

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 883

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-53**
(22) Přihlášeno: **29.01.2013**
(40) Zveřejněno: **06.08.2014**
(Věstník č. 32/2014)
(47) Uděleno: **12.06.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **24.07.2019**
(Věstník č. 30/2019)

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)

(56) Relevantní dokumenty:
Veterinářství 57 s. 624-628 (2007).
WO 2008/084294 A2; US 2005/0089533 A1; AU 2012244091 A1; WO 2004/067031 A1.

(73) Majitel patentu:
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 vynálezu:
**Multivalentní vakcína k imunoprophylaxi
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 307883 B6

Multivalentní vakcína k imunoprofylaxi infekčních onemocnění psůOblast 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 psinky, parvoviru, infekční hepatitidy, infekční laryngotracheitidy a vztekliny.

10

Dosavadní stav techniky

15

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 Duramunne – 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 Non core – 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
Hepatitida psů	Adenovirus - 1	CAV - 1	HCC, Rubartova choroba	Heterologní imunita - používá se CAV - 2 (atenuovaný kmen inf. laryngotracheitidy)
Psinka psů	Paramyxivirus	CDV	FCC (canine distemper)	Živé atenuované vakcíny
Infekční laryngo-tracheitida 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 hepatitidě CAV1
Vzteklina psů	Rhabdovirus	R	Lyssa, rabies	Inaktivovaný virus
Korona-viróza psů	Coronavirus	C		Inaktivovaný virus

5

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 leptospir do vakcíny velmi pečlivý, důkladný a předvídající geografický pobyt psa (jednotlivé sérovary se liší místem výskytu).

10

Tab. 2 Nejdůležitějších původci bakteriálních onemocnění psů skupiny C

15

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	Leptospira pomona	Lp		Inaktivovaná vakcína

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. 3 Další 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	Microsporium canis		Plísňové onemocnění psů	Inaktivovaná vakcína

5

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 čelenými 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.

10

Tab. 4 Předpokládaná délka imunity po vakcinaci

15

Název	Původce	Zkratka	Jiné názvosloví	Vakcinace
Parainfluenza psů	Parainfluenza virus	CPiV - 2	Psincový kašel	každoročně
Leptospiróza	Leptospira ictero-haemorrhagiae, 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 (canine distemper)	Minimálně 3 roky (odhad 5 až 9 let)
Parvoviróza psů	Parvovirus psů	CPV	Parvovirová enteritida	Minimálně 3 roky (odhad 5 až 9 let)
Hepatitida psů	Adenovirus - 1	CAV - 1	HCC, Rubartova choroba	Minimálně 3 roky (odhad 5 až 9 let)
Vzteklina psů	Rhabdovirus	R	Lyssa, rabies	Minimálně 3 roky
Coronaviróza psů	Coronavirus psů	C		každoročně

5 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 názvoslovi	Protektivní titr
Leptospiróza psů	Leptospira ictero-haemorrhagiae	Li		Min. MAL 1 : 32 (nahrazuje se ELISA metodou)
Leptospiróza psů	Leptospira gripotyphosa	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 enteritida	min. HIT = 1 : 80

Hepatitida psů	Adenovirus psů - 1	CAV - 1	HCC, Rubartova choroba	min.VNT = 1 : 100
Psinka psů	Virus psinky	CDV	FCC (canine distemper)	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

5 VNT = virus – neutralizační titr

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., 10 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 15 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 20 imunity.

Podstata vynálezu

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

Podstatou nového vynálezu je nové složení multivalentní vakcíny pro imunoprofylaxi infekčních onemocnění psů obsahující celkem 5 až 11 antigenů, zahrnující výhodně ve svém složení i coronavirus a 5 sérovarů leptospir, které jsou dominantní u psů na celém světě. Antigen infekční 30 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 imunoprofylaxi proti 6 až 12 nejzávažnějším infekčním psím patogenům ze skupiny:

35 – parainfluenza psů, koronaviróza psů, infekce *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira canicola*, *Leptospira bratislava* a *Leptospira pomona* s délkou ochrany 1 rok a

– psinka, parvovirus, vzteklna, infekční hepatitida a infekční laryngotracheitida s délkou ochrany 3 roky,
 5 která je ve formě pevné lyofilizované složky pro smíchání před použitím s tekutou složkou, přičemž

– imunizační antigeny pevné složky jsou alespoň 2 virové antigeny ze skupiny atenuované živé viry infekční laryngotracheitidy psů atenuované živé viry psinky psů, atenuované živé viry parvovirózy psů a atenuované živé viry parainfluenzy psů, a imunizační antigeny tekuté složky
 10 jsou ze skupiny inaktivovaný virus vztekliny, inaktivovaný coronavirus psů a 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,
 15 podle aktuálního rozšíření jednotlivých patogenů a s uvážením 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
 20 hodnot $TCID_{50} 10^{4.5}$ až $TCID_{50} 10^{7.0}$ ($TCID_{50}$, Tissue Culture Infective Dose, je množství patogenu, se kterým se dosáhne patologické změny u 50 % naočkováných kultur).

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

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
 30 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.
 35

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.
 40

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
 45 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).
 50

Multivalentní vakcína k imunoprophylaxi infekčních onemocnění psů chrání psy proti všem zásadním infekčním onemocněním psů na celém světě. Vakcína obsahuje čtyři živé, atenuované virové komponenty (psinku, parvovirus, parainfluenzu, inf. laryngotracheitidu psů), dvě

inaktivované virové komponenty (vzteklinu a coronavirus psů) a pět serovarů leptospir (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. gryppotyphosa*, *L. pomona* a *L. bratislava*).

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

Příklady uskutečnění vynálezu

- 10 Níže uvedený příklad slouží pouze pro ilustraci a lepší pochopení 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.

Příklad 1

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

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

- 25 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.

1 . Výroba multivalentní vakcíny proti infekčním onemocněním psů

- 30 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 dosažení maximálního nárůstu se 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 TCID₅₀ 10^{4,5} až TCID₅₀ 10^{7,0} (titr viru se stanoví titrací na vhodných tkáňových kulturách dle Českého lékopisu).

- 40 Výroba a testace imunogenu – inf. Laryngotracheitidy psů

- Výrobní kmen infekční laryngotracheitidy psů Adenovirus – 2 se množí staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru na narostlých buňkách tkáňové linie MDCK (buněčná linie odvozená z ledvin zdravé dospělé feny kokršpaněla). 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. hepatitidě psů. 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 kulturách).

Výroba a testace imunogenu – Parvovirózy psů

- 55 Výrobní kmen parvovirózy psů se množí staticky nebo fermentačním způsobem v bioreaktoru na narostlých buňkách tkáňové linie MDCK. 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 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

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 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

Výrobní kmen koronaviru psů se množí staticky fermentačním způsobem v bioreaktoru na narostlých buňkách tkáňové linie A – 72. Po dosažení maximálního nárůstu se virus koronaviru 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 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

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, jeho koncentrace a purifikace. U inaktivovaného, koncentrovaného a purifikovaného viru vztekliny je stanoven obsah glykoproteinu viru vztekliny. Na základě těchto stanovení je posléze 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 u psa proti vzteklině po dobu minimálně 3 let. 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 – Leptospira grippotyphosa

Výrobní kmen *Leptospira grippotyphosa* 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 icterohaemorrhagiae*

Výrobní kmen *Leptospira icterohaemorrhagiae* 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 canicola*

5

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.

10

Výroba a testace imunogenu – *Leptospira pomona*

15

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.

20

Výroba a testace imunogenu – *Leptospira bratislava*

25

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.

30

2. Složení multivalentní vakcíny proti infekčním onemocněním psů

35

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.

40

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

45

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.

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.

50

3. Imunizační postup multivalentní vakcíny proti infekčním onemocněním psů

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 leptospiroze psů pravidelné roční revakcinace, u ostatních původců infekčních nákaz (psinka, hepatitida, infekční laryngotracheitida, parvoviróza a vzteklna) pravidelné tříroční revakcinace.

4. Testace multivalentní vakcíny proti infekčním onemocněním psů

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.

Těmito čelenžními experimenty bylo jednoznačně prokázáno, že protektivní imunita trvá u parainfluenzy psů, coronavirózy a vůči jednotlivým sérovarům leptospir, obsaženým ve vakcíně po dobu jednoho roku po imunizaci a u imunizačních antigenů psinky, hepatitidy, parvovirózy, laryngotracheitidy a vzteklině trvá protektivní imunita minimálně 3 roky po provedené imunizaci.

Průmyslová využitelnost

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

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Multivalentní vakcína pro použití k imunoprophylaxi proti 6 až 12 nejzávažnějším infekčním psím patogenům ze skupiny:

– parainfluenza psů, coronaviróza psů, infekce *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira canicola*, *Leptospira bratislava* a *Leptospira pomona* s délkou ochrany 1 rok a

– psinka, parvovirus, vzteklna, infekční hepatitida a infekční laryngotracheitida s délkou ochrany 3 roky,

vyznačující se tím, že je ve formě pevné lyofilizované složky pro smíchání před použitím s tekutou složkou, přičemž

– imunizační antigeny pevné složky jsou alespoň 2 virové antigeny ze skupiny atenuované živé viry infekční laryngotracheitidy psů atenuované živé viry psinky psů, atenuované živé viry parvovirózy psů a atenuované živé viry parainfluenzy psů, a

– imunizační antigeny tekuté složky jsou ze skupiny inaktivovaný virus vztekliny, inaktivovaný coronavirus psů a alespoň jeden z inaktivovaných sérovarů leptospir, zvolených ze skupiny *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona* a *L. bratislava*.

2. Multivalentní vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že imunizační antigen parvoviru je atenuovaný živý aktuální kmen viru parvovirózy psů CPV 2b.
- 5 3. Multivalentní vakcína podle některého z nároků 1 a 2, **vyznačující se tím**, že hodnota titru viru parvovirózy psů ve finální vakcíně je v rozmezí hodnot TCID₅₀ 10^{4,5} až TCID₅₀ 10^{7,0}.
4. Multivalentní vakcína podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že hodnota titru viru vztekliny ve finální vakcíně je alespoň 1,0 IU/vakcinační dávku.
- 10 5. Multivalentní vakcína podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že jako imunitní adjuvans je v tekuté složce vakcíny obsažen gel hydroxidu hlinitého.
- 15 6. 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.
- 20 7. Multivalentní vakcína podle některého z předcházejících nároků 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.