

As. 110.375

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-063560- -00005-0000

Fecha: 2012-11-08 16:14:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 24

Señor

DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

REF: Expediente No. **09 063560**– solicitud de patente de invención a favor de **FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX** Título **COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE OLIGOGALACTURONANOS Y SACARIDOS POLICATIONICOS.**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al oficio número 14080 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 14 de Agosto de 2012.

Con el ánimo de subsanar las objeciones planteadas por el señor Examinador, nos permitimos presentar un nuevo pliego reivindicatorio compuesto por diez (10) reivindicaciones, en donde no se amplía en ningún momento la materia inicialmente divulgada, y se encuentra enteramente sustentado en la descripción.

En lo que respecta a las excepciones a la patentabilidad y a las reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso referidas por su Despacho, nos permitimos informar al señor Examinador que las anteriores reivindicaciones 13-18 han sido eliminadas del nuevo pliego reivindicatorio con el fin de superar las objeciones impuestas sobre las mismas.

Claridad

En primera medida queremos referirnos a los términos objetados por el señor Examinador, señalados por ser "de carácter no limitativo", al respecto consideramos que dichos

términos se corresponde con expresiones completamente claras al ser interpretadas en el contexto de las reivindicaciones, y hacen parte del derecho que tiene el solicitante de proteger su invención de posibles infracciones por parte de terceros.

Específicamente el termino "uno o más" se refiere a la selección de mínimo uno o máximo todos los elementos allí mencionados, razón por la cual en dicho contexto la expresión en cuestión si se interpreta como una expresión limitativa. Por tanto, dicha expresión no se eliminó en el nuevo pliego reivindicatorio. Por demás, las demás expresiones fueron retiradas de la materia reivindicada.

Ahora bien, nos permitimos aclarar al señor Examinador que la descripción de la presente solicitud cuenta con todo el soporte requerido para el entendimiento de la materia incluida en las reivindicaciones, al considerar que el solicitante ha encontrado que diferentes compuestos pueden ser de utilidad para la solución del problema técnico propuesto. Por tanto, ante la sugerencia del señor Examinador de limitar toda la materia revelada a un compuesto específico, mostramos nuestro total desacuerdo al considerar que una restricción de tal tipo sería injusta, pues en definitiva una serie de agentes cumplen con las funciones requeridas dentro de la presente invención. Además, el señor Examinador debe tener en cuenta que varios de los agentes que objetó se corresponden con agentes adicionales, que constituyen modalidades preferidas de la invención y por tanto los mismos no corresponden con las características esenciales de la presente invención.

Así, con el ánimo de demostrar al señor Examinador que la descripción se constituye un sustento para el pliego reivindicatorio, nos permitimos referir algunos fragmentos de la respectiva descripción,

Ventajosamente, el sacárido policatiónico es un oligo- o un polisacárido, preferentemente un oligosacárido de quitosán o polímero de quitosán, más preferentemente, los oligo- o polisacáridos de quitosán utilizados presentan un grado de acetilación inferior al 50%, preferentemente comprendido entre 0 y aproximadamente el 50% y un grado de polimerización superior a 5.

Además, al observar las modificaciones realizadas a la nueva reivindicación 1 consideramos que la misma se encuentra adecuadamente limitada y sustentada por la descripción.

- 3
1. *Una composición que comprende uno o más oligogalacturonano(s) con un grado de polimerización comprendido entre 9 y 20 y que presenta una configuración dimérica de caja de huevo estabilizada además por uno o más oligosacáridos o polisacáridos de quitosano policatiónicos en presencia de cationes.*

Por tanto, las restricciones incluidas en la nueva reivindicación 1 definen un rango de grado de polimerización, lo cual en definitiva es una limitación bastante razonable. Lo anterior debe considerarse en conjunto con las demás reivindicaciones, dependientes, que se encargan de definir las modalidades preferidas de la invención, y que por tanto complementan la materia revelada.

Así, por ejemplo, la reivindicación establece:

3. *La composición de acuerdo a las reivindicaciones 1 o 2, en donde el oligosacárido o el polisacárido de quitosano presenta un grado de polimerización comprendido entre 5 y 12.*

Por otra parte, en lo que se refiere a la presencia de iones en la composición, nos permitimos aclarar que el solicitante demostró que tanto los cationes monovalentes como los divalentes son en efecto necesarios en un rango específico para así dar paso a la formación de la configuración de caja de huevo por los oligogalacturonanos. La descripción establece,

"Ya que los diferentes elementos contienen iones monovalentes y divalentes, en una relación molar divalente/monovalente, preferentemente entre aproximadamente 1/50 y aproximadamente 1/300 (o aproximadamente 1/25 y aproximadamente 1/250 miliequivalentes) (...)

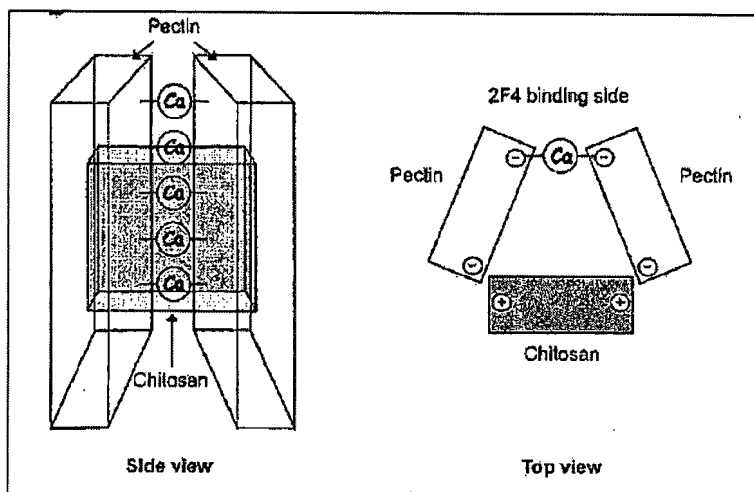
Se utiliza preferentemente Ca^{2+} como ión divalente. Otros cationes divalentes son también adecuados (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , ...)." .

Por tanto, en este caso, y en los casos de los demás agentes mencionados a lo largo de la descripción, el señor Examinador debe tener en cuenta que la materia reivindicada debe encontrar sustento en la totalidad de las enseñanzas de la descripción pero de ninguna manera debe centrarse dicho sustento en los ejemplos de la misma, de acuerdo a lo consignado en el artículo 30 de la Decisión 486. Por su parte, la guía de patentabilidad

establece que los ejemplos son casos particulares que sirven para ilustrar la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a la práctica la invención. Reiteramos entonces que los ejemplos son plenamente ilustrativos de la materia reivindicada más no limitativos de la misma, y que toda la materia reivindicada en la presente solicitud, se encuentra completamente sustentada en la totalidad de las enseñanzas de la descripción.

Ahora bien, en lo que se refiere a la sugerencia del señor Examinador respecto a la estabilización de la estructura de caja de huevo por acción de los sacáridos policatiónicos, nos permitimos expresar al señor Examinador nuestro desacuerdo frente a la interpretación que éste realizó de tal información contenida en la reivindicación 1. En primer lugar, es vital aclarar que estabilizar la conformación de caja de huevo adoptada por los oligogalacturonanos no es de ninguna manera el "resultado a alcanzar" de la composición de la presente invención, de hecho, el señor Examinador debe comprender que la composición de la presente invención ejerce su acción debido a que la misma contiene oligogalacturonanos en una conformación específica de caja de huevo, la cual se encuentra estabilizada por sacáridos policationicos, y por tanto la mención de dicha característica se constituye un aspecto esencial de la presente invención, siendo esta la razón por la cual no es viable de ninguna manera, eliminar dicha información del alcance de la reivindicación 1.

En referencia a la objeción emitida hacia la reivindicación 2, nos permitimos dar argumentos para demostrar al señor Examinador que incurre en un error al asegurar que la misma se refiere a una metodología de caracterización estructural. En primera medida queremos recordarle al señor Examinador que las características esenciales de una invención se encuentran reflejadas en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes definen modalidades preferidas de la invención. Por otra parte, aclaramos que la reivindicación 2 se encuentra dentro del pliego reivindicatorio para describir una característica técnica de la composición objeto de la presente invención, en la cual se refleja que el solicitante ha demostrado que los anticuerpos 2FA reconocen específicamente la región bisagra pectica, es decir, que contiene derivados del ácido galactourónico, de la conformación de caja de huevo. Lo anterior encuentra ilustración en la siguiente figura,



Cabrera et al. 2010

Por tanto, la razón para incluir dicha característica estructural como parte de las reivindicaciones dependientes radica en que el reconocimiento de la conformación de caja de huevo que adoptan los oligogalacturonanos por parte de los anticuerpos 2FA representa una característica particular de la presente invención.

Queremos aclarar al señor Examinador que la composición de la presente invención puede hacer parte de una serie de productos, los cuales se encuentran especificados por las anteriores reivindicaciones 9 y 10, lo cual de ninguna manera debe ser interpretado como un uso. Lo que pretenden dichas reivindicaciones es aclarar que la composición puede ser concebida haciendo parte de otras composiciones más complejas, lo cual en definitiva hace parte del derecho con que cuenta el solicitante de proteger la materia de su invención, para no dar vía libre a futuras infracciones que con la aplicación de una modificación trivial podrían buscar el uso de la presente invención como parte de cualquier otro sistema que la contenga.

En lo que se refiere al empleo de la marca comercial *Pectinex Ultra SLP*, en definitiva consideramos que el mismo se corresponde con un producto altamente utilizado y por tanto muy conocido en el arte previo. Dicho producto contienen poligalacturonasa aislada de *Aspergillus aculeatus*.

Finalmente, nos permitimos solicitar respetuosamente al señor Examinador que realice una lectura juiciosa de la descripción de la presente solicitud, con lo cual podrá encontrar que la misma establece claramente que el objetivo de la presente invención es proveer una composición que comprenda galacturonanos con propiedades mejoradas, que

encuentran especial interés en la protección de material vegetal, al considerar que el arte previo no concibe composiciones con dichas características.

En conclusión, consideramos que el alcance de las nuevas reivindicaciones se encuentra debidamente sustentado en la totalidad de las enseñanzas de la descripción y más aun teniendo en cuenta que los ejemplos son plenamente ilustrativos de la invención pero de ninguna manera se deben considerar como limitativos de la materia reivindicada, por la cual solicitamos respetuosamente aceptar el nuevo pliego reivindicatorio como claro y conciso.

Novedad

Partiendo de las referencias citadas por el señor Examinador, según las cuales él considera la falta de novedad de la presente invención, nos permitimos exponer los argumentos mediante los cuales defendemos la novedad de la composición reivindicada a la luz del arte previo.

En primera medida, observamos que la referencia **D1 (WO2006/085075)** describe la elaboración de pectinas reticuladas por polietilenimina, las cuales son usadas como dispositivos de liberación de fármacos en el tracto gastrointestinal, midiéndose dicha capacidad de liberación mediante ensayos por digestión en un medio intestinal simulado que se caracteriza por la presencia de enzima pectinolítica.

Así, D1 describe dos fases principales para la realización de su respectiva invención, en donde la primera fase corresponde a la formación de gránulos de hidrogel mediante el uso de una pectina de alto peso molecular, altas concentraciones de calcio, y la posterior reticulación a través de polietilenimina en presencia de una molécula de interés a ser liberada en el tracto gastrointestinal. Previo a la segunda fase, los gránulos obtenidos han de ser enjuagados en agua, para continuar con el análisis de la liberación de la molécula de interés mediante la digestión de un medio que contiene una alta concentración de pectinasa, en buffer fosfato, de acuerdo a los requerimientos de la Farmacopea de los Estados Unidos, que establece que los componentes de un medio intestinal estimulado se logra mediante:

- Disolución de 6,8 g de fosfato de potasio monobásico en 250 mL de agua
- Mezcla y posterior adición de 77 mL de NaOH 0,2 N y 500 mL de agua
- Adición de 10,0 g de pancreatina

- Mezcla y ajuste de pH mediante el uso de NaOH 0,2 N o HCl 0,2 N hasta obtener un pH de 6,8.
- Dilución con agua, hasta volumen de 1000 mL

Por su parte la referencia **D2 (Chang L.L.B. and Lin J. (2000))** describe la elaboración de gránulos de pectina en altas concentraciones de calcio (4-20%) y en presencia de quitosano. Dentro de dicha referencia se establece además que los gránulos de pectina obtenidos se destinan, al igual que en D1, al uso como dispositivos de liberación de fármacos de interés para el tracto intestinal, aspecto que es probado mediante ensayos de digestión en los cuales se hace uso de una enzima pectinolítica en un buffer fosfato.

La referencia **D3 (Munjeri et al (1997))** establece por su parte la elaboración de gránulos de pectina amidada en altas concentraciones de calcio y en presencia de quitosano, las cuales son destinadas, nuevamente, al uso como dispositivos de liberación de fármacos al tracto gastrointestinal, probándose su aptitud para la liberación mediante digestión con una enzima pectinolítica en buffer fosfato.

Finalmente, **D4 (Atyabi et al. (2005))** incluye materia relacionada con el comportamiento de gránulos de gel que contienen cloruro de trimetil quitosano como dispositivos de liberación para macromoléculas solubles en agua.

En contraste con las referencias anteriores, la presente invención reivindica una composición que comprende uno o más oligogalacturonanos con un grado de polimerización comprendido entre 9 y 20, y que presenta una configuración dimérica de caja de huevo estabilizada además por uno o más oligosacáridos o polisacáridos de quitosano policatiónicos en presencia de cationes.

De esta manera, de acuerdo con las enseñanzas del arte previo nos permitimos aclarar al señor Examinador que ninguno de los procedimientos descritos en las referencias D1 a D4 que refieren la digestión de gránulos de pectina y quitosano en presencia de buffer y un medio estimulante de la digestión, permiten la generación de oligogalacturonanos con un grado de polimerización superior a 8, y por tanto no permiten la generación de oligogalacturonanos que puedan adoptar la conformación de caja de huevo que si adoptan los referidos por la presente invención.

Así, a partir de las enseñanzas del arte previo se conocen, entre otras, las siguientes situaciones:

- La metilesterificación de pectina impide la unión de calcio y por tanto la posterior formación de la configuración de caja de huevo (*Liners et al. Plant Physiol. (1992) 99, 1099-1104*). Dicho aspecto desvirtúa la objeción de novedad basada en las referencias D1, D2 y D4.
 - Los buffer de fosfatos se consideran inadecuados para la preparación de oligogalacturonanos que exhiban una conformación de caja de huevo, debido fundamentalmente a que los mismos generan la precipitación del Ca^{2+} en forma de fosfato de calcio, razón por la cual se genera una deficiencia en la concentración de iones Ca^{2+} , y por tanto impide la formación de los dímeros de caja de huevo, pues en ausencia de Ca^{2+} , se ha demostrado que los anticuerpos 2F4 no detectan conformaciones caja de huevo. De tal manera, un medio sin Ca^{2+} tal como el que se emplea en D1 no es el apropiado para obtener oligogalacturonanos como los reivindicados en la presente invención (*Liners et al. Plant Physiol. (1989) 91, 1419-1424*). Dicho aspecto desvirtúa la objeción de novedad basada en la totalidad de las referencias citadas.
 - En el arte previo es bien conocido que las poligalacturonasas no hidrolizan pectinas metilesterificadas, pero si tienen la capacidad de hidrolizar enlaces glicosídicos presentes entre residuos ácidos en cadenas pectínicas. Así, con un porcentaje de metilesterificación del 30% no se cuenta con unidades suficientes para la formación de la configuración caja de huevo (*Luh and Phaff (1953) Arch. Biochem. Biophys. 48 (1) 23-37*) (*Liners et al (1992) Fig 1, p. 1101*). Dicho aspecto desvirtúa la objeción de novedad basada en la totalidad de las referencias citadas.
- La digestión de pectina para la obtención de oligogalacturonanos con un grado de polimerización mayor a 8 requiere de una presencia extremadamente baja de pectinasa, mientras que la digestión de quitosano para obtener quito-oligosacaridos requiere concentraciones muy altas de tal pectinasa debido a que el quitosano no se corresponde con un sustrato natural de la enzima. Por tanto, mediante la co-digestión de pectina y quitosano por medio de pectinasa, tal como se establece en D1 a D4, es imposible la obtención simultánea de fragmentos de quitosano y pectina con una dimensión adecuada para la obtención de los

oligogalacturonanos reivindicados en la presente invención, puesto que la concentración de pectinasa en las referencias citadas es extremadamente alta y generaría la reducción de la pectina a monómeros y oligómeros con un grado de polimerización considerablemente bajo (*Luh and Phaff (1953) Arch. Biochem. Biophys. 48 (1) 23-37*). Dicho aspecto desvirtúa la objeción de novedad basada en la totalidad de las referencias citadas, contrastándose lo anterior con las enseñanzas de la presente invención, en donde los quitoooligosacaridos y los ácidos oligogalacturonicos, con grado de polimerización específico, son preparados de manera individual, para ser posteriormente mezclados, dando paso a la formación de complejo reivindicado.

Así las cosas, bajo las condiciones expuestas por la referencia D1, particularmente las establecidas en la segunda etapa, los fragmentos de pectina recubiertos con polietilenimina generados por la digestión enzimática de los gránulos de pectina, no tienen la capacidad de adoptar la conformación de caja de huevo dimérica. Adicionalmente, teniendo en cuenta la necesidad de la presencia de Ca^{2+} , que en el caso de D1 se precipita debido al buffer fosfato, el solicitante ha establecido clara e inequívocamente que la conformación de caja de huevo dimérica se lleva a cabo con un rango óptimo de relación de iones divalentes:monovalentes, siendo éste último un aspecto no contemplado para los fines de la invención de D1.

Como evidencia adicional, nos permitimos remitir los resultados de un ensayo aprobado por el Journal Internacional de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas (IJPPS, Vol 3, Suppl 5, 2001) realizado por el solicitante, en donde se demuestra puntualmente que bajo las condiciones de digestión haciendo uso de pectinasa contempladas en la referencia D1, los gránulos de pectina recubiertos con polietilenimina y quitosan no son aptos para la producción de oligopectatos con un grado de polimerización mayor a 2, y por tanto no pueden dar paso a la formación de una configuración de caja de huevo. Lo anterior se suma a la confirmación mediante un ensayo por HPLC, en donde dicha técnica analítica demuestra que no es posible encontrar oligogalacturonido alguno en la fracción soluble de los gránulos de pectina y Ca^{2+} tanto amidados como no amidados, tras un tiempo de incubación de aproximadamente 5 horas en diferentes medios estimulados, en donde es de gran importancia resaltar la presencia de picos que se caracterizan por presentarse en tiempos que no se corresponden con los tiempos de retención estándar de los oligogalacturonidos. El mismo ensayo se presta como confirmación de la presencia de ácidos monogalacturonico y digalacturonico, en presencia de pectinasa, y que dichos

compuestos de bajo grado de polimerización no se encuentran en capacidad de formar la configuración de caja de huevo, en concordancia con los ensayos por ELISA evidenciados en la Figura 7 de dicho estudio. Finalmente, queremos incluir la información ilustrada por la figura 8, la cual evidencia que el uso de polietilenimina genera una fuerte inhibición de la formación de la conformación de caja de huevo del ácido oligogalacturónico inducida por Calcio.

De manera similar, bajo las condiciones contempladas en las referencias D2 y D3, es decir, la co-digestión de pectina y quitosano mediante una pectinasa, no se da paso a la obtención de fragmentos de oligogalacturonidos con el tamaño adecuado para formar dímeros de caja de huevo que se establezcan por quitooligosacáridos. Por tanto, como fue expuesto previamente, el empleo de buffer fosfato impide la formación de los dímeros en la conformación reivindicada, dando paso a la obtención de oligómeros de pectina con grados de polimerización inferiores a 3, y por tanto la materia revelada por dichas referencias no se considera como materia que afecte la novedad de la presente invención.

Finalmente, en el caso de D4, el señor Examinador puede notar que la pectina usada presente características estructurales muy similares a la contenida en D3, 28% de metilación y 20% de amidación vs. 23% metilación y 24% de amidación, y se enseña el empleo de una pectina y una digestión con las mismas características que en D3. Por tanto, se obtienen los resultados referidos para el caso de la referencia D3.

En conclusión no consideramos que las enseñanzas dadas por ninguno de los documentos D1-D4 contengan de forma alguna la totalidad de las características de la presente invención y por tanto nos permitimos concluir que la composición aquí reivindicada es novedosa a la luz de las referencias citadas, siendo imposible la obtención de dicha invención mediante la aplicación de las enseñanzas de tales referencias.

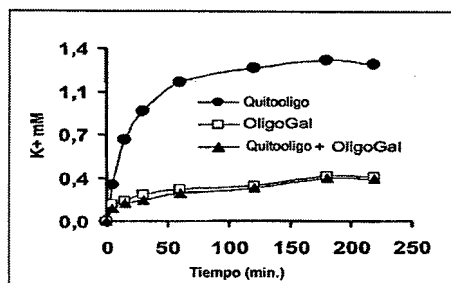
Nivel inventivo

Consideramos que ninguna de las referencias citadas en el Oficio Técnico describen, ni sugieren, composiciones que comprendan fragmentos de oligogalacturonanos que presenten un grado de polimerización entre 9 y 20, caracterizándose por tener una conformación de caja de huevo dimérica que se encuentra estabilizada por sacáridos policationicos.

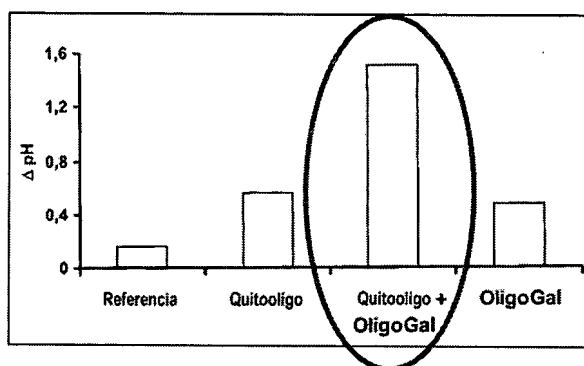
Particularmente, pudimos identificar que ninguna de las referencias citadas especifica el tipo de quitooligosacaridos que han de ser usados en conjunto con los oligogalacturonanos, y por tanto, las mismas tampoco pueden concebir dentro de sus enseñanzas que las condiciones de digestión que son requeridas para la obtención de fragmentos de quitooligosacaridos con un grado de polimerización mayor a 5 y la obtención de fragmentos de oligogalacturonanos con un grado de polimerización entre 9 y 20, son mutuamente exclusivos.

Ahora bien, queremos referirnos a la aseveración del señor Examinador, mediante la cual asegura que la combinación de oligogalacturonanos y quitosano no parece conceder un efecto técnico inesperado. Al respecto, nos permitimos desmentir dicha afirmación, al aclarar que los efectos obtenidos con la composición aquí reivindicada son inesperados, al considerar que los efectos de los componentes individuales, es decir, quitooligosacarido y ácido oligogalacturonicos como entidades individuales, pues la presente composición actúa por un mecanismo de acción completamente diferente al de los componentes por separado, de manera tal, que la presente invención presenta resultados que no son obvios a la luz del estado del arte.

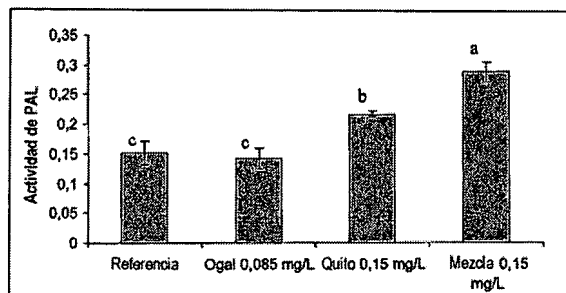
De esta manera, el solicitante ha demostrado que los efectos de la composición objeto de la presente solicitud difieren completamente de los resultados obtenidos con cada uno de los componentes por separado. Con el ánimo de demostrar lo anterior, nos queremos referir a un estudio realizado sobre el eflujo K^+ , el cual corresponde a uno de los eventos clase en la vía de transducción que lleva a múltiples mecanismos de defensa, aplicado a células de Arabidopsis, en donde se demostró eflujo de potasio desde células de Arabidopsis en suspensión tratadas con quitooligomeros, oligalacturonidos o la mezcla de éstos, y mas exactamente queremos recalcar que la Figura 10 de la descripción se corresponde con una evidencia del efecto mejorado de control del eflujo de potasio de la mezcla de quitooligomeros y acidos oligogalacturonicos, lo cual no se constituye como una simple adición de los efectos de quitooligosacaridos y de oligogalacturonidos.



Ahora bien, otro de los aspectos analizados corresponde a la alcalinización del medio, aspecto que se constituye como una de las respuestas más tempranas de las células vegetales frente a los elicitores. Al respecto la figura 12 de la presente solicitud evidencia que la mezcla de quitoooligómeros y ácidos oligogalacturónicos induce una alta alcalinización del medio en comparación con los componentes individuales, y por tanto se encuentra un efecto superior al del generado por la simple suma de componentes.



En tercer lugar, queremos incluir el análisis realizado sobre la actividad de fenilalanina amoniaco liasa (PAL) en plantas de *Arabidopsis*, la cual se encuentra implicada en la defensa contra el estrés biótico producido por patógenos al ser la primera enzima de la vía de señalización fenilpropanoide. En este sentido las plantas tratadas únicamente con oligogalacturonidos, únicamente con quitoooligómeros y con la composición de la presente invención, evidenciaron comportamientos claramente definidos, en donde, se observó una estimulación con características sinérgicas al aplicarse la mezcla reivindicada por la presente invención. Al respecto, la figura 9 representa la producción de actividad de PAL en plantas de *Arabidopsis* tratadas con oligogalacturónidos, quitoooligómeros o su combinación, en donde una prueba ANOVA indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para las plantas tratadas con quitoooligómeros o mezcla.



Finalmente, nos permitimos referir al señor Examinador a la Tabla 3 de la respectiva descripción en donde es posible evidenciar que al comparar los genes cuya expresión se encuentra alterada por la composición de la presente invención o los componentes individuales, se concluye que el comportamiento de la composición reivindicada sobre la expresión genética no se constituyen como la adición del efecto individual de los componentes en cuestión. En efecto, al centrarse el interés sobre el gen At3g44870, un gen altamente conocido por codificar una proteína de defensa metiltransferasa, el solicitante demostró que el nivel de expresión de dicho gen disminuye significativamente por acción de la composición de la presente invención, mientras que en contraste, uno de los componentes individuales, el quitooligosacarido, genera un incremento significativo de la expresión del gen en mención, mientras que los oligogalacturonanos no generan alteración alguna.

Así, en conclusión la composición de la presente invención presenta un comportamiento sobre el mecanismo de defensa de las plantas que no se encuentra explicado por la simple combinación de los efectos de los componentes individuales, es decir, muestra un comportamiento inesperado, que respalda su nivel inventivo.

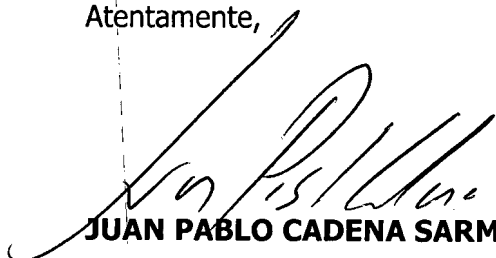
Como elemento adicional, queremos incluir datos obtenidos por el inventor en Agosto de 2008 sobre el efecto sinérgico de la composición de la presente invención sobre la protección de viñedos contra el moho (*Plasmopara viticola*). Al respecto, aclaramos que los experimentos fueron llevados a cabo mediante la aspersión de plantas localizadas en invernaderos, llevándose a cabo la medición de la aparición y el tamaño de puntos sobre las hojas en desarrollo.

Protección (%)			
	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3
10 ppm OGA	32.1	17.7	71.7
10 ppm COS	8.7	23.2	81.3
10 ppm COS-OGA	21.7	76.8	92.5
20 ppm OGA	0.0	9.8	92.8
20 ppm COS	18.5	25.3	95.7
20 ppm COS-OGA	17.4	92.4	99.2

Teniendo en cuenta el sustento brindado previamente, consideramos que las referencias citadas fallan en enseñar, y además en sugerir, la manera en la que se puede llegar a las enseñanzas de la presente invención, más aun considerando que la misma demuestra un comportamiento no contemplado por los componentes individuales que la componen. Por tanto, la información divulgada en el presente documento ha de considerarse como un respaldo de la novedad y del nivel invento de la composición aquí reivindicada.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la decisión 486.

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.SJ.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

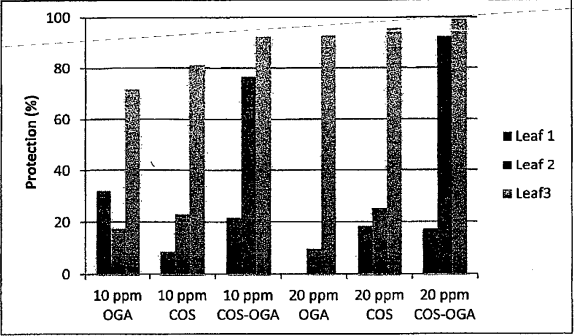
Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende uno o más oligogalacturonano(s) con un grado de polimerización comprendido entre 9 y 20 y que presenta una configuración dimérica de caja de huevo estabilizada además por uno o más oligosacáridos o polisacáridos de quitosano policatiónicos en presencia de (cat)iones.
2. La composición de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el costado de unión a calcio de la configuración dimérica de caja de huevo es detectada por el anticuerpo 2F4.
3. La composición de acuerdo a las reivindicaciones 1 o 2, en donde el oligosacárido o el polisacárido de quitosano presenta un grado de polimerización comprendido entre 5 y 12.
4. La composición de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde el oligosacárido o el polisacárido de quitosano presenta un grado de acetilación comprendido entre 0% y 50%.
5. La composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual es una solución acuosa.
6. La composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más elementos seleccionados del grupo constituido por otros sacáridos, reguladores o factores de crecimiento, minerales, iones, nutrientes, aditivos alimenticios, saborizantes, colorantes, vitaminas, fitonutrientes, KH_2PO_4 o una molécula bioactiva.
7. La composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual es un producto seleccionado del grupo que comprende un producto fitosanitario, un elicitador, un fertilizante, un adyuvante de estos productos, un reemplazo de fitohormona, un mejorador de fitohormona o un modulador de fitohormona.
8. La composición de acuerdo a la reivindicación 7, en donde el producto fitosanitario es un fungicida.
9. Un biomaterial que comprende la composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
10. Un textil que comprende la composición de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 8.

Protection

	Leaf 1	Leaf 2	Leaf3
10 ppm OGA	32,1	17,7	71,7
10 ppm COS	8,7	23,2	81,3
10 ppm COS-OGA	21,7	76,8	92,5
20 ppm OGA	0,0	9,8	92,8
20 ppm COS	18,5	25,3	95,7
20 ppm COS-OGA	17,4	92,4	99,2



DRUG ENCAPSULATION IN PECTIN HYDROGEL BEADS- A SYSTEMATIC STUDY OF SIMULATED DIGESTION MEDIA

JUAN CARLOS CABRERA, PIERRE CAMBIER AND PIERRE VAN CUTSEM*

Research Unit in Cell Biology, University of Namur, rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium. *Email: pierre.vancutsem@fundp.ac.be

Received: 16 July 2011, Revised and Accepted: 21 Oct 2011

ABSTRACT

Pectin fragments have powerful anti-metastatic properties but the molecular structure of the active component(s) is still unknown. Pectin hydrogels are used to encapsulate drugs for oral drug delivery. This polysaccharide is not digested in the upper intestinal tract but its degradation in the colon releases oligomers with potential bioactivity. Here we tested the release of pectin fragments in standard simulated digestion media. Calcium-pectin beads, some of them further reticulated by polyethyleneimine and/or chitosan were incubated in simulated gastric, intestinal or colonic media in presence or absence of pancreatin or pectinases. Pectin oligomers were released only in simulated colonic media (*i.e.* in presence of pectinase) but the fragments were not longer than dimers which is much shorter than previously reported for pectin incubated with human faeces. The *in vitro* study of pectin digestion will therefore need simulated digestion media with much lower pectolytic enzyme concentrations.

Keywords: Encapsulation, Pectin, Hydrogel, Digestion

INTRODUCTION

Polysaccharide hydrogels are used in oral drug delivery devices for a more effective release of active agents in the colon¹. Colonic delivery overcomes hurdles such as poor drug stability in the small intestine or poor transport across biological membranes in the upper gastrointestinal tract. Direct drug delivery to the colon is also more effective in the case of diseases such as ulcerative colitis, colorectal cancer and Crohn's disease. The active agents, such as proteins, antibiotics, nucleotides, etc, are encapsulated in high cross linked polymeric beads allowing their direct administration to the colon. It also benefits from lower protease activity and longer residence time delivery in the colon, something useful in the treatment of nocturnal asthma, angina and arthritis^{2,3}.

Several polysaccharides among which pectin, chitosan, alginates and carrageenans are degraded by colonic bacterial enzymes only and are therefore used as carriers for targeting drugs to the colon.

Pectin is a complex polysaccharide whose main constituent is a linear polymer of (1-4)-D-galacturonic acid whose carboxylic groups are naturally more or less methylesterified⁴. Acidic pectin is a polyanion at pH above 5 and can be easily cross linked by calcium cations in mild conditions, ideal to entrap different bioactives. Pectin molecules form so-called calcium "egg boxes" when at least nine non-esterified galacturonic acid residues are present in sequence. A monoclonal antibody (2F4) that specifically binds this supramolecular conformation has been described⁵. De-esterified pectin can be chemically converted to carboxamide to yield neutral amidated pectin. Amidation of pectin promotes association of amide groups along the chain through hydrogen bonding.

Since pectin is not digested by gastric or intestinal enzymes⁶, but easily degraded by pectinases produced by the colonic microflora, calcium pectinates have been used in different formulations for colon drug delivery⁷. A subsequent coating with polycations, such as polyethyleneimine (PEI) or chitosan, has been used to stabilize calcium pectinate beads: coating pectin beads with PEI for example considerably improves their stability in simulated intestinal medium⁸.

In human and mammalian cells, pectin fragments have relevant bioactivities. Intravenous injection of murine melanoma cells with citrus pectin (CP) resulted in a significant increase in the appearance of tumor colonies in the lung, while injection of shorter modified citrus pectin (MCP) obtained by α -elimination at alkaline pH significantly decreased experimental metastasis by more than 90%⁹. MCP is a reduced molecular weight and debranched pectin consisting of a homogalacturonan backbone with little methylesterification¹⁰. In another study¹¹, MCP given orally to

athymic mice inhibited tumor growth, angiogenesis and metastasis *in vivo*. MCP appears to be capable of targeting multiple critical rate-limiting steps in cancer metastasis and the main established mechanism of action for MCP is by antagonizing a β -galactoside binding protein galectin-3¹². Pectin and pectin oligosaccharides also induced apoptosis in a human colonic adenocarcinoma cell line as demonstrated by caspase-3 activity and DNA laddering¹³. Heat treatment instead of alkaline treatment of citrus pectin also generates pectin fragments that lead to the induction of significant levels of apoptosis in prostate cancer cells¹⁴.

Pectin fragments have also prebiotic properties¹⁵, and were found to possess anti-adhesive properties for pathogenic microorganism cells^{16,17}. However, the structural requirements of pectin fragments for all these bioactivities are not yet well defined.

In plant cells, the biological activities of the pectin fragments are well known¹⁸ as well as their size dependency: fragments with a degree of polymerization higher than 8 are able to associate intermolecularly through Ca^{2+} bridges to form so-called "egg boxes", a conformation that determines their bioactivity^{19,20}. WAK1, a membrane receptor that binds this conformation of pectin has been described²¹.

Here we were interested to see whether and where pectin fragments could be released during incubation of different calcium pectinate beads reticulated or not by polycations in standard simulated gastric, intestinal or colonic media. It had already been shown during *in vitro* incubation of pectin with human faeces flora that oligogalacturonides of DPs between one and seven were produced and finally fermented into short chain fatty acids²¹. Here, we could show that in standard simulated colonic media containing recommended concentrations of pectinolytic enzymes only oligogalacturonides with a degree of polymerization (DP) lower than three were released. No oligogalacturonides long enough to associate intermolecularly through Ca^{2+} bridges could be detected at any time.

MATERIALS AND METHODS

Non-amidated Pectin with degree of methylesterification of 30%, polyethyleneimine (PEI, Supelco) and chitosan were purchased from Sigma-Aldrich; 20% amidated pectin and 22-28% methylesterified OG175C Unipectin were obtained from Degussa. Pancreatin was supplied by Sigma.

Preparation of Pectin Beads and reticulation with chitosan and/or Polyethyleneimine

Different pectin-containing beads were tested. The pectin beads were prepared by described procedures^{7,8}. An aqueous solution of 6% (w/v) pectin (non-amidated with degree of methylesterification

of 30% or 20% amidated and 22-28% methylesterified OG175C Unipeptin) was introduced dropwise by a peristaltic pump (Pharmacia LKB P-1, Sweden) through a plastic tubing (0.8 mm inner diameter) into a calcium chloride solution (CaCl_2 6%, w/v) to form gel particles. The particles were kept in the Ca^{2+} solution for 20 min. The beads were then rinsed repeatedly with distilled water until neutrality and dried at 37°C. For reticulation in PEI the undried pectin beads recovered by filtration from the CaCl_2 solution were introduced in a PEI (0.8% w/v) solution for 20 min with magnetic stirring. The reticulated beads were recovered by filtration and part of them was treated for a second time with fresh PEI solutions.

The preparation of chitosan-reticulated pectin beads was based on published protocols^{23, 24, 25}. Undried pectin beads were recovered by filtration from CaCl_2 or PEI solutions and introduced in a chitosan solution (1% w/v) for 20 min. Trimethylchitosan was also tested instead of chitosan. These reticulated beads were also rinsed repeatedly with distilled water until neutral pH and dried at 37°C.

The schematic representation of the procedures for producing non-amidated (D1 to D4) and amidated (D11 and D12) pectin- Ca^{2+} beads reticulated with PEI and/or chitosan is presented in Figure 1A and 1B, respectively.

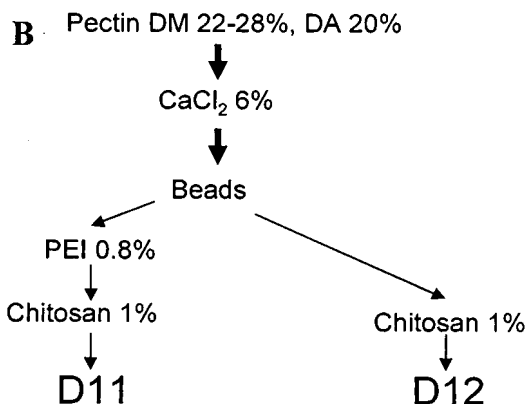
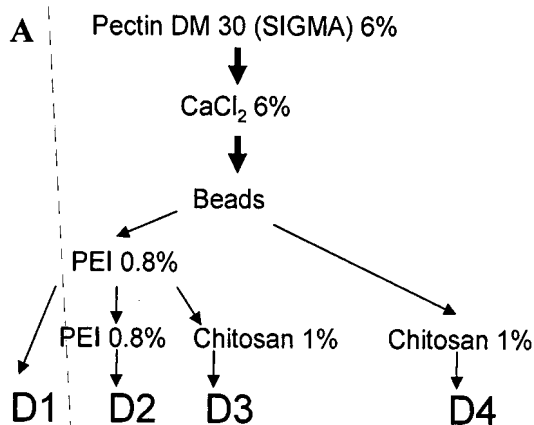


Fig. 1: Preparation of non-amidated pectin (Sigma) (A) or amidated pectin (OG175C Unipeptin) beads (B) reticulated with PEI (0.8%) and/or chitosan (1%)

Incubation of beads in simulated gastrointestinal media

In one set of experiments, beads were placed directly in each individual simulated medium. The above-described beads (D1 - D4, D11, D12) were incubated either in phosphate buffer (PBS 0.01 M, pH 7.4) or in media simulating digestive juices: gastric medium USP XXIV²⁶ (KCl 0.2 M adjusted at pH 1.4 with HCl) and intestinal medium USP XXIV (SIM: phosphate buffer 50 mM and 1% pancreatin at pH 6.8) as described⁸. After incubation, the solutions were tested by HPLC-PAD and ELISA for the presence of oligogalacturonides and egg boxes (Figure 2A).

In another set of experiments, the particles were first incubated in SIM for 5h, then placed in synthetic colonic medium (HEPES 10 mM and NaCl 140 mM, pH 6) to test for OGA and egg boxes released after increasing times of incubation with or without pectinase (Pectinex Ultra SPL, Sigma) as described⁸. These authors use a pectinolytic enzymes concentration of 5200 PG/mL in SIM. Since such an extremely high pectinolytic enzyme concentration completely degrades pure pectin into monomers in a very short time, we used a six times lower Pectinex enzyme concentration (*i.e.* 870 PG/mL) to increase chances of producing oligosaccharides (Figure 2B).

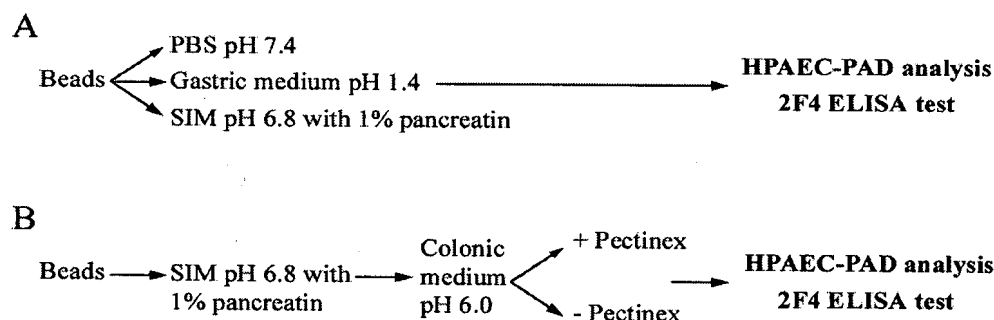


Fig. 2: Protocol used for testing the presence of oligogalacturonides and egg boxes released from pectin beads D1, D2, D3, D4, D11 and D12 incubated in phosphate buffer or simulated gastric or intestinal media (A) or in simulated intestinal media with or without pectinolytic enzymes (B).

Chromatographic analysis of oligogalacturonides

Each sample was filtered (0.45 μm) and then analyzed by High Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC-PAD) for the determination of the degree of polymerization of the oligosaccharides following a procedure adapted from existing protocols²⁷. HPAEC was performed on a Dionex GP50 gradient pump (Dionex, California, USA) equipped with a LC Packings Famos

autosampler, a CarboPac PA100 column and ICS-3000 Pulsed Amperometric Detector (PAD) from Dionex (California, USA).

The mobile phases were all degassed with helium to prevent carbon dioxide solubilization and carbonate formation. Chromoleon software (Dionex, California, USA) was used for controlling chromatographs and data acquisition and processing. The analysis was carried out at 1mL/min with a linear gradient of 200 mM to 500

mM sodium acetate in 100 mM sodium hydroxide (0-50 min) and 500 mM to 800 mM sodium acetate in 100 mM sodium hydroxide (50-65 min). The column was reconditioned by washing with 800 mM sodium acetate containing 100 mM sodium hydroxide and then

re-equilibrated with the starting buffer solution. The HPAE column was calibrated using standard oligogalacturonides. A typical example of oligogalacturonides separation is presented on Figure 3A.

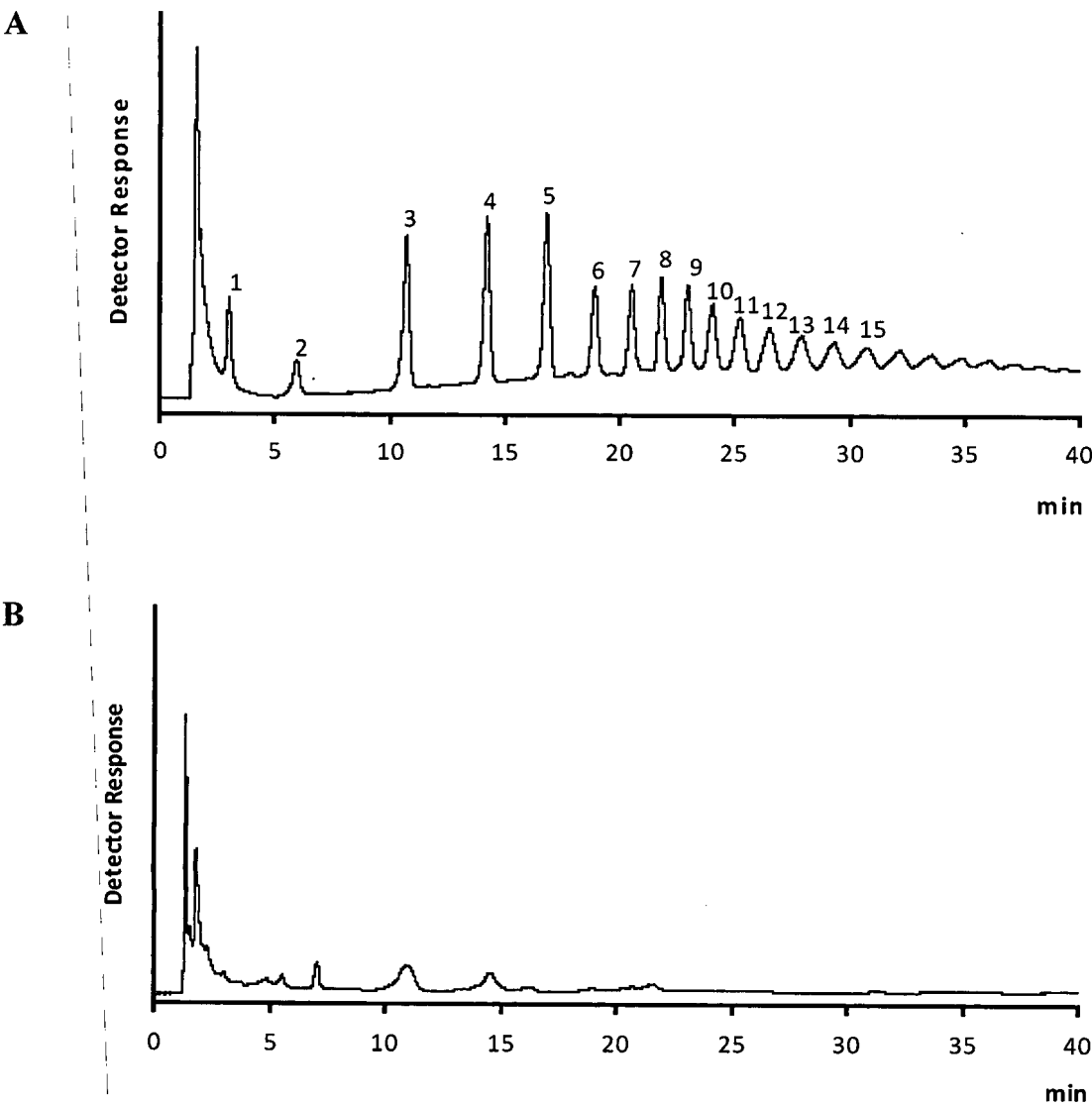


Fig. 3: HPAEC-PAD profile of oligogalacturonides (OGA) of degrees of polymerization between 1 and 15 (A) and pancreatin-containing SIM (B) separated on Carbpac PA100. The labels above the peaks on graph A indicate the degree of polymerization of the OGA eluted in each peak. Unidentified contaminants from the pancreatin preparation produced peaks of low retention times.

Immunological detection of pectin egg boxes

Pectic fragments with a DP>8 dimerize in presence of calcium ions and can be detected by immunoprecipitation-GaMlg ELISA tests carried out as described ²⁰. Briefly, samples were immunoprecipitated with the 2F4 antibody that specifically binds pectin chain dimerized through calcium ions under the egg box conformation. After centrifugation, the free unreacted antibodies in the supernatant were assayed in a sandwich ELISA test using goat anti-mouse immunoglobulin (GaMlg) as capture antibody and horseradish peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin as detection antibody.

RESULTS

Analysis of the soluble fraction released from simulated gastric and intestinal media

The non-amidated pectin-Ca²⁺ beads (D1 to D4, Figure 1A) and the amidated pectin beads (D11 and D12, Figure 1B) were first incubated in PBS buffer at pH 7.4, in simulated gastric medium at pH 1.4 (Figure 4) or in simulated intestinal medium in presence of 1% pancreatin at pH 6.8 (Figure 5) for increasing times, before testing the presence of oligogalacturonides in solution. No pectin oligomers could be detected in any case.

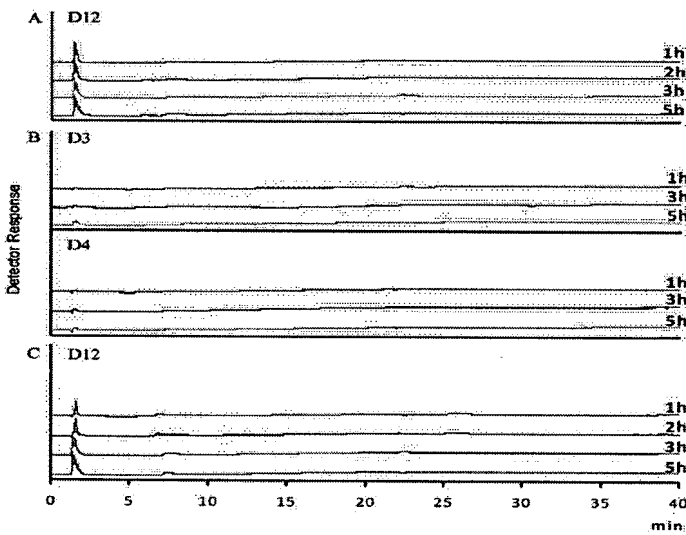


Fig. 4: HPAEC-PAD profiles of the soluble fraction of amidated pectin beads D12 incubated in PBS buffer at pH 7.4 (A) or non-amidated pectin beads D3 and D4 (B) and amidated pectin beads D12 (C) incubated in simulated gastric medium at pH 1.4 for different times (1-5h). No pectin oligomer could be detected in the incubation buffer of any of the beads even after 5 h treatment.

In simulated intestinal medium in presence of 1% pancreatin at pH 6.8, small peaks were detected in the incubation medium of non-amidated D3 and D4 and amidated D12 beads at retention times lower than the ones of oligogalacturonides of DP 9-20 (Figure 5). These peaks originated from the pancreatin preparation (Figure 3B).

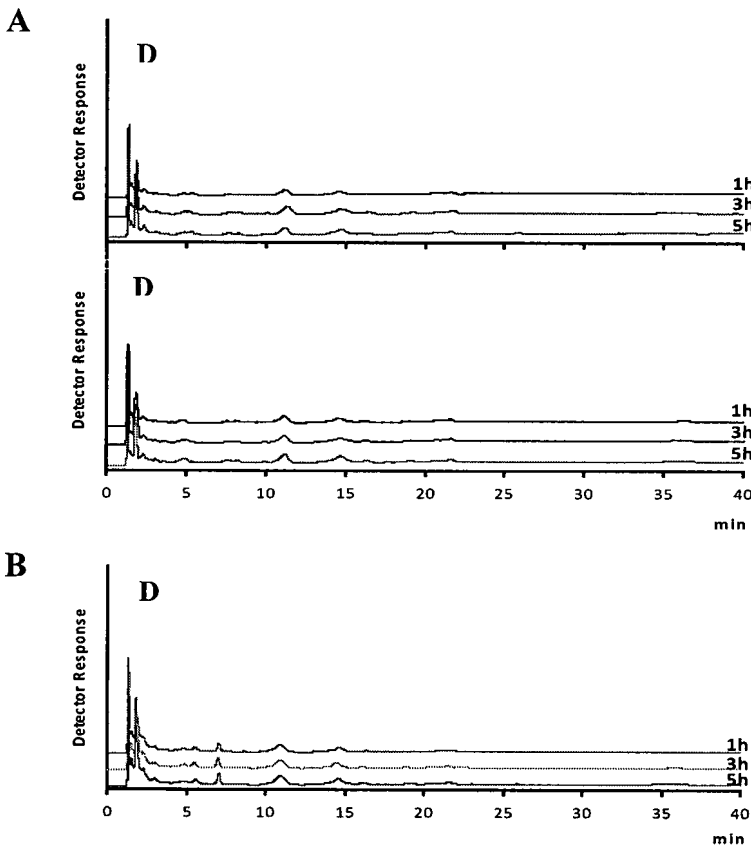


Fig. 5: HPAEC-PAD profiles of the soluble fraction of non-amidated (A) and amidated (B) pectin-Ca beads incubated in SIM with pancreatin for different times. No high DP OGA was detected even after 5 h treatment.

Analysis of the soluble fraction released by sequential incubation in simulated intestinal and colonic media

After five hours in SIM-pancreatin, the amidated and non-amidated pectin-Ca²⁺ beads were transferred to colonic medium without pectinolytic enzymes. No oligogalacturonide could be detected in the equilibrium solution even after 5 hours incubation (data not shown). When beads treated for five hours in SIM-pancreatin were

transferred to colonic medium with Pectinex Ultra SPL, only peaks with retention times lower than DP3 could be observed (Figure 6). This is not surprising since even the six times reduced enzyme activity we used in this experiment (*i.e.* 870 PG/mL instead of 5200 PG/mL as recommended for SIM) was still about one thousand times more concentrated than the one used to obtain pectin fragments of DP9-20 in controlled conditions²⁸.

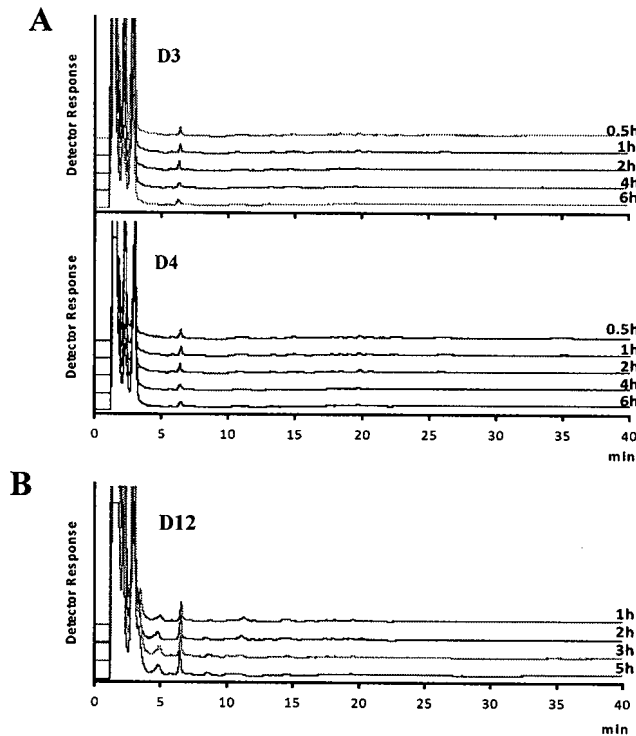


Fig. 6: HPAEC-PAD profiles of the soluble fraction of (A) non-amidated pectin-Ca beads (D3 and D4) and (B) amidated pectin-Ca beads (D12) incubated in simulated colonic medium solution with pectinase. No pectin oligomer of DP 9 to 20 could be detected whatever the incubation time

Calcium-induced egg box conformation

Pectin fragments long enough to associate cooperatively through calcium ions are recognized by the conformation-specific monoclonal antibody 2F4. Methylesterification and amidation of

pectin molecules as well as a reduction in the degree of polymerization of non-substituted oligogalacturonides prevent calcium-induced egg box formation, as recognized by the 2F4 antibody (Figure 7).

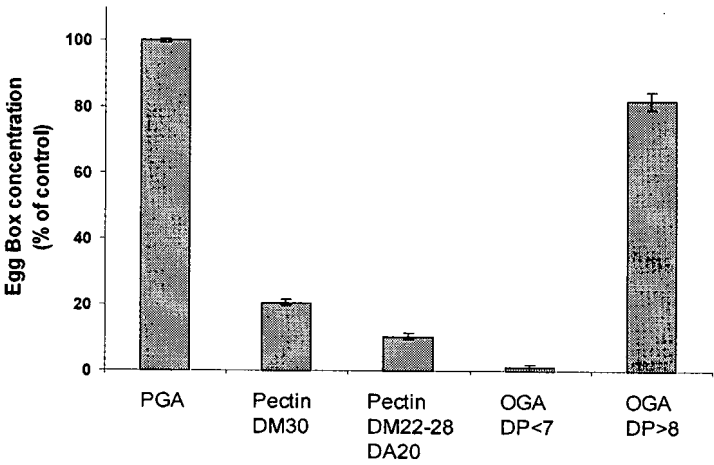


Fig. 7: Quantification by 2F4 MoAbs of Ca²⁺ induced egg box dimers.

Polygalacturonic acid (PGA), Non-amidated Pectin with degree of methylation of 30% (Pectin DM30), 20% amidated and 22-28% methylesterified pectin (Pectin DM22-28, DA20), oligogalacturonides with degree of polymerization lower than 7 (OGA DP<7) and higher than 8 (OGA DP>8) were tested in a sandwich ELISA test. The mean values of three replicates are presented.

The effect of polyethyleneimine on OGA egg box stability was also studied: since PEI is a polycation, we hypothesized that it could

easily destroy the egg boxes by binding to the negative charges of pectin. OGAs with DP > 8 were titrated by increasing PEI concentration and the egg boxes detected by an ELISA test with the 2F4 antibody (Figure 8). At PEI concentrations about ten times lower than OGAs, the egg boxes completely disappeared: the addition of polycations such as PEI to pectin beads completely destroyed the egg box conformation. Even if OGAs of the right size were produced in the digestion media, the presence of such polycations would hinder their direct association through calcium ions and strongly modify their physico-chemical properties.

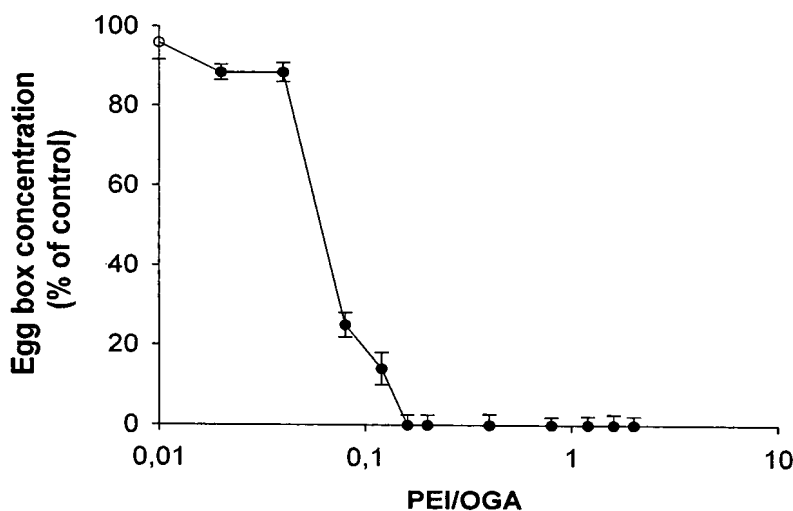


Fig. 8: Effect of PEI on egg box dimer formation by high DP oligogalacturonides

The 2F4 MoAbs were incubated with high DP OGA (4.0 mg.L⁻¹) in presence of increasing concentrations of PEI. Egg box concentrations were measured by an immunoprecipitation - GaMlg ELISA test. The concentrations of egg boxes are represented as percentages of the concentrations measured in control solutions without added PEI. No OGA egg box could be detected by the 2F4 MoAb at PEI concentrations nearly ten times lower than OGA concentration.

DISCUSSION

Drug encapsulation in pectin

Oral drug administration is most convenient for patients but localized delivery in the colon for treatment of diseases like ulcerative colitis, Crohn's disease or carcinomas needs protection of the drugs from the hostile environment of the upper gastro-intestinal tract. Polysaccharides are used to encapsulate drugs because they are largely resistant to gastrointestinal environment and enzymes. Once in the colon, polysaccharides are degraded by the local microflora and drugs are released. Pectin is commonly used to encapsulate drugs for colon delivery but the polymer must be made less water soluble to avoid premature release of the drug. Polycations such as chitosan, a β -1,4- polymer of glucosamine, or polyethyleneimine have been used for that purpose^{2,3}. The stability of such formulations is routinely tested in simulated digestion media. Simulated colonic media contain large amounts of pectolytic enzymes to mimic the action of colonic microflora.

Since modified citrus pectin is known to have powerful anticancer properties and consists mostly in linear homogalacturonan of DP 8 up to >30¹⁰, we wondered what type of pectic fragments such simulated digestion media would release. Experiments were therefore carried out on beads of pectin, crosslinked with calcium and/or reticulated with chitosan or trimethylchitosan and/or polyethyleneimine to check whether and which oligogalacturonides would be produced upon beads incubation in simulated gastro-

intestinal media. Both HPLC-PAD and ELISA tests with the 2F4 antibody that recognizes homogalacturonan of DP>8 were used to detect oligogalacturonides and their capacity to adopt the supramolecular conformation induced by calcium ions.

HPLC and ELISA analysis of fragments

The HPLC-PAD analysis showed that no oligogalacturonide could be found in the soluble fraction of any amidated and non-amidated pectin-Ca²⁺ beads, whether cross-linked or not with PEI and/or chitosans, assayed after up to five hours incubation in gastric and intestinal simulated media (Fig. 4). Pectin beads coated with trimethylchitosan behaved similarly to chitosans-treated beads in all respects (data not shown). In the soluble fraction of SIM incubation media that contained pancreatin, some peaks with low retention times were detected (Fig. 5). These peaks did not correspond to the retention times of standard oligogalacturonides, and they were also detected in the pancreatin enzyme preparation before incubation with the beads: these peaks correspond to contaminants in the pancreatin preparations. Beads incubated first in SIM-pancreatin and then in colonic medium with pectinase released monogalacturonic and digalacturonic acids in the incubation solution. These oligogalacturonides of lower degrees of polymerization were not able to form any egg-boxes as confirmed by ELISA tests (data not shown). Additionally, even small concentrations of polyethyleneimine were shown to strongly inhibit calcium-induced OGA egg box formation (Figure 8). Chitosan had a similar effect on OGA egg boxes (not shown).

None of the experimental procedures describing incubation and/or digestion of pectin, pectin-chitosan or pectin-PEI beads in various buffers and simulated digestion media could produce oligogalacturonides of DP $\geq$ 3. In particular, longer fragments susceptible to adopt the egg box conformation known to have biological activity in other biological systems were not produced

while a study on pectin metabolism in the gastrointestinal tract report the transitory production of oligopectates of DP up to seven by *in vitro* fermentation of pectin with human faecal flora ²². Incubation of pectin with *Bacteroides thetaiotaomicron* obtained from human faecal flora led to the transient production of a spectrum of pectin oligomers of DP up to seven that peaked four to six hours after the start of the incubation and the study suggests that *in vivo* "some of the bioactive molecules formed from ingested pectin may be absorbed in the colon." ²⁹

Composition of digestion media

Several factors might explain this discrepancy between the very small size of oligogalacturonides produced in simulated digestion media and the size of oligomers obtained upon incubation with faecal material or bacteria. Above all, the production by enzymatic digestion of pectin oligomers of larger DPs requires very low Pectinex Ultra SPL enzyme concentration (typically a 1:3000 dilution of a solution at 30925 PG ml⁻¹) ¹⁸. However, even with very dilute enzyme preparations, the hydrolysis of pectin must be rapidly stopped by boiling to avoid complete degradation into very short oligomers and monomers. Concentrated Pectinex Ultra SPL solutions routinely used in simulated intestinal media therefore immediately chop up any nascent pectin fragment into very small DP oligomers. This could have an impact on the kinetics of drug release estimated by *in vitro* digestion of pectin beads.

Experiments with amidated and methylesterified pectin are not expected to give many long oligogalacturonides because polygalacturonases of fungal origin as is the case with the Pectinex Ultra SPL preparation hydrolyze glycosidic bonds randomly between acidic residues in pectin chains. With 30% methylesterification most acidic stretches of pectin will probably be a few units long. If longer fragments were present, methylesterification and amidation of pectin would hinder calcium binding and subsequent egg box formation as is shown in Figure 7.

Concerning the ELISA detection with the 2F4 antibody, even if pectin fragments of the right size and composition were produced, the buffers commonly used to simulate digestion are not suited to pectin egg box formation. Ca²⁺-containing Tris buffers must be used to induce and detect egg boxes in ELISA tests with the 2F4 antibody. Phosphate buffers such as the one in simulated digestion media induce calcium phosphate precipitation ³⁰ which could prevent calcium from interacting with oligopectates. EDTA ⁸ or citrate buffers chelate calcium and strongly prevent pectin association through calcium ions (data not shown). The colonic medium that contains 140 mM NaCl without calcium is also clearly not suited for pectin egg box formation.

CONCLUSION

Incubation of pectin-containing beads in standard simulated digestion media in presence of recommended amounts of pectolytic enzymes released pectin fragments not longer than dimers. On the basis of these results we consider as highly unlikely that longer oligogalacturonides such as the ones found in MCP could be released from pectin-based drug delivery devices tested in standard simulated digestion media. Such small oligomers do not mimic what is found when pectin is incubated with faeces or faecal bacteria. If the pectin-derived structures with anticancer activity were shown to be related to oligogalacturonides with a degree of polymerization higher than two, the composition of simulated digestion media would need to be adapted in order to prevent nearly complete degradation of pectin by the enzymes. This would allow a more realistic *in vitro* study of the pectin degradation process.

REFERENCES

1. Mishra MU, Khandare JN Evaluation of Tamarind seed polysaccharide as biodegradable carrier for colon specific drug delivery. Int J Pharm Pharm Sci 2011;3(1): 139-42
2. Chourasia MK, Jain SK Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. J of Pharm Pharm Sci 2003;6(1):33-66.

3. Aurora J, Talwar N, Pathak V Colonic drug delivery challenges an opportunities - An overview. Eur Gastroenterol Rev 2006;1:1-6.
4. Awasthi R Selection of pectin as pharmaceutical excipient on the basis of rheological behavior. Int J Pharm Pharm Sci 2011;3(1): 229-31
5. Liners F, Letesson JJ, Didembourg C, Van Cutsem P Monoclonal Antibodies against Pectin: Recognition of a Conformation Induced by Calcium. Plant Physiol 1989;91(4):1419-24.
6. Saito D, Nakaji S, Fukuda S, Shimoyama T, Sakamoto J, Sugawara K. Comparison of the amount of pectin in the human terminal ileum with the amount of orally administered pectin. Nutrition 2005;21:914-9.
7. Bourgeois S, Gernet M, Pradeau D, Andreumont A, Fattal E. Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of beta-lactamases entrapped in pectin beads. Int J Pharm 2006;324(1):2-9.
8. Bourgeois S, Laham A, Besnard M, Andreumont A, Fattal E. *In vitro* and *in vivo* evaluation of pectin beads for the colon delivery of beta-lactamases. J Drug Target 2005;13(5):277-84.
9. Platt D, Raz A Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin. J Natl Cancer Ins 1992;84(6):438-42.
10. Eliaz I, Hotchkiss AT, Fishman ML, Rode D. The effect of modified citrus pectin on urinary excretion of toxic elements. Phytother Res 2006;20: 859-64
11. Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, Raz A Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. J Natl Cancer Inst 2002;94(24):1854-62.
12. Glinesky VV, Raz A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. Carbohydr Res, 2009;344:1788-91.
13. Olano-Martin E, Rimbach GH, Gibson GR, Rastall RA Pectin and pectic-oligosaccharides induce apoptosis in *in vitro* human colonic adenocarcinoma cells. Anticancer Res 2003;23(1A):341-6.
14. Jackson CL, Dreaden TM, Theobald LK, Tran NM, Beal TL, Eid M, Gao MY, Shirley RB, Stoffel MT, Kumar M., Mohnen D Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. Glycobiology 2007;17(8):805-19.
15. Hotchkiss AT, Olano-Martin E, Grace WE, Gibson GR, Rastall RA Pectic oligosaccharides as prebiotics. In: Eggleston G, Cote GL, editors. Oligosaccharides in food and agriculture. ACS symposium series, 849. American Chemical Society, Washington; 2003. p54-62.
16. Ganan M, Collins M, Rastall R, Hotchkiss AT, Chau HK, Carrascosa AV, Martinez-Rodriguez AJ Inhibition by pectic oligosaccharides of the invasion of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. Int J Food Microbiol 2009;137(2-3):181-5.
17. Rhoades J, Manderson K, Wells A, Hotchkiss AT, Gibson GR, Formentin K, Beer M, Rastall RA. Oligosaccharide-mediated inhibition of the adhesion of pathogenic *Escherichia coli* strains to human gut epithelial cells *in vitro*. J Food Prot 2008;71(11):2272-7.
18. Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen DA. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry 2001;57(6):929-67.
19. Messiaen J, Van Cutsem P Defense gene transcription in carrot cells treated with oligogalacturonides. Plant Cell Physiol 1993;34(7):93-116.
20. Cabrera JC, Boland A, Cambier P, Frettinger P, Van Cutsem P. Chitosan oligosaccharides modulate the supramolecular conformation and the biological activity of oligogalacturonides in Arabidopsis. Glycobiology 2010;20(6):775-86.
21. Decreux A, Thomas A, Spies B, Brasseur R, Van Cutsem P, Messiaen J. *In vitro* characterization of the homogalacturonan binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. Phytochemistry 2006;67:1068-79
22. Dongowski G, Anger H. Metabolism of pectin in the gastrointestinal tract. In: Visser J, Voragen AGJ, editors. Pectins

24

- and pectinases, Proceedings of an International Symposium. Progress in Biotechnology 1996;(14). p659-66
23. Munjeri O, Collett JH, Fell JT. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: The role of chitosan in modifying drug release. J Control Release 1997;46(3):273-8.
24. Chang KLB, Lin J Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. Carbohydr Polym 2000;43(2):163-9.
25. Atyabi F, Inanloo K, Dinarvand R Bovine serum albumin-loaded pectinate beads as colonic peptide delivery system: Preparation and in vitro characterization. Drug Deliv 2005;12(6):367-75.
26. The United States Pharmacopoeia XXIV and NF XIX, Amer Pharmaceut Assoc, Washington, DC, 2000
27. Hotchkiss AT, El-Bahtimy K, Fishman ML Analysis of Pectin Structure by HPAEC-PAD. In: Linskens H-F, Jackson JF editors. Plant Cell Wall Analysis, Modern Methods of Plant Analysis, Springer-Verlag, Berlin, Vol. 17, 1996. p129-46.
28. Cabrera JC, Boland A, Messiaen J, Cambier P, Van Cutsem P Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. Glycobiology 2008;18(6):473-82
29. Dongowski G, Lorenz A, Anger H. Degradation of pectins with different degrees of esterification by *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated from human gut flora. Appl Environ Microbiol 2000;66: 1321-7.
30. Park Y, Kim SH, Matalon S, Wang N-HL, Franses EI Effect of phosphate salts concentrations, supporting electrolytes, and calcium phosphate salt precipitation on the pH of phosphate buffer solutions. Fluid Phase Equilib 2009;278:76-84.