патогенних мікроорганізмів, алергічних проявів і порушень нормального біоцинозу. У 2016 році був спалах захворюваності з летальністю 60 %, викликаний грибом *Candida auris*, який нечутливий до усіх протигрибкових лікарських засобів (ЛЗ).

У зв'язку з цим для терапії кандидозних захворювань є перспективним застосування специфічної стимуляції захисних механізмів організму. Для цього актуально розробити вакцину на основі грибів роду *Candida* для профілактики та лікування кандидозної інфекції. Подібні дослідження зараз активно проводяться за кордоном.

Однак, незважаючи на гостру необхідність, кандидозні вакцини на сьогодні в Україні не випускаються, не зареєстровано жодної вітчизняної або імпоротної кандидозної вакцини. Тобто розробка вакцини для попередження та лікування кандидозної інфекції є актуальним питанням для вітчизняної фармації і медицини.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження лікарських засобів на основі природної та синтетичної сировини» (№ 0114U000945), тема дисертаційної

роботи затверджена на засіданні вченої ради Національного фармацевтичного університету (протокол № 11 від 31.08.2017).

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи є обґрунтування методологічних підходів щодо розробки складу і технології інноваційного ін'єкційного розчину вакцини (ІРВ) для попередження та лікування кандидозу (ПЛК), який містить асоційовані антигени грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

Реалізація поставленої мети вимагала вирішення таких завдань:

- провести аналіз та узагальнити дані наукових інформаційних джерел щодо етіології, патогенезу і сучасних аспектів лікування захворювань на кандидоз;
- розробити методологічні принципи створення ІРВ для ПЛК на підставі фізико-хімічних, імунологічних та біологічних досліджень;
- розробити комплексну національну термінологію щодо ІЛЗ, а саме вакцин, у вигляді фармакопейної статті;
- провести маркетинговий аналіз асортименту протикандидозних ЛЗ на вітчизняному фармацевтичному ринку;
- теоретично та експериментально обґрунтувати технологію культивування грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* для накопичення біомаси, з якої планується одержати ІРВ для ПЛК;
- теоретично та експериментально обґрунтувати технологію інактивації та подальшого змішування клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* для створення ІРВ на підставі фізико-хімічних, імунологічних та біологічних досліджень;
- теоретично та експериментально обґрунтувати технологію дезінтеграції клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* і подальшого очищення розчину білків і полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* для створення ІРВ для ПЛК на підставі фізико-хімічних, імунологічних та біологічних досліджень;
- дослідити склад білків та полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*;
- порівняти результати імунологічних та біологічних досліджень асоційованих інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з очищеним розчином асоційованих білків, полісахаридів клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*;
- обґрунтувати склад ІРВ на підставі фізико-хімічних, імунологічних та біологічних досліджень;
- обґрунтувати та експериментально розробити промислову технологію виробництва ІРВ для ПЛК;
- визначити тип упаковки, умови і термін зберігання ІРВ;
- розробити проект методів контролю якості (МКЯ) розробленого ІРВ;
- узагальнити результати органолептичних, фізико-хімічних, імунологічних та біологічних досліджень розробленого ІРВ;
- провести апробацію технології розробленого ІРВ у промислових умовах;
- результати проведених досліджень впровадити у навчально-науковий процес низки вищих фармацевтичних і медичних освітніх закладів.

**Об'єкт дослідження:** інактивовані клітини, білки та полісахариди грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*; ІРВ «Кандидоцид».

**Предмет дослідження.** Предметом дослідження є науковий підхід до обґрунтування складу і розробки промислової технології ІРВ «Кандидоцид» для ПЛК, а також розробка фармакопейної статті ДФУ «Термінологія, яку використовують у монографіях на ІЛЗ».

**Методи дослідження.** При вирішенні окреслених у роботі завдань були використані такі методи дослідження: органолептичні (зовнішній вигляд, колір тощо), фізико-хімічні (рН, паперова хроматографія, електрофорез тощо), імунобіологічні (імуноферментний аналіз (ІФА), біологічні (мікробіологічні та фармакологічні) та статистичні. Обробку експериментальних даних проводили за допомогою методів математичної статистики згідно з вимогами ДФУ з використанням прикладних комп'ютерних програм Statistica 6.0 та MS Excel 7.0. із застосуванням статистичних методів: Хі-квадрат, однофакторний дисперсійний аналіз та ін.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше запропоновано науково-методологічний підхід до створення ІРВ для ПЛК, сутність якого полягає в розробці складу та технології асоційованих антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

Сформульовано основні терміни вакцин, що були покладені в основу створення вітчизняної нормативної бази щодо ІЛЗ.

Уперше на підставі фізико-хімічних, імунологічних та біологічних досліджень теоретично та експериментально обґрунтовано склад і розроблено раціональну технологію нового ІРВ під умовною назвою «Кандидоцид» на основі клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, який може бути використаний для ПЛК.

Уперше досліджено імунногенну дію інактивованих клітин, білків і полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при внутрішньом'язовому та підшкірному шляху введення. При розробці лікарських засобів системної дії обрано оптимальний шлях уведення інактивованих клітин, білків і полісахаридів грибів. Установлено синхронне зростання титрів антитіл у вісім разів та ефективності дії, що становить 90 % при внутрішньом'язовому шляху уведення інактивованих клітин, білків і полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. Встановлено, що при фармацевтичній розробці ІРВ найбільш ефективною буде вакцина на основі білків і полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, оскільки вона максимально очищена від баластних речовин, які можуть викликати побічні імунні реакції.

Визначено критичні параметри у процесі виробництва ІРВ «Кандидоцид»: температура технологічного процесу дезінтеграції –  $25 \pm 2$  °С, час роботи ультразвукового випромінювача – 15 хв при інтенсивності 5 Вт/см<sup>2</sup>, час перемішування та режим роботи мішалки – 15 хв зі швидкістю обертання 100 об/хв.

Експериментально доведено стабільність, встановлено термін і умови зберігання розробленого ІРВ «Кандидоцид» – 2 роки у флаконах із непрозорого нейтрального скла першого класу. Розроблено проект контролю якості (МКЯ).

Новизна досліджень захищена 2 патентами України на корисну модель від 27.10.2014 р. № 94138 «Імунобіологічний препарат для попередження та лікування кандидозної інфекції» та від 27.10.2014 р. № 94139 «Спосіб одержання імунобіологічного препарату для попередження та лікування кандидозної інфекції».

**Практичне значення одержаних результатів.** Уперше на підставі проведених досліджень створено та запропоновано для практичної медицини і фармації новий ІРВ «Кандидоцид» для ПЛК.

Розроблено нормативну базу щодо термінології ІЛЗ у вигляді загальної фармакопейної статті «Термінологія, яку використовують у монографіях на імунобіологічні лікарські засоби» (5.2.1.) розділу 5.2. «Загальні тексти на біологічні лікарські засоби», яка запланована до внесення у ДФУ 2.0 Доповнення 3 (лист ФЦ № 11/918-5 від 6.09.2017 р.).

Розроблено проект технологічного регламенту та МКЯ на виробництво ІРВ «Кандидоцид», які апробовано в промислових умовах ТОВ МНВЦ «Біосан», м. Вінниця (акт апробації від 15.12.2014 р.) – виробництво ІРВ внесено до перспективного плану розвитку на 2020 р., ПАТ «Фармстандарт-Біолік», м. Харків (акт апробації від 8.09.2017 р.) – виробництво ІРВ внесено до перспективного плану розвитку на 2020–2021 р., ТОВ «Фонд «Здоров'я нації», м. Дніпро (акт апробації від 12.09.2017 р.) – виробництво ІРВ внесено до перспективного плану розвитку на 2020–2021 р.

Досліджено та підтверджено на тваринах імунологічну ефективність і безпечність ІРВ «Кандидоцид» на базі ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України» (фармакологічний звіт від 4.04.2013 р. № 154).

Підготовлено та ухвалено Українським центром наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи МОЗ України два інформаційні листи: № 119-2015 «Імунобіологічний лікарський засіб для попередження та лікування кандидозної інфекції» та № 214-2015 «Спосіб одержання розчину імунобіологічного лікарського засобу для попередження та лікування кандидозної інфекції», які упроваджено в роботу науково-дослідних лабораторій: мікробіологічних та паразитологічних досліджень ДВНЗ «Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» (акт впровадження від 20.03.2017 р.), мікробіологічних та імунологічних досліджень Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 1.03.2017 р.), протимікробних засобів ДУ «Інституту мікробіології і імунології імені І. І. Мечникова НАМН України» (акт впровадження від 14.03.2017 р.), лабораторії та клінічного відділу молекулярної імунофармакології ДУ «Інституту мікробіології і імунології імені І. І. Мечникова НАМН України» (акт впровадження від 20.10.2017 р.), ТОВ МНВЦ «Біосан», м. Вінниця (акт апробації від 25.10.2017 р.), ПАТ «Фармстандарт-Біолік», м. Харків (акт апробації від 5.10.2017 р.) та науково-дослідної ТОВ «Фонд «Здоров'я нації», м. Дніпро (акт апробації від 27.10.2017 р.).

Здобувачем запропоновані теоретичні і методичні підходи, які створюють методичне підґрунтя для подальших розробок у галузі створення сучасних вакцин на основі асоціації антигенів грибів, зокрема методичні рекомендації та монографія.

Методичні рекомендації «Методи дезінтеграції мікроорганізмів та подальшого очищення для одержання антигенів», «Методи інактивації мікроорганізмів та подальшого змішування для одержання антигенів» і «Компоненти вакцин та методи їх обґрунтування», затверджені ПК «Фармація» МОЗ і НАМН України (протокол № 102 від 19.04.2017 р.),

Методичні рекомендації упроваджені в роботу науково-дослідної лабораторії мікробіологічних та імунологічних досліджень Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 9.11.2017 р.), лабораторії та клінічного відділу молекулярної імунофармакології ДУ «Інституту мікробіології і імунології імені І. І. Мечникова НАМН України» (акт впровадження від 7.11.2017 р.), лабораторії готових лікарських засобів ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції» (акт апробації від 13.11.2017 р.) ТОВ МНВЦ «Біосан», м. Вінниця (акт апробації від 10.11.2017 р.), ПАТ «Фарм-стандарт-Біолік», м. Харків (акт апробації від 8.11.2017 р.) і ТОВ «Фонд «Здоров'я нації», м. Дніпро (акт апробації від 14.11.2017 р.).

Монографія «Загальна характеристика вакцин та технологія виробництва (на прикладі розробки інкційного розчину вакцини для попередження та лікування кандидозу)», затверджена вченою радою Національного фармацевтичного університету (протокол № 1 від 27.09.2017 р.).

Монографія упроваджена у навчальний процес кафедр: промислової фармації Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 9.11.2017 р.); мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 13.11.2017 р.); біотехнології Харківської державної зооветеринарної академії (акт впровадження від 14.11.2017 р.); управління та економіки фармації з технологією ліків ДВНЗ «Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (акт впровадження від 10.11.2017 р.).

Результати досліджень також упроваджені у навчальний процес кафедр: технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка» (акт впровадження від 27.03.2017 р.); фармації (акт впровадження від 2.03.2017 р.) та фармації Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (акт впровадження від 20.03.2017 р.); промислової фармації Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 1.03.2017 р.); біотехнології імені Ф. І. Осташко Харківської державної зооветеринарної академії (акт впровадження від 14.03.2017 р.); біотехнології, біофізики і аналітичної хімії Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» (акт впровадження від 24.05.2017 р.); технології ліків Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 27.03.2017 р.); внутрішньої медицини № 2 і клінічної імунології та алергології Харківського національного медичного університету (акт впрова-

дження від 25.05.2017 р.); біотехнології ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет» (акт впровадження від 22.03.2017 р.)

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Особисто дисертантом визначено мету дослідження, завдання для її досягнення та шляхи її реалізації, методологію досліджень; здійснено планування усіх експериментальних робіт; вивчено, проаналізовано й узагальнено сучасні дані наукової літератури за цим напрямком; проведено експериментальну роботу за темою дисертації і науковий аналіз отриманих результатів фізико-хімічних, імунологічних та біологічних досліджень; теоретично обґрунтовано і розроблено склад і технологію ІРВ «Кандидоцид»; складено й оформлено проект технологічного регламенту та МКЯ; узагальнено результати експериментальних досліджень із вивчення активності та нешкідливості ІРВ; складено проект загальної фармакопейної статті ДФУ з термінології ІЛЗ.

Усі наукові узагальнення, положення, результати, висновки та рекомендації, що викладені в дисертації, отримано автором самостійно. З наукових праць, опублікованих у фахових наукових виданнях у співавторстві (за списком опублікованих праць за темою дисертації), дисертантом визначені методологія і методи дослідження, прийнято участь у плануванні та проведенні експериментальних досліджень, проведено аналіз і узагальнення одержаних результатів, підготовлені матеріали до друку.

Співавторами наукових праць дисертанта захищені такі дисертації: Філімоною Н. І. «Мікробіологічне обґрунтування раціонального сумісного використання глюкокортикоїдів і нестероїдних протизапальних засобів з антибіотиками», м. Харків, 2004 р.; Стрельниковим Л. С. «Технологічні і біофармацевтичні аспекти створення ліпосомальних препаратів на основі біологічно активних дисперсійних середовищ», м. Харків, 1992 р.; Стрілець О. П. «Наукове і експериментальне обґрунтування складу і технології комбінованих таблетованих лікарських форм антигіпертензивної дії», м. Харків, 2013 р.; Калюжною О. С. «Розробка складу і технології супозиторіїв з пробіотиками», м. Харків, 2010; Дядюн Т. В. «Розробка складу та технології супозиторіїв на основі N, N'-дібензіламіда малонової кислоти», м. Харків, 2011 р.; Ковальовим В. В. «Розробка складу та технології м'якої лікарської форми з екстрактом хлорофіліпту», м. Харків, 2009 р.; Азаренко Ю. М. «Розробка технології та дослідження супозиторіїв з фенольним гідрофобним препаратом прополісу», м. Харків, 1999 р.; Кононенко Н. М. «Еритроцитарна і лейкоцитарна ланки системи гемостазу в нормі та механізми їх порушень при гастральних виразках», м. Харків, 2009 р.; Івахненко О. Л. «Розробка складу та технології м'якої лікарської форми з катіазином», м. Харків, 2015 р.; Бурикіною (Чікіткіною) О. М. «Фармакологічне обґрунтування застосування комбінованого засобу глікверин при цукровому діабеті», м. Одеса, 2016 р.; Новіковим В. П. «Синтез, будова і реакційна здатність хіноїдних та семіхіноїдних сполук», м. Львів, 1995 р.

Постановка мети та завдань, обговорення результатів проведені разом із науковим консультантом.



**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи викладені й обговорені на: Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих вчених «Сучасні аспекти медицини і фармації» (Чернівці, 2014); XX Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених і студентів «Actual Questions of Development of New Drugs» (Харків, 2014); 79-й Всеросійській науковій конференції студентів і молодих учених із міжнародною участю «Молодежная наука и современность», присвяченій 79-річчю КДМУ (Курськ, 2014); XIII International Congress of Medical Sciences for students and young doctors (Софія, 2014); XXXI Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів» (Харків, 2014); IV Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (Харків, 2014); Міжнародній науково-практичній конференції «Фармацевтична мікробіологія і клінічна лабораторна діагностика» (Харків, 2014); II Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів та молодих учених «Новітні тенденції в медицині та фармації» (Чернівці, 2015); 69-й науково-практичній конференції студентів і молодих учених з міжнародною участю «Актуальные проблемы современной медицины и фармации» (Мінськ, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених і студентів «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2015); X Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченій 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2016); VII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 2016); VI науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2016); XI науково-практичній конференції молодих учених і студентів ТДМУ ім. Абуалі ібні Сіно з міжнародною участю «Медицинская наука: достижения и перспективы» (Душанбе, 2016); XX Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини» (Тернопіль 2016); IV науково-практичній конференції школи молодих науковців ПАТ «Фармак» «Наука та сучасне фармацевтичне виробництво» (Київ, 2016), VI Науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (Харків, 2017).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опублікована 61 наукова праця, з них: 2 патенти України на корисну модель, 34 статті у наукових фахових виданнях (6 із яких опубліковано у закордонних виданнях, 2 – цитуються наукометричною базою даних SCOPUS), 6 є моно статтями, 2 патенти на корисну модель, 3 методичні рекомендації, 2 інформаційні листи, 1 монографія, 1 навчальний посібник і 18 тез доповідей.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 396 сторінках машинопису, складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), об'єктів і методів дослідження (розділ 2), експериментальної частини (розділи 3–6),

загальних висновків, списку використаних літературних джерел та додатків. Обсяг основного тексту – 278 сторінки. Робота ілюстрована 68 таблицями та 43 рисунками. Бібліографія містить 353 джерела, з них 199 латинськими літрами.

### ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У *вступі* наведено актуальність теми, мету та основні завдання дисертаційних досліджень, відзначено наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів.

У *розділі 1 «Сучасні аспекти створення ін'єкційного розчину вакцини для попередження та лікування кандидозу»* проаналізовано та узагальнено сучасні дані наукової літератури щодо патогенетичних особливостей (етіології, патогенезу і клінічних проявів) та основних напрямків терапії захворювань на кандидоз. Установлено, що як у США та європейських країнах, так і в Україні існують труднощі діагностики та лікування кандидозів. Діагностика інфекційної патології в Україні здебільшого проводиться шляхом висівів на поживні середовища навіть без ідентифікації видів. Терапевтичні проблеми при лікуванні кандидозу також не рідкість. У літературі з'являються повідомлення, що через активне використання на протязі багатьох років одних і тих самих протигрибкових препаратів останнім часом гриби роду *Candida* часто виявляються не чутливими до них. Визначено, що друга проблема в усьому світі – все більша розповсюдженість різних видів грибів роду *Candida (non-albicans)*, деякі з них із самого початку нечутливі до азолів, з яких починають лікування. Багато дослідників вважають, що використання препаратів, які здатні стимулювати захисні імунні реакції протикандидозної інфекції, тобто вакцин, є перспективним напрямком у боротьбі з кандидозом і альтернативою протигрибковим препаратам. На цей час за кордоном низка різних кандидозних вакцин проходять стадію доклінічних досліджень, а дві вакцини – стадію клінічних випробувань (табл. 1).

Таблиця 1

#### Кандидозні вакцини у світі

Вид вакцини	Назва вакцини	Стадія дослідження
Жива послаблена	<i>C. albicans tet-NRG1</i>	Доклінічні дослідження
Білкові	Hsp90p, Hyr1p	
Вуглеводні	$\beta$ -манан, $\beta$ -глюкан	
Білкові та вуглеводні	<i>C. albicans</i> вакцина	
Білкові	Sap2p, rAls3p-N	Клінічні дослідження

Проаналізовано різні види вакцин залежно від способу одержання та складових. Досліджено вітчизняний фармацевтичний ринок вакцин й установлено, що в Україні не випускається і не зареєстровано жодної вакцини для ПЛК. Розглянуто особливості технології вакцин, зазначено основні недоліки та переваги, які виникають при створенні різних лікарських форм.

На основі проведеного аналізу даних наукової літератури обґрунтовано актуальність створення нового вітчизняного асоційованого ІРВ для ПЛК на основі біомаси грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

У розділі 2 «Обґрунтування загальної концепції і методів досліджень» викладено загальну методологію досліджень, яка відображає сутність роботи та полягає у виконанні низки наукових завдань із метою створення нового ІРВ для ПЛК на основі клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. Розроблена методологічна концепція базується на послідовному проведенні фізико-хімічних, імунологічних та біологічних досліджень, які забезпечують відповідність запропонованої вакцини сучасним вимогам. На рис. 1 наведено методологію створення ІРВ для ПЛК на основі клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

Представлено об'єкти досліджень, з'ясовано властивості діючих і допоміжних речовин, на використанні яких базується створення вакцини. Обґрунтовано вибір методик для проведення фізико-хімічних, імунологічних та біологічних досліджень, які використовувалися у ході розробки складу, технології та оцінки якості дослідних зразків і готового ІРВ. Імунобіологічні дослідження проведено на базі Державної установи «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

Наведено основні результати роботи з розробки загальної фармакопейної статті «Термінологія, яку використовують у монографіях на імунобіологічні лікарські засоби» (5.2.1) розділу 5.2 «Загальні тексти на біологічні лікарські засоби», яка запланована до внесення у ДФУ 2.0 Доповнення 3 (лист ФЦ № 11/918-5 від 6.09.2017 р.).

У розділі 3 «Наукове та експериментальне обґрунтування технології одержання антигенів на основі інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*» наведено результати теоретичних та експериментальних досліджень з обґрунтування методу інактивації та змішування клітин грибів і подальших досліджень із визначення нешкідливості та імуногенності для ПЛК як окремо, так і в асоціації.

Першим етапом роботи був вибір температурного режиму та часу для культивування біомаси грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* на поживному середовищі агар Сабуру. Для цього були використані штами грибів *C. albicans* АТСС 1023 та *C. tropicalis* АТСС 20336, які зберігалися в музеї культур Державної установи «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків. На основі мікробіологічних досліджень на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету нами було обрано оптимальну температуру ( $25 \pm 2$ ) °С упродовж 6 діб культивування клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* третьої генерації.

Наступним етапом досліджень стало визначення оптимального методу інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

Спочатку досліджували вплив температури. Суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* із концентрацією  $8 \times 10^8$ - $8 \times 10^9$  у 1 мл, окремо інактивували при температурі ( $30 \pm 2$ ) °С, ( $40 \pm 2$ ) °С та ( $50 \pm 2$ ) °С протягом 30 хв і при температурі ( $50 \pm 2$ ) °С протягом 45 та 60 хв при постійному перемішуванні електромішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв. Результати досліджень наведені на рисунках 2 і 3.



Рис. 1 Схема методології створення ІРВ для ПЛК (початок)

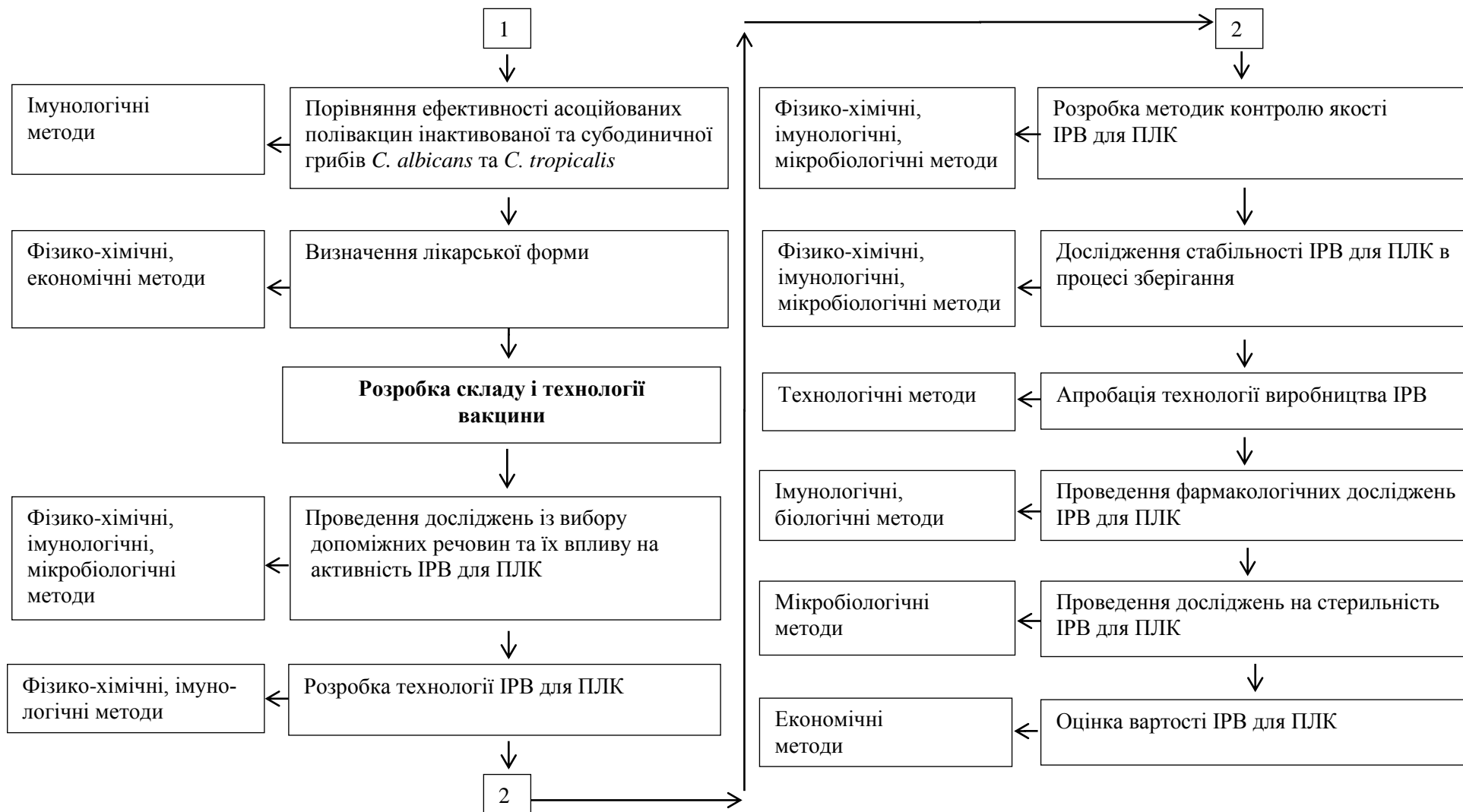


Рис. 1 Схема методології створення ІРВ для ПЛК (закінчення)

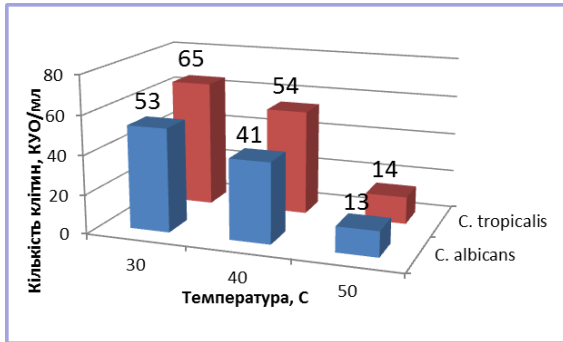


Рис. 2 Залежність інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від величини температури при експозиції 30 хв,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

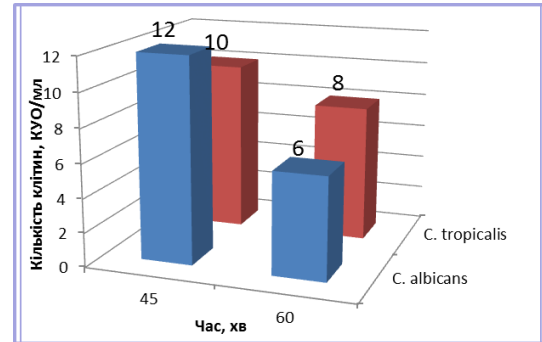


Рис. 3 Залежність інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від часу при температурі  $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Далі досліджували вплив УФ-випромінювання з довжиною хвилі 250 нм протягом 30, 45 та 60 хв. Результати досліджень наведені на рис. 4.

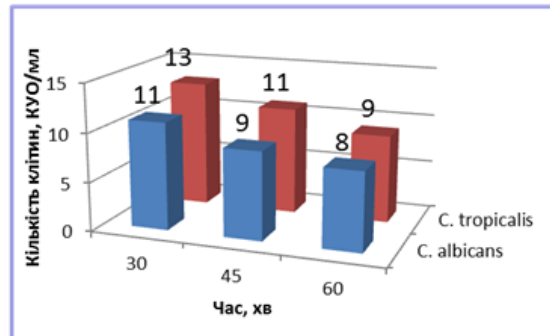


Рис. 4 Залежність інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від часу УФ-випромінювання,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Далі досліджували вплив ультразвуку: використовували ультразвукове випромінювання з частотою 22 кГц та інтенсивністю 0,5, 0,7 і 1,0 Вт/см<sup>2</sup> протягом 30 хв; інтенсивність 1,0 Вт/см<sup>2</sup> протягом 45 та 60 хв. Результати досліджень наведені на рисунках 5 і 6.

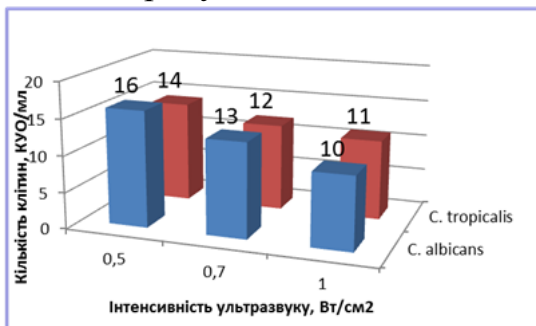


Рис. 5 Залежність інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від інтенсивності ультразвуку при експозиції 30 хв,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

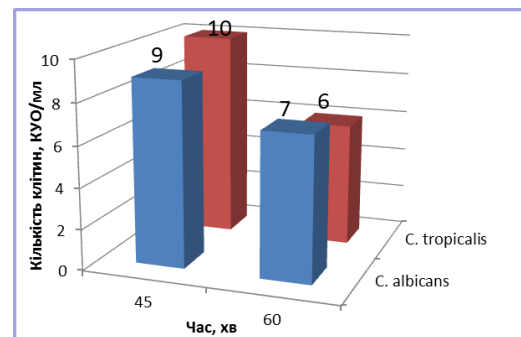


Рис. 6 Залежність інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від часу при інтенсивності ультразвуку 1 Вт/см<sup>2</sup>,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

На наступному етапі досліджували вплив формаліну на інактивацію клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. До суспензій грибів окремо додавали формалін з концентрацією 0,3, 0,4 та 0,5 %, перемішували електромішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 5 хв та залишали на 12 годин. Далі використовували формалін із концентрацією 0,5 % протягом 24 і 36 годин при температурі  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Результати досліджень наведені на рисунках 7 і 8.

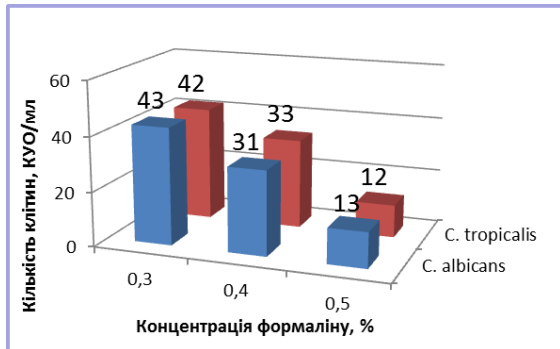


Рис. 7 Залежність інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від концентрації формаліну при експозиції 12 год,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

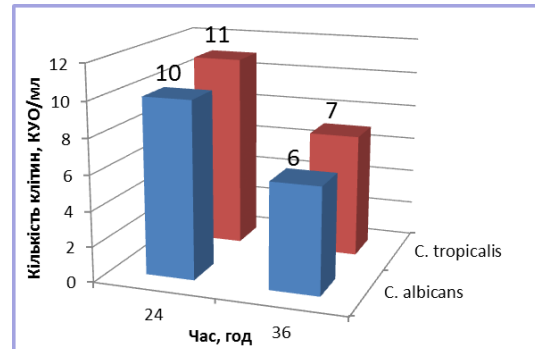


Рис. 8 Залежність інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від часу при концентрації формаліну 0,5 %,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Потім досліджували комплексний метод інактивації. Суспензії клітин грибів інактивували при температурі  $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$  протягом 1 години при постійному перемішуванні електромішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв. Після чого до кожної суспензії грибів додавали формалін, доводячи його кінцеву концентрацію у суспензіях до 0,5 %, перемішували електромішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 5 хв і залишали на 24 та 36 год при температурі  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .

За результатами досліджень встановлено, що найменш ефективними щодо інактивації клітин грибів були термічний (температура  $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$  при експозиції 30 хв) та хімічний (формалін у концентрації 0,3 % при експозиції 12 годин) методи. Значно ефективнішими були термічний – температура  $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$  та експозиція 60 хв, УФ-випромінювання – довжина хвилі 250 нм та експозиція 60 хв, ультразвуковий – інтенсивність випромінювання  $1 \text{ Вт/см}^2$ , хімічний – використання формаліну в концентрації 0,5 % при експозиції 36 год методи. Однак ці методи при таких параметрах не забезпечували повної інактивації клітин грибів. Лише комплексне використання фізичного та хімічного факторів, а саме температури  $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$  при експозиції 60 хв та обробки формаліном у концентрації 0,5 % при експозиції 24 і 36 год, забезпечує повну інактивацію клітин грибів – зафіксована відсутність росту колоній грибів.

Враховуючи, що кандидоз частіше за все викликають гриби *C. albicans* та *C. tropicalis*, було б доцільно перевірити асоційовані інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* для попередження і терапії кандидозу. Для одержання асоційованих інактивованих клітин грибів необхідно було провести процес змішування, який мав би забезпечити рівномірний розподіл інактивованих

клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* по всьому об'єму загальної суспензії клітин. Для цього можливе використання різних технологічних процесів – механічне та ультразвукове змішування. Для визначення оптимальних параметрів змішування використовували живі клітини грибів. Після процесу змішування відбирали проби, розводили та визначали в них кількість клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при культивуванні на щільному середовищі Гіса. Якщо кількість клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* була однаковою, то змішування відбулося повністю, а якщо кількість клітин грибів була різною, то не повністю.

При механічному змішуванні використовували перемішувальний пристрій з електричною мішалкою зі швидкістю обертання 50, 75 та 100 об/хв при експозиції 5 хв. Далі використовували швидкість обертання 100 об/хв при експозиції 10 та 15 хв в об'ємі 100 мл при змішуванні 50 мл суспензії живих клітин грибів *C. albicans* і 50 мл *C. tropicalis* із концентрацією клітин грибів в обох випадках 5 млн кл./мл.

Для проведення ультразвукового змішування використовували ультразвукову установку з параметрами роботи, які не призведуть до руйнування клітин: довжина хвилі – 22 кГц, інтенсивність – 0,3, 0,5 та 0,7 Вт/см<sup>2</sup>, експозиція – 5 хв в об'ємі 100 мл та інтенсивність – 0,7 Вт/см<sup>2</sup>, експозиція – 10 та 15 хв.

У результаті проведених досліджень було з'ясовано, що при механічному змішуванні електричною мішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв при експозиції 15 хв клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* рівномірно змішувалися, а при використанні ультразвуку з інтенсивністю 0,3, 0,5 та 0,7 Вт/см<sup>2</sup>, експозицією 5, 10 15 хв змішування було нерівномірним.

Досліджували окремі і асоційовані інактивовані клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* із різним вмістом клітин грибів на нешкідливість при підшкірному та внутрішньом'язовому уведенні. Далі проводили оцінку імуногенності щодо попередження та лікування генералізованого кандидомікозу інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при двократному уведенні з інтервалом 14 діб по 0,2 мл за титром специфічних антитіл і тестом активного захисту мишей, тобто імунологічну оцінку захисту тварин від летальних доз інфекції у порівнянні з інтактними тваринами. Для цього експериментальним шляхом була розроблена модель генералізованого кандидозу у білих мишей. Дослідження проводили на базі Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова». Для цього використовували набір реагентів для імуноферментного виявлення антитіл класу G до *C. albicans* за допомогою тест-системи ІФА «Вектор-Бест». Через відсутність наборів реагентів для імуноферментного виявлення антитіл класу G до *C. tropicalis* виявляли лише антитіла класу G до *C. albicans*.

За результатами досліджень можна зробити висновок, що внутрішньом'язовий шлях уведення окремих і асоційованих інактивованих клітин грибів *Candida* забезпечує кращі результати при попередженні та терапії кандидозної інфекції, ніж підшкірний. Також визначено, що для активації захисних функцій організму необхідно проводити двократне уведення інактивованих клітин грибів *Candida* з інтервалом 14 діб по 0,2 мл. Оптимальною концентрацією для



асоційованих інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* є 10 + 10 млн кл./мл (таблиці 2 і 3).

Таблиця 2

**Дослідження активності асоційованих інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при попередженні кандидозу**

Шлях введення	Інактивовані клітини грибів <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i> , млн кл./мл									
	Ефективність					Титри антитіл				
	5+5	6+4	4+6	10+10	Контроль	5+5	6+4	4+6	10+10	Контроль
	Кількість тварин, %									
	Здорові/Хворі/Загиблі									
	Після I ін'єкції									
в/м	0/100/0	0/100/0	0/100/0	10/90/0	0/0/100	1:(800 ± 33)	1:(800 ± 34)	1:(800 ± 35)	1:(800 ± 33)	1:(400 ± 16)
п/ш	0/100/0	0/100/0	0/100/0	0/100/0	0/0/100	1:(800 ± 35)	1:(800 ± 33)	1:(800 ± 34)	1:(800 ± 35)	1:(400 ± 18)
Після II ін'єкції										
в/м	70/30/0	70/30/0	70/30/0	90/10/0	0/0/100	1:(1600 ± 65)	1:(1600 ± 67)	1:(1600 ± 72)	1:(3200 ± 131)	1:(400 ± 17)
п/ш	30/70/0	30/70/0	30/70/0	50/50/0	0/0/100	1:(1600 ± 72)	1:(1600 ± 71)	1:(1600 ± 68)	1:(1600 ± 72)	1:(400 ± 16)
Через 1 місяць										
в/м	70/30/0	70/30/0	70/30/0	90/10/0	0/0/100	1:(1600 ± 64)	1:(1600 ± 72)	1:(1600 ± 67)	1:(3200 ± 142)	1:(400 ± 18)
п/ш	30/70/0	30/70/0	30/70/0	50/50/0	0/0/100	1:(600 ± 71)	1:(1600 ± 65)	1:(1600 ± 71)	1:(1600 ± 68)	1:(400 ± 17)
Через 3 місяці										
в/м	70/30/0	70/30/0	70/30/0	90/10/0	0/0/100	1:(1600 ± 67)	1:(1600 ± 71)	1:(1600 ± 68)	1:(3200 ± 138)	1:(400 ± 16)
п/ш	20/80/0	20/80/0	20/80/0	30/70/0	0/0/100	1:(600 ± 72)	1:(1600 ± 68)	1:(1600 ± 72)	1:(1600 ± 67)	1:(400 ± 18)

Примітка:  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Таблиця 3

**Дослідження активності асоційованих інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при терапії кандидозу**

Тварини	Здорові тварини	Хворі після 1-ої ін'єкції	Хворі після 2-ої ін'єкції
Титри АТ в ІФА для <i>C. albicans</i>	1:(350 ± 14)	1:(700 ± 28)	1:(2800 ± 112)
Ефективність	Здорові/Хворі/Загинули		
	100/0/0	30/70/0	90/10/0

Примітка:  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

За результатами проведених досліджень щодо попередження кандидозу встановлено, що при підшкірному шляху введення після другої ін'єкції найкращий результат був зафіксований при концентрації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* 10 + 10 млн кл./мл – ефективність становила 50 %, титри антитіл

зростали у 4 рази, через 3 місяці ефективність зменшувалася до 30 %, зростання титрів антитіл залишалось без змін. При внутрішньом'язовому шляху введення після другої ін'єкції найкращий результат був зафіксований при концентрації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*  $10 + 10$  млн кл./мл – ефективність становила 90 %, титри антитіл зростали у 8 разів, через 3 місяці ефективність і зростання титрів антитіл залишалось без змін. Тому для подальших досліджень було обрано саме цю концентрацію клітин грибів при двократному внутрішньом'язовому шляху введення.

Згідно з одержаними даними досліджень щодо терапії кандидозу встановлено, що при внутрішньом'язовому шляху введення після першої ін'єкції при концентрації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*  $10 + 10$  млн кл./мл ефективність становила 30 %, титри антитіл зростали у 4 рази, а після другої – ефективність становила 90 %, титри антитіл зростали у 8 разів.

Отже, асоційовані інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* володіють терапевтичною активністю, як і окремі інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. Однак при асоційованих інактивованих клітинах грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* є можливість введення лише однієї ін'єкції і вона діє одразу проти двох видів грибів – *C. albicans* та *C. tropicalis*. Тобто асоційовані інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* перспективніші, ніж окремі інактивовані клітини цих грибів.

**У розділі 4 «Наукове та експериментальне обґрунтування технології одержання антигенів на основі білків і полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*»** наведено результати теоретичних та експериментальних досліджень з обґрунтування методу дезінтеграції клітин грибів, визначення оптимального об'єму суспензії клітин грибів та їх концентрації. Охарактеризовано білковий та полісахаридний склад антигенів, обґрунтовано технологію очищення, лікарську форму та подальші дослідження з визначення нешкідливості й імуногенності щодо попередження та лікування кандидозної інфекції як окремо, так і в асоціації.

Для визначення оптимального методу для дезінтеграції клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* та вивільнення білків і полісахаридів нами була проведена дезінтеграція паралельно з використанням декількох методів з урахуванням усіх технологічних аспектів і з подальшим аналізом біохімічного складу одержаних речовин після центрифугування розчинів зі швидкістю обертання 3000 об/хв упродовж 15 хв. Для руйнування клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* були обрані найдоступніші, ефективні та недорогі фізичні методи: обробка ультразвуком, розтирання клітин із твердими матеріалами та заморожування – розморожування.

Спочатку досліджували вплив ультразвуку. Суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* із концентрацією  $8 \times 10^8 - 8 \times 10^9$  в 1 мл окремо піддавали дії ультразвуку на апараті УЗУУ-21 при частоті 22 кГц, інтенсивності 1, 5 та  $10 \text{ Вт/см}^2$  і температурі  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  упродовж 10 хв, а потім, виходячи з одержаних результатів, використовували інтенсивність  $5 \text{ Вт/см}^2$  упродовж 15 та 20 хв. Результати досліджень наведені на рис. 9.

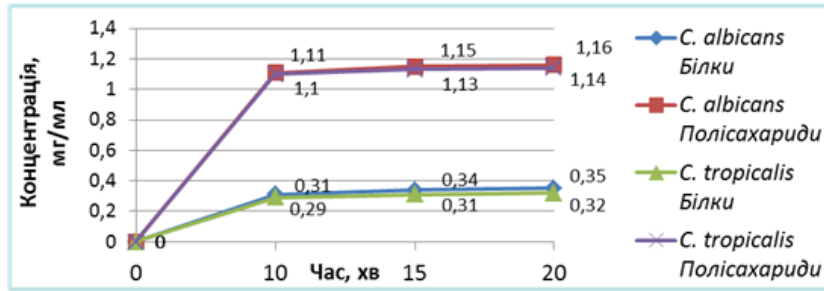


Рис. 9 Залежність концентрації білків та полісахаридів *C. albicans* та *C. tropicalis* від часу при інтенсивності ультразвуку  $5 \text{ Вт/см}^2$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Далі досліджували вплив розтирання, що робили у ступці товкачем протягом 10, 15 та 20 хв при температурі  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$  із кварцовим піском, який додавали до біомаси грибів у співвідношенні 1:1. Результати досліджень наведені на рис. 10.

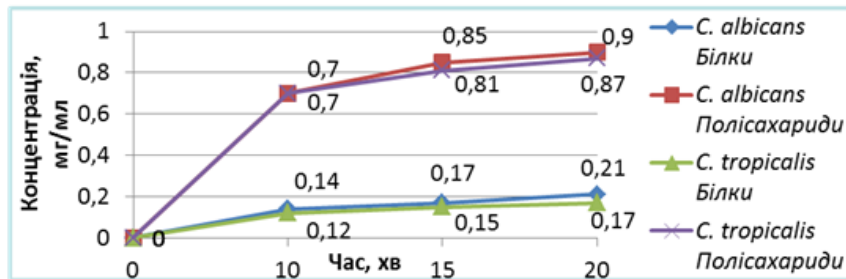


Рис. 10 Залежність концентрації білків та полісахаридів *C. albicans* та *C. tropicalis* від часу при розтиранні,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Потім досліджували вплив перепаду температур із циклом заморожування до температури мінус  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$  та розморожування до температури плюс  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$  протягом 10, 15 та 20 хв. Результати досліджень наведені на рис. 11.

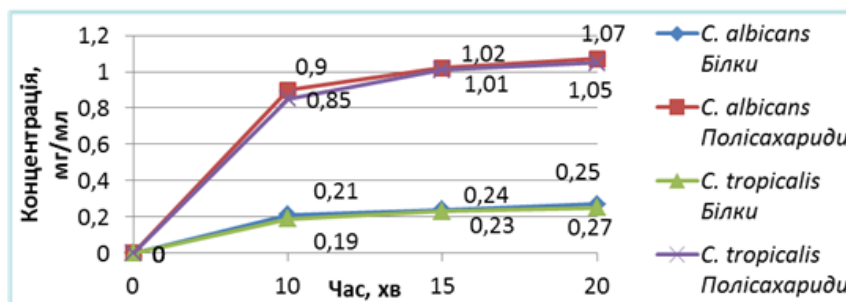


Рис. 11 Залежність концентрації білків та полісахаридів *C. albicans* та *C. tropicalis* від часу при заморожуванні та розморожуванні,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Результати вивчення складу одержаних розчинів білків, полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* свідчать, що найменша кількість білків та полісахаридів одержана фізичним методом розтирання при експозиції 10 хв. Найкращим методом дезінтеграції клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* є дія ультразвуку при інтенсивності  $5 \text{ Вт/см}^2$  упродовж 15 хв. Одержані розчини представлені сумішшю білків і полісахаридів.

Полісахариди клітин *C. albicans* склалися з моносахаридів  $\beta$ -манози ( $60,27 \pm 2,24$ ) %,  $\beta$ -глюкози – ( $30,41 \pm 1,23$ ) % і двох неідентифікованих моносахаридів ( $5,48 \pm 0,27$ ) % та ( $5,37 \pm 0,25$ ) %. Визначення моносахаридів проводили методом паперової хроматографії. Результати досліджень наведені на рис. 12. Полісахариди клітин *C. tropicalis* були представлені таким же спектром виявлених моносахаридів:  $\beta$ -манозою ( $65,38 \pm 2,61$ ) %,  $\beta$ -глюкозою – ( $25,12 \pm 1,02$ ) % і двома неідентифікованими моносахаридами ( $5,31 \pm 0,24$ ) % та ( $5,27 \pm 0,23$ ) %. Результати досліджень наведені на рис. 13.

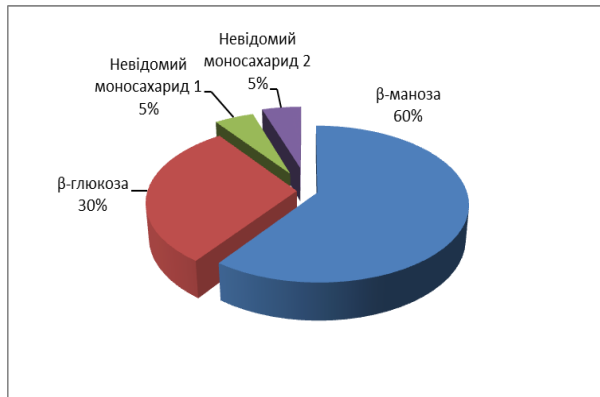


Рис. 12 Моносахаридний склад полісахаридів грибів *C. albicans*, % при  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

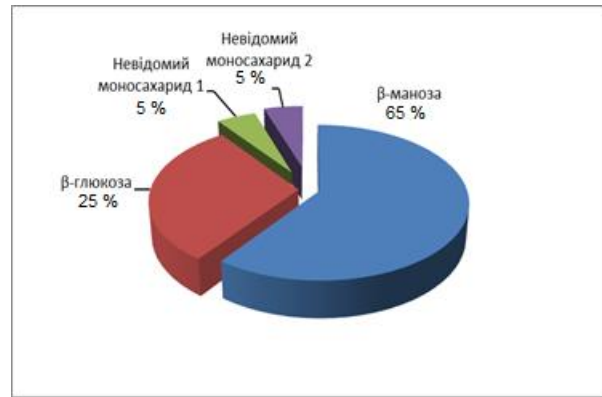


Рис. 13 Моносахаридний склад полісахаридів грибів *C. tropicalis*, % при  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Білкові фракції грибів *C. albicans* (рис. 14) та *C. tropicalis* (рис. 15) досліджували за допомогою електрофореза у 12,5 % поліакриламідному гелі. Для виявлення молекулярної маси антигенів використовували набори білків «Broad Range» (BIO-RAD). Отримані результати свідчать про домінування фракції білків із молекулярною масою 75 кДа у загальній суміші досліджуваних білків грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

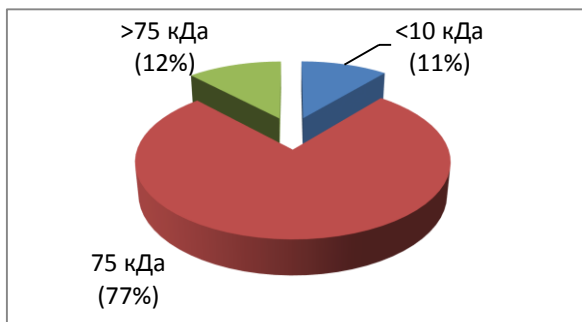


Рис. 14 Склад білків за молекулярною масою клітин грибів *C. albicans*, % при  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

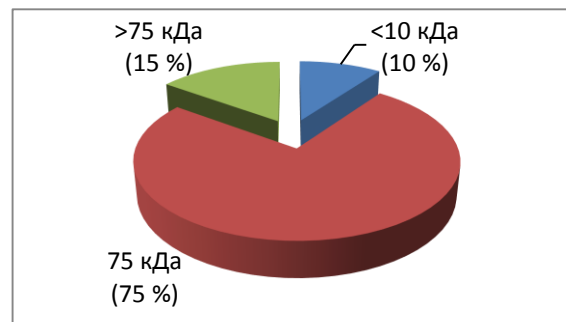


Рис. 15 Склад білків за молекулярною масою клітин грибів *C. albicans*, % при  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Для очищення білків, полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від супутніх низькомолекулярних фракцій використовували метод ультрафільтрації з мембранним фільтром «MF-Millipore» і розміром пор 0,05 мкм, який забез-

печує відділення баластних речовин із молекулярною масою менше 10 кДа. Одержану фракцію асоційованих білків та полісахаридів перевіряли в дослідах на мишах при попередженні і терапії кандидозів (таблиці 4 і 5).

Таблиця 4

**Дослідження активності асоційованих білків, полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з молекулярною масою більше 10 кДа при попередженні кандидозу**

Шлях уведення	Антигени грибів <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i> , концентрація білка, мг/мл									
	Ефективність					Титри антитіл				
	2 + 4	3 + 5	3 + 4	2 + 3	Контроль	2 + 4	3 + 5	3 + 4	2 + 3	Контроль
	Кількість тварин, %									
	Здорові/Хворі/Загиблі									
	Після I ін'єкції									
в/м	0/100/0	20/80/0	0/100/0	0/100/0	0/0/100	1:(800 ± 32)	1:(800 ± 35)	1:(800 ± 34)	1:(800 ± 36)	1:(400 ± 17)
п/ш	0/100/0	0/100/0	0/100/0	0/100/0	0/0/100	1:(800 ± 34)	1:(800 ± 33)	1:800 ± 32)	1:(800 ± 34)	1:(400 ± 18)
	Після II ін'єкції									
в/м	90/10/0	90/10/0	90/10/0	70//30/0	0/0/100	1:(3200 ± 132)	1:(3200 ± 142)	1:3200 ± 137)	1:(1600 ± 141)	1:(400 ± 16)
п/ш	70/30/0	70/30/0/	70/30/0	50/50/0	0/0/100	1:(1600 ± 65)	1:(1600 ± 67)	1:1600 ± 71)	1:(1600 ± 68)	1:(400 ± 17)
	Через 1 місяць									
в/м	90/10/0	90/10/0	90/10/0	70//30/0	0/0/100	1:(3200 ± 143)	1:(3200 ± 135)	1:3200 ± 142)	1:(1600 ± 67)	1:(400 ± 18)
п/ш	70//30/00	70//30/0	70//30/0	50/50/0	0/0/100	1:(1600 ± 72)	1:(1600 ± 67)	1:1600 ± 68)	1:(1600 ± 71)	1:(400 ± 16)
	Через 3 місяці									
в/м	70//30/0	90/10/0	70/30/0	50/50/0	0/0/100	1:(1600 ± 65)	1:(3200 ± 135)	1:1600 ± 72)	1:(1600 ± 67)	1:(400 ± 17)
п/ш	50/50/0	70//30/0	50/50/0	30/70/0	0/0/100	1:(1600 ± 67)	1:(1600 ± 71)	1:1600 ± 68)	1:(1600 ± 72)	1:(400 ± 18)

Примітка:  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Таблиця 5

**Дослідження активності асоційованих білків, полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з молекулярною масою більше 10 кДа при терапії кандидозу**

Тварини	Антигени грибів <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i> , концентрація білка, 4 мг/мл		
	здорові	хворі після 1-ої ін'єкції	хворі після 2-ої ін'єкції
Титри АТ в ІФА для <i>C. albicans</i>	1:(350 ± 15)	1:(700 ± 32)	1:(3200 ± 134)
Ефективність	Здорові/Хворі/Загинули		
	100/0/0	30/70/0	90/10/0

Примітка:  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Визначено, що для активації захисних функцій організму необхідне двократне введення асоційованих білків, полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* по 0,2 мл з інтервалом в 14 діб. У цьому випадку оптимальною концентрацією білків грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* є 3 та 5 мг/мл при співвідношенні 1:1.

За результатами проведених досліджень щодо попередження кандидозу встановлено, що при підшкірному шляху введення після другої ін'єкції у співвідношенні білків грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* (2 + 3) мг/мл ефективність становила 50 %, а у співвідношенні (2 + 4), (3 + 5), (3 + 4) мг/мл – 70 %, титри антитіл зростали у 4 рази в усіх указаних співвідношеннях. Через 3 місяці ефективність при співвідношенні білків грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* (3 + 5) мг/мл залишалась 70 %, а при співвідношенні (2 + 4), (3 + 4) мг/мл знизилась до 50 %, при всіх указаних співвідношеннях зростання титрів антитіл залишалось без змін. При внутрішньом'язовому шляху введення після другої ін'єкції найкращий результат було зафіксовано при співвідношенні білків грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* (2 + 4), (3 + 5), (3 + 4) мг/мл: ефективність становила 90 %, титри антитіл зростали у 8 разів. Через 3 місяці ефективність при співвідношенні білків грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* (3 + 5) мг/мл залишалась на рівні 90 %, а при співвідношенні (2 + 4), (3 + 4) мг/мл зменшувалась до 70 %, у всіх указаних співвідношеннях зростання титрів антитіл залишалось без змін. Для подальших досліджень було обрано співвідношення білків грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* (3 + 5) мг/мл як найоптимальніше при двократному внутрішньом'язовому введенні.

Згідно з одержаними даними при дослідженнях з терапії кандидозу встановлено, що при внутрішньом'язовому шляху введення після першої ін'єкції у співвідношенні білків грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* (3 + 5) мг/мл ефективність становила 30 %, титри антитіл зростали у 4 рази, а після другої – 90 %, титри антитіл зростали у 8 разів.

За результатами досліджень було визначено, що запропонована технологія очищення білків, полісахаридів *C. albicans* та *C. tropicalis* забезпечує збереження імуногенності при попередженні і терапії кандидозної інфекції. Розроблена технологія очищення білків, полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* наведена на рис. 16.

Отже, можна стверджувати, що ефективності асоційованих білків, полісахаридів і асоційованих інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* однакові. Але враховуючи той факт, що асоційовані білки, полісахариди грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* максимально очищені від супутніх речовин, які можуть впливати на результати імунологічних реакцій, на відміну від асоційованих інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, які містять цілі клітини з усіма компонентами, для подальших досліджень були обрані очищені асоційовані білків, полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

У розділі 5 «Наукове та експериментальне обґрунтування складу і технології ін'єкційного розчину вакцини під умовною назвою «Кандидоцид» для попередження та лікування кандидозу» наведено результати теоретичних та

експериментальних досліджень з обґрунтування складу і технології виготовлення ІРВ «Кандидоцид» для ПЛК на основі білків, полісахаридів клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

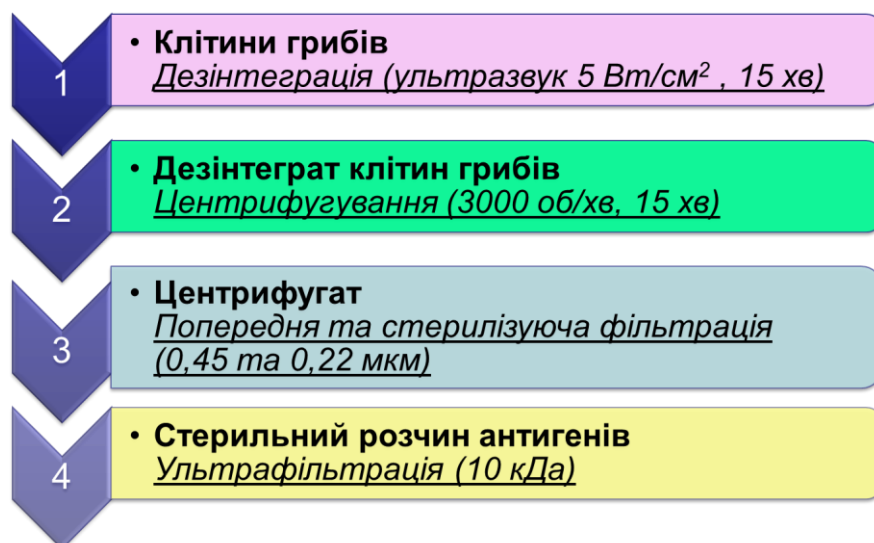


Рис. 16 Технологія очищення білків та полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*

На стадії розробки складу ІРВ необхідно було обґрунтувати розчинник. Для дослідження були обрані такі розчинники: вода для ін'єкцій, ізотонічний 0,9 % розчин натрію хлориду та фосфатний буферний розчин рН  $7,2 \pm 0,2$ . Дослідження проводили на мишах. Усі розчинники зберігали активність ІРВ (таблиці 6 і 7).

Таблиця 6

#### Обґрунтування розчинника у складі ІРВ при попередженні кандидозу

Розчинники	Титри АТ в ІФА для <i>C. albicans</i>		
	Здорові/Хворі/Загиблі		
	здорові	через 1 місяць	через 3 місяці
Вода для ін'єкцій	1:(350 ± 15)	1:(2800 ± 115)	1:(2800 ± 123)
	100/0/0	90/10/0	90/10/0
Р-н натрію хлориду	1:(300 ± 14)	1:(2400 ± 102)	1:(2400 ± 105)
	100/0/0	90/10/0	90/10/0
Фосфатний буферний р-н	1:(400 ± 17)	1:(3200 ± 132)	1:(3200 ± 147)
	100/0/0	90/10/0	90/10/0

Примітка:  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Враховуючи, що фосфатний буферний розчин зберігає постійне значення рН  $7,2 \pm 0,2$ , а також враховуючи, що ІЛЗ можуть втрачати активність під час зберігання при зміні рН середовища, важливо забезпечити збереження нейтрального значення рН ІРВ при його уведенні пацієнтам як оптимального при парентеральному уведенні речовин. Тому для подальших досліджень було обрано фосфатний буферний розчин.

## Обґрунтування розчинника у складі ІРВ при терапії кандидозу

Розчинники	Титри АТ в ІФА для <i>C. albicans</i>		
	Здорові/Хворі/Загиблі		
	здорові	хворі	після лікування
Вода для ін'єкцій	1:(350 ± 16)	1:(700 ± 31)	1:(2800 ± 121)
	100/0/0	0/100/0	90/10/0
Р-н натрію хлориду	1:(400 ± 17)	1:(800 ± 34)	1:(3200 ± 132)
	100/0/0	0/100/0	90/10/0
Фосфатний буферний р-н	1:(350 ± 15)	1:(700 ± 32)	1:(2800 ± 123)
	100/0/0	0/100/0	90/10/0

Примітка:  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Запропонований ІРВ доцільно випускати у багатодозових контейнерах для одночасної імунізації певної групи людей. Це пов'язано зі зниженням собівартості дози вакцини за рахунок зменшення витрат на первинну та вторинну упаковки, зменшенням кількості операцій при виробництві, скороченням місць для зберігання на складі і транспортування флаконів із вакциною, а також з процесом оптимізації вакцинації населення. Оскільки вакцинацію пацієнтів необхідно проводити під наглядом лікаря на території лікарні з метою можливості надання первинної допомоги, то доцільно для оптимального використання часу медпрацівників проводити групову імунізацію. Для багатодозових рідких ЛЗ існує необхідність уведення ефективного антимікробного консерванту, який визначають з урахуванням можливого забруднення ІРВ протягом використання і максимального рекомендованого терміну використання після розкриття контейнера. Досліджено вплив на активність вакцини таких консервантів: меркуртіолят (мертіолят або тимеросал), формальдегід та фенол. Дослідження проводили на мишах.

Результати вивчення ефективності зразків свідчать, що формальдегід у концентрації 0,4 % знижує ефективність ІРВ при попередженні кандидозу, а мертіолят у концентрації 0,01 % і фенол у концентрації 0,25 % зберігають активність ІРВ. Необхідно зазначити, що фенол є канцерогенною речовиною, однак його кількість в одній дозі об'ємом 0,2 мл надзвичайно мала. Мертіолят – це органічна соль ртуті, однак вона не містить чистої ртуті. Крім того, фенол і мертіолят добре себе зарекомендували як консерванти для вакцин упродовж багатьох років. Тому для подальших досліджень було обрано фенол і мертіолят (таблиці 8 і 9).

У результаті досліджень встановлено, що за ефективністю консервуючої дії критерію АДФУ відповідав консервант фенол у концентрації 0,25 %. Фенол у концентрації 0,2 % і мертіолят у концентрації 0,01 та 0,005 % не відповідали вимогам АДФУ. Згідно з отриманими результатами як консервант був обраний фенол у концентрації 0,25 %. Одержані дані свідчать про хімічну сумісність консерванта фенолу в концентрації 0,25 % та антигенів грибів *Candida* (АФІ).



**Обґрунтування консерванту у складі ІРВ при попередженні кандидозу**

Консерванти	Концентрація, %	Титри АТ в ІФА для <i>S. albicans</i>		
		Здорові/Хворі/Загиблі		
		здорові	через 1 місяць	через 3 місяці
Фенол	0,25	1:(350 ± 15)	1:(2800 ± 114)	1:(2800 ± 118)
		100/0/0	90/10/0	90/10/0
Мертіолят	0,01	1:(400 ± 17)	1:(3200 ± 131)	1:(3200 ± 142)
		100/0/0	90/10/0	90/10/0
Формальдегід	0,4	1:(300 ± 12)	1:(2400 ± 103)	1:(1200 ± 48)
		100/0/0	90/10/0	60/40/0
Контроль	–	1:(350 ± 17)	1:(2400 ± 107)	1:(2400 ± 105)
		100/0/0	90/10/0	90/10/0

Примітка: контроль – ІРВ без консерванту,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

**Обґрунтування консерванту у складі ІРВ при терапії кандидозу**

Консерванти	Концентрація, %	Титри АТ в ІФА для <i>S. albicans</i>		
		Здорові/Хворі/Загиблі		
		здорові	хворі	після лікування
Фенол	0,25	1:(350 ± 15)	1:(700 ± 31)	1:(2800 ± 115)
		100/0/0	0/100/0	90/10/0
Мертіолят	0,01	1:(400 ± 17)	1:(800 ± 34)	1:(3200 ± 131)
		100/0/0	0/100/0	90/10/0
Формальдегід	0,4	1:(400 ± 16)	1:(800 ± 33)	1:(3200 ± 135)
		100/0/0	0/100/0	80/20/0
Контроль	–	1:(400 ± 18)	1:(700 ± 32)	1:(3200 ± 133)
		100/0/0	0/100/0	90/10/0

Примітка: контроль – ІРВ без консерванту,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Посилення імунної відповіді на уведення вакцини можливе за рахунок додавання до вакцини різних ад'ювантів, які можуть підвищувати її активність, тобто стимулювати синтез антитіл і гальмувати усмоктування антигенів.

Досліджуваний ІРВ містить антигени грибів *S. albicans* із концентрацією білка 3 мг/мл та *S. tropicalis* із концентрацією білка 5 мг/мл у співвідношенні 1:1, тобто загальна концентрація білка становить 4 мг/мл. Враховуючи те, що запропонована вакцина у зазначеній концентрації білка володіє 90 % активністю при ПЛК, було доцільно дослідити уведення ад'юванту до складу розведеного ІРВ із концентрацією білка грибів 3 мг/мл.

ІРВ досліджували з різними ад'ювантами: гідроксид алюмінію та фосфат алюмінію. Були проведені дослідження з підтвердження сорбції між ад'ювантами та діючими речовинами.

Установлено, що додавання ад'ювантів до складу ІРВ не забезпечило вираженого захисного ефекту при попередженні кандидозу. Враховуючи те, що вакцина без ад'юванту містить меншу кількість допоміжних речовин, більш до-

цільно для подальших досліджень використовувати саме цей варіант (таблиці 10 і 11). За одержаними результатами для подальших досліджень було обрано ІРВ із консервантом фенолом у концентрації 0,25 % без ад'ювантів.

Таблиця 10

### Обґрунтування ад'юванту в складі ІРВ при попередженні кандидозу

Ад'юванти	Вміст ад'юванту, %	Титри АТ в ІФА для <i>C. albicans</i>		
		Здорові/Хворі/Загиблі		
		здорові	через 1 місяць	через 3 місяці
Гідроксид алюмінію	0,25	1:(350 ± 14)	1:(1400 ± 61)	1:(1400 ± 58)
		100/0/0	70/30/0	70/30/0
	0,20	1:(300 ± 12)	1:(1200 ± 53)	1:(1200 ± 51)
		100/0/0	60/40/0	60/40/0
Фосфат алюмінію	0,01	1:(300 ± 13)	1:(1200 ± 51)	1:(1200 ± 53)
		100/0/0	60/40/0	50/50/0
	0,005	1:(350 ± 15)	1:(1400 ± 57)	1:(1400 ± 61)
		100/0/0	70/30/0	60/40/0
Контроль	–	1:(400 ± 17)	1:(3200 ± 135)	1:(3200 ± 132)
		100/0/0	90/10/0	90/10/0

Примітка: контроль – ІРВ без ад'юванту,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

Таблиця 11

### Обґрунтування ад'юванту в складі ІРВ при терапії кандидозу

Ад'юванти	Вміст ад'юванту, %	Титри АТ в ІФА для <i>C. albicans</i>		
		Здорові/Хворі/Загиблі		
		здорові	хворі	після лікування
Гідроксид алюмінію	0,25	1:(400 ± 18)	1:(800 ± 33)	1:(1600 ± 64)
		100/0/0	0/100/0	70/30/0
	0,20	1:(350 ± 16)	1:(700 ± 30)	1:(1400 ± 57)
		100/0/0	0/100/0	60/40/0
Фосфат алюмінію	0,01	1:(350 ± 15)	1:(700 ± 28)	1:(1400 ± 58)
		100/0/0	0/100/0	60/40/0
	0,005	1:(400 ± 17)	1:(800 ± 35)	1:(1600 ± 67)
		100/0/0	0/100/0	60/40/0
Контроль	–	1:(400 ± 18)	1:(800 ± 34)	1:(3200 ± 134)
		100/0/0	0/100/0	90/10/0

Примітка: контроль – ІРВ без ад'юванту,  $n = 10$ ,  $P < 0,05$

На підставі проведених досліджень був запропонований такий склад ІРВ під умовною назвою «Кандидоцид» (на 1 мл):

Білки і полісахариди грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*

Концентрація білка в екстракті 4 мг/мл – 0,004 г

Концентрація полісахаридів в екстракті 17 мг/мл – 0,017 г

Фенол (0,25 %) – 0,025 г

Фосфатний буфер – до 1 мл.

Розроблено технологічну (рис. 17) й апаратурну схеми виробництва ІРВ під умовною назвою «Кандидоцид».

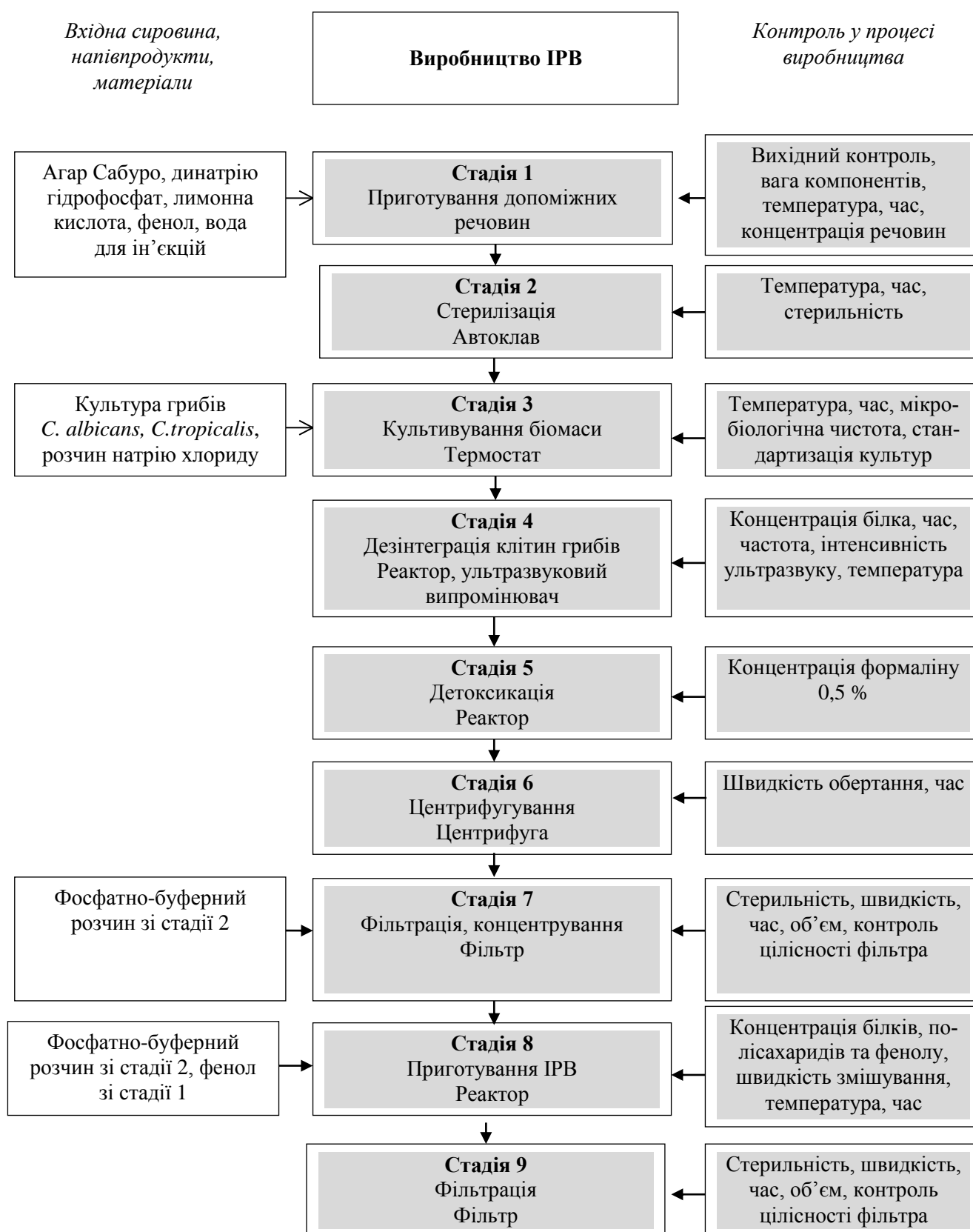


Рис. 17 Технологічна схема виробництва ІРВ «Кандидоцид» (початок)

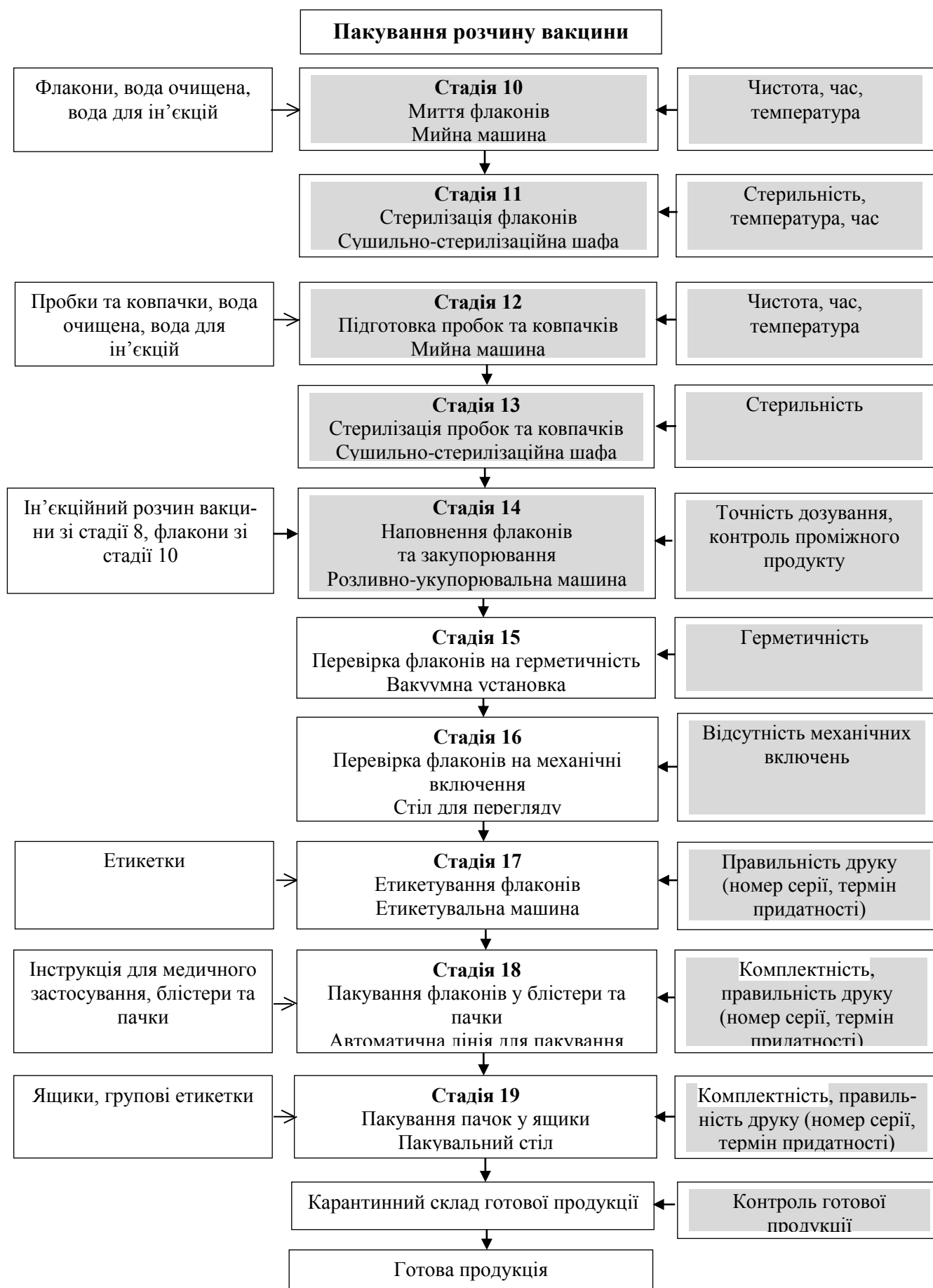


Рис. 17 Технологічна схема виробництва ІРВ «Кандидоцид» (закінчення)

Промислову технологію апробовано в промислових умовах ТОВ МНВЦ «Біосан», м. Вінниця (акт апробації від 15.12.2014 р.) – виробництво ІРВ внесено до перспективного плану розвитку виробництва на 2020 р., ПАТ «Фармстандарт-Біолік», м. Харків (акт апробації від 8.09.2017 р.) – виробництво ІРВ внесено до перспективного плану розвитку виробництва на 2020–2021 р., ТОВ «Фонд «Здоров'я нації», м. Дніпро (акт апробації від 12.09.2017 р.) – виробництво ІРВ внесено до перспективного плану розвитку виробництва на 2020–2021 р.

Для обґрунтування температури проведення технологічного процесу було вивчено її вплив на імуногенність ІРВ. За отриманими даними, критична температура технологічного процесу становить  $(25 \pm 0,2)$  °С із часом експозиції 60 хв. Визначено критичні технологічні параметри (табл. 12).

Таблиця 12

### Основні критичні параметри виробництва ІРВ «Кандидоцид»

Стадія технологічного процесу	Технологічний параметр	Значення технологічного параметра
Культивування клітин грибів <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i>	Температура Час	$(25 \pm 0,2)$ °С 6 діб
Дезінтеграція клітин грибів <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i>	Інтенсивність ультразвуку Час Температура	5 Вт/см <sup>2</sup> 15 хв $(25 \pm 2)$ °С
Змішування білків, полісахаридів клітин грибів <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i>	Швидкість обертання мішалки Час	100 об/хв 30 хв
Ультрафільтрація	Діаметр пор	0,05 мкм
Розливання вакцини у флакони	Точність дозування	$(5,0 + 0,2)$ мл

У розділі 6 «Фізико-хімічні та біологічні дослідження ін'єкційного розчину вакцини під умовною назвою «Кандидоцид» для попередження та лікування кандидозу» наведені результати розробки методик аналізу ІРВ, а також дослідження її фізико-хімічних та біологічних властивостей. Якість ІРВ оцінювали за всіма показниками, які визначені ДФУ щодо ін'єкційного розчину вакцин: опис, якісне та кількісне визначення речовин у складі розчину вакцини, прозорість, ступінь забарвлення, стерильність, герметичність контейнера, рН, об'єм контейнера, термін придатності після першого розкриття, контроль на механічні включення та активність ІРВ. На підставі проведених досліджень було розроблено проект МКЯ. Показники якості ІРВ, згідно з вимогами ДФУ, наведені у табл. 13.

Для дослідження були виготовлені й закладені на зберігання зразки ІРВ «Кандидоцид» різних серій у скляних флаконах із непрозорого нейтрального скла першого класу. Розчин зберігали при 2-х температурних режимах: в умовах холодильника від 2 до 8 °С і при кімнатній температурі від 15 до 25 °С.

## Показники якості ІРВ «Кандидоцид»

Показник		Вимоги проекту МКЯ	Результати
Опис		Прозора безбарвна рідина	За п. 1 МКЯ
Ідентифікація	білки	Розчин забарвлюється у синій колір з фосфорно-вольфрамовим реактивом	За п. 2 МКЯ, ДФУ 2.5.16
	полісахариди	Утворюється червоний осад з купрум-тартратним реактивом	За п. 2 МКЯ
рН		7,0 – 7,4	За п. 3 МКЯ
Об'єм вмісту контейнера, мл		Від 5,0 до 5,2 при пакуванні по 5 мл	За п. 4 МКЯ, ДФУ 2.9.17
Герметичність контейнера		Герметичний	За п. 5 МКЯ
Контроль механічних включень		Відсутні механічні включення	За п. 6 МКЯ
Кількісний вміст, г/мл	білки	Від 0,0038 до 0,0042	За п.7 МКЯ, ДФУ 2.5.16
	полісахариди	Від 0,0168 до 0,0172	За п.7 МКЯ, ДФУ, 1 вид., доп. 3
	фенол	Від 0,0023 до 0,0027	За п 7 МКЯ, ДФУ 2.5.15
Стерильність		Не виявлено росту мікроорганізмів	За п. 9 МКЯ, ДФУ 2.6.1
Нешкідливість		При внутрішньом'язовому уведенні не викликає місцевих реакцій, загальні реакції знаходяться у межах норми, усі тварини живі	За п.10 МКЯ
Попередження	титри антитіл <i>C. albicans</i>	Зростання титрів антитіл не менше ніж у 8 разів	За п. 11 МКЯ
	ефективність	Кількість мишей, що залишаються здоровими після зараження, не менше 80 %	За п. 11 МКЯ
Терапія	титри антитіл <i>C. albicans</i>	Зростання титрів антитіл не менше ніж у 8 разів	За п. 12 МКЯ
	ефективність	Кількість мишей, що залишаються здоровими після зараження, не менше 80 %	За п. 12 МКЯ
Пірогенність		ІРВ апірогенний	За п. 13 МКЯ ДФУ 2.6.8
Аномальна токсичність		Миші (5) та мурчаки (2) охайні, активні, мають задовільний апетит, процеси сечовиділення і дефекації в нормі, порушення дихання та судом немає	За п. 14 МКЯ, ДФУ 2.6.9
Реактогенність		Еритема у 3 мурчаків не більше 5 мм протягом 24 год	За п. 15 МКЯ
Алергенність		Еритема у 3 мурчаків не більше 5 мм через 1-5 хв і 24-48 год	За п. 16 МКЯ
Зберігання		У захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С	За п. 17 МКЯ

Якісне визначення білкового та полісахаридного антигенного матеріалу проводили одночасно з кількісним згідно з вимогами ДФУ. Визначення вмісту фенолу проводили також згідно з вимогами ДФУ.

Контейнер із вакциною «Кандидоцид» є багатодозовим контейнером, який містить 25 доз, тому необхідно провести перевірку витягування з нього усіх зазначених доз згідно з вимогами ДФУ 2.9.17. «Об'єм лікарських засобів парентерального застосування, що виготовляється. Багаторазові контейнери».

Біологічні дослідження ІРВ «Кандидоцид» для ПЛК включали дослідження активності при попередженні і терапії кандидозної інфекції, нешкідливості, стерильності, пірогенності, аномальної токсичності, реактогенності, алергенності.

Аналіз результатів проводили методами, зазначеними у ДФУ ст. 5.3 «Статистичний аналіз результатів біологічних випробувань і кількісних визначень».

Розроблений ІРВ під умовною назвою «Кандидоцид» є стерильним продуктом, тому було визначено термін придатності після першого розкриття первинної упаковки – 7 годин.

При вивченні стабільності ІРВ встановлено, що він є стабільним протягом 2 років зберігання у флаконах з непрозорого нейтрального скла першого класу при температурі від 2 до 8 °С.

На підставі комплексу проведених теоретичних та експериментальних досліджень можна зробити висновок, що упровадження у медичну і фармацевтичну практику запропонованого ІРВ на основі асоційованих антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* забезпечить появу першої вакцини для ПЛК в Україні.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено актуальну проблему сучасної медицини: проведено теоретичне обґрунтування й експериментальне підтвердження методології створення інноваційного ін'єкційного розчину вакцини для попередження та лікування кандидозу, на основі асоційованих антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, які одержанні методом ультразвукової дезінтеграції клітин грибів та науково й експериментально обґрунтованої технології очищення одержаних антигенів.

1. Проаналізовано й узагальнено дані наукових інформаційних джерел щодо етіології, патогенезу і сучасних аспектів лікування захворювань на кандидоз та доведено необхідність створення нового ІРВ для ПЛК із метою поповнення вітчизняного асортименту.

2. Обґрунтовано та опрацьовано методологічні принципи щодо створення ІРВ на основі асоційованих антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* для попередження та лікування кандидозу з використанням імунологічних, фізико-хімічних та біологічних методів досліджень.

3. Розроблено національну термінологію щодо ІЛЗ, а саме до вакцин, у вигляді загальної фармакопейної статті «Термінологія, яку використовують у монографіях на імунобіологічні лікарські засоби» (5.2.1.) розділу 5.2. «Загальні тексти на біологічні лікарські засоби», яка запланована до внесення у ДФУ 2.0, Доповнення 3 (лист ФЦ від 6.09.2017 р. № 11/918-5).

4. Проведено маркетинговий аналіз асортименту протигрибкових ЛЗ на фармацевтичному ринку України, за результатами якого встановлено відсутність вакцин для ПЛК; визначено основні країни-експортери та найпоширеніші лікарські форми протигрибкових ЛЗ.

5. За результатами проведених мікробіологічних досліджень обґрунтовано технологічні параметри для накопичення біомаси грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, з якої одержали ІРВ для ПЛК: температура –  $(25 \pm 2)$  °С і час – 6 діб культивування.

6. На підставі фізико-хімічних та біологічних досліджень обґрунтовано технологію інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, яка полягає у прогріванні суспензії клітин грибів при температурі  $(50 \pm 2)$  °С протягом 1 год, послідовній обробці формальдегідом та витримуванні протягом 24 годин при температурі  $(25 \pm 2)$  °С. Також обґрунтовано технологічні параметри змішування клітин грибів.

7. За результатами фізико-хімічних та біологічних досліджень обґрунтовано технологію дезінтеграції клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, яка полягає в обробці біомаси ультразвуком на апараті УЗУУ-21 при частоті 22 кГц, інтенсивності 5 Вт/см<sup>2</sup> і температурі  $(25 \pm 2)$  °С упродовж 15 хв. Також обґрунтовано технологію очищення антигенного матеріалу від супутніх низькомолекулярних баластних речовин, яка полягає у проведенні ультрафільтрації з використанням фільтра «MF-Millipore» із розміром пор 0,05 мкм, який забезпечує відділення білків, полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з молекулярною масою менше 10 кДа.

8. За результатами проведених біохімічних досліджень визначено моносахаридний склад полісахаридів антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, який представлений β-манозою, β-глюкозою та слідами двох неідентифікованих моносахаридів і молекулярні маси білків із домінуванням 75 кДа.

9. Проведено порівняння результатів імунологічних досліджень асоційованих інактивованих клітин грибів *C. albicans*, *C. tropicalis*, а також асоційованих білків, полісахаридів цих грибів, за результатами яких встановлено, що асоційовані білки, полісахариди грибів *C. albicans* із концентрацією білків 3 мг/мл та *C. tropicalis* 5 мг/мл у співвідношенні 1:1 при двократному внутрішньом'язовому уведенні з інтервалом 14 діб по 0,2 мл є перспективним складом ІРВ, оскільки забезпечують високу ефективність при попередженні та лікуванні кандидозної інфекції та спричиняють менше побічних імунних реакцій.

10. На підставі комплексу імунологічних, фізико-хімічних та біологічних досліджень обґрунтовано склад ІРВ: білки та полісахариди грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* (концентрація білка – 4 мг/мл, полісахаридів – 17 мг/мл), розчинник (фосфатно-буферний розчин рН  $7,2 \pm 0,2$ ) та допоміжна речовина (консер-



вант фенол у кількості 0,25 %). Технологію захищено патентом на корисну модель України № 94139.

11. Обґрунтовано й експериментально розроблено промислову технологію виробництва ІРВ «Кандидоцид» для ПЛК. Складено технологічну та апаратурну схеми виробництва. Технологію виробництва захищено патентом на корисну модель України № 94138.

12. Експериментально встановлено тип упаковки, умови і термін зберігання розробленого ІРВ «Кандидоцид», при яких він є стабільним – 2 роки при температурі 2–8 °С у флаконах із непрозорого нейтрального скла першого класу. Встановлено показники якості: якісне та кількісне визначення білків, полісахаридів та фенолу, прозорість, ступінь забарвленості, герметичність контейнера, рН, об'єм контейнера, контроль на механічні вклучення, імуногенність та ін.

13. Розроблено методи ідентифікації та кількісного визначення вмісту речовин у ІРВ «Кандидоцид» на основі грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. Досліджено основні показники якості запропонованого ІРВ, розроблено проект МКЯ.

14. Проведені імунологічні, біологічні та фізико-хімічні дослідження розробленого ІРВ «Кандидоцид» дають змогу запропонувати його як ефективну та нешкідливу вакцину для ПЛК.

15. Розроблено проект технологічного промислового регламенту на виробництво ІРВ під умовною назвою «Кандидоцид» і проведено її апробацію в промислових умовах ТОВ МНВЦ «Біосан», м. Вінниця (акт апробації від 15.12.2014 р.) – виробництво ІРВ внесено до перспективного плану розвитку виробництва на 2020 р., ПАТ «Фармстандарт-Біолік», м. Харків (акт апробації від 6.09.2017 р.) – виробництво ІРВ внесено до перспективного плану розвитку виробництва на 2020–2021 р., ТОВ «Фонд «Здоров'я нації», м. Дніпро (акт апробації від 12.09.2017 р.) – виробництво ІРВ внесено до перспективного плану розвитку виробництва на 2020–2021 р.

16. Результати проведених досліджень у вигляді наукових публікацій та методичного забезпечення упроваджено у навчально-науковий процес низки вищих фармацевтичних і медичних освітніх закладів для підготовки здобувачів першого, другого(магістерського) і третього(освітньо-наукового) рівнів вищої освіти та науково-педагогічних працівників.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Фахові статті

1. Рибалкін М. В., Стрельников Л. С., Стрілець О. П. Обґрунтування технології змішування клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. *Український біофармацевтичний журнал*. 2017. № 1 (48). С. 54–57. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів).

2. Рибалкін М. В. Методологія створення вакцини проти кандидозу. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*. 2017. Т. 3, № 2. С. 17–23.

3. Рибалкін М. В., Стрельников Л. С. Наукове та експериментальне обґрунтування технології очищення антигенів грибів *Candida*. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2017. № 1 (5). С. 62–65. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

4. Рибалкін М. В., Стрельников Л. С., Стрілець О. П. Маркетингові дослідження ринку протигрибкових лікарських засобів. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. Київ, 2017. Вип. 28. С. 108–115. (Особистий внесок: участь в інформаційному пошуку, оформлення статті).

5. Рибалкін М. В., Стрельников Л. С., Стрілець О. П. Визначення оптимального об'єму та концентрації суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* при дезінтеграції ультразвуком. *Фармаком*. 2017. № 1. С. 29–32. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

6. Rybalkin M., Strelnikov L., Strilets O. Research of molecular mass of proteins, which obtained by different technological methods of the *Candida* fungi cells disintegration. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2017. № 5 (9). P. 21–24. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

7. The experimental substantiation of the shelf-life of «Candidocyde» vaccine / M. V. Rybalkin, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov, O. A. Ivakhnenko. *Вісник фармації*. 2017. № 1 (89). P. 21–24. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

8. Рибалкін М. В., Стрельников Л. С. Експериментальне обґрунтування інтенсивності ультразвуку для руйнування клітин грибів *Candida*. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. Київ, 2016. Вип. 26. С. 246–249. (Особистий внесок: участь у плануванні експерименту та його проведенні, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

9. Біотехнологічне обґрунтування режиму культивування грибів роду *Candida* / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников. *Український біофармацевтичний журнал*. 2015. № 1 (36). С. 74–77. (Особистий внесок: участь у плануванні експерименту та його проведенні, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

10. Оцінка фракцій антигенів дезінтеграта клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* у разі попередження кандидомікозів / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников. *Фармацевтичний журнал*. 2015. № 2 (17). С. 100–104. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

11. The immunobiological assessment of the antibody titre in treating candidiases by antigens of *C. albicans* fungi / M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov. *Клінічна фармація*. 2015. Т. 19, № 2. P. 54–56. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

12. Біофармацевтичне обґрунтування розчинника у складі імунобіологічного препарату для попередження та лікування кандидамікозів / М. В. Рибалкін, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников, О. С. Калюжна. *Annals of Mechnikov Institute*. 2014. № 3. С. 19–22. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

13. Експериментальне обґрунтування консерванту в складі імунобіологічного препарату для профілактики й лікування кандидамікозів / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников. *Фармацевтичний часопис*. 2014. № 3 (31). С. 45–49. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

14. Визначення температурного режиму в технології виробництва імунобіологічного препарату проти кандидамікозів / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников. *Фармацевтичний часопис*. 2014. № 4 (32). С. 39–42. (Особистий внесок: участь у плануванні експерименту та його проведенні, обробка отриманих результатів).

15. Рибалкін М. В. Розробка складу та технології виробництва імунобіологічного розчину «Кандидоцид» для попередження та лікування кандидозної інфекції. *Фармаком*. 2014. № 3. С. 22–27.

16. Рибалкін М. В. Обґрунтування оптимального методу інактивації клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*. *Фармаком*. 2014. № 2. С. 30–33.

17. Рибалкін М. В. Визначення оптимального методу дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2014. № 2 (15). С. 71–75.

18. Рибалкін М. В. Експериментальне визначення умов та терміну зберігання імунобіологічного розчину «Кандидоцид». *Фармаком*. 2014. № 4. С. 61–64.

19. Rybalkin M. V., Filimonova N. I. The experimental substantiation of advisability of introducing an adjuvant to the composition of the immunobiological solution «Candidocycide». *Клінічна фармація*. 2014. Т. 18, № 4. Р. 45–48. (Особистий внесок: планування експерименту, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

20. Rybalkin M. V., Filimonova N. I., Strelnikov L. S. Comparison of the action of associated antigens and associated inactivated cells of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi. *Вісник фармації*. 2014. № 3 (79). С. 70–73. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів).

21. Determination of reactogenicity and allergenicity of the immunobiological drug for prevention and treatment of candidiasis / M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov. *Вісник фармації*. 2014. № 4 (80). С. 76–78. (Особистий внесок: участь у проведенні експерименту та його плануванні, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

22. Визначення здатності інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* окремо формувати імунітет проти кандидозної інфекції / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников. *Українсь-*

кий біофармацевтичний журнал. 2014. № 2 (31). С. 8–12. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

23. Рибалкін М. В., Філімонова Н. І., Стрельников Л. С. Визначення терапевтичної дії асоційованих інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*. *Фармацевтичний часопис*. 2014. № 2 (30). С. 80–83. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

24. Рибалкін М. В., Філімонова Н. І., Стрельников Л. С. Доцільність використання антигенів грибів *Candida* при лікуванні кандидамікозів. *Український біофармацевтичний журнал*. 2014. № 3 (32). С. 17–20. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів).

25. Рибалкін М. В., Філімонова Н. І., Стрельников Л. С. Перспектива асоційованого поєднання інактивованих клітин грибів *C. Albicans* та *C. Tropicalis* для профілактики кандидамікозів. *Ліки України*. 2014. № 3 (20). С. 18–20. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

26. Терапевтична дія інактивованих клітин грибів *C. Albicans* та *C. Tropicalis* / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников. *Ліки України*. 2014. № 2 (19). С. 25–27. (Особистий внесок: планування експерименту, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

27. Rybalkin M. V. Biotechnological description of technologies for obtaining of antigens of *Candida* genus fungi. *Annals of Mechnikov Institute*. 2014. № 2. P. 20–24.

28. Rybalkin M. V. The study of the therapeutic action of the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi. *Вісник фармації*. 2014. № 2 (78). P. 78–81.

#### Іноземні статті

29. Substantiation of the preservative in the composition of the immunobiological drug «Candidocyde» / M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, T. V. Diadiun, V. V. Kovalev, Iu. M. Azarenko. *International Journal of Pharmaceutical Sciences, Research*. 2016. Vol. 7 (3). P. 1035–1038. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

30. Обоснование состава и технологии производства раствора «Кандидоцид» / Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филимонова, О. П. Стрилец, Л. С. Стрельников. *Фармация Казахстана*. 2015. № 2. С. 31–34. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

31. Determination of toxicity of the immunobiological drug for prevention and treatment of candidal infection / M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. S. Kal-yuzhnaya, L. S. Strelnikov. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2014. 6 (9). P. 25–27. (Особистий внесок: участь у плануванні експерименту та його проведенні, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

32. Оценка антигенов клеток грибов *Candida albicans* / Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филимонова, О. П. Стрилец, Л. С. Стрельников. *Фармация Казахстана*. 2014. № 10. С. 40–42. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

33. The study of protective properties of associated antigens of *candida albicans* and *candida tropicalis* / M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2014. 6 (4). P. 954–957. (Особистий внесок: планування експерименту, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

34. The study of the effect of «Candidocyde» drug on T-, B-lymphocytes and the  $\gamma$ -globulin fraction / Mykola Rybalkin, Oksana Strilets, Leonid Strelnikov, Olga Kalyuzhnaya, Tatiana Diadiun, Vladimir Kovalev. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2015. 6 (3). P. 1476–1479. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті).

### Патенти на корисну модель

35. Спосіб одержання імунобіологічного препарату для попередження та лікування кандидозної інфекції: пат. 94138 України. Рибалкін М. В., Філімонова Н. І., Стрилец О. П., Стрельников Л. С. № 2014 06471; заявл. 11.06.2014; опубл. 27.10.2014, Бюл. № 20. 4 с. (Особистий внесок: планування патентного пошуку, розробка технології одержання вакцини, участь у підготовці формули до корисної моделі та опису до патенту).

36. Імунобіологічний препарат для попередження та лікування кандидозної інфекції: пат. 94139 України. Рибалкін М. В., Філімонова Н. І., Стрилец О. П., Стрельников Л. С. № 2014 06472; заявл. 11.06.2014; опубл. 27.10.2014, Бюл. № 20. 4 с. (Особистий внесок: планування патентного пошуку, участь у підготовці формули до корисної моделі та опису до патенту).

### Методичні рекомендації, монографії й інформаційні листи

37. Загальна характеристика вакцин та технологія виробництва (на прикладі розробки ін'єкційного розчину вакцини для попередження та лікування кандидозу) : моногр. / авт. кол. : М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, Л. С. Стрельников, О. П. Стрилец. Харків: Степанов В.В., 2017, 148 с. (Особистий внесок: узагальнення даних та написання монографії).

38. Компоненти вакцин та методи їх обґрунтування : метод. рек. / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, Л. С. Стрельников, О. П. Стрилец. Х.: НФаУ, 2017. 27 с. (Особистий внесок: узагальнення даних та написання відповідних розділів методичних рекомендацій).

39. Методи дезінтеграції мікроорганізмів та подальшого очищення для одержання антигенів : метод рек. / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, Л. С. Стрельников, О. П. Стрилец. Х.: НФаУ, 2017. 28 с. (Особистий внесок: планування змісту методичних рекомендацій, участь у їх написанні).

40. Методи інактивації мікроорганізмів та подальшого змішування для одержання антигенів : метод. рек. / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, Л. С. Стрельников, О. П. Стрілець. Х.: НФаУ, 2017. 25 с. (*Особистий внесок: узагальнення даних, написання методичних рекомендацій*).

41. Імунобіологічний лікарський засіб для попередження та лікування кандидозної інфекції: інформ. лист / Н. І. Філімонова, Л. С. Стрельников, О. П. Стрілець, Н. М. Кононенко, О. С. Калюжная, О. Л. Івахненко, О. М. Чікіткіна, М. В. Рибалкін. № 214-2015. К., 2014. 4 с. (*Особистий внесок: узагальнення даних та написання інформаційного листа*).

42. Спосіб одержання розчину імунобіологічного лікарського засобу для попередження та лікування кандидозної інфекції: інформ. лист / Н. І. Філімонова, Л. С. Стрельников, О. П. Стрілець, М. В. Рибалкін. № 119-2015. К., 2014. 4 с. (*Особистий внесок: узагальнення даних та написання інформаційного листа*).

### Навчальні посібники

43. Біотехнологія. Дипломне проектування : навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / О. С. Калюжна, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников, О. Л. Івахненко, М. В. Рибалкін, В. П. Новіков. Х.: НФаУ, 2016. 150 с.

### Тези

44. Біотехнологічна перспективність поєднаних антигенів *C. albicans* та *C. tropicalis* при попередженні кандидамікозів / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, Л. С. Стрельников, О. П. Стрілець. *Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями: матеріали наук.-практ. конф. за участю міжнародних спеціалістів присвяч. 170-й річниці з дня народження І. І. Мечникова*, м. Харків, 14–15 трав. 2015 р. Х.: ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», 2015. С. 33.

45. Лікування кандидамікозів інактивованими клітинами грибів кандиди / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников. *Лікувальній. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів: матеріали XXXI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнародною участю*, м. Харків, 22 трав. 2014 р. Х.: НФаУ, 2014. С. 121.

46. Рибалкін М. В. Визначення концентрації формаліну та часу для інактивації грибів кандиди. *XX Міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини»*, м. Тернопіль, 25–27 квіт. 2016 р. Тернопіль: ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», 2016. С. 344.

47. Рибалкін М. В. Визначення температури та часу для інактивації клітин грибів кандиди. *Біотехнологія XXI століття: матеріали X Всеукр. наук.-практ. конф., присвяч. 135-й річниці від дня народ. Олександра Флемінга*, м. Київ, 22 квіт. 2016 р. / Міністерство освіти і науки України, Національний

технічний університет України «КПІ», Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. К.: НТУУ «КПІ», 2016. С. 78.

48. Рибалкін М. В. Дослідження антигенів *C. albicans* та *C. tropicalis* на здатність стимулювати імунітет. *Новітні тенденції в медицині та фармації, ВІМСО 2015*: матеріали II Міжнар. медико-фармац. конгр. студентів і молодих учених, м. Чернівці, 8–10 квіт., 2015. Чернівці: Хист, 2015. С. 386.

49. Рыбалкин Н. В. Определение условий и сроков хранения раствора «Кандидоцид». *Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2015*: сборник тезисов докладов 69-й науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых с международным участием, г. Минск, 19–20 апр. 2015. Минск: БГМУ, 2015. С. 1690.

50. Рибалкін М. В., Стрельников Л. С., Стрілець О. П. Визначення інтенсивності ультразвуку для руйнування клітин грибів *Candida*. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи*: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13–16 верес. 2016: у 2 т. Т. 1 / М-во охорони здоров'я України, Нац. фармац. ун-т; ред. кол.: В. П. Черних (голова) та ін.; уклад.: С. Ю. Данильченко та ін. Харків: НФаУ, 2016. С. 409.

51. Рибалкін М. В., Стрельников Л. С., Стрілець О. П. Дослідження моносахаридного складу розчинів антигенів *C. albicans* та *C. tropicalis*. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології*: збірник наукових праць, випуск 3, м. Харків, 13 жовт. 2017 р. Х.: НФаУ, 2017. С. 235.

52. Рибалкін М. В., Стрілець О. П., Стрельников Л. С. Обґрунтування температурного режиму та часу культивування грибів роду кандиди. *Сучасні аспекти медицини і фармації*: матеріали Міжнар. медико-фармац. конгр. студентів і молодих учених, м. Чернівці, 2–4 квіт. 2014 р. Чернівці: Хист, 2014. С. 332.

53. Рибалкін М., Стрілець О., Стрельников Л. Дослідження впливу лікарського засобу «Кандидоцид» на Т-, В-лімфоцити та  $\gamma$ -глобулін у крові. *XIX Міжнар. мед. конгр. студентів і молодих вчених* присвяч. пам'яті ректора, члена-кореспондента НАМН України, професора Леоніда Якимовича Ковальчука, м. Тернопіль, 27–29 квіт. 2016 р. Тернопіль: ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», 2015. С. 363.

54. Рибалкін М. В., Філімонова Н. І., Стрілець О. П., Стрельников Л. С. Дослідження впливу ад'ювантів на активність імунобіологічного розчину «Кандидоцид». *Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології*: матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. з міжнародною участю, м. Харків, 16–17 жовт. 2014 р. Х.: НФаУ, 2014. С. 245.

55. Рибалкін М. В., Стрельников Л. С., Стрілець О. П. Експериментальне дослідження фізичних методів інактивації клітин грибів роду *Candida* за допомогою ультразвуку та УФ-випромінювання. *VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»*, м. Тернопіль, 10–11 листоп. 2016 р. Тернопіль: ТДМУ, 2016. С. 288–289.

56. Рыбалкин Н. В., Стрилец О. П., Стрельников Л. С. Сравнение различных методов дезинтеграции клеток грибов рода *Candida*. *Молодежная наука и современность: материалы 79-ой Всерос. науч. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием*, посвящ. 79-летию КГМУ, г. Курск, 16–17 апр. 2014 г.: в 3 частях. Курск: ГБОУ ВПО КГМУ, 2014. Часть II. С. 383.

57. Рыбалкин Н. В., Стрельников Л. С., Стрилец О. П. Изучение влияния ультразвука с разной интенсивностью на дезинтеграцию клеток грибов кандиды. *XI науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с междунар. участием*, посвящ. 25-летию государственной независимости Республики Таджикистан «Медицинская наука: достижения и перспективы», г. Душанбе, 29 апр. 2016 г. Душанбе: ТГМУ им. Абуали ибни Сино, 2016. С. 360–361.

58. Рыбалкин М. В., Філімонова Н. І. Терапевтична дія поєднаних антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. *Фармацевтична мікробіологія і клінічна лабораторна діагностика: тези доп. міжнар. наук.-практ. конф.*, м. Харків, 27–28 листоп. 2014 р. Х.: НФаУ, 2014. С. 50–52.

59. Combined inactivated cells of fungi *C. albicans* and *C. tropicalis* in the prevention candidiasis / M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student* (April 23, 2015). Kh.: NUPh, 2015. P. 269.

60. Rybalkin M. V., Strilets O. P., Strelnikov L. S., Kaljuzhnaja O. S., Filimonova Natalya. Immunogenic properties of inactivated cells of *Candida*. *Abstracts of XIII International Congress of Medical Sciences for students and young doctors*, Sofia, 8–11May 2014. S.: Preclinical, 2014. P. 82.

61. Rybalkin M. V., Strilets O. P., Strelnikov L. S. Rationale for optimum inactivation methods fungal cells *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Actual Questions of Development of New Drugs: Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students*, Kharkov, 22–23 April 2014. Kh.: Publishing Office, 2014. P.138.

## АНОТАЦІЯ

**Рыбалкин М. В. Наукове та експериментальне обґрунтування складу та технології ін'єкційного розчину вакцини «Кандидоцид» для попередження та лікування кандидозу.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2018.

Дисертація присвячена науковому та експериментальному обґрунтуванню складу і технології ін'єкційного розчину вакцини для попередження та лікування кандидозу.



Запропоновано загальну методологічну концепцію фармацевтичної розробки ІРВ для ПЛК.

Розроблено загальну фармакопейну статтю «Термінологія, яку використовують у монографіях на імунобіологічні лікарські засоби» (5.2.1) розділу 5.2 «Загальні тексти на біологічні лікарські засоби», яка запланована до внесення у ДФУ 2.0 Доповнення 3.

За результатами фізико-хімічних та біологічних досліджень обґрунтовано технологію дезінтеграції клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, яка полягає в обробці біомаси ультразвуком на апараті УЗУУ-21 при частоті 22 кГц, інтенсивності 5 Вт/см<sup>2</sup> і температурі (25 ± 2) °С упродовж 15 хв. Також обґрунтовано технологію очищення антигенного матеріалу від супутніх низькомолекулярних баластних речовин, яка полягає у проведенні ультрафільтрації з використанням фільтра «MF-Millipore» із розміром пор 0,05 мкм, який забезпечує відділення білків, полісахаридів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з молекулярною масою менше 10 кДа.

Для практичної медицини і фармації створено ІРВ для ПТК. Обґрунтовано та експериментально розроблено промислову технологію виробництва ІРВ «Кандидоцид» для ПЛК. Складено технологічну й апаратурну схеми виробництва. Експериментально встановлено тип упаковки, умови і термін зберігання розробленого ІРВ на основі грибів *C. albicans* and *C. tropicalis*. Розроблено методи ідентифікації та кількісного визначення вмісту речовин в ІРВ, досліджено основні показники якості, розроблено проект МКЯ. Узагальнено дані імунологічних та біологічних досліджень запропонованого ІРВ.

**Ключові слова:** технологія, інактивація, дезінтеграція, змішування, ультразвук, фільтрація, ін'єкційний розчин, склад, білки, полісахариди, антиген, вакцина, кандидоз.

## АННОТАЦИЯ

**Рыбалкин Н. В. Научное и экспериментальное обоснование состава и технологии инъекционного раствора вакцины «Кандидоцид» для предупреждения и лечения кандидоза.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 15.00.01 – технология лекарств, организация фармацевтического дела и судебная фармация. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2018.

Диссертация посвящена научному и экспериментальному обоснованию состава и технологии инъекционного раствора вакцины для предупреждения и лечения кандидоза.

Предложена общая методологическая концепция фармацевтической разработки ИРВ для ПЛК.

Разработана общая фармакопейная статья «Терминология, используемая в монографиях на иммунобиологические лекарственные средства» (5.2.1) раз-

дела 5.2 «Общие тексты на биологические лекарственные средства», которая запланирована к включению в ГФУ 2.0 Дополнение 3.

На основании физико-химических, иммунологических и биологических исследований впервые разработаны рациональный состав и технология ИРВ под условным названием «Кандидоцид» для ПЛК. Согласно результатам физико-химических и биологических исследований обоснована технология дезинтеграции клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis*, которая заключается в обработке биомассы ультразвуком на аппарате УЗУУ-21 с частотой 22 кГц, интенсивностью 5 Вт/см<sup>2</sup>, при температуре  $(25 \pm 2)^\circ \text{C}$  в течение 15 мин. Также обоснована технология очистки антигенного материала от сопутствующих низкомолекулярных балластных веществ, которая заключается в проведении ультрафильтрации с использованием фильтра «MF-Millipore» с размером пор 0,05 мкм, который обеспечивает отделение антигенного материала с молекулярной массой меньше 10 кДа.

На основании комплекса иммунобиологических, физико-химических и биологических исследований обоснован состав ИРВ: белки и полисахариды грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* (концентрация белка – 4 мг/мл, полисахаридов – 17 мг/мл), растворитель (фосфатно-буферный раствор pH  $7,2 \pm 0,2$ ) и вспомогательное вещество (консервант фенол в количестве 0,25%).

Экспериментально установлены тип упаковки, условия и срок хранения разработанного ИРВ «Кандидоцид», при которых он сохраняет стабильность.

Разработан проект технологического промышленного регламента на производство ИРВ под условным названием «Кандидоцид» и проведена его апробация в условиях промышленного производства ООО МНПЦ «Биосан» – производство ИРВ внесено в перспективный план развития на 2020 г., ПАТ «Фармстандарт-Биолек» – производство ИРВ внесен в перспективный план развития на 2020–2021 гг., ТОВ «Фонд «Здоровье нации» – производство ИРВ внесено в перспективный план развития на 2020–2021 гг.

**Ключевые слова:** технология, инактивация, дезинтеграция, смешивание, ультразвук, фильтрация, инъекционный раствор, состав, белки, полисахариды, антиген, вакцина, кандидоз.

## SUMMARY

**Rybalkin M. V. Scientific and experimental substantiation of the composition and technology of “Candidocyde” vaccine solution for injection for prevention and treatment of candidiasis. – A manuscript copyright.**

The thesis for a degree of Doctor of Pharmacy in speciality 15.00.01 – Technology of Drugs, Organization of Pharmacy and Forensic Pharmacy. – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2018.

The thesis is devoted to scientific and experimental substantiation of the composition and technology of the vaccine solution for injection (VSI) for prevention and treatment of candidiasis (PTC).

The general methodological concept for pharmaceutical development of VSI for PTC has been proposed.

The general monograph “Terminology used in monographs on immunobiological drugs” (5.2.1.) of section 5.2 “General texts on biological medicinal products” planned to be included into the SPhU 2.0, Appendix 3, has been developed.

For the first time based on the physicochemical, immunological and biological studies the rational composition and technology of VSI under the conditional name of “Candidocyde” for PTC have been developed. According to the results of the physicochemical and biological studies the technology of cell disintegration of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi has been substantiated. It consists in treating the biomass by ultrasound on a UZUU-21 ultrasonic device at the frequency of 22 kHz, intensity of 5 W/cm<sup>2</sup> and temperature of (25 ± 2) °C for 15 min. The technology for purification of the antigenic material from the related low-molecular ballast substances has been also substantiated. It consists in ultrafiltration using a “MF-Millipore” filter with the particle size of 0.05 µm, it provides separation of the antigenic material with the molecular weight less than 10 kDa.

According to the results of the microbiological, physicochemical and immunobiological studies the composition of VSI has been substantiated: proteins and polysaccharides of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi (the protein concentration – 4 mg/ml, the polysaccharide concentration – 17 mg/ml), the solvent (phosphate buffer solution with pH of 7.2 ± 0.2) and the excipient (phenol as a preservative in the amount of 0.25 %).

The manufacturing technology for “Candidocyde” VSI for PTC has been substantiated and experimentally developed. The manufacturing formula and technological flowchart has been worked out. The novelty of the research is protected by the patents of Ukraine No. 94138 and 94139.

Two information letters No. 119-2015 “The immunobiological drug for prevention and treatment of candidal infection” and No. 214-2015 “The method of obtaining the solution of the immunobiological drug for prevention and treatment of candidal infection” have been prepared and approved by the Ukrainian Center of Scientific Medical Information and Patent and Licensing Work at the Ministry of Health of Ukraine.

The pack type, shelf life and storage conditions of “Candidocyde” VSI, in which it is stable, have been experimentally determined.

Using modern research methods the methods for qualitative and quantitative determination of active substances and excipients in the composition of VSI have been proposed. The basic indicators of quality of the vaccine proposed have been studied; the project of the Quality Control Methods (QCM) has been elaborated.

The immunological and biological studies of “Candidocyde” VSI developed allow offering it as an effective and safe vaccine for PTC.

The theoretical basis of the thesis is methodological recommendations “Methods for disintegration of microorganisms and further purification to obtain antigens”, “Methods for inactivation of microorganisms and subsequent mixing to obtain antigens” and “Components of vaccines and methods for their substantiation”; a mono-

graph “General characteristics of vaccines and the manufacturing technology (on the example of VSI development for PTC)”.

The project of the manufacturing specification for VSI under the conditional name of “Candidocyde” has been developed at LLC “Medical Research and Production Center Biosan” – production of VSI included in the long-term development plan for 2020, PJSC “Pharmstandard-Biolik” – production of VSI included in the long-term development plan for 2020–2021, LLC “Health of the Nation Fund” – production of VSI included in the long-term development plan for 2020–2021.

The results of the dissertation research are introduced into the educational process of a number of higher pharmaceutical and medical educational institutions of Ukraine.

**Key words:** technology, inactivation, disintegration, mixing, ultrasound, filtration, solution for injection, composition, proteins, polysaccharides, antigen, vaccine, candidiasis.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АТ - антитіла  
АФІ – активність фармацевтичного інгредієнта  
ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я  
ДФУ – Державна фармакопея України  
ІЛЗ – імунобіологічний лікарський засіб  
ІРВ – ін'єкційний розчин вакцини  
ІФА – імуноферментний аналіз  
ЛЗ – лікарський засіб  
МКЯ – методи контролю якості  
МНВЦ – медичний науково-виробничий центр  
ПАТ – публічне акціонерне товариство  
ПЛК – попередження та лікування кандидозу  
ТОВ – товариство з обмеженою відповідальністю  
УФ-випромінювання – ультрафіолетове випромінювання

---

Підписано до друку 13.04.2018. Формат 60x90/16.  
Папір офсетний. Гарнітура Times ET. Друк ризографічний.  
Ум. друк. арк. 1,9. Наклад 150 пр. Зам. 18/08.

---

Надруковано з готових оригінал-макетів у друкарні ФОП Петров В.В.  
Єдиний державний реєстр юридичних осіб та фізичних осіб-підприємців.  
Запис № 24800000000106167 від 08.01.2009 р.  
61144, м. Харків, вул. Гв. Широнінців, 79в, к. 137, тел. (057) 778-60-34.  
e-mail:bookfabrik@mail.ua

