



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0308365-9 B1**

**(22) Data do Depósito:** 06/03/2003

**(45) Data de Concessão:** 27/12/2016



---

**(54) Título:** VACINA DE DNA MÚLTIPLA PARA INJEÇÃO IN OVO

**(51) Int.Cl.:** A61K 39/255; A01N 65/00; C12P 19/34; C12N 7/00; C12N 15/00; C12N 15/66; C07H 21/04

**(30) Prioridade Unionista:** 04/03/2003 US 10/377,718, 08/03/2002 US 60/362,547

**(73) Titular(es):** SCHWEITZER CHEMICAL CORPORATION USA

**(72) Inventor(es):** TSUN-YUNG KUO

**“VACINA DE DNA MÚLTIPLA PARA INJEÇÃO *IN OVO*”****REFERÊNCIA ANTERIOR**

Este pedido reivindica a prioridade do Pedido Provisório US 60/362.647, depositado no dia 8 de março de 2002, que está incorporado neste documento por referência.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO****CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a uma vacina de DNA múltipla ou de uma vacina de DNA polivalente para usar na aquisição da imunidade embrionária em ovos de aves e também trata dos métodos de preparação e do uso da vacina. A vacina de DNA múltipla contém duas ou mais estruturas de DNA, cada uma contendo uma molécula de DNA que codifica uma proteína viral de aves ou uma fração da proteína capaz de induzir uma resposta imunológica protetora contra uma doença viral aviária em aves. A vacina de DNA polivalente contém uma estrutura de DNA contendo duas ou mais moléculas de DNA. Cada uma das moléculas de DNA representa um gene viral aviário ou uma fração do gene. A vacina de DNA polivalente é capaz de expressar dois ou mais antígenos virais e induzir respostas imunológicas protetoras contra duas ou mais doenças virais aviárias em aves. Ambas as vacinas de DNA múltipla e polivalente são injetadas de preferência no líquido amniótico do ovo das aves 18 dias após a fertilização.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A vacinação *in ovo* com vacinas contendo vírus foi extensivamente descrita por Sharma et al. (Patente US 4.458.630). Particularmente, eles demonstram que o vírus vivo da doença de Marek pode

ser injetado no líquido amniótico dentro do ovo, o que torna o embrião infectado e o vírus da vacina se multiplica em níveis elevados, o que induz a formação de anticorpos protetores no embrião tratado (Ver *Sharma* (1985), *Avian Diseases* 29, 1.155, 1.167-68).

5                   É bem conhecido na área dos negócios avícolas mundiais que certas doenças virais, tal como o vírus da doença de Marek (sigla MDV em inglês), o vírus da doença infecciosa da bursa (também chamada de doença de Gumboro) (IBDV), o vírus da doença de Newcastle (NDV), o vírus da bronquite infecciosa (IBV), o vírus da laringotraqueite infecciosa (ILTV), o vírus da  
10 encefalomielite aviária (AEV), o vírus da anemia aviária (CAV), o vírus da varíola aviária (FPV), o vírus da influenza aviária (AIV), o reovírus, o vírus da leucose aviária (ALV), o vírus da reticuloendoteliose (REV), o adenovírus aviário e o vírus da enterite hemorrágica (HEV) podem causar um grande surto e resultar em perdas econômicas significativas para a indústria avícola  
15 comercial. Entre eles, o vírus da doença de Marek (MDV), o vírus da doença de Gumboro (IBDV), o vírus da doença de Newcastle (NDV) e o vírus da bronquite infecciosa (IBV) são particularmente importantes devido à sua natureza virulenta.

                  A doença de Marek (MD) é uma doença linfoproliferativa maligna,  
20 que ocorre naturalmente em galinhas. A doença é causada por um herpesvírus, o vírus da doença de Marek (MDV). A doença de Marek (MD) é onipresente, ocorrendo nos países produtores de aves no mundo inteiro. A doença de Marek (MD) inevitavelmente causará perdas entre as aves criadas em sistemas de produção intensiva. Os sintomas da doença de Marek (MD) aparecem  
25 amplamente nos nervos, nos órgãos genitais, nos órgãos internos, nos olhos e na pele das aves infectadas, causando dificuldade motora (devido à paralisia quando os nervos são afetados), dificuldade funcional dos órgãos internos (devido a tumores), e subnutrição crônica (se os órgãos internos são atacados

pelo vírus). A doença de Marek (MD) afeta galinhas a partir de aproximadamente 6 semanas de idade, e ocorre mais frequentemente entre 12 e 24 semanas.

Por enquanto, não há nenhum método para se tratar a doença de  
5 Marek (MD). O controle da doença é principalmente realizado por práticas de manejo, como por exemplo, o isolamento das galinhas em crescimento das fontes da infecção, o uso de animais geneticamente resistentes e a vacinação. Porém, os procedimentos de manejo normalmente não são eficazes devido ao custo e a seleção das aves com elevada resistência controlada geneticamente  
10 não têm apresentado progresso significativo. Hoje em dia, o controle da doença de Marek (MD) está quase completamente baseado na vacinação.

O vírus da doença de Gumboro (IBDV) é responsável por uma doença imunossupressora altamente contagiosa em galinhas jovens que causa perdas significativas para a indústria avícola no mundo inteiro (Ver Kibenge  
15 (1988), *J. Gen. Virol.*, 69:1757-1775). A infecção de galinhas suscetíveis com cepas virulentas do vírus da doença de Gumboro (IBDV) pode levar a uma condição imunossupressora conhecida como doença infecciosa da bursa. O dano causado aos folículos linfóides da bursa de Fabricius e ao baço pode agravar as infecções causadas por outros agentes e também pode reduzir a  
20 habilidade da galinha em responder à vacinação (Ver Cosgrove (1962), *Avian Dis.*, 6:385-3.894).

O vírus da doença de Gumboro (IBDV) pertence à família de *Birnaviridae* e seu genoma consiste em dois segmentos de RNA de fita dupla (Ver Dobos *et al.* (1979), *J. Virol.*, 32:593-605). O segmento B (menor -  
25 aproximadamente 2800 bp) codifica VP1, a polimerase do dsRNA. O segmento A (maior - aproximadamente 3000 bp) codifica um polipeptídeo precursor de 110 kDa em um único molde de leitura aberta (ORF) que é processado em VP2, VP3 e VP4 maduro (Ver Azad *et al.* (1985), *Virology*, 143:35-44). A partir

de um pequeno ORF que parcialmente sobrepõe com o polipeptídeo ORF, o segmento A também pode codificar VP5, uma proteína de 17-kDa de função desconhecida (Ver *Kibenge et al.* (1991), *J. Gen. Virol.* 71:569-577).

Enquanto VP2 e VP3 são as proteínas estruturais principais do vírion, VP2 é o imunógeno que causa maior proteção no hospedeiro e causa a indução de anticorpos neutralizantes (Ver *Becht et al.* (1988), *J. Gen. Virol.*, 69:631-640; *Fahey et al.* (1989), *J. Gen. Virol.*, 70:1.473-1.481). VP3 é considerado um antígeno grupo-específico porque é reconhecido por anticorpos monoclonais (Mabs) direcionados contra VP3 de cepas de ambos os sorotipos 1 e 2 (Ver *Becht et al.* (1988), *J. Gen. Virol.*, 69:631-640). VP4 é uma protease codificada por vírus e está envolvida no processamento de proteína precursora (Ver *Jagadish et al.* (1988), *J. Virol.* 62:1.084-1.087).

No passado, o controle de infecção do vírus da doença de Gumboro (IBDV) em galinhas jovens foi alcançado através de vacinação viva com cepas não virulentas ou principalmente através da transferência do anticorpo materno induzida pela administração de vacinas com o vírus da doença de Gumboro (IBDV) vivo e morto para matrizes. Infelizmente, nos anos recentes, cepas variantes virulentas do vírus da doença de Gumboro (IBDV) foram isoladas de animais vacinados nos Estados Unidos (Ver, por exemplo, *Snyder et al.* (1988), *Avian Dis.* 32:535-539; *Van der Marel et al.* (1990), *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 97:81-83), que drasticamente arruinam a efetividade do uso de vacina viva contra o vírus da doença de Gumboro (IBDV).

Esforços também foram feitos para desenvolver uma vacina recombinante contra o vírus da doença de Gumboro (IBDV), e o genoma do vírus da doença de Gumboro (IBDV) foi clonado (Ver *Azad et al.* (1985) *Virology*, 143:35-44). O gene VP2 do vírus da doença de Gumboro (IBDV) foi clonado e expresso por levedura (Ver *Macreadie et al.* (1990), *Vaccine*, 8:549-552), como também no vírus recombinante da varíola (Ver *Bayliss et al.* (1991),

*Arch. Virol.* 120:193-205). Quando as galinhas foram imunizadas com o antígeno VP2 expresso por levedura, o anti-soro proporcionou uma proteção passiva em galinhas contra a infecção com o vírus da doença de Gumboro (IBDV). Quando usado em estudos de imunização ativa, o antígeno VP2  
5 associado ao vetor da varíola produziu uma proteção contra a mortalidade, mas não contra o dano causado a bursa de Fabricius.

O vírus da doença de Newcastle (NDV) é um vírus envelopado que contém um genoma RNA linear, de fita simples, não-segmentado, de filamento negativo. Tipicamente, famílias de vírus que contêm genomas RNA  
10 envelopados de fita simples, de filamento negativo, são classificadas em grupos que têm genomas não-segmentados (por exemplo, *Paramyxoviridae* e *Rhabdoviridae*) ou em grupos que têm genomas segmentados (por exemplo, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* e *Arenaviridae*). O vírus da doença de Newcastle (NDV), junto com o vírus de parainfluenza, o vírus de Sendai, o vírus  
15 símio 5 e o vírus da caxumba, pertence à família de *Paramyxoviridae*.

Os elementos estruturais do vírus da doença de Newcastle (NDV) incluem o vírus envelopado que é uma bicamada lipídica, derivado da membrana plasmática da célula. A glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) projeta-se a partir do envelope permitindo que o vírus contenha ambas  
20 atividades de hemaglutinina e neuraminidase. A glicoproteína de fusão (F), que também interage com a membrana viral, é produzida primeiramente como um precursor inativo, então clivada pós-translacionalmente para produzir dois polipeptídeos ligados por pontos dissulfeto. A proteína F ativa (da glicoproteína de fusão) está envolvida na penetração do vírus da doença de Newcastle  
25 (NDV) em células hospedeiras através da facilitação da fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira. A proteína matriz (M), está envolvida na montagem viral e interage com ambas a membrana viral e as proteínas nucleocapsídicas.

A subunidade principal da proteína nucleocapsídica do vírus da doença de Newcastle (NDV) é a proteína nucleocapsídica (NP) que confere simetria helicoidal no capsídeo. As proteínas P e L estão em associação com o nucleocapsídeo. Acredita-se que a fosfoproteína (P), que é sujeita à fosforilação, tem uma função reguladora na transcrição, e também pode estar envolvida na metilação, fosforilação e poliadenilação. O gene L, que codifica uma polimerase de RNA, RNA-dependente, é necessário para a síntese de RNA viral, junto com a proteína P. A proteína L que ocupa quase a metade da capacidade de codificação do genoma viral é a maior das proteínas virais, e tem uma função importante em ambas a transcrição e a replicação.

A replicação de todos os vírus de RNA, de filamento negativo, inclusive o vírus da doença de Newcastle (NDV), é complicada pela ausência do mecanismo celular exigido para reproduzir o RNA. Adicionalmente, o genoma de filamento negativo não pode ser traduzido diretamente em proteína, mas primeiramente ele deve ser transcrito em uma cópia de filamento positivo (mRNA). Em consequência disso, ao entrar na célula hospedeira, o vírus não pode sintetizar a RNA polimerase RNA-dependente exigida. As proteínas L, P e NP têm que entrar na célula junto com o genoma na infecção. Ambos os genomas NDV de filamento negativo (vRNA) e os antigenomas (cRNA) estão encapsulados por proteínas nucleocapsídicas; as únicas espécies de RNA não-encapsulados são os mRNAs de vírus. O citoplasma é o local da replicação RNA viral do vírus da doença de Newcastle (NDV), da mesma maneira que é o local para transcrição. A montagem dos componentes virais parece ocorrer na membrana plasmática da célula hospedeira e o vírus maduro é liberado por brotamento.

A Patente US 5.427.791, Ahmad et al. descrevem a vacinação embrionária contra o vírus da doença de Newcastle (NDV) que necessita de modificação dos vírus pelo uso do etilmetano sulfonado (EMS). Porém, como o

EMS é um agente mutagênico, tanto que a vacina preparada pelo uso de EMS é suspeita de agir como um agente mutagênico, o que é indesejável para administração regular da vacina. Apesar disso, sem a modificação com EMS, a vacina do vírus da doença de Newcastle (NDV) não pode ser aplicada na  
5 vacinação *in ovo* porque quase todos os embriões morrerão após a injeção dos ovos com o vírus não-modificado.

O vírus da bronquite infecciosa (IBV), o protótipo da família de *Coronaviridae*, é o agente etiológico da bronquite infecciosa (IB). O vírus tem um genoma de RNA de fita simples, de aproximadamente 20 kb em  
10 comprimento, de polaridade positiva, e tem normalmente cerca de 80-100 nm, sendo redondo com espículas salientes de 20 nm. O vírus da bronquite infecciosa (IBV) é o agente causal de uma doença aguda, altamente contagiosa em galinhas de todas as idades, afetando os sistemas respiratório, reprodutivo e renal.

15 O vírus da bronquite infecciosa (IBV) contém três proteínas estruturais: a glicoproteína de espícula (S), a glicoproteína de membrana e a proteína nucleocapsídica. A glicoproteína de espícula é chamada assim porque ela está presente nas projeções de superfície no formato de uma lágrima ou espícula que protruem da membrana lipídica do vírus. Acredita-se que a  
20 proteína de espícula é provavelmente responsável pela antigenicidade do vírus, em parte por analogia com as proteínas de espícula de outros coronavírus e em parte pelas experiências de neutralização *in vitro* (Ver, por exemplo, D. Cavanagh *et al.* (1984), *Avian Pathology*, 13, 573-583). Há duas glicoproteínas de espícula que são S1 (90.000 daltons) e S2 (84.000 daltons). Estima-se que  
25 os componentes polipeptídeos das glicoproteínas S1 e S2 têm um peso molecular combinado de aproximadamente 125.000 daltons após a remoção enzimática dos oligossacarídeos. Aparentemente a proteína de espícula é fixada à membrana viral pelo polipeptídeo S2.



O vírus da bronquite infecciosa (IBV) é freqüente nos países onde uma indústria aviária intensiva foi desenvolvida. As galinhas jovens de até 4 semanas de idade são as mais suscetíveis ao vírus da bronquite infecciosa (IBV). A infecção leva a taxas altas de morbidez e à mortalidade que é o  
5 resultado de infecção bacteriana secundária. A infecção também resulta em queda na produção de ovos, bem como em falha na postura em sua potencialidade, junto com um aumento no número de ovos produzidos classificados como inferiores com casca delgada, deformada, áspera e mole que pode ter um efeito econômico grave.

10 A administração de vacinas vivas para pinto em desenvolvimento no ovo (*in ovo*) provou ser um método rápido (40.000 ovos por hora), efetivo (100% dos ovos recebem a vacina), e que poupa trabalho (\$100.000 por ano por incubadora) para vacinar pintos contra certas doenças antes da eclosão.

A primeira máquina de vacinação *in ovo* para ser usada em ovos  
15 de galinhas em incubação foi desenvolvida pela Embrex, Inc., de Raleigh, N.C. nos anos 80. (Ver as Patentes US 5.056.464 e 5.699.751). Esta máquina de vacinação *in ovo* é atualmente usada em aproximadamente 80% das incubadoras norte-americanas, principalmente para administrar vacinas contra a doença de Marek (MD). Esta máquina que provou ser segura e efetiva na  
20 vacinação de pintos contra a doença de Marek (MD), também está sendo usada crescentemente para administrar vacinas contra a doença de Gumboro (IBD) e a doença de Newcastle (ND).

Na invenção a ser apresentada nas seguintes seções, uma imunização mediada por DNA (coletivamente chamadas de "vacinas de DNA")  
25 será introduzida. Há dois tipos de vacinas de DNA, isto é, uma vacina de DNA múltipla e uma vacina de DNA polivalente. A vacina de DNA múltipla da presente invenção contém uma combinação de duas ou mais estruturas de DNA, cada uma contendo uma única molécula de DNA que é um gene viral ou

um fragmento dele. A vacina de DNA polivalente da presente invenção contém dois ou mais genes virais ou fragmentos que se unem em uma estrutura de DNA. Os genes virais ou fragmentos usados na preparação da vacina de DNA múltipla ou polivalente são aqueles que codificam peptídeos virais que são  
5 antigênicos e podem induzir o sistema imunológico celular e humoral do hospedeiro. As vacinas de DNA são aplicadas no ovo, de preferência por meio de agulhas. A injeção das vacinas de DNA *in ovo* leva a respostas imunológicas surpreendentemente fortes que incluem não só a indução de anticorpos e a ativação de células T com secreção de citocina, mas também a  
10 produção de linfócitos T citotóxicos (CTL).

#### DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece uma vacina de DNA múltipla para injeção *in ovo*. A vacina de DNA múltipla contém duas ou mais estruturas de DNA, cada estrutura de DNA expressando uma proteína antigênica de um vírus  
15 aviário que causa doença aviária viral em aves. A proteína antigênica do vírus aviário é capaz de induzir uma resposta imunológica protetora contra uma doença aviária viral. A vacina de DNA múltipla é injetada de preferência no ovo, particularmente no líquido amniótico do ovo da ave. O ovo é incubado de preferência durante cerca de 18 dias. As aves preferidas incluem galinha, peru,  
20 pato e ganso.

A estrutura de DNA contém uma molécula e um vetor de DNA. O vetor pode ser um plasmídeo ou um carreador viral. O vetor preferido é um plasmídeo. Exemplos do plasmídeo incluem, mas não são limitados a, pcDNA3, pVAX1, pSectag, pTracer, pDisplay, plasmídeo do sistema pUC  
25 (como pUC7, pUC8, pUC18), e plasmídeo do sistema pGEM. Alternativamente, qualquer plasmídeo que contém um promotor como promotor de CMV, promotor de SV40, promotor de RSV, e promotor de  $\beta$ -actina, também pode ser usado para preparar a estrutura de DNA. O plasmídeo mais favorável é o

pcDNA3. O carreador viral preferido é selecionado do grupo que consiste em um baculovírus, um herpesvírus e um poxvírus.

Exemplos de vírus aviário incluem, mas não são limitados ao vírus da doença Marek (MDV), vírus da doença de Gumboro (IBDV), vírus da doença de Newcastle (NDV), vírus da bronquite infecciosa (IBV), vírus da laringotraqueite infecciosa (ILTV), vírus da encefalomielite aviária (AEV), vírus da leucose aviária (ALV), poxvírus aviário (FPV), paramyxovírus aviário (APV), vírus da hepatite de pato (sigla DHV em inglês), e vírus da enterite hemorrágica (HEV).

As moléculas de DNA que são particularmente adequadas para a indução de uma resposta imunológica protetora contra as doenças aviárias virais mencionadas acima, incluem, mas não são limitadas ao gene inteiro gB do vírus da doença de Marek (MDV) tendo a sequência de DNA SEQ ID Nº:1 ou um fragmento dessa; o gene inteiro VP2 do vírus da doença de Gumboro (IBDV) tendo a sequência de DNA SEQ ID Nº:2 ou um fragmento dessa; o gene inteiro HN do vírus da doença de Newcastle (NDV) tendo a sequência de DNA (das bases 6.321 a 8.319) SEQ ID Nº:3 ou um fragmento dessa (isto é, SEQ ID Nº:3 é o genoma inteiro do vírus da doença de Newcastle (NDV)); o gene inteiro S1 do vírus da bronquite infecciosa (IBV) tendo a sequência de DNA SEQ ID Nº:4 ou um fragmento dessa; o gene inteiro G de glicoproteína do vírus da laringotraqueite infecciosa (ILTV) tendo a sequência de DNA SEQ ID Nº:5 ou um fragmento dessa; os genes inteiros VP1, VP0 ou VP3 do vírus da encefalomielite aviária (AEV) ou um fragmento dos genes (o gene VP1 tem a sequência de DNA SEQ ID Nº:6; o gene VP0 tem a sequência de DNA SEQ ID Nº:7; e o gene VP3 tem a sequência de DNA SEQ ID Nº:8); o gene inteiro G de paraglicoproteína do vírus da parainfluenza aviária (APV) tendo a sequência de DNA SEQ ID Nº:9 ou um fragmento dessa; o gene inteiro de base de pentamérica tipo A do vírus da enterite hemorrágica (HEV) tendo a sequência

de DNA SEQ ID Nº:10 ou um fragmento dessa; e o gene inteiro de antígeno de envelope do vírus da varíola aviária (FPV) tendo a seqüência de DNA SEQ ID Nº:11 ou um fragmento dessa.

Um exemplo preferido da vacina de DNA contém duas estruturas de DNA, cada uma contendo uma molécula capaz de expressar um gene ou um fragmento do gene que é do vírus da doença de Marek (MDV), do vírus da doença de Gumboro (IBDV), do vírus da doença de Newcastle (NDV) ou do vírus da bronquite infecciosa (IBV).

Outro exemplo preferido da vacina de DNA múltipla contém três ou mais estruturas de DNA, cada uma contendo uma molécula de DNA capaz de expressar um gene ou um fragmento do gene que é do vírus da doença de Marek (MDV), do vírus da doença de Gumboro (IBDV), do vírus da doença de Newcastle (NDV) ou do vírus da bronquite infecciosa (IBV).

A presente invenção também fornece um método de vacinação de ovos de aves e um método de preparação da vacina de DNA múltipla. O método de vacinação de ovos de aves inclui a injeção da vacina de DNA múltipla nos ovos das aves como mostrado acima. O método de preparação da vacina de DNA múltipla inclui a ligação da molécula de DNA a um plasmídeo ou carreador de vírus para formar uma estrutura de DNA; e depois misturar duas ou mais destas estruturas de DNA para formar uma vacina de DNA múltipla. A inserção da molécula de DNA no vetor pode ser alcançada através do método convencional, isto é, através da ligação da molécula de DNA com uma enzima tal como T4 DNA ligase quando ambos os genes e o vetor desejado são cortados com a(s) mesma(s) enzima(s) de restrição como finais complementares de DNA são produzidos desse modo. Para pcDNA3, as enzimas de restrição preferidas são BamH1 e EcoR1.

Em uma outra formação, uma vacina de DNA polivalente é fornecida para a injeção *in ovo*. A vacina de DNA polivalente inclui uma

estrutura de DNA contendo duas ou mais moléculas de DNA ligadas com um vetor. Cada uma das moléculas de DNA expressa uma proteína antigênica de um vírus aviário, o que é capaz de induzir uma resposta imunológica protetora contra aquela doença aviária viral em aves. A vacina de DNA polivalente é

5 injetada de preferência no ovo das aves. Cada uma das moléculas de DNA de uma vacina de DNA polivalente é um gene ou um fragmento do gene do vírus da doença de Marek (MDV), vírus da doença de Gumboro (IBDV), vírus da doença de Newcastle (NDV), vírus da bronquite infecciosa (IBV), vírus da laringotraqueite (ILTV), vírus da encefalomielite aviária (AEV), vírus da leucose

10 aviária (ALV), vírus da varíola aviária (FPV), vírus da parainfluenza aviária (APV), vírus da hepatite de pato (DHV) e o vírus da enterite hemorrágica (HEV).

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Vacinas aviárias tradicionais incluem vacinas com o vírus

15 quimicamente desativado ou vacinas com o vírus vivo modificado. Vacinas inativadas requerem imunizações adicionais, cuja produção é cara e a aplicação necessita de muito trabalho. Além disso, algumas partículas virais infecciosas podem sobreviver ao processo de inativação e podem causar doença depois da aplicação no animal.

20 Em geral, as vacinas com vírus vivo atenuado são preferidas em vez de vacinas inativadas porque elas evocam uma resposta imunológica freqüentemente associada a ambas as reações humoral e celular. Tais vacinas normalmente são obtidas pela passagem seriada de cepas virulentas em cultura de tecido. Porém, o processo de atenuação induz mutações do genoma

25 viral, resultando em uma população de partículas virais heterogênea quanto à virulência e às propriedades de imunização. Além disso, é bem conhecido que as vacinas tradicionais com o vírus vivo atenuado podem reverter à virulência que resulta em surtos de doença em animais inoculados e na possível

expansão do elemento patogênico para outros animais.

Por esta razão, é vantajoso para a indústria empregar vacinas baseadas na tecnologia recombinante de DNA. As vacinas de DNA resultantes só contêm e expressam o material antigênico necessário e relevante que é capaz de eliciar uma resposta imunológica protetora contra os elementos patogênicos e que não teria as desvantagens das vacinas vivas ou inativadas mencionadas acima.

Com a finalidade de preparar vacinas de DNA múltiplas ou vacinas de DNA recombinantes polivalentes, a sequência de DNA do gene (também pode ser denominada como “molécula de DNA”) não precisa conter o comprimento completo do DNA que codifica os polipeptídeos. Na maioria dos casos, um fragmento do gene que codifica uma região de epitopo deveria ser suficiente para a imunização. A sequência de DNA de uma região de epitopo pode ser encontrada através pelo seqüenciamento da parte correspondente de outras cepas virais e depois compará-las. É provável que os principais determinantes antigênicos sejam aqueles que mostram a maior heterologia. É também provável que estas regiões ficam de modo acessível na estrutura adaptável das proteínas. Um ou mais de tais fragmentos de genes que codificam os determinantes antigênicos podem ser preparados através de síntese química ou de tecnologia de DNA recombinante. Estes fragmentos de genes, se desejável, podem ser unidos um ao outro ou podem ser ligados a outras moléculas de DNA.

Além disso, os genes virais não precisam ser de DNA. De fato, algumas das doenças aviárias virais freqüentemente encontradas são causadas por RNA vírus, de fita dupla ou de fita simples. Por exemplo, o vírus da doença de Marek é um vírus de RNA de fita dupla, enquanto o vírus da doença de Gumboro (IBDV), o vírus da doença de Newcastle (NDV) e o vírus da bronquite infecciosa (IB) são vírus de RNA de fita simples. Porém, as

seqüências virais de RNA podem ser transcritas reversamente em DNA usando a tecnologia de Reação em Cadeia por Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) e depois incorporadas em um vetor pela tecnologia convencional de DNA recombinante.

5                    Além disso, por causa da degeneração do código genético, é possível ter numerosas seqüências de RNA e DNA que codificam uma seqüência de aminoácido especificada. Assim todas as seqüências de RNA e DNA que resultam na expressão de um polipeptídeo, com características de ligação de anticorpo, são abrangidas por esta invenção.

10                   Para elaborar uma vacina de DNA recombinante, seja univalente seja polivalente, a seqüência de DNA do gene viral pode ser ligada a outras moléculas de DNA com quais ela não é associada ou ligada naturalmente. Opcionalmente, a seqüência de DNA de um gene viral pode ser ligada a uma outra molécula de DNA, isto é, um vetor, que contém porções de suas  
15 seqüências de codificação de proteína de fusão de DNA, tal como  $\beta$ -galactosidase, resultando em uma molécula denominada de ácido nucléico recombinante ou estrutura de DNA, que pode ser usada para a transformação de um hospedeiro adequado. Tal vetor é derivado, de preferência, por exemplo, de plasmídeos ou seqüências de ácido nucléico, presentes em bacteriófagos,  
20 cosmídeos ou vírus.

Vetores específicos que podem ser usados para clonar seqüências de ácido nucléico, de acordo com a invenção, são conhecidos cientificamente e incluem seja um plasmídeo ou um carreador de vírus. Exemplos do plasmídeo incluem, mas não são limitados a pBR322, pcDNA3,  
25 pVAX1, pSectag, pTracer, pDisplay, plasmídeos de sistema de pUC (por exemplo, pUC7, pUC8, pUC18), plasmídeos de sistema de pGEM, plasmídeos Bluescript ou quaisquer outros plasmídeos onde o promotor de CMV, promotor de SV40, promotor de RSV, ou o promotor de  $\beta$ -actina é incluído. O plasmídeo

preferido é o pcDNA3. Exemplos do carreador de vírus incluem, mas não são limitados a bacteriófagos (por exemplo  $\lambda$  e os fagos derivados de M13), SV40, adenovírus, polyoma, baculovírus, herpesvírus (HVT) ou poxvírus (por exemplo, vírus da varíola aviária).

- 5 Os métodos utilizados para a construção de uma molécula de ácido nucléico recombinante são conhecidos no meio científico. Por exemplo, a inserção da sequência de ácido nucléico no vetor de clonagem pode ser alcançada facilmente através da ligação com uma enzima como T4 DNA ligase quando ambos os genes e o veículo de clonagem desejado são cortadas com  
10 a(s) mesma(s) enzima(s) de restrição, para que os fins de DNA complementares sejam assim produzidos.

- Alternativamente, pode ser necessário modificar os locais de restrição para produzir fins cegos pela digestão do DNA de fita simples ou pelo preenchimento dos fins recessivos com uma DNA polimerase apropriada.
- 15 Subseqüentemente, a ligação do fim cego com uma enzima tal como T4 DNA ligase pode ser realizada. Se for desejado, qualquer local de restrição pode ser produzido através da ligação de ligadores aos fins de DNA. Tais ligadores podem incluir seqüências de oligonucleotídeos específicas que codificam as seqüências do local de restrição. O vetor clivado pela enzima de restrição e a  
20 seqüência de ácido nucléico também podem ser modificados através do enfraquecimento homopolimérico.

- A presente invenção fornece dois tipos de vacinas de DNA. O primeiro tipo é uma vacina de DNA múltipla que inclui duas ou mais das vacinas de DNA univalentes, cada uma contendo uma seqüência de DNA que  
25 codifica pelo menos um polipeptídeo, assim permitindo proteção contra uma doença viral tal como o vírus da doença de Marek (MDV), vírus da doença de Gumboro (IBDV), vírus da doença de Newcastle (NDV), vírus da bronquite infecciosa (IBV), vírus da laringotraqueite infecciosa (ILTV), vírus da



encefalomielite aviária (AEV), vírus da varíola aviária (FPV), vírus da influenza aviária (AIV), vírus da leucose aviária (ALV), genoma B do vírus da hepatite de patos o vírus da enterite hemorrágica (HEV), inserida em um plasmídeo disponível comercialmente.

5                   O segundo tipo é uma vacina de DNA recombinante polivalente que contém dois ou mais genes ou fragmentos de genes de vírus diferentes. Estes genes ou frações de genes são levados por um vetor útil que pode ser um plasmídeo ou um carreador de vírus. A vacina de DNA recombinante polivalente codifica dois ou mais polipeptídeos antigênicos que permitem uma  
10   proteção contra pelo menos duas doenças virais, incluindo, mas não limitados à doença de Marek (MD), doença de Gumboro (IBD), doença de Newcastle (ND) ou bronquite infecciosa (IB). Os genes virais ou os fragmentos dos genes são ligados de maneira eficaz ao vetor em um molde de leitura para que eles possam ser expressos em um hospedeiro. As diferentes seqüências de DNA  
15   estruturais levadas pelo vetor podem ser separadas pelas seqüências de término e de começo para que as proteínas possam ser expressas separadamente ou elas podem ser uma parte de um molde de leitura simples e por isso serem produzidas como uma proteína de fusão através dos métodos conhecidos na ciência.

20                   As seqüências preferidas de DNA incluem, mas não são limitadas ao gene inteiro gB do vírus da doença de Marek (MDV) tendo a seqüência de DNA SEQ ID Nº:1 ou um fragmento dessa; o gene inteiro VP2 inteiro do vírus da doença de Gumboro (IBDV) tendo a seqüência de DNA SEQ ID Nº:2 ou um fragmento dessa; o gene inteiro HN do vírus da doença de Newcastle (NDV)  
25   tendo a seqüência de DNA SEQ ID Nº:3 ou um fragmento dessa; o gene inteiro S1 do vírus da bronquite infecciosa (IBV) tendo a seqüência de DNA SEQ ID Nº:4 ou um fragmento dessa.

A seqüência de DNA que codifica o polipeptídeo gB do vírus da

doença de Marek (MDV) tem a sequência de ácido nucléico como SEQ ID Nº:1.  
A sequência de DNA contém 3.650 bp do DNA linear.

A sequência de DNA que codifica o polipeptídeo VP2 do vírus da  
doença de Gumboro (IBDV) tem a sequência de ácido nucléico como SEQ ID  
5 Nº:2. A sequência de DNA contém 3004 bp da molécula de DNA linear que é  
transcrita reversamente do RNA padrão do vírus da doença de Gumboro  
(IBDV).

A sequência de DNA do genoma inteiro do vírus da doença de  
Newcastle (NDV) contém 15.186 bps de DNA, em que (1) as bases 56 a 1.792  
10 codificam o polipeptídeo NP que é uma proteína do capsídeo do núcleo; (2) as  
bases 1.804 a 3.244 codificam o polipeptídeo P, que é uma fosfoproteína; (3)  
as bases 3.256 a 4.487 codificam o polipeptídeo M que é uma proteína de  
matriz; (4) as bases 4.498 a 6.279 codificam o polipeptídeo F que é uma  
proteína de fusão; (5) as bases 6.321 a 8.319 codificam o polipeptídeo HN que  
15 é uma hemaglutinina-neuraminidase; (6) as bases 8.370 a 15.073 codificam o  
polipeptídeo L que é uma proteína polimerase grande. O genoma do vírus da  
doença de Newcastle (NDV) tem a sequência de DNA como SEQ ID Nº:3.

A sequência de DNA do polipeptídeo S1 contém 1.611 bp de  
sequência de DNA linear como mostrado em SEQ ID Nº:4 que é transcrita  
20 reversamente dos padrões RNA do vírus da bronquite infecciosa (IBV).

Os seguintes esboços experimentais são ilustrativos, mas não  
limitam o escopo da presente invenção. Variações razoáveis, como aquelas  
que ocorrem com um bom artesão, podem ser feitas sem fugir do escopo da  
presente invenção.

25

## **I. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **(A) VÍRUS E VACINAS**

O vírus da bronquite infecciosa (IBV) e as vacinas contra a  
doença de Gumboro (IBD) e a doença de Newcastle (ND) foram compradas da

Intervet Inc.

### **(B) ISOLAMENTO DO RNA VIRAL E RT-PCR**

Duzentos microlitros de vacinas atenuadas diluídas (Intervet Inc.) foram dissolvidos em um tampão GTC resfriado (4 M isotiocianato de guanidina, 25mM citrato de sódio, pH 7,0, 0,5% Sarkosyl, 0,1 M - mercaptoetanol) e acetato de sódio (pH 4). Um volume igual de fenol-clorofórmio (1:1) foi acrescentado e colocado em gelo durante 15 minutos depois de vortexing. A fase aquosa foi coletada depois da centrifugação e o RNA foi precipitado com um volume igual de isopropanol. O RNA foi peletizado por centrifugação a 12.000 rpm por 20 min a 4°C e depois suspenso em água destilada deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e depois armazenado a -70°C.

### **(C) OLIGONUCLEOTÍDEOS**

Os primers de oligonucleotídeos para a ampliação do RT-PCR foram comprados da Promega e foram projetados de acordo com o genoma do vírus da bronquite infecciosa aviária (cepa Beaudette CK), do vírus da doença de Newcastle (cepa Lasota) e do vírus da doença de Gumboro, respectivamente. As seqüências dos primers usados para PCR foram:

IBS1F 5' CGg gat ccg ccg ccg ccA TGT TGG TAA CAC CTC TT 3'; (SEQ ID N°:12)

IBS1R 5' CGG AAT TCT TAA CGT CTA AAA CGA CGT GT 3'; (SEQ ID N°:13)

NDF F 5' CGG GAT CCG CCG CCG CCA TGG GCT CCA GAC CTT CTA CC 3'; (SEQ ID N°:14)

NDF R 5' CCG CTC GAG TTA CAT TTT TGT AGT GGC TCT CAT T 3'; (SEQ ID N°:15)

NDHN F 5' CGG GAT CCG CCG CCG CCA TGG ACC GCG CCG TTA GGC AAG 3'; (SEQ ID NO:16)

NDHN R 5' GCT CTA GAT TAC TCA ACT AGC CAG ACC TG 3'; (SEQ ID

Nº:17)

IBDVP2F 5' CGG GAT CCG CCG CCG CCA TGA CAA ACC TGC AAG AT 3';

(SEQ ID NO:18)

IBDVP2R 5' CGG AAT TCT TAC CTT ATG GCC CGG ATT AT 3'; (SEQ ID

5 NO:19)

#### **(D) REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE COM TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)**

A transcrição reversa do RNA do vírus da bronquite infecciosa (IBV), do vírus da doença de Newcastle (NDV) e do vírus da doença de Gumboro (IBDV) foi realizada a 42°C por 30 minutos em um tampão 2,5 x Taq (200 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl, pH7,4, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM β-mercaptoetanol e 0,25 mM de cada um - dATP, dCTP, dGTP e dTTP). Além do tampão Taq, a mistura de reação (40 µl) também conteve RNA viral, 2,4 U de transcrição reversa do vírus de mieloblastose aviária (AMV) (Promega), 16 U de RNAsin (Promega) e 0,01 nmol primer reverso (IBDVP2R, NDF F, NDHN F ou IBS1R). O volume final da mistura de reação era 40 µl. Depois da transcrição reversa, os seguintes reagentes foram acrescentados à mistura de transcrição reversa: 0,02 nmol de cada trifosfato de nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,01 nmol de primer iniciador (IBDVP2F, NDF R, NDHN R ou IBS1F) e 1,5 U de Taq DNA polymerase (Strategene). Depois disso, água foi acrescentada até um volume final de 100 µl. A reação foi executada durante 32 ciclos em um termociclador (Perkin Elmer-Cetus). Cada ciclo de PCR consistiu na desnaturação por 1 minuto a 94°C, no anelamento por 1 minuto a 57°C e no alongamento da cadeia de DNA por 2 minutos a 72°C.

#### **(E) PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS DE DNA**

Os plasmídeos pCMV-VP2, pCMV-S1, pCMV-NDF e pCMV-NDHN foram construídos com os genes VP2, S1, NDF e NDHN da vacina contra a doença de Gumboro (IBD), da vacina contra o vírus da doença da bronquite infecciosa (IBV) e da vacina contra o vírus da doença de Newcastle

(NDV), respectivamente, e colocados no plasmídeo comercial pcDNA3 (Invitrogen, E.U.A.). Todos os genes foram inseridos no vetor pcDNA3 usando enzimas de restrição BamHI, EcoRI, XbaI e XhoI (caracteres sublinhados na sequência dos primers). As seqüências de todos os genes no vetor pcDNA3  
 5 foram verificadas através do seqüenciamento em ambas as direções.

#### **(F) PREPARAÇÃO DE DNA E DISPERSÃO DE DNA**

A quantidade do DNA do plasmídeo que foi purificado através da cromatografia de afinidade (Qiagen Inc.) foi determinada por medidas espectrofotométricas a 260 e 280 nm. O DNA em alíquotas a 100 µg foi  
 10 suspenso em 100 µl de PBS (0,14M NaCl, 10mM fosfato de sódio, pH 7,4). Para a dispersão do DNA, uma seringa de 1ml com 20 escalas e uma agulha de 1 e 1/2 polegada foram utilizadas. Para os grupos *in ovo*, os embriões (ovos com 18 dias após a fertilização e em desenvolvimento das bandejas de incubação) foram injetados com vacina de DNA de 0,1 mililitro (100 µg) na  
 15 extremidade mais larga de cada ovo através da câmara de ar com agulha. Depois disso, os ovos foram transferidos para a incubadora onde eles permaneceram até a eclosão com aproximadamente 21 dias de idade. No caso da vacina intramuscular (sigla IM), todas foram injetadas no músculo torácico da galinha (1/5 da dose das vacinas vivas) 10 dias após a eclosão.

20

#### **II. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Ovos livres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free – SPF) fertilizados (n=60) foram aleatoriamente colocados em 12 grupos. Em todos os grupos (cinco ovos em cada grupo), cada ovo recebeu o volume de 100 µl de vacina. Uma mistura de 100 µg de pCMV-NDF + 100 µg de pCMV-NDHN foi injetada em cada ovo do grupo A, 100 µg de pCMV-S1 foi injetado  
 25 em cada ovo do grupo B, 100 µg de pCMV-VP2 foi injetado em cada ovo de grupo C, uma mistura de 100 µg de pCMV-NDF + 100 µg de pCMV-NDHN + 100 µg de pCMV-S1 (ND+IB) foi injetada em cada ovo do grupo D, uma mistura

de 100 µg de pCMV-NDF + 100 µg de pCMV-NDHN + 100 µg de pCMV-VP2 (ND+IBD) foi injetada em cada ovo do grupo E, uma mistura de 100 µg de pCMV-VP2 + 100 µg de pCMV-VP2 mistura (IB+IBD) foi injetada em cada ovo do grupo F, uma mistura de 100 µg de pCMV-NDF + 100 µg de pCMV-NDHN + 100 µg de pCMV-S1 + 100 µg de pCMV-VP2 (ND+IB+IBD) foi injetada em cada ovo do grupo G, uma dose da vacina comercial *in ovo* contra a doença de Gumboro (IBD) (Embrex, Inc.) foi injetada em cada ovo do grupo H como controle positivo, e 100 µl de PBS foi injetado em cada ovo do grupo I, J, K e L. Todas as aves neste trabalho receberam um volume de 100 µl de vacina cada (1/5 das vacinas vivas), injetado no músculo torácico, 10 dias após a eclosão. As aves do grupo A e I foram injetadas com a vacina contra o vírus da doença de Newcastle (NDV), as do grupo B e J foram injetadas com a vacina contra o vírus da bronquite infecciosa (IBV), as do grupo C e K foram injetadas com a vacina contra o vírus da doença de Gumboro (IBDV), as do grupo D foram injetadas com a mistura das vacinas contra o vírus da doença de Newcastle (NDV) e contra a bronquite infecciosa (IB), as do grupo E foram injetadas com a mistura das vacinas contra o vírus da doença de Newcastle (NDV) e contra a doença de Gumboro (IBD), as do grupo F foram injetadas com a mistura das vacinas contra a bronquite infecciosa (IB) e contra a doença de Gumboro (IBD) e as do grupo G e L foram injetadas com a mistura das vacinas contra o vírus da doença de Newcastle (NDV), contra a bronquite infecciosa (IB) e contra a doença de Gumboro (IBD).

### III. DETECÇÃO DE SEROLOGIA

Todas as amostras de soro foram coletadas 10 dias (as aves injetadas com vacinas vivas de baixa dosagem foram coletadas ao mesmo tempo), 17 dias, 24 dias e 31 dias após a eclosão. Os títulos de anticorpos foram detectados por ELISA usando kits laboratoriais para detecção de anticorpos para bronquite infecciosa (IB), doença de Gumboro (IBD) e vírus da

doença de Newcastle (NDV), comprados da IDEXX Laboratories, Inc. Todas as amostras foram analisadas em duplicadas. Antes da análise, as amostras do teste foram diluídas quinhentas vezes (1:500) com diluentes para amostras. Os procedimentos dos testes foram aplicados de acordo com o manual do equipamento. Para a validação do ensaio, foi necessário mensurar e registrar os valores de absorvência a 650 nm, A (650). O nível relativo de anticorpo foi determinado calculando a relação amostra positiva (S/P). Os títulos máximos foram calculados usando a fórmula:

$$\text{Log}_{10}\text{Título} = 1,09(\text{Log}_{10}\text{S/P}) + 3,36$$

10

### RESULTADOS

Como mostrado na Tabela 1, os resultados demonstraram que para a detecção de anticorpos anti-IBD (doença de Gumboro), os antígenos recombinantes VP2 do vírus da doença de Gumboro (IBDV) podem ser expressos e eles tiveram o papel da estimulação primária. Os títulos aumentaram rapidamente após o booster de uma vacina de baixa dosagem. Os títulos do grupo C, E, F e G 17 dias após a eclosão (isto é, 7 dias após a injeção intramuscular (IM)) foram significativamente mais altos do que os títulos do grupo K e L. O mais importante é que a expressão do antígeno do vírus da doença de Gumboro (IBDV) não sofreu interferência de outras vacinas de DNA monovalentes (vírus da doença de Newcastle (NDV) e vírus da bronquite infecciosa (IBV)). Os mesmos resultados foram aplicados às vacinas de DNA da bronquite infecciosa (IB) e do vírus da doença de Newcastle (NDV). Os títulos do grupo B, D, F, e G foram mais altos do que os títulos do grupo J e L 17 dias após a eclosão (Tabela 2) e os títulos do grupo A, D, E e G foram mais altos do que os títulos do grupo I e L 17 dias após a eclosão (Tabela 3). O único resultado imprevisível foi que o título anti-NDV (vírus da doença de Newcastle) não pode ser altamente induzido pela vacina de DNA triplovalente (Tabela 3, grupo G), mas o título anti-IBD (doença de Gumboro) e anti-IB

(bronquite infecciosa) podem (Tabelas 1 e 2, grupo G).

**TABELA 1**

Amostras de Soro Analisadas por Kits Laboratoriais para Detecção de Anticorpos da Doença de Gumboro (IBD) IDEXX (Os títulos de anticorpos correspondem a valores médios  $\pm$  SD).

PROGRAMAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO E DA COLETA DE AMOSTRAS (DIAS)				
GRUPO DE ANIMAIS	10 DIAS AE*	17 DIAS AE	24 DIAS AE	31 DIAS AE
C (IBD)	—**	4.535 $\pm$ 1.267	16.623 $\pm$ 3.105	21.254 $\pm$ 3.852
E (IBD+ND)	—	1.685 $\pm$ 655	17.339 $\pm$ 2.185	19.041 $\pm$ 2.967
F (IBD+IB)	—	8.252 $\pm$ 2.205	10.057 $\pm$ 1.295	17.561 $\pm$ 2.006
G (IBD+IB+ND)	—	9.111 $\pm$ 1.701	13.127 $\pm$ 1.763	16.694 $\pm$ 2.134
H (IBD positivo)	6.553 $\pm$ 851	13.025 $\pm$ 2.131	18.015 $\pm$ 1.592	18.853 $\pm$ 2.614
K (PBS/IBD)	—	—	1.853 $\pm$ 302	17.002 $\pm$ 2.965
L (PBS/IBD+IB+ND)	—	—	6.923 $\pm$ 1.168	18.063 $\pm$ 2.531

\*AE: após eclosão.

—\*\*: título médio menor que 396 (considerado negativo pelo kit IDEXX).

**TABELA 2**

Amostras de Soro Analisadas por Kits Laboratoriais para Detecção de Anticorpos IB IDEXX (Os títulos de anticorpos correspondem a valores médios  $\pm$  SD).

PROGRAMAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO E DA COLETA DE AMOSTRAS (DIAS)				
GRUPO DE ANIMAIS	10 DIAS AE*	17 DIAS AE	24 DIAS AE	31 DIAS AE
B (IB)	—**	441 $\pm$ 117	2.426 $\pm$ 264	3.214 $\pm$ 877
D (IB+ND)	—	586 $\pm$ 182	805 $\pm$ 221	1.988 $\pm$ 501
F (IB+IBD)	—	509 $\pm$ 89	685 $\pm$ 186	1.192 $\pm$ 237
G (IBD+IB+ND)	—	499 $\pm$ 81	688 $\pm$ 78	2.551 $\pm$ 531



PROGRAMAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO E DA COLETA DE AMOSTRAS (DIAS)				
GRUPO DE ANIMAIS	10 DIAS AE*	17 DIAS AE	24 DIAS AE	31 DIAS AE
J (PBS/IB)	—	—	485±76	1.662±441
L (PBS/IBD+IB+ND)	—	—	819±202	1.332±488

\*AE: após eclosão.

—\*\*: título médio menor que 396 (considerado negativo pelo kit IDEXX).

**TABELA 3**

Amostras de Soro Analisadas por Kits Laboratoriais para  
 5 Detecção de Anticorpos NDV IDEXX (Os títulos de anticorpos correspondem a valores médios ± SD).

PROGRAMAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO E DA COLETA DE AMOSTRAS (DIAS)				
GRUPO DE ANIMAIS	10 DIAS AE*	17 DIAS AE	24 DIAS AE	31 DIAS AE
A (ND)	—	466±101	2.394±456	8.103±2.198
D (ND+IB)	—	706±140	1.778±378	6.811±2.206
E (ND+IBD)	—	517±104	3.021±411	5.991±1.695
G (IBD+IB+ND)	—	—	—	783±201
I (PBS/ND)	—	—	1.853±324	3.912±304
L (PBS/IBD+IB+ND)	—	—	4.027±662	5.807±1.996

\*AE: após eclosão.

\*\* título médio menor que 396 (considerado negativo pelo conjunto IDEXX).

A presente invenção pode ter variações, portanto, não devem ser  
 10 interpretadas como uma limitação do escopo da invenção, mas como uma mera ilustração de algumas das representações preferidas apresentadas desta invenção. Assim o escopo da invenção deve ser determinado pelas reivindicações anexas e seus equivalentes legais.

**REIVINDICAÇÃO**

1. Vacina de DNA bivalente, para injeção in ovo, caracterizada por compreender;
- duas estruturas de DNA, cada estrutura de DNA expressando uma proteína antigênica de um vírus aviário onde;
- 5 uma primeira estrutura de DNA compreende uma primeira molécula de DNA que codifica um gene HN inteiro do vírus da Doença de Newcastle (NDV) tendo a sequência de DNA de bases 6321 a 8319 em SEQ ID NO:3 e um vetor; uma segunda estrutura de DNA compreende uma segunda molécula de DNA que codifica uma proteína antigênica de um vírus aviário e um vetor; onde a segunda molécula de DNA é selecionada dentre um grupo
- 10 compreendendo um gene gB inteiro do vírus da Doença de Marek (MDV) tendo a sequência de DNA SEQ ID NO:1; um gene VP2 inteiro do vírus da Doença Infecciosa Bursal (IBDV) tendo a sequência de DNA SEQ ID NO:2; um gene S1 inteiro do vírus da Bronquite Infecciosa (IBV) tendo a sequência de DNA SEQ ID NO:4; um gene G inteiro de glicoproteína (SEQ ID NO:5) do vírus da
- 15 Laringotraqueíte Infecciosa (ILTV); um gene VP1 (SEQ ID NO:6), VP0 (SEQ ID NO:7) ou VP3 inteiro (SEQ ID NO:8) do vírus da Encefalomielite Aviária (AEV); um gene G inteiro de paraglicoproteína (SEQ ID NO:9) do vírus da Parainfluenza Aviária (APV); um gene base penton tipo A inteiro (SEQ ID NO:10) do vírus da Enterite Hemorrágica (HEV); e um gene antigênico do envelope inteiro (SEQ ID
- 20 NO:11) do vírus da Variola Aviária (FPV); onde o dito vetor é um plasmídeo.

**RESUMO****“VACINA DE DNA MÚLTIPLA PARA INJEÇÃO *IN OVO*”**

A presente invenção refere-se a uma vacina de DNA múltipla e/ou uma vacina de DNA bivalente para ser usada na aquisição de imunidade embrionária em ovos de aves. A vacina de DNA múltipla contém duas estruturas de DNA, cada uma contendo uma molécula de DNA que codifica uma proteína viral aviária, capaz de induzir uma resposta imunológica protetora contra doença viral aviária em aves. A vacina de DNA múltipla contém uma estrutura de DNA que contém duas moléculas de DNA, cada uma representando um gene viral aviário. A vacina de DNA múltipla e/ou bivalente é injetada preferencialmente no líquido amniótico do ovo da ave após cerca de 18 dias de incubação.