



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-112566

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

METODO Y APARATO PARA LA INYECCION A CHORRO DE
HUEVOS DE AVES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

MERIAL LIMITED

DOMICILIO

DULUTH, GEORGIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

Creación
13-41-2006


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Rad: 06-112566-00000-0000
 Fee: 2006-11-03 17:38:27 Dep. 2020 NUECREACIONES
 Tra. 11 PATENTE/II
 Eve: 378 FASENACIONAL
 Act 411 PRESENTACION
 Folios: 169

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
 PCT
 ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **MERIAL LIMITED**
 sociedad constituida y existente bajo las
 leyes del Estado de Delaware, Estados
 Unidos de América.

Dirección: 3239 Satellite Blvd.,
 Duluth,
 30096 Georgia
 Estados Unidos de América

Domicilio: Duluth, Georgia,
 Estados Unidos de América.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**
 Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
 Teléfono: 347 36 11
 Fax: 211 86 50
 E-mail: clientes@camvp.com
 Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

 Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. **Kemal KARACA,**
 125 Woodhaven Street,
 Athens,
 Georgia 30608,
 Estados Unidos de América

3. **Joseph H. Jr. JOHNSTON,**
 5472 Concord Circle,
 Gainesville,
 Georgia 30507,
 Estados Unidos de América

2. **David J. HAYZER,**
 2740 Janellen Drive,
 Atlanta,
 Georgia 30345,
 Estados Unidos de América

5

PCT (86)

 Solicitud Internacional No. PCT/US2005/011194

 Fecha: 1 de Abril de 2005

 Publicación Internacional No. WO2005/094387 A2

 Fecha: 13 de Octubre de 2005

6

Título (54)
MÉTODO Y APARATO PARA LA INYECCIÓN A CHORRO DE HUEVOS DE AVES

7

Clasificación Internacional (51) A01K 45/00

8

Prioridad

 SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US
US

(32) Fecha

3 de Abril de 2004
4 de Noviembre de 2004

(31) Número de Solicitud

60/559.138
60/624.970

9

Comprobante de pago No.: 06 – 81.717
Fecha: 23 de octubre de 2006

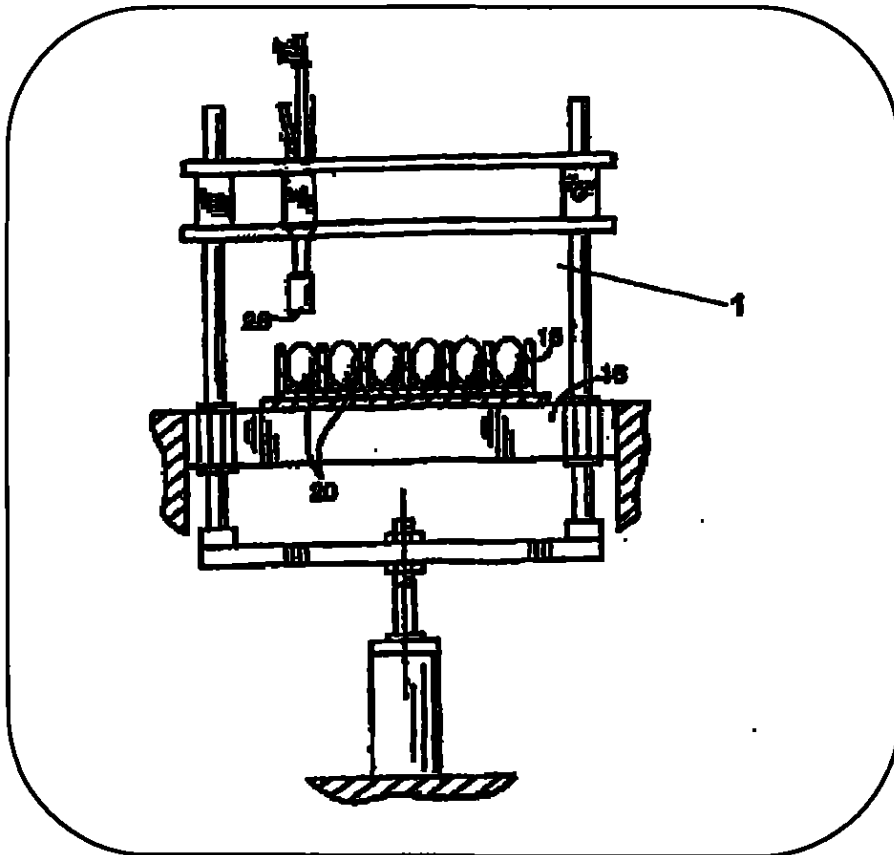
10

An x s:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredita la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

ZCA

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2005/094387 A2**

Páginas en el idioma original 34

Páginas en español 77

Reivindicaciones: Número (s) 30

Figuras: Número (s) 8

2. ☒ **Extracto de publicación.**

**GEORGIA SUPERIOR COURT
CLERKS' COOPERATIVE AUTHORITY**

Notary Division

**1875 Century Boulevard, Suite 100
Atlanta, Georgia 30345**

14306

11485

24

**APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)**

1. Country: **UNITED STATES OF AMERICA**
2. This public document
has been signed by **TIKI CANTRELL**
3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC, STATE OF GEORGIA**
4. bears the seal/stamp of **TIKI CANTRELL
NOTARY PUBLIC
FULTON COUNTY, GEORGIA**

CERTIFIED

5. at **ATLANTA, GEORGIA**
6. the **8TH DAY OF JULY, 2004**
7. by **GEORGIA SUPERIOR COURT CLERKS' COOPERATIVE AUTHORITY**
8. No. **I-103889**
9. Seal/Stamp
10. Signature:



David R. Williams
**DAVID R. WILLIAMS
EXECUTIVE DIRECTOR**

**NOTARY PUBLIC
(404) 327-6823**

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

MERIAL LIMITED

domiciliado (s) en/of 3239 Satellite Blvd.,

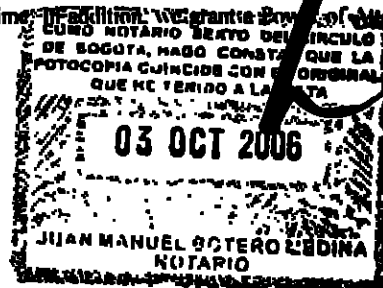
Duluth, Georgia 30096, Estados Unidos de América, hereby ratify the patent

application No. 04.051.017 filed by EMILIO FERRERO on June 1^o, 2004 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO. tpa. 31929: GONZALO PERDOMO. tpa. 831: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ. tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER. tpa. 832. domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia. en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestras) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO. tpa. 31929: GONZALO PERDOMO. tpa. 831: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ. tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER. tpa. 832. domiciled at Carrera 4a N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.



nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this June 16, 2014
en/in Duluth, Georgia
por/by Horace D. Kalle
Company Secretary
Firma/Signature x [Signature]



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado
de 200 _____ de _____

compareció(eron)
personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y
quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 16 días del mes de Junio
de 200 4 compareció(eron) ante mí.

Horace D. Nalle

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada

Merial Limited

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos: *
Artículos de constitución, 31 Julio, 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Merial Limited

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de
acuerdo con las leyes de Delaware

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

3239 Satellite Blvd
Duluth, Georgia 30096

© CAVELIER ABOGADOS
WPRODE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
before me, a Notary Public or Attesting Official
200 _____ of _____

personally
appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 16th day of June
200 4 appeared before me

Horace D. Nalle

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named

Merial Limited

I certify:

1. That I have seen the following documents: *
ARTICLES OF ASSOCIATION dated
July 31, 1997

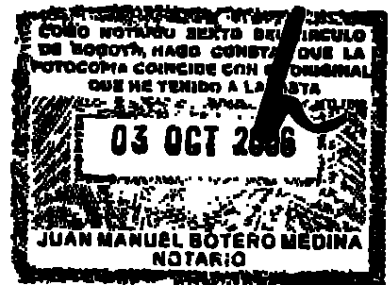
2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Merial Limited

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is

3239 Satellite Blvd.
Duluth, Georgia 30096



2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.)

Horace Nalle
está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.
Ciudad Duluth
Estado Georgia
Hoy 16 Junio dc 2004

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) - Horace D. Nalle

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City Duluth
State Georgia
This 16th day of June 200 4

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

John Cartell
Notary Public, Fulton County, Georgia
My Commission Expires May 3 2008

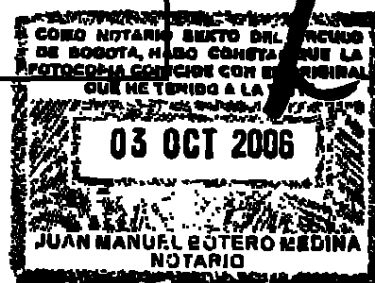
APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature

C CAVELIER ABOGADOS
WPP0101-101 (MINUTA Nº12.1.1.2.6 USA)



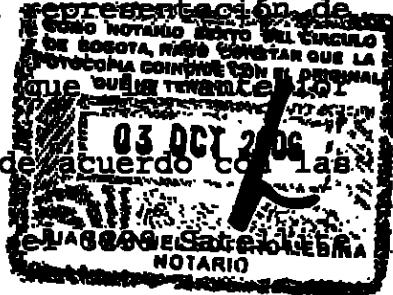
TRADUCCIÓN OFICIAL No. 26.07/04a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **MERIAL LIMITED** domiciliada en el 3239 Satellite Blvd., Duluth, Georgia 30096, Estados Unidos de América, por el presente ratifica la solicitud de patente No. 04.051.017 presentada por el Doctor Emilio FERRERO el 1 de Junio de 2004, y otorga derechos de representación y poder a los Doctores Emilio Ferrero, tpa. 31929; Gonzalo Perdomo, tpa. 831; Luz Clemencia de Páez, tpa. 23555 y Germán Cavelier, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 16 de junio de 2004 en Duluth, Georgia por Horáce D. Nalle, Secretario de la Compañía.

Firma Firma Ilegible

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en donde se certifica la firma del Señor Horace D. Nalle en el anterior documento en representación de Merial Limited y adicionalmente se certifica que la compañía está legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Delaware, que su domicilio es en el 3239 Satellite Blvd., Duluth, Georgia 30096, y que el Señor Horace D. Nalle está autorizado para otorgar el presente Poder.



Dado y firmado en la ciudad de Duluth, Estado de Georgia el 16 de Junio de 2004.

Notario Público o Funcionario Autorizado Firma Ilegible

Sello:

Notario Público Condado de Fulton, Georgia
Mí Comisión vence Mayo 3 de 2008

AUTORIDAD COOPERATIVA DEL SECRETARIO
DEL TRIBUNAL SUPERIOR DE GEORGIA
División Notarial
1875 Century Boulevard, Suite 100
Atlanta, Georgia 30345

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Este documento público
2. ha sido firmado por TIKI CANTRELL
3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE GEORGIA
4. lleva el sello/estampilla de TIKI CANTRELL
NOTARIO PÚBLICO
CONDADO DE FULTON, GEORGIA

CERTIFICADO

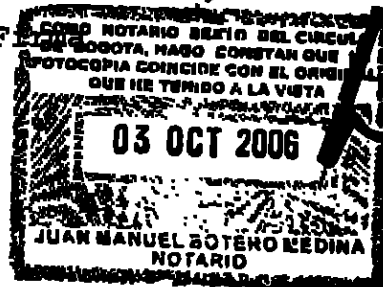
5. En ATLANTA, GEORGIA
6. El 8 DE JULIO DE 2004
7. por la AUTORIDAD COOPERATIVA DEL SECRETARIO DE LA CORTE SUPERIOR DE GEORGIA
8. No. I-103889
9. Sello/estampilla:
10. F. como NOTARIO DEL CIRCULO DE GEORGIA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

ESTADO DE GEORGIA

1776

Firma Ilegible
DAVID R. WILLIAMS
DIRECTOR EJECUTIVO

NOTARIO PÚBLICO
(404) 327-6023



Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ//ID-005829/WPCL002G/COLO 14036-841-001-6

Cns C-2004-00009516

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1998
MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LAS

Diego D. Vargo

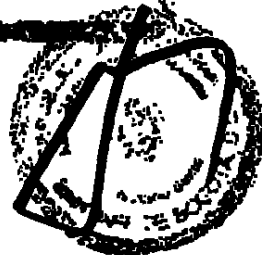
3

CON LA FIRMA REGISTRADA POR

(2973) EN ESTA NOTARIA

SANTA FE DE BOGOTA.

29 JUL 2004



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

07 OCT 2006

JUAN MANUEL BUTERO MEDINA

NOTARIO

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 October 2005 (13.10.2005)

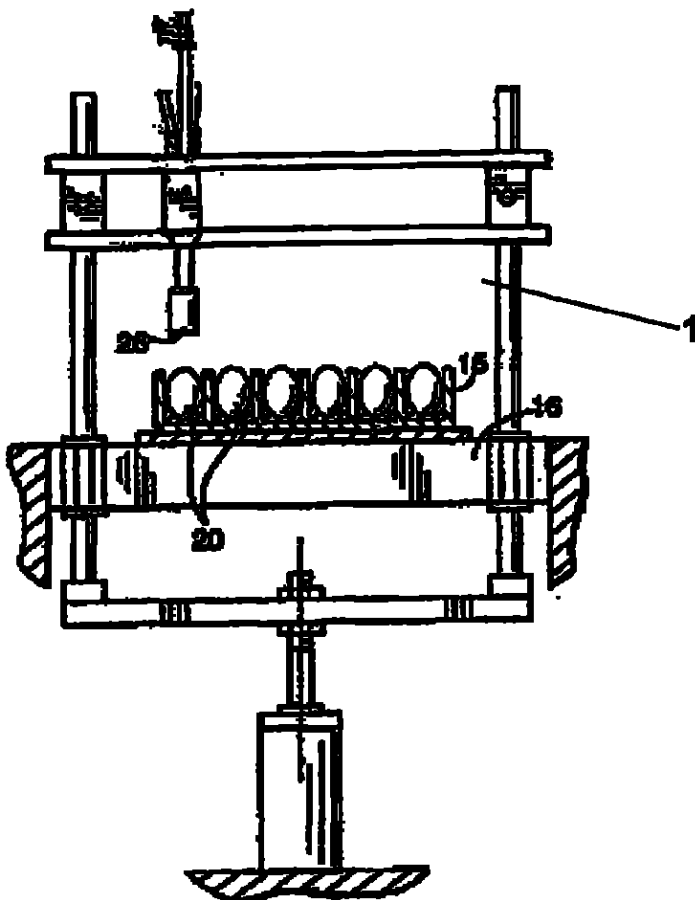
PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/094387 A2

- (51) International Patent Classification: Not classified
- (21) International Application Number: PCT/US2005/011194
- (22) International Filing Date: 1 April 2005 (01.04.2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/559,138 3 April 2004 (03.04.2004) US
60/624,970 4 November 2004 (04.11.2004) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERIAL LIMITED [US/US]; 3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KARACA, Kemal [US/US]; 125 Woodhaven Street, Athens, GA 30606 (US). HAYZER, David, J. [US/US]; 2740 Jamellen Drive, Atlanta, GA 30345 (US). JOHNSTON, Joseph, H., Jr. [US/US]; 5472 Concord Circle, Gainesville, GA 30507 (US).
- (74) Agent: JARECKI-BLACK, Judy, J.D., PH.D.; Merial Limited, 3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR AUTOMATIC JET INJECTION OF BIRD EGGS



(57) Abstract: An *in ovo* jet injection apparatus and related methods for treating live eggs. The jet injection apparatus includes one or more jet injection delivery devices configured to deliver one or more treatment substances to predetermined areas of eggs using a high pressure stream of the treatment substance(s). Multiple treatment substances can be delivered so that they are spatially and/or temporally separate. The devices and methods of the invention enable the effective use of a plurality of treatment substances, including those that are effective when used alone but can be noxious if mixed. The methods and apparatus for the jet injection of substances into embryonic chicks reduce the risk of mechanical injury to the developing birds that would be caused by injection needles. The methods and apparatus of the invention can also reduce the introduction of an infection into the chicks.

WO 2005/094387 A2



TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

TITLE OF THE INVENTION**METHODS AND APPARATUS FOR AUTOMATIC JET INJECTION OF BIRD EGGS****CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

- 5 This application claims priority to US Provisional Patent Application Serial Number 60/559,138, filed April 3, 2004 and US Provisional Patent Application Serial Number 60/624,970, filed November 4, 2004.

INCORPORATION BY REFERENCE

- 10 All documents cited or referenced herein ("herein cited documents"), and all documents cited or referenced in herein cited documents, together with any manufacturer's instructions, descriptions, product specifications, and product sheets for any products mentioned herein or in any document incorporated by reference herein, are hereby incorporated herein by reference, and may be employed in the practice of the invention.

15 **FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to treatment of avian embryos and, more particularly, relates to *in ovo* jet injection devices and methods for delivering various substances to live embryonated eggs.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- 20 Injections of various substances into avian eggs have been employed to decrease post-hatch mortality rates, increase the potential growth rates or eventual size of the resulting chicken, and even to influence the gender determination of the embryo. Similarly, injections of antigens into live eggs have been employed to incubate various substances used in the production of vaccines that have human or animal medicinal or diagnostic applications.
- 25 Examples of substances that have been proposed as viable treatment (or harvestable vaccine material) alternatives for delivery via *in ovo* injection of avian embryos include live culture vaccines, antibiotics, vitamins, and even competitive exclusion media (a live replicating organism). Specific examples of treatment substances are described in U.S. Pat. No. 4,458,630 to *Sharma et al*, and U.S. Pat. No. 5,028,421 to *Fredericksen et al*.
- 30 Conventionally, the physical injection has been typically targeted at preferred positions within the egg to administer the substance into specific developing regions of the embryo. As understood by those of skill in the art, as the incubation period progresses towards maturity and hatching, the embryo and its membranes, the air cell, the allantois, and yolk sac correspondingly change in volume and position within the egg shell. Additionally,

the quantitative volume of the enclosed fluids can vary. For example, the density of the allantois varies over the incubation period. Thus, selection of the site and time of treatment can impact the effectiveness of the injected substance as well as the mortality rate of the treated embryos. See e.g., U.S. Pat. No. 4,458,630 to *Sharma et al.*, U.S. Pat. No. 4,681,063 to *Hebrank*, and U.S. Pat. No. 5,158,038 to *Sheeks et al.*

Current injection methods that rely on substance delivery using a cannulated needle, however, present the risk of introducing infection into the target egg and/or injuring the injected embryo. There is still a need, therefore, for injection methods and apparatus that can deliver treatment substances to avian embryos but which do not, after piercing the outer hard shell, mechanically penetrate into the egg contents or the embryo. There is also a need for multisite injection methods and apparatus that will have a reduced likelihood of infecting the target egg due to mechanical penetration into the egg contents. There is a further need for automatic injection methods for treating multiple eggs simultaneously or in rapid and continuous succession without mechanically penetrating into the egg interior.

SUMMARY OF THE INVENTION

An *in ovo* jet injection apparatus and related methods for treating live eggs is disclosed. The jet injection apparatus includes one or more jet injection delivery devices which are configured to deliver one or more different substances into predetermined areas within the egg by means of narrow high pressure streams delivered from an injection head positioned outside the egg.

The devices and methods of the invention enable the effective use of a plurality of treatment substances that can be delivered so that they are spatially and/or temporally separate, including those that are effective when used alone but can be noxious if mixed.

The present invention recognizes that there is a need to introduce a treatment substance(s) into a live egg with a minimum of trauma thereto. The present invention therefore provides methods and apparatus for the injection of substances into embryonic chicks while significantly reducing the risk of mechanical injury to the developing birds that would otherwise be caused by using injection needles. By avoiding the use of injection needles as is well known in the art, the methods and apparatus of the present invention can substantially reduce the likelihood of introducing an infection into the chicks. The apparatus and methods can allow the delivery of individual treatment substances, including substances which are effective treatment alternatives when separately injected but become biologically noxious or unstable when combined. Thus, one object of the present invention is to provide

15

an *in ovo* jet injection delivery device for delivering a variety of treatment substances to avian embryos while minimizing the risk of injury or infection thereto.

It is one object of the present invention to introduce, without mixing, biologically incompatible products *in ovo* to embryos.

5 It is a further object of the present invention to separately introduce without mixing at least two different treatment materials into different locations in the egg, through either a single or two separate delivery paths.

It is another object of the present invention to introduce at least two different treatment substances which are separately delivered by one or more of time and spatial
10 separation into an opening in the egg shell.

A first aspect of the present invention, therefore, is a jet injection method for treating avian embryos *in ovo*. In the method, an avian egg is oriented into a predetermined position and a small opening is introduced into the shell of the avian egg. A jet injection delivery device is then positioned relative to the opening in the hard shell such that a high pressure
15 stream of a treatment substance can be directed to a desired region of the interior of the egg and hence to the contents therein.

Another aspect of the present invention includes a jet injection method for treating avian embryos *in ovo* that first orients an avian egg into a predetermined position and then introduces a small first opening into the shell of an avian egg. Additionally, a small second
20 opening is introduced into the shell of the avian egg, the second opening being spaced apart from the first opening. Respective ones of the first and second jet injection delivery devices are positioned over corresponding first and second openings such that high pressure streams of treatment substance(s) can be directed to desired regions of the interior of the egg and hence to the contents therein. Predetermined dosages of a first substance and a second
25 substance are released from respective ones of the first and second jet injection delivery devices into the egg. The delivery devices are then retracted from the egg, thereby treating the avian embryo.

Yet another aspect of the present invention includes a multi-injection method for treating avian embryos *in ovo* which orients an avian egg into a predetermined position and
30 introduces a small opening into the shell of an avian egg. A delivery device is positioned over the opening such that high pressure streams of treatment substance(s) can be directed to desired regions of the interior of the egg, and hence to the contents therein. Predetermined dosages of a first substance and a second substance are released into the egg and the delivery device is retracted from the egg, thereby treating the avian embryo. Advantageously, this

16

method temporally combines the different substances to minimize degradation of the substances attributed to their interaction. Thus, preferably, this method allows the first and second substances to be stored in separate chambers and temporally combines or mixes the first and second substances, either with an active mixing chamber, or by introducing them
5 into a common delivery high pressure stream, prior to delivery into the egg.

An additional aspect of the present invention is directed towards an automated *in ovo* jet injection apparatus for the rapid simultaneous or sequential treatment of a plurality of eggs. The apparatus comprises a fixture for holding a plurality of eggs in a substantially upright and aligned position. The fixture is configured to provide external access to
10 predetermined areas of the eggs. The apparatus also includes a plurality of jet injection delivery devices configured to contact predetermined areas of the eggs; at least one of the injection devices corresponding to each egg in the fixture.

Preferably, the apparatus of the invention includes a means of penetrating the eggshell to create an opening in the shell. The opening will have a diameter sufficient to allow the
15 high-pressure jet that is delivered from the exit orifice of the jet injection delivery device to be directed into the interior of the egg without obstruction. The apparatus further comprises a first treatment substance container for holding a first treatment substance. The first container is in fluid communication with each of the plurality of jet injection delivery devices. The apparatus may also include a second treatment substance container for holding a second
20 treatment substance. The second container is also in fluid communication with each of the plurality of jet injection devices. The first container and each of the plurality of jet injection devices define a first fluid pathway therebetween. Similarly, the second container and each of the plurality of jet injection delivery devices define a second fluid pathway therebetween. A pump may be operably associated with the first and second containers and the jet injection
25 units for delivering predetermined dosages of each of the first and second treatment substances to the injection devices.

In one embodiment of this aspect of the invention, the apparatus may comprise one jet injection delivery head that can move relative to the fixture holding the eggs, such that the injection head will treat one egg after another. In another embodiment, there is a plurality of
30 injection heads such that a plurality of eggs, such as a row of arranged eggs can be treated in a single operation. A means of piercing the egg shells may also be provided as a single unit that will precede the injection head or plurality of heads as the injection heads advance from egg to egg. In one embodiment, each jet injection head is associated with a shell piercing means.

17

Another aspect of the present invention is also directed to an automated *in ovo* injection apparatus. The apparatus comprises a fixture for holding a plurality of eggs in an aligned position, such that the fixture is configured to provide external access to predetermined areas of the eggs. The apparatus includes a plurality of first jet injection delivery devices and a plurality of second jet injection delivery devices, each configured to contact predetermined areas of the egg, a respective one of each of the first and second injection delivery devices corresponding to one egg in the fixture. The device also includes first and second treatment substance containers for holding respective ones of first and second treatment substances. Preferably, the apparatus will include a means of penetrating the eggshell to create an opening in the shell. The opening in a hard egg shell will have a diameter sufficient to allow the high-pressure jet stream that is delivered from the exit orifice of the jet injection delivery device(s) to be directed into the interior of the egg without obstruction. The first container is in fluid communication with each of the first jet injection delivery devices and the second container is in fluid communication with each of the second jet injection delivery devices. Thus, the first container and each of the first delivery devices define a first fluid pathway therebetween and the second container and each of the second injection delivery devices define a second fluid pathway therebetween such that the first pathway is separate from the second pathway. A pump(s) may be operably associated with the first and second containers for delivering a predetermined dosage of each of the first and second treatment substances to each of the respective first and second injection devices. Similar to the apparatus above, this device can be alternatively configured to deliver different treatment substances to different treatment sites within the egg.

Eggs treated by the methods and apparatus of the present invention are preferably incubated to hatch after the treatment substances are administered. Most preferably, the treated eggs are resealed immediately after treatment to prevent infection of the embryos.

The foregoing and other objects and aspects of the present invention are explained in detail in the specification set forth below.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- Fig. 1 illustrates a single jet injection delivery device according to the invention.
- Fig. 2 illustrates a multiple jet injection delivery device according to the invention.
- Fig. 3A illustrates a jet injection delivery device head with a tubular egg penetration punch attached thereto.
- Fig. 3B illustrates a jet injection delivery device head with a rotatable tubular egg penetration punch attached thereto.

Fig. 3C illustrates a rotatable egg shell penetration device with a toothed end.

Fig. 3D illustrates a twist drill egg shell penetration device not coaxial with an emitted high pressure liquid stream.

Fig. 3E illustrates a jet injection head having a vacuum system attached for removal
5 of shell debris.

Fig. 3F illustrates a jet injection head incorporating a high pressure gas jet to abrasively pierce a target hard egg shell.

Fig. 3G illustrates a jet injection head comprising a venturi for drawing a liquid treatment substance into a high pressure gas stream.

10 Fig. 3H illustrates a jet injection head comprising two lumens and a single orifice.

Fig. 4 illustrates an embodiment of the jet injection apparatus according to the invention wherein an egg shell penetration means is secured to the jet injection delivery device.

Fig. 5 illustrates an embodiment of the jet injection apparatus according to the
15 invention wherein an egg shell penetration means is a unit separate from the jet injection head and capable of independently locating and contacting a hard egg shell.

Fig. 6 illustrates one embodiment of an automated jet injection apparatus according to the present invention.

Fig. 7A illustrates a jet injection delivery device configured with a tubular punch
20 coaxial to the delivered jet stream wherein the distal end is configured to contact and rest against predetermined areas of an external egg shell.

Fig. 7B illustrates the retracted position of jet injection devices to rest a predetermined distance above the eggs and stationary base.

Fig. 8 illustrates a block diagram of one embodiment of the automatic jet injection
25 delivery apparatus according to the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention is practiced with eggs, particularly bird or avian eggs such as chicken, turkey, duck, geese, quail, pheasant, or ostrich eggs. The eggs are viable eggs; that is, eggs containing a live avian embryo. The eggs may be in any stage of embryonic
30 development, including both early embryonic development and late embryonic development.

The present invention will now be described more fully hereinafter with reference to the accompanying drawings, in which a preferred embodiment of the invention is shown. This invention may, however, be embodied in many different forms and should not be construed as limited to the embodiments set forth herein. Rather, these embodiments are

provided so that this disclosure will be thorough and complete and will fully convey the scope of the invention to those skilled in the art. In the drawings, like numbers refer to like elements throughout.

The present invention provides a apparatus for the jet injection delivery of treatment substances to the contents of an egg. Having pierced the hard shell of an avian egg, the treatment substance is delivered as a narrow, high pressure stream that is capable of penetrating the membranes and tissues of the embryo and its associated tissues. The use of a high pressure liquid stream avoids the use of injection needles that can cause mechanical harm to the developing embryo, sometimes with fatal results. Because of the physical contact of needles with egg contents, there is also the possibility of cross contamination of a batch of eggs. Jet injection avoids mechanical transfer of infectious material between targeted eggs.

The jet injection apparatus 1 of the present invention can employ a single jet injection delivery device 10 (Fig. 1) or multiple (Fig. 2) jet injection delivery devices 10 to deliver one or more treatment substances into targeted eggs. As such, the apparatus is preferably configured to automatically introduce (in one or more of a spatially and temporally separated sequences) one or a multiple of treatment substances into a live egg 20 with a minimum of trauma thereto, and most preferably into a plurality of eggs. Advantageously, this apparatus can also deliver substances that are effective treatment alternatives when separately injected but which become less effective or biologically noxious when combined.

For the methods and apparatus of the present invention it is necessary that the hard shell of a targeted avian egg be opened, or pierced, to allow a jet injection delivery device 10 to deliver a an unimpeded high pressure stream 43 of a treatment substance from an orifice 30 directly into the interior of the egg 20, but without the jet injection delivery device 10 itself entering into the interior of the egg. It is contemplated, therefore, that the methods and the apparatus will employ a means 40 of penetrating a hard egg shell. A selected egg shell penetration means 40 can be an integral component of the jet injection delivery device 10 or, alternatively, a separate unit that will make a hole in the egg shell before a jet injection delivery device 10 is positioned to deliver a high pressure stream of a treatment substance to the interior of the egg. The egg penetration means 40 may be any device and method that can penetrate the hard egg shell, preferably without causing significant cracking of the shell surrounding a hole. Most preferably, the penetration means 40 will generate a circular opening. A preferred opening in the shell, however, is of sufficient area and dimensions that a high pressure stream 43 of jet injected treatment substance can enter the egg through the

opening without being obstructed, which would otherwise decrease the in ~~jected~~ administered dose or divert the stream from its intended path and target area of treatment.

A variety of egg shell penetration means 40 can be usefully incorporated into the apparatus of the including, but not limited to, a rotatable drill bit, a rotatable grinding bit, a
5 rotatable saw, a piercing punch and a high pressure gas or fluid abrasive stream or a combination thereof. For example, one embodiment of the penetration means 40 is a tubular punch having a lumen 41 defined by the interior wall 48 of the punch and which may be positioned at the delivery end of a jet injection delivery device 10 as shown in Fig. 3A. The
10 internal diameter of the lumen 41 may be the same or greater (as shown for example in Fig. 3A) than the diameter of the orifice 30 from which the high pressure jet stream 43 exits the delivery device 10. A high pressure treatment substance stream 43 can be ejected through an exit an orifice 30 of the jet injection delivery device 10 and pass in the direction of the longitudinal axis of the lumen 41 but without touching the interior wall 48 thereof, and hence into a target egg, as shown in Figs 3A and 3B. The distal end 45 of the tubular punch 40 may
15 be configured as a bevel 42 having a sharpened edge 47 to ease penetration of the shell. The egg shell will be penetrated by contacting the egg shell with the distal end 45 of the punch 40. A reciprocal motion of the jet injection delivery device relative to the egg will drive the punch 40 through the eggshell. Since penetration of the shell by this means might drive fragments of the shell into the interior of the egg, the outer surface of the shell may be
20 disinfected before piercing to prevent or reduce the possibility of introducing infectious material to the developing chick embryo.

In one embodiment of the invention, a punch 40 may be operably attached to a spring that will force the punch to enter through the shell while the jet injection delivery device is at a constant distance from the shell surface. In another embodiment, the punch 40 may be
25 operably connected to a hydraulic ram 50 to drive the punch 40 through the shell and retract the punch for reuse with another egg.

In an alternative embodiment of the invention, the tubular punch 40 is rotatably mounted on the jet injection delivery device 10 to ease the penetration of the hard egg shell in the manner of a drill, as shown, for example in Fig. 3B. A means of rotating the tubular
30 punch 40 such as, but not limited to, an electric or hydraulic motor 44 is operably connected to the punch 40. In this embodiment of the invention, the distal end 45 of a rotating tubular punch 40 may be variously configured to penetrate the egg shell without applying a vertical force that could excessively crack or shatter the shell. For instance, the distal end 45 may be toothed, as illustrated in Fig. 3C, and/or coated with an abrasive, that will progressively grind

shell material. In other embodiments of the invention, the egg shell penetration means 40 is a twist drill 49 such as shown in Fig. 3D, or a grinding bit. The tip of the twist drill may also be adapted as a grinding surface to grind a hole in the egg shell.

5 In an embodiment of the invention, the penetration means 40, whether coaxial to the jet injection stream or as a separate unit, is a means of delivering a jet of high pressure gas containing an abrasive material for grinding the egg shell at a targeted site, as illustrated in Fig. 3F. In one embodiment, the high pressure abrasive jet will be directed from the orifice 30 of the jet injection delivery device 10.

10 To increase the rate of grinding of the egg shell by a mechanical device such as a drill bit or a high pressure gas jet, a liquid lubricant may be directed to the point of penetration. Preferably, the liquid will be sterile and may include a disinfectant for cleaning the penetration site of potentially infectious material. The penetration device 40 may further comprise a means of removing egg shell dust generated by the piercing operation, such as a low pressure or vacuum system 46, as shown, for example, in Fig. 3E.

15 In some embodiments of the invention, the eggshell penetration means 40 may not be coaxial with the high pressure stream 43 from the jet injection delivery device 10. The eggshell penetration means 40 can be rigidly attached to the jet injection delivery device 10, as shown for example in Fig. 4, or is a unit separate from the jet injection head as illustrated, for example, in Fig. 5. In any of the embodiments wherein the eggshell penetration means 40 is not coaxial with the jet injection stream, penetration of the shell will typically be at least a two-step operation. In the first step, the penetration means 40 is positioned at the desired entry point of the egg shell and the hole is formed by operating the penetration device 40. In a second step, the penetration device 40 is displaced from the vicinity of the newly-made hole in the shell and the jet injection delivery device 10 is positioned relative to the hole so that a high pressure substance 43 from the injection delivery device 10 may pass unimpeded through the hole and into the egg 20. It is further contemplated that if the egg shell penetration means 40 is not coaxial with the high pressure stream 43 from the jet injection delivery device 10, a means 51 to accurately detect the hole in the shell and to position the jet injection device 10 so as to deliver the high pressure stream 43 into the egg may be provided. 25 In one instance, an optical means such as a camera or reflected laser beam may be used to detect the hole and regulate the motion of the jet injection device relative thereto. Accurate positioning of the high pressure stream 43 can also be achieved by accurately engineering and moving the piercing device 40 and the jet injection delivery device 10 from a first or piercing position to the second, or jet injection position. 30

The jet injection delivery device 10 suitable for use in the present invention may be a single shot deliver device such as, for example, described in U.S. Patent Serial No. 6,585,685 to *Staylor et al.* Preferably, however, the injection device is a multi-shot jet injector wherein the treatment substance(s) are feed to the injector head from a reservoir. Such a jet injector delivery device is most suitable for incorporation into an automatic jet injector system where a plurality of eggs is to be injected. In those embodiments of the apparatus 1 wherein there is a plurality of jet injection delivery devices 10 for the treatment of a array of eggs 20, the treatment substances can be delivered to the jet injection delivery devices 10 from a single reservoir chamber via feed tubes leading to each device, or each jet injector delivery device 10, individually or as a single combined unit, can be operably connected to its own reservoir.

Treatment substances may be administered to an egg as a bolus in the same or different physical form. The bolus of treatment substance may be administered into any suitable compartment of the egg, including intraperitoneally, intramuscularly, or subcutaneously within the embryo, into the yolk sac or stalk, into the liver or lungs of the embryo, into the air cell, the allantoic sac, or the amniotic fluid, etc. In some cases it may be desirable to administer two different substances into different locations within the same compartment (e.g., intraperitoneal or intramuscularly, or even into the amniotic fluid for rapidly absorbed but otherwise incompatible treatment substances). In addition, it may be desirable in some cases for the first and second treatment substances to be the same, but simply administered in different locations within the egg. Treatment substances that may be administered include, but are not limited to, vaccines, hormones, growth-promoting agents, etc.

Referring now to the drawings, Fig. 6 illustrates one embodiment of an automated jet injection apparatus 1 according to the present invention. As shown in Fig. 6, the apparatus 1 includes a flat 15, a stationary base 16, and a plurality of jet injection delivery devices 10. The flat 15 holds a plurality of eggs 20 in a substantially upright and aligned position. The flat 15 is configured to provide external access to predetermined areas of the eggs 20. The egg 20 is held in by the flat 15 so that a respective one egg is in proper alignment relative to a corresponding one of the jet injection delivery devices 10 as the jet injection delivery device 10 advances towards the base 17 of the apparatus.

Each of the plurality of jet injection delivery devices 10 has a distal end 45. The jet injection devices 10 may have a first extended position 200 and a second retracted position 201 as shown in Fig. 7B. The jet injection delivery device 10 can be configured with a tubular eggshell penetration means 40 coaxial to the delivered jet stream 43, upon extension

of the jet injection device 10, the distal end 45 is configured to contact and rest against predetermined areas of the external egg shell. As shown in Fig. 7B, when not injecting, the jet injection delivery devices 10 can be retracted to rest a predetermined distance 201 above the eggs 20 and stationary base 15.

5 The automated jet injection device 1 may be horizontally moveable relative to the stationary base 16 so as to position another flat 15 beneath the plurality of jet injection delivery devices 10. Alternatively, the base 16 can be longitudinally slidably moveable to position the eggs in proper position relative to the injection delivery device 10 (as indicated by the arrow in Fig. 6. For ease of discussion, the description describes a unit with a single jet injection
10 delivery device 10 (shown as a top jet injection delivery device 10) but the description also applies to an apparatus with multiple jet injection delivery devices 10, as shown in Fig. 6 or, alternatively, one or more of single bottom or side devices.

15 In the embodiments shown in Fig. 7A and 7B, an *in ovo* jet injection delivery device 10 for delivering compounds inside an egg comprises a body member 50 and a jet injection delivery device 10. The device includes an egg locating member, or egg engaging member 25, connected to the body member bottom end portion, which as illustrated is slidably connected to the body member and includes a spring 49 to both cushion the engagement, and hold the egg in place during the shell penetration and jet injection of a treatment substance.

20 It is contemplated that the apparatus will have an eggshell penetration means 40. There may be a plurality of units, each of which is integral with a jet injection delivery device 10 and hence will move into position with the target egg along with the jet injection delivery device 10. In other embodiments of the apparatus, one or a plurality of egg penetration means 40 are not integral with the jet injection delivery devices 10 and are independently positioned over a selected point on the target egg(s), pierce the eggshells and are then
25 displaced from the eggs, thereby allowing the jet injection delivery devices 10 to be positioned to direct the high pressure treatment substance stream(s) into the egg(s).

30 As shown by the block diagram in Fig. 8, one embodiment of the automatic jet injection delivery apparatus 10 includes a main controller 100, a first and second treatment substance chambers 110, 120, associated valves 111, 121 and one or more drive means such as pumps 112, 122 operably associated with the substance chambers for delivering the appropriate amounts of treatment substances to the jet injection delivery device 10 via an optional mixing chamber 150. Although the apparatus 10 is illustrated as having a separate drive means for each fluid or treatment chamber 110, 120, it will be appreciated by one of skill in the art that the invention is not limited thereto. Indeed, a single electric or pneumatic

or hydraulic pump can be connected to the substance chambers to deliver each treatment substance to the inlet ports in the jet injection delivery device. The apparatus 1 incorporates one or more pressurization means that, when actuated, will deliver precise dosages of treatment substances from the jet injection delivery devices 10 for high pressure gas ejection through the exit orifice 30 (as shown in Figs 3A-3F) as a high pressure stream 43 and ultimately to the egg.

Optionally, as illustrated by the dotted line paths in Fig. 8, the apparatus 10 can be configured to separately store the treatment substances in the respective chambers 110, 120 and then channel them through a mixing chamber 300 as shown in Fig. 7B) or through a single lumen for jet delivery into the egg as in Fig. 3H. A valve, controlled by the controller, is required to alternately switch from one treatment fluid source to the other. Switching can be timed with positioning of the jet injection orifice 30 and the pressure of the jet adjusted so that different fluids are injected in different compartments within the egg. The different treatment substances can each be provided in liquid, gas or aerosol form, or any other suitable form, so long as the substances are substantially separated from one another (e.g., liquid treatment substances separated by an intervening gas bubble) so that different treatment substances are placed in different compartments.

Also preferably, as also shown in Fig. 8, the apparatus 10 can include a cleaning solution chamber 140 operably associated with the controller 100 and plumbed to be in fluid communication with each of the separate substance delivery channels 115, 125 upstream of the exit orifice 30 of the jet injection delivery device 10 as well as the one or more fluid or substance delivery paths 118, 128 (130) in the jet injection device itself 10. This will allow the delivery paths 118, 128 (130) to be flushed with a decontamination fluid to maintain a preferred level of sterility in the apparatus so as to reduce the likelihood of the growth of undesired contaminants in the delivery paths to help maintain the apparatus in optimum performance condition. Any conventional cleansing solution may be used, with chlorine cleansing solutions preferred.

In operation, in one embodiment of the present invention, a controller 100 (as shown in Fig. 8) directs the opening of the valves 111, 121 to release predetermined dosages of treatment substance into first and second tubes 60, 61 shown in Fig. 6. The associated drive means or pumps 112, 122 forces the substances into delivery paths 115, 125 (such as through tubing 60, 61) in fluid communication with a jet injection delivery device exit orifices 30 via inlet ports thereon 28a, 28b. The treatment substances are then forced out of the exit orifice 30 by application of a high pressure gas to the liquid, thereby forming a high pressure jet

aimed at the contents of an egg. In one embodiment of the jet injection delivery device 10, the injection head comprises a venturi, wherein the passage of the high pressure gas through the venturi generates a low pressure that draws a liquid treatment substance into the gas stream as illustrated, for example, in Fig. 3G.

5 The jet injection delivery device 10 is configured to release a predetermined dosage of the treatment substance(s) into predetermined sites, such as above or below the air cell and into the amnion of the avian embryo or into the tissues of the embryo itself (as will be discussed in more detail hereinbelow). The jet injection delivery device is then retracted and may be flushed before the next flat of eggs is advanced.

10 A jet injection delivery device 10 may have a nozzle head with two lumens that terminate into a single orifice as shown in Fig. 3G. This configuration keeps the substances separate a major portion of the substance delivery path but allows them to mix at the site of jet injection. Note that where two (or more) holes are made in the egg shell, particularly in a configuration that would cause the contents of the shell to drain from the egg, then at least
15 one of the holes (preferably the lower hole) should be sealed, in accordance with known techniques to prevent draining of the egg. Suitable methods for sealing a pierced egg shell include, but are not limited to, sealing with hot glue, covering the hole with a sealing tape, applying a cold glue such as white glue or a cyanoacrylate-based glue, overlaying the hole with a fragment of egg shell and securing thereto or by any other suitable means known to
20 one familiar with methods of sealing eggs to allow development of the embryo therein.

Use of the jet injection delivery device 10 and methods of the invention are preferred over currently used injection methods and apparatus to reduce the risk of yolk sac leaks. One advantage of the jet injection methods of the invention is that the hole required to allow access to the interior of the egg can be small enough to retain the yolk in the egg shell. The
25 apparatus of the instant invention can also employ a jet injection device 10 positioned to direct the high pressure jet stream to the side or bottom of an egg. One or more of these alternative jet injection devices 10 can be used concurrently with a top jet injecting device or subsequent or prior in time. Of course the flat must be altered to provide access to the appropriate part of the egg shell. When injecting from the bottom, it is preferred to position
30 the bottom injection device opposing the top jet injection delivery device.

The methods and apparatus of the invention are particularly useful for delivering treatment substances such as, but not limited to, Newcastle's disease vaccine and Marek's disease vaccine. Marek's disease vaccine is preferably administered into the region defined by the amnion; Newcastle's disease vaccine is preferably administered into the air cell. The

protective effect afforded to jet injected chicken embryos treated with the vaccines is shown in Example 3 below.

A "nucleic acid" refers to the phosphate ester polymeric form of ribonucleosides (adenosine, guanosine, uridine or cytidine; "RNA molecules") or deoxyribonucleosides (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxythymidine, or deoxycytidine; "DNA molecules") in either single stranded form, or a double-stranded helix. Double stranded DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA helices are possible. The term nucleic acid molecule, and in particular DNA or RNA molecule, refers only to the primary and secondary structures of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes double-stranded DNA found, inter alia, in linear or circular DNA molecules (e.g., restriction fragments), plasmids and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the nontranscribed strand of DNA (i.e., the strand having a sequence homologous to the mRNA).

As defined herein an "isolated" or "substantially pure" nucleic acid (e.g., an RNA, DNA or a mixed polymer) is one which is substantially separated from other cellular components which naturally accompany a native human sequence or protein, e.g., ribosomes, polymerases, many other human genome sequences and proteins. The term embraces a nucleic acid sequence or protein that has been removed from its naturally occurring environment, and includes recombinant or cloned DNA isolates and chemically synthesized analogs or analogs biologically synthesized by heterologous systems.

The term "vector", refers to viral expression systems, autonomous self-replicating circular DNA, plasmid, and includes both expression and nonexpression plasmids. Where a recombinant microorganism or cell culture is described as hosting an "expression vector," this includes both extrachromosomal circular DNA and DNA that has been incorporated into the host chromosome(s). Where a host cell is maintaining a vector, the vector may either be stably replicated by the cells during mitosis as an autonomous structure, or is incorporated within the host's genome. Vectors which may be used include, but are not limited to, pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-) (commercially available from Invitrogen).

The term "plasmid" refers to an autonomous circular DNA molecule capable of replication in a cell, and includes both the expression and nonexpression types. Where a recombinant microorganism or cell culture is described as hosting an "expression plasmid", this includes latent viral DNA integrated into the host chromosome(s). Where a plasmid is being maintained by a host cell, the plasmid is either being stably replicated by the cells

during mitosis as an autonomous structure or is incorporated within the host's genome. The plasmid or vector as contemplated herein comprises a leader sequence which are known to those skilled in the art.

5 This vector or plasmid may also further comprise a second isolated nucleic acid that encodes a screenable marker and/or a polypeptide. For purposes of this invention, a "polypeptide that is a detectable marker" includes but is not limited to: the dimer, trimer and tetramer form of the polypeptide. *E. coli* β -galactosidase is a tetramer composed of four polypeptides or monomer sub-units.

10 The present invention is particularly useful to deliver DNA vaccines to a developing avian embryo and in particular to deliver the vaccine vector construct to the breast muscle of the embryo for expression therein of the target antigen. DNA vaccines are described in U.S. Pat. Nos. 5,589,466 and 5,973,972, and PCT published applications PCT/US90/01515, PCT/US93/02338, PCT/US93/048131, and PCT/US94/00899, and the priority applications cited therein, which are each incorporated herein by reference. Further, the review articles
15 cited above describe DNA vaccine technology and cite examples of DNA vaccines. Exemplary poultry directed vaccines include those targeted to such diseases as, but not limited to, Marek's disease, IBDV, Infectious Bursal disease, coccidial infection, Newcastle Disease virus or ILT. In each case, plasmid or viral DNA can be delivered to cells of an individual which take up the construct DNA and express immunogenic target proteins
20 encoded by the vectors. The immune response generated against the immunogenic target protein provides a prophylactic or therapeutic benefit to the vaccinated individual.

According to the present invention, the coding sequence on the vector that encodes the immunogenic target protein is provided with a coding sequence that encodes an amino acid sequence whose presence on the protein results in a specific intracellular localization of
25 the expressed protein. The nucleotide sequences that encode amino acid sequences which direct intracellular protein trafficking and which are included in the coding sequences of immunogenic proteins that are included in vector constructs used as DNA vaccine compositions direct localization to specific areas in the cells which result in enhancement of specific immune responses.

30 As used herein, the term "genetic construct" is meant to refer to plasmids or modified viruses which comprise coding sequences that encode an immunogenic target protein and an amino acid sequence that directs intracellular protein trafficking, the coding sequences being operably linked to regulatory elements required for expression of the coding sequences in

eukaryotic cells. Regulatory elements for DNA expression include a promoter and a polyadenylation signal. In addition, other elements, such as a Kozak region, may also be included in the genetic construct. Initiation and termination signals are required regulatory elements that are often considered part of the coding sequence. The coding sequences of genetic constructs of the invention include functional initiation and termination signals.

As used herein, the term "immunogenic target protein" is meant to refer to an antigen that is a target for an immune response which is directed at proteins associated with conditions, infections, diseases or disorders such as allergens, pathogen antigens, antigens associated with cancer cells or cells involved in autoimmune diseases. The immunogenic target antigen is encoded by the coding sequence of a genetic construct used in a DNA vaccine. The DNA vaccine is administered to the vaccinated individual, the genetic construct is taken up by the cells of the individual, the coding sequence is expressed and the immunogenic target protein is produced. The immunogenic target protein induces an immune response against the immunogenic target protein in the individual. The immune response is directed against proteins associated with conditions, infections, diseases or disorders such as allergens, pathogen antigens, antigens associated with cancer cells or cells involved in autoimmune diseases. Thus the vaccinated individual may be immunized prophylactically or therapeutically to prevent or treat conditions, infections, diseases or disorders. The immunogenic target protein refers to peptides and protein encoded by gene constructs of the present invention that act as target proteins for an immune response. The term "immunogenic target protein" refers to a protein against which an immune response can be elicited. The immunogenic target protein shares at least an epitope with a protein from the allergen, pathogen or undesirable protein or cell-type such as a cancer cell or a cell involved in autoimmune disease against which immunization is required. The immune response directed against the immunogenic target protein will protect the individual against and treat the individual for the specific infection or disease with which the protein from the allergen, pathogen or undesirable protein or cell-type is associated. The immunogenic target protein does not need to be identical to the protein against which an immune response is desired. Rather, the immunogenic target protein must be capable of inducing an immune response that cross reacts to the protein against which the immune response is desired.

Further, the nucleic acid which encodes a polypeptide is selected from a group consisting of a: cytokine, Infectious bovine rhinotracheitis virus gE, bovine respiratory syncytial virus attachment protein (BRSV G), bovine respiratory syncytial virus fusion protein (BRSV F), bovine respiratory syncytial virus nucleocapsid protein (BRSV N), bovine

parainfluenza virus type 3 fusion protein, and the bovine parainfluenza virus type 3 hemagglutinin neuraminidase, marek's disease virus glycoprotein B, marek's disease virus glycoprotein D, newcastle disease virus hemagglutinin, newcastle disease virus neuraminidase, newcastle disease virus fusion, infectious bursal disease virus VP1, infectious bursal disease virus VP2, infectious bursal disease virus VP3, infectious bursal disease virus VP4, infectious bursal disease virus VP5, infectious bursal disease virus polyprotein, infectious bronchitis virus spike, and infectious bronchitis virus matrix and chick anemia virus.

Such may also be derived or derivable from avian encephalomyelitis virus, avian reovirus, avian paramyxovirus, avian influenza virus, avian adenovirus, fowl pox virus, avian coronavirus, avian rotavirus, chick anemia agent, *Salmonella* spp., *E. coli*., *Pasteurella* spp., *Bordetella* spp. *Eimeria* spp. *Histomonas* spp., *Trichomonas* spp., poultry nematodes, cestodes, trematodes, poultry mites/lice, poultry protozoa.

As contemplated herein cytokines, include but are not limited to the following: chicken myelomonocytic growth factor (cMGF) or chicken interferon (cIFN), transforming growth factor beta, epidermal growth factor family, fibroblast growth factors, hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, vascular endothelial growth factor, interleukin 1, IL-1 receptor antagonists, interleukin-2, interleukin-3, interleukin-4, interleukin-5, interleukin-6, IL-6 soluble receptor, interleukin-7, interleukin-8, interleukin-9, interleukin-10, interleukin-11, interleukin-12, interleukin-13, angiogenin, chemokines, colony stimulating factors, granulocyte-macrophage colony stimulating factors, erythropoietin, interferon, interferon gamma, infectious bursal disease virus VP3, infectious bursal disease virus VP3, stem cell factor (or known as mast cell growth factor, or c-kit ligand protein), leukemia inhibitory factor, oncostatin M, pleiotrophin, secretory leukocyte protease inhibitor, stem cell factor, tumor necrosis factors, soluble TNF receptors and immunostimulating sequence (ISS).

The isolated nucleic acid may be under the control of an endogenous upstream promoter, or it may be put under control of a heterologous upstream promoter. Promoters include but are not limited to the following: cytomegalovirus, Rous Sarcoma Virus, synthetic pox viral promoter, pox synthetic late promoter 1, pox synthetic late promoter 2 early promoter 2, pox 01L promoter, pox 14L promoter, pox 13L promoter, pox 12L promoter, pox 11L promoter, pox DIOR promoter, PRV gX, HSV-1 alpha 4, chicken beta-actin promoter, HCMV immediate early, MDV gA, MDV gB, MDV gD, ILT gB, BHV-1 VP8 and ILT gD and internal ribosomal entry site promoter. In a preferred embodiment the promoter is a human cytomegalovirus promoter.

As provided herein, the vaccine may be used for administration to an avian having an avian pathogen or disease. Such pathogens or diseases are known to those skilled in the art and include but are not limited to: Infectious Bursal Disease Virus, Newcastle Disease Virus, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Riemerella anatipestifer*, Tuberculosis (*Mycobacterium avium*), Infectious Coryza, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, *Erysipelothrix*, Chlamydia, Marek's disease virus, Retroviridae (avian leukosis virus), Infectious Bronchitis Virus, Laringotracheitis Virus, Avian Encephalomyelitis Virus, Influenza Virus, Hemorrhagic Enteritis Virus, Egg Drop Syndrome Virus, Pox Virus, Duck Hepatitis Virus, Duck Virus Enteritis, Reoviruses, Goose Parvovirus, Israel Turkey meningoencephalitis Virus (Flaviviridae). In a preferred embodiment the disease is infectious Bursal Disease Virus.

Suitable carriers for the vaccine are well known to those skilled in the art and include but are not limited to proteins, sugars, etc. One example of such a suitable carrier is a physiologically balanced culture medium containing one or more stabilizing agents such as hydrolyzed proteins, lactose, etc. The live vaccine can be created by taking tissue culture fluids and adding stabilizing agents such as stabilizing hydrolyzed proteins. Further, as used herein "acceptable carrier" are well known to those skilled in the art and include, but are not limited to, 0.01-0.1M and preferably 0.05M phosphate buffer or 0.8% saline.

Additionally, such pharmaceutically acceptable carrier may be aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's or fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers such as those based on Ringer's dextrose, and the like. Preservatives and other additives may also be present, such as, for example antimicrobials, antioxidants, chelating agents, inert gases and the like.

The term "adjuvant" refers to a compound or mixture that enhances the immune response to an antigen. An adjuvant can serve as a tissue depot that slowly releases the antigen and also as a lymphoid system activator that non-specifically enhances the immune response (Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, Calif., p. 384). Often, a primary challenge with an antigen alone, in the absence of an adjuvant, will fail to elicit a humoral or cellular immune response. Adjuvants include, but are

not limited to, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, saponin, mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil or hydrocarbon emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-
5 Guerin) and *Corynebacterium parvum*).

The present invention encompasses a method for enhancing an avian immune response which comprises administering to the avian egg an effective amount of the vaccine for protecting an avian against a disease organism such as a virus which comprises an effective immunizing amount of a vector comprising 1) one or more isolated nucleic acids
10 encoding a polypeptide, wherein said nucleic acid is under the control of a promoter; and 2) a suitable carrier and/or an adjuvant.

The present invention also provides a method of immunizing an avian comprising administering to the avian egg an effective amount of the vaccine. Such pathogens or diseases are known to those skilled in the art and include but are not limited to: Infectious
15 Bursal Disease Virus, Newcastle Disease Virus, and/or *Mycoplasma gallisepticum*. The vaccine may be administered in conjunction with live or attenuated vaccines that are known to those skilled in the art. As contemplated herein the present vaccine or vector may be administered in combination with other vaccines that are known to those skilled in the art.

For purposes of this invention, an "effective immunizing amount" of the vaccine of
20 the present invention is within the range of 1 μ g to 100 mg. In another embodiment the immunizing amount is of 1 ng to 100 ng. In a preferred embodiment the immunizing amount is 100 μ g.

As disclosed in US Patent Serial No. 6,464,984 to Audonnet et al., which is incorporated herein by reference in its entirety, the vaccine may comprise more than one
25 valency and comprise at least one plasmid, integrating so as to express in vivo in the host cells a gene with one or more avian pathogen valencies, these valencies being selected from the group consisting of Marek's disease virus (MDV), Newcastle's disease virus (NDV), infectious bursal disease virus (IBDV), infectious bronchitis virus (IBV), infectious anaemia virus (CAV), infectious laryngotracheitis virus (ILT), encephalomyelitis virus (AEV) or
30 avian leukosis virus (ALV), pneumovirus, and avian plague virus, the plasmids comprising, for each valency, one or more of the genes selected from the group consisting of, but not limited to, gB and gD for the Marek's disease virus, HN and F for the Newcastle disease virus, VP2 for the infectious bursal disease virus, S, M and N for the infectious bronchitis virus, C+NS1 for the infectious anaemia virus, gB and gD for the infectious

laryngotracheitis virus, env and gag/pro for the encephalomyelitis virus, F and G for the pneumovirus virus and HA, N and NP for the avian plague virus.

Valency in the present invention is understood to mean at least one antigen providing protection against the organism, such as a virus, for the pathogen considered, it being possible for the valency to contain, as subvalency, one or more natural or modified genes from one or more strains of the pathogen considered.

Advantageously, the vaccine formula according to the invention may comprise, but is not intended to be limited to, more than one valency including, for example, at least three valencies chosen from, but not limited to, Marek, infectious bursal, infectious anaemia and Newcastle. The infectious bronchitis valency can also preferably be added thereto.

On this basis of 3, 4 or 5 valencies, it will be possible to add one or more of the avian plague, laryngotracheitis, pneumovirus and encephalomyelitis valencies.

As regards the Marek valency, two genes may be used encoding gB and gD, in different plasmids or in one and the same plasmid. For the Newcastle valency, the two HN and F chains, integrated into two different plasmids or into one and the same plasmid, are preferably used. For the infectious bronchitis valency, the use of the S gene is possible. The S and M can be associated in a single plasmid or in different plasmids. For the infectious anaemia valency, the two C and NS1 genes are preferably associated in the same plasmid. For the infectious laryngotracheitis valency, the use of the gB gene alone is preferred. Optionally, but less preferably, the two gB and gD genes can be associated in different plasmids or in one and the same plasmid.

For the avian plague valency, the use of the HA gene is advantageous although it is possible to use the associations HA and NP or HA and N in different plasmids or in one and the same plasmid. The HA sequences from more than one influenza virus strain, in particular from the different strains found in the field, may be associated in the same vaccine. On the other hand, NP provides cross-protection and the sequence from a single virus strain will therefore be satisfactory. For the encephalomyelitis valency, the use of env is preferred.

The vaccine formula according to the invention can be presented in a dose volume of between 0.1 and 1 ml and in particular between 0.3 and 0.5 ml.

The dose will be generally between 10 ng and 1 mg, preferably between 100 ng and 800 µg and preferably between 0.1 µg and 50 µg per plasmid type.

Use will be preferably made of naked plasmids, simply placed in the vaccination vehicle which will be in general physiological saline and the like. It is of course possible to

use all the polynucleotide vaccine forms described in the prior art and in particular formulated in liposomes.

Each plasmid comprises a promoter capable of ensuring the expression of the gene inserted, under its control, into the host cells. This will be in general a strong eukaryotic promoter and in particular a cytomegalovirus early CMV-IE promoter of human or murine origin, or optionally of another origin such as rats, pigs and guinea pigs.

More generally, the promoter may be either of viral origin or of cellular origin. As viral promoter other than CMV-IE, there may be mentioned the SV40 virus early or late promoter or the Rous sarcoma virus LTR promoter. It may also be a promoter from the virus from which the gene is derived, for example the gene's own promoter. As cellular promoter, there may be mentioned the promoter of a cytoskeleton gene, such as, for example, the desmin promoter (Bolmont et al., J. Submicroscopic Cytol. and Pathol. (1990) 22: 117-122; and Zhenlin et al., Gene, (1989) 78: 243-254), or alternatively the actin promoter. When several genes are present in the same plasmid, these may be presented in the same transcription unit or in two different units.

The combination of the different vaccine valencies may be preferably achieved by mixing the polynucleotide plasmids expressing the antigen(s) of each valency, but it is also possible to envisage causing antigens of several valencies to be expressed by the same plasmid.

The methods of the invention, therefore, encompass the injection of a monovalent vaccine formulae comprising one or more plasmids encoding one or more genes from one of the viruses above, the genes being those described above. Besides their monovalent character, these formulae may possess the characteristics stated above as regards the choice of the genes, their combinations, the composition of the plasmids, the dose volumes, the doses and the like.

The monovalent vaccine formulae may also be used (i) for the preparation of a polyvalent vaccine formula as described above, (ii) individually against the actual pathology, (iii) associated with a vaccine of another type (live or inactivated whole, recombinant, subunit) against another pathology, or (iv) as booster for a vaccine as described below.

Another exemplary treatment substance is a biologically active substance such as a vaccine, antibiotic, hormone, probiological culture (e.g., a competitive exclusion media), and the other is a marker such as a dye. The marker can serve as a positive control to confirm injection, for example in the case of eggs subsequently found to be nonviable.

Another aspect of the invention provides a jet injection method for treating an avian embryo *in ovo*, the method comprising the steps of orienting an avian egg into a predetermined position, introducing a first opening into the shell of said egg, positioning a jet injection delivery device relative to the first opening whereby the jet injection delivery device
5 can direct a jet injection stream through the first opening and into the egg, releasing a predetermined dosage of a first treatment substance as a high pressure stream by jet injection into the egg and retracting the jet injection delivery device from the egg, thereby treating the avian embryo. The jet injection procedure is capable of delivering a liquid sample to any desired region of a target bird egg, including to the air sac, allantois, embryo (including
10 subcutaneously as evidenced by the jet injection of dye into multiple embryos.

The jet injection methods according to the invention allow for the production of viable chicks from treated eggs, as shown in Example 2 below. The jet injection of vaccines specifically directed against viral diseases of birds, and in particular of chickens can elicit an immune response that affords protection against subsequent exposure and challenge of the
15 pathological virus, as shown in Example 3 below. The jet injection methods of the invention will also deliver virus to the embryos (see Tables 8 and 9 below).

In one embodiment of the invention, the method further comprises the step of delivering a predetermined dosage of a second treatment substance by jet injection into the egg. In another embodiment, the first and second treatment substances are jet injected into
20 different compartments of the egg. Another embodiment of the methods of the invention further comprises the steps of introducing a second opening into the egg shell separate from the first opening and positioning a jet injection delivery device to direct a jet injection stream through the second small opening and into the egg.

In various embodiments of the methods of the invention, at least one treatment substance is jet injected into the air cell, the yolk sac, allantois, amnion or the embryo. In various embodiments of the methods of the invention, at least one treatment substance is jet injected into the air cell and another treatment substance is introduced via the jet injection device into the yolk sac, allantois, amnion or embryo.

In one embodiment of the invention, the opening is introduced by piercing the shell
30 with a drill device.

In another embodiment of the invention, the opening is introduced by piercing the shell with a tubular punch, the lumen of which is coaxial with the direction of the high pressure stream emitted from a jet injection device, and wherein the jet injection stream is delivered through the lumen of the tubular punch.

In another embodiment of the invention, the opening in the egg shell is introduced by piercing the shell with a gas stream. The gas stream may further comprise an abrasive.

In one embodiment of the invention, the gas stream further comprises a liquid lubricant. In another embodiment of the invention, the gas stream further comprises a disinfectant. In one embodiment of the invention, the liquid lubricant is a disinfectant.

In one embodiment of the invention, the first and second treatment substances are delivered into the egg sequentially in time.

In another embodiment of the invention, the method further comprises the step of resealing the eggshell. The step of resealing the eggshell may further comprise applying to a hole in the eggshell a glue seal, a sealing membrane or a combination thereof.

The invention further provides a jet injection method for treating avian embryos *in ovo* comprising the steps of orienting an avian egg into a predetermined position, positioning a shell piercing means to a predetermined position on the shell surface, piercing the shell of the avian egg, positioning a jet injection delivery device relative to the opening, whereby the jet injection delivery device can direct a jet injection stream through the opening and into the egg, retracting the jet injection delivery devices from the egg, thereby treating the avian embryo, and resealing the egg.

The invention further provides a jet injection method for inducing a protective response to an infectious agent in an avian, comprising the steps of orienting an avian egg into a predetermined position, positioning a shell piercing means to a predetermined position on the shell surface, piercing the shell of the avian egg, positioning a jet injection delivery device relative to the opening, whereby the jet injection delivery device can direct a jet injection stream through the opening and into the egg, wherein the jet injection stream comprises a pharmaceutical substance capable of inducing a protective response in an avian against an infectious agent, retracting the jet injection delivery devices from the egg, thereby treating the avian embryo, resealing the egg, and incubating the treated egg, thereby allowing a protective response to develop. In one embodiment of this method of the invention, the pharmaceutical substance is an antigen capable of eliciting an immune response in a bird.

In another embodiment, the pharmaceutical substance is jet injected into the breast muscle of a bird. The pharmaceutical substance may be a DNA vaccine. In one embodiment, the DNA vaccine elicits a protective response against Marek's disease, IBDV, Infectious Bursal disease, coccidial infection, Newcastle Disease virus or ILT.

The invention also provides a jet injection method for treating avian embryos *in ovo* comprising the steps of orienting an avian egg into a predetermined position, positioning a

36

shell piercing means to a predetermined position on the shell surface, introducing a first opening into the shell of an avian egg, introducing a second opening into the shell of an avian egg, the second opening being spaced apart from the first opening, positioning a first jet injection delivery device relative to the first opening whereby the first jet injection delivery device can direct a first jet injection stream through the first opening and into the egg, positioning a second jet injection delivery device relative to the second opening whereby the second jet injection delivery device can direct a second jet injection stream through the second opening and into the egg, releasing a predetermined dosage of a first treatment substance from the first jet injection delivery device into the egg, releasing a predetermined dosage of a second treatment substance from the second delivery device into the egg, retracting the first and second jet injection delivery devices from the egg, thereby treating the avian embryo, and resealing the egg shell.

In one embodiment of this aspect of the invention, the method further comprises the step of jet injecting the first and second treatment substances simultaneously through a single orifice of the jet injection delivery device.

In one embodiment of this aspect of the invention, the method further comprises the step of jet injecting the first treatment substance beneath the membrane of the egg.

In another embodiment of this aspect of the invention, the second jet injection delivery device is adjusted to deliver the second treatment substance within or adjacent the albumen, the yolk sac, embryo, allantois, or amnion.

In still another embodiment of this aspect of the invention, the first and second treatment substances are released substantially simultaneously in time.

Another aspect of the invention provides an automated *in ovo* jet injection apparatus, comprising a flat for holding a plurality of eggs in a substantially upright and aligned position, wherein the flat is configured to provide external access to predetermined areas of the eggs, a plurality of jet injection delivery devices configured to contact predetermined areas of the egg, at least one of the jet injection devices corresponding to each egg in the flat, a first treatment substance container for holding a first treatment substance, said first container in fluid communication with each of the jet injection delivery devices.

In one embodiment of this aspect of the invention, the automatic jet injection device further comprises a means of piercing the shell of an egg, said means capable of being positioned at a predetermined position on the surface of an egg.

In another embodiment of this aspect of the invention, the automatic jet injection device further comprises a second treatment substance container for holding a second

treatment substance, said second container in fluid communication with each of the jet injection delivery devices.

5 In the various embodiments of this aspect of the invention, each jet injection delivery device has a means of introducing an opening in an egg, said opening being positioned relative to a jet injection delivery device whereby the jet injection delivery device can direct a jet injection stream through the opening and into the egg.

In one embodiment of the automated *in ovo* jet injection apparatus according to the invention, the means of introducing an opening in an egg is a tubular punch.

10 In yet another embodiment of the automated *in ovo* jet injection apparatus according to the invention, the means of introducing an opening in an egg is a twist drill.

In still another embodiment of the invention, the means of introducing an opening in an egg is a tubular drill bit having a lumen therein.

15 In this embodiment of the invention, the means of introducing an opening in an egg can be configured such that the jet injection stream is delivered to the egg through the lumen of the tubular drill bit.

In various embodiments of the automated *in ovo* jet injection apparatus according to the invention, the means of introducing an opening in an egg can be a high-pressure gas jet that may also further comprise an abrasive for grinding an opening into the egg shell. In one embodiment, the high pressure gas jet further comprises a lubricant, a disinfectant or a combination thereof.

The automated *in ovo* jet injection apparatus according to the invention may further comprise a means for removing ground egg shell from the surface of the egg.

25 In another embodiment of the automated jet injection apparatus according to the invention, the jet injection devices are configured to deliver the first and second treatment substances via at least one of spatially and temporally sequentially separated injections into the eggs in the flat.

In another embodiment of the automated jet injection apparatus according to the invention, the at least one jet injection device corresponding to each egg includes first and second jet injection devices corresponding to each egg in the flat.

30 In still another embodiment of the apparatus according to the invention, the first injection device is configured to inject the top large end of the egg and the second jet injection device is configured to inject into a separate opening spaced apart from the first jet injection device. In yet another embodiment of the apparatus according to the invention, a

first treatment substance stream is delivered by the first jet injection device to a depth that is below the air cell of the egg.

In one embodiment of the apparatus according to the invention, a second treatment substance stream can be delivered by the second jet injection device so as to terminate
5 penetration into the egg above the air cell of the egg.

The invention further provides an automated *in ovo* jet injection apparatus, comprising a flat for holding a plurality of eggs in an aligned position, wherein the flat is configured to provide external access to predetermined areas of the eggs, a plurality of first jet injection delivery devices, wherein each jet injection delivery device is configured to
10 direct a treatment substance stream to an egg, one of the first injection delivery devices corresponding to each egg in the flat, a plurality of second jet injection delivery devices configured to contact predetermined areas of the egg, one of the second jet injection delivery devices corresponding to each egg in the flat, a first treatment substance container for holding a first treatment substance, the first container in fluid communication with each of the first jet
15 injection delivery devices, a second treatment substance container for holding a second treatment substance, the second container in fluid communication with each of the second injection delivery devices, a pump means operably associated with the first and second containers for delivering a predetermined dosage of each of the first and second treatment substances to each of the respective first and second jet injection devices, and a means of
20 introducing at least one opening in each egg, wherein each opening is positioned relative to a jet injection delivery device whereby the jet injection delivery device can direct a jet injection stream comprising a treatment substance through the opening and into the egg.

In one embodiment of the automated *in ovo* jet injection apparatus according to this aspect of the invention, the means of opening an egg is integral to the jet injection delivery
25 device.

In another embodiment, the first container and each of the first jet injection delivery devices define a first fluid pathway therebetween and the second container and each of the second jet injection delivery devices define a second fluid pathway therebetween, wherein the first pathway is separate from the second pathway but may be combined before exiting the
30 orifice of the jet injection delivery device.

In another embodiment of the automated *in ovo* jet injection apparatus according to the invention, a first jet injection device is configured to deliver a first treatment substance at a first location below the air cell of the egg and said second jet injection device is configured to deliver a second treatment substance at a second location in the egg.

Yet another embodiment according to the invention further comprises a third treatment container for holding a third treatment substance, said third treatment communication with one of said first and second injection devices.

5 In this embodiment of the automated *in ovo* jet injection apparatus, the first injection device can also be configured to deliver said first and third treatment substances.

The present invention provides an automated *in ovo* injection apparatus comprising a flat for holding a plurality of eggs in an aligned position, wherein said flat is configured to provide external access to predetermined areas of the eggs, a plurality of injection delivery devices, at least one of said injection delivery devices corresponding to each egg in said flat,
10 each of said devices having an end configured to contact and penetrate into a predetermined location in said egg, a first treatment substance container for holding a first treatment substance, said first container in fluid communication with each of said injection delivery devices, a second treatment substance container for holding a second treatment substance, said second container in fluid communication with each of said injection delivery devices,
15 and a pump operably associated with said first and second containers for delivering a predetermined dosage of each of said first and second treatment substances to each of said injection devices, wherein the predetermined dosages of the first and second treatment substances are combined prior to said end port to be delivered to the egg together at the site of injection.

20 One embodiment of this automated jet injection apparatus can further comprise a means for combining the first and second treatment substances prior to injection and delivering the predetermined dosage as a mixed treatment substance along a single fluid pathway into each of said injection devices.

In another embodiment of this automated jet injection apparatus according to the
25 invention, the first container and each of the injection devices defining a first fluid pathway therebetween and the second container and each of the injection devices defining a second fluid pathway therebetween, wherein the first and second pathways are separate but are configured to terminate to a common pathway at the first end of the jet injection device at the site of injection.

30 Still another embodiment of the automated injection apparatus according to the invention further comprises a third container for holding a cleansing liquid, said third container in fluid communication with said pump, said first container, and each of said injection devices, thereby allowing said fluid pathways to be flushed with said cleansing liquid.

It will be understood that although the form of the invention shown and described herein constitutes preferred embodiments of the invention, it is not intended to illustrate all possible forms of the invention. The words used are words of description rather than of limitation. Various changes and variations may be made to the present invention without departing from the spirit and scope of the invention.

Example 1: Jet injection into eggs

Eighteen-day old chick embryos in the shell were inoculated with a Biojector 2000 jet injector fitted with a No. 2 syringe head and adjusted to deliver 0.2 ml of liquid. The top of an egg (four replicates were performed) was opened by picking away the shell to expose the underlying membrane and 0.2 ml of dye was delivered to the embryo. The dye was deposited both subcutaneously and intra-muscularly through the membrane as well as some dye remaining on the membrane surface. Various regions or organs of the embryos received the dye solution. The inoculations were repeated with a Biojector 3400 and No.2 syringe with similar results.

A Biojector and No. 7 syringe as the inoculation device, in one instance, passed the indicator dye through the membrane and yolk, depositing the dye at the bottom of the egg.

Example 2: Effect of in ovo jet injection on viability of 17-19 day in-shell chicken embryos

Viable chicken in shell embryos were jet injected using a VITAJET™ (Bioject Medical Technologies, New Jersey) spring activated injector using different spring loadings and nozzle diameters for comparative purposes, according to the manufacturer's instructions. Fifty 17, 18 and 19 day embryonation eggs (ED) were used per test sample. A pilot hole was made in the shell of each egg with a drill and the exit nozzle of the injector aligned to allow an inoculum stream to enter the egg. A non-lethal tracking dye was used. The injector was fitted with an 0.006 or 0.008 nozzle and discharged with a spring force of 40 lbs or 52 lbs.

As shown in Table 1, viability to hatching was at least 70% with a 0.006 nozzle and 40 lbs spring force with an injected volume of 0.05 ml of dye, which entered directly into the tissues of the embryo chicks as determined by subsequent visual observation and dissection

Table 1. Effects of jet injection and age of embryo on hatchability

Effects of jet injection and age of embryo on hatchability	Hatch	Trauma Death	Death
Control	49/50 (98%)	0	1
Day 17	36/50 (72%)	6	6

91

Day 18	39/50 (78%)	3	5
Day 19	48/50 (96%)	0	1

In another comparative study, as shown in Table 2, there was no difference between the 0.006 and the 0.008 nozzles on the viability of the recipient chicks. The volume of the delivered fluid also did not have detectable effects

Table 2. Effect on hatchability following jet injection in ovo (ED18) injection (52 Lbs injector)

Nozzle Type	Volume	Hatch	Trauma Death	Death
0.006	0.05ml	12/20 (60%)	5	1
0.006	0.1 ml	12/20 (60 %)	4	1
0.008	0.05ml	12/20 (60%)	6	0
0.008	0.1 ml	10/20 (50%)	8	0
Control	N/A	20/20 (100 %)	0	0

An increase in the force of the jet stream had a detectable decrease in chick viability, as shown in Table 3.

Table 3. Effect on hatchability following jet injection in ovo (ED 18) injection with an 0.006 nozzle and increasing jet stream forces

Injector	Volume	Hatch	Trauma Death	Death
40 lbs	0.1 ml	46/60 (77 %)	8	5
40 lbs	0.05 ml	44/60 (73%)	12	2
52 lbs	0.05 ml	18/30 (60%)	8	0

10 **Example 3: Use of jet injection to deposit vaccine into viable chick en embryos and elicit a protective immune response**

15 Viable chicken in shell embryos were jet injected using a VITA-JECT™ spring activated injector using different spring loadings and nozzle diameters for comparative purposes. Fifty eggs of 18 days embryonation (ED) were used per test sample. A pilot hole was made in the shell of each egg with a drill and the exit nozzle of the injector was aligned to allow an inoculum stream to enter the egg. The injector was fitted with an 0.006 size nozzle and discharged with a spring force of 40 lbs. HVT vaccine directed against Marek's

disease, was deposited intraembryonically, either intramuscularly or subcutaneously. Embryos were subsequently challenged by the virus to determine the efficacy of the early protection afforded by the jet injected vaccine. A high level of viability of the injected embryos was retained, as shown in Table 4.

5 **Table 4. Effect of in ovo (ED18) jet injection HVT vaccination on hatchability**

Group	Hatch	Trauma Death	Death
jet injection	121/140 (86 %)	11	3
Control	74/75 (99 %)	0	0

The injection of HVT vaccine directly into the 18 day chicken embryos afforded protection from a subsequent challenge with HVT, as shown in Table 5.

Table 5. Protective Efficacy of HVT administered via jet injection in ovo (ED 18)

Group	Viremia on day 4	Viremia on Day 8	MDV/ Total	% Protection
Non Vaccinated-non Challenge	N/A	N/A	0/15	-
NonVaccinated-Challenge	N/A	N/A	30/30	0
jet injection	19.4 ± 11	27.9 ±26	13/59	78

10 Chicken embryos were also additionally treated with jet injected vaccines directed against Newcastle Disease Virus (NDV), including the vaccine encoded in the poxvirus vector Trovac. Viability of the injected embryos was not significantly affected, as shown in Table 6. The survival and response of chicks to the injected vaccine are shown in Table 7.

Table 6. Effect of in ovo (ED18) jet injection vaccination on hatchability (40lbs 0.006 nozzle)

Group	Route	Hatch	Trauma Death	Death
Control	N/A	27/30 (90%)	1	1
Trovac ND	jet injection	56/60 (93 %)	3	1
NDV-WOW	jet injection	55/60 (92 %)	1	2
Trovac ND	SQ	43/45 (96%)	0	0
WOW	SQ	43/45 (96%)	0	2

Table 7. Effect of in ovo (ED18) jet injection vaccination on chick survivability and NDV responses

15

Group	Route	Death/Total	NDV Response		
			1st Vaccination	2nd Vaccination	Percentage protection
Control	N/A	0/20	0/20	0/10	0
Trovac ND	jet injection	27/30	ND	ND	NA
NDV- WOW	jet injection	0/30	1/26 (1)	6/13 (31)	8
Trovac ND	SQ	0/30	13/30 (20)	14/14 (3408)	100
WOW	SQ	0/30	29/30 (1286)	15/15 (3745)	100

Chicken embryos were also additionally treated with jet injected with Canarypox Virus. Viability of the injected embryos was not significantly affected, as shown in Table 8. The virus recovery levels from muscle, as opposed to spleen and liver of chicks are shown in Table 9.

5 Table 8. Effect of *in ovo* (ED18) jet injection vaccination on hatchability (40lbs 0.006 nozzle) following vaccination with Canarypox

Group	Route	Hatch	Trauma/Death	Death
Control (PBS)	jet injection	18/20 (90%)	1	0
ALVAC-CDV (10 ⁵)	jet injection	22/30(73%)	4	0
ALVAC-CDV (10 ⁵)	jet injection	28/30 (93%)	2	0
ALVAC-CDV (10 ⁵)	jet injection	27/30 (90 %)	2	0
ALVAC-CDV (10 ⁵)	1-Day IM	27/30 (90%)	0	2

Table 9. Effect of *in ovo* (ED18) jet injection vaccination on virus recovery following vaccination with Canarypox

Group	Route	Virus Isolation	
		Spleen/Liver	Muscle
Control (PBS)	jet injection	ND	ND
ALVAC-CDV (10 ⁵)	jet injection	0/5	5/5
ALVAC-CDV (10 ⁵)	jet injection	0/5	5/5
ALVAC-CDV (10 ⁵)	jet injection	0/5	1/5
ALVAC-CDV (10 ⁵)	1-Day IM	ND	ND

10 **Example 3: Preparation of a viral vaccine**

(a) *Culture of the Viruses:* Viruses are cultured on the appropriate cellular system until a cytopathic effect is obtained. The cellular systems to be used for each virus are well known

to persons skilled in the art. Briefly, the cells sensitive to the virus used, which are cultured in Eagle's minimum essential medium (MEM medium) or another appropriate medium, are inoculated with the viral strain studied using a multiplicity of infection of 1. The infected cells are then incubated at 37° C for the time necessary for the appearance of a complete cytopathic effect (on average 36 hours).

After culturing, the supernatant and the lysed cells are harvested and the entire viral suspension is centrifuged at 1000 g for 10 minutes at +4° C to remove cellular debris. The viral particles are then harvested by ultracentrifugation at 400,000 g for 1 hour at +4° C. The pellet is taken up in a minimum volume of buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) and the concentrated viral suspension is treated with proteinase K (100 µg/ml final) in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS) (0.5% final) for 2 hours at 37° C. The viral DNA is then extracted with a phenol/chloroform mixture and then precipitated with 2 volumes of absolute ethanol. After leaving overnight at -20° C., the DNA is centrifuged at 10,000 g for 15 minutes at +4° C. The DNA pellet is dried and then taken up in a minimum volume of sterile ultrapure water. It can then be digested with restriction enzymes.

The RNA viruses were purified according to techniques well known to persons skilled in the art. The genomic viral RNA of each virus is then isolated using the "guanidium thiocyanate/phenolchloroform" extraction technique described by Chromczynski & Sacchi (Anal. Biochem., 1987. 162, 156-159).

All the constructions of plasmids are carried out using the standard molecular biology techniques described by J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). All the restriction fragments used for the present invention were isolated using the "GeneClean" kit (BIO 101 Inc. La Jolla, Calif.).

Specific oligonucleotides (comprising restriction sites at their 5' ends to facilitate the cloning of the amplified fragments) are synthesized such that they completely cover the coding regions of the genes which are to be amplified (see specific examples). The reverse transcription (RT) reaction and the polymerase chain reaction (PCR) were carried out according to standard techniques (Sambrook J. et al., 1989). Each RT-PCR reaction is performed with a pair of specific amplimers and taking, as template, the viral genomic RNA extracted. The complementary DNA amplified is extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) before being digested with restriction enzymes.

(b) *Preparation and Purification of the Plasmids:* For the preparation of the plasmids intended for the vaccination of avian eggs, any technique may be used which makes it possible to obtain a suspension of purified plasmids predominantly in the supercoiled form. These techniques are well known to persons skilled in the art. There may be mentioned in particular the alkaline lysis technique followed by two successive ultracentrifugations on a caesium chloride gradient in the presence of ethidium bromide as described in J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Reference may also be made to patent applications PCT WO 95/21250 and PCT WO 96/02658 that describe methods for producing, on an industrial scale, plasmids which can be used for vaccination. For the purposes of the manufacture of vaccines, the purified plasmids are resuspended so as to obtain solutions at a high concentration (>2 mg/ml) compatible with storage. The plasmids are resuspended either in ultrapure water or in TE buffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0).

(c) *Manufacture of the Associated Vaccines:* The various plasmids necessary for the manufacture of an associated vaccine are mixed starting with their concentrated solutions. The mixtures are prepared such that the final concentration of each plasmid corresponds to the effective dose of each plasmid. The solutions that can be used to adjust the final concentration of the vaccine may be either a 0.9% NaCl solution, or PBS buffer. Specific formulations such as liposomes, cationic lipids, may also be used for the manufacture of the vaccines.

Prophetic Example: Antibody generation conferring a protective response to infection in chickens

Chicken embryos are treated with jet injected DNA vaccines directed against Newcastle Disease Virus (NDV), including a vaccine encoded in the poxvirus vector Trovac. Viability of the injected embryos is not significantly affected. The embryos are jet injected with between about 50 µg and 1000 µg of a DNA construct comprising a plasmid or viral vector incorporating a promoter, preferably, but not limited to, an avian gene promoter that will drive expression of a heterologous nucleic acid operably linked thereto, the heterologous nucleic acid encoding at least one antigenic determinant of an avian pathogen. The nucleic acid vaccine preparation, which is optionally mixed with a pharmaceutically acceptable carrier will be jet injected directly into the breast muscle tissue of shelled embryos using the apparatus and methods described herein.

46

After resealing of the injected eggshells using glue of other suitable sealing method that maintains the sterility of the internal contents of the eggs, the eggs are incubated until hatching of the chicks. Expression of the antigenic target in the serum of the chicks and adult birds will be measured. Antibody generation in the serum is measured at least up to 60 days
5 from hatching of the injected chicks. Detectable levels of the expected antibody will be found, the levels correlating to the degree of protection afforded against the target infectious organism presented to the treated birds.

Although a few exemplary embodiments of this invention have been described, those
10 skilled in the art will readily appreciate that many modifications are possible in the exemplary embodiments without materially departing from the novel teachings and advantages of this invention. Accordingly, all such modifications are intended to be included within the scope of this invention as defined in the claims. The invention is defined by the following claims, with equivalents of the claims to be included therein.

15

What is claimed:

1. A jet injection method for treating an avian embryo *in ovo*, comprising the steps of:
 - (a) orienting an avian egg into a predetermined position;
 - (b) introducing a first opening into the shell of said egg;
 - 5 (c) positioning a jet injection delivery device relative to the first opening whereby the jet injection delivery device can direct a jet injection stream through the first opening and into the egg;
 - (d) releasing a predetermined dosage of a first treatment substance by jet injection into the egg; and
 - 10 (e) retracting the jet injection delivery device, thereby treating the avian embryo.
2. The method according to Claim 1, further comprising the steps of introducing a second opening into the egg shell separate from the first opening and positioning a jet injection delivery device to direct a jet injection stream through the second small opening and into the egg, thereby delivering a predetermined dosage of a second treatment substance by jet injection into the egg.
- 15 3. The method according to Claim 2, wherein the first and second treatment substances are jet injected into different compartments of the egg.
- 20 4. The method according to Claim 2, wherein at least one treatment substance is jet injected into the air cell and another treatment substance is introduced via the jet injection device into the yolk sac, allantois, amnion or embryo.
- 25 5. The method according to Claim 1, wherein the opening is introduced by piercing the shell with a device selected from a tubular drill, a twist drill or a grinding drill bit, a tubular punch having a lumen coaxial with a high pressure stream from the jet injection device, and wherein the jet injection stream is delivered through the lumen of the tubular punch, a gas stream, a gas stream comprises an abrasive, a gas stream further comprising a liquid lubricant, and a gas stream further comprising a disinfectant.
- 30

6. The method according to Claim 1, further comprising the step of resealing the egg shell.
7. The method according to Claim 6, wherein the step of resealing the egg shell comprises applying to a hole in the egg shell a glue seal, a sealing membrane or a combination thereof.
8. A jet injection method for treating avian embryos *in ovo*, comprising the steps of:
orienting an avian egg into a predetermined position;
10 positioning a shell piercing means to a predetermined position on the shell surface;
piercing the shell of the avian egg;
positioning a jet injection delivery device relative to the opening, whereby the jet injection delivery device can direct a jet injection stream through the opening and into the egg;
15 retracting the jet injection delivery devices, thereby treating the avian embryo;
and
resealing the egg.
- 20 9. A jet injection method for treating avian embryos *in ovo*, comprising the steps of:
orienting an avian egg into a predetermined position;
positioning a shell piercing means to a predetermined position on the shell surface;
introducing a first opening into the shell of an avian egg;
25 introducing a second opening into the shell of an avian egg, the second opening being spaced apart from the first opening;
positioning a first jet injection delivery device relative to the first opening whereby the first jet injection delivery device can direct a first jet injection stream through the first opening and into the egg;
30 positioning a second jet injection delivery device relative to the second opening whereby the second jet injection delivery device can direct a second jet injection stream through the second opening and into the egg;
releasing a predetermined dosage of a first treatment substance from the first jet injection delivery device into the egg;

releasing a predetermined dosage of a second treatment substance from the second delivery device into the egg;
retracting the first and second jet injection delivery devices from the egg, thereby treating the avian embryo; and
5 resealing the egg shell.

10. A jet injection method for inducing a protective response to an infectious agent in an avian, comprising the steps of:
- 10 orienting an avian egg into a predetermined position;
positioning a shell piercing means to a predetermined position on the shell surface;
piercing the shell of the avian egg;
positioning a jet injection delivery device relative to the opening, whereby the jet injection delivery device can direct a jet injection stream through the opening and into the egg, and wherein the jet injection stream comprises a pharmaceutical substance capable of inducing a protective response in an avian against an infectious agent;
15 jet injecting the pharmaceutical substance into the egg, thereby treating the avian embryo therein;
retracting the jet injection delivery devices;
20 resealing the egg; and
incubating the treated egg, thereby allowing a protective response to develop.
11. The method according to Claim 10, wherein the pharmaceutical substance is an antigen or a DNA vaccine capable of eliciting an immune response in a bird.
- 25 12. The method according to Claim 10, wherein the pharmaceutical substance is jet injected into the breast muscle of a bird.
- 30 13. The method according to Claim 12, wherein the DNA vaccine elicits a protective response against Marek's disease, IBDV, Infectious Bursal disease, coccidial infection, Newcastle Disease virus or ILT.
14. An automated *in ovo* jet injection apparatus, comprising:

- a flat for holding a plurality of eggs in a substantially upright and aligned position, wherein the flat is configured to provide external access to predetermined areas of the eggs;
- a plurality of jet injection delivery devices configured to contact predetermined areas of the egg, at least one of the jet injection devices corresponding to each egg in the flat;
- a first treatment substance container for holding a first treatment substance, said first container in fluid communication with each of the jet injection delivery devices and, optionally, a second treatment substance container for holding a second treatment substance, said second container in fluid communication with each of the jet injection delivery devices..
- 15 The automatic jet injection device according to Claim 14, further comprising a means of piercing the shell of an egg, said means capable of being positioned at a predetermined position on the surface of an egg
16. The automatic jet injection device according to Claim 14, wherein each jet injection delivery device has a means of introducing an opening in an egg, said opening being positioned relative to a jet injection delivery device whereby the jet injection delivery device can direct a jet injection stream through the opening and into the egg.
17. The automatic jet injection device according to Claim 16, wherein the means of introducing an opening in an egg is a tubular punch, a twist drill, a tubular drill bit having a lumen therein, or a high-pressure gas jet.
18. The automatic jet injection device according to Claim 17, wherein the tubular punch is coaxial to the jet injection stream delivered by the jet injection delivery device.
19. The automatic jet injection device according to Claim 17, wherein the high pressure gas jet further comprises an abrasive for grinding an opening into the egg shell, a lubricant, a disinfectant or any combination thereof.
20. The automatic jet injection device according to Claim 14, further comprising a means for removing ground egg shell from the surface of the egg.

21. The automated jet injection apparatus according to Claim 17, wherein the at least one jet injection device corresponding to each egg includes first and second jet injection devices corresponding to each egg in the flat.
- 5
22. The automated jet injection apparatus according to Claim 22, wherein the first injection device is configured to inject the top large end of the egg and the second jet injection device is configured to inject into a separate opening spaced apart from the first jet injection device.
- 10
23. An automated *in ovo* jet injection apparatus, comprising:
- 15
- a flat for holding a plurality of eggs in an aligned position, wherein the flat is configured to provide external access to predetermined areas of the eggs;
- a plurality of first jet injection delivery devices, wherein each jet injection delivery device is configured to direct a treatment substance stream to an egg, one of the first injection delivery devices corresponding to each egg in the flat;
- 20
- a plurality of second jet injection delivery devices configured to contact predetermined areas of the egg, one of the second jet injection delivery devices corresponding to each egg in the flat;
- a first treatment substance container for holding a first treatment substance, the first container in fluid communication with each of the first jet injection delivery devices;
- 25
- a second treatment substance container for holding a second treatment substance, the second container in fluid communication with each of the second injection delivery devices;
- a pump means operably associated with the first and second containers for delivering a predetermined dosage of each of the first and second treatment substances to each of the respective first and second jet injection devices; and
- 30
- a means of introducing at least one opening in each egg, wherein each opening is positioned relative to a jet injection delivery device whereby the jet injection delivery device can direct a jet injection stream comprising a treatment substance through the opening and into the egg.

24. The automated *in ovo* jet injection apparatus according to Claim 23, wherein the means of opening an egg is integral to the jet injection delivery device.
- 5 25. The automated *in ovo* jet injection apparatus according to Claim 23, the first container and each of the first jet injection delivery devices define a first fluid pathway therebetween and the second container and each of the second jet injection delivery devices define a second fluid pathway therebetween, wherein the first pathway is separate from the second pathway.
- 10 26. The automated jet injection apparatus according to Claim 23, wherein said first jet injection device is configured to deliver a first treatment substance at a first location below the air cell of the egg and said second jet injection device is configured to deliver a second treatment substance at a second location in the egg.
- 15 27. An automated *in ovo* jet injection apparatus, comprising:
a flat for holding a plurality of eggs in an aligned position, wherein said flat is configured to provide external access to predetermined areas of the eggs;
a plurality of injection delivery devices, at least one of said injection delivery devices corresponding to each egg in said flat, each of said devices having
20 opposing first and second end portions, said second end portion having an end port configured to contact and penetrate into a predetermined location in said egg;
a first treatment substance container for holding a first treatment substance, said first container in fluid communication with each of said injection delivery devices;
25 a second treatment substance container for holding a second treatment substance, said second container in fluid communication with each of said injection delivery devices;
a pump operably associated with said first and second containers for
30 delivering a predetermined dosage of each of said first and second treatment substances to each of said injection devices, wherein the predetermined dosages of the first and second treatment substances are combined prior to said end port to be delivered to the egg together at the site of injection.

53

28. The automated jet injection apparatus according to Claim 27, further comprising a mixing chamber in fluid communication with said first and second containers and said injection devices, said mixing chamber positioned intermediate of said containers and said injection devices, thereby temporally combining the first and second treatment substances prior to injection and delivering the predetermined dosage as a mixed treatment substance along a single fluid pathway into each of said injection devices.
29. The automated jet injection apparatus according to Claim 27, the first container and each of the injection devices defining a first fluid pathway therebetween and the second container and each of the injection devices defining a second fluid pathway therebetween, wherein the first and second pathways are separate but are configured to terminate to a common pathway at the first end of the jet injection device at the site of injection.
30. The automated jet injection apparatus according to Claim 28, further comprising a third container for holding a cleansing liquid, said third container in fluid communication with said pump, said first container, and each of said injection devices, thereby allowing said fluid pathways to be flushed with said cleansing liquid.

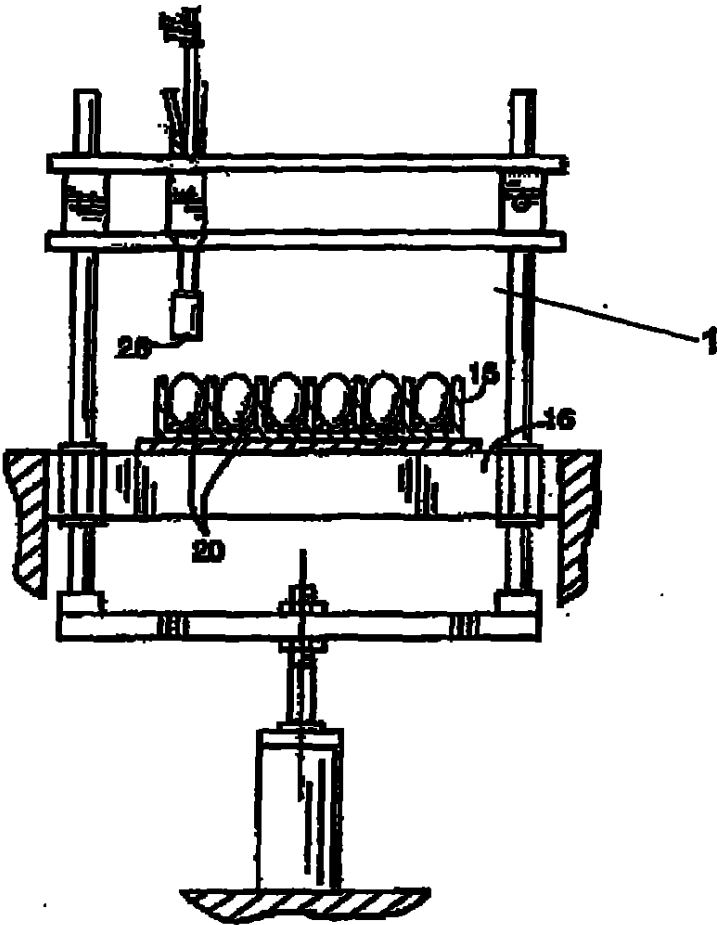


Fig. 1

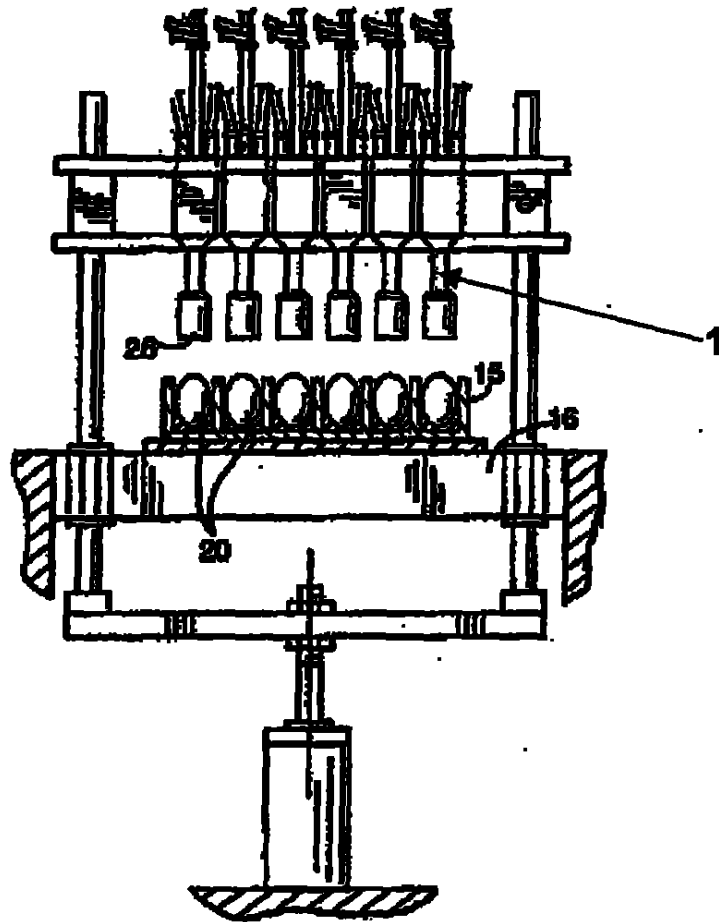
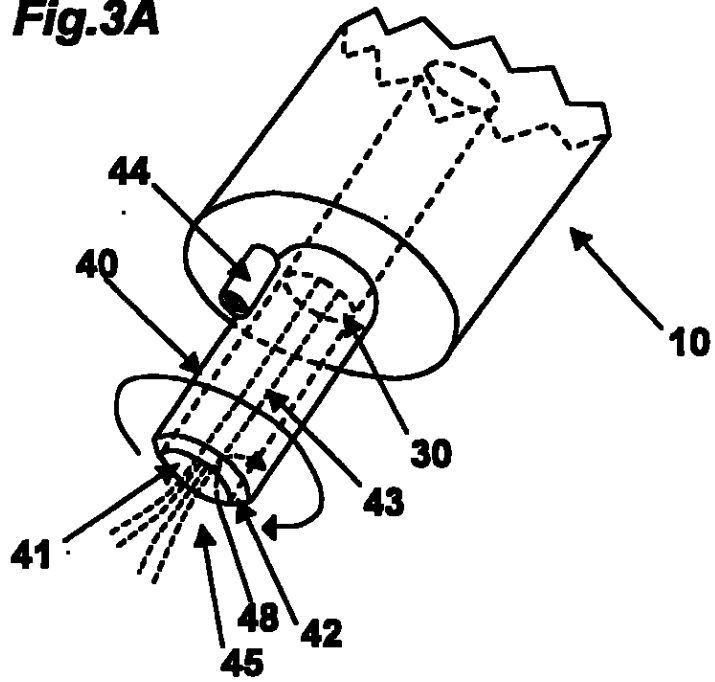
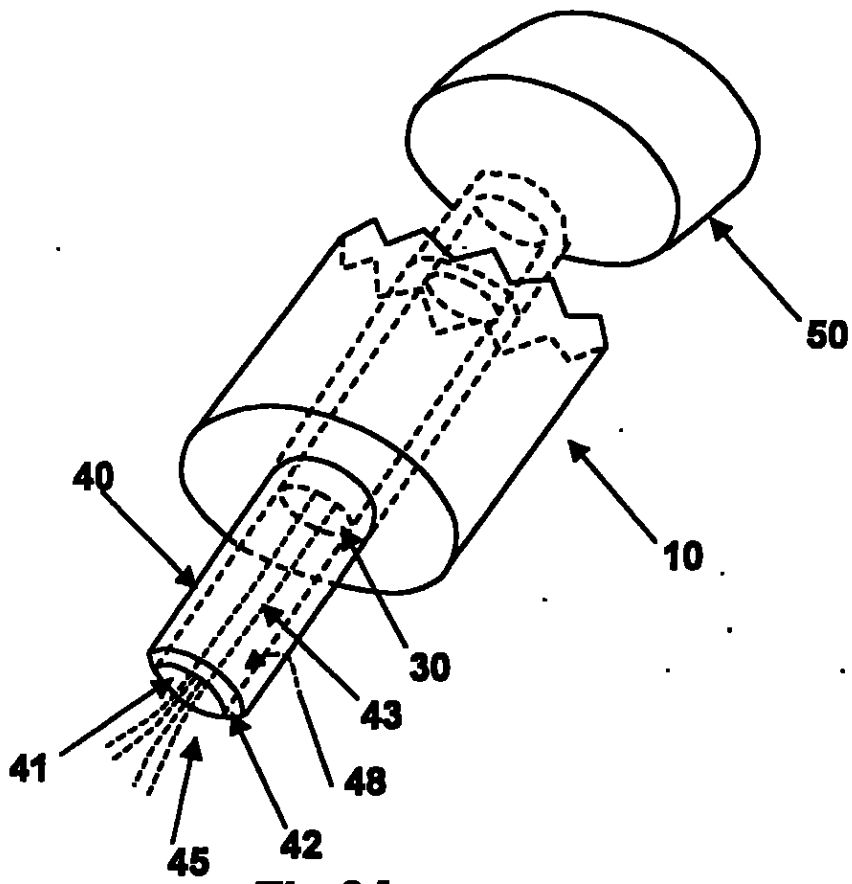


Fig. 2



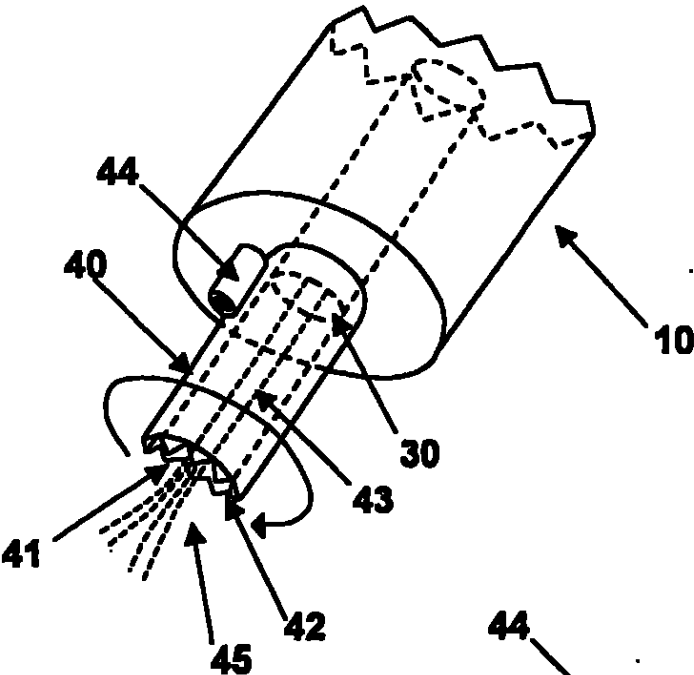


Fig.3C

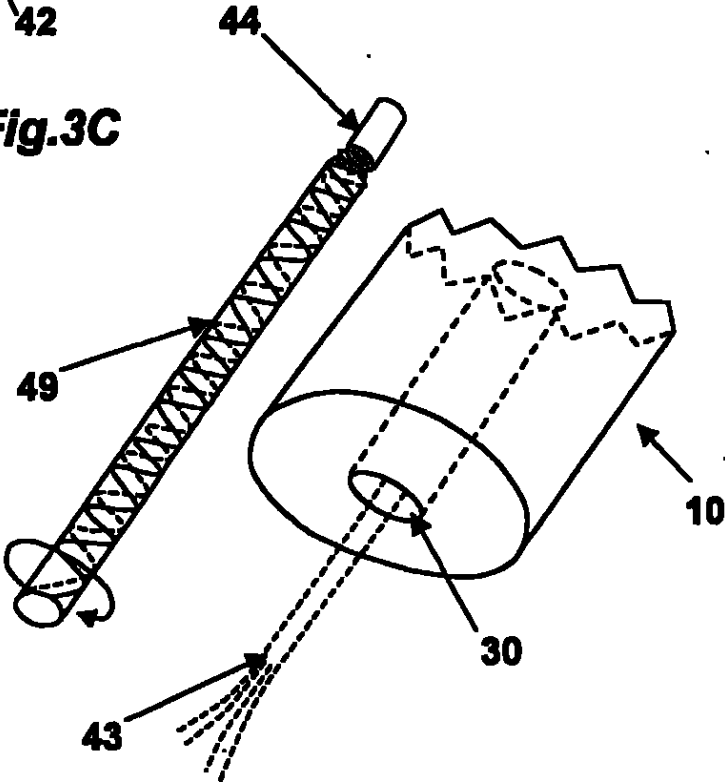


Fig.3D

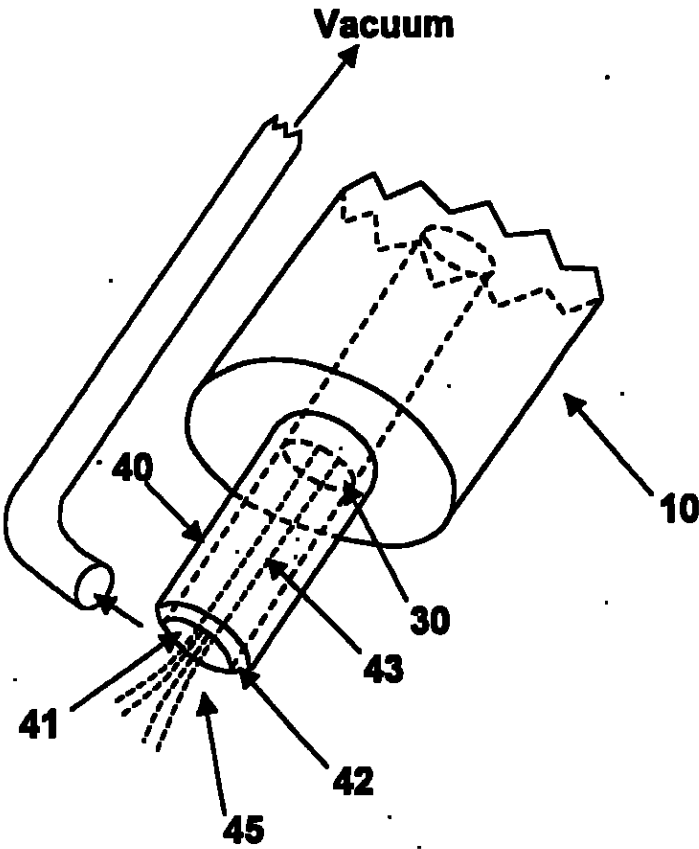


Fig.3E

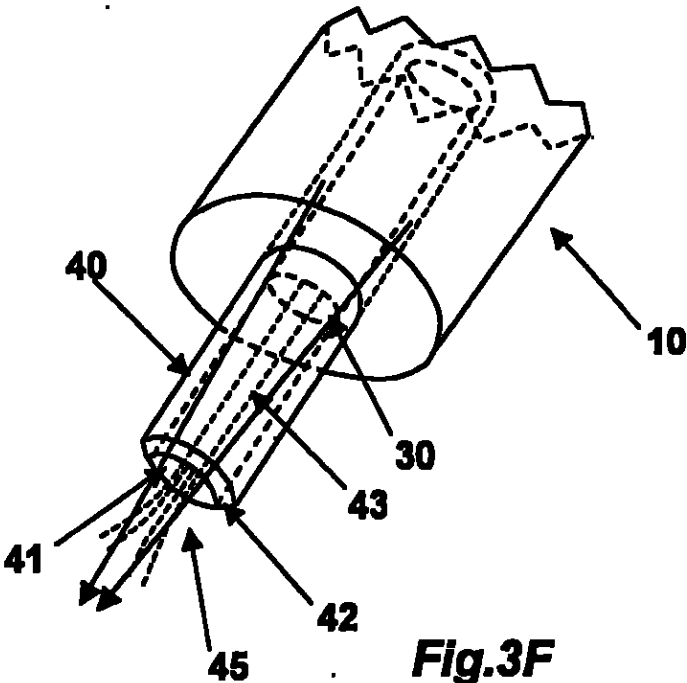
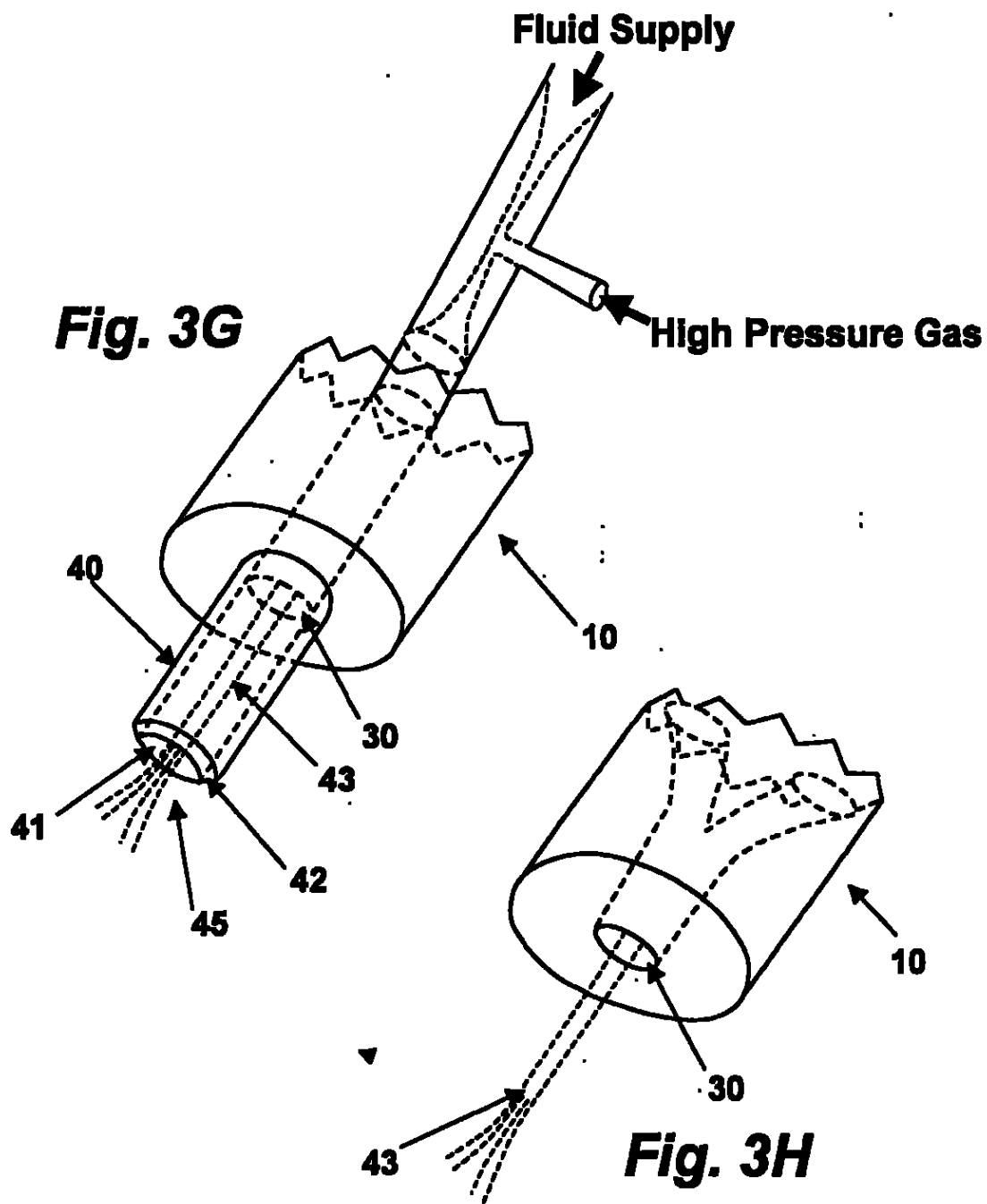
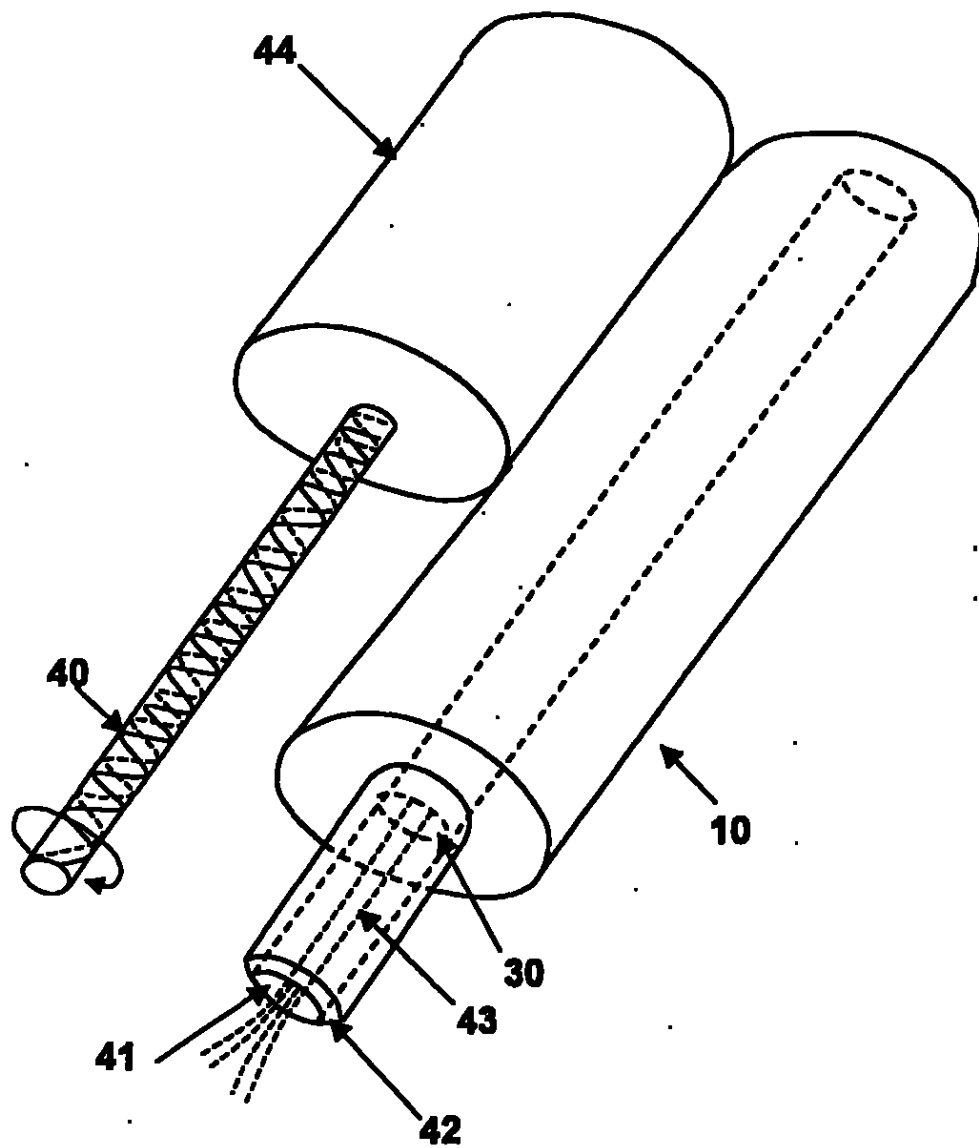
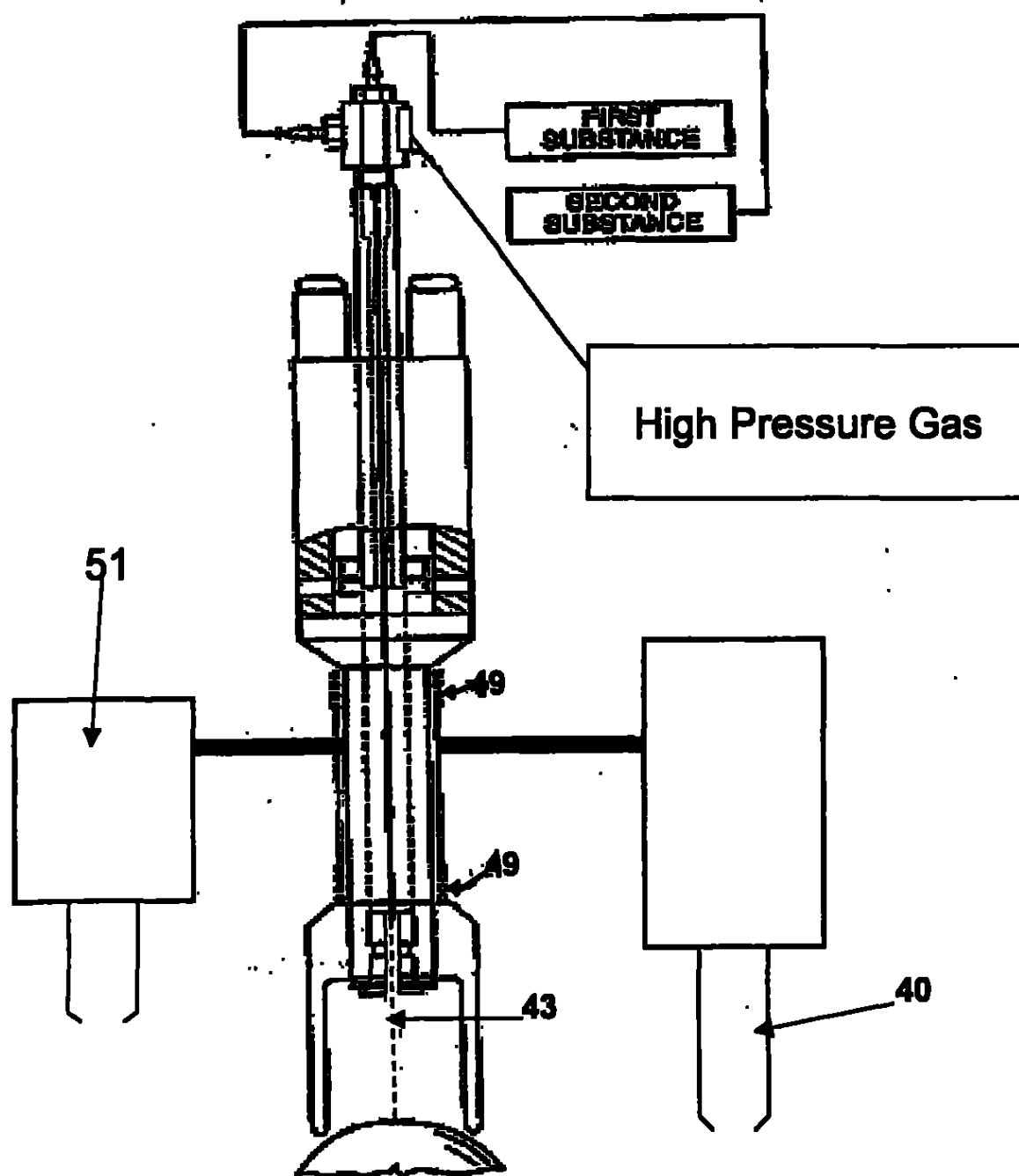
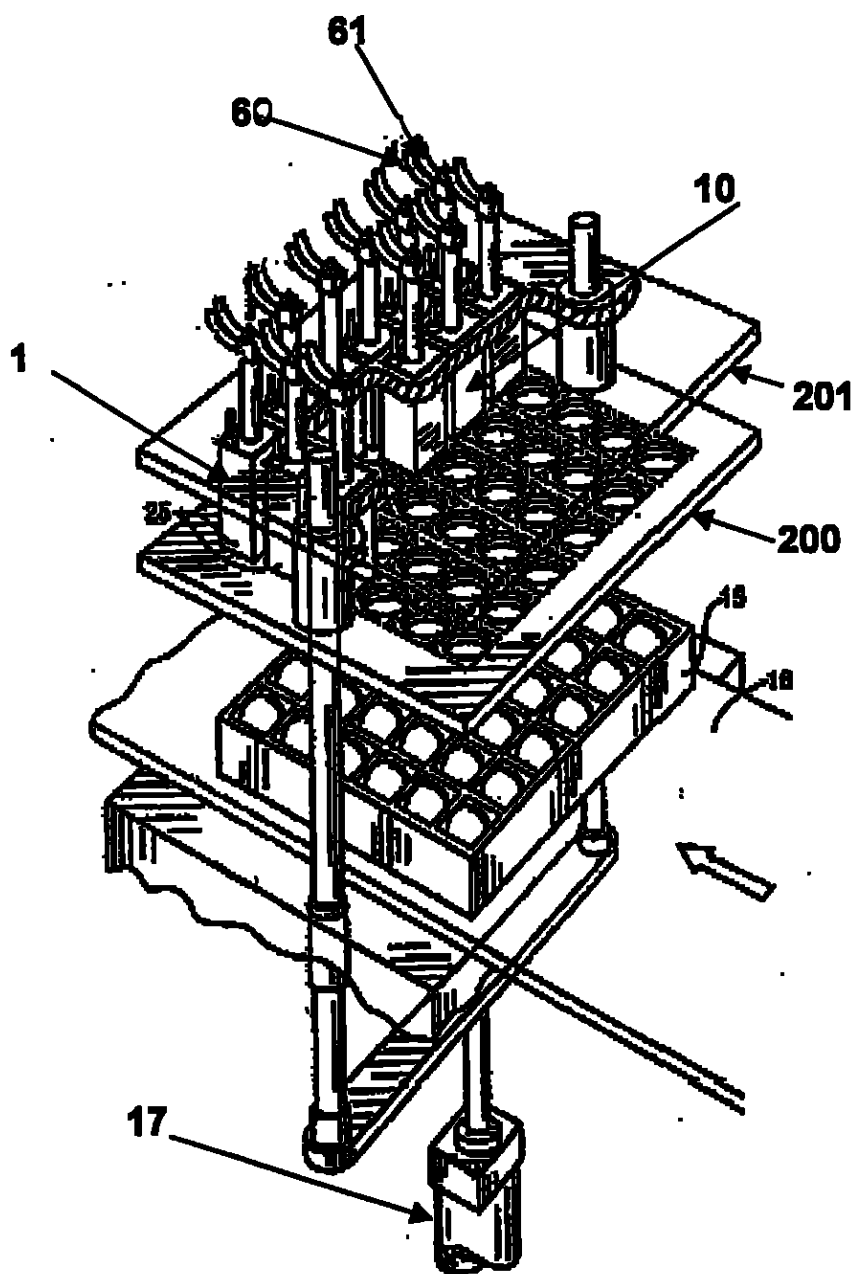


Fig.3F



**Fig. 4**

**Fig. 5**

**Fig. 6**

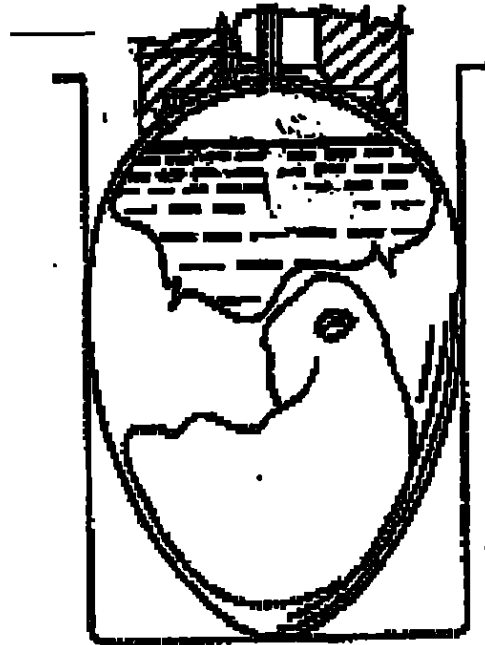


Fig. 7A

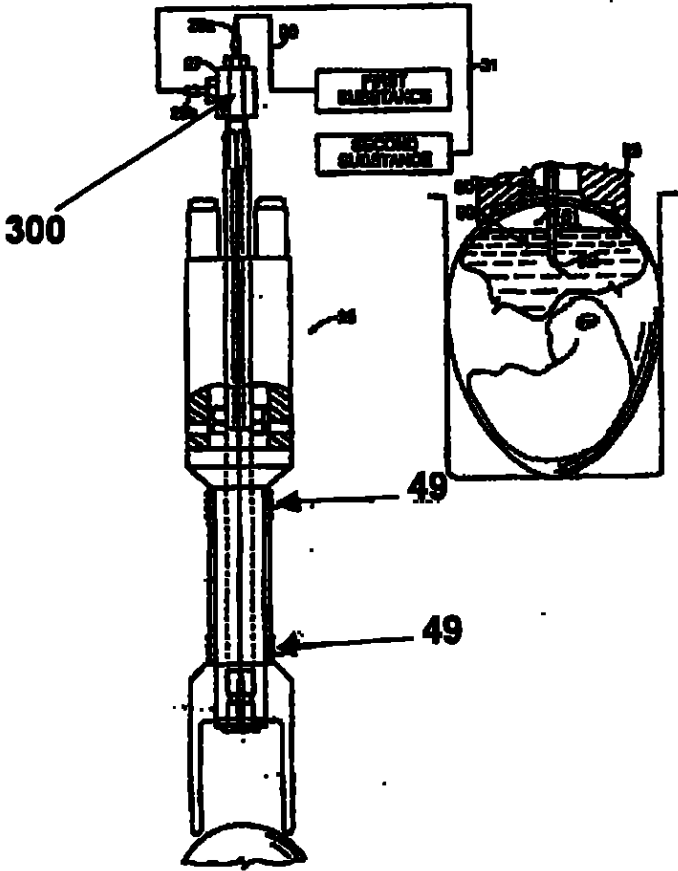


Fig. 7B

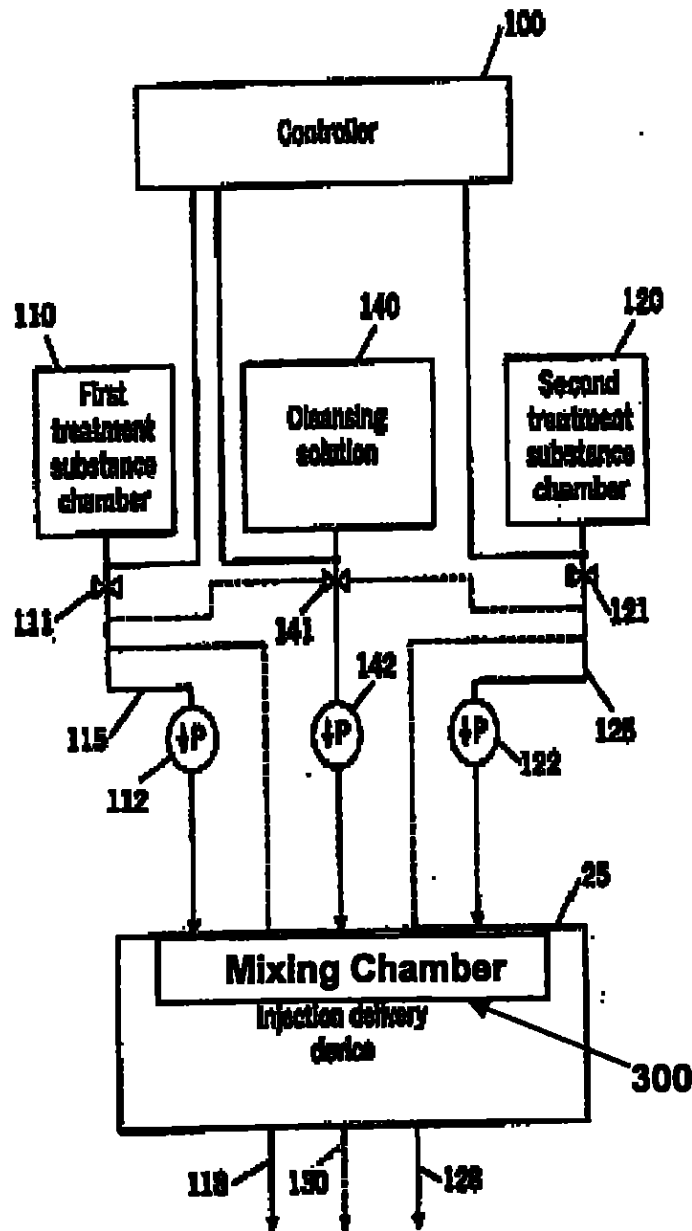


Fig. 8

MÉTODO Y APARATO. PARA LA INYECCIÓN A CHORRO DE HUEVOS DE
AVES

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona al tratamiento
5 de embriones de ave y, más particularmente, se relaciona a
dispositivos de inyección a chorro in ovo y métodos para el
suministro de varias sustancias a huevos de embriones vivos.

Se han empleado inyecciones de varias sustancias
dentro de huevos de ave para disminuir los índices de
10 mortalidad después de la incubación, incrementar los índices
de crecimiento potenciales o el tamaño eventual del polluelo
resultante, e incluso para influenciar la determinación de
género del embrión. De modo similar, se han empleado
inyecciones de antígenos dentro de huevos vivos para incubar
15 varias sustancias utilizadas en la producción de vacunas que
tienen aplicaciones medicinales o de diagnóstico, humanas o
animales. Ejemplos de sustancias que se han propuesto como
posibles alternativas de tratamiento (o material de vacuna
cosechable) para el suministro a través de inyección in ovo
20 de embriones de ave incluyen vacunas de cultivos vivos,
antibióticos, vitaminas e incluso medios de exclusión
competitivos (un organismo vivo de replicación). Ejemplos
específicos de sustancias de tratamiento se describen en la
Patente Norteamericana No. 4,458,630 para *Sharma et al*, y la
25 Patente Norteamericana No. 5,028,421 para *Fredericksen et al*.

Convencionalmente, la inyección física se ha enfocado normalmente a posiciones preferidas dentro del huevo para administrar la sustancia dentro de regiones específicas de desarrollo del embrión. Como se entiende por aquellos de experiencia en la técnica, cuando el periodo de incubación avanza hacia la madurez y la incubación, el embrión y sus membranas, la célula aérea, los alantoides y el saco vitelino cambian según el caso en volumen y posición dentro del cascarón del huevo. Adicionalmente, el volumen cuantitativo de los fluidos adjuntos puede variar. Por ejemplo, la densidad de los alantoides varía durante el periodo de incubación. De este modo, la selección del sitio y tiempo de tratamiento puede impactar la efectividad de la sustancia inyectada así como el índice de mortalidad de los embriones tratados. Véase por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 4,458,630 para *Sharma et al.*, Patente Norteamericana No. 4,681,063 para *Hebrank*, y la Patente Norteamericana No. 5,158,038 para *Sherks et al.*

Los métodos de inyección actuales que dependen del suministro de sustancias al utilizar una aguja de cánula, sin embargo, presenta el riesgo de introducir infección dentro del huevo objetivo y/o dañar el embrión inyectado. Existe todavía una necesidad, por lo tanto, para métodos y aparatos de inyección que pueden suministrar sustancias de tratamiento a embriones de ave, pero los cuales, después de perforar el

cascarón duro externo, no penetran mecánicamente dentro de los contenidos del huevo o el embrión. Existe también una necesidad para métodos y aparatos de inyección de multisitio que tendrán una probabilidad reducida de infectar el huevo
5 objetivo debido a la penetración mecánica dentro de los contenidos del huevo. Existe una necesidad adicional para métodos de inyección automática para tratar múltiples huevos al mismo tiempo o en sucesión rápida y continua sin penetrar mecánicamente dentro del interior del huevo.

10 Se describe un aparato de inyección a chorro *in ovo* y métodos relacionados para tratar huevos vivos. El aparato de inyección a chorro incluye uno o más dispositivos de suministro de inyección a chorro los cuales se configuran para suministrar una o más diferentes sustancias dentro de
15 áreas predeterminadas dentro del huevo por medio de corrientes de alta presión estrechas suministradas a partir de una cabeza inyectora colocada fuera del huevo.

 Los dispositivos y métodos de la invención permiten el uso efectivo de una pluralidad de sustancias de
20 tratamiento que pueden suministrarse de manera que se separan en espacio y/o tiempo, incluyendo aquellas que son efectivas cuando se utilizan solas, pero pueden ser nocivas si se mezclan.

 La presente invención reconoce que existe una
25 necesidad para introducir una o unas sustancias de

tratamiento dentro de un huevo vivo con un mínimo de trauma a éste. La presente invención proporciona por lo tanto métodos y aparatos para la inyección de sustancias dentro de polluelos embrionicos mientras se reduce significativamente el riesgo de daño mecánico a las aves en desarrollo que de otro modo se provocaría al utilizar agujas de inyección. Al evitar el uso de agujas de inyección como se conoce bien en la técnica, los métodos y aparatos de la presente invención pueden reducir sustancialmente la probabilidad de introducir una infección dentro de los polluelos. El aparato y métodos pueden permitir el suministro de sustancias de tratamiento individuales, incluyendo sustancias las cuales son alternativas de tratamiento efectivas cuando se inyectan de modo separado, pero se vuelven nocivas o inestables biológicamente cuando se combinan. De este modo, un objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo de suministro de inyección *in ovo* para suministrar una variedad de sustancias de tratamiento a embriones de ave mientras se minimiza el riesgo de daño o infección al mismo.

Es un objeto de la presente invención introducir, sin mezclar, productos biológicamente incompatibles a embriones *in ovo*.

Es un objeto adicional de la presente invención introducir por separado sin mezclar al menos dos diferentes materiales de tratamiento dentro de diferentes ubicaciones en

el huevo, a través ya sea de una sola o dos trayectorias de suministro separadas.

Es otro objeto de la presente invención introducir al menos dos diferentes sustancias de tratamiento las cuales se suministran de modo separado por una o más separación de tiempo y espacio dentro de una abertura en el cascarón del huevo.

Un primer aspecto de la presente invención, por lo tanto, es un método de inyección a chorro para tratar embriones de ave in ovo. En el método, un huevo de ave se orienta dentro de una posición predeterminada y una abertura pequeña se introduce dentro del cascarón del huevo de ave. Un dispositivo de suministro de inyección a chorro se coloca entonces en relación a la abertura en el cascarón duro de manera que una corriente de alta presión de una sustancia de tratamiento pueda dirigirse a una región deseada del interior del huevo y por consiguiente a los contenidos en la presente.

Otro aspecto de la presente invención incluye un método de inyección a chorro para tratar embriones de ave in ovo que orientan primero un huevo de ave dentro de una posición predeterminada y luego se introduce una primera abertura pequeña dentro del cascarón de un huevo de ave. Adicionalmente, se introduce una segunda abertura pequeña dentro del cascarón del huevo de ave, la segunda abertura que se separa de la primera abertura. Se colocan respectivos de

los primeros y segundos dispositivos de suministro de inyección a chorro sobre primeras y segundas aberturas correspondientes de manera que las corrientes de alta presión de la o las sustancias de tratamiento pueden dirigirse a
5 regiones deseadas del interior del huevo y por consiguiente a los contenidos en la presente. Las dosis predeterminadas de una primera sustancia y una segunda sustancia se liberan a partir de las respectivas de los primeros y segundos dispositivos de suministro de inyección a chorro dentro del
10 huevo. Los dispositivos de suministro se retraen entonces a partir del huevo, tratando por consiguiente el embrión de ave.

Aún otro aspecto de la presente invención incluye un método de inyección múltiple para tratar embriones de ave
15 *in ovo* los cuales orientan un huevo de ave dentro de una posición predeterminada e introduce una abertura pequeña dentro del cascarón de un huevo de ave. Un dispositivo de suministro se coloca durante la abertura de manera que las corrientes de alta presión de la o las sustancias de
20 tratamiento pueden dirigirse a regiones deseadas del interior del huevo, y por consiguiente a los contenidos en la presente. Dosis predeterminadas de una primera sustancia y una segunda sustancia se liberan dentro del huevo y el dispositivo de suministro se retrae a partir del huevo,
25 tratando por consiguiente el embrión del ave. Ventajosamente,

este método combina temporalmente las diferentes sustancias para minimizar la degradación de las sustancias atribuidas a su interacción. De este modo, de preferencia, este método permite a la primera y segunda sustancias almacenarse en
5 cámaras separadas y combina o mezcla temporalmente la primera y segunda sustancias, ya sea con una cámara de mezclado activa, o introduciéndolas dentro de una corriente de alta presión de suministro común, antes del suministro dentro del huevo.

10 Un aspecto adicional de la presente invención se dirige hacia un aparato de inyección a chorro in ovo automatizado para el tratamiento simultáneo o secuencial rápido de una pluralidad de huevos. El aparato comprende un artefacto para mantener una pluralidad de huevos en una
15 posición sustancialmente vertical o alineada. El artefacto se configura para proporcionar acceso externo en áreas predeterminadas de los huevos. El aparato incluye también una pluralidad de dispositivos de suministro de inyección a chorro configurados para poner en contacto áreas
20 predeterminadas de los huevos; al menos uno de los dispositivos de inyección que corresponden a cada huevo en el artefacto.

De preferencia, el aparato de la invención incluye un medio para penetrar el cascarón de huevo para crear una
25 abertura en el cascarón. La abertura tendrá un diámetro

suficiente para permitir el chorro a alta presión que se suministra a partir del orificio de salida del dispositivo de suministro de inyección de chorro que se dirige dentro del interior del huevo sin obstrucción. El aparato comprende
5 además un primer recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una primera sustancia de tratamiento. El primer recipiente está en comunicación de fluido con cada una de la pluralidad de dispositivos de suministro de inyección a chorro. El aparato puede incluir también un segundo
10 recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una segunda sustancia de tratamiento. El segundo recipiente está también en comunicación de fluido con cada una de la pluralidad de dispositivos de inyección a chorro. El primer recipiente y cada una de la pluralidad de dispositivos de
15 inyección a chorro definen una primera trayectoria de fluido entre ellos. De modo similar, el segundo recipiente y cada uno de la pluralidad de dispositivos de suministro de inyección a chorro definen una segunda trayectoria de fluido entre ellos. Una bomba puede asociarse operablemente con el
20 primero y segundo recipientes y las unidades de inyección a chorro para suministrar dosis predeterminadas de cada una de las primera y segunda sustancias de tratamiento a los dispositivos de inyección.

En una modalidad de este aspecto de la invención,
25 el aparato puede comprender una cabeza de suministro de

inyección a chorro que puede mover relativamente al artefacto que mantiene los huevos, de manera que la cabeza inyectora tratará un huevo después de otro. En otra modalidad, existe una pluralidad de cabezas de inyección de manera que una pluralidad en caso de los huevos, tal como una hilera de huevos dispuestos puede tratarse en una sola operación. Un medio para perforar los cascarones de huevos puede proporcionarse también como una sola unidad que precederá la cabeza inyectora o una pluralidad de cabezas cuando las cabezas de inyección avanza de huevo a huevo. En una modalidad, cada cabeza inyectora a chorro se asocia con un medio de perforación del cascarón.

Otro aspecto de la presente invención se dirige también a un aparato de inyección in ovo automatizado. El aparato comprende un artefacto para mantener una pluralidad de huevos en una posición alineada, de manera que el artefacto se configura para proporcionar acceso externo en áreas predeterminadas de los huevos. El aparato incluye una pluralidad de primeros dispositivos de suministro de inyección a chorro y una pluralidad de segundos dispositivos de suministro de inyección a chorro, cada uno configurado para poner en contacto áreas predeterminadas del huevo, uno respectivo de cada una del primero y segundo dispositivos de suministro de inyección que corresponden a un huevo en el artefacto. El dispositivo incluye también primero y segundo

recipientes de sustancia de tratamiento para mantener respectivos primera y segunda sustancias de tratamiento. De preferencia, el aparato incluirá un medio para penetrar el cascarón de huevo para crear una abertura en el cascarón. La
5 abertura en un cascarón duro del huevo tendrá un diámetro suficiente para permitir la corriente de chorro a alta presión que se suministra a partir del orificio de salida del o los dispositivos de suministro de inyección a chorro que se dirige dentro del interior del huevo sin obstrucción. El
10 primer recipiente está en comunicación de fluido con cada uno de los primeros dispositivos de suministro de inyección a chorro y el segundo recipiente está en comunicación de fluido con cada uno de los segundos dispositivos de suministro de inyección a chorro. De este modo, el primer recipiente y cada
15 uno de los primeros recipientes de suministro definen una primera trayectoria de fluido entre estos y el segundo recipiente y cada uno de los segundos recipientes de suministro de inyección definen una segunda trayectoria de fluido entre estos de manera que la primera trayectoria se
20 separa a partir de la segunda trayectoria. Una de la o las bombas pueden asociarse operablemente con el primer y segundo recipientes para suministrar una dosis predeterminada de cada uno de la primera y segunda sustancias de tratamiento para cada uno del primer y segundo dispositivos de inyección
25 respectivos. Similar al aparato anterior, este dispositivo

puede configurarse alternativamente para suministrar diferentes sustancias de tratamiento a diferentes sitios de tratamiento dentro del huevo.

Los huevos tratados por los métodos y aparatos de la presente invención se incuban de preferencia para incubar después de que se administran las sustancias de tratamiento. Más preferiblemente, los huevos tratados se resellan inmediatamente después del tratamiento para evitar la infección de los embriones.

Objetos anteriores y otros objetos y aspectos de la presente invención se explican en detalle en la especificación establecida posteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra un dispositivo de suministro de inyección a chorro sencillo de acuerdo con la invención.

La Figura 2 ilustra un dispositivo de suministro de inyección a chorro múltiple de acuerdo con la invención.

La Figura 3A ilustra una cabeza de dispositivo de suministro de inyección de chorro con un punzón de penetración de huevos tubular unido al mismo.

La Figura 3B ilustra una cabeza de dispositivo de suministro de inyección a chorro con un punzón de penetración de huevos tubular girable unido al mismo.

La Figura 3C ilustra un dispositivo de penetración del cascarón de huevo girable con un extremo dentado.

La Figura 3D ilustra un dispositivo de penetración de coraza de huevo de broca en espiral no coaxial con una corriente líquida de alta presión emitida.

La Figura 3E ilustra una cabeza inyectora a chorro
5 que tiene un sistema de vacío unido para la remoción de desechos del cascarón.

La Figura 3F ilustra una cabeza inyectora a chorro que incorpora un chorro de gas a alta presión para perforar abrasivamente un cascarón duro del huevo objetivo.

10 La Figura 3G ilustra una cabeza inyectora de chorro que comprende un inyector para extraer una sustancia de tratamiento de líquido dentro de una corriente de gas a alta presión.

La Figura 3H ilustra una cabeza inyectora a chorro
15 que comprende dos lúmenes y un solo orificio.

La Figura 4 ilustra una modalidad del aparato de inyección a chorro de acuerdo con la invención, en donde el medio de penetración del cascarón de huevo se asegura al dispositivo de suministro de inyección a chorro.

20 La Figura 5 ilustra una modalidad del aparato de inyección a chorro de acuerdo con la invención en donde el medio de penetración del cascarón de huevo es una unidad separada a partir de la cabeza inyectora a chorro y capaz de ubicar y poner en contacto independientemente un cascarón
25 duro del huevo.

La Figura 6 ilustra una modalidad de un aparato de inyección a chorro automatizado de acuerdo con la presente invención.

La Figura 7A ilustra un dispositivo de suministro
5 de inyección de chorro configurado con un punzón tubular coaxial a la corriente a chorro suministrado en donde el extremo distal se configura para estar en contacto y yacer contra áreas predeterminadas de un cascarón de huevo externo.

La Figura 7B ilustra la posición retrazada de los
10 dispositivos de inyección a chorro que yace a una distancia predeterminada sobre los huevos y la base estacionaria.

La Figura 8 ilustra un diagrama en bloque de una modalidad del aparato de suministro de inyección a chorro automático de acuerdo con la invención.

15 La presente invención se practica con huevos, particularmente huevos de pájaros o aves tales como pollo, pavo, pato, ganso, codorniz, faisán o huevos de avestruz. Los huevos son huevos reales; es decir, huevos que contienen un embrión aviar vivo. Los huevos pueden estar en cualquier
20 etapa de desarrollo embrionario, incluyendo tanto el desarrollo embrionario temprano como el desarrollo embrionario tardío.

La presente invención se describirá ahora más completamente más adelante con referencia a los dibujos
25 anexos, en los cuales una modalidad preferida de la invención

7d

se muestra. Esta invención puede, sin embargo, representarse en muchas diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las modalidades establecidas en la presente. Más bien, estas modalidades se proporcionan de manera que esta
5 descripción será meticulosa y completa y transmitirá completamente el alcance de la invención a aquellos expertos en la técnica. En los dibujos, números similares se refieren a elementos similares del todo.

La presente invención proporciona un aparato para
10 el suministro de inyección a chorro de sustancias de tratamiento a los contenidos de un huevo. Al haber perforado el cascarón duro de un huevo de ave, se suministra la sustancia de tratamiento como una corriente de alta presión, estrecha que es capaz de penetrar las membranas y tejidos del
15 embrión y sus tejidos asociados. El uso de una corriente líquida de alta presión evita el uso de agujas de inyección que pueden provocar daño mecánico al embrión de desarrollo, algunas veces con resultados fatales. Debido al contacto físico de las agujas con los contenidos del huevo, existe
20 también una posibilidad de contaminación cruzada de un lote de huevos. La inyección a chorro evita la transferencia mecánica del material infeccioso entre los huevos objetivo.

El aparato 1 de inyección a chorro de la presente invención pueden emplear un dispositivo 10 de suministro de
25 inyección a chorro sencillo (Figura 1) o múltiples (Figura 2)

dispositivos 10 de suministro de inyección a chorro que suministran una o más sustancias de tratamiento dentro de los huevos objetivo. En sí, el aparato se configura de preferencia para introducir automáticamente (en una o más 5 secuencias separadas en espacio y tiempo) una o múltiples sustancias de tratamiento dentro de un huevo 20 vivo con un mínimo de trauma al mismo, y más preferiblemente dentro de una pluralidad de huevos. Ventajosamente, este aparato puede suministrar sustancias que son alternativas de tratamiento 10 efectivas cuando se inyectan por separado pero las cuales se vuelven menos efectivas o biológicamente nocivas cuando se combinan.

Para los métodos y aparatos de la presente invención, es necesario que el cascarón duro de un huevo de 15 ave objetivo pueda abrirse, o perforarse, para permitir un dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro para suministrar a una corriente 43 de alta presión sin impedimentos de una sustancia de tratamiento a partir de un orificio 30 directamente dentro del interior del huevo 20, 20 pero sin el dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro mismo que penetra dentro del interior del huevo. Se contempla, por lo tanto que los métodos y el aparato emplearán un medio 40 para penetrar un cascarón duro del huevo. Un medio 40 de penetración del cascarón de huevo 25 seleccionado puede ser un componente integral del dispositivo

10 de suministro de inyección o, alternativamente, una unidad separada que hará un agujero en el cascarón del huevo antes de que se coloque un dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro para suministrar una corriente de alta
5 presión de una sustancia de tratamiento al interior del huevo. El medio 40 de penetración de huevos puede ser cualquier dispositivo y método que puede penetrar el cascarón duro del huevo, de preferencia sin provocar agrietamiento notable del cascarón que rodea un orificio. Más
10 preferiblemente, el medio 40 de penetración generará una abertura circular. Una abertura preferida en el cascarón, sin embargo, es de suficiente área y dimensiones de manera que una corriente 43 de presión alta de sustancia de tratamiento inyectado pueda penetrar el huevo a través de la abertura sin
15 que se obstruya, la cual disminuirá de otro modo la dosis administrada terminada o desviar la corriente a partir de su trayectoria y área objetivo pretendida de tratamiento.

Una variedad de medios 40 de penetración del cascarón de huevo puede incorporarse útilmente dentro del
20 aparato, incluyendo, pero sin limitarse a una broca girable, una broca de molienda, una sierra girable, un punzón perforador y una corriente abrasiva de gas o fluido de alta presión o una combinación de las mismas. Por ejemplo, una modalidad del medio 40 de penetración es un punzón tubular
25 que tiene un lumen 41 definido por la pared 48 interior del

punzón y el cual puede colocarse en el extremo de suministro de un dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro como se muestra en la Figura 3A. El diámetro interno del lumen 41 puede ser el mismo o mayor (como se muestra por ejemplo en la 5 Figura 3A) que el diámetro del orificio 30 a partir del cual la corriente 43 de chorro de alta presión sale del dispositivo 10 de suministro. Una corriente 43 de sustancia de tratamiento de alta presión puede expulsarse a través de una salida de un orificio 30 del dispositivo 10 de suministro 10 de inyección a chorro y pasa en la dirección del eje longitudinal del lumen 41 pero sin tocar la pared 48 interior del mismo, y por consiguiente dentro de un huevo objetivo, como se muestra en las Figuras 3A y 3B. El extremo 45 distal del punzón 40 tubular puede configurarse como un bisel 42 que 15 tiene un extremo 47 afilado que facilita la penetración del cascarón. El cascarón del huevo será penetrado al poner en contacto el cascarón de huevo con el extremo 45 distal del punzón 40. Un movimiento recíproco del dispositivo de suministro de inyección a chorro en relación con el huevo 20 conducirá el punzón 40 a través del cascarón de huevo. Ya que la penetración del cascarón por este medio podría arrastrar fragmentos del cascarón dentro del interior del huevo, la superficie externa del cascarón puede desinfectarse antes de la perforación para evitar o reducir la posibilidad de 25 introducir material infeccioso al embrión de polluelos en

desarrollo.

En una modalidad de la invención, un punzón 40 puede unirse operablemente a un resorte que forzará el punzón para penetrar a través del cascarón mientras que el
5 dispositivo de suministro de inyección está en una distancia constante a partir de la superficie del cascarón. En otra modalidad, el punzón 40 puede conectarse de modo operable a un ariete 50 hidráulico para conducir el punzón 40 a través del cascarón y replegar el punzón para el re-uso con otro
10 huevo.

En una modalidad alternativa de la invención, el punzón 40 tubular se monta girablemente en el dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro para facilitar la penetración del cascarón duro del huevo en la manera de un
15 taladro como se muestra por ejemplo, en la Figura 3B. Un medio para hacer girar el punzón 40 tubular tal como, pero sin limitarse a un motor 44 eléctrico o hidráulico se conecta operablemente al punzón 40. En esta modalidad de la invención, el extremo 45 distal de un punzón 40 tubular
20 giratorio puede configurarse de distinto modo para penetrar el cascarón de huevo sin aplicar una fuerza vertical que podría agrietar excesivamente o estrellar el cascarón. Por ejemplo, el extremo 45 distal puede dentarse, como se ilustra en la Figura 3C, y/o recubrirse con un abrasivo, que molerá
25 progresivamente el material del cascarón. En otras

modalidades de la invención, el medio 40 de penetración del cascarón de huevo es una broca 49 en espiral tal como se muestra en la Figura 3D, o una broca de molienda. La punta de la broca en espiral puede adaptarse también como una
5 superficie de molienda que muele un orificio en el cascarón del huevo.

En una modalidad de la invención, el medio 40 de penetración, ya sea coaxial a la corriente de inyección a chorro o como una unidad separada, es un medio para el
10 suministro de un gas de alta presión que contiene un material abrasivo para moler el cascarón de huevo en un sitio objetivo, como se ilustra en la Figura 3F. En una modalidad, el chorro abrasivo a alta presión se dirigirá a partir del orificio 30 del dispositivo 10 de suministro de inyección a
15 chorro.

Para incrementar la velocidad de molienda del cascarón del huevo por un dispositivo mecánico tal como una broca o un chorro de gas de alta presión, un lubricante líquido puede dirigirse al punto de penetración. De
20 preferencia, el líquido será estéril y puede incluir un desinfectante para limpiar el sitio de penetración del material potencialmente infeccioso. El dispositivo 40 de penetración puede comprender además un medio para remover polvo del cascarón de huevos generado por la operación de
25 perforación, tal como un sistema 46 de presión o vacío bajo,

como se muestra, por ejemplo en la Figura 3E.

En algunas modalidades de la invención, el medio 40 de penetración del cascarón de huevo puede no ser coaxial con la corriente 43 de alta presión a partir del dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro. El medio 40 de penetración del cascarón de huevo puede unirse de manera rígida al dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro, como se muestra por ejemplo en la Figura 4, o es una unidad separada a partir de la cabeza inyectora a chorro como se ilustra, por ejemplo, en la Figura 5. En cualquiera de las modalidades en donde el medio 40 de penetración del cascarón de huevo, no es coaxial con la corriente de inyección a chorro, la penetración del cascarón será normalmente al menos una operación de dos etapas. En la primera etapa, el medio 40 de penetración se coloca en el punto de entrada deseado del cascarón de huevo y el orificio se forma accionando el dispositivo 40 de penetración. En una segunda etapa, el dispositivo 40 de penetración se desplaza a partir de la cercanía del orificio recién hecho en el cascarón y el dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro se coloca con relación al orificio de manera que una corriente 43 de sustancia de alta presión a partir del dispositivo 10 de suministro de inyección puede pasar sin impedimentos a través del orificio y dentro del huevo 20. Se contempla además que si el medio 40 de penetración del cascarón de huevo no es

coaxial con la corriente 43 de alta presión a partir del dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro, puede proporcionarse un medio 51 que detecta exactamente el orificio en el cascarón y para colocar el dispositivo 10 de
5 suministro de inyección a chorro, de manera que se suministra la corriente 43 de alta presión dentro del huevo. En un ejemplo, un medio óptico tal como una cámara o haz de láser reflejado puede utilizarse para detectar el orificio y regular el movimiento del dispositivo de inyección a chorro
10 con relación a éste. La colocación exacta de la corriente 43 de alta presión puede conseguirse también diseñando y moviendo exactamente el dispositivo 40 de perforación y el dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro a partir de una primera posición de perforación a la segunda posición
15 de inyección a chorro.

El dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro adecuado para uso en la presente invención puede ser un solo dispositivo de suministro de inyección tal como por ejemplo, se describe en la Patente Norteamericana No. de
20 Serie 6,585,685 para *Staylor et al.* De preferencia, sin embargo, el dispositivo de inyección es un inyector a chorro de múltiples inyecciones en donde la o las sustancias de tratamiento se alimentan a la cabeza inyectora a partir de un depósito. Tal dispositivo de suministro de inyector a chorro
25 es más adecuado para la incorporación dentro de un sistema

inyector a chorro automático en donde una pluralidad de huevos va a inyectarse. En aquellas modalidades del aparato 1 en donde existe una pluralidad de dispositivos 10 de suministro de inyección a chorro para el tratamiento de series de huevos 20, las sustancias de tratamiento pueden suministrarse a los dispositivos 10 inyectores a chorro a partir de una cámara de depósito sencilla a través de tubos de alimentación que conducen a cada dispositivo, o cada dispositivo 10 de suministro de inyector a chorro, 10 individualmente o como una unidad combinada sencilla, pueden conectarse operablemente a su propio depósito.

Las sustancias de tratamiento pueden administrarse a un huevo como un bolo en la misma o diferente forma física. El bolo de la sustancia de tratamiento puede administrarse 15 dentro de cualquier compartimiento adecuado del huevo, incluyendo intraperitoneal, intramuscular o subcutáneamente dentro del embrión, dentro del saco vitelino o tallo, dentro del hígado o pulmones del embrión, dentro de la célula aérea, el saco alantoico, o el fluido amniótico, etc. En algunos 20 casos, puede ser deseable administrar dos diferentes sustancias dentro de diferentes ubicaciones dentro del mismo compartimiento (por ejemplo, intraperitoneal o intramuscularmente, o incluso dentro del fluido amniótico para absorber rápidamente, aunque por otro lado sustancias de 25 tratamiento incompatibles). Además, puede ser deseables en

algunos casos para las primeras y segundas sustancias de tratamiento que son las mismas, administrarse simplemente en diferentes ubicaciones dentro del huevo. Las sustancias de tratamiento que pueden administrarse incluyen, pero no se
5 limitan a, vacunas, hormonas, agentes de promoción de crecimiento, etc.

Con referencia ahora a los dibujos, la Figura 6 ilustra una modalidad de un aparato 1 de inyección a chorro automatizado de acuerdo a la presente invención. Como se
10 muestra en la Figura 6, el aparato 1 incluye una superficie 15 plana, una base 16 estacionaria, y una pluralidad de dispositivos 10 de suministro de inyección a chorro. La superficie 15 plana mantiene una pluralidad de huevos 20 en una posición vertical y alineada sustancialmente. La
15 superficie 15 plana se configura para proporcionar acceso externo en áreas predeterminadas de los huevos 20. El huevo 20 se mantiene por la superficie 15 plana de manera que un huevo respectivo está en alineación apropiada con relación a una correspondiente de los dispositivos 10 de suministro de
20 inyección a chorro cuando el dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro avanza hacia la base 17 del aparato.

Cada una de la pluralidad de dispositivos 10 de suministro de inyección a chorro tiene un extremo 45 distal. Los dispositivos 10 de inyección a chorro pueden tener una
25 primera posición 200 extendida y una segunda posición 201

retraída como se muestra en la Figura 7B. El dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro puede configurarse con un medio 40 de penetración del cascarón de huevo tubular coaxial a la corriente 43 de chorro suministrada, en la extensión del
5 dispositivo 10 de inyección a chorro, el extremo 45 distal se configura al poner en contacto y reposar contra áreas predeterminadas del cascarón de huevo externo. Como se muestra en la Figura 7B, cuando no se inyecta, los dispositivos 10 de suministro de inyección a chorro pueden
10 replegarse para reposar una distancia 201 predeterminada sobre los huevos 20 y la base 15 estacionaria.

El dispositivo 1 de inyección a chorro automatizado puede ser movable horizontalmente con relación a la base 16 estacionaria de manera que se coloca la superficie 15 plana
15 de la antera debajo de la pluralidad de los dispositivos 10 de suministro de inyección a chorro. Alternativamente, la base 16 puede ser deslizablemente movable de modo longitudinal para colocar los huevos en posición apropiada con relación al dispositivo 10 de suministro de inyección
20 (como se indica por la flecha en la Figura 6). Para facilidad de discusión, la descripción describe una unidad con un dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro sencillo (mostrado como un dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro superior) pero la descripción también se aplica a un
25 aparato con múltiples dispositivos 10 de suministro de

inyección a chorro, como se muestra en la Figura 6, o alternativamente, uno o más dispositivos de fondo o laterales sencillos.

En las modalidades mostradas en la Figura 7A y 7B, un dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro *in ovo* para suministrar compuestos dentro de un huevo comprende un miembro 50 de cuerpo y un dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro. El dispositivo incluye un miembro de ubicación de huevo, o un miembro 25 de enganche de huevo, conectado a la porción extrema base del miembro de cuerpo, la cual como se ilustra se conecta deslizablemente al miembro de cuerpo e incluye un resorte 49 para amortiguar el acoplamiento y mantener el huevo en el lugar durante la penetración del cascarón y la inyección a chorro de una sustancia de tratamiento.

Se contempla que el aparato tendrá un medio 40 de penetración del cascarón de huevo. Puede haber una pluralidad de unidades, cada una de las cuales es integral con un dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro y por consiguiente se moverá dentro de la posición con el huevo objetivo junto con el dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro. En otras modalidades del aparato, un o una pluralidad de medios 40 de penetración de huevo no son integrales con los dispositivos 10 de suministro de inyección a chorro y se colocan independientemente sobre un punto

9/11
dl

seleccionado en el o los huevos objetivo, perforan los cascarones de huevo y se desplazan entonces a partir de los huevos, por lo que se permite a los dispositivos 10 de suministro de inyección a chorro que se colocan para dirigir la o las corrientes de sustancia de tratamiento de alta presión dentro del o los huevos.

Como se muestra por el diagrama en bloque en la Figura 8, una modalidad del aparato 10 de suministro de inyección de chorro automático incluye un controlador 100 principal, una primera y segunda cámaras 110, 120 de sustancia de tratamiento, válvulas 111, 121 asociadas y uno o más medio de conducción tales como bombas 112, 122 asociadas operablemente con las cámaras de sustancia para suministrar cantidades apropiadas de sustancias de tratamiento al dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro a través de una cámara 150 de mezclado opcional. Aunque el aparato 10 se ilustra como teniendo un medio de conducción separado para cada cámara 110, 120 de fluido o de tratamiento, se apreciará por alguien de experiencia en la técnica que la invención no se limita a la misma. Efectivamente, una bomba eléctrica o neumática o hidráulica sencilla puede conectarse a las cámaras de sustancia para suministrar cada sustancia de tratamiento a los puertos de entrada en el dispositivo de suministro de inyección a chorro. El aparato 1 incorpora uno o más medios de presurización que, cuando se accionan,

suministrarán dosis precisas de sustancias de tratamiento a partir de los dispositivos 10 de suministro de inyección a chorro para expulsión de gas de alta presión a través del orificio 30 de salida (como se muestra en las Figuras 3A-3F) como una corriente 43 de alta presión y finalmente al huevo.

Opcionalmente, como se ilustra por las trayectorias de línea punteadas en la Figura 8, el aparato 10 puede configurarse para almacenar de modo separado las sustancias de tratamiento en las cámaras 110, 120 respectivas y luego canalizarlas a través de una cámara 300 de mezclado como se muestra en la Figura 7B) o a través de un lumen sencillo para suministro a chorro dentro del huevo como en la Figura 3H. Una válvula, controlada por el controlador, se requiere para reemplazar alternativamente desde una fuente de fluido de tratamiento a la otra. La sustitución puede regularse con la colocación del orificio 30 de inyección a chorro y la presión del chorro se ajusta de manera que diferentes fluidos se inyectan en diferentes compartimientos dentro del huevo. Diferentes sustancias de tratamiento pueden proporcionarse cada una en forma líquida, gaseosa o en aerosol, o cualquier otra forma adecuada, siempre y cuando las sustancias se separen sustancialmente entre sí (por ejemplo, las sustancias de tratamiento líquido separadas por una burbuja de gas intermedio) de manera que diferentes sustancias de tratamiento se coloca en diferentes compartimientos.

También de preferencia, como se muestra en la Figura 8, el aparato 10 puede incluir una cámara 140 de solución de limpieza asociada operablemente con el controlador 100 y conectar a un tubo que está en comunicación de fluido con cada uno de los canales 115, 125 de suministro de sustancia separados corriente arriba del orificio 30 de salida del dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro así como una o más trayectorias 118, 128 (130) de suministro de fluido o de sustancia en el dispositivo de inyección a chorro mismo 10. Esto permitirá a las trayectorias 118, 128 (130) de suministro que se enjuaga con un fluido de descontaminación para mantener un nivel preferido de esterilidad en el aparato de manera que se reduce la probabilidad de crecimiento de contaminantes indeseados en las trayectorias de suministro que ayuda a mantener el aparato en una condición de rendimiento óptimo. Puede utilizarse cualquier solución de limpieza convencional, con soluciones de limpieza de cloro preferidas.

En operación, en una modalidad de la presente invención, un controlador 100 (como se muestra en la Figura 8) dirige la abertura de las válvulas 111, 121 para liberar las dosis predeterminadas de la sustancia de tratamiento dentro de los segundos tubos 60, 61 mostrados en la Figura 6. Los medios o bombas 112, 122 de conducción asociados fuerzan a las sustancias dentro las trayectorias 115, 125 de

suministro (tal como a través de la tubería 60, 61) en comunicación de fluido con orificios 30 de salida del dispositivo de suministro de inyección a chorro a través de los puertos de entrada 28a, 28b en los mismos. Las sustancias
5 de tratamiento se fuerzan entonces fuera del orificio 30 de salida por la aplicación de un gas de alta presión al líquido, por lo que se forma un chorro de alta presión enfocados en los contenidos de un huevo. En una modalidad del dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro, la cabeza
10 inyectora comprende un inyector, en donde el paso del gas de alta presión a través del inyector, genera una presión baja que extrae una sustancia de tratamiento líquido dentro de la corriente de gas como se ilustra por ejemplo, en la Figura 3G.

15 El dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro se configura para liberar una dosis predeterminada de la o las sustancias de tratamiento dentro de sitios predeterminados, tales como sobre o debajo de la célula aérea y dentro de la placenta del embrión de aves o dentro de los
20 tejidos del embrión mismo (como se discutirá en mayor detalle posteriormente). El dispositivo de suministro de inyección a chorro se retrae entonces y puede enjuagarse antes de que la siguiente superficie plana de los huevos se adelante.

Un dispositivo 10 de suministro de inyección puede
25 tener una cabeza de boquilla con dos lúmenes que terminan

dentro de un orificio sencillo como se muestra en la Figura 3G. Esta configuración mantiene las sustancias apartadas de una mayor porción de la trayectoria de suministro de sustancia pero les permite mezclarse en el sitio de inyección a chorro. Se observa que en donde dos (o más) orificios se hacen en el cascarón del huevo, particularmente en una configuración que provocaría a los contenidos del cascarón drenarse desde el huevo, entonces al menos uno de los orificios (de preferencia el orificio inferior) debe sellarse, de acuerdo con técnicas conocidas para evitar el drenado del huevo. Métodos adecuados para sellar un cascarón de huevo perforado incluyen, pero no se limitan a, sellar con adhesivo caliente, cubriendo el orificio con una cinta de sellado, aplicando un adhesivo frío tal como adhesivo blanco o un adhesivo con base en cianoacrilato, traslapando el orificio con un fragmento del cascarón del huevo y asegurando al mismo o por cualquier otro medio adecuado conocido por alguien familiarizado con métodos para sellar huevos que permiten el desarrollo del embrión en la presente.

El uso del dispositivo 10 de suministro de inyección a chorro y métodos de la invención se prefieren sobre métodos y aparatos de inyección actualmente utilizados que reducen el riesgo de que el saco vitelino se fugue. Una ventaja de los métodos de inyección a chorro de la invención es que el orificio requerido para permitir el acceso al

interior del huevo puede ser suficientemente pequeño para retener la yema en el cascarón del huevo. El aparato de la presente invención puede emplear también un dispositivo 10 de inyección a chorro colocado para dirigir la corriente de chorro de alta presión en un lado o en el fondo de un huevo. Uno o más de estos dispositivos 10 de inyección a chorro alternativos pueden utilizarse al mismo tiempo con un dispositivo de inyección a chorro superior o subsecuente o antes de tiempo. Por supuesto, la superficie plana debe alterarse para proporcionar acceso a la parte apropiada del cascarón de huevo. Cuando se inyecta a partir del fondo, se prefiere colocar el dispositivo de inyección de fondo opuesto al dispositivo de suministro de inyección a chorro superior.

Los métodos y aparatos de la invención son particularmente útiles para suministrar sustancias de tratamiento tales como, pero sin limitarse a vacuna de la enfermedad de Newcastle y vacuna de enfermedad de Marek. Se administra de preferencia la vacuna de enfermedad de Marek dentro de la región definida por la placenta; se administra de preferencia la vacuna de la enfermedad de Newcastle dentro de la célula aérea. El efecto protector producido a embriones de polluelos inyectados a chorro tratados con las vacunas se muestra en el Ejemplo 3 posteriormente.

Un "ácido nucleico" se refiere a la forma polimérica del éster de fosfato de ribonucleósidos

(adenosina, guanosina, piridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxirubonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiadenosina, desoxitimidina o desoxicitidina; "moléculas de ADN") en cualquier forma de una sola hebra, o una hélice de doble hebra. Son posibles hélices de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN de doble hebra. El término molécula de ácido nucleico, y en particular la molécula de ADN o ARN, se refiere solamente a estructuras primarias y secundarias de la molécula, y no se limitan a ningunas formas terciarias particulares. De este modo, este término incluye ADN de doble hebra encontrado inter alia, en moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo, fragmentos de restricción), plásmidos y cromosomas. Al abordar la estructura de moléculas de ADN de doble hebra particulares, pueden describirse secuencias en la presente de acuerdo a la convención normal al dar sólo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (es decir, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm).

Como se define en la presente, un ácido nucleico "aislado" o "sustancialmente puro" (por ejemplo, un ARN, ADN o un polímero mezclado) es aquel el cual se separa sustancialmente de otros componentes celulares los cuales acompañan naturalmente una secuencia o proteína humana nativa, por ejemplo, ribosomas, polimerasas, muchas otras secuencias y proteínas de genoma humano. El término abarca

una secuencia o proteína de ácido nucleico que se ha removido a partir de su ambiente de origen natural, e incluye aislados de ADN recombinante o clonado y sintetiza químicamente análogos o análogos bioquímicamente sintetizados por sistemas
5 heterólogos.

El término "vector" se refiere a sistemas de expresión viral, ADN circular de auto-replicación autónomo, plásmido e incluye tanto plásmidos de expresión como sin expresión. En donde un microorganismo recombinante o cultivo
10 celular se describe como alojando un "vector de expresión", este incluye tanto ADN circular extracromosomal como ADN que se ha incorporado dentro del o los cromosomas del huésped. En donde una célula huésped está manteniendo un vector, el vector puede replicarse ya sea establemente por las células
15 durante la mitosis como una estructura autónoma, o se incorpora dentro del genoma del huésped. Los vectores que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, pcADN3.1(+) y pcADN3.1(-) (comercialmente disponibles de Invitrogen).

El término "plásmido" se refiere a una molécula de
20 ADN circular autónoma capaz de replicación en una célula, e incluye ambos tipos de expresión y no expresión. En donde un microorganismo recombinante o cultivo celular se describe como alojando un "plásmido de expresión", este incluye ADN viral latente integrado dentro del o los cromosomas del
25 huésped. En donde un plásmido está siendo mantenido por una

91

célula huésped, el plásmido se replica ya sea establemente por las células durante la mitosis como una estructura autónoma o se incorpora dentro del genoma del huésped. El plásmido o vector como se contempla en la presente comprende una secuencia líder la cual se conoce por aquellos expertos en la técnica.

Este vector o plásmido puede comprender también además un segundo ácido nucleico aislado que codifica un marcador seleccionable y/o un polipéptido. Para propósitos de esta invención, un "polipéptido que es un marcador detectable" incluye, pero no se limita a: la forma dimérica, trimérica y tetramérica del polipéptido. La E. coli β -galactosidasa es un tetramero compuesto de cuatro polipéptidos o sub-unidades monoméricas.

La presente invención es particularmente útil para suministrar vacunas de ADN a un embrión de aves en desarrollo y en particular para suministrar la construcción del vector de vacunas al músculo la pechuga del embrión para expresión en la presente del antígeno objetivo. Se describen vacunas de ADN en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,589,466 y 5,973,972 y las solicitudes publicadas de PCT PCT/US90/01515, PCT/US93/02338, PCT/US93/048131 y PCT/US94/00899, y las solicitudes de prioridad citadas en la presente, las cuales se incorporan en la presente para referencia. Además, los artículos revisados citados anteriormente describen

tecnología de vacunas de ADN y ejemplos citados de vacunas de ADN. Las vacunas dirigidas a aves de corral ejemplares incluyen aquellos objetivos a tales enfermedades como, pero sin limitarse a enfermedad de Marek, IBVD, enfermedad 5 Infecciosa Bursal, infección coccidial, virus de Enfermedad de Newcastle o ILT. En cada caso, el plásmido o ADN viral pueden suministrarse a células de un individuo el cual utiliza el ADN de construcción y expresa proteínas objetivo inmunogénicas codificadas por los vectores. La respuesta 10 inmune generada contra la proteína objetivo inmunogénica proporciona un beneficio profiláctico o terapéutico al individuo vacunado.

De acuerdo a la presente invención, la secuencia de codificación en el vector que codifica la proteína objetivo 15 inmunogénica se proporciona con una secuencia de codificación que codifica una secuencia de aminoácido cuya presencia en la proteína resulta en una localización intracelular específica de la proteína expresada. Las secuencias de nucleótido que codifican secuencias de aminoácido las cuales dirigen el 20 tráfico de proteínas intracelulares y las cuales se incluyen en las secuencias de codificación de proteínas inmunogénicas que se incluyen en construcciones vector utilizadas como composiciones de vacunas de ADN dirigen la localización en áreas específicas en las células las cuales resultan en el 25 mejoramiento de respuestas inmunes específicas.

Como se utiliza en la presente, el término "construcción genética" quiere decir que se refiere a plásmidos o virus modificados los cuales comprenden secuencias de codificación que codifican una proteína
5 objetivo inmunogénica y una secuencia de aminoácido que dirige el tráfico de proteínas intracelulares, las secuencias de codificación se enlazan operablemente a elementos reguladores requeridos para la expresión de las secuencias de codificación en células eucarióticas. Los elementos
10 reguladores de la expresión de ADN incluyen un promotor y una señal de poliadenilación. Además, otros elementos, tales como región de Kozak, pueden incluirse también en la construcción genética. Las señales de iniciación y de terminación son elementos regulatorios requeridos que se consideran con
15 frecuencia parte de la secuencia de codificación. Las secuencias de codificación de las construcciones genéticas de la invención incluyen señales de iniciación y de terminación funcional.

Como se utiliza en la presente, el término
20 "proteína objetivo inmunogénica" quiere decir que se refiere a un antígeno que es un objetivo para una respuesta inmune la cual se dirige a proteínas asociadas con condiciones, infecciones, enfermedades o trastornos tales como alergenicos, antígenos patógenos, antígenos asociados con células
25 cancerígenas o células implicadas en enfermedades

autoinmunes. El antígeno objetivo inmunogénico se codifica por la secuencia de codificación de una construcción genética utilizada en una vacuna de ADN. Se administra la vacuna de ADN al individuo vacunado, la construcción genética se
5 incorpora mediante las células del individuo, la secuencia de codificación se expresa y la proteína objetivo inmunogénica se produce. La proteína objetivo inmunogénica induce una respuesta inmune contra la proteína objetivo inmunogénica en el individuo. La respuesta inmune se dirige contra proteínas
10 asociadas con condiciones, infecciones, enfermedades o trastornos tales como alérgenos, antígenos patógenos, antígenos asociados con células cancerígenas o células implicadas en enfermedades autoinmunes. De este modo, el individuo vacunado puede inmunizarse profiláctica o
15 terapéuticamente para evitar o tratar condiciones, infecciones, enfermedades o trastornos. La proteína objetivo inmunogénica se refiere a péptidos y proteínas codificadas por construcciones genéticas de la presente invención que actúan como proteínas objetivo para una respuesta inmune. El término
20 "proteína objetivo inmunogénica" se refiere a una proteína contra la cual puede producirse una respuesta inmune. La proteína objetivo inmunogénica comparte al menos un epítipo con una proteína a partir del alérgeno, patógeno o proteína indeseable o tipo de célula tal como una célula cancerígena o
25 célula implicada en una enfermedad autoinmune contra la cual

se requiere inmunización. La respuesta inmune dirigida contra la proteína objetivo inmunogénica protegerá al individuo contra y tratará al individuo de infección o enfermedad específica con la cual la proteína a partir del alérgeno, patógeno o proteína indeseable o tipo de célula se asocia. La proteína objetivo inmunogénica no necesita ser idéntica a la proteína contra la cual se desea una respuesta inmune. Más bien, la proteína objetivo inmunogénica debe ser capaz de inducir una respuesta inmune que reacciona contrario a la proteína contra la cual se desea la respuesta inmune.

Además, el ácido nucleico el cual codifica un polipéptido se selecciona a partir de un grupo que consiste de una: citoquina, virus gE de rinotraqueitis bovina infecciosa, proteína de unión de virus sincitial respiratorio de bovino (BRSV G), proteína de fusión del virus sincitial respiratorio de bovino (BRSV F), proteína de nucleocápside del virus sincitial respiratorio de bovino (BRSV N), proteína de fusión del virus de parainfluenza bovina del tipo 3, y hemaglutinina neuraminidasa del virus de parainfluenza bovina del tipo 3, glicoproteína B del virus de la enfermedad de marek, glicoproteína D del virus de enfermedad de marek, hemaglutinina del virus de enfermedad de newcastle, neuraminidasa del virus de enfermedad de newcastle, fusión del virus de la enfermedad de newcastle, virus VP1 de enfermedad bursal infecciosa, virus VP2 de enfermedad bursal

infecciosa, virus VP3 de la enfermedad bursal infecciosa, virus VP4 de enfermedad bursal infecciosa, virus VP5 de enfermedad bursal infecciosa, poliproteína del virus de enfermedad bursal infecciosa, protección del virus de
5 bronquitis infecciosa, matriz de virus de bronquitis infecciosa y virus de anemia de polluelos.

Tales pueden derivarse o ser derivables del virus de encefalomiелitis aviar, reovirus aviar, paramixovirus aviar, virus de influenza aviar, adenovirus aviar, virus de
10 la viruela aviar, coronavirus aviar, rotavirus aviar, agente de anemia de polluelos, Salmonella spp., E. coli, Pasteurella spp., Bordetella spp. Eimeria spp. Histomonas spp., Tricomonas spp., nemátodos de aves de corral, cestodos, tremátodos, acáridos/piojos de aves de corral, protozoarios
15 de aves de corral.

Como se contempla en la presente, las citoquinas incluyen, pero no se limitan a lo siguiente: factor de crecimiento miclomonoцítico de pollos (cMGF) o interferón de pollos (cIFN), factor beta de crecimiento de transformación,
20 familia del factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de fibroblasto, factor de crecimiento de hepatocito, factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento endotelial vascular, interleucina 1, agonistas del receptor IL-1, interleucina-2, interleucina-3,
25 interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, receptor

soluble a IL-6, interleucina-7, interleucina-8, interleucina-9, interleucina-10, interleucina-11, interleucina 12, interleucina 13, angiogenina, quimioquinas, factores que estimulan la colonia, factores que estimulan la colonia de
5 granulocitos-macrófagos, eritropoyetina, interferón, virus VP3 de enfermedad bursal infecciosa Inter., virus VP3 de enfermedad bursal infecciosa eron gamma, factor de célula madre (o conocido como factor de crecimiento celular madre o proteína de ligando de c-kit), factor inhibidor de leucemia,
10 oncostatina M, pleiotropina, inhibidor de proteasa de leucocitos secretores, factor de célula madre, factores de necrosis tumoral, receptores de TNF solubles y secuencia de inmunoestimulación (ISS).

El ácido nucleico aislado puede estar bajo el
15 control de un promotor corriente arriba endógeno, o puede colocarse bajo el control de un promotor corriente arriba heterólogo. Los promotores incluyen, pero no se limitan a lo siguiente: citomegalovirus, Virus de Sarcoma Rous, promotor viral de viruela sintético, promotor 1 tardío sintético de
20 viruela, promotor 2 tardío sintético de viruela, promotor 2 temprano, promotor de viruela 01L, promotor de viruela 14L, promotor de viruela 13L, promotor de viruela 12L, promotor de viruela 11L, promotor de viruela DIOR, PRV gX, HSV-1 alfa 4, promotor de beta-actina de pollos, HCMV inmediato temprano,
25 MDV gA, MDV gB, MDV gD, ILT gD, BHV-1.1 VP8 e ILT gD y

promotor de sitio de entrada ribosomal interno. En una modalidad preferida, el promotor es un promotor de citomegalovirus humano.

Como se proporciona anteriormente, la vacuna puede
5 utilizarse para la administración a un ave que tiene un patógeno o enfermedad aviar. Tales patógenos o enfermedades se conocen por aquellos expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a: Virus de la Enfermedad Bursal Infecciosa, Virus de la Enfermedad de Newcastle, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Salmonella enteritidis*,
10 *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Riemerella anatipestifer*, Tuberculosis (*Mycobacterium avium*), Infectious Coryza, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, *Erysipelothrix*, *Chlamydia*, virus de la enfermedad de Marek,
15 Retroviridae (virus de leucosis aviar), Virus de Bronquitis Infecciosa, Virus de laringotraqueitis, Virus de Encefalomiелitis Aviar, Virus de Influenza, Virus de Enteritis Hemorrágica, Virus de Síndrome de la Baja de la Postura, Virus de viruela, Virus de Hepatitis de Patos,
20 Enteritis del Virus en Patos, Reovirus, Parvovirus en Gansos, Virus de meningoencefalitis de pavos de Israel (Flaviviridae). En una modalidad preferida, la enfermedad es el Virus de Enfermedad Bursal infecciosa.

Los portadores adecuados para la vacuna se conocen
25 bien por aquellos expertos en la técnica e incluyen, pero no

se limitan a proteínas, azúcares, etc. Un ejemplo de tal portador adecuado es un medio de cultivo fisiológicamente equilibrado que contiene uno o más agentes de estabilización tales como proteínas hidrolizadas, lactosa, etc. La vacuna
5 viva puede crearse al tomar fluidos de cultivo de tejido y agregar agentes estabilizantes tales como proteínas hidrolizadas estabilizantes. Además, como se utiliza en la presente, "portador aceptable" se conoce bien por aquellos expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a
10 tampón de fosfato 0.01-0.1 M y de preferencia 0.05 M de solución salina al 0.8%.

Adicionalmente, tal portador farmacéuticamente aceptable puede ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de solventes no acuosos son
15 propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos
20 parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites de Ringer o fijos lactados. Los vehículos intravenosos incluyen re-abastecedores de fluidos y nutrientes, re-abastecedores de electrolitos tales como aquellos basados en dextrosa de
25 Ringer y similares. Los conservadores y otros aditivos pueden

presentarse también, tales como por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que mejora la respuesta inmune a un antígeno. Un
5 adyuvante puede servir como un depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como un activador de sistema linfoide que no mejora específicamente la respuesta inmune (Hood et al., Immunology, Segunda edición, 1984, Benjamín/Cummings: Menlo Park, Calif., p. 384). Con
10 frecuencia, un desafío principal con un antígeno solo, en la ausencia de un adyuvante, fracasará para producir una respuesta inmune humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como
15 hidróxido de aluminio, sustancias activas superficiales tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, hemocianinas de lapa de cerradura, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacille Calmette-
20 Guerin) y Corynebacterium parvum).

La presente invención abarca un método para mejorar una respuesta inmune aviar la cual comprende administrar al
huevo del ave una cantidad efectiva de la vacuna para
proteger un ave contra un organismo enfermo tal como un virus
25 el cual comprende una cantidad inmunizante efectiva de un

vector que comprende 1) uno o más ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido, en donde el ácido nucleico está bajo el control de un promotor; y 2) un portador adecuado y/o un adyuvante.

5 La presente invención proporciona también un método para inmunizar un ave que comprende administrar al huevo del ave una cantidad efectiva de la vacuna. Tales patógenos o enfermedades se conocen por aquellos expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a: Virus de la Enfermedad Bursal
10 Infecciosa, Virus de la Enfermedad de Newcastle y/o *Mycoplasma gallisepticum*. La vacuna puede administrarse junto con vacunas vivas o atenuadas que se conocen por aquellos expertos en la técnica. Como se contempla aquí, la presente vacuna o vector puede administrarse en combinación con otras
15 vacunas que se conocen por aquellos expertos en la técnica.

 Para propósitos de esta invención, una "cantidad inmunizante efectiva" de la vacuna de la presente invención está dentro del rango de 1 ug a 100 mg. En otra modalidad, la cantidad inmunizante es de 1 ng a 100 ng. En una modalidad
20 preferida, la cantidad inmunizante es 100 ug.

 Como se describe en la Patente Norteamericana No. de Serie 6,464,984 para Audonnet, et al., la cual se incorpora en la presente para referencia en su totalidad, la vacuna puede comprender más de una valencia y comprende al
25 menos un plásmido, integrando de manera que se exprese in

104
110

vivo en las células huésped un gen con una o más valencias de patógenos de aves, estas valencias se seleccionan a partir del grupo que consiste del virus de enfermedad de Marek (MDV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de enfermedad bursal infecciosa (IBDV), virus de bronquitis infecciosa (IBV), virus de anemia infecciosa (CAV), virus de laringotraqueitis infecciosa (ILTV), virus de encefalomiелitis (AEV o virus de leucosis aviar ALV), virus de neumovirosis, y virus de la peste aviar, los plásmidos comprenden, para cada valencia, uno o más de los genes seleccionados a partir del grupo que consiste de, pero no se limitan a gB y gD para el virus de la enfermedad de Marek, HN y F para el virus de la enfermedad de Newcastle, VP2 para el virus de la enfermedad bursal infecciosa, S, M y N para el virus de bronquitis infecciosa, C+NS1 para el virus de anemia infecciosa, gB y gD para el virus de laringotraqueitis infecciosa, env y gag/pro para el virus de encefalomiелitis, F y G para el virus neumovirosis y HA, N y NP para el virus de peste aviar.

La valencia en la presente invención se entiende para significar que al menos un antígeno que proporciona protección contra el organismo, tal como un virus, para el patógeno considerado, es posible para la valencia que contiene, como sub-valencia, uno o más genes naturales o modificados a partir de una o más cepas del patógeno

12/10
p1

considerado.

Ventajosamente, la fórmula de la vacuna de acuerdo con la invención puede comprender, pero no se pretende para limitarse a, más de una valencia incluyendo, por ejemplo, al menos tres valencias elegidas a partir de, pero sin limitarse a, de Marek, bursal infecciosa, anemia infecciosa y de Newcastle. La valencia de bronquitis infecciosa puede agregarse también de preferencia a la misma.

En esta base de 3, 4 ó 5 valencias, será posible agregar una o más valencias de la peste aviar, laringotraqueitis, neumovirosis y encefalomiелitis.

En cuanto a la valencia de Marek, dos genes pueden utilizarse codificando gB y gD, en diferentes plásmidos o en uno y el mismo plásmido. Para la valencia de Newcastle, las dos cadenas HN y F, integradas dentro de dos diferentes plásmidos o dentro de uno y el mismo plásmido, se utilizan de preferencia. Para la valencia de la bronquitis infecciosa, el uso del gen S es posible. El S y M pueden asociarse en un solo plásmido o en diferentes plásmidos. Para la valencia de anemia infecciosa, los dos genes C y NS1 se asocian de preferencia en el mismo plásmido. Para la valencia de laringotraqueitis infecciosa, el uso del gen gB sólo se prefiere. Opcionalmente, pero menos preferible, los dos genes gB y gD pueden asociarse en diferentes plásmidos o en uno y el mismo plásmido.

/2

Para la valencia de la peste aviar, el uso del gen HA es ventajoso aunque es posible utilizar las asociaciones HA y NP o HA y N en diferentes plásmidos o en uno y el mismo plásmido. Las secuencias HA de más de una cepa del virus de
5 influenza, en particular desde diferentes cepas encontradas en el campo, pueden asociarse en la misma vacuna. Por otro lado, NP proporciona protección cruzada y la secuencia desde una cepa de un solo virus por lo tanto será satisfactoria. Para la valencia de encefalomiелitis, el uso de env se
10 prefiere.

La fórmula de la vacuna de acuerdo con la invención puede presentarse en un volumen de dosis de entre 0.1 y 1 ml y en particular entre 0.3 y 0.5 ml.

La dosis estará generalmente entre 10 ng y 1 mg, de
15 preferencia entre 100 ng y 800 μ g y de preferencia entre 0.1 μ g y 50 μ g por tipo de plásmido.

El uso se hará de preferencia de plásmidos sin protección, colocados simplemente en el vehículo de vacunación el cual será en general solución salina
20 fisiológica y similares. Es posible por supuesto utilizar todas las formas de vacunas de polinucléotido en la técnica anterior y en particular formuladas en liposomas.

Cada plásmido comprende un promotor capaz de asegurar la expresión del gen insertado, bajo su control,
25 dentro de las células huéspedes. Esto será en general un

fuerte promotor eucariótico y en particular un promotor de CMV-IE temprano de citomegalovirus de origen humano o murino, u opcionalmente de otro origen tal como ratas, puercos y cobayos.

5 Más generalmente, el promotor puede ser ya sea de origen viral o de origen celular. Como promotor viral diferente del CMV-IE, puede haberse mencionado el promotor temprano o tardío del virus SV40 del promotor LTR del virus de sarcoma Rous. Puede también ser un promotor del virus a
10 partir del cual el gen se deriva, por ejemplo, el propio promotor del gen. Como promotor celular, puede mencionarse el promotor de un gen de citoesqueleto, tal como por ejemplo, el promotor de desmina (Bolmont, et al., J. Submicroscopic Cytol. y Pathol. (1990) 22: 117-122; y Zhenlin et al., Gene,
15 (1989) 78:243-254) o alternativamente el promotor de actina. Cuando se presentan varios genes en el mismo plásmido, estos pueden presentarse en la misma unidad de transcripción o en dos diferentes unidades.

La combinación de las diferentes valencias de la
20 vacuna pueden lograrse de preferencia mezclando los plásmidos del polinucléotido que expresan el o los antígenos de cada valencia, pero es también posible crear antígenos justificados de varias valencias que se expresan por el mismo plásmido.

25 Los métodos de la invención, por lo tanto abarcan

la inyección de una fórmula de vacuna monovalente que comprende uno o más plásmidos que codifican uno o más genes a partir de uno de los virus anteriores, los genes son aquellos que se describen anteriormente. Además de su carácter
5 monovalente, estas fórmulas poseen las características establecidas anteriormente referente a la elección de los genes, sus combinaciones, la composición de los plásmidos, los volúmenes de dosis, las dosis y similares.

Las fórmulas de vacunas monovalentes pueden
10 utilizarse también (i) para la preparación de una fórmula de vacunas polivalentes como se describe anteriormente, (ii) individualmente contra la patología actual, (iii) asociarse con una vacuna de otro tipo (viva o completa inactivada, recombinante, sub-unidad) contra otra patología, o (iv) como
15 refuerzo para una vacuna como se describe posteriormente.

Otra sustancia de tratamiento ejemplar es una sustancia biológicamente activa tal como una vacuna, antibiótico, hormona, cultivo pro-biológico (por ejemplo, un medio de exclusión competitivo) y la otra es un marcador tal
20 como un tinte. El marcador puede servir como un control positivo para confirmar la inyección, por ejemplo en el caso de huevos subsecuentemente encontrados que no son posibles.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de inyección a chorro para tratar un embrión aviar in ovo, el
25 método comprende las etapas de orientar un huevo de ave

dentro de una posición predeterminada, introduciendo una primera abertura dentro del cascarón del huevo, colocando un dispositivo de suministro de inyección a chorro con relación a la primera abertura por lo que el dispositivo de suministro de inyección pueden dirigirse a una corriente de inyección a chorro a través de la primera abertura y dentro del huevo, liberando una dosis predeterminada de una primera sustancia de tratamiento como una corriente de alta presión por inyección a chorro dentro del huevo y retrayendo el dispositivo de suministro de inyección a chorro a partir del huevo, por lo que se trata el embrión del ave. El procedimiento de inyección a chorro es capaz de suministrar una muestra líquida a cualquier región deseada de un huevo de ave objetivo, incluyendo el alvéolo pulmonar, los alantoides, el embrión (incluyendo subcutáneamente como se evidencia por la inyección a chorro del tinte dentro de múltiples embriones.

Los métodos de inyección a chorro de acuerdo con la invención permiten la producción de posibles polluelos a partir de huevos tratados, como se muestra en el Ejemplo 2 posteriormente. La inyección a chorro de vacunas dirigidas específicamente contra enfermedades virales de aves, y en particular de polluelos puede producir una respuesta inmune que produce protección contra exposición y desafío subsecuente de los virus patológicos, como se muestra en el

Ejemplo 3 posteriormente. Los métodos de inyección a chorro de la invención suministrará también virus a los embriones (véanse las Tablas 8 y 9 posteriormente).

En una modalidad de la invención, el método
5 comprende además la etapa de suministrar una dosis predeterminada de una segunda sustancia de tratamiento por inyección a chorro dentro del huevo. En otra modalidad, la primera y segunda sustancias de tratamiento se inyectan a chorro dentro de diferentes compartimientos del huevo. Otra
10 modalidad de los métodos de la invención comprende las etapas de introducir una segunda abertura dentro del cascarón de huevo separada a partir de la primer abertura y colocando un dispositivo de suministro de inyección de chorro para dirigir una corriente de inyección de chorro a través de la segunda
15 abertura y dentro del huevo.

En varias modalidades de los métodos de la invención, al menos una sustancia de tratamiento se inyecta a chorro dentro de la célula área, el saco vitelino, los alantoides, la placenta o el embrión. En varias modalidades
20 de los métodos de la invención, al menos una sustancia de tratamiento se inyecta a chorro dentro de la célula aérea y se introduce otra sustancia de tratamiento a través del dispositivo de inyección a chorro dentro del saco vitelino, los alantoides, la placenta o el embrión.

25 En una modalidad de la invención, se introduce la

116
117

abertura al perforar el cascarón con un dispositivo de taladro.

En otra modalidad de la invención, la abertura se introduce al perforar el cascarón con un punzón tubular, el lumen del cual es coaxial con la dirección de la corriente de alta presión emitida a partir de un dispositivo de inyección a chorro, y en donde la corriente de inyección a chorro se suministra a través del lumen del punzón tubular.

En otra modalidad de la invención, la abertura en el cascarón del huevo se introduce al perforar el cascarón con una corriente de gas. La corriente de gas puede comprender además un abrasivo.

En una modalidad de la invención, la corriente de gas comprende además un lubricante líquido. En otra modalidad de la invención, la corriente de gas comprende además un desinfectante. En una modalidad de la invención, el lubricante líquido es un desinfectante.

En una modalidad de la invención, la primera y segunda sustancias de tratamiento se suministran dentro del huevo secuencialmente con el tiempo.

En otra modalidad de la invención, el método comprende además la etapa de resellado del cascarón de huevo. La etapa para resellar el cascarón de huevo puede comprender además aplicar a un orificio en el cascarón de huevo un sello adhesivo, una membrana sellada o una combinación de los

117
118

mismos.

La invención proporciona además un método de inyección a chorro para tratar embriones de aves in ovo que comprenden las etapas de orientar un huevo de ave dentro de una posición predeterminada, colocando un medio de perforación del cascarón a una posición predeterminada en la superficie del cascarón, perforando el cascarón del huevo de ave, colocando un dispositivo de suministro de inyección a chorro con relación a la abertura, por lo que el dispositivo de suministro de inyección puede dirigir una corriente de inyección a chorro a través de la abertura y dentro del huevo, retrayendo los dispositivos de suministro de inyección a chorro a partir del huevo, por lo que se trata el embrión aviar, y resellando el huevo.

La invención proporciona además un método de inyección a chorro para inducir una respuesta protectora para un agente infeccioso en un ave, que comprende las etapas de orientar un huevo de ave en una posición predeterminada, colocando un medio de perforación del cascaron en una posición predeterminada en la superficie del cascaron, perforando el cascaron del huevo de ave, colocando un dispositivo de suministro de inyección a chorro con relación a la abertura, por lo cual el dispositivo de suministro de inyección a chorro puede dirigir una corriente de inyección a chorro a través de la abertura y dentro del huevo, en donde

2/8
1/19

la corriente de inyección a chorro comprende una sustancia farmacéutica capaz de inducir una respuesta protectora en un ave contra un agente infeccioso, retrayendo los dispositivos de suministro de inyección a chorro a partir del huevo, por lo que se trata el embrión aviar, resellando el huevo, e incubando el huevo tratado, por lo que se permite desarrollar una respuesta protectora. En una modalidad de este método de la invención, la sustancia farmacéutica es un antígeno capaz de producir una repuesta inmune en un ave.

10 En otra modalidad, la sustancia farmacéutica se inyecta a chorro dentro del músculo de la pechuga de un ave. La sustancia farmacéutica puede ser una vacuna de ADN. En una modalidad, la vacuna de ADN produce una respuesta protectora contra la enfermedad de Marek, IBDV, enfermedad Bursal
15 Infecciosa, infección coccidial, virus de la enfermedad de Newcastle o ILT.

La invención proporciona también un método de inyección a chorro para tratar embriones de aves *in ovo* que comprenden las etapas de orientar un huevo de ave dentro de
20 una posición predeterminada, colocando un medio de perforación del cascarón a una posición predeterminada en la superficie del cascarón, introduciendo una primera abertura dentro del cascarón de un huevo de ave, introduciendo una segunda abertura dentro del cascarón de un huevo de ave, la
25 segunda abertura se separa de la primera abertura, colocando

219
120

un primer dispositivo de suministro de inyección a chorro con relación a la primera abertura por lo que el primer dispositivo de suministro de inyección a chorro puede dirigir una primera corriente de inyección a chorro a través de la primera abertura y dentro de huevo, colocando un segundo dispositivo de suministro de inyección a chorro con relación a la segunda abertura por lo que el segundo dispositivo de suministro de inyección a chorro puede dirigir una segunda corriente de inyección a chorro a través de la segunda abertura y dentro del huevo, liberando una dosis predeterminada de una primera sustancia de tratamiento a partir del primer dispositivo de suministro de inyección a chorro dentro del huevo, liberando una dosis predeterminada de una segunda sustancia de tratamiento a partir del segundo dispositivo de suministro dentro del huevo, retrayendo los primero y segundo dispositivos de suministro de inyección a chorro a partir del huevo, por lo que se trata el embrión de ave y se resella el cascarón del huevo.

En una modalidad de este aspecto de la invención, el método comprende además la etapa de inyectar a chorro la primera y segunda sustancias de tratamiento al mismo tiempo a través de un solo orificio del dispositivo de suministro de inyección a chorro.

En una modalidad de este aspecto de la invención, el método comprende además la etapa de inyectar a chorro la

120
121

primera sustancia de tratamiento debajo de la membrana del huevo.

En otra modalidad de este aspecto de la invención, el segundo dispositivo de suministro de inyección a chorro se
5 ajusta para suministrar la segunda sustancia de tratamiento o adyacente al albúmina, el saco vitelino, el embrión, los alantoides o la placenta.

En aún otra modalidad de este aspecto de la invención, la primera y segunda sustancias de tratamiento se
10 liberan sustancial y simultáneamente con el tiempo.

Otro aspecto de la invención proporciona un aparato de inyección a chorro *in ovo* automatizada, que comprende una superficie plana para mantener una pluralidad de huevos en una posición vertical y alineada sustancialmente, en donde la
15 superficie plana se configura para proporcionar acceso externo en áreas predeterminadas de los huevos, una pluralidad de dispositivos de suministro de inyección a chorro configurados para poner en contacto áreas predeterminadas del huevo, al menos uno de los dispositivos
20 de inyección a chorro que corresponde a cada huevo en la superficie plana, un primer recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una primera sustancia de tratamiento, el primer recipiente en comunicación de fluido con cada uno de los dispositivos de suministro de inyección a
25 chorro.

En una modalidad de este aspecto de la invención, el dispositivo de inyección a chorro automática comprende un medio para perforar el cascarón de un huevo, el medio es capaz de colocarse en una posición predeterminada en la superficie de un huevo.

En otra modalidad de este aspecto de la invención, el dispositivo de inyección a chorro automático comprende además un segundo recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una segunda sustancia de tratamiento, el segundo recipiente en comunicación de fluido con cada uno de los dispositivos de suministro de inyección a chorro.

En diversas modalidades de este aspecto de la invención, cada dispositivo de suministro de inyección a chorro tiene un medio para introducir una abertura en un huevo, la abertura se coloca con relación a un dispositivo de suministro de inyección a chorro por lo que el dispositivo de suministro de inyección a chorro puede dirigir una corriente de inyección a chorro a través de la abertura y dentro del huevo.

En una modalidad del aparato de inyección a chorro *in ovo* automatizado, de acuerdo con la invención, el medio para introducir una abertura en un huevo es un punzón tubular.

En aún otra modalidad del aparato de inyección a chorro *in ovo* automatizado de acuerdo con la invención, el

t72
123

medio para introducir una abertura en un huevo es una broca en espiral.

En aún otra modalidad de la invención, el medio para introducir una abertura en un huevo es una broca tubular
5 que tiene un lumen en la misma.

En esta modalidad de la invención, el medio para introducir una abertura en un huevo puede configurarse de manera que la corriente de inyección a chorro se suministra al huevo a través del lumen de la broca tubular.

10 En varias modalidades del aparato de inyección a chorro *in ovo* automatizado de acuerdo con la invención, el medio para introducir una abertura en un huevo puede ser un chorro de gas a alta presión que puede comprender además un abrasivo para pulverizar una abertura dentro del cascarón de
15 huevo. En una modalidad, el chorro de gas a alta presión comprende además un lubricante, un desinfectante o una combinación de los mismos.

El aparato de inyección a chorro *in ovo* automatizado de acuerdo con la invención puede comprender
20 además un medio para remover el cascarón de huevo molido a partir de la superficie del huevo.

En otra modalidad del aparato de inyección a chorro automatizado de acuerdo con la invención, los dispositivos de inyección a chorro se configuran para suministrar la primera
25 y segunda sustancias de tratamiento a través de al menos una

123
501

de las inyecciones en espacio y tiempo secuencialmente separadas dentro de los huevos en la superficie plana.

En otra modalidad del aparato de inyección a chorro automatizado de acuerdo con la invención, al menos un
5 dispositivo de inyección a chorro que corresponde a cada huevo incluye primeros y segundos dispositivos de inyección a chorro que corresponde a cada huevo en la superficie plana.

En aún otra modalidad del aparato de acuerdo con la invención, el dispositivo de inyección se configura para
10 inyectar el extremo grande superior del huevo y el segundo dispositivo de inyección a chorro se configura para inyectar dentro de una abertura separada espaciada del primer dispositivo de inyección a chorro. En aún otra modalidad del aparato de acuerdo con la invención, una primera corriente de
15 sustancia de tratamiento se suministra por el primer dispositivo de inyección a chorro a una profundidad que está debajo de la célula aérea del huevo.

En una modalidad del aparato de acuerdo con la invención, una segunda corriente de sustancia de tratamiento
20 puede suministrarse por el segundo dispositivo de inyección a chorro de manera que se termina la penetración dentro del huevo sobre la célula aérea del huevo.

La invención proporciona además un aparato de inyección a chorro *in ovo* automatizada, que comprende una
25 superficie plana para mantener una pluralidad de huevos en

una posición alineada, en donde la superficie plana se configura para proporcionar acceso externo en áreas predeterminadas de los huevos, una pluralidad de primeros dispositivos de suministro de inyección a chorro, en donde
5 cada dispositivo de suministro de inyección a chorro se configura para dirigir una corriente de sustancia de tratamiento a un huevo, uno de los primeros dispositivos de suministro de inyección que corresponde a cada huevo en la superficie plana, una pluralidad de segundos dispositivos de
10 suministro de inyección a chorro configurados para poner en contacto áreas predeterminadas del huevo, uno de los segundos dispositivos de suministro de inyección a chorro que corresponden a cada huevo en la superficie plana, un primer recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una
15 primera sustancia de tratamiento, el primer recipiente en comunicación de fluido con cada uno de los primeros dispositivos de suministro de inyección a chorro, un segundo recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una segunda sustancia de tratamiento, el segundo recipiente en
20 comunicación de fluido con cada uno de los segundos dispositivos de suministro, un medio de bombeo asociado operablemente con el primero y segundo recipientes para suministrar una dosis predeterminada de cada una de la primer y segunda sustancias de tratamiento para cada uno del primer
25 y segundo dispositivos de inyección a chorro, y un medio para

125
126

introducir al menos una abertura en cada huevo, en donde cada
abertura se coloca con relación a un dispositivo de
suministro de inyección a chorro por lo que el dispositivo de
suministro de inyección a chorro puede dirigir una corriente
5 de inyección a chorro que comprende una sustancia de
tratamiento a través de la abertura y dentro del huevo.

En una modalidad del aparato de inyección a chorro
in ovo automatizado de acuerdo a este aspecto de la
invención, el medio para abrir un huevo es íntegro al
10 dispositivo de suministro de inyección a chorro.

En otra modalidad, el primer recipiente y cada uno
de los primeros dispositivos de suministro de inyección a
chorro definen una primera trayectoria de fluido entre ellos
y el segundo recipiente y cada uno de los segundos
15 dispositivos de suministro de inyección definen una segunda
trayectoria de fluido entre ellos, en donde la primera
trayectoria se separa a partir de la segunda trayectoria,
pero puede combinarse antes de salir del orificio del
dispositivo de suministro de inyección a chorro.

20 En otra modalidad del aparato de inyección a chorro
in ovo de acuerdo con la invención, se configura un primer
dispositivo de inyección a chorro para suministrar una
primera sustancia de tratamiento en una primera ubicación
debajo de la célula aérea del huevo y el segundo dispositivo
25 de inyección a chorro se configura para suministrar una

126
178

segunda sustancia de tratamiento en una segunda ubicación en el huevo.

Aún otra modalidad de acuerdo con la invención comprende además un tercer recipiente de tratamiento para
5 mantener una tercera sustancia de tratamiento, la tercera comunicación de tratamiento con uno de los primeros y segundos dispositivos de inyección.

En esta modalidad del aparato de inyección a chorro in ovo automatizado, el primer dispositivo de inyección puede
10 también configurarse para suministrar la primera y tercera sustancias de tratamiento.

La presente invención proporciona un aparato de inyección in ovo automatizado que comprende una superficie plana para mantener una pluralidad de huevos en una posición
15 alineada, en donde la superficie plana se configura para proporcionar acceso externo en áreas predeterminadas de los huevos, una pluralidad de dispositivos de suministro de inyección, al menos uno de los dispositivos de suministro de inyección que corresponden a cada huevo en tal superficie
20 plana, cada uno de los dispositivos que tiene un extremo configurado para poner en contacto y penetrar dentro de una ubicación predeterminada en el huevo, un primer recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una primera sustancia de tratamiento, el primer recipiente en comunicación fluida
25 con cada uno de los dispositivos de suministro de inyección,

un segundo recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una segunda sustancia de tratamiento, el segundo recipiente en comunicación de fluido con cada uno de los dispositivos de suministro de inyección, y una bomba operablemente asociada con el primero y segundo recipientes para suministrar una dosis predeterminada de cada una de la primera y segunda sustancias de tratamiento a cada uno de los dispositivos de inyección, en donde la dosis predeterminada de la primera y segunda sustancias de tratamiento se combinan antes del puerto extremo que se suministra al huevo juntos en el sitio de inyección.

Una modalidad de este aparato de inyección a chorro automatizado puede comprender además un medio para combinar la primera y segunda sustancias de tratamiento antes de la inyección y suministrando la dosis predeterminada como una sustancia de tratamiento mezclada a lo largo de una sola trayectoria de fluido dentro de cada uno de los dispositivos de inyección.

En otra modalidad de este aparato de inyección a chorro automatizado de acuerdo con la invención, el primer recipiente y cada uno de los dispositivos de inyección que definen una primera trayectoria de fluido entre ellos y el segundo recipiente y cada uno de los dispositivos de inyección que definen una segunda trayectoria de fluido entre ellos, en donde la primera y segunda trayectorias se separan,

19/2/28

pero se configuran para terminar a una trayectoria común en el primer extremo del dispositivo de inyección a chorro en el sitio de inyección.

Aún otra modalidad del aparato de inyección automatizado de acuerdo con la invención comprende además un
5 tercer recipiente para mantener un líquido para limpieza, el tercer recipiente en comunicación de fluido con la bomba, el primer recipiente, y cada uno de los dispositivos de inyección, por lo que se permiten las trayectorias de fluido
10 que se enjuagan con el líquido para limpieza.

Se entenderá que aunque la forma de la invención mostrada y descrita en la presente constituye modalidades preferidas de la invención, no se pretende para ilustrar todas las posibles formas de la invención. Las palabras
15 utilizadas son palabras de descripción en lugar de limitación. Varios cambios y variaciones pueden hacerse para la presente invención sin apartarse desde el espíritu y alcance de la invención.

Ejemplo 1: Inyección a chorro dentro de huevos

20 Se inocularon embriones de polluelos de dieciocho días en el cascarón con un inyector a chorro Biojector 2000 adaptado con una cabeza de jeringa No. 2 y se ajustó para suministrar 0.2 ml de líquido. La parte superior de un huevo (se realizaron cuatro copias) se abrió al clasificar el
25 cascarón para exponer la membrana subyacente y 0.2 ml de

129
130

tinte se suministró al embrión. El tinte se depositó tanto simultáneamente como intra-muscularmente a través de la membrana así como algún tinte restante en la superficie de la membrana. Varias regiones u órganos de los embriones
5 recibieron la solución de tinte. Se repitieron inoculaciones con un Biojector 3400 y una jeringa No. 2 con resultados similares.

Un biojector y una jeringa No. 7 como el dispositivo de inoculación, en un caso, pasó el tinte
10 indicador a través de una membrana y la yema, depositando el tinte en el fondo del huevo.

Ejemplo 2: Efecto de inyección a chorro in ovo en la viabilidad de 17-19 días en embriones de pollos en el cascarón

15 Los posibles pollos en embriones en el cascarón se inyectaron en chorro utilizando un inyector activado con resorte VITAJET™ (Bioject Medical Technologies, New Jersey) utilizando diferentes cargas de resorte y diámetros de boquilla para propósitos comparativos, de acuerdo a las
20 instrucciones del fabricante. Cincuenta huevos de embrionación (ED) de 17, 18 y 19 días se utilizaron por muestra de prueba. Un orificio modelo se hizo en el cascarón de cada huevo con una broca y la boquilla de salida del inyector alineado para permitir una corriente de inóculo que
25 entra al huevo. Se utilizó un tinte de rastreo no letal. El

130
130

inyector se adaptó con una boquilla de 0.006 a 0.008 y se descargó con una fuerza de resorte de 18.144 kg (40 libras) o 23.58 kg (52 libras).

Como se muestra en la Tabla 1, la viabilidad para 5 incubar fue al menos 70% con una boquilla de 0.006 y 18.144 kg (40 libras) de fuerza de resorte con un volumen inyectado de 0.05 ml de tinte, el cual entró directamente dentro de los tejidos de los polluelos embriones como se determina por observación visual subsecuente y disección.

10 *Tabla 1. Efectos de inyección a chorro y edad del embrión en incubabilidad*

15	Efectos de inyección a chorro y edad del embrión en la incubabilidad	Incubación	Muerte por Trauma	Muerte
	Control	49/50 (98%)	0	1
	Día 17	36/50 (72%)	6	6
	Día 18	39/50 (78%)	3	5
	Día 19	48/50 (96%)	0	1

20 En otro estudio comparativo, como se muestra en la Tabla 2, no hubo diferencia entre las boquillas de 0.006 y 0.008 en la viabilidad de los polluelos receptores. El volumen del fluido suministrado no tuvo efectos detectables.

25 *Tabla 2. Efecto en la incubabilidad siguiendo la inyección a chorro in ovo (ED18) inyección (inyector de 23.58 kg (52*

131
131

libras)

5

Tipo de Boquilla	Volumen	Incubación	Muerta por Trauma	Muerta
0.006	0.05ml	12/20 (60%)	5	1
0.006	0.1 ml	12/20 (60 %)	4	1
0.008	0.05ml	12/20 (60%)	6	0
0.008	0.1 ml	10/20 (50%)	8	0
Control	N/A	20/20 (100 %)	0	0

10

Un incremento en la fuerza de la corriente a chorro tuvo una disminución detectable en la viabilidad del polluelo, como se muestra en la Tabla 3.

15 *Tabla 3. Efecto en incubabilidad siguiendo inyección a chorro in ovo (ED 18) inyección con una boquilla de 0.006 e incrementando fuerzas de corriente a chorro*

20

Inyector	Volumen	Incubación	Muerta por Trauma	Muerta
40 lbs	0.1 ml	46/60 (77 %)	8	5
40 lbs	0.05 ml	44/60 (73%)	12	2
52 lbs	0.05 ml	18/30 (60%)	8	0

25 Ejemplo 3: Uso de inyección a chorro para depositar la vacuna dentro de posibles pollos en embriones y producir una

132
132

respuesta inmune protectora

Se inyectaron a chorro posibles pollos en embriones del cascarón utilizando un inyector activado con resorte VITA-JECT™ utilizando diferentes cargas de resorte y diámetros de boquilla para propósitos comparativos. Cincuenta huevos de 18 días de embrionación (ED) se utilizaron por muestra de prueba. Un orificio modelo se hizo en el cascarón de cada huevo con una broca y la boquilla de salida del inyector se alineo para permitir una corriente de inóculo para penetrar al huevo. El inyector se adaptó con una boquilla de 0.006 de tamaño y se descargó con una fuerza de resorte de 18.144 kg (40 libras). La vacuna de HVT dirigida contra enfermedad de Marek, se depositó intra-embriónicamente, ya sea intramuscular o subcutáneamente. Se impugnarón subsecuentemente embriones por el virus para determinar la eficacia de la protección temprana producida por la vacuna inyectada a chorro. Un nivel elevado de viabilidad de los embriones inyectados se retuvo como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de vacunación de HVT de inyección a chorro in ovo (ED18) en incubabilidad

Grupo	Incubación	Muerte por Trauma	Muerte
Inyección a chorro	121/140 (86%)	11	3
Control	74/75 (99%)	0	0

123
134

La inyección de la vacuna HVT directamente dentro de embriones de pollos de 18 días produjo la protección a partir de un desafío subsecuente con HVT, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Eficacia Protectora de HVT administrada a través de inyección a chorro in ovo (ED 18)

	Grupo	Viremia en el día 4	Viremia en el día 8	MDV/Total	% de Protección
10	No Vacunado-sin desafío	N/A	N/A	0/15	-
	No vacunado-con desafío	N/A	N/A	30/30	0
15	Inyección a chorro	19.4 ± 11	27.9 ±26	13/59	78

inyectadas a chorro utilizando contra virus de enfermedad de Newcastle (NDV), incluyendo la vacuna codificada en el vector de virus de la viruela Trovac. La viabilidad de los embriones inyectados no se afectó significativamente, como se muestra en la Tabla 6. La supervivencia y respuesta de los pollos a la vacuna se muestran en la Tabla 7.

Tabla 6. Efecto de vacunación de inyección a chorro in ovo (ED18) en incubabilidad (18.144 kg (40 libras) boquilla de 0.006)

234
134

5

Grupo	Ruta	Incubación	Muerta por Trauma	Muerte
Control	N/A	27/30 (90%)	1	1
Trovac ND	Inyección a chorro	56/60 (93 %)	3	1
NDV-WOW	Inyección a chorro	55/60 (92 %)	1	2
Trovac ND	SQ	43/45 (96%)	0	0
WOW	SQ	43/45 (96%)	0	2

10

Tabla 7. Efecto en vacunación de inyección a chorro in ovo (ED18) en supervivencia de pollos y respuestas de NDV

15

Grupo	Ruta	Muerte/Total	Respuesta de NDV		
			1a Vacunación	2a Vacunación	Porcentaje de Protección
Control	N/A	0/20	0/20	0/10	0
Trovac ND	Inyección a chorro	27/30	ND	ND	NA
NDV- WOW	Inyección a chorro	0/30	1/26 (1)	6/13 (31)	8
Trovac ND	SQ	0/30	13/30 (20)	14/14 (3408)	100
WOW	SQ	0/30	29/30 (1286)	15/15 (3745)	100

20

Se trataron también adicionalmente embriones de pollos tratados con chorro inyectado con Virus Canarypox. La viabilidad de los embriones inyectados no se afectó significativamente, como se muestra en la Tabla 8. Los niveles de recuperación del virus a partir del músculo, como

135
135

se opone al bazo e hígado de polluelos se muestran en la
Tabla 9.

5 *Tabla 8. Efecto de vacunación de inyección a chorro in ovo
(ED18) en incubabilidad (18.144 kg (40 libras) boquilla de
0.006) siguiendo la vacunación con Canarypox*

10

Grupo	Ruta	Incubación	trauma/muerte	Muerte
Control (PBS)	Inyección a chorro	18/20 (90%)	1	0
ALVAC-CDV (10 ⁶)	Inyección a chorro	22/30(73%)	4	0
ALVAC-CDV (10 ⁶)	Inyección a chorro	28/30 (93%)	2	0
ALVAC-CDV (10 ⁶)	Inyección a chorro	27/30 (90 %)	2	0
ALVAC-CDV (10 ⁶)	1-Day IM	27/30 (90%)	0	2

15

*Tabla 9.Efecto de vacunación de inyección a chorro in ovo
(ED18) en recuperación de virus siguiendo la vacunación con
Canarypox*

20

Grupo	Ruta	Aislamiento del Virus	
		Bazo/Hígado	Músculo
Control (PBS)	Inyección a chorro	ND	ND
ALVAC-CDV (10 ⁶)	Inyección a chorro	0/5	5/5
ALVAC-CDV (10 ⁶)	Inyección a chorro	0/5	5/5
ALVAC-CDV (10 ⁶)	Inyección a chorro	0/5	1/5
ALVAC-CDV (10 ⁶)	1-Day IM	ND	ND

Ejemplo 3: Preparación de una vacuna viral

25

(a) *Cultivo del Virus:* Se cultivan virus en el

sistema celular apropiado hasta que se obtiene un efecto citopático. Los sistemas celulares que se utilizan para cada virus se conocen bien por personas experimentadas en la técnica. Brevemente, las células sensibles al virus
5 utilizado, las cuales se cultivan en medio esencial mínimo de Eagle (medio MEM) u otro medio apropiado, se inoculan con la cepa viral estudiada utilizando una multiplicidad de infección de 1. Las células infectadas se incuban entonces a 37°C durante el tiempo necesario para la aparición de un
10 efecto citopático completo (en promedio 36 horas).

Después del cultivo, el sobrenadante y las células lisadas se cosecharon y la suspensión viral completa se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos a +4°C para remover los residuos celulares. Las partículas virales se cosechan
15 entonces por ultracentrifugación a 400,000 g durante 1 hora a +4°C. El gránulo se incorpora en un volumen mínimo del tampón (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA) y la suspensión viral concentrada se trata con proteinasa K (100 µg/ml final) en la presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS (0.5% final)
20 durante 2 horas a 37°C. El ADN viral se extrae entonces con una mezcla de fenol/cloroformo y luego se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto. Después de dejar durante la noche a -20°C, el ADN se centrifuga a 10,000 g durante 15 minutos a +4°C. El gránulo de ADN se seca y luego se
25 incorpora en un volumen mínimo de agua ultrapura estéril.

Éste puede digerirse con enzimas de restricción.

Los virus de ARN se purificaron de acuerdo a técnicas bien conocidas por personas experimentadas en el arte. El ARN viral genómico de cada virus se aísla entonces
5 utilizando la técnica de extracción de "tioacianato de guanidinio/fenolcloroformo" descrita por Chromczynski & Sacchi (Anal. Biochem., 1987. 162, 156-159).

Todas las construcciones de plásmidos se llevan a cabo utilizando técnicas de biología molecular estándares
10 descritas por J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Todos los fragmentos de restricción utilizados para la presente invención se aislaron utilizando el equipo "Geneclean" (BIO 101 Inc. La Joya,
15 Calif.).

Oligonucleótidos específicos (que comprenden sitios de restricción en sus extremos 5' para facilitar la clonación de los fragmento amplificados) se sintetizan de manera que cubren completamente las regiones de codificación de los
20 genes que van a amplificarse (véanse ejemplos específicos). La reacción de transcripción inversa (RT) y la reacción de cadena de polimerasa (PCR) se llevaron a cabo de acuerdo a técnicas estándares (Sambrook J. et al., 1989). Cada reacción de RT-PCR se realiza con un par de amplificadores específicos
25 y tomando como plantilla, el ARN genómico viral extraído. El

ADN complementario amplificado se extrae con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) antes de digerirse con enzimas de restricción.

(b) Preparación y Purificación de los Plásmidos:

5 Para la preparación de los plásmidos pretendidos para la vacunación de huevos de aves, puede utilizarse cualquier técnica la cual hace posible obtener una suspensión de plásmidos purificados predominantemente en la forma de supercoloide. Estas técnicas son bien conocidas por aquellos
10 expertos en la técnica. Pueden mencionarse en particular la técnica de lisis alcalina seguida por dos ultracentrifugaciones sucesivas en gradiente de cloruro de cesio en la presencia de bromuro de etidio como se describe en J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory
15 Manual, 2ª edición, Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Puede hacerse también referencia a las solicitudes de patente PCT WO 95/21250 y PCT WO 96/02658 que describe métodos para producir, en una escala industrial, plásmidos los cuales pueden utilizarse para
20 vacunación. Para los propósitos de la fabricación de vacunas, los plásmidos purificados se vuelven a suspender de manera que se obtienen soluciones en una alta concentración (>2 mg/ml) compatible con almacenamiento. Los plásmidos se vuelven a suspender ya sea en agua ultrapura o en tampón de
25 TE (10 mM de Tris-HCl; 1 mM de EDTA, pH 8.0).

(c) *Fabricación de las Vacunas Asociadas:* Los diversos plásmidos necesarios para la fabricación de una vacuna asociada se mezclan iniciando con sus soluciones concentradas. Las mezclas se preparan de tal manera que la
5 concentración final de cada plásmido corresponde a la dosis efectiva de cada plásmido. Las soluciones que pueden utilizarse para ajustar la concentración final de la vacuna pueden ser ya sea una solución de NaCl al 0.9%, o un tampón de PBS. Formulaciones específicas tales como liposomas,
10 lípidos catiónicos, pueden utilizarse también para la fabricación de las vacunas.

Ejemplo Profético: Generación de anticuerpo que confiere una respuesta protectora para infección en pollos

Se tratan embriones de pollos con vacunas de ADN
15 inyectadas a chorro dirigidas contra Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), incluyendo una vacuna codificada en el vector Trovac del virus de la viruela. La viabilidad de los embriones inyectados no se afecta significativamente. Los embriones se inyectan a chorro con entre aproximadamente 50
20 μg y 1000 μg de una construcción de ADN que comprende un plásmido o un vector viral incorporando un promotor, de preferencia, pero sin limitarse a un promotor genético aviar que conducirá la expresión de un ácido nucleico heterólogo operablemente unido al mismo, el ácido nucleico heterólogo
25 codifica al menos una determinante antigénica de un patógeno

aviar. La preparación de una vacuna de ácido nucleico, la cual se mezcla opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable se inyectará a chorro dentro del tejido del músculo de la pechuga de los embriones con el cascarón utilizando el aparato y métodos descritos en la presente.

Después de resellar los cascarones de huevos inyectadas utilizando adhesivo de otro método de sellado adecuado que mantiene la esterilidad de los contenidos internos de los huevos, los huevos se incuban hasta la incubación de los polluelos. La expresión del objetivo antigénico en el suero de los polluelos y aves adultas se medirá. La generación de anticuerpo en el suero se mide al menos hasta 60 días a partir de la incubación de los polluelos inyectados. Se encontrarán niveles detectables del anticuerpo esperado, los niveles se correlacionan al grado de protección producido contra el organismo infeccioso objetivo presentado a las aves tratadas.

Aunque pocas modalidades ejemplares de esta invención se han descrito, aquellos expertos en la técnica apreciarán fácilmente que muchas modificaciones son posibles en las modalidades ejemplares sin apartarse materialmente de las enseñanzas y ventajas novedosas de esta invención. Por consiguiente, todas las modificaciones se pretenden para incluirse dentro del alcance de esta invención como se define

en las reivindicaciones. La invención se define por las siguientes reivindicaciones, con equivalentes de las reivindicaciones que se incluyen en la presente.

REIVINDICACIONES

1. Un método de inyección a chorro para tratar un embrión aviar *in ovo*, caracterizado porque comprende las etapas de:

5 (a) orientar un huevo de ave dentro de una posición predeterminada;

 (b) introducir una primera abertura dentro del cascarón del huevo;

 (c) colocar un dispositivo de suministro de
10 inyección a chorro con relación a la primera abertura por lo que el dispositivo de suministro de inyección a chorro puede dirigir una corriente de inyección a chorro a través de la primera abertura y dentro del huevo;

 (d) liberar una dosis predeterminada de una primera
15 sustancia de tratamiento por inyección a chorro dentro del huevo; y

 (e) retraer el dispositivo de suministro de inyección a chorro, por lo que se trata el embrión aviar.

2. El método de conformidad con la reivindicación
20 1, caracterizado porque comprende además las etapas de introducir una segunda abertura dentro del cascarón de huevo separada desde la primera abertura y colocando un dispositivo de suministro de inyección a chorro para dirigir una corriente de inyección a chorro a través de la segunda
25 abertura pequeña y dentro del huevo, por lo que se suministra

una dosis predeterminada de una segunda sustancia de tratamiento por inyección a chorro dentro del huevo.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la primera y segunda sustancias de tratamiento se inyectan a chorro dentro de diferentes compartimientos del huevo.

4. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque al menos una sustancia de tratamiento se inyecta a chorro dentro de la célula aérea y otra sustancia de tratamiento se introduce a través del dispositivo de inyección a chorro dentro del saco vitelino, la placenta o el embrión.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la abertura se introduce perforando el cascarón con un dispositivo seleccionado a partir de una broca tubular, una broca en espiral o una broca de molienda, un punzón tubular que tiene un lumen coaxial con una corriente de alta presión a partir del dispositivo de inyección a chorro, y en donde la corriente de inyección a chorro se suministra a través del lumen del punzón tubular, una corriente de gas, una corriente de gas que comprende un abrasivo, una corriente de gas que comprende además un lubricante líquido, y una corriente de gas que comprende además un desinfectante.

6. El método de conformidad con la reivindicación

1, caracterizado porque comprende además la etapa de resellar el cascarón del huevo.

7. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la etapa de resellar el cascarón del huevo comprende aplicar a un orificio en el cascarón del huevo un sello adhesivo, una membrana de sellado o una combinación de los mismos.

8. Un método de inyección a chorro para tratar embriones aviares in ovo, caracterizado porque comprende las etapas de:

orientar un huevo de ave dentro de una posición predeterminada;

colocar un medio de perforación del cascarón a una posición predeterminada en la superficie del cascarón;

15 perforar el cascarón del huevo de ave;

colocar un dispositivo de suministro de inyección a chorro con relación a la abertura, por lo que el dispositivo de suministro de inyección a chorro puede dirigir una corriente de inyección a chorro a través de la abertura y dentro del huevo;

retraer los dispositivos de suministro de inyección a chorro, por lo que se trata el embrión aviar;

y

resellar el huevo.

25 9. Un método de inyección a chorro para tratar

embriones in ovo, caracterizado porque comprende las etapas de:

orientar un huevo de ave dentro de una posición predeterminada;

5 colocar un medio de perforación del cascarón a una posición predeterminada en la superficie del cascarón;

introducir una primera abertura dentro del cascarón de un huevo de ave,

introducir una segunda abertura dentro del cascarón
10 de un huevo de ave, la segunda abertura se separa de la primera abertura;

colocar un primer dispositivo de suministro de inyección a chorro con relación a la primera abertura por lo que el primer dispositivo de suministro de inyección a chorro
15 puede dirigir una primera corriente a chorro a través de la primera abertura y dentro del huevo;

colocar un segundo dispositivo de suministro de inyección a chorro con relación a la segunda abertura por lo que el segundo dispositivo de suministro de inyección a
20 chorro puede dirigir una segunda corriente de inyección a chorro a través de la segunda abertura y dentro del huevo;

liberar una dosis predeterminada de una primera sustancia de tratamiento a partir del primer dispositivo de suministro de inyección a chorro dentro del huevo;

25 liberar una dosis predeterminada de una segunda

sustancia de tratamiento a partir del segundo dispositivo de suministro dentro del huevo;

retraer el primero y segundo dispositivos de inyección a chorro a partir del huevo, por lo que se trata el
5 embrión aviar; y

liberar el cascarón de huevo.

10. Un método de inyección a chorro para inducir una respuesta protectora a un agente infeccioso en un ave, caracterizado porque comprende las etapas de:

10 orientar un huevo de ave dentro de una posición predeterminada;

colocar un medio de perforado del cascarón a una posición predeterminada en la superficie del cascarón;

perforar el cascarón de un huevo de ave;

15 colocar un dispositivo de suministro de inyección a chorro con relación a la abertura, por lo que el dispositivo de suministro de inyección a chorro puede dirigir una corriente de inyección a chorro a través de la abertura y dentro del huevo, y en donde la corriente de inyección a
20 chorro comprende una sustancia farmacéutica capaz de inducir una respuesta protectora en un ave contra un agente infeccioso;

inyectar a chorro la sustancia farmacéutica dentro del huevo, por lo que se trata el embrión aviar en la misma;

25 retraer los dispositivos de suministro de inyección

a chorro;

resellar el huevo; y

incubar el huevo tratado, por lo que se permite desarrollar una respuesta protectora.

5 11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la sustancia farmacéutica es un antígeno o una vacuna de ADN capaz de producir una respuesta inmune en un ave.

10 12. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la sustancia farmacéutica se inyecta a chorro dentro del músculo de la pechuga de un ave.

15 13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la vacuna de ADN produce una respuesta protectora contra enfermedad de Marek, IBDV, enfermedad Bursal Infecciosa, infección coccidial, virus de la Enfermedad de Newcastle o ILT.

14. Un aparato de inyección a chorro in ovo automatizado, caracterizado porque comprende:

20 una superficie plana para mantener una pluralidad de huevos en una posición vertical y alineada sustancialmente, en donde la superficie plana se configura para proporcionar acceso externo en áreas predeterminadas de los huevos;

25 una pluralidad de dispositivos de suministro de inyección a chorro configurados para poner en contacto áreas

predeterminadas del huevo, al menos uno de los dispositivos de inyección a chorro que corresponden a cada huevo en la superficie plana;

un primer recipiente de sustancia de tratamiento
5 para mantener una primera sustancia de tratamiento, el primer recipiente en comunicación fluida con cada uno de los dispositivos de suministro de inyección a chorro, y opcionalmente, un segundo recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una sustancia de tratamiento, el
10 segundo recipiente en comunicación fluida con cada uno de los dispositivos de suministro de inyección a chorro.

15. El dispositivo de inyección a chorro automático de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque comprende un medio para perforar el cascarón de un
15 huevo, el medio es capaz de colocarse en una posición predeterminada en la superficie de un huevo.

16. El dispositivo de inyección a chorro automático de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque cada dispositivo de suministro de inyección a chorro tiene un
20 medio para introducir una abertura en un huevo, la abertura se coloca con relación a un dispositivo de suministro de inyección a chorro por lo que el dispositivo de suministro de inyección a chorro puede dirigir una corriente de inyección a chorro a través de la abertura y dentro del huevo.

25 17. El dispositivo de inyección a chorro automático

de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el medio para introducir una abertura en un huevo es un punzón tubular, una broca en espiral, una broca tubular que tiene un lumen en la misma, o un chorro de gas a alta
5 presión.

18. El dispositivo de inyección a chorro automático de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el punzón tubular es coaxial con la corriente de inyección a chorro suministrada por el dispositivo de suministro de
10 inyección a chorro.

19. El dispositivo de inyección a chorro automático de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el chorro de gas a alta presión comprende además un abrasivo para moler una abertura dentro del cascarón del huevo, un
15 lubricante, un desinfectante o cualquier combinación de los mismos.

20. El dispositivo de inyección a chorro automático de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque comprende además un medio para remover el cascarón de huevo
20 molido a partir de la superficie del huevo.

21. El dispositivo de inyección a chorro automático de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque al menos un dispositivo de inyección a chorro que corresponde a cada huevo incluye primeros y segundos dispositivos de
25 inyección a chorro que corresponden a cada huevo en la

superficie plana.

22. El dispositivo de inyección a chorro automático de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el primer dispositivo de inyección se configura para inyectar
5 el extremo grande superior del huevo y el segundo dispositivo de inyección a chorro se configura para inyectar dentro de una abertura separada parte del primer dispositivo de inyección a chorro.

23. Un aparato de inyección in ovo automatizado,
10 caracterizado porque comprende:

una superficie plana para mantener una pluralidad de huevos en una posición alineada, en donde la superficie plana se configura para proporcionar acceso externo en áreas predeterminadas de los huevos;

15 una pluralidad de primeros dispositivos de suministro de inyección a chorro, en donde cada dispositivo de suministro de inyección a chorro se configura para dirigir una corriente de sustancia de tratamiento a un huevo, uno de los primeros dispositivos de suministro de inyección
20 corresponde a cada huevo en la superficie plana;

una pluralidad de segundos dispositivos de suministro de inyección a chorro configurados para poner en contacto áreas predeterminadas del huevo uno de los segundos dispositivos de suministro de inyección a chorro corresponde
25 a cada huevo en la superficie plana;

un primer recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una primera sustancia de tratamiento, el primer recipiente en comunicación fluida con cada uno de los dispositivos de suministro de inyección a chorro;

5 un segundo recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una segunda sustancia de tratamiento, el segundo recipiente en comunicación fluida con cada uno de los segundos dispositivos de suministro de inyección;

un medio de bombeo operablemente asociado con el
10 primero y segundo recipientes para suministrar una dosis predeterminada de cada una de las primeras y segundas sustancias de tratamiento a cada uno de los respectivos primeros y segundos dispositivos de inyección a chorro; y

un medio para introducir al menos una abertura en
15 cada huevo, en donde cada abertura se coloca con relación a un dispositivo de suministro de inyección a chorro por lo que el dispositivo de suministro de inyección a chorro puede dirigir una corriente de inyección a chorro que comprende una sustancia de tratamiento a través de la abertura y dentro del
20 huevo.

24. El aparato de inyección a chorro *in ovo* automatizado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el medio para abrir un huevo es integral al dispositivo de suministro de inyección a chorro.

25 25. El aparato de inyección a chorro *in ovo*

automatizado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el primer recipiente y cada uno de los primeros dispositivos de suministro de inyección a chorro define una primera trayectoria de fluido entre ellos y el
5 segundo recipiente y cada uno de los segundos dispositivos de suministro de inyección a chorro define una segunda trayectoria de fluido entre ellos, en donde la primera trayectoria se separa de la segunda trayectoria.

26. El aparato de inyección a chorro *in ovo*
10 automatizado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el primer dispositivo de inyección a chorro se configura para suministrar una primera sustancia de tratamiento en una primera ubicación debajo de la célula aérea del huevo y el segundo dispositivo de inyección a
15 chorro se configura para suministrar una segunda sustancia de tratamiento en una segunda ubicación en el huevo.

27. Un aparato de inyección a chorro *in ovo* automatizado, caracterizado porque comprende:

una superficie plana para mantener una pluralidad
20 de huevos en una posición alineada, en donde la superficie plana se configura para proporcionar acceso externo en áreas predeterminadas de los huevos;

una pluralidad de dispositivos de suministro de inyección, al menos uno de los dispositivos de suministro de
25 inyección corresponde a cada huevo en la superficie plana,

cada uno de los dispositivos que tiene primer y segunda porciones extremas opuestas, la segunda porción extrema que tiene un puerto de extremo configurado para poner en contacto y penetrar dentro de una ubicación predeterminada en el
5 huevo;

un primer recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una primera sustancia de tratamiento, el primer recipiente en comunicación fluida con cada uno de los dispositivos de suministro de inyección;

10 un segundo recipiente de sustancia de tratamiento para mantener una segunda sustancia de tratamiento, el segundo recipiente en comunicación fluida con cada uno de los dispositivos de suministro de inyección;

una bomba asociada operablemente con los primeros y
15 segundos recipientes para suministrar una dosis predeterminada de cada una de las primeras y segundas sustancias de tratamiento a cada uno de los dispositivos de inyección, en donde las dosis predeterminadas de la primera y segunda sustancias de tratamiento se combinan antes del
20 puerto extremo que se suministra al huevo juntos en el sitio de inyección.

28. El aparato de inyección a chorro automatizado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque comprende además una cámara de mezclado en comunicación
25 fluida con el primero y segundo recipientes y los

dispositivos de inyección, la cámara de mezclado colocada intermedia de los recipientes y los dispositivos de inyección, por lo que se combina temporalmente la primera y segunda sustancias de tratamiento antes de la inyección y
5 suministrar la dosis predeterminada como una sustancia de tratamiento mezclada a lo largo de una trayectoria de fluido sencilla dentro de cada uno de los dispositivos de inyección.

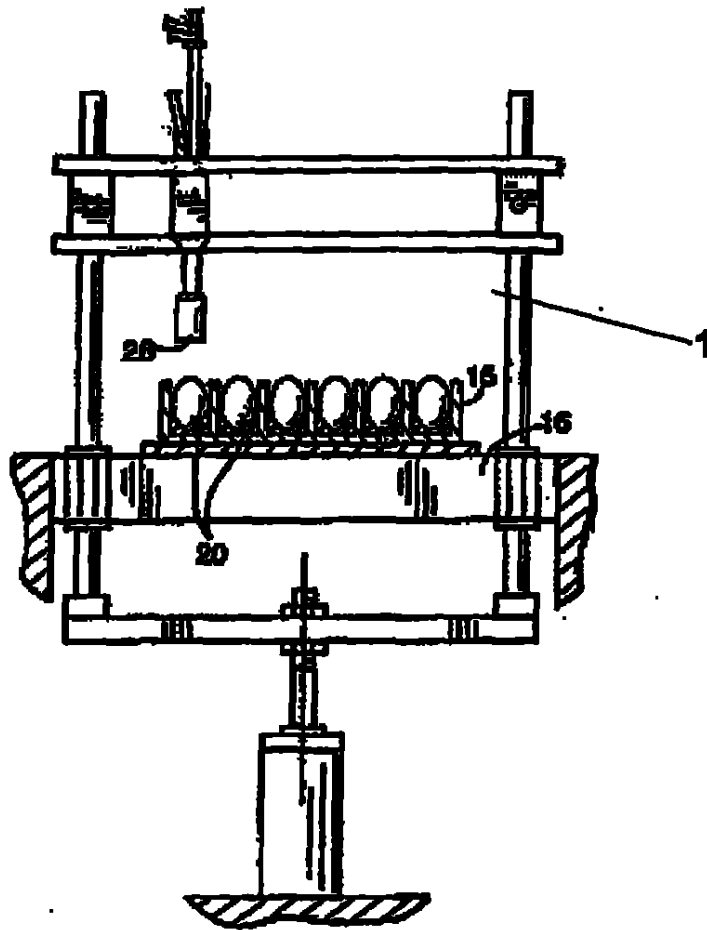
29. El aparato de inyección a chorro automatizado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque
10 el primer recipiente y cada uno de los dispositivos que define una primera trayectoria de fluido entre ellos y el segundo recipiente y cada uno de los dispositivos de inyección definen una segunda trayectoria de fluido entre ellos, en donde la primera y segunda trayectorias se separan,
15 pero se configuran para terminar a una trayectoria común en el primer extremo del dispositivo de inyección a chorro en el sitio de inyección.

30. El aparato de inyección a chorro automatizado de conformidad con la reivindicación 28, que comprende además
20 un tercer recipiente para mantener un líquido para limpieza, el tercer recipiente en comunicación fluida con la bomba, el primer recipiente, y cada uno de los dispositivos de inyección, por lo que se permiten trayectorias de fluido que se enjuagan con el líquido para limpieza.

25

RESUMEN

Un aparato para inyección a chorro *in ovo* y métodos relacionados para tratar huevos vivos. El aparato de inyección a chorro incluye uno o más dispositivos de suministro de inyección a chorro configurados para suministrar una o más sustancias de tratamiento en áreas predeterminadas de huevos utilizando una corriente de alta presión de la o las sustancias de tratamiento. Se pueden suministrar sustancias de tratamiento múltiples de manera que se separan en espacio y/o tiempo. Los dispositivos y métodos de la invención permiten el uso efectivo de una pluralidad de sustancias de tratamiento, incluyendo aquellas que son efectivas cuando se utilizan solas, pero pueden ser nocivas si se mezclan. Los métodos y el aparato para la inyección a chorro de las sustancias dentro de los polluelos embrionicos reducen el riesgo de daño mecánico a las aves en desarrollo que serían causados por agujas de inyección. Los métodos y el aparato de la invención pueden reducir también la introducción de una infección dentro de los polluelos.

**Fig. 1**

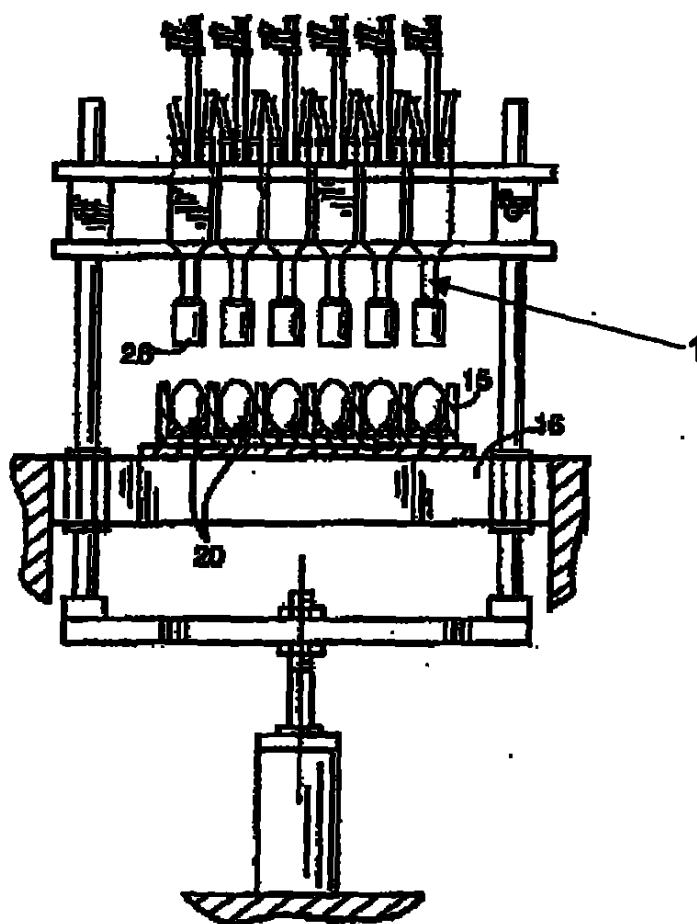
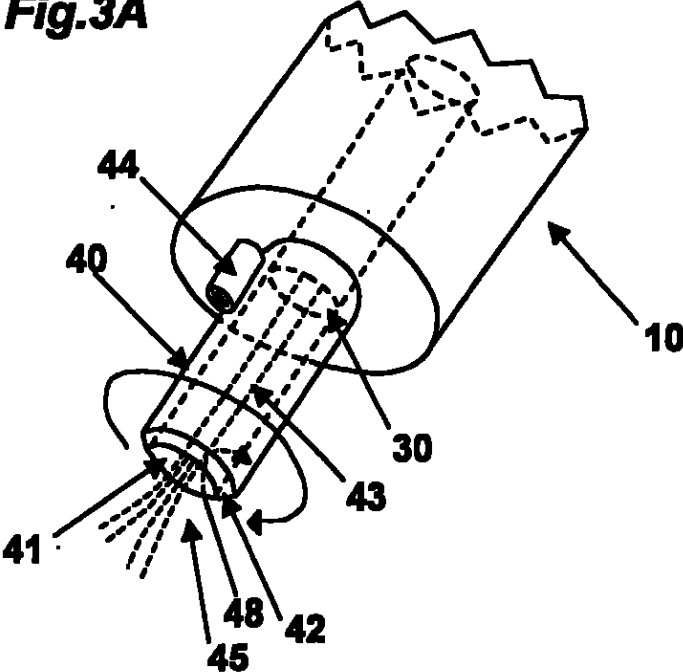
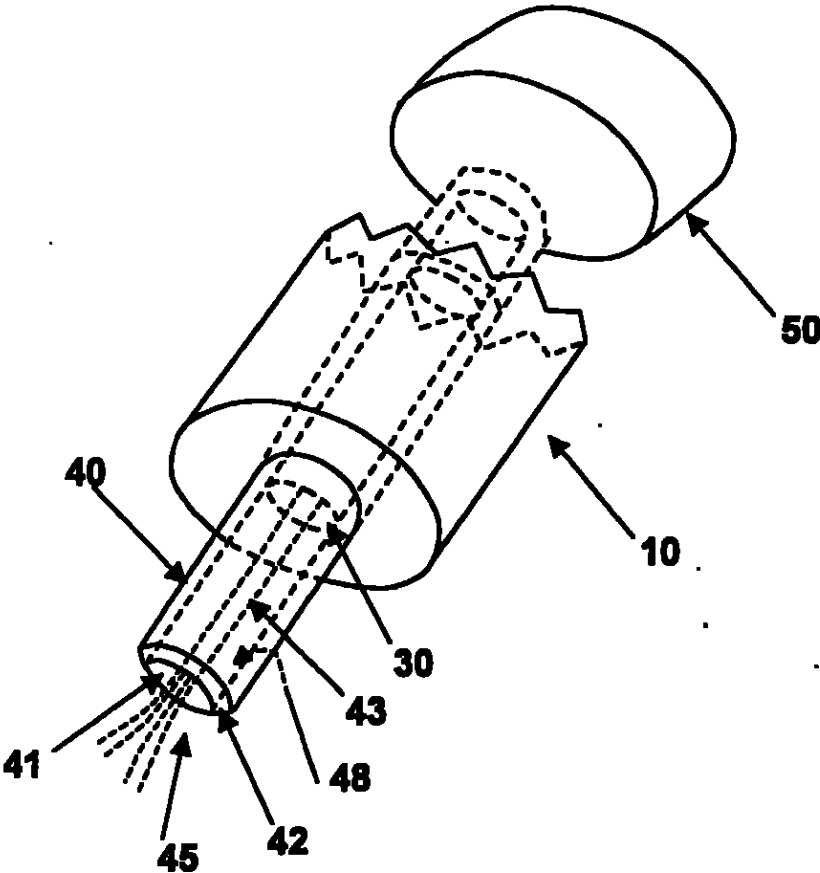


Fig. 2



154

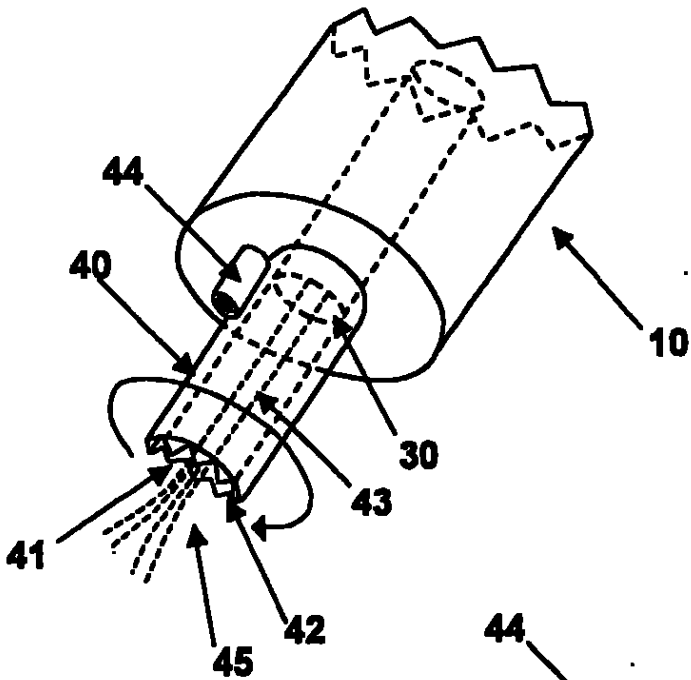


Fig.3C

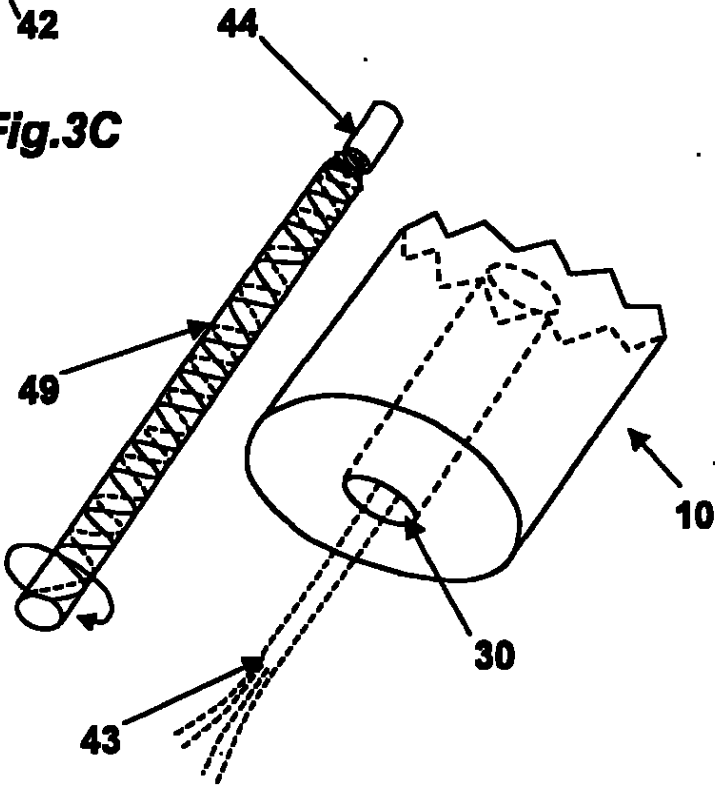


Fig.3D

189
160

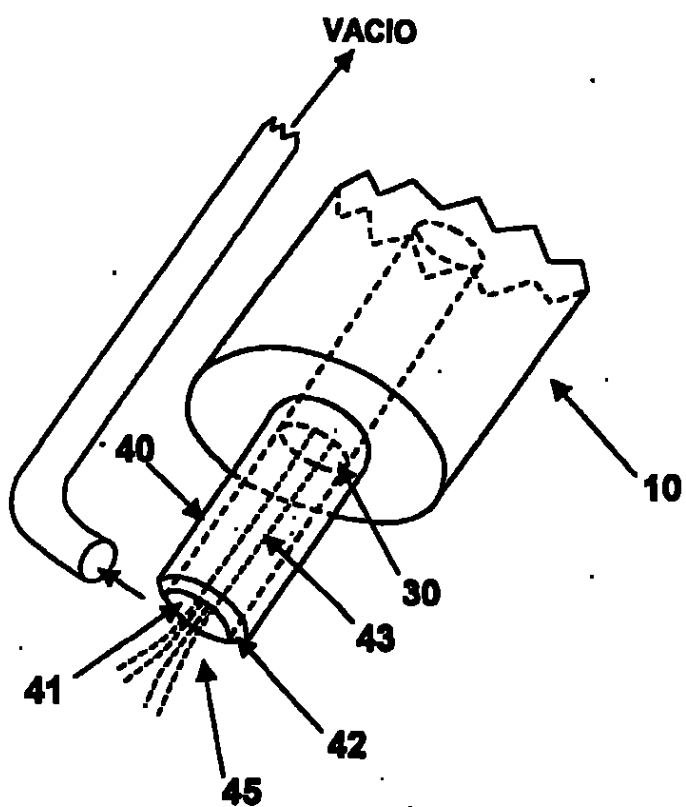


Fig.3E

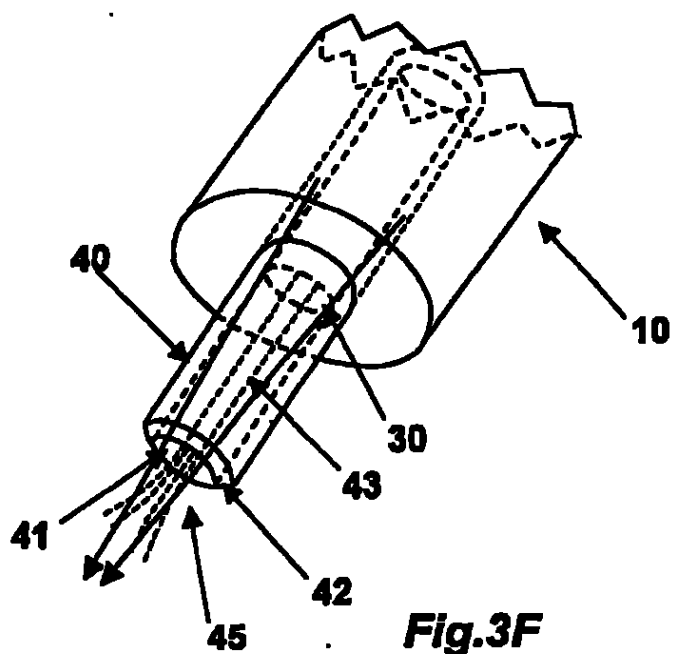
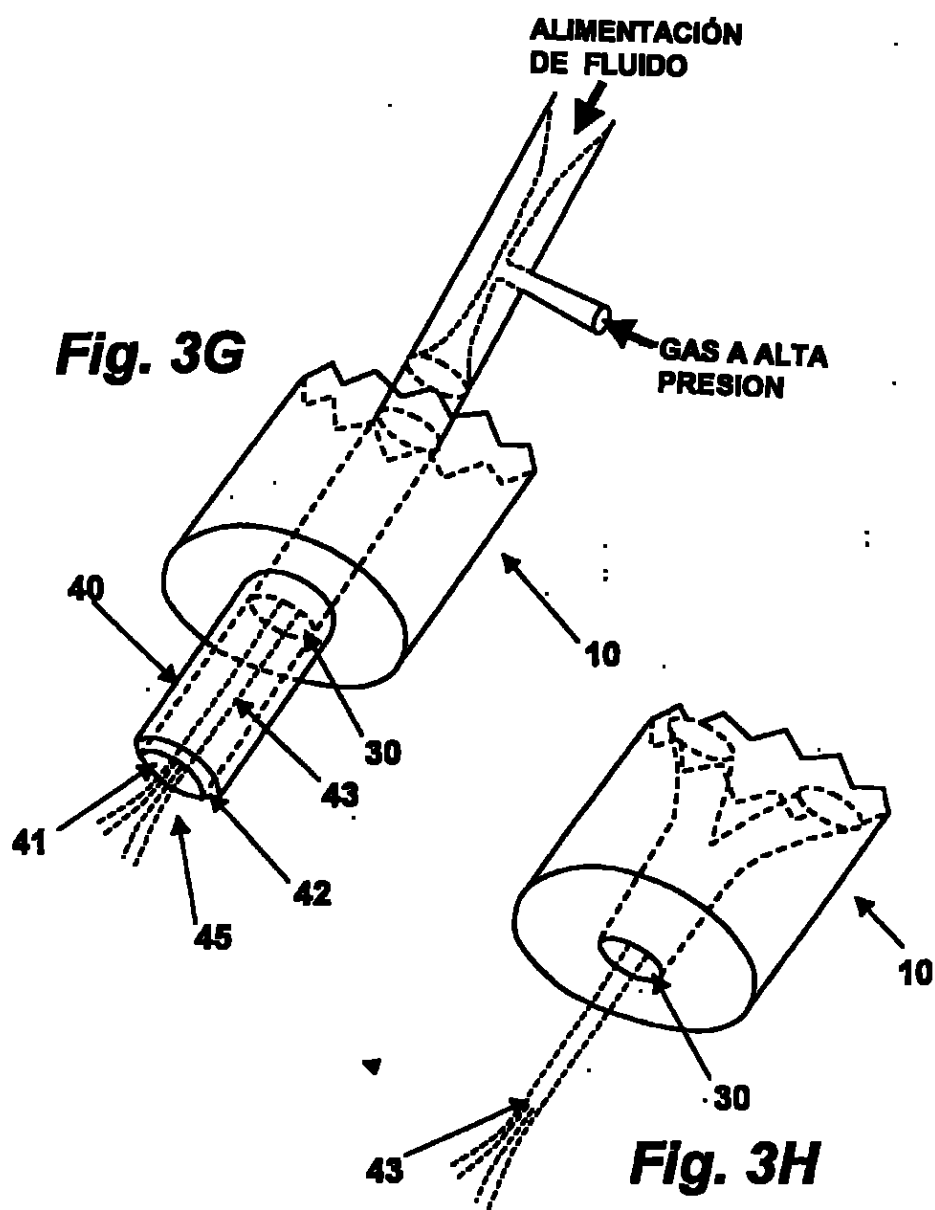


Fig.3F

160
161



181
162

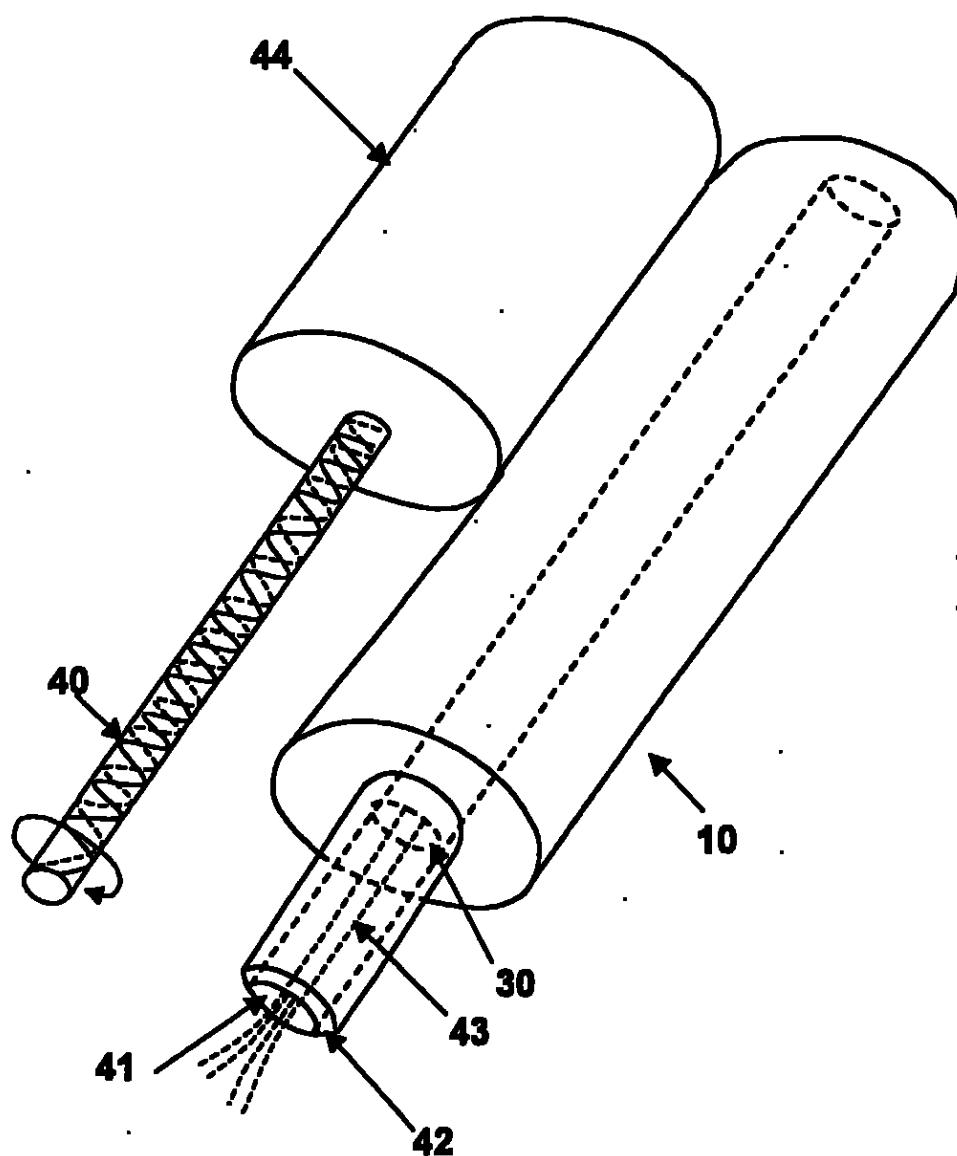


Fig. 4

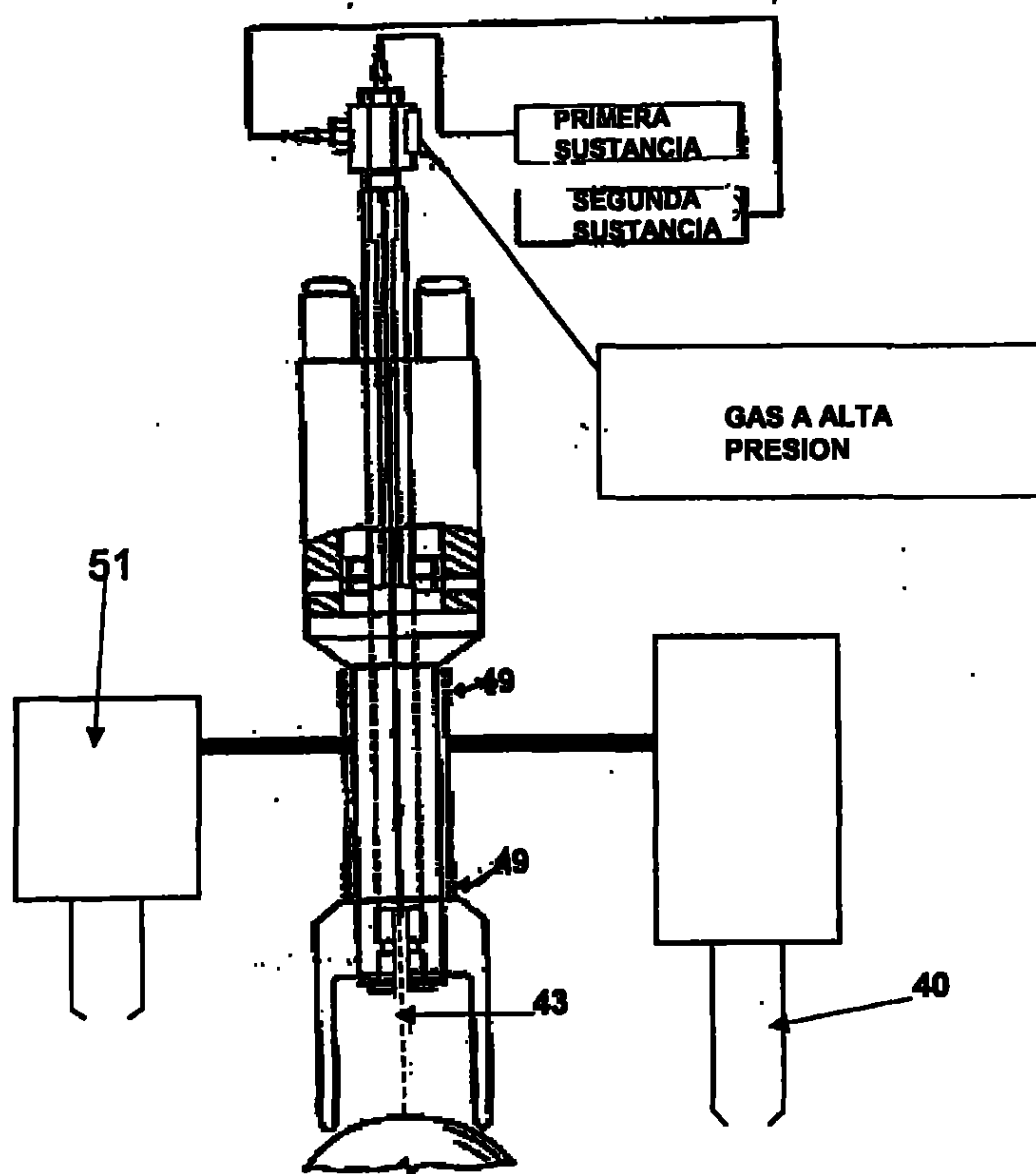


Fig. 5

163
16A

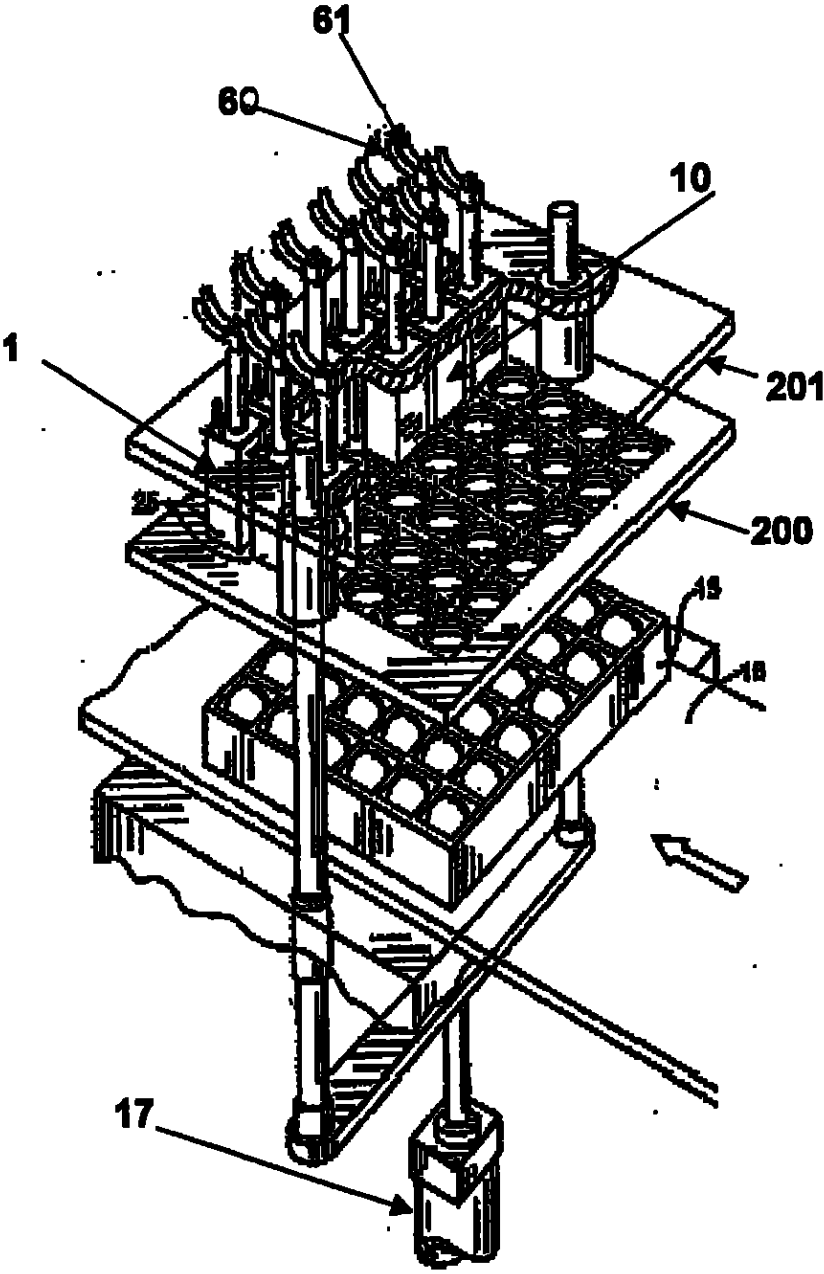


Fig. 6

164
165



Fig. 7A

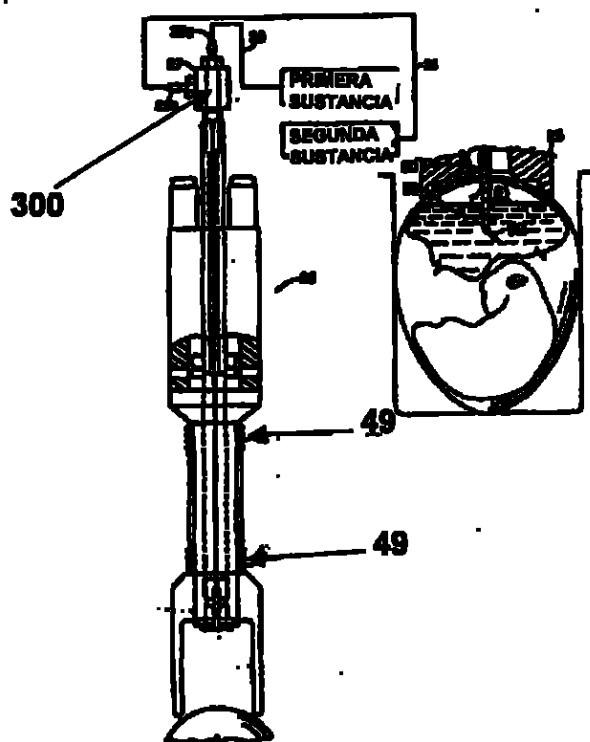


Fig. 7B

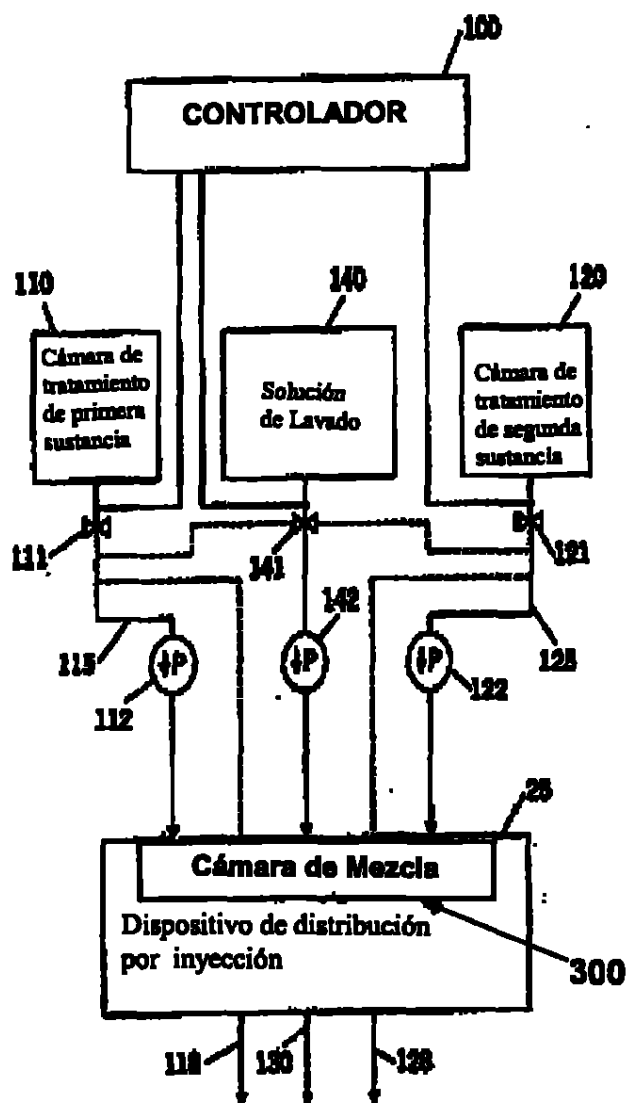
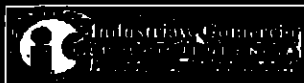


Fig. 8



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S.A.

Expediente No		No de unidades	No de Folio
Item			
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	/	n
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones:

Sobre con arte original

129
170

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-112566-00000-0000
Fec: 2006-11-03 17:39:27 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eve: 378 FASENACIONAL/
Act 411 PRESENTACION Folios: 189

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 01,717
FECHA : OCTUBRE 23 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54739448	23/10/2006	40,813,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 14306 841 008 1

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☒]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☒]
- ◆ Descripción de la Invención [☒]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [☒]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [☒]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha Nov. 3/08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

172

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
MERIAL LIMITED

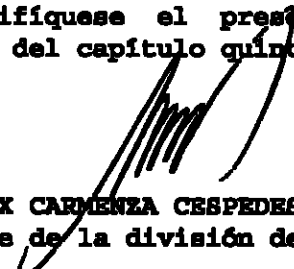
REFERENCIA	Radicación No.	6 112566
	Solicitud internacional	PCT/US2005/011194
	Fecha inicio fase nacional	03/11/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14647

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 22 DIC. 2006
adpall