

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2013-53

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.01.2013**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **06.08.2014**

(Věstník č. 32/2014)

A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/175 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
A61K 39/23 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, CZ

(72) Původce:
MVDr. Jiří Nezval, Brno, CZ
MVDr. Milan Huňady, Bohdalice, CZ

(74) Zástupce:
Advokátní kancelář, JUDr. PhDr. Jaromír Saxl,
advokát, Údolní 33, 602 00 Brno

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Multivalentní vakcína k imunoprolaxi
infekčních onemocnění psů**

(57) Anotace:
Nová multivalentní vakcína proti širokému spektru 6 až
12 infekčních virových a leptospirových onemocnění u
psů obsahující 5 až 11 imunizačních antigenů a výhodně
se zařazením aktuálního kmene psiho parvoviru CPV 2b.
Nová vakcína umožňuje prodloužení délky imunity na
dobu tří let u psinky, parvoviru, infekční hepatitidy,
infekční laryngotracheitidy a vztekliny.

CZ 2013 - 53 A3

29.01.13

PV 2013-53

Multivalentní vakcína k imunoprophylaxi infekčních onemocnění psů

Oblast techniky

- 5 Vynález se týká nového složení multivalentní vakcíny proti širokému spektru 6 až 12 infekčních virových a leptospirových onemocnění u psů obsahující 5 až 11 imunizačních antigenů a výhodně se zařazením aktuálního kmene psího parvoviru CPV 2b. Nová vakcína umožňuje prodloužení délky imunity na dobu tří let u psů, parvoviru, infekční hepatitidy, infekční laryngotracheitidy a vztekliny.

Dosavadní stav techniky

- V současné době je vyráběna celá řada vakcín pro psy, některé z nich jsou i vícevalentní (obsahují více imunizačních antigenů). Tyto vakcíny vyrábí více firem zabývajících se výrobou imunobiologických přípravků (Dyntec – přípravky řady Canvac, Intervet – přípravky řady Nobivac, Merial – přípravky řady Eurican a další, Pfizer – přípravky řady Vanguard, Fort Dodge – přípravky řady Duramune – a další firmy. Uvedené výrobky obsahují maximálně 8 antigenů.
- 20 V současné době jsou původci infekčních nákaz psů rozdělováni do dvou skupin – Core (vakcinace proti nim je nezbytná) a Noncore – vakcíny by se měly používat v závislosti na geografických podmínkách a životním způsobu chovatelů a psů (Schulze, R., 2010).

- 25 **Tab.1 Nejdůležitějších původci virových onemocnění psů skupiny Core**

Název	Původce	Zkratka	Jiné názvosloví	Vakcinologie
Parvoviróza psů	Parvovirus psů	CPV	Parvovirová enteritida	Živé atenuované vakcíny

Hepatitída psů	Adenovirus - 1	CAV - 1	HCC, Rubartova choroba	Heterologní imunita - používá se CAV - 2 (atenuovaný kmen inf. laryngotracheitidy)
Psinka psů	Paramyxivirus	CDV	FCC (caninedistemper)	Živé atenuované vakcíny
Infekční laryngotracheitida psů	Parainfluenza psů 2	CPIV - 2	Psincový kašel, ILT	Živé atenuované vakcíny
	Adenovirus - 2	CAV - 2		Živé atenuované vakcíny - interferenční efekt - vytváří ochranu i proti hepatidě CAV1
Vzteklina psů	Rhabdovirus	R	Lyssa, rabies	Inaktivovaný virus
Korona-viróza psů	Coronavirus	C		Inaktivovaný virus

Přehled základních bakteriálních původců infekčních nákaz psů skupiny Core je uveden v tabulce 2. Leptospiry jsou jednoznačně nejnebezpečnějším psím patogenem bakteriálního (spirochetálního) původu. Leptospiry vyvolávají po vakcinaci zejména monospecifickou imunitu (vůči podanému specifickému imunogenu), křížová imunita se u leptospir mnoho neuplatňuje, tak jako například u virových antigenů. Proto musí být výběr jednotlivých sérovarů leptospirdo vakcíny velmi pečlivý, důkladný a předvídající geografický pobyt psa (jednotlivé sérovary se liší místem výskytu).

Tab.2Nejdůležitějších původci bakteriálních onemocnění psů skupiny Core

Název	Původce	Zkratka	Jiné názvosloví	Vakcinologie
Leptospiróza psů	Leptospira icterohaemorrhagiae	Li		Inaktivovaná vakcína
Leptospiróza psů	Leptospira gripotyphosa	Lg		Inaktivovaná vakcína
Leptospiróza psů	Leptospira canicola	Lc	Stuttgartská nákaza	Inaktivovaná vakcína
Leptospiróza psů	Leptospira bratislava	Lb		Inaktivovaná vakcína
Leptospiróza psů	Leptospirapomona	Lp		Inaktivovaná vakcína

- 5 Další původci infekčních onemocnění psů jsou na zvážení chovatele a majitele zvířat, či zvíře bude těmito antigeny imunizováno či ne. Přehled těchto antigenů je v tabulce 3.

Tab. 3Další potencionální původci onemocnění psů skupiny non-Core

Název	Původce	Zkratka	Jiné názvosloví	Vakcinologie
Bordetelóza psů	Bordetella bronchiseptica	Bb		Inaktivovaná vakcína či živá vakcína
Borelióza psů	Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia afzelii, Borrelia garinii	BS, BA, BG,		Inaktivovaná vakcína, inaktivovaná rekombinantní vakcína

Herpesvirová infekce u psů	Herpes virus	CHV	Psí kašel, poruchy reprodukce	Inaktivovaná vakcína či živá vakcína
Chřipka psů	Influenza virus	IV		Inaktivovaná vakcína či živá vakcína
Mikrosporóza psů	Microsporum canis		Plísňové onemocnění psů	Inaktivovaná vakcína

Dalším důležitým bodem vakcinologie psů je délka imunity po provedené imunizaci. Všeobecně se má za to, že délka imunity je delší, než všeobecně udávaná každoroční imunizace proti všem psím patogenům (Olson, P. a další, 1997; Reddy a další, 2003, Abdelmagid a další, 2004; Gore a další, 2005). Tento všeobecný poznatek však musí být dokonale ověřen nejprve čelenžními testy, posléze může být kontrola po vakcinaci prováděna serologickými metodami na základě titrů postvakcinačních protilátek. Obecně udávané doby trvání imunity po provedené vakcinaci jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tab. 4 Předpokládaná délka imunity po vakcinaci

Název	Původce	Zkratka	Jiné názvosloví	Vakcinace
Parainfluenza psů	Parainfluenza virus	CPIV - 2	Psincový kašel	každoročně
Leptospiróza	Leptospira icterohaemorrhagiae, L. canicola, L. gripotyphosa, L. bratislava, L. pomona	Li, Lc, Lg, Lb, Lp,	Stuttgartská choroba	každoročně
Lymeská borelióza	Borrelia burgdorferi sensu stricto, B. afzelii, B. garinii	LS, LA, LG,		každoročně

Psinka psů	Paramyxovirus	CDV	FCC (caninedistemper)	Minimálně 3 roky (odhad 5 – 9 let)
Parvoviróza psů	Parvovirus psů	CPV	Parvovirová enteritida	Minimálně 3 roky (odhad 5 – 9 let)
Hepatitída psů	Adenovirus - 1	CAV - 1	HCC, Rubartova choroba	Minimálně 3 roky (odhad 5 – 9 let)
Vzteklina psů	Rhabdovirus	R	Lyssa, rabies	Minimálně 3 roky
Coronaviróza psů	Coronavirus psů	C		každoročně

Z hlediska praktické kontroly stavu imunity u vakcinovaných psů se provádí serologické vyšetření titru protilátek u vakcinovaných psů. U většiny psích patogenů byly již všeobecně přijaty hodnoty protilátek, které se považují za protektivní vůči jednotlivým infekčním chorobám psů. Tyto hodnoty protektivních protilátek jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tab. 5 Protektivní titry protilátek chránící před onemocněním

Název	Původce	Zkratka	Jiné názvosloví	Protektivní titr
Leptospiróza psů	Leptospira icterohaemorrhagiae	Li		Min. MAL 1 : 32 (nahrazuje se ELISA metodou)
Leptospiróza psů	Leptospira griptyphosa	Lg		Min. MAL 1 : 32 (nahrazuje se ELISA metodou)
Leptospiróza psů	Leptospira canicola	Lc	Stuttgartská nákaza	Min. MAL 1 : 32 (nahrazuje se ELISA metodou)

Leptospiróza psů	Leptospira bratislava	Lb		Min. MAL 1 : 32 (nahrazuje se ELISA metodou)
Leptospiróza psů	Leptospira pomona	Lp		Min. MAL 1 : 32 (nahrazuje se ELISA metodou)
Parvoviróza psů	Parvovirus psů	CPV	Parvovirová enteritída	min. HIT = 1 : 80
Hepatitída psů	Adenovirus psů - 1	CAV - 1	HCC, Rubartova choroba	min.VNT = 1 : 100
Psinka psů	Virus psinky	CDV	FCC (caninedistemper)	min.VNT = 1 : 32
Para-influenza psů	Parainfluenza psů - 2	CPIV - 2	Psincový kašel, ILT	
Infekční laryngo-tracheitida psů	Adenovirus - 2	CAV - 2		min.VNT = 1 : 100
Vzteklina psů	Rhabdovirus	R	Lyssa, rabies	Min. FAVN test = 0,5 MJ/1ml

MAL = mikroaglutinace - lýze

HIT = hemaglutinačně – inhibiční test

VNT = virus – neutralizační titr

5 FAVN = neutralizace viru fluorescenčními protilátkami

V současné době se objevují nové názory na imunizaci psů proti nejrozličnějším infekčním onemocněním (Horzinek, M., 2006), či se uvádějí nové možnosti jejich imunizace (Crisci, E., 2012). Tyto nové možnosti imunizace však doposud nenalezly širšího uplatnění v praxi, neboť jejich technologie je příliš složitá pro praktickou výrobu a výsledná dávka za finální dávku vakcíny by byla příliš nákladná pro konečného uživatele. Při zvyšování počtu imunizačních antigenů v jedné vakcíně dochází často k nedostatečné imunizaci proti jednomu nebo více onemocněním a/nebo

zkrácení doby imunity. Pro potřebnou širší ochrany je tak nutné podávání více vakcín, což je pro zvíře i majitele stresující a může dojít k opomenutí podání některé vakcíny, zvláště při vycestování do různých zemí.

- Existuje proto potřeba cenově dostupné vakcíny pokrývající širší spektrum závažných virových i bakteriálních onemocnění psů, s minimálními nežádoucími účinky a dostatečně dlouhou dobu imunity.

Podstata vynálezu

- Překvapivě bylo zjištěno, že výše uvedené i další nedostatky odstraňuje vakcína podle vynálezu.

- Podstatou nového vynálezu je nové složení multivalentní vakcíny pro imunoprophylaxi infekčních onemocnění psů obsahující celkem 5 až 11 antigenů, zahrnující výhodně ve svém složení coronavirus a 5 sérovarů leptospir, které jsou dominantní u psů na celém světě. Antigen infekční laryngotracheitidy chrání křížově i proti infekční hepatitidě. Antigen infekční hepatitidy tedy ve vakcíně přítomen není, ale pes je proti této nemoci chráněn.

- Předmětem vynálezu je tedy multivalentní vakcína k imunoprophylaxi proti 6 až 12 nejzávažnějším infekčním psím patogenům, která jako imunizační antigeny obsahuje

alespoň 4 virové antigeny zvolené ze skupiny atenuované živé viry psinky, parvoviru, parainfluenzy a infekční laryngotracheitidy psů, a inaktivované viry vztekliny a koronaviru psů;

- alespoň jeden z inaktivovaných sérovarů leptospir, zvolených ze skupiny *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. gryppotyphosa*, *L. pomona* a *L. bratislava*.

Níževalentní varianty se volí na základě analýzy podle požadavků na ochranu v dané lokalitě, podle aktuálního rozšíření jednotlivých patogenů a s uvažováním ekonomických hledisek.

- Ve výhodném provedení je použitý imunizační antigen parvoviru atenuovaný živý aktuální kmen viru parvovirózy psů CPV 2b, zvláště

kmen CPV 2b kultivovaný na tkáňové linii buněk MDCK. Hodnota titru viru parvovirózy psů ve finální vakcíně je v dalším výhodném provedení v rozmezí hodnot $TCID_{50} 10^{4,5}$ až $TCID_{50} 10^{7,0}$ ($TCID_{50}$, Tissue Culture Infective Dose, jemnožství patogenu, se kterým se dosáhne patologické změny u 50% naočkovaných kultur).

Ve výhodném provedení obsahuje multivalentní vakcína jako virus vztekliny psů virus kultivovaný fermentačním způsobem v bioreaktoru. Hodnota titru viru vztekliny ve finální vakcíně je s výhodou alespoň 1,0 IU/vakcinační dávku.

- 10 Bylo zjištěno, že výhodná je vakcína ve formě pevné lyofilizované složky pro smíchání před použitím s tekutou složkou, ve které zvolené antigeny pevné složky jsou ze skupiny atenuované živé viry psinky psů, infekční laryngotracheitidy psů, parvovirózy psů a parainfluenzy psů, a antigeny tekuté složky jsou ze skupiny inaktivované viry vztekliny, koronaviru psů a inaktivované sérovary leptospir: *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira canicola*, *Leptospira pomona* a *Leptospira bratislava*.

Jako imunitní adjuvans je v tekuté složce vakcíny výhodně obsažen gel hydroxidu hlinitého.

- 20 Vakcína podle vynálezu se výhodně používá jako primovakcinace v 8 týdnech věku psů s následnou revakcinací ve věku minimálně 12 týdnů věku psů.

- Bylo ověřeno, že nová vakcína umožňuje prodloužení délky imunity na dobu tří let u psinky, parvoviru, infekční hepatitidy, infekční laryngotracheitidy a vztekliny.

- Proto se další použití týká vakcíny pro použití pro revakcinaci proti patogenům ze skupiny parainfluenza psů, koronaviróza psů a *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira canicola*, *Leptospira bratislava* a *Leptospira pomona* v ročních intervalech a proti patogenům ze skupiny psinka, parvovirus, vzteklna, infekční hepatitida a infekční laryngotracheitida v tříletých intervalech.

Součástí vynálezu je i použití popsané vakcíny při způsobu imunizace zabezpečující dlouhodobou imunitu (až tři roky) proti nejzávažnějším infekčním psím patogenům (psinka, parvovirus, vzteklna, infekční hepatitida a infekční laryngotracheitida).

- 5 Multivalentní vakcína k imunoprophylaxi infekčních onemocnění psů chrání psy proti všem zásadním infekčním onemocněním psů na celém světě. Vakcíny obsahuje čtyři živé, atenuované virové komponenty (psinku, parvovirus, parainfluenzu, inf. laryngotracheitidu psů), dvě inaktivované virové komponenty (vzteklinu a coronavirus psů) a pět
- 10 serovarů leptospir (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. gryppotyphosa*, *L. pomonae* *L. bratislava*).

- Svůj význam nalezne vynález ve veterinární medicíně, kdy vakcinování psi budou chráněni proti všem zásadním infekčním onemocněním na
- 15 celém světě. Touto ochranou psů budou následně chráněni i lidé před velmi vážnými až smrtelnými chorobami (vzteklina, leptospiroza).

Příklady provedení vynálezu

- Níže uvedený příklad slouží pouze pro ilustraci a lepší pochopení
- 20 vynálezu a v žádném případě není předkládán proto, aby limitoval rozsah nebo patentové nároky. Výsledky jsou aplikovatelné i na méněvalentní kombinace. Podle lékopisu totiž platí, že když je ověřena vícevalentní kombinace, nemusí se již ověřovat méněvalentní kombinace vycházející z vícevalentní kombinace.

25

Příklad 1

Tento příklad provedení demonstruje výrobu multivalentní vakcíny proti infekčním onemocněním psů, její složení, způsob imunoprophylaxe její testaci pomocí náročných čelenžních experimentů.

- 30 Stanovení hodnoty titru viru se provádí metodou titrace viru na tkáňových kulturách.

Stanovení množství leptospirového imunogenu se provádí metodou kultivace a odstředění jednotlivých sérovarů leptospir do maximální koncentrace a poté naředění jednotlivých sérovarů leptospir na požadovanou stanovenou koncentraci.

5

1 .Výroba multivalentní vakcíny proti infekčním onemocněním psů

Výroba a testace imunogenu- Psinky psů

Výrobní kmen psinky psů se množí staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru na narostlých buňkách tkáňové linie VERO. Po
 10 dosažení maximálního nárůstuse virus psinky psů sklízí a je provedena jeho titrace. Pro účely výroby vakcíny se použije ve finální vakcinační dávce takové množství viru, které zaručí u vakcinovaných psů minimálně 3 letou protektivní imunitu proti psince psů. Výhodně je hodnota titru viru ve finální vakcíně v rozmezí hodnot $TCID_{50} 10^{4,5}$ až $TCID_{50} 10^{7,0}$ (titr viru
 15 se stanoví titrací na vhodných tkáňových kulturáchdle Českého lékopisu).

Výroba a testace imunogenu- inf. Laryngotracheitidy psů

Výrobní kmen infekční laryngotracheitidy psů Adenovirus - 2 se množí staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru na narostlých
 20 buňkách tkáňové linieMDCK. Po dosažení maximálního nárůstu se virus infekční laryngotracheitidy psů sklízí a je provedena jeho titrace. Pro účely výroby vakcíny se použije ve finální vakcinační dávce takové množství viru, které zaručí u vakcinovaných psů minimálně 3 letou protektivní imunitu proti infekční laryngotracheitidy psů a proti inf.
 25 hepatitidě psů. Výhodně je hodnota titru viru ve finální vakcíně v rozmezí hodnot $TCID_{50} 10^{4,5}$ až $TCID_{50} 10^{7,0}$ (titr viru se stanoví titrací na vhodných tkáňových kulturách).

Výroba a testace imunogenu- Parvovirózy psů

30 Výrobní kmen parvovirózy psůse množí staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru na narostlých buňkách tkáňové linieMDCK. Po

- dosažení maximálního nárůstu se virus parvovirózy psů sklízí a je provedena jeho titrace. Pro účely výroby vakcíny se použije ve finální vakcinační dávce takové množství viru, které zaručí u vakcinovaných psů minimálně 3 letou protektivní imunitu proti parvoviróze psů. Kmenem viru
- 5 parvovirózy psů je kmen CPV 2b kultivovaný na tkáňové linii MDCK a hodnota titru viru ve finální vakcíně je v rozmezí hodnot $TCID_{50} 10^{4,5}$ až $TCID_{50} 10^{7,0}$ (titr viru se stanoví titrací na vhodných tkáňových kulturách).

Výroba a testace imunogenu- Parainfluenza psů

- 10 Výrobní kmen parainfluenzy psů se množí staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru na narostlých buňkách tkáňové linie VERO. Po dosažení maximálního nárůstu se virus parainfluenzy psů sklízí a je provedena jeho titrace. Pro účely výroby vakcíny se použije ve finální vakcinační dávce takové množství viru, které zaručí u vakcinovaných psů
- 15 minimálně 1 letou protektivní imunitu proti parainfluenze psů. Výhodně je hodnota titru viru ve finální vakcíně v rozmezí hodnot $TCID_{50} 10^{4,5}$ až $TCID_{50} 10^{7,0}$ (titr viru se stanoví titrací na vhodných tkáňových kulturách).

Výroba a testace imunogenu- koronaviru psů

- 20 Výrobní kmen koronavirů psů se množí staticky fermentačním způsobem v bioreaktoru na narostlých buňkách tkáňové linie A - 72. Po dosažení maximálního nárůstu se virus koronavirů psů sklízí a je provedena jeho titrace. Pro účely výroby vakcíny se použije ve finální vakcinační dávce takové množství viru, které zaručí u vakcinovaných psů minimálně 1
- 25 letou protektivní imunitu proti koronaviru psů. Výhodně je hodnota titru viru ve finální vakcíně v rozmezí hodnot $TCID_{50} 10^{4,5}$ až $TCID_{50} 10^{7,0}$ (titr viru se stanoví titrací na vhodných tkáňových kulturách).

Výroba a testace imunogenu- vztekliny psů

- 30 Virus vztekliny se množí staticky nebo s výhodou fermentačním způsobem v bioreaktoru na suspenzně narostlých buňkách tkáňové linie

BHK -21. Po pomnožení viru vztekliny následuje jeho inaktivace pomocí beta – propiolaktonu, jehokoncentrace a purifikace. U inaktivovaného, koncentrovaného a purifikovaného viru vztekliny jestanoven obsah glykoproteinu viru vztekliny. Na základě těchto stanovení je posléze
 5 naředěn inaktivovaný virus vztekliny tak, aby ve finální vakcinační dávce pro psa byla hodnota titru viru vztekliny minimálně 1,0 IU. Tato hodnota zabezpečí protektivitu psa proti vzteklině po dobu minimálně 3 let. Výhodně je hodnota titru viru ve finální vakcíně v rozmezí hodnot TCID₅₀ 10^{4,5} až TCID₅₀ 10^{7,0} (titr viru se stanoví titrací na vhodných tkáňových
 10 kulturách).

Výroba a testace imunogenu- *Leptospira grippotyphosa*

Výrobní kmen *Leptospira grippotyphosa* se pomnoží staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru. Poté je provedena inaktivace
 15 leptospir 0,1% formaldehydem a je provedena koncentrace a purifikace leptospir. Poté se provede naředění inaktivovaných koncentrovaných leptospir tak, aby ve výsledné vakcinační dávce bylo tolik leptospirového imunogenu, aby zabezpečil minimálně 1 roční imunitu u vakcinovaných zvířat. Ve vakcinační dávce musí být pro tento účel taková koncentrace
 20 leptospir, aby po vakcinaci a revakcinaci králíků vyvolala titr aglutinačně – lytických protilátek minimálně 1 : 64.

Výroba a testace imunogenu- *Leptospira icterohaemorrhagiae*

Výrobní kmen *Leptospira icterohaemorrhagiae* se pomnoží staticky nebo
 25 fermentačním způsobem v bioreaktoru. Poté je provedena inaktivace leptospir 0,1% formaldehydem a je provedena koncentrace a purifikace leptospir. Poté se provede naředění inaktivovaných koncentrovaných leptospir tak, aby ve výsledné vakcinační dávce bylo tolik leptospirového imunogenu, aby zabezpečil minimálně 1 roční imunitu u vakcinovaných
 30 zvířat. Ve vakcinační dávce musí být pro tento účel taková koncentrace leptospir, aby po vakcinaci a revakcinaci králíků vyvolala titr aglutinačně – lytických protilátek minimálně 1 : 64.

Výroba a testace imunogenu- *Leptospira canicola*

Výrobní kmen *Leptospira canicola* se pomnoží staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru. Poté je provedena inaktivace leptospir 0,1% formaldehydem a je provedena koncentrace a purifikace leptospir. Poté se provede naředění inaktivovaných koncentrovaných leptospir tak, aby ve výsledné vakcinační dávce bylo tolik leptospirového imunogenu, aby zabezpečil minimálně 1 roční imunitu u vakcinovaných zvířat. Ve vakcinační dávce musí být pro tento účel taková koncentrace leptospir, aby po vakcinaci a revakcinaci králíků vyvolala titr aglutinačně – lytických protilátek minimálně 1 : 64.

Výroba a testace imunogenu- *Leptospira pomona*

Výrobní kmen *Leptospira pomona* se pomnoží staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru. Poté je provedena inaktivace leptospir 0,1% formaldehydem a je provedena koncentrace a purifikace leptospir. Poté se provede naředění inaktivovaných koncentrovaných leptospir tak, aby ve výsledné vakcinační dávce bylo tolik leptospirového imunogenu, aby zabezpečil minimálně 1 roční imunitu u vakcinovaných zvířat. Ve vakcinační dávce musí být pro tento účel taková koncentrace leptospir, aby po vakcinaci a revakcinaci králíků vyvolala titr aglutinačně – lytických protilátek minimálně 1 : 32.

Výroba a testace imunogenu- *Leptospira bratislava*

Výrobní kmen *Leptospira bratislava* se pomnoží staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru. Poté je provedena inaktivace leptospir 0,1% formaldehydem a je provedena koncentrace a purifikace leptospir. Poté se provede naředění inaktivovaných koncentrovaných leptospir tak, aby ve výsledné vakcinační dávce bylo tolik leptospirového imunogenu, aby zabezpečil minimálně 1 roční imunitu u vakcinovaných zvířat. Ve vakcinační dávce musí být taková koncentrace leptospir, aby

po vakcinaci a revakcinaci králíků vyvolala titr aglutinačně – lytických protilátek minimálně 1 : 64.

2.Složení multivalentní vakcíny proti infekčním onemocněním psů

- 5 Multivalentní vakcína proti infekčním onemocněním psů se skládá ze složky pevné (lyofilizované) a složky tekuté.

Pevná (lyofilizovaná) složka obsahuje atenuované živé viry psinky psů, infekční laryngotracheitidy psů, parvovirózy psů a parainfluenzy psů.

- 10 Tekutá složka obsahuje inaktivované viry vztekliny, koronaviru psů a inaktivované sérovary leptospir: *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira canicola*, *Leptospira pomona* a *Leptospira bratislava*.

- 15 Obě složky vakcíny (pevná lyofilizovaná a tekutá) se před použitím spojí (pevná lyofilizovaná složka se rozpustí tekutou složkou vakcíny). Po smísení obou složek vakcíny je možno finální formu vakcíny použít neprodleně po naředění.

- 20 Jako imunitní adjuvans je ve vakcíně obsažen gel hydroxidu hlinitého. Je obsažen v tekuté složce vakcíny a po smíchání obou složek se tak stává imunitním adjuvans pro inaktivované složky vakcíny. Před použitím je proto nutné obsah finální lékovky jemně protřepat.

3.Imunizační postup multivalentní vakcíny proti infekčním onemocněním psů

- 25 Aplikuje se 1 ml finální formy vakcíny od 12 týdne věku psa. Vakcína se aplikuje subkutánně. Imunita nastupuje u živých komponent vakcíny za 10 dní po primovakcinaci a imunita u inaktivovaných antigenů se vytváří za 14 dní po revakcinaci. Primovakcinovaní jedinci se revakcinují v intervalu 21 dní. K udržení imunity se doporučují u parainfluenzy, koronaviru a leptospiróze psů pravidelné roční revakcinace, u ostatních
30 původců infekčních nákaz (psinka, hepatitida, infekční

laryngotracheitida, parvoviróza a vzteklna) pravidelné tříroční revakcinace.

4. Testace multivalentní vakcíny proti infekčním onemocněním psů

- 5 Multivalentní vakcína proti infekčním onemocněním psů byla testována čelenžními experimenty v obvyklém uspořádání dle Českého lékopisu na skupinách psů, kteří na počátku experimentu byli negativní na protilátky proti testované složce, nezávisle vůči všem vakcinačním komponentám vakcíny.
- 10 Těmito čelenžními experimenty bylo jednoznačně prokázáno, že protektivní imunita trvá u parainfluenzy psů a vůči jednotlivým sérovarům leptospir obsaženým ve vakcíně po dobu jednoho roku po imunizaci a u imunizačních antigenů psinky, hepatitidy, parvovirózy, coronavirózy a vzteklně trvá protektivní imunita minimálně 3 roky po
- 15 provedené imunizaci.

Průmyslová využitelnost

- 20 Nová multivalentní vakcína proti nejzávažnějším infekčním onemocněním psů je prakticky využitelná při imunoprofylaxi psů. Vakcína vzhledem ke svému originálnímu složení najde uplatnění při imunoprofylaxi psů bez ohledu na to, v jaké zemi se nacházejí, či do jaké země budou cestovat. Způsob imunoprofylaxe, originální složení a provedené testace umožnily prodloužit dobu pravidelných vakcinací u nejzávažnějších patogenů až na 3 roky a snížit tak počet celkových vakcinačních úkonů psů.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Multivalentní vakcína k imunoprophylaxi proti 6 až 12
5 nejzávažnějším infekčním psím patogenům vyznačující se tím, že jako imunizační antigeny obsahuje alespoň 4 virové antigeny zvolené ze skupiny atenuované živé viry psinky, parvoviru, parainfluenzy a infekční laryngotracheitidy psů, a inaktivované viry vztekliny a koronaviru psů;
10 alespoň jeden z inaktivovaných sérovarů leptospir, zvolených ze skupiny *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. gryppotyphosa*, *L. pomona* a *L. bratislava*.
2. Multivalentní vakcína podle nároku 1, vyznačující se
15 tím, že imunizační antigen parvoviru je atenuovaný živý aktuální kmen viru parvovirózy psů CPV 2b.
3. Multivalentní vakcína podle nároku 1 nebo 2, vyznačující
20 se tím, že kmenem viru parvovirózy psů je kmen CPV 2b kultivovaný na tkáňové linii buněk MDCK.
4. Multivalentní vakcína podle některého z nároků 1 až 3,
vyznačující se tím, že hodnota titru viru parvovirózy
25 psů ve finální vakcíně je v rozmezí hodnot $TCID_{50} 10^{4,5}$ až $TCID_{50} 10^{7,0}$.
5. Multivalentní vakcína podle některého z nároků 1 až 4,
vyznačující se tím, že jako virus vztekliny psů
obsahuje virus kultivovaný fermentačním způsobem
30 v bioreaktoru.

6. Multivalentní vakcína podle některého z nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že hodnota titru viru vztekliny ve finální vakcíně je alespoň 1,0 IU/vakcinační dávku.
- 5
7. Multivalentní vakcína podle některého z předcházejících nároků vyznačující se tím, že je ve formě pevné lyofilizované složky pro smíchání před použitím s tekutou složkou, přičemž antigeny pevné složky jsou ze skupiny atenuované živé viry psinky psů, infekční laryngotracheitidy psů, parvovirózy psů a parainfluenzy psů, a antigeny tekuté složky jsou ze skupiny inaktivované viry vztekliny, koronaviru psů a inaktivované sérovary leptospir: *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira canicola*, *Leptospira pomona* a *Leptospira bratislava*.
- 10
- 15
8. Multivalentní vakcína podle některého z předcházejících nároků vyznačující se tím, že jako imunitní adjuvans je v tekuté složce vakcíny obsažen gel hydroxidu hlinitého.
- 20
9. Multivalentní vakcína podle některého z předcházejících nároků vyznačující se tím, že je pro použití pro primovakcinaci v 8 týdnech věku psů s následnou revakcinací ve věku minimálně 12 týdnů věku psů.
- 25
10. Multivalentní vakcína podle některého z předcházejících nároků vyznačující se tím, že je pro použití pro revakcinaci proti patogenům ze skupiny parainfluenza psů, koronaviróza psů a *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira canicola*, *Leptospira bratislava* a *Leptospira pomona* v ročních intervalech a proti patogenům ze skupiny psinka,
- 30

parvovirus, vzteklna, infekční hepatitida a infekční laryngotracheitida v tříletých intervalech.