

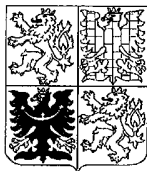
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1997 - 3489

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.11.1997**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:
A 61 K 39/23
A 61 K 39/42
A 61 P 31/12

(71) Přihlašovatel:
MEDIPHARM CZ, S. R. O., Starovice, CZ;

(72) Původce:
Mičan Petr, Hustopeče, CZ;
Štěpánek Jan, Zvole nad Perštejnem, CZ;

(74) Zástupce:
Smola Josef Ing., Mendlovo nám. 1a, Brno,
603 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Perorální přípravek k prevenci a léčbě
parvovirózy psů**

(57) Anotace:

Perorální přípravek k prevenci a léčbě parvovirózy psů, který obsahuje psí antiparvovirové protilátky z kolostra imunizovaných krav a/nebo z vaječných žloutků imunizovaných nosnic. Obsahuje rovněž stabilizované živé kultury laktacidoprodukčních bakterií. Dále je popsán způsob výroby psích antivirových protilátek tím, že se imunizují dojnice a/nebo nosnice antigenem psiho parvoviru, načež se získá kolostrum imunizovaných dojnic a/nebo žloutky imunizovaných nosnic a takto získaná látka se upraví, například sušením, do formy pro použití při imunizaci psů.

CZ .1997 - 3489 A3

Perorální přípravek k prevenci a léčbě parvovirozy psů

Oblast techniky

Vynález se týká perorálního přípravku k prevenci a léčbě parvovirozy psů.

Dosavadní stav techniky

Původcem tohoto onemocnění je psí parvovirus *Canine parvovirus* type II (CPV - 2), který existuje v jedné antigenní variantě, zásadně odlišné od nepatogenního parvoviru typu I (CPV - 1). K infekci psů patogenním parvovirem (CPV - 2) dochází téměř výlučně perorální cestou. Vzhledem k jednoznačné afinitě patogenního parvoviru k rychle se dělícím somatickým buňkám je infekční proces koncentrován především na buňky epiteliální výstelky tenkého střeva. U malých štěňat jsou postiženy i buňky myokardu. V průběhu infekce dochází k degeneraci a deskvamaci enterocytů a k obnažení stromatu střevních klků. Důsledkem je výrazné snížení resorbní schopnosti střevní sliznice, hyperbiosy, přesun tekutin z tkání do střevního lumen, střevní dysmikrobie, a v některých případech následná bakteriální sepse vyvolaná fakultativními enteropatogeny (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, atd.). Klinicky se parvovirová infekce projevuje úporným zvracením, těžkým průjemem s následnou dehydratací, a v případě myokarditidy náhlým úhynem štěňat.

Kauzální terapie parvovirozy psů je, kromě parentálního podání specifických protilátek, prakticky nemožná. Proto převažuje jen léčba symptomatická a podpůrná, zaměřená na zmírnění klinických příznaků, posílení obranných mechanismů zvířete, a na omezení možnosti rozvoje sekundárních bakteriálních infekcí. Specifická profylaxe parvovirozy psů je založena na využití živých nebo inaktivovaných vakcín.

Nedostatečnost současných léčebných metod i imunoprofylaktických postupů je v případě parvovirozy psů obecně známa. Příčiny této nedostatečnosti jsou shrnuty v následující části:

Parvovirus je vysoce rezistentní k fyzikálním a chemickým vlivům a ve vnějším prostředí dlouhodobě přežívá v plně aktivním stavu.

Zdrojem nákazy jsou nemocná zvířata, která vylučují parvovirus do vnějšího prostředí trusem ve vysokých koncentracích.

K parvovirové infekci jsou nejvnímavější štěňata, protože v prvním období po narození nemají ještě rozvinutý imunitní systém. Jejich odolnost k infekčním faktorům závisí na protilátkách získaných v průběhu intrauterinního vývoje (5%), a pak zejména na protilátkách vstřebaných z kolostra matek (95%) v průběhu prvních tří dnů po porodu. Ve skutečnosti to znamená, že odolnost štěňat vůči parvovirové infekci závisí na dvou zcela nestabilních faktorech, jako je úroveň imunity matky - resp. na koncentraci antiparvovirových protilátek v matčině kolostru, a na množství kolostra přijatého štěnětem v perinatálním období.

Nevýhodou vakcinace dospělých psů je, že nenavozuje celoživotní odolnost k parvovirové infekci. Imunita dosahuje maxima 28 až 35 dní po vakcinaci, a potom postupně klesá. Z tohoto důvodu je nutné vakcinaci opakovat nejméně jedenkrát ročně.

Vakcinace štěňat proti parvoviróze je komplikovaná existencí tzv. imunitního okna. Jde o časový úsek, kdy úroveň kolostrální imunity štěňat poklesne pod protektivní limit, ale současně je ještě dostatečná k neutralizaci antigenního efektu vakcíny. V tomto dvou až čtyřtýdenním období jsou štěňata vnímavá k infekci, ale nemohou být účinně vakcinována. Časově je vznik imunitního okna u jednotlivých štěňat rozdílný. Obecně se jedná o období od 6. do 12. týdne stáří štěňat po narození. Podle některých údajů zasahuje imunitní okno až do věku 16 týdnů. Zřejmě z toho důvodu většina vakcinačních programů doporučuje zahájit vakcinaci štěňat v 6. týdnu po narození, s opakováním ve čtrnáctidenních intervalech až do stáří 12 až 16 týdnů.

Účinnost specifické profylaxe, například vakcinace, stejně jako efektivita případné parentální aplikace protilátek je v případě parvovirózy psů signifikantně nižší, protože protilátky z krevního řečiště obtížně pronikají do místa primární infekce, tj. k parvovirem napadeným enterocytům v lumenu tenkého střeva. Stejným mechanismem je do jisté míry omezena i účinnost kolostrální imunity štěňat ve vztahu k antiparvovirovým protilátkám resorbovaným z mateřského kolostra do krve mláďat.

Vzhledem k značnému rozšíření a dramatickému průběhu je parvoviróza považována za jedno z nejnebezpečnějších onemocnění psů, které je, zejména u štěňat, provázeno vysokou mortalitou.

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky ve značné míře odstraňuje perorální přípravek k prevenci a léčbě parvovirózy psů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že účinnou složkou jsou psí antiparvovirové protilátky. Další účinnou složkou jsou stabilizované laktacidoprodukční bakterie, například druhy *Enterococcus spp. a/nebo Lactobacillus spp.*, mající ochranný účinek a vitaminy mající podpůrný účinek. Nosné látky zajišťují homogenitu a standardní obsah účinných složek v aplikačních formách, například pastě, nebo sypkém prášku. Účinek přípravku podle vynálezu spočívá v umělém navození stavu lokální imunity sliznice gastrointestinálního traktu psů, zejména štěňat, k infekci parvovirem a současně v podpoře celkových obranných systémů organismu. Základní účinnou složku perorálního přípravku tvoří stabilizované specifické antiparvovirové protilátky, schopné neutralizovat psí parvovirus v intestinu zvířat a inhibovat iniciační fázi infekčního procesu, tj. adhezi a penetraci viru do epitelárních buněk sliznice střeva, a tak znemožnit nebo zmírnit průběh onemocnění.

Výhodou vynálezu je skutečnost, že specifické antiparvovirové protilátky jsou získávány z netradičních zdrojů, tj. z kolostra krav nebo s výhodou z vajec nosnic imunizovaných antigenem psího parvoviru. Zpracování výchozích surovin, například kolostra nebo vaječných žloutků, zahrnuje prakticky již jen šetrnou konzervaci, a to buď sprejovým nebo fluidním sušením, nebo výhodněji a šetrněji lyofilizační technikou. Výsledným produktem je bílý nebo žlutý prášek, který je z nutričního hlediska identický s krmnými komponenty běžně užívanými ve výživě psů. Hladina specifických antiparvovirových protilátek v sušeném nebo lyofilizovaném kolostru či vaječných žloutcích musí dosáhnout minimálně neutralizačního titru 16 na 100 TCID₅₀ (Tissue culture infections dose, tj. infekční dávka pro tkáňovou kulturu) v 0,05 mg sušené hmoty. Biologickou účinnost specifických antiparvovirových protilátek v organismu zvířat je možné podpořit

probiotickou složkou, která je významná pro udržení eubiózy střevní mikrobiální biocenózy narušené parvovirovou infekcí. Stabilizované živé kultury laktacidoprodukčních bakterií *Enterococcus spp.* nebo *Lactobacillus spp.* jsou schopné bránit rozvoji nežádoucích fakultativně patogenních bakterií ve střevě zvířat, a tak omezovat riziko bakteriální sepse na minimum. Probiotická složka je vyráběna submersní pulzační kultivací vybraných laktacidoprodukčních bakterií, a po separaci média jsou kultury stabilizovány lyofilizací. Koncentrace živých zárodků v 1 g probiotického koncentrátu by měla dosáhnout minimálně 50×10^9 (CFU: $50 \times 10^9/1g$) (Colonies forming units, tj. zárodky schopné vytvořit kolonii). Ke zvýšení celkové odolnosti organismu k infekcím se s výhodou perorální přípravek doplňuje vitamínovou složkou složenou z vitaminů A,D,E, skupinou vitaminů B a vitaminu C, a to buď v sypkém stavu, nebo ve formě olejové suspenze. Minimální denní dotace vitaminů pro psa by měly být 500 m.j. vitaminu A, 35 m.j. vitaminu D₃, 7 mg vitaminu E, 1,2 mg vitaminu C, 1 mg vitaminu B₁₁, 1,5 mg vitaminu B₂, 0,02 mg vitaminu B₁₂, 2 mg niacinu a 0,01 mg biotinu. Protože přípravek je určen převážně k perorálnímu ošetření štěňat různého stáří, která jsou parvovirovou infekcí ohrožena nejvíce, byly jako nejvhodnější zvoleny dvě aplikační formy. Přípravek ve formě pasty, která je inkorporována do plastových aplikátorů, je vhodný pro podávání štěňatům po narození a v období kojení, resp. mléčné výživy. Naproti tomu aplikační forma sypkého prášku (pulvis nebo premix) umožňuje snadné zapracování přípravku do všech typů krmiv pro odstavená štěňata nebo psy všech věkových kategorií, například masové homogenáty, masové konzervy, granulované nebo extrudované krmivo. Zatímco forma pasty umožňuje zcela bezpečné a přesné individuální perorální dávkování přípravku mláďatům na kořen jazyka bez rizika vyplivnutí nebo nežádoucích a nebezpečných aspirací, prášková forma (pulvis, premix) vyhovuje skupinové i individuální aplikaci do krmiva starším a/nebo odstaveným štěňatům a psům všech věkových kategorií. V případě přípravy přípravku v aplikační formě pasty tvoří hlavní nosné komponenty kolodiální silikon-hydrolyzát a destilované monoglyceridy, které společně s kvalitním potravinářským olejem vytvářejí konzistentní pastu s molekulárním sítem, které zajišťuje homogenní

zpracování všech účinných i nosných složek. U všech operací při výrobě past, včetně procesu plnění plastových aplikátorů, je třeba zajistit, aby nedošlo k nežádoucí mikrobiální kontaminaci přípravku. Finální adjustace sypké formy přípravku (pulvis, premix) je založena na energetických typech nosičů jako je glukóza, laktóza, sorbitol nebo škrob, společně se sušeným odtučněným mlékem nebo sušenou syrovátkou. Přípravek v suché, tj. sypké formě (pulvis, premix) je možné přidávat do krmiva štěňat již v období přikrmování před odstavem. U starších psů lze přípravek přidávat do všech typů krmiv, například granulovaná či extrudovaná krmiva, naturální masové směsi.

Výhoda přípravku podle vynálezu spočívá především v tom, že umožňuje překlenout nedostatky dosavadních preventivních a léčebných postupů. Má však také řadu dalších výhod:

Je vyráběn z biologických surovin, které tvoří součást běžné výživy psů. Je zcela netoxický, takže při žádném, ani laickém, podávání nehrozí jeho předávkování. Může být bez rizika využit u všech věkových skupin štěňat i psů. Je použitelný jak k terapii již rozvinutého parvovirového onemocnění, tak k prevenci onemocnění u zvířat vystavených většímu infekčnímu tlaku, například v souvislosti s realizací hromadných kynologických akcí, například výstav, soutěží, zkoušek výkonu, dočasný pobyt v útulcích, atd. U štěňat umožňuje zvýšit odolnost k parvovirové infekci nejen během odchovu a při odstavení, ale zejména při přesunu do jiného chovu, resp. při všech změnách prostředí. Použití přípravku podle vynálezu lze rovněž indikovat ke zvýšení odolnosti štěňat v období vzniku tzv. imunitního okna, tedy v období 6. až 12. týdne života. Lokálně aplikované protilátky nemohou interferovat s účinkem parenterální vakcinace a blokovat postvakcinační vývoj imunity proti parvoviróze. Aplikační formy, například pasta nebo prášek, umožňují optimální způsob aplikace všem věkovým kategoriím psů s vyloučením rizika aspirace přípravku u novorozenců a sajících štěňat.

Příklady provedení vynálezu

Perorální přípravek k prevenci a léčbě parvovirózy psů je připraven úpravou základních účinných složek, nosných složek, vitamínové přísady do dvou základních aplikačních forem. Zatímco přípravek ve formě pasty je určen k aplikaci sajícím štěňatům v ranném postnatálním období, prášková forma (pulvis, premix) je podávána starším štěňatům a psům v krmivu. Základní účinné složky přípravku podle vynálezu jsou u obou forem zcela shodné.

Při přípravě antiparvovirových protilátek je k imunizaci využíván antigen, což je psí parvovirus (například kmen CAPM V - 464, Collection of Animal Pathogenic Microorganisms, Hudcova 70, Brno), kultivovaný na vnímavých buněčných kulturách (například buněčná linie CRFK, A - 72) s hemaglutinačním titrem (HT) 512-1024. Antigen je finálně zahuštěn 10 až 20 krát pomocí ultracentrifugace. K imunizaci jsou použity gravidní krávy, nebo nosnice, kterým je intramuskulárně aplikováno 0,2 až 1,0 ml virového antigenu předem smíseného s olejovým adjuvantem v poměru 1:1. Virová suspenze se u krav podává 2 krát před očekávaným porodem a u nosnic 3 krát v intervalu 21 dnů a dále podle potřeby, obvykle v tří až čtyřtydenních intervalech.

Detekce hladiny vytvořených parvovirových protilátek se provádí pomocí hemaglutinačně - inhibičního testu, nebo virus neutralizačním testem. Titr protilátek se vyjadřuje reciproční hodnotou ředění séra, kolostra, nebo vaječné suspenze, které inhibovalo 8 aglutinačních jednotek nebo neutralizovalo infekční potenciál 100 TKID₅₀ psího parvoviru.

K dosažení žádoucího účinku je třeba, aby množství psích antiparvovirových protilátek v 1 g přípravku bylo alespoň 16/100 TKID₅₀.

Produkty imunizovaných zvířat, tj. kolostrum nebo vaječné žloutky, se před dalším zpracováním vždy dobře homogenizují. Následně je kolostrum nebo vaječný homogenát finálně konzervován sprejovým či fluidním sušením, s výhodou lyofilizací. Před dalším zpracováním je získaný běložlutý prášek uchováván v suchu a chladnu.

Při přípravě probiotického koncentrátu jsou vybrané kmeny laktacidoprodukčních bakterií *Enterococcus faecium* M74 (CCM 6226) nebo

Lactobacillus casei (CCM 3775) submersně kultivovány pulzačním způsobem tak, aby po separaci média a stabilizaci zahuštěné mikrobiální biomasy lyofilizací vznikl suchý bakteriální koncentrát s minimální koncentrací živých buněk $50 \times 10^9/\text{g}$ (CFU $50:10^9/\text{g}$). Před dalším použitím jsou vyrobené probiotické koncentráty dlouhodobě uchovány při teplotě -18°C v mrazničce.

Příklad 1

Konečnou aplikační formou perorálního přípravku podle vynálezu je například pasta, která se připraví zapracováním účinných látek do nosných složek pasty zajišťujících homogenitu, a tím i jejich standardní obsah v pastě. Jednotlivé účinné složky přípravku podle vynálezu, specifické psí antiparvovirové protilátky ve formě sušeného či lyofilizovaného kolostra nebo vaječných žloutků pocházejících od imunizovaných zvířat, probiotický koncentrát obsahující stabilizované živé laktacidoprodukční bakterie a vitamínové přísady, jsou postupně zapracovávány pod vakuem ve speciálním míchacím zařízení

Tabulka 1: Základní složení přípravku ve formě pasty v hmotnostních procentech:

Nosné složky pasty	hmot. %
kvalitní potravinářský olej (např. arašidový)	45 - 60
koloidní siloid / hydrolyzát (CABOSIL)	4 - 6,5
destilované monoglyceridy	1 - 3
Účinné složky pasty	
sušené kolostrum nebo vaječné žloutky od imunizovaných zvířat	18 - 45
probiotický koncentrát CFU $400 \times 10^9/\text{g}$ (<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus casei</i>)	1 - 2,5
Vitamínová přísada pasty	
směs koncentrátů vitamínů	4 - 5
(vitaminy: A, D ₃ , E, C, K ₃ , B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , biotin, niacin)	

Po dokonalé homogenizaci je přípravek podle vynálezu ve formě pasty antisepticky rozplněn do plastových aplikátorů s obsahem 15 až 30 ml. Běžné perorální aplikační dávky se pohybují od 0,25 do 2 ml pasty na zvíře a den.

Příklad 2

Konečná úprava sypké - práškové formy přípravku (pulvis/premix) podle vynálezu se provádí ve standardních míchacích zařízeních vybavených horizontálním i vertikálním pohybem, tak aby bylo dosaženo nejvyšší možné homogenity přípravku. Účinné složky se nejdříve rozptýlí v menším objemu nosných substrátů a teprve po důkladném předmíchání se finalizační zařízení doplní nosiči na plný obsah.

Tabulka 2: Základní složky přípravku podle vynálezu ve formě sypkého prášku (pulvis/premix):

Nosné složky	hmot. %
sušené instantní mléko nebo sušená syrovátka	18 - 39
Účinné složky	
glukóza, škrob, sorbitol	18 - 39
sušené kolostrum nebo sušené vaječné žloutky od imunizovaných zvířat	20 - 60
probiotický koncentrát (CFU: $400 \times 10^9/1g$) (Ent. faecium M 47, nebo Ltb. casei)	1 - 2
vitamínová přísada (vitamínové koncentráty A, D ₃ , E, C, K ₃ , B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , biotin, cholin)	1 - 2

Po dokonalé homogenizaci je přípravek podle vynálezu rozplněn do kontejnerů s obsahem 100 až 250 g. Přípravek se přidává do krmiva štěňat a psů v denní dávce 3 až 20 g podle stáří, plemene a hmotnosti zvířat.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Perorální přípravek k prevenci a léčbě parvovirozy psů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje psí antiparvovirové protilátky z kolostra imunizovaných krav a/nebo z vaječných žloutků imunizovaných nosnic.
2. Perorální přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rovněž obsahuje stabilizované živé kultury laktacidoprodukčních bakterií.
3. Přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že množství psích antiparvovirových protilátek je alespoň 16/100 TKID₅₀ 1g přípravku.
4. Přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rovněž obsahuje vitaminy a nosné látky.
5. Přípravek podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že stabilizovanými živými kulturami laktoacidoprodukčních bakterií jsou druhy *Enterococcus spp. a/nebo Lactobacillus spp.*
6. Přípravek podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace stabilizovaných živých kultur laktoacidoprodukčních bakterií je v rozsahu $100 \cdot 10^6$ až $100 \cdot 10^9$ živých zárodků na 1g přípravku.
7. Přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 18 až 60 hmotnostních % kolostra imunizovaných krav a/nebo vaječných žloutků imunizovaných nosnic.
8. Přípravek podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že množství vitaminů odpovídá pro vitamin A alespoň 100 m.j., pro vitamin D₃ alespoň 10 m.j. a pro vitamin E alespoň 2 mg.

9. Přípravek podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nosné látky obsahují potravinářský olej v množství od 45 do 60 hmotnostních %, silikon - hydrolyzát v množství od 4 do 6,5 hmotnostních % a destilované glyceridy v množství od 1 do 3 hmotnostních %.

10. Přípravek podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nosné látky obsahují glukózu a/nebo sacharózu a/nebo škrob v celkovém množství od 18 do 39 hmotnostních % společně s instantním sušeným mlékem a/nebo syrovátkou v celkovém množství od 18 do 39%.

11. Způsob výroby psích antivirových protilátek podle nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se imunizují dojnice a/nebo nosnice antigenem psího parvoviru, načež se získá kolostrum imunizovaných dojnic a/nebo žloutky imunizovaných nosnic a takto získaná látka se upraví do formy pro použití při imunizaci psů, například sušením.

12. Způsob výroby psích antivirových protilátek podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen psího parvoviru je kmen CAPM V-464.