

ТЕХНОЛОГІЯ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

Recommended by Doctor of Medicine, Professor N. M. Kononenko

UDC 615.371:615.07:616-097

DOI: 10.24959/nphj.17.2148

M. V. Rybalkin, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov, O. L. Ivakhnenko

National University of Pharmacy

The experimental substantiation of the shelf-life of “Candidocyde” vaccine

Because of the difficult situation with the diagnosis and therapy of candidiasis many researchers propose to use vaccines as an alternative to anti-fungal drugs for preventing and treating candidal infections. The authors have developed “Candidocyde” vaccine against candidiasis.

Aim. To determine experimentally the shelf-life of the solution of “Candidocyde” vaccine.

Materials and methods. “Candidocyde” vaccine was stored at two temperature regimes: in the refrigerator at the temperature of 2-8 °C and at the room temperature of (15-25 °C). Antibody titers of the solution of “Candidocyde” vaccine were assessed every three months to prevent and treat candidiasis. For this purpose the reagent kit for immunoassay detection of antibodies of class G to *C. albicans* using the test system ELISA “Vector-best” was applied.

Results and discussion. When conducting the studies of the vaccine stored in glass vials protected from light at the temperature from 2 °C to 8 °C it was found that the activity of the solution was preserved for 2 years and 3 months when preventing and treating candidal infections. The titers of antibodies in animals remained at the level of 1 : 600-1 : 4000 when preventing and treating candidiasis. The positive results were recorded in all animals in the group, i.e. all animals were healthy. It indicates that the solution of “Candidocyde” vaccine is stable for 2 years.

Conclusions. When studying the shelf-life of the solution of “Candidocyde” vaccine based on antigens of cells of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi it has been found that it is stable for 2 years of storage in glass vials protected from light at the temperature of 2-8 °C.

Key words: vaccine; antigen; candidiasis; shelf-life; antibody titers

М. В. Рибалкін, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников, О. Л. Івахненко

Експериментальне обґрунтування терміну придатності вакцини «Кандидоцид»

Актуальність. Внаслідок складної ситуації з діагностикою та терапією кандидамікозів багато дослідників пропонують використовувати вакцини як альтернативу протигрибковим препаратам, що використовуються для попередження та лікування кандидозної інфекції. Автори розробили вакцину «Кандидоцид» для лікування кандидозу.

Метою даних досліджень є експериментальне визначення терміну придатності розчину вакцини «Кандидоцид».

Матеріали та методи. Вакцину «Кандидоцид» зберігали при 2-х температурних режимах: в умовах холодильника при температурі 2-8 °C та за кімнатної температури (15-25 °C). Титри антитіл розчину вакцини «Кандидоцид» оцінювали кожні три місяці при попередженні та терапії кандидозу. Для цього використовували набір реагентів для імуноферментного виявлення антитіл класу G до *C. albicans* за допомогою тест-системи ІФА «Вектор-Бест».

Результати та їх обговорення. При проведенні досліджень вакцини, що зберігалася в скляних флаконах без доступу світла при температурі від 2 °C до 8 °C було виявлено збереження активності при попередженні та терапії кандидозної інфекції впродовж 2 років і 3 місяців. Титри антитіл у тварин при попередженні та терапії кандидозу зберігалися на рівні 1 : 600-1 : 4000. У всіх тварин у групі були зафіксовані позитивні результати, тобто усі тварини були здорові. Це свідчить про те, що розчин вакцини «Кандидоцид» зберігає стабільність впродовж 2 років.

Висновки. При дослідженні терміну придатності розчину вакцини «Кандидоцид» на основі антигенів клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* встановлено, що він є стабільним впродовж 2 років зберігання в скляному флаконі без доступу світла при температурі від 2 °C до 8 °C.

Ключові слова: вакцина; антиген; кандидоз; термін придатності; титри антитіл

Н. В. Рыбалкин, О. П. Стрилец, Л. С. Стрельников, Е. Л. Ивахненко

Экспериментальное обоснование срока годности вакцины «Кандидоцид»

Актуальность. В результате затруднительной ситуации с диагностикой и терапией кандидамикозов многие исследователи предлагают использовать вакцины в качестве альтернативы противогрибковым препаратам для предупреждения и лечения кандидозной инфекции. Авторы разработали вакцину «Кандидоцид» против кандидоза.

Целью данных исследований является экспериментальное определение срока годности раствора вакцины «Кандидоцид».

Материалы и методы. Вакцину «Кандидоцид» хранили при 2-х температурных режимах: в холодильнике при температуре 2-8 °С и при комнатной температуре (15-25 °С). Титры антител раствора вакцины «Кандидоцид» оценивали каждые три месяца при предупреждении и терапии кандидоза. Для этого использовали набор реагентов для иммуноферментного выявления антител класса G к *C. albicans* с помощью тест-системы ИФА «Вектор-Бест».

Результаты и их обсуждение. При проведении исследований вакцины, которая хранилась в стеклянных флаконах без доступа света при температуре хранения от 2 °С до 8 °С, было обнаружено сохранение активности при предупреждении и терапии кандидозной инфекции в течение 2 лет и 3 месяцев. Титры антител у животных при предупреждении и терапии кандидоза сохранялись на уровне 1 : 600-1 : 4000. У всех животных в группе были зафиксированы положительные результаты, то есть все животные были здоровы. Это свидетельствует о том, что раствор вакцины «Кандидоцид» сохраняет стабильность в течение 2 лет.

Выводы. При исследовании срока годности раствора вакцины «Кандидоцид» на основе антигенов клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* установлено, что он является стабильным в течение 2 лет хранения в стеклянном флаконе без доступа света при температуре от 2 °С до 8 °С.

Ключевые слова: вакцина; антиген; кандидоз; срок годности; титры антител

Candida causes a wide range of infections: from insignificant diseases of the skin and mucous membranes to invasive processes, which can affect practically the whole human body [1-3].

Because of the difficult situation with the diagnosis and therapy of candidiasis many researchers propose to use vaccines as an alternative to anti-fungal drugs for preventing and treating candidal infections. Similar studies are performed in many countries of the world, and currently the drugs developed undergo preclinical and clinical trials [4, 5]. It should be mentioned that at present no domestic vaccine is produced in Ukraine and no imported vaccines for candidiasis have been registered. Therefore, development of a vaccine against candidal infection is the topical issue for both domestic and foreign modern pharmacy and medicine.

At the premises of the National University of Pharmacy the researchers of the Biotechnology Department and the Department of Microbiology, Virology and Immunology developed the composition and technology of “Candidocyte” vaccine on the basis of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi. Experimentally the following main parameters were determined: the technology of cell cultivation of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi at the temperature of 25 ± 2 °С for 6 days [6]; the technology of fungal cell disintegration using an ultrasonic disintegrator at the frequency of 22 kHz, the intensity of 5 W/cm² and exposure of 15 min [7]; the purification technology consisting of centrifugation with the rotation speed of 1000 rpm for 15 min, prefiltration and sterilizing filtration using filters with the pore diameter of 0.45 μm and 0.22 μm, ultrafiltration through the membrane providing separation of the biological material with the size of 10 kDa [8]. According to the results of our studies of the optimal excipients the composition of the solution of “Candidocyte” vaccine based on the cell-associated antigens of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi with the protein concentration of 3 mg/ml and *C. tropicalis* with the protein concentration of 5 mg/ml in the ratio of 1 : 1 with the solvent (phosphate buffer solution) and phenol as a preservative in the concentration of 0.25 % was de-

termined [9, 10]. The vaccine developed shows a pronounced activity when preventing and treating candidiasis in animal experiments.

At the next stage of our research it is necessary to determine the shelf life of the solution of “Candidocyte” vaccine when preventing and treating candidiasis by the indicators of antibody titers.

The aim of the study is to determine experimentally the shelf-life of the solution of “Candidocyte” vaccine.

Materials and Methods

For studies the samples of the solution of “Candidocyte” vaccine of different batches were prepared and put for storage in glass vials made of a neutral opaque glass of the first class. The vaccine studied was stored at two temperature regimes: in the refrigerator at the temperature of 2-8 °С and at the room temperature of (15-25 °С). Antibody titers of the solution of “Candidocyte” vaccine were assessed every three months.

The antibody titers were determined in preventing and treating candidal infections in two month white mice weighing 18-22 g (six animals in the control and experimental groups each). They were kept in the same conditions on a standard diet. Before the study the animals acclimatized themselves under experimental room conditions. In studies regarding prevention of candidal infection the mice received a double intramuscular injection of 0.2 ml of the solution of “Candidocyte” vaccine in the upper part of the rear right paw with an interval of 14 days. After immunization the animals were infected intraperitoneally. For this purpose the suspensions of *Candida albicans* fungi in the amount of 20 mln of cells and *C. tropicalis* in the amount of 60 mln of cells in the volume of 1 ml were used; they were introduced with an interval of 1 h. Animals of the control group were injected the sterile 0.9 % isotonic saline solution. In 14 days the protective functions of the animals' body were determined by the titer of specific antibodies of *C. albicans* when conducting enzyme immunoassay (ELISA) according to the SPhU, I-st ed., art. 2.7.1, p. 55-57. To do this, the reagent kit for immunoassay detection of antibodies of class G to *C. albicans* using the test system

Table

Antibody titers when preventing and treating candidiasis

Temperature, °C	Beginning of the storage	3 months	6 months	2 years and 3 months
Prevention				
2-8	1 : 600-1 : 4000	1 : 600-1 : 4000	1 : 600-1 : 4000	1 : 600-1 : 4000
15-25	1 : 600-1 : 4000	1 : 800-1 : 1600	–	–
Control	1 : 400-1 : 1000	1 : 400-1 : 1000	1 : 400-1 : 1000	1 : 400-1 : 1000
Treatment				
2-8	1 : 600-1 : 4000	1 : 600-1 : 4000	1 : 600-1 : 4000	1 : 600-1 : 4000
15-25	1 : 600-1 : 4000	1 : 800-1 : 1600	–	–
Control	1 : 400-1 : 1000	1 : 400-1 : 1000	1 : 400-1 : 1000	1 : 400-1 : 1000

Notes: n = 6.

ELISA “Vector-best” was applied. Since there were no the sets of reagents for immunoassay detection of antibodies of class G to *C. tropicalis*, identification of antibodies only of class G to *C. albicans* was conducted.

In studies concerning the treatment of candidiasis the animals were infected intraperitoneally with the suspensions of *Candida albicans* in the amount of 20 mln of cells and *Candida tropicalis* in the amount of 60 mln of cells in the volume of 1 ml introduced with the interval of 1 h. In 5 days a double intramuscular injection of 0.2 ml of the solution “Candidocyde” vaccine was introduced to mice in the upper part of the rear right paw with an interval of 14 days. Animals of the control group were injected the sterile 0.9 % isotonic saline solution. In 14 days the protective functions of the animals’ body were determined by the titer of specific antibodies of *C. albicans* when conducting ELISA.

To obtain the reliable results of the study all data were statistically processed, the median for all groups and its confidence interval were calculated.

Results and Discussion

The results of the study for preventing candidal infection showed that before the injection of “Candidocyde” vaccine the antibody titers of healthy animals were in the range of 1 : 200-1 : 500. This can be explained by the possible contact with the fungus of *Candida* genus during the life of animals or animals can be carriers of the fungal species since these fungi are part of the normal microflora of animals. After a double injection of the solution of the vaccine with an interval of 14 days there was an increase in the antibody titer, and it was in the range of 1 : 600-1 : 4000. The titer of antibodies in the control group was in the range of 1 : 400-1 : 1000. The results of the study of “Candidocyde” vaccine when treating candidal infection demonstrated that after a double injection of the vaccine with an interval of 14 days there was a double increase in the antibody titer (1 : 600-1 : 4000) in relation to the infected animals with the titers in the range of 1 : 800-1 : 1600. The titer of antibodies in the control group was in the range of 1 : 800-1 : 1600.

Comparing the results obtained in the experimental and control groups it can be assumed with confidence that introduction of the solution of the vaccine stimulates formation of antibodies that are responsible for humoral immunity.

When conducting these studies of the vaccine stored in glass vials protected from light at the temperature from 2 °C to 8 °C it was found that the activity of the solution was preserved for 2 years and 3 months when preventing and treating candidal infections. The titers of antibodies in animals remained at the level of 1 : 600-1 : 4000 when preventing and treating candidiasis. The positive results were recorded in all animals in the group, i.e. all animals were healthy. It indicates that the solution of “Candidocyde” vaccine is stable for 2 years. The research results are given in Table.

The solution “Candidocyde” vaccine stored at the room temperature of 15-25 °C appeared to be unstable already in 3 months of its storage when exposed to light and with no exposure to light. The titers of antibodies in animals were at the level of 1 : 800-1 : 1600 when preventing and treating candidiasis. Therefore, the storage conditions studied at the temperature of 15-25 °C do not provide the appropriate stability of the solution of the vaccine developed.

CONCLUSIONS

When studying the shelf-life of the solution of “Candidocyde” vaccine based on antigens of cells of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi it has been found that it is stable for 2 years of storage in glass vials protected from light at the temperature of 2-8 °C. The activity of the solution studied is preserved as evidenced by the results of checking the antibody titers when preventing and treating candidal infections.

In the future, it is planned to study reactogenicity, allergenicity, abnormal toxicity of “Candidocyde” vaccine, as well as stimulation of T-, B-lymphocytes and g-globulin.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

1. Kullberg, B. J. Invasive Candidiasis / B. J. Kullberg, M. C. Arendrup // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373. – P. 1445–1456.
2. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review / S. Antinori, L. Milazzo, S. Sollima et al. // *NCBI.* – 2016. – Vol 34. – P. 21–28. doi: 10.1016/j.ejim.2016.06.029
3. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America / P. G. Pappas, C. A. Kauffman, D. R. Andes et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 62, Issue 4. – P. e1–e50. doi: 10.1093/cid/civ933
4. Cassone, A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer / A. Cassone // *Nature Rev. Microbiol.* – 2013. – Vol. 11, Issue 12. – P. 884–891. doi: 10.1038/nrmicro3156
5. Vaccines in the treatment of invasive candidiasis / X. Wang, X. Sui, L. Yan et al. // *Virulence.* – 2015. – Vol. 6, Issue 4. – P. 1–7. doi: 10.4161/21505594.2014.983015
6. Біотехнологічне обґрунтування режиму культивування грибів роду *Candida* / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников // *Укр. біофармац. журн.* – 2015. – Т. 36, № 1. – С. 74–76.
7. Рибалкін, М. В. Визначення оптимального методу дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* / М. В. Рибалкін // *Актуальні питання фарм. і мед. науки та практики.* – 2014. – Т. 15, № 2. – С. 71–75.
8. Оцінка фракцій антигенів дезінтеграції клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при попередженні кандидамікозів / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников // *Фармац. журн.* – 2015. – Т. 17, № 2. – С. 100–104.
9. Експериментальне обґрунтування консерванту у складі імунобіологічного препарату для попередження та лікування кандидамікозів / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников // *Фармац. часопис.* – 2014. – Т. 31, № 3. – С. 45–49.
10. Обоснование состава и технологии производства раствора «Кандидоцид» / Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филимонова, О. П. Стрелец, Л. С. Стрельников // *Фармация Казахстана.* – 2015. – Т. 165, № 2. – С. 31–34.

REFERENCES

1. Kullberg, B. J., Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *The New England Journal of Medicine*, 373, 1445–1456.
2. Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., Corbellino, M. (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*, 34, 21–28. doi: 10.1016/j.ejim.2016.06.029
3. Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Sobel, J. D. (2015). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62 (4), e1–e50. doi: 10.1093/cid/civ933
4. Cassone, A. (2013). Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (12), 884–891. doi: 10.1038/nrmicro3156
5. Wang, X., Sui, X., Yan, L., Wang, Y., Cao, Y., Jiang, Y. (2015). Vaccines in the treatment of invasive candidiasis. *Virulence*, 6 (4), 1–7. doi: 10.4161/21505594.2014.983015
6. Rybalkin, M. V., Filimonova, N. I., Strilets, O. P., Strelnikov, L. S. (2015). *Ukrainskyi biofarmatsevychnyi zhurnal*, 36 (1), 74–76.
7. Rybalkin, M. V. (2014). *Aktualni pitannya farmatsevychnoi i medychnoi nauky ta praktyky*, 15 (2), 71–75.
8. Rybalkin, M. V., Filimonova, N. I., Strilets, O. P., Strelnikov, L. S. (2015). *Farmatsevychnyi zhurnal*, 17 (2), 100–104.
9. Rybalkin, M. V., Filimonova, N. I., Strilets, O. P., Strelnikov, L. S. (2014). *Farmatsevychnyi chasopys*, 31 (3), 45–49.
10. Rybalkin, N. V., Filimonova, N. I., Strilets, O. P., Strelnikov, L. S. (2015). *Farmatsiia Kazahstana*, 165 (2), 31–34.

Information about authors:

Rybalkin M. V., Candidate of Pharmacy (Ph. D.), teaching assistant of the Department of Biotechnology, National University of Pharmacy. E-mail: rybalkin.nikolay@mail.ru
 Strelnikov L. S., Doctor of Pharmacy (Dr. habil.), professor, head of the Department of Biotechnology, National University of Pharmacy. E-mail: biotech@nuph.edu.ua
 Strilets O. P., Doctor of Pharmacy (Dr. habil.), professor of the Department of Biotechnology, National University of Pharmacy. E-mail: biotech_ukrfa@mail.ru
 Ivakhnenko O. L., Candidate of Pharmacy (Ph. D.), teaching assistant of the Department of Biotechnology, National University of Pharmacy. E-mail: lena.ivakh@gmail.com

Відомості про авторів:

Рибалкін М. В., канд. фарм. наук, асистент кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет. E-mail: rybalkin.nikolay@mail.ru
 Стрельников Л. С., д-р фарм. наук, професор, завідувач кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет. E-mail: biotech@nuph.edu.ua
 Стрілець О. П., д-р фарм. наук, професор кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет. E-mail: biotech_ukrfa@mail.ru
 Івахненко О. Л., канд. фарм. наук, асистент кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет. E-mail: lena.ivakh@gmail.com

Информация об авторах:

Рыбалкин Н. В., канд. фарм. наук, ассистент кафедры биотехнологии, Национальный фармацевтический университет. E-mail: rybalkin.nikolay@mail.ru
 Стрельников Л. С., д-р фарм. наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, Национальный фармацевтический университет. E-mail: biotech@nuph.edu.ua
 Стрелец О. П., д-р фарм. наук, профессор кафедры биотехнологии, Национальный фармацевтический университет. E-mail: biotech_ukrfa@mail.ru
 Ивахненко Е. Л., канд. фарм. наук, ассистент кафедры биотехнологии, Национальный фармацевтический университет. E-mail: lena.ivakh@gmail.com

Надійшла до редакції 23.11.2016 р.