



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

09-63560

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE OLIGOGALACTURONANOS Y
SACÁRIDOS POLICATIÓNICOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE FACULTE NOTRE-DAME DE LA PAIX

DOMICILIO NAMUR, BELGICA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C.

PETITORIO

AS: 110.375

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-063560- -00000-0000

Fecha: 2009-06-18 17:08:25
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 57

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE

Nombre: **FACULTE NOTRE-DAME DE LA PAIX**

Dirección: Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Bélgica
Nacionalidad o Domicilio: Bélgica
Lugar de Constitución: Bélgica

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Pierre VAN CUTSEM, Juan Carlos PINO CABRERA.

Dirección: Rue Haute 28, B-1348 Ottignies, BE; Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, BE (respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2007/062968

Fecha 28-11-2007

Publicación Internacional No WO 2008/065151 A1

Fecha 05-06-2008

6 Título (54): **COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE OLIGOGALACTURONANOS Y SACÁRIDOS POLICATIÓNICOS**

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

SI ☒

NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

28-11-2006

(31) Número de Solicitud

06124918.1

9 Comprobante de pago No. 09- 31.037; 09- 7.225

Fecha 18-06-2009

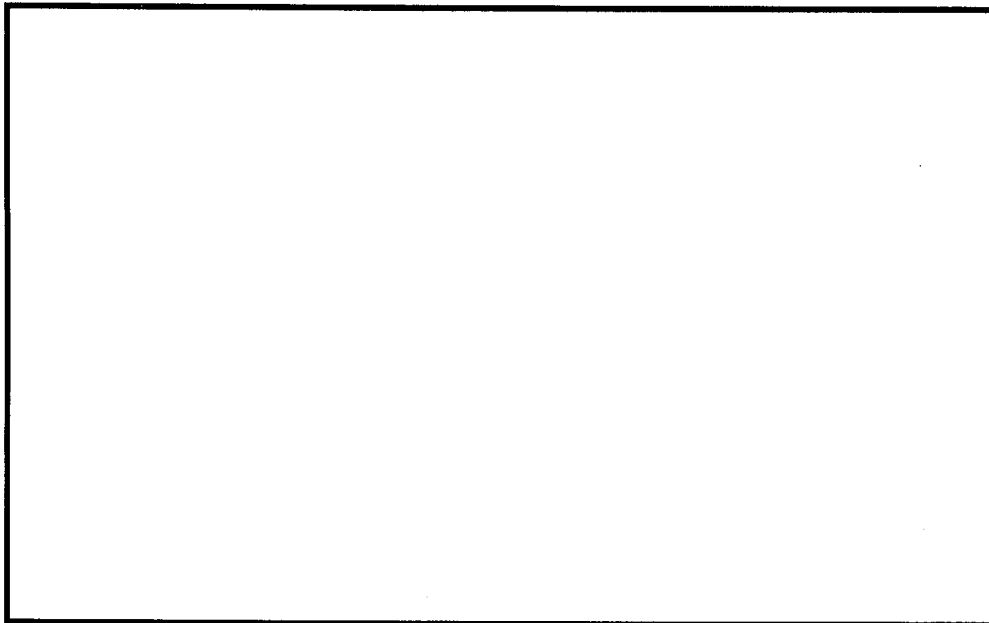
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

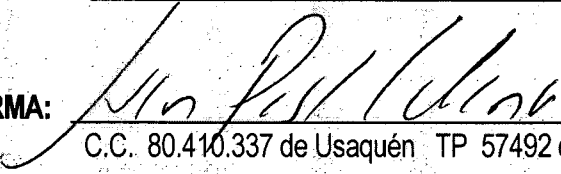
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 540.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite 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.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales \$50.000 (2*\$25.000)

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA: 

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

110375

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-063560-00000-0000

Fecha: 2009-06-18 17:08:25 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 57

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 31,037
FECHA : ABRIL 24 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRISARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946063	22/04/2009	25,421,080.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

110 375

61

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-063560- -00000-0000

Fecha: 2009-06-18 17:08:25 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 57

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 7,225
FECHA : ENERO 29 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105765402	28/01/2009	36,082,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	50,000.00
		TOTAL :	\$ 50,000.00

SON: CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2007/062968

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

PRONOVEM - OFFICE VAN MALDEREN
Avenue Josse Goffin, 158
B-1082 Brussels
BELGIQUE

Date of mailing (day/month/year)

03 June 2008 (03.06.2008)

Applicant's or agent's file reference
BPFNDP023CWO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/EP2007/062968

International filing date (day/month/year)

28 November 2007 (28.11.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

VAN CUTSEM, Pierre
Rue Haute 28
B-1348 Ottignies
Belgium

State of Nationality

BE

State of Residence

BE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and inventor for all designated states.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Sontag Frederic

e-mail pt06.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 06

Facsimile No. +41 22 338 89 70

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 June 2008 (05.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/065151 A1(51) International Patent Classification:
C08L 5/06 (2006.01) A61L 26/00 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/EP2007/062968(22) International Filing Date:
28 November 2007 (28.11.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
06124918.1 28 November 2006 (28.11.2006) EP(71) Applicant (for all designated States except US): FAC-
ULTE NOTRE-DAME DE LA PAIX [BE/BE]; Rue de
Bruxelles 61, B-5000 Namur (BE).

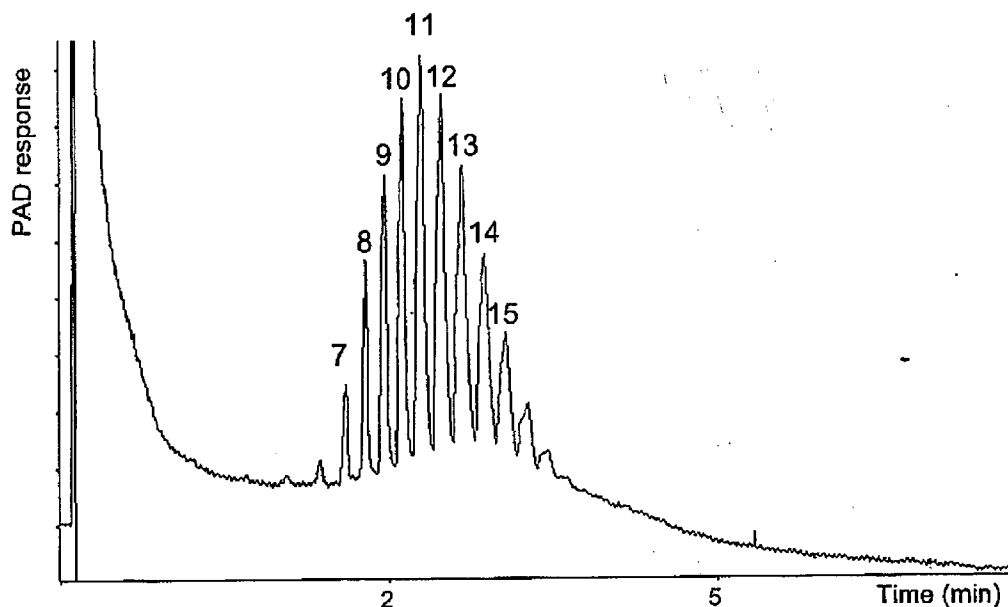
(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): PINO CABRERA,
Juan Carlos [CU/BE]; Rue de Bruxelles 61, B-5000 Na-
mur (BE).(74) Agent: PRONOVEM - OFFICE VAN MALDEREN;
Avenue Josse Goffin, 158, B-1082 Brussels (BE).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.(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, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING OLIGOGALACTURONANS AND POLYCATIONIC SACCHARIDES



(57) Abstract: The present invention is related to a "bioactive" composition that comprises one or more oligogalacturonans((1→4)-α-D-galacturonan) or any other oligosaccharides (oligoguluronans) that may present an "egg box" conformation, this conformation being further stabilized by one or more polycationic saccharide(s), preferably either a chitosan oligosaccharide or a chitosan polysaccharide. The present invention is also related to a method for the preparation of this composition and its use, in medical, pharmaceutical, agricultural, nutraceutical, food, feed, textile, cosmetic, industrial and/or environmental applications.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad

Intelectual

Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

05 de junio de 2008 (05.06.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2008/065151 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C08L 5/06 (2006.01) A61L 26/00 (2006.01)

(21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/EP2007/062968

(22) Fecha de Presentación Internacional:
28 de noviembre de 2007 (28.11.2007)

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Datos de la Prioridad:
06124918.1 28 de noviembre de 2006 (28.11.2006) EP

(71) Solicitante (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos): **FACULTE NOTRE-DAME DE LA PAIX** [BE/BE]; Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur (BE).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (solo para los Estados Unidos): **VAN CUTSEM, Pierre**; Rue Haute 28, B-1348 Ottignies (BE). **PINO CABRERA, Juan Carlos**; Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur (BE).

(74) Agente: **PRONOVEM - OFFICE VAN MALDEREN**; Avenue Josse Goffin, 158, B-1082 Brussels (BE).

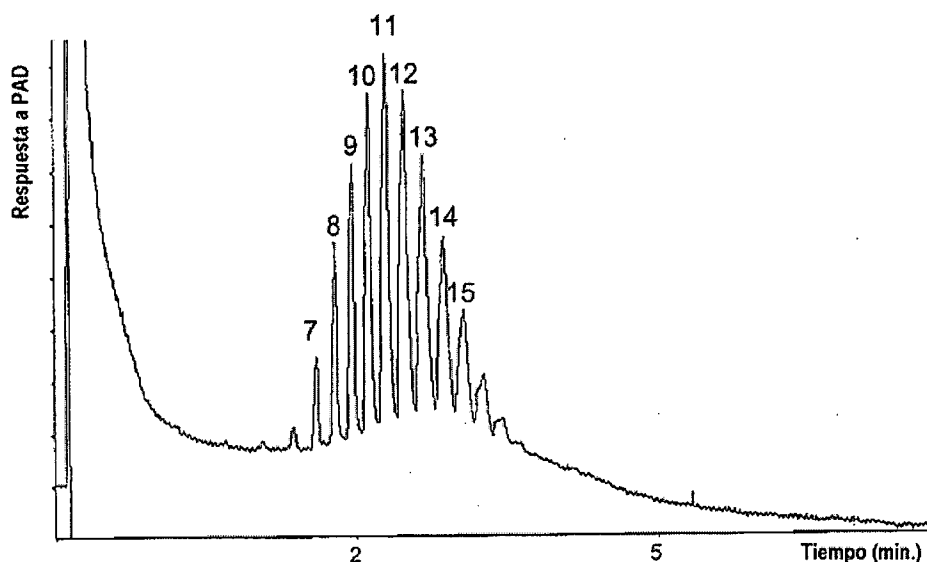
(81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con el informe de búsqueda internacional
- antes de la fecha límite de expiración para reivindicaciones modificadas y a ser republicado nuevamente en el evento de recibirlas

(54) Título: COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE OLIGOGALACTURONANOS Y SACÁRIDOS POLICATIÓNICOS



(57) Resumen: La presente invención se refiere a una composición "bioactiva" que comprende uno o más oligogalacturonanos ((1→4)-α-D-galacturonano) o cualquier otro oligosacárido (oligogalacturonano) que pueden presentar una configuración de "huevera", estando estabilizada además esta configuración por uno o más sacárido(s) policatiónico(s) preferentemente un oligosacárido de quitosán o un polisacárido de quitosán. La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para la preparación de esta composición y a su utilización, en aplicaciones médicas, farmacéuticas, agrícolas, nutraceuticas, alimentarias, piensos, textiles, cosméticas, industriales y/o medioambientales.

- 1 -

**COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE OLIGOGALACTURONANOS Y SACÁRIDOS
POLICATIÓNICOS**

DESCRIPCION

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10

La presente invención se refiere a una composición "bioactiva" que comprende uno o más oligogalacturonanos ((1→4)-α-D-galacturonano) o cualquier otro oligosacárido (oligogalacturonano) que pueden presentar una configuración de "huevera", estando estabilizada además esta configuración por uno o más sacárido(s) policatiónico(s) preferentemente un oligosacárido de quitosán o un polisacárido de quitosán.

15

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para la preparación de esta composición y a su utilización, en aplicaciones médicas, farmacéuticas, agrícolas, nutraceuticas, alimentarias, piensos, textiles, cosméticas, industriales y/o medioambientales.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Pectina y fragmentos de pectina

25

Los polisacáridos naturales, tales como el almidón, la celulosa, la quitina, el alginato y la pectina son de gran importancia tecnológica porque están disponibles en grandes cantidades y presentan características específicas normalmente no presentes en los polímeros sintéticos.

30

La pectina constituye una red molecular densa que cuenta para muchas de las propiedades mecánicas de la pared celular vegetal.

35

Las zonas vellosas de las pectinas (Rhamnogalacturonano) coexisten con dominios suaves homopoligalacturónicos (galacturonano) que pueden dimerizarse según el denominado modelo "huevera" (Grant, FEBS letters, volumen 32, págs. 195-198, 1973). Se ha confirmado la existencia de esta configuración de "huevera" de quelación intercatenaria del calcio mediante dicroísmo circular (Powell *et al.* Journal of Molecular Biology, Vol. 155, págs. 517-531, 1982).

40

La extensión de dichas zonas de articulación en la pared celular depende en gran medida del polianión, de la capacidad de los cationes bivalentes y se inhibe por metilesterificación y acetilesterificación (Liners *et al.* Plant Physiology. Vol 90, págs. 1090-1104, 1992).

45

La pectina constituye asimismo una diana privilegiada implicada en procesos morfológicos y en interacciones hospedador-patógeno. Las enzimas pectolíticas liberan oligogalacturonanos que pueden modular diferentes procesos fisiológicos dentro de la matriz de la pared celular y el protoplasto.

50

También es sabido que a diferentes concentraciones estos oligogalacturonanos pueden modificar la actividad biológica de las células.

55

Por consiguiente, estos oligogalacturonanos son adecuados para el tratamiento de plantas, especialmente en los métodos de crecimiento y protección de plantas basados en la utilización de estos productos naturales. Más específicamente, estos oligogalacturonanos son adecuados para la producción de defensas innatas aumentadas de las plantas contra patógenos.

Van Cutsem y Messiaen (Planta, vol. 208, págs. 246-256, 1999) describen la adsorción de poliaminas en el ácido poligalacturónico en presencia de cationes mono y divalentes competitivos (Na^+ , Ca^{2+}). Entre las poliaminas, se probaron putrescina, espermidina y espermina. Los autores demuestran que la cascada de transducción de señal iniciada en las células vegetales por el enlace Ca^{2+} (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-oligogalacturonano fue bloqueada por la espermidina y la espermina, pero no por la putrescina. Se supone que la destrucción por la espermidina y la espermina de la conformación supramolecular inducida por Ca^{2+} de fragmentos pécticos fue la causa de la inhibición de la señal péctica. Por consiguiente, parece que las poliaminas pueden actuar sobre la fisiología celular de la planta modulando la transducción de la señal péctica. Otros oligosacáridos tales como el alginato pueden presentar esta configuración de "huevera" y pueden actuar sobre la fisiología vegetal.

Quitina y quitosán

La quitina es un polímero natural de alto peso molecular encontrado extensamente en la naturaleza (segundo polímero principal después de la celulosa) y es el principal componente de la cutícula de insectos y crustáceos. La quitina forma parte de las paredes celulares de algunos hongos y otros organismos. El quitosán es producido a nivel industrial por modificaciones químicas de la quitina y se encuentra también en la naturaleza en unos pocos organismos.

El quitosán es el copolímero aleatorio de la N-acetil (D)-glucosamina y de la (D)-glucosamina. La solicitud de patente internacional WO 03/068824 describe la estructura química del quitosán y varios procedimientos para obtener este quitosán. Además, esta solicitud de patente describe también un procedimiento para aislar derivados de la pared celular a partir de biomasa de hongos y levadura y un procedimiento para obtener quitosán a partir de este procedimiento. Esta solicitud de patente describe asimismo la utilización de quitosán en aplicaciones médicas, farmacéuticas, agrícolas, nutracéuticas, alimentarias, textiles, cosméticas, industriales y/o medioambientales.

Sin embargo, el quitosán adolece de varios inconvenientes, tales como las altas concentraciones necesarias para obtener un efecto fisiológico (más de 1 g por litro) y podría ser tóxico a tales concentraciones elevadas.

Combinaciones de pectina y quitosán

La patente US nº 5.919.574 describe películas laminadas biodegradables fabricadas a partir de pectina y quitosán. Esta patente expone que la propiedad catiónica de quitosán ofrece una oportunidad para aprovecharse de las interacciones electrostáticas con pectina aniónica parcialmente desmetilada. Los inventores de la presente patente exponen que existe una combinación de enlace de hidrógeno y fuerzas electrostáticas entre los grupos carboxilato de pectina y los grupos amino protonados de quitosán y que la actividad del agua compatible posibilita una interfase estable entre una película péctica y una película de quitosán. Esta patente describe asimismo la utilización de las películas laminadas obtenidas en numerosas aplicaciones, incluyendo las aplicaciones médicas (producción de parches, saquitos o bolsas biodegradables, encapsulación de células vivas, etc.).

La solicitud de patente internacional WO 01/82724 describe una composición que contiene aminopolisacáridos y polisacáridos con carga negativa. Entre los amino polisacáridos ensayados, los inventores describen quitosán y derivados de quitosán combinados con polisacáridos con carga negativa, tales como la pectina.

Sin embargo, ninguno de estos documentos describe que es posible mejorar la bioactividad de los fragmentos de pectina (oligogalacturonanos). Tampoco describen ningún efecto de moléculas de quitosán en la configuración bioactiva inducida por el calcio del galacturonano. Mas específicamente, ninguno de estos documentos describe un

estimulador o un efecto fertilizante para una combinación de pectina y fragmentos de quitosán.

5 Es sabido que la producción vegetal se consigue clásicamente mediante la utilización de productos químicos sintéticos que no son siempre aceptables desde el punto de vista ambiental y son normalmente costosos.

10 Por consiguiente, la utilización de estos productos naturales podría reducir la cantidad de la protección de la cosecha o de productos químicos fertilizantes aplicados a las cosechas, permitiendo una agricultura orgánica adecuada y minimizando el impacto medioambiental de la agricultura.

15 Durante las últimas décadas, las ventas de productos orgánicos han presentado un aumento anual de por lo menos el 20%. El sector de crecimiento más rápido de la agricultura en ventas al por menor de alimentos orgánicos y de bebidas fue aproximadamente de 12,8 miles de millones de dólares. El alimento orgánico está ganando también aceptación internacional en las naciones como Japón y Alemania, llegando a importantes mercados de alimentos orgánicos internacionales.

20

OBJETIVOS DE LA INVENCION

25 Un primer objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una composición que comprende galacturonanos con propiedades mejoradas, tal como una configuración de huevera estabilizada preferentemente detectable por el anticuerpo 2F4 (F. LINERS, J.-J. LETESSON, C. DIDEMBURG y P. VAN CUTSEM (1989) Monoclonal antibodies against pectin: recognition of a configuration induced by calcium. *Plant Physiol.* 91, 1419-1424), propiedades de bioactividad especialmente mejoradas para el crecimiento y la protección de las plantas.

30

Otro objetivo de la presente invención consiste en proponer una composición de productos naturales.

35 Un objetivo adicional de la presente invención consiste en proporcionar una composición que presenta nuevas propiedades para los oligogalacturonanos y que podría utilizarse en aplicaciones médicas, farmacéuticas, nutracéuticas, alimentarias, textiles, cosmética, industriales y/o medioambientales.

40

SUMARIO DE LA INVENCION

45 La presente invención se refiere a una composición que comprende uno o más oligogalacturonanos ((1→4)-α-D-galacturonano), oligoguluronanos (tales como los oligómeros de alginato) o algunos oligómeros que pueden presentar una configuración de "huevera", (con la adición de uno o más cationes (Ca²⁺, Na⁺,...)), detectándose preferentemente esta configuración por el anticuerpo 2F4 y se estabiliza además ventajosamente mediante (la adición de) uno o más sacárido(s) policatiónico(s). Un sacárido policatiónico significa un sacárido que tiene múltiples cargas positivas, preferentemente por lo menos 6 (seis) cargas.

50

Ventajosamente, estos sacáridos son productos naturales (diferentes de un polímero u oligómero sintético) lo que significa que pueden obtenerse a partir de una fuente natural renovable con pocas o ninguna modificaciones.

55

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 (cinco).

Además, los oligogalacturonanos presentes en la composición según la invención, presentan preferentemente un grado de polimerización (DP) superior a 8 (ocho), preferentemente comprendido entre 9 (nueve) y 20 (veinte) o entre 9 (nueve) y 15 (quince).

Los inventores han descubierto inesperadamente que dicha composición se caracteriza por un efecto sinérgico lo que significa que mejora los oligogalacturonanos y/o posiblemente los oligoguluronanos (por ejemplo, oligómeros de alginato) u otros oligosacáridos característicos (especialmente las propiedades agronómicas), pero también reduce posibles efectos secundarios de los sacáridos policatiónicos, especialmente si estos sacáridos policatiónicos son oligosacáridos de quitosán o polímeros de quitosán. En particular, dicha composición reduce inesperadamente posibles propiedades tóxicas de las moléculas de quitosán y por consiguiente controla y reduce la muerte celular (inducida por estas moléculas de quitosán a alta concentración).

Esta composición aumenta sinérgicamente la bioactividad de cada oligosacárido y combina sus efectos potenciadores individuales en varios campos, incluyendo las aplicaciones medicas, farmacéuticas, agrícolas, nutraceuticas, alimentarias, de piensos, textiles, cosméticas, industriales, producción de textiles o de papel y/o medioambientales. Esta composición podría unirse a una superficie de soporte sólido mediante un enlace covalente o no covalente.

En particular, esta composición es una composición estimuladora que podría utilizarse para proteger plantas (aumenta la defensa natural de la planta contra los patógenos) y para estimular el crecimiento y diferenciación de la planta. La estimulación puede explicarse como el (los) mecanismo(s) mediante el (los) cual(es) las células y los tejidos esencialmente de todos los organismos responden y se adaptan a los cambios en condiciones ambientales externas. En muchos casos, estos mecanismos utilizan las series de reacciones de receptores específicos para determinados productos químicos. Cuando dichos productos químicos entran en contacto con las superficies celulares, se unen específicamente a determinados receptores. Esta unión desencadena una cascada de sucesos dentro de las células, incluyendo la regulación por aumento y disminución del los genes y la activación o represión de las series de reacciones específicas dentro de las células. Estos procedimientos dan como resultados sustanciales cambios en la fisiología celular. De este modo, estos estimuladores son desencadenantes de respuestas fisiológicas drásticas. Además, una cantidad muy pequeña de la molécula estimuladora es suficiente a menudo para producir cambios superiores en la fisiología celular. Un ejemplo de actividad basada en el estimulador incluye la provocación de respuesta inmunitaria o de resistencia en plantas o animales.

La respuesta más precoz a los estimuladores se indica mediante cambios en la permeabilidad de la membrana y en la activación de los canales iónicos específicos que conducen a la entrada de Ca^{2+} y H^+ y el eflujo de Cl^- y K^+ (Cervone *et al.*, (1997) "Perception of fungal elicitors and signal transduction" En Aducci P., ed. Signal transduction in plants Basilea, Suiza: Birkhäuser Verlag, 151-177). Esta etapa se caracteriza también por cambios rápidos en el potencial transmembranario. En numerosos vasos, se observó la despolarización de la membrana (Kuchitsu *et al.*, (1993) "N-acetylchitoooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells" *Protoplasma* 174, 79-81). Estos efectos localizados en la membrana son seguidos por explosión oxidativa, la síntesis de fitoalexinas y la activación de genes de defensa (Templeton y Lamb (1988) "Elicitors and defense gene activation" *Plant, Cell and Environment* 11, 395-401). En el pasado, se han encontrado problemas con estrategias existentes para estimular la resistencia como método práctico de control de la enfermedad. Estos problemas han incluido citotoxicidad (amarillamiento, necrosis y enfermedad de las plantas en general),

carecen de niveles significativos de control de la enfermedad y falta de reproducibilidad/sostenibilidad. La composición de la presente invención alivia ventajosamente estas limitaciones.

Además, esta composición es una composición fertilizante, que podría utilizarse para aumentar, por ejemplo rendimientos de plantas, mediante el aumento de altura, espesor (de ramas, hojas, raíces....) biomasa o número de flores/frutos por planta. Se sabe que una medición de "biomasa", que es básicamente la densidad o cantidad de planta viva, está directamente relacionada con el rendimiento de la cosecha.

Sin embargo, la composición según la invención puede comprender asimismo otros elementos, tales como otros oligosacáridos, reguladores del crecimiento (o factores de crecimiento), minerales, iones, nutrientes, aditivos para alimentos, potenciadores de sabor, colorantes, vitaminas, minerales, fragancias, fitonutrientes, y otras moléculas bioactivas para mejorar la bioactividad de la composición, especialmente la bioactividad de cada oligosacárido en estas aplicaciones varias.

Por consiguiente, la composición según la invención corresponde a una composición farmacéutica (incluyendo una vacuna), un adyuvante, una composición cosmética, un alimento o composición alimenticia (incluyendo alimento funcional o pienso funcional), un aditivo para alimentos, una bebida (especialmente vino, cerveza o zumo de frutas) o un adyuvante para una bebida, un producto fitosanitario (preferentemente una composición micótica), un fertilizante, un productor o un adyuvante de estos productos.

Por ejemplo, la composición según la invención podría utilizarse para recubrir a partir de dicha bebida, partículas orgánicas, microorganismos, coloides, proteínas, metales pesados, pesticidas residuales, micotoxinas y endotoxinas.

La composición según la invención podría utilizarse también como aditivo para alimentos naturales destinados a obtener actividades antimicrobianas y antifúngicas contra un intervalo amplio de hongos (incluyendo levadura) y bacterias y podría utilizarse también como adyuvante para conservantes de alimentos convencionales y agentes contra el ennegrecimiento, como componente para películas comestibles permeables adecuadas para el almacenamiento de frutas/vegetales, como agente de espesamiento, estabilización o emulsionante, como agente tixotrópico o como aditivo natural de sabor. Puede utilizarse también en varios procedimientos de alimentación, ya que puede aplicarse por ejemplo como agente espumante, como espesador o como estabilizante.

La actividad antimicrobiana y antimicótica (para la protección de semillas o frutos vegetales) de la composición según la invención puede utilizarse en la industria de alimentos o de piensos para obtener un periodo de caducidad prolongado, maduración y putrefacción retardadas de las frutas o vegetales, para la conservación de la carne, crustáceos (ostras), frutas, vegetales y productos acabados, posiblemente en combinación con conservantes convencionales (sulfito o benzoato sódico) o como alternativa a estos conservantes.

La composición según la invención puede aplicarse asimismo en fibras textiles en forma de película o por impregnación de esta fibra o tejido con una solución que comprende la composición según la invención. Por consiguiente, la propiedad de la fibra de un textil puede modificarse (propiedades antibacterianas y/o antifúngicas mejoradas). Este textil puede corresponder también a un textil médico para el tratamiento de heridas.

Las aplicaciones cosméticas de la composición según la invención son particularmente adecuadas para la formulación para el cuidado de la piel (crema, loción) o para la formulación del cuidado del cabello (como atomizadores, champús o formulación después del champú), en la composición para maquillaje o en pastas dentífricas y pueden también utilizarse por sus propiedades anti-UV, en la preparación de desodorantes, en composición para la higiene bucal y en composición para la encapsulación de pigmentos.

Ventajosamente, debido a su origen no animal, es posible utilizar la composición sin provocar riesgos de alergias.

5 En las aplicaciones medioambientales, la composición según la invención podría utilizarse como agente quelante (quelante de metal pesado) o para el tratamiento de agua residual, especialmente en las técnicas de purificación de agua para la segregación de compuestos orgánicos y metales pesados. Pueden utilizarse también para precipitar determinados compuestos residuales u otros contaminantes, tales como DDT o policlorobenzenos o para fijar radicales.

10 Ventajosamente, la composición según la invención podría utilizarse asimismo en procesos de fabricación de papel. Puede reemplazar a algunos sustituyentes amino tal como goma o polisacáridos polisintéticos y es adecuada para reducir la utilización de aditivos químicos y para mejorar los resultados.

15 Es posible también que el papel obtenido mediante la utilización de la composición según la invención pueda presentar una superficie más suave y mejor resistencia a la humedad. Puede utilizarse asimismo para la producción de papel sanitario, papel de embalaje y cartón.

20 Otra aplicación ventajosa de la composición según la invención es en el campo de aplicación en medicina y farmacéutica.

25 Debido a estas buenas propiedades de bioadhesión, la composición según la invención podría aplicarse como adyuvante quirúrgico antiadhesivo, para impedir la adhesión entre tejidos durante la intervención quirúrgica y como adyuvante para vacunas, gracias a una buena mucoadhesión.

30 La presente invención se refiere asimismo por consiguiente a cualquier biomaterial que comprende la composición según la invención para aplicaciones médicas, de diagnóstico o investigación específicas de compuestos que deben ser liberados en los intestinos, debido a la falta de digestión de la composición de la invención en el estómago (liberación retardada).

35 La presente invención puede formularse como aditivo para la aplicación oral y parenteral controlada y puede mejorar asimismo la eficacia de vehículos orales mediante modificaciones químicas y la unión de fármacos y otras moléculas biofuncionales y puede utilizarse asimismo para mejorar las propiedades que forman películas y geles de conocidos compuestos y puede utilizarse para la fabricación de membranas transdérmicas.

40 Sus propiedades mucoadhesivas pueden utilizarse asimismo para obtener un buen contacto con las capas de la piel y para mejorar el sistema de administración de fármacos innovadores mediante la administración local y generalizada. Pueden utilizarse también en la preparación de excipientes en la formación de comprimidos, en la granulación de polvos, en la preparación de emulsiones, como agentes humectantes y de recubrimiento. Se pueden utilizar asimismo sus diversas características ventajosas, tal como su bioadhesividad y su capacidad para formar fármacos complejos (aniónico, catiónico o anfifílico) y polímeros en el sistema farmacéutico para mejorar la solubilidad de fármacos muy poco solubles en agua, para mejorar la absorción de fármacos a través de tejidos de mucosas y para potenciar (mejorar o modular) la respuesta inmunológica de las vacunas (como adyuvantes de vacunas).

55 Las conocidas propiedades farmacéuticas de quitosán, especialmente en cicatrización de heridas permiten la utilización de la composición para prevenir o tratar la formación de porciones de fibrina en heridas, para prevenir la formación de cicatrices y para soportar la regeneración celular.

La composición puede utilizarse asimismo para la ingeniería tisular, el trasplante celular y la encapsulación celular. Puede utilizarse en películas permeables al aire, para soportar la regeneración celular, mientras se protege el tejido de las agresiones microbianas, para formar suturas y vendajes, para la preparación de piel artificial, en sistemas para la reconstrucción de tejidos y órganos y/o el trasplante de células (posiblemente suturas y vendajes bio(degradables)).

Por consiguiente, estas aplicaciones farmacéuticas podrían combinarse ventajosamente con compuestos conocidos, para reparaciones de tejidos, tales como los biomateriales que contienen partículas de huesos o partículas de cartílagos, iones y sales, factores de crecimiento y hormonas y derivados del plasma, tales como fibrinógeno, factores de coagulación, plaquetas, incluyendo plaquetas ricas en plasma y plaquetas pobres en plasma (PRP y PPP), antibióticos, vitaminas, factores de diferenciación, citocinas, interferones, proteínas de tejidos blandos (tales como cartílagos, elastina, fibrina o sus precursores), etc.

La composición según la invención presenta ventajosas características de hidratación, propiedades para cicatrización de heridas, propiedades de regeneración y propiedades antimicrobianas y/o antimicóticas.

La composición según la invención podría presentarse en varias formas, especialmente en forma líquida (por ejemplo, soluciones acuosas), en forma de partículas (nanopartículas, microesferas y suspensiones o emulsiones de las mismas, granulados), y en forma sólida porosa o no porosa. Al considerar las aplicaciones agrícolas y agroquímicas de la presente composición, contendrán por lo general componentes adicionales conocidos por ser útiles para aplicar materiales a cultivos en crecimiento, tal como uno o más materiales transportadores, materiales tampón para control de pH y similares. El agua se utiliza con frecuencia como vehículo, pero pueden utilizarse también otros vehículos convencionales. Se apreciará que la cantidad de solución requerida para el tratamiento del cultivo dependerá del cultivo en particular que se está tratando. Dicha cantidad es la que determina fácilmente un experto en la materia.

La composición según la invención podría aplicarse asimismo fácilmente en sistemas agrícolas y agroquímicos, como recubrimiento conservante y agente bioestático cuando se aplica en frutas, vegetales y cultivos, como fertilizante, como agente que aumenta el número de microorganismos útiles en el suelo y la disminución de los perjudiciales ("control biológico"). Control biológico significa la reducción de la cantidad de inóculo o de actividad productora de enfermedad de un patógeno realizada por uno o más organismos distintos del hombre o mediante los mismos (Harman *et al.*, "Enzymes, Biological Control and Comercial Applications," Trichoderma and Gliocladium Vol. 2, Cap. 6 (1998)). Las cepas para control biológico son conocidas en la técnica y son eficaces en una gran variedad de hábitats y frente a una variedad de patógenos (Harman *et al.*, véase anteriormente). Ejemplos de organismos para control biológico puede ser cualquiera de los identificados como útiles para el control biológico de enfermedades de plantas, incluyendo, sin limitación, los de los géneros siguientes: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Phytium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Botrytis* y *Sclerotinia* (Harman *et al.*, véase anteriormente, y las patentes US nº 5.474.926 y nº 6.512.166). Las semillas vegetales pueden empaparse en soluciones acuosas de la composición según la invención para prevenir infecciones micóticas y/o microbianas y aumentar la producción vegetal. La composición de la invención puede utilizarse también para obtener un recubrimiento eficaz de las semillas.

En concentraciones adecuadas, la composición de la invención puede utilizarse para activar mecanismos de defensa de las plantas contra infecciones y agresiones de parásitos (efecto estimulador) mediante aplicaciones generalizadas y/o tópicas. Dicho efecto estimulador puede medirse mediante determinadas actividades enzimáticas producidas en las plantas tratadas con la composición de la invención, tales como las actividades de glucanasa, quitinasa y fenilalanina amoníaco liasa (PAL).

Además de sus propiedades estimuladoras, bioestáticas, fertilizantes y/o conservantes, la composición según la invención podría utilizarse para reforzar las raíces de la planta y para engrosar el tronco de las plantas. La composición de la invención puede utilizarse asimismo como sustitución, aumento o modulador de fitohormonas.

La composición de la invención puede utilizarse asimismo para estimular la síntesis de agentes protectores por la propia planta, para acelerar la germinación y el crecimiento de las plantas. Ejemplos de agentes protectores sintetizados por las plantas son: óxido nítrico (NO), especies de oxígeno reactivo (ROS), ácido salicílico, ácido jasmónico, proteínas relacionadas con la patogénesis y fitoalexinas.

La composición según la invención puede aplicarse a semillas, hojas, flores/frutos y/o raíces de las plantas mediante sistemas de pulverización, rociado, empapado, mojado, inyectables y por fertilización. Como fertilizante, la composición de la invención puede aplicarse indistintamente mediante alimentación en el suelo o alimentación foliar con objeto de acelerar la germinación del crecimiento de las plantas. La composición de la invención puede esparcirse en forma seca o como una dilución de una solución. Como estimulador, la composición deseada de la presente invención puede aplicarse en forma de atomización, o en forma sólida, en la que el estimulador está presente junto con un vehículo adhesivo aceptable desde el punto de vista agrícola, por ejemplo, metilcelulosa o goma arábiga y aplicarse en forma de polvo. La aplicación de la formulación puede realizarse según técnicas bien conocidas según los expertos en la materia tal como mediante la preparación de una atomización para la aplicación al cultivo en crecimiento. Se apreciará que la cantidad de solución requerida para el tratamiento del cultivo dependerá del cultivo concreto que se está tratando. Dicha cantidad es la que determina fácilmente un experto en la materia.

Las plantas de interés son dicotiledóneas y monocotiledóneas, preferentemente plantas económicamente importantes seleccionadas de entre el grupo constituido por: tomates, zanahorias, pepinos, guisantes, lechugas, pimientos, remolachas azucareras, patatas, trigo, maíz, arroz, alfalfa, cebada, centeno, girasol, cacahuete, batata, alubias, achicoria, endibia, col, coles de Bruselas, chirivía, nabos, coliflor, brécol, rábanos, espinacas, cebolla, ajo, berenjena, guindilla, apio, zumo de naranja, calabaza, calabacín, manzana, pera, melón, frutos agrios, fresa, uvas, frambuesa, piña, soja, tabaco, sorgo y azúcar de caña. Ejemplos de plantas ornamentales son: geranio, ponsetia, crisantemo, clavel, zinnia y céspedes artificiales.

La composición de la invención puede utilizarse también para obtener un recubrimiento de conocidos productos fitosanitarios tales como fungicidas, plaguicidas, herbicidas, etc. Debido a sus características mejoradas, puede utilizarse para obtener una disminución en la cantidad de pesticidas utilizados normalmente para el tratamiento de estas plantas.

Las ventajosas características adhesivas de la composición según la invención también permiten su utilización en otros campos (química, metalurgia, electrónica, textil, etc.) para el recubrimiento de soportes sólidos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al proceso de preparación de la composición según la invención, en la que una cantidad suficiente de uno o más sacáridos policatiónicos se añade a los oligogalacturonanos (o cualquier otro oligosacárido adecuado (oligogalacturonanos) que puede presentar una configuración de "huevera"). Esta cantidad suficiente se define ventajosamente según la concentración de oligogalacturonanos (o de dichos otros oligosacáridos) inicialmente presentes y en el grado de polimerización de estos sacáridos.

En el proceso de preparación según la invención, se mezclan varios elementos siempre que se obtenga una solución acuosa uniforme, es decir, que no se observa la

formación de polímeros o gel. Además, el pH de la composición se mantiene preferentemente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0 (para obtener una solubilidad eficaz del componente y para mantener la seguridad de la planta tratada), cuando sea aplicable. La composición de la invención puede prepararse, por ejemplo, diluyendo una solución madre en agua o cualquier otro disolvente apropiado, o mezclando una forma sólida de la composición en agua o cualquier otro disolvente apropiado. Las composiciones preparadas de este modo son adecuadas para la administración por las vías de administración tópica o generalizada.

Para este procedimiento de preparación, una cantidad adecuada de iones está también presente para obtener esta configuración de huevera preferentemente detectable por el anticuerpo 2F4. 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), pueden utilizarse para obtener la configuración en huevera bioactiva de estos oligogalacturonanos (u otros oligosacáridos) estabilizados además mediante la adición de estos sacáridos policatiónicos. Se puede disminuir la relación de cationes divalentes/monovalentes en condiciones no fisiológicas (tal como ELISA) o aumentar en condiciones fisiológicas (tales como los cultivos celulares) en las que, por ejemplo, una alta concentración de Na^+ sería perjudicial. Se utiliza preferentemente Ca^{2+} como ión divalente. Otros cationes divalentes son también adecuados (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , ...).

Para los oligogalacturonanos que presentan altos grados de polimerización (superiores a 8) se añade una cantidad superior de sacáridos policatiónicos. Esta concentración se define también según el número de cargas positivas presentes en los sacáridos policatiónicos.

Esta concentración se caracteriza por el grado de polimerización de los sacáridos policatiónicos añadidos. Preferentemente, los oligosacáridos añadidos presentan un grado de polimerización superior a 5.

Ventajosamente, la cantidad de los dos componentes se define según las características de la composición que debe obtenerse, preferentemente para obtener una estabilización eficaz requerida para la configuración de "huevera" que se caracteriza preferentemente por su capacidad para unirse al anticuerpo específico PP-2F4 (Ig G1 de ratón) comercializado por la compañía Plantprobes (UK) (www.plantprobes.co.uk).

Otro aspecto de la invención se refiere al envejecimiento de la mezcla con objeto de aumentar la proporción de moléculas de galacturonano en la configuración bioactiva como se ejemplifica a continuación.

Los sacáridos de alginato (oligogalacturonanos) unen los iones Ca^{2+} en un proceso cooperador, que se ha explicado también según el "modelo de huevera". Se pueden estabilizar estas hueveras de alginato con los oligosacáridos de quitosán u otros polímeros policatiónicos (poliaminas o sacáridos policatiónicos).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de esta composición en la aplicación mencionada anteriormente, especialmente en aplicaciones médicas, farmacéuticas, nutracéuticas, alimentarias, de piensos, textiles, cosméticas, industriales, agronómicas y/o medioambientales, especialmente en las que se observan los dos componentes de la composición o en aplicaciones en las que se reducen los posibles inconvenientes de uno o ambos componente(s) individual(es); por ejemplo, para modular la muerte celular producida por componentes individuales, para obtener una reducción de la reacción del estrés oxidativo producida por adición de componentes individuales (por ejemplo, para obtener menor acumulación de especies de oxígeno reactivo, tal como de peróxido de hidrógeno), y para obtener un aumento de actividad en

los sistemas celulares (tal como la actividad de fenilalanina amoniaco liasa implicada en la defensa contra estrés bióticos producidos por patógenos).

5 Otro aspecto todavía de la presente invención es un procedimiento para aumentar la resistencia de las plantas a las enfermedades. Este procedimiento implica aplicar una composición de la presente invención a plantas en condiciones eficaces para aumentar la resistencia de la planta a las enfermedades. La aplicación de la composición deseada de la presente invención se realiza como se ha descrito anteriormente, utilizando una cantidad suficiente de la composición deseada de la presente invención preparada de manera apropiada por el modo seleccionado de aplicación.

10 Un aspecto más de la presente invención es un procedimiento para aumentar los rendimientos de las plantas, mediante aumento de altura, grosor (de tronco, hojas, raíces...), biomasa o numero de flores/frutos por planta. Este procedimiento conlleva aplicar una composición de la presente invención a las plantas en condiciones eficaces para obtener superiores rendimientos. La aplicación de la composición deseada de la presente invención se lleva a cabo tal como se ha descrito anteriormente, utilizando una cantidad suficiente de la composición deseada de la presente invención preparada de manera apropiada por el modo de aplicación seleccionado.

15 La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos adjuntos, haciendo referencia a las figuras adjuntas que se presentan como una ilustración no limitativa de las diversas formas de realización de la presente invención.

25

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: preparación de quitoooligosacáridos

30 El quitosán a aproximadamente 10,0 g/l de concentración se disolvió durante la noche agitando a temperatura ambiente en tampón acetato 0,175 M aproximadamente, pH 5,5 aproximadamente. Esta solución de quitosán (aproximadamente 90 ml) se mezcló con 10 ml de Pectinex Ultra SPL (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca). La mezcla de reacción se incubó a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 24 h. Los quitoooligosacáridos se aíslan por precipitación selectiva en metanol al 90% del hidrolizado de quitosán neutralizado. La composición obtenida del conjunto de quitoooligosacáridos se presenta en la Tabla 1.

35

TABLA 1: Composición iónica asignada del espectro MALDI-TOF-MS de quitoooligosacáridos con grados de polimerización (DP) de 6 o superiores preparada por hidrólisis enzimática y fraccionada por precipitación selectiva por metanol al 90%.

<i>m/z</i>	Composición iónica	Tipos
1007,4	(GlcN) ₆	[M+Na] ⁺
1023,4		[M+K] ⁺
1049,9	(GlcN) ₅ -GlcNAc	[M+Na] ⁺
1109,9	(GlcN) ₃ -(GlcNAc) ₃	[M+H] ⁺
1168,4	(GlcN) ₇	[M+Na] ⁺
1184,4		[M+K] ⁺
1210,7	(GlcN) ₆ -GlcNAc	[M+Na] ⁺
1226,4		[M+K] ⁺
1270,7	(GlcN) ₄ -(GlcNAc) ₃	[M+H] ⁺
1329,5	(GlcN) ₈	[M+Na] ⁺
1345,5		[M+K] ⁺
1371,8	(GlcN) ₇ -GlcNAc	[M+Na] ⁺
1387,5		[M+K] ⁺
1490,5	(GlcN) ₉	[M+Na] ⁺
1506,5		[M+K] ⁺
1532,8	(GlcN) ₈ -GlcNAc	[M+Na] ⁺
1651,6	(GlcN) ₁₀	[M+Na] ⁺
1812,7	(GlcN) ₁₁	[M+Na] ⁺

EJEMPLO 2: preparación de oligogalacturonos

Se obtuvieron oligómeros pécticos por hidrólisis enzimática del ácido poligalacturónico. Se hidrolizó la solución de PGA (aproximadamente 2% p/v, pH 6,0, 90 ml) con aproximadamente 10 ml de solución Pectinex Ultra SPL (1:3.000) durante 60 min. Una vez se hirvió la solución durante aproximadamente 10 min., se fraccionaron los oligosacáridos pécticos por precipitación selectiva de su sal de bario. La composición obtenida del conjunto de oligogalacturonos se presenta en la figura 1 que es un modelo de elución HPAEC-PAD de la mezcla de oligogalacturonos del hidrolizado péctico. Los picos están marcados según su correspondiente grado de polimerización.

EJEMPLO 3: Estabilización de la configuración en huevera

Los quitoooligosacáridos son capaces de estabilizar la configuración en huevera de los oligogalacturonos producida por los iones calcio. Este efecto depende del grado quitoooligosacárido de la polimerización, del grado de acetilación (DA) y de la relación molar quitoooligosacárido/ácido galacturónico en la mezcla. Se utilizó un anticuerpo monoclonal (denominado 2F4), que reconoce la configuración de la pectina en huevera producida por el calcio.

Recubrimiento de micropocillos con inmunoglobulina anti-ratón: Se repartieron 50 µl de inmunoglobulina anti-ratón (molécula completa, SIGMA) (aproximadamente 0,05 mg/ml en tampón carbonato 50 mM, pH 9,5) en cada pocillo de microplacas NUNC High Binding Capacity (MAXISORP) y se dejaron toda la noche a 4°C. Se bloqueó la unión no específica incubando los pocillos durante aproximadamente 2 h a aproximadamente 37°C con aproximadamente 200 µl de albúmina de suero bovino (aproximadamente 30 mg/ml preparados en ampón de acetato 50 mM, pH 5,7 que contiene aproximadamente CaCl₂ y 0,5 mM y NaCl aproximadamente 150 mM). Esta solución cuando se expresa en miliequivalentes, corresponde a 1 miliequivalente de calcio, ya que el calcio es un catión

divalente y 150 miliequivalentes de sodio ya que el sodio es un catión monovalente. Tras la eliminación del exceso de albúmina, se añadieron soluciones competitivas a los pocillos.

5 Preparación de soluciones competitivas e incubación con anticuerpos: se prepararon soluciones competitivas con 100 µl de ascitis 2F4 diluidas 177 veces en tampón de acetato que contiene la solución $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ descrita anteriormente y se incubaron previamente con aproximadamente 100 µl de la solución mezcla del material péptico y quitoooligosacáridos y durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente a 25°C. Estas mezclas de oligosacáridos-anticuerpo se centrifugaron a continuación durante aproximadamente 10 minutos en aproximadamente 7.500 g antes de repartir los sobrenadantes en micropocillos recubiertos con inmunoglobulina anti-ratón y bloqueados como se ha descrito anteriormente. Las microplacas que contienen sobrenadantes de los ensayos competitivos se incubaron durante aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 37°C. Las microplacas se lavaron a continuación ocho veces con el tampón que contiene la solución $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ como se ha descrito anteriormente y que contiene además aproximadamente 0,1% de Tween 20 antes de la adición de aproximadamente 50 µl de inmunoglobulina anti-ratón de oveja marcada con peroxidasa de rábano picante (aproximadamente 1:5.000 en tampón acetato 50 mM que contiene la solución de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ descrita anteriormente) durante 60 minutos a 37°C. Después de un segundo ciclo de lavado se reveló la unión de los anticuerpos mediante aproximadamente 100 µl del sustrato K-blue TMB aumentado (Neogen Corporation, Lexington, KY, US) incubado aproximadamente 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. El proceso de revelado fue interrumpido por aproximadamente 50 µl de HCl 1 N. La absorbancia de la solución se midió después de 15 minutos con un Titertek multiscan® a 405 nm.

30 La Figura 2 representa la estabilización del calcio producida por la dimerización de los oligogalacturonanos (DP9-DP15) por quitoooligosacáridos de bajo DA y diferentes grados de polimerización. Los MoAb 2F4 se incubaron con oligogalacturonanos y diferentes concentraciones de quitoooligosacáridos con DA~10% de bajo y alto DP. Las mezclas resultantes se centrifugaron y se dispersaron los sobrenadantes en micropocillos recubiertos con Ig anti-ratón. Los resultados se expresan en porcentaje de la adsorbancia de la referencia sin quitoooligosacáridos.

35

EJEMPLO 4: experimentos *in vitro*

40 A. Las moléculas pépticas impiden la muerte celular producida por elevadas concentraciones de quitoooligosacáridos totalmente desacetiladas en suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana*. La viabilidad celular se expresa en función del contenido en proteínas de las células (mg de proteínas/peso en fresco (FW)).

45 La Figura 3 representa el contenido en proteínas de suspensiones celulares de *Arabidopsis* 24 h después del tratamiento con quitoooligosacáridos (completamente desacetilados, DP entre 5 y 9), oligogalacturonanos (DP superior a 8) y su combinación. Los datos significan la media ± SD de muestras por triplicado de una representación de dos experimentos independientes.

50 Células cultivadas en suspensión procedentes de hojas de la cepa L-MM1 de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Landsberg erecta* se cultivaron en medio Murashige y Skoog (aproximadamente 4,43 g/l) con sacarosa (aproximadamente 30 g/l) y aproximadamente 0,5 µg/ml de NAA y aproximadamente 0,05 µg/ml de Kinetin, pH 5,7. Se mantuvieron los cultivos en un fotoperiodo de luz/oscuridad de 16 h/8 h, a aproximadamente 25°C en un agitador rotativo a 100 rpm. Se diluyeron 10 veces las células en medio creciente cada 7 días.

55

Los quitoooligosacáridos que deben analizarse se disolvieron en 250 µl de agua destilada, se filtraron a través de un filtro con membrana de 0,22 µm (MILLIPORE) y se añadieron asépticamente a aproximadamente a 10 ml de células cultivadas en suspensión de 3 días y se incubaron aproximadamente 24 horas a aproximadamente 25°C en agitación suave. Se centrifugaron 5 ml de la mezcla de reacción durante aproximadamente 5 min., aproximadamente 100 g y aproximadamente a 4°C para recoger las células. Se homogeneizaron las células a aproximadamente 4°C en aproximadamente 1 ml de tampón borato 0,1 mM aproximadamente (pH 8,8) que contenía aproximadamente 2 mM de mercaptoetanol. Se centrifugó el homogeneizado a 4.000 rpm durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4°C. Se determinó la concentración en proteínas en extractos por el ensayo de proteínas de Bradford (BIO-RAD).

B. Los quitoooligosacáridos en combinación con oligogalacturonanos estimulan el crecimiento celular en suspensión celular de zanahoria. Este experimento se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente, pero utilizando una suspensión celular de zanahoria (*Daucus carota*). Se midió la densidad celular en peso (g de células/ml).

La Figura 4 representa la densidad celular de la suspensión celular de zanahoria 24 h después del crecimiento con quitoooligosacáridos (completamente desacetilados, DP entre 5 y 9), oligogalacturonanos (DP superior a 8) y su combinación. Los datos son la media ± SD de las muestras por triplicado de una representación de dos experimentos independientes.

C. Combinaciones específicas de oligogalacturonanos y quitoooligosacáridos tienen actividad de estimulador de reacción de defensa de la planta superior a los oligosacáridos individuales

Este experimento se realizó como se ha descrito anteriormente. Se determinó la actividad de PAL (EC 4.3.1.5.) en 0,125 ml de sobrenadante en presencia de aproximadamente 1,37 ml de tampón borato aproximadamente 0,1 M (pH 8,8) enriquecido con aproximadamente 60 mM de L-fenilalanina como describen Beaudoin-Eagan y Thorpe (*Plant. Physiol.* 78:438-441, 1985) y expresado como micromoles de ácido cinnámico producido por mg de proteína por hora).

La Figura 5 representa la producción de actividad de PAL en suspensión celular de *Arabidopsis* 24 h después del tratamiento con quitoooligosacáridos (completamente desacetilados, DP entre 5 y 9), oligogalacturonanos (DP superior a 8) y su combinación. Los datos son la media ± SD de las muestras por triplicado de una representación de dos experimentos independientes.

D. Combinaciones específicas de oligogalacturonanos y quitoooligosacáridos producen estrés oxidativo inferior en plantas que la aplicación individual de estos oligosacáridos

Las condiciones del cultivo celular son similares a las descritas anteriormente.

Medición de H₂O₂: Se disolvieron los quitoooligosacáridos que deben analizarse en aproximadamente 50 µl de agua destilada. Se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,22 µm (MILLIPORE) y se añadieron a aproximadamente 5 ml de células cultivadas en suspensión de 3 días y se incubaron a 25°C con agitación. Se separaron alícuotas de aproximadamente 100 µl cada 4 minutos durante 30 minutos, se centrifugaron rápidamente a alta velocidad y se midió la concentración de H₂O₂ en el sobrenadante utilizando un kit de análisis Amplex Red hydrogen peroxide/Peroxidase (MOLECULAR PROBES) según las instrucciones del fabricante.

La Figura 6 representa la acumulación de peróxido de hidrógeno en suspensión celular de *Arabidopsis* 24 h después del tratamiento con quitoooligosacáridos (completamente desacetilados, DP entre 5 y 9), oligogalacturonano (DP superior a 8) y su

combinación. Los datos son la media $\pm$ SD de muestras por triplicado de una representación de dos experimentos independientes.

EJEMPLO 5: Las combinaciones específicas de oligogalacturónidos y quitoooligosacáridos pueden ser absorbidas por semillas de tomate y estimular el crecimiento de la planta

Se sumergieron semillas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) de la variedad "Moneymaker" en una solución que contiene una mezcla de oligogalacturónidos y quitoooligosacáridos en condiciones iónicas adecuadas para producir la formación de dímeros péptidos (cationes $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ a aproximadamente una relación Ca^{2+} 0,5 mM/ Na^{+} 150 mM) o una solución que contiene todos los elementos de la mezcla excluyendo la mezcla de oligosacáridos (referencia) durante 4 horas. Los quitoooligosacáridos utilizados presentaban un grado de acetilación del 25%. A continuación, se secaron las semillas antes de la plantación y se cultivaron durante 30 días en un lecho para semillas de 6 cavidades en el suelo a 25°C en un régimen de 16 h de luz diurna/8 h de oscuridad.

La Figura 7 representa la biomasa (en fresco y en seco) de plantas de tomate de 30 días obtenidas a partir de las semillas tratadas con quitoooligosacáridos, oligogalacturónidos y su combinación, expresados como porcentaje de la biomasa de las plantas de referencia. Se informa de los valores de la media $\pm$ SE (n=3). Las letras mayúsculas y las letras minúsculas se refieren a dos ensayos de ANOVA independientes. Los datos con letras iguales no son estadísticamente diferentes (P<0,05).

EJEMPLO 6: Aplicación foliar de combinaciones específicas de oligogalacturónidos y quitoooligosacáridos producen sinérgicamente reacciones de defensa en plantas de tomate

Se cultivaron plantas de tomate de la variedad "Moneymaker" en el suelo en condiciones controladas con un régimen de luz/oscuridad de 16 h/8 h respectivamente, a 25°C, durante 20 días antes de ser atomizados con soluciones que contienen la mezcla de oligogalacturónidos y quitoooligosacáridos a razón de 250 mg.l⁻¹ disueltos en una solución de pH 5,5 que contiene Tween 20 a aproximadamente 0,01% y cationes $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ a aproximadamente una relación de Ca^{2+} 0,5 mM/ Na^{+} 150 mM. Los quitoooligosacáridos utilizados en la mezcla presentaban un grado de acetilación (DA) del 25%. Como referencia, el agua que contenía aproximadamente Tween 20 al 0,01% se atomizó en las hojas.

Después de 24 horas, las verdaderas hojas de las plantas tratadas por atomización se recogieron y molieron en nitrógeno líquido. Se extrajeron las hojas en polvo en tampón de acetato sódico 50 mM, pH 5,2 que contenía EDTA aproximadamente 5 mM, β -mercaptoetanol aproximadamente 14 mM y NaCl aproximadamente 1,0 M a una caudal de aproximadamente 1 g de hojas en polvo por cada 2 ml de tampón. El extracto se centrifugó a continuación a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Se analizó en el sobrenadante la actividad de dos proteínas relacionadas con la patogénesis: glucanasa (actividad expresada en mg de glucosa liberada/mg de proteína.min.) (Boudart *et al.* (1988) *Planta* 206:86-94) y quitinasa (actividad expresada en picomoles de p-nitrofenol liberado/mg de proteína.min.) (Kit de ensayo de quitinasa, Sigma).

La Figura 8 representa la producción de glucanasa y la actividad de quitinasa en plantas de tomate después de 24 horas de una aplicación foliar de la mezcla de oligogalacturónidos y quitoooligosacáridos. Se describen los valores de la media $\pm$ SE (n=3). Las pruebas ANOVA indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) entre las plantas tratadas con la solución de referencia y la mezcla.

**EJEMPLO 7: Combinaciones específicas de oligogalacturónidos y
quitoligosacáridos provocan sinérgicamente reacciones de defensa en plantas de
Arabidopsis**

Se cultivaron plantas de *Arabidopsis thaliana* a 25°C en un régimen de 16 h de luz diurna/8h de oscuridad, en un medio semisólido que contenía aproximadamente 4,4 g/ml de nutrientes de Murashige y Skoog, aproximadamente 30 g/l de sacarosa y aproximadamente 0,3 g/l de agar-agar. Se separaron las plantas de crecimiento completo del medio, se lavaron con tampón MES aproximadamente 0,05 M a pH 5,7 y se transfirieron al mismo tampón con cationes $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ en la relación Ca^{2+} aproximadamente 0,5 mM/ Na^{+} 150 mM que contiene oligogalacturónidos (DP 9-20) solos, quitoligómeros (DP 5-9, DA 25%) solos o una mezcla de oligogalacturónidos y quitoligómeros. Se determinó la actividad de fenilalanina amoníaco liasa (PAL) 24 h después (micromoles de ácido cinnámico producidos/mg de proteína.h).

La Figura 9 representa la producción de actividad de PAL en plantas de *Arabidopsis* tratadas con oligogalacturónidos, quitoligómeros o su combinación. Los valores de la media $\pm$ SE se describen (n=3). La prueba ANOVA indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para las plantas tratadas con quitoligómeros o mezcla.

EJEMPLO 8: EFLUJO DE POTASIO Y ALCALINIZACION DEL MEDIO

Células cultivadas en suspensión procedentes de hojas de *Arabidopsis thaliana*, cepa L-MM1, ecotipo *Landsberg erecta* se cultivaron en medio de Murashige y Skoog (aproximadamente 4,43 g.l⁻¹) con sacarosa (aproximadamente 30 g.l⁻¹) aproximadamente 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de NAA, aproximadamente 0,05 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de cinetina, pH 5,7. Los cultivos se mantuvieron en un fotoperiodo luz/oscuridad de 16 h/8 h, a aproximadamente 25°C en un agitador rotativo a 100 rpm. Se diluyeron las células 10 veces en medio reciente cada siete días. Se utilizaron las células de siete días para los experimentos.

Los quitoligosacáridos (aproximadamente 30 mg.l⁻¹), los oligogalacturónidos (aproximadamente 40 mg.l⁻¹) y una mezcla de ambos oligosacáridos (aproximadamente 70 mg.l⁻¹) se disolvieron en una solución que contenía sacarosa 10 mM, Ca^{2+} 0,5 mM, Na^{+} aproximadamente 50 mM y MES aproximadamente 0,5 mM se ajustó el pH a 5,7 con Tris-(hidroximetil)-aminometano.

Alícuotas de las células lavadas (100 mg de peso en fresco (FW) ml⁻¹) se colocaron en viales de vidrio y el medio de incubación se cambió por un volumen igual de soluciones de la prueba y se agitó en un agitador rotativo a 150 rpm. Se determinaron el pH extracelular y las concentraciones de K^{+} en alícuotas del medio de incubación obtenidas por filtración rápida de las células a través de Miracloth® (Calbiochem).

Se controlaron los cambios de pH extracelular con un electrodo de pH y se determinaron las concentraciones de K^{+} extracelular en HCl 1 N utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (PU 9200X, Pye-Unicam, Cambridge, U.K.).

La Figura 10 muestra el eflujo de potasio de las células en suspensión de *Arabidopsis* tratado con quitoligómeros, oligogalacturónidos o su mezcla. La mezcla controla el eflujo de potasio en valores similares a los oligogalacturónidos solamente.

La Figura 11 muestra la alcalinización del medio de células en suspensión de *Arabidopsis* tratados con quitoligómeros, oligogalacturónidos o su mezcla. La mezcla produce la alcalinización del medio mantenida mientras que los componentes individuales tienen un efecto durante menos de una hora después del tratamiento.

La Figura 12 representa la alcalinización del medio de las células en suspensión de *Arabidopsis* 24 h tras el tratamiento con quitoooligómeros, oligogalacturónidos o su mezcla. La mezcla produce una alcalinización del medio claramente superior a la de los componentes individuales.

EJEMPLO 9: ANÁLISIS PROTEOMICOS/GENÓMICOS/TRANSCRIPTÓMICOS

Para estos análisis, se realizaron cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* como se ha descrito anteriormente.

A. Análisis proteómico de proteínas expresadas de forma diferenciada

Después de cuatro horas de incubación con tampón de referencia de oligogalacturonanos, oligoquitosanos o su mezcla, se recogieron las células por centrifugación y se extrajeron las proteínas y se analizaron por electroforesis en gel bidimensional utilizando el protocolo descrito por Valot *et al.* 2005 (*Plant Molecular Biology* 59:565-580).

El análisis proteómico presentó 59 proteínas reguladas de manera significativa en por lo menos un tratamiento en comparación con los otros tres. Entre estas 59 proteínas, se identificaron 44.

Las proteínas sobreexpresadas se asociaron principalmente con mecanismos de defensa, como PAL (fenilalanina amoniaco liasa). Es interesante observar que una cuarta parte de las proteínas reguladas estaba relacionada con el metabolismo energético. Notablemente, el análisis del grupo indicó que las células producidas con la mezcla bioactiva produjo un modelo de expresión de proteínas solubles diferente del de las células producidas con componentes individuales que estaban más íntimamente relacionadas entre sí. En la Tabla 2 se representan ejemplos de proteínas cuyos niveles de expresión son diferentes entre tratamientos:

- 17 -
Tabla 2

	Referencia	Quitooligo- sacáridos	Composición	Oligo- galacturonanos
Succinato deshidrogenasa	1,00*	2,00*	0,93	1,53
Proteína con repetición de WD40	1,00	0,75*	1,12*	0,85
Enzima málica dependiente de NADP	1,00	1,14*	0,71*	0,82
Trasladador del fosfato mitocondrial	1,00	0,88*	1,51*	1,12
3-fosfato gliceraldehído- deshidrogenasa (GAPDH)	1,00*	1,62*	1,13	1,56

5 Las proteínas cuyos niveles de expresión son estadísticamente diferentes entre sí se marcan con un asterisco (*).

B. Análisis transcriptómico de genes expresados de manera diferenciada

10 Se realizó el análisis transcriptómico por la técnica de microrred de ADNc en las células de *Arabidopsis* muestreadas cuatro horas después del tratamiento con estimuladores. Se extrajo el ARN completo de las células tratadas de *Arabidopsis* utilizando un kit RNeasy Mini de QIAGEN (Darlington Lab.).

15 El análisis transcriptómico de *Arabidopsis* presentó 96 genes regulados de manera significativa ($P < 0,05$) con por lo menos una relación de 3 veces, en por los menos 2 de los 3 tratamientos (oligogalacturónidos, quitooligosacáridos, mezcla de ambos). En contraste con el análisis proteómico, el análisis transcriptómico puso de manifiesto que el tratamiento de las células cultivadas con oligómeros de quitosán o con la mezcla produjo una respuesta muy similar. El tratamiento con oligómeros de pectina parece provocar una respuesta limitada, próxima a los cultivos de referencia. Los tratamientos con oligómeros de quitosán, oligómeros de pectina o con su mezcla regulan la expresión de 95 genes (57 por disminución, 38 por aumento), 25 (16 por disminución, 9 por aumento) y 92 (56 por disminución, 36 por aumento), respectivamente.

25 Entre los genes regulados, varios presentan modelos distintos de expresión dependiendo del tratamiento. Algunos de estos genes están listados en la Tabla 3, donde los niveles de la expresión génica se indican como relación sobre el nivel de expresión en la referencia. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas con un asterisco.

30

Denominación	Registro nº	Quitooligo- sacáridos	Composición	Oligo- galacturonanos
Clavata3/ESR- relacionado-1	At1g73165	-3,60*	-1,15	3,35*
Familia de tipo extensina rica en prolina	At5g49080	3,15	2,51*	-3,68*
Proteína de la familia con repetición de WD-40	At5g40880	3,38*	1,77	-2,24*
Proteína relacionada con la defensa	At3g44870	5,46*	-2,06*	-1,15
Familia grpE de co- chaperona	At4g26780	-1,15	3,16*	1,03
Proteína de fijación del AMP	At1g75960	1,61	3,87*	1,95

EJEMPLO 10: Producción de resistencia a *Venturia inequalis* en plantones de manzana

Semillas de manzana (aproximadamente 1.400), de la variedad “Golden Delicious” se pusieron a vernalizar durante 90 ó 120 días a 4°C tras la desinfección con lejía. Se sembraron a continuación las semillas en capa superficial de tierra con una densidad de 40 semillas por lecho. Cada lecho se cubrió a continuación con tierra, se regó y se incubó a una temperatura próxima a 10°C durante una semana antes de ser transferido al invernadero a 18°C.

Grupos de 40 plantones se trataron por atomización con una solución de referencia (agua más Tween 20 al 0,01%) o estimuladores en soluciones acuosas (composición de la invención a 0,25 g.l⁻¹ en la “etapa de 3 hojas” a los 10 y 3 días antes de la inoculación con *Venturia inequalis* (150.000 conidios viables por ml). Se evaluó el porcentaje del área superficial de esporulación 14 días después de la inoculación de la última hoja desarrollada antes del tratamiento con estimuladores (F1) y la primera hoja desarrollada después del tratamiento con estimuladores (F0). Los resultados se expresan como porcentaje del área superficial de la hoja de esporulación (media ± SD de 200 plantones por tratamiento) para F1 y F0 como se muestra en la Figura 13.

EJEMPLO 11: Propiedades fungicidas de la combinación de KH₂PO₄ con una mezcla de oligogalacturónidos y quitooligosacáridos

Tres pizcas de 20 µl que contenían 2.10⁴ esporas cada una de *Penicilium Expansum* se inocularon en placas Petri de 39 g.l⁻¹ de agar-agar con dextrosa de patata (PDA) esparcido con una de las soluciones siguientes: agua + Tween 20 al 0,01% (referencia), mezcla de oligogalacturonanos y oligoquitosanos (0,5 g.l⁻¹), KH₂PO₄ (5 g.l⁻¹), mezcla de oligogalacturonanos y oligoquitosanos (0,5 g.l⁻¹) + KH₂PO₄ (5 g.l⁻¹). Se incubaron las placas Petri 48 horas a 25°C y se contaron las esporas resultantes utilizando una celda Neubauer. En la Figura 14 se muestran los resultados, expresados como promedio de 3 experimentos.

Reivindicaciones

- 5 1. Composición que comprende uno o más oligogalacturonano(s) con un grado de polimerización superior a 8 y que presenta una configuración dimérica de huevera estabilizada además por uno o más sacáridos policatiónicos.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que la configuración dimérica de huevera es detectada por el anticuerpo 2F4.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que el sacárido policatiónico es un quitosán oligosacárido o un quitosán polisacárido.
- 20 4. Composición según la reivindicación 3, en la que el quitosán oligo o polisacárido presenta un grado de polimerización superior a 5.
- 25 5. Composición según la reivindicación 3 ó 4, en la que el quitosán oligo o polisacárido presenta un grado de polimerización inferior al 50%.
- 30 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una solución acuosa.
- 35 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más elemento(s) seleccionado de entre el grupo constituido por otros sacáridos, reguladores o factores de crecimiento, minerales, iones, nutrientes, aditivos alimenticios, potenciadores de sabor, colorantes, vitaminas, y fitonutrientes.
- 40 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un producto seleccionado de entre el grupo constituido por una composición farmacéutica una composición nutracéutica, una composición alimenticia o de pienso incluyendo un alimento funcional o un pienso funcional, un producto fitosanitario, un estimulante, un fertilizante o un adyuvante de estos productos.
- 45 9. Composición según la reivindicación 8, en la que el producto fitosanitario es un fungicida.
- 50 10. Biomaterial que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 55 11. Textil que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
12. Utilización de la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en aplicaciones alimentarias, de piensos, textiles, cosméticas, industriales y/o medioambientales.

27

- 20 -

13. Utilización de la composición según las reivindicaciones 1 a 10 para inducir la protección de las plantas contra la infección por patógenos vegetales.

5 14. Utilización de la composición según las reivindicaciones 1 a 11 como activador de crecimiento.

10 15. Utilización de la composición según las reivindicaciones 1 a 11 como recubrimiento para semillas.

15 16. Utilización de la composición según las reivindicaciones 1 a 10 como adyuvante antifúngico.

20 17. Utilización de la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la preparación de un medicamento, en el tratamiento de cicatrización de heridas.

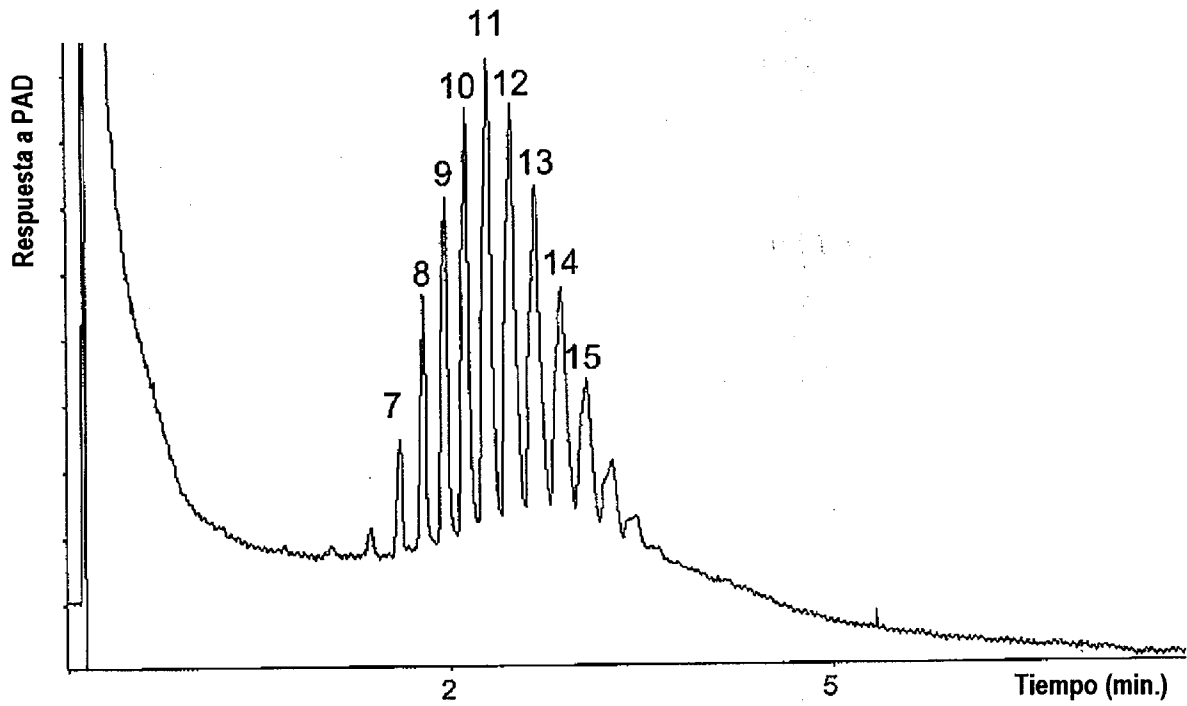


Fig. 1

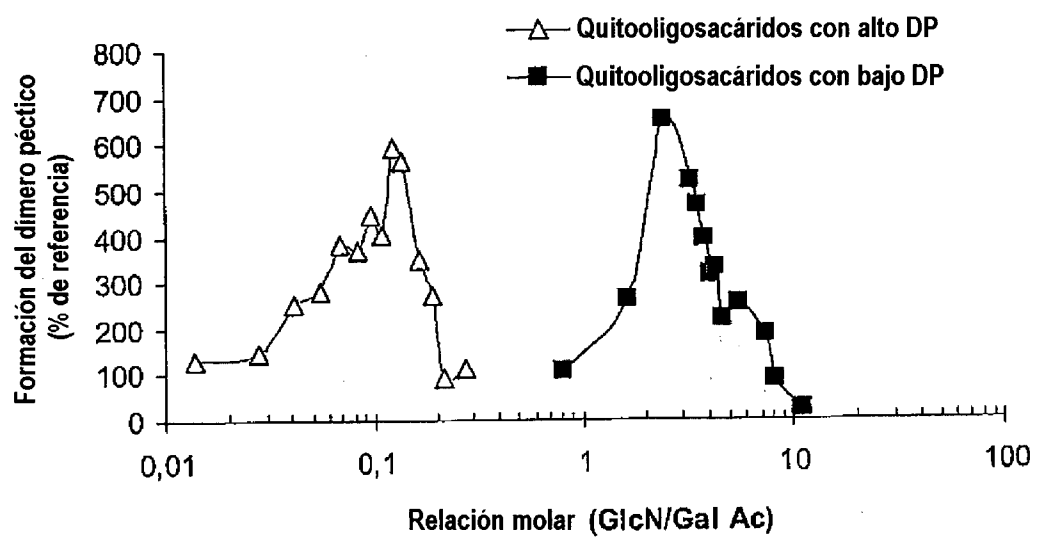


Fig. 2

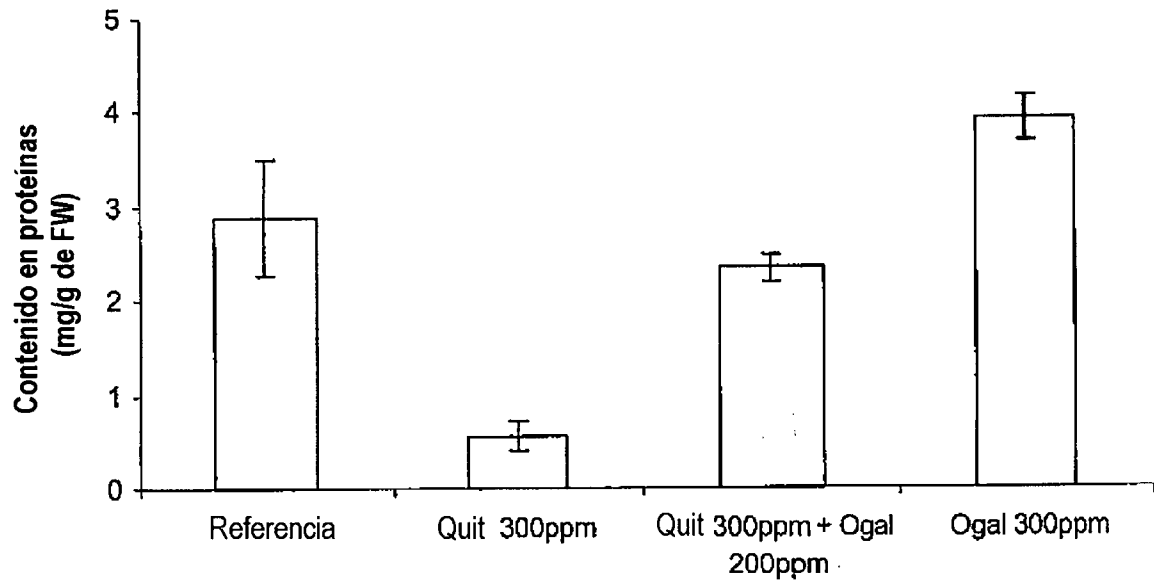


Fig. 3

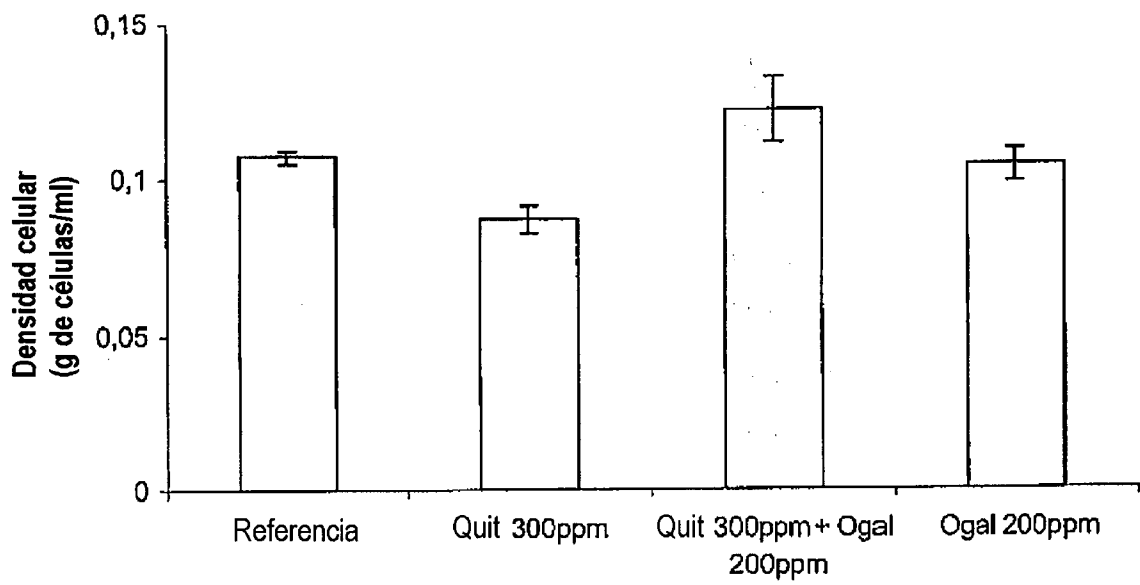


Fig. 4

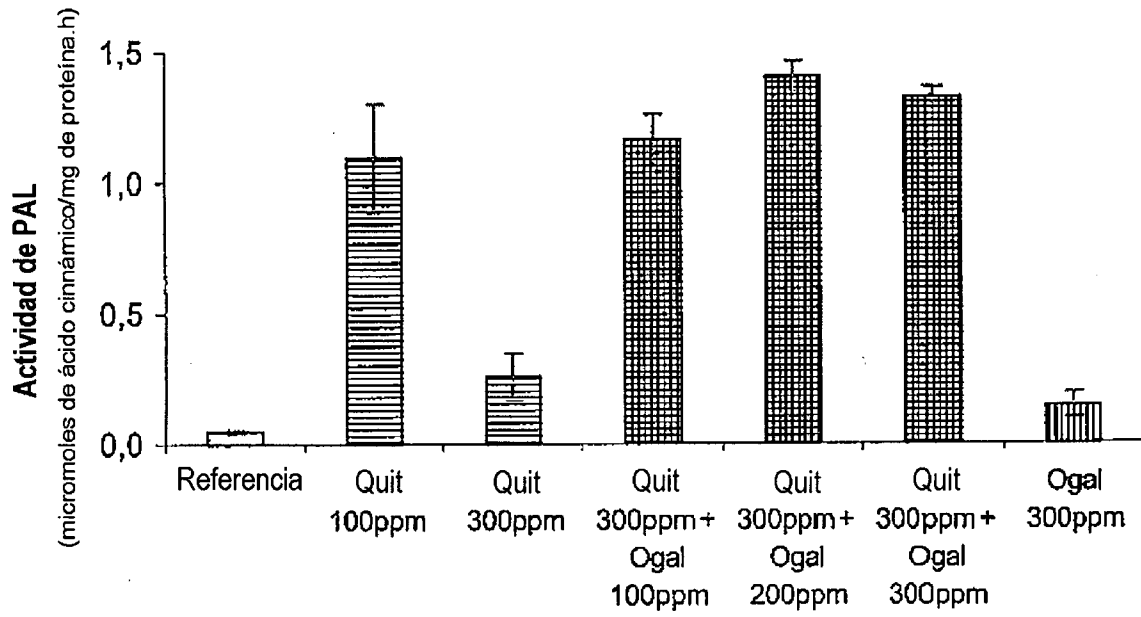


Fig. 5

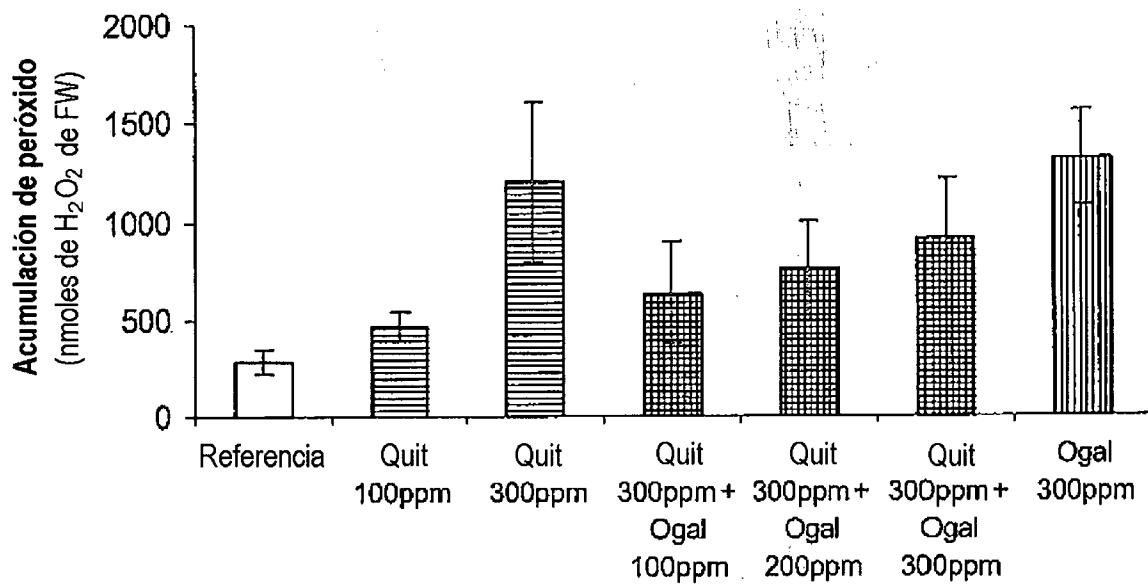


Fig. 6

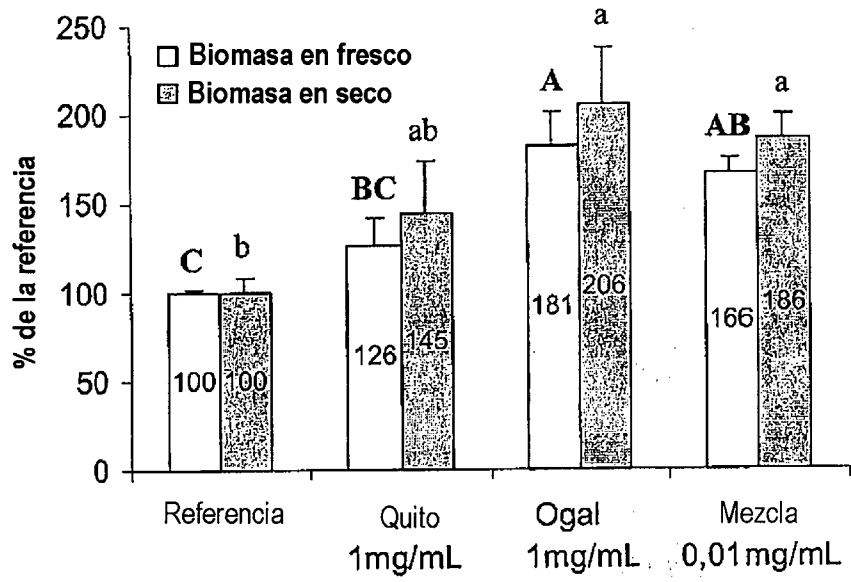


Fig. 7

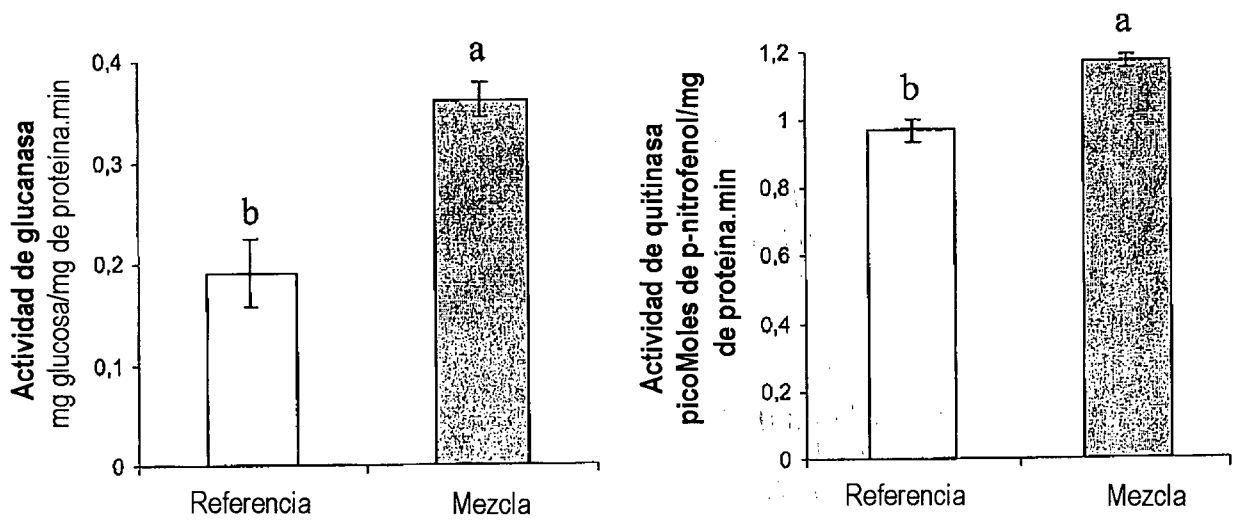


Fig. 8

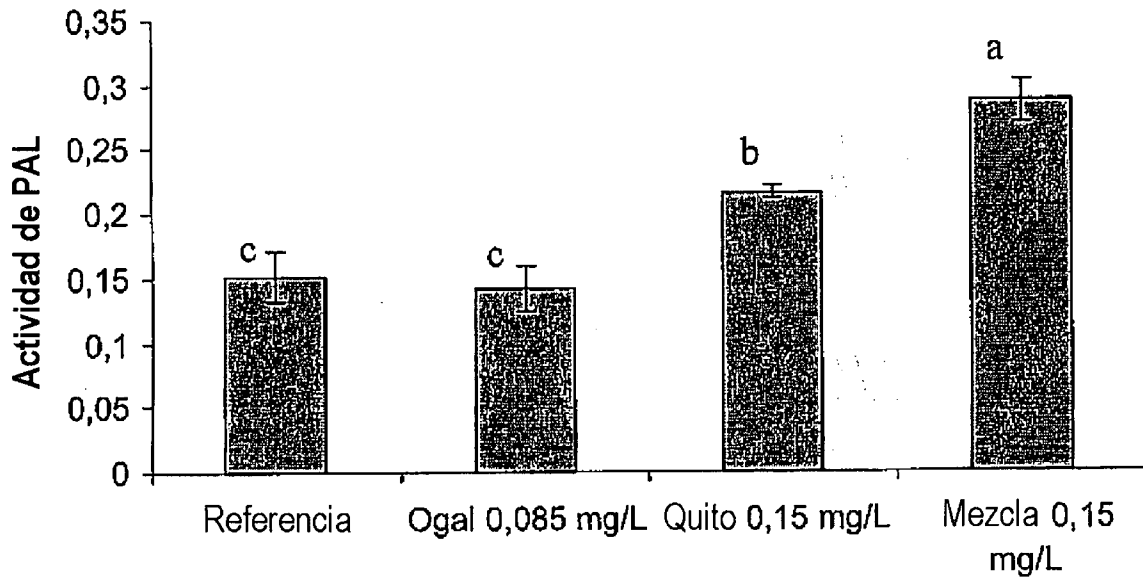


Fig. 9

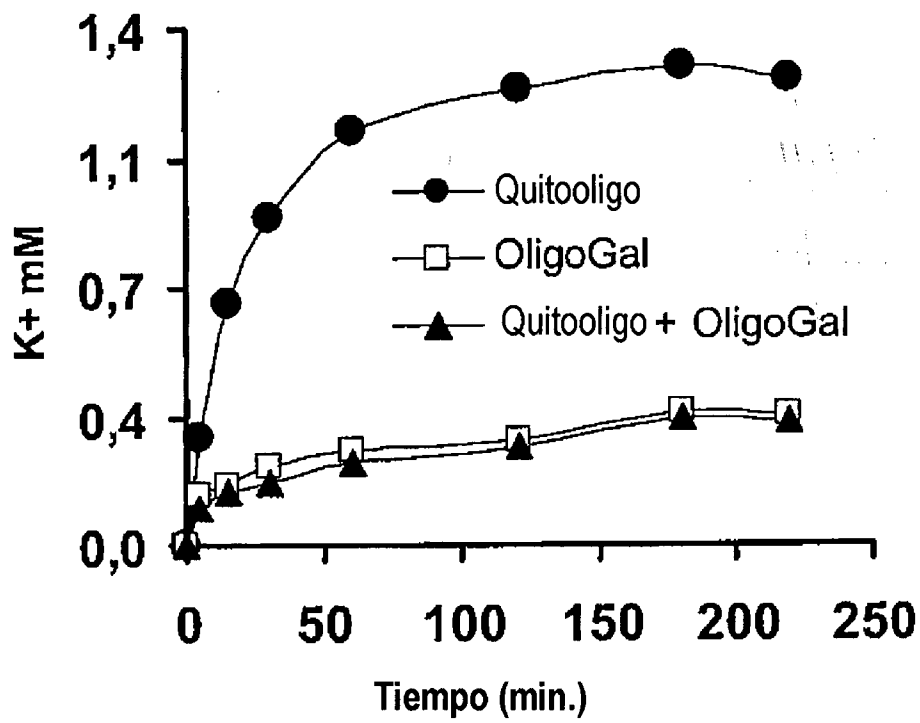


Fig. 10

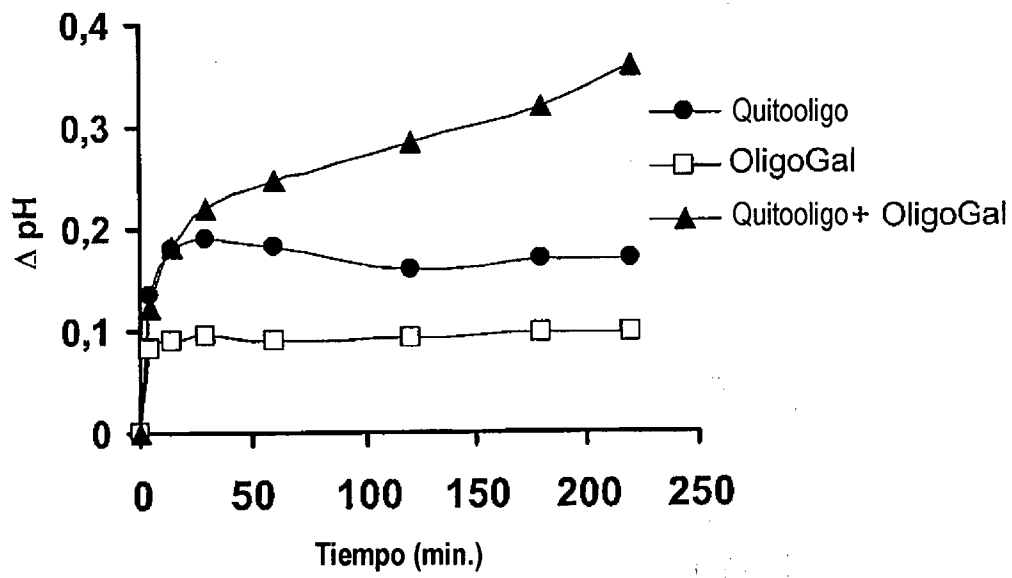


Fig. 11

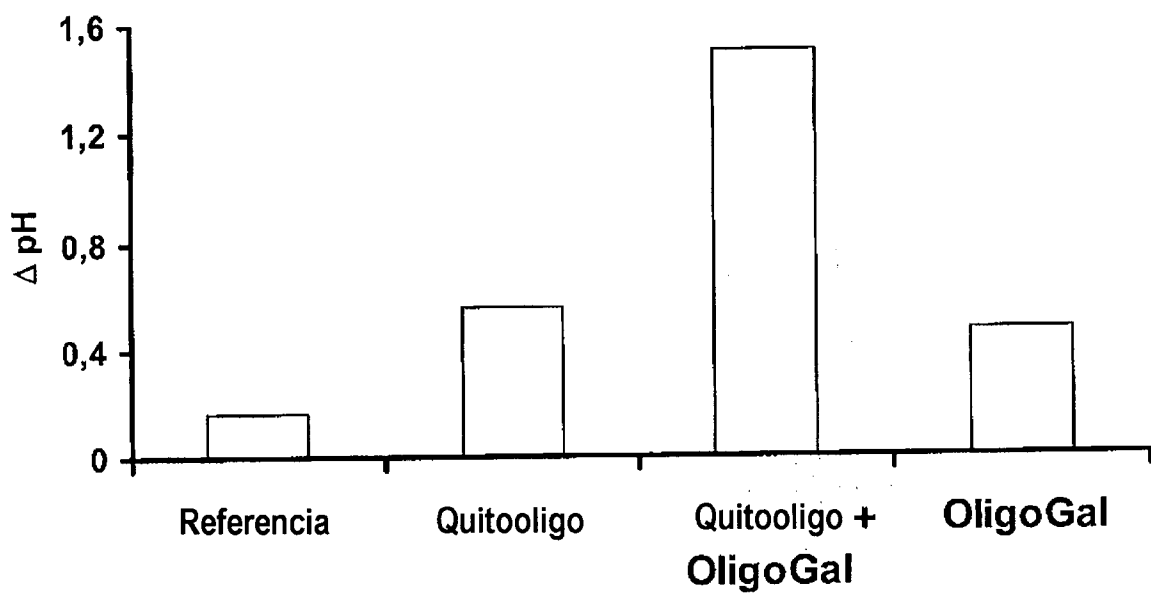


Fig. 12

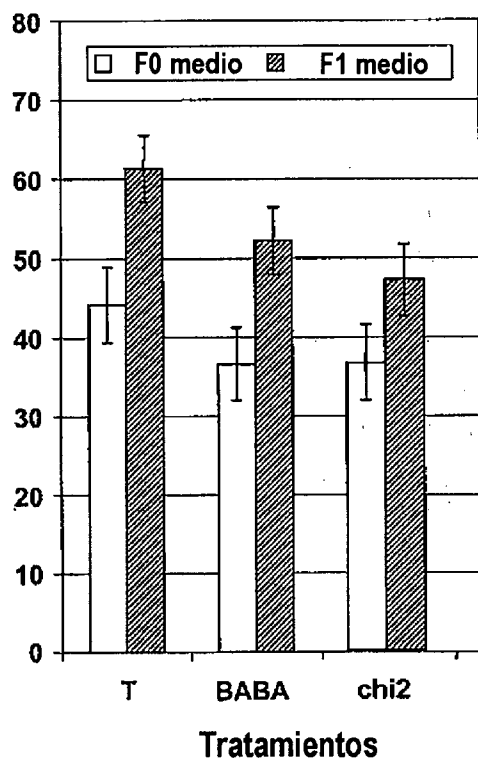


Fig. 13

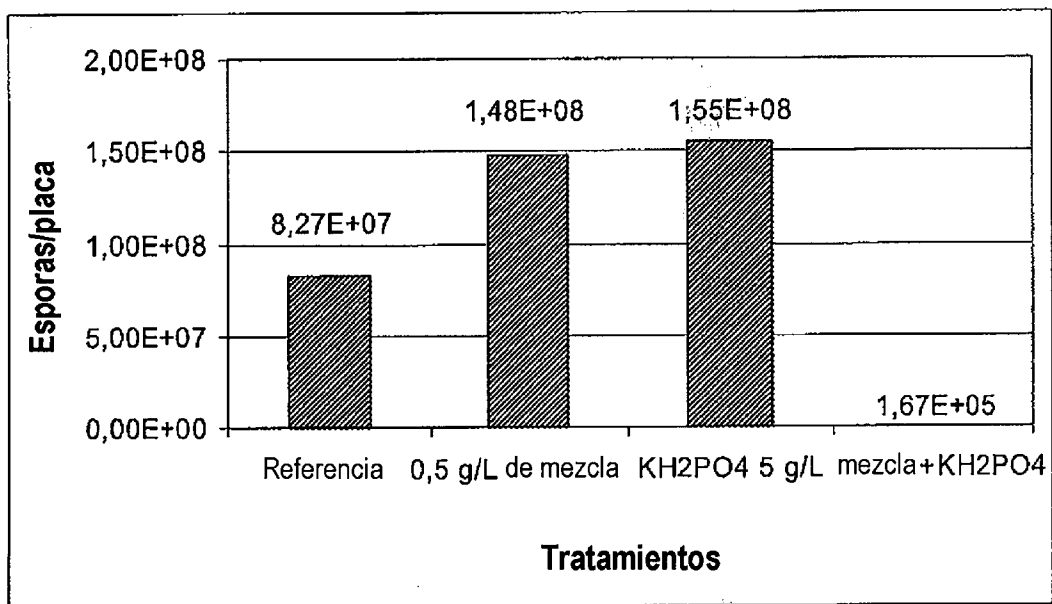
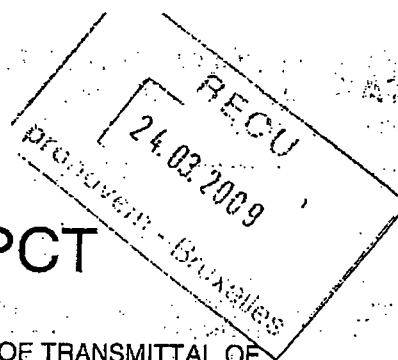


Fig. 14

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY



PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

To:

PRONOVEM - OFFICE VAN MALDEREN
Avenue Josse Goffin 158
B-1082 Brussels
BELGIQUE

Date of mailing
(day/month/year) 20.03.2009

Applicant's or agent's file reference
BP.FNDP.023CWO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2007/062968

International filing date (day/month/year)
28.11.2007

Priority date (day/month/year)
28.11.2006

Applicant

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Tissot, Laurent

Tel. +49 89 2399-5731



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BP.FNDP.023CWO		FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2007/062968		International filing date (day/month/year) 28.11.2007	Priority date (day/month/year) 28.11.2006	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C08L5/06				
Applicant Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix				
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>2</u> sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☒ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).				
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application				
Date of submission of the demand 2008-08-22		Date of completion of this report 20.03.2009		
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Lanz, Sandra Telephone No. +49 89 2399-7869		



INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No. 32
PCT/EP2007/062968

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-31 as originally filed

Claims, Numbers

1-18 received on 24.09.2008 with letter of 16.09.2008

Drawings, Sheets

17-77 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

4. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☒ the claims, Nos. 5-8
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No. **PCT/EP2007/062968**

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-18</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-18</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-14,16</u>
	No: Claims	<u>15,17,18</u>

2. Citations and explanations (Rule 70.7):
see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/062968

Re Item I

Basis of the report

1. Only the main request filed with letter of 16.09.08 is considered because subsidiary requests are not foreseen under the PCT.
2. The amendments filed with the letter dated 16.09.08 introduce subject-matter which extends beyond the content of the application as filed, contrary to Article 34(2)(b) PCT. The amendments concerned are the following:
 - (a) Claim 5 concerns a composition comprising a chitosan oligosaccharide having a degree of polymerization of lower than 12. This value cannot be found in the originally filed application. Table 1 of the application as filed relates to the MS-spectra of a specific chitooligosaccharide.
 - (b) Claim 8 concerns a composition comprising KH₂PO₄. KH₂PO₄ cannot be found in the general description of the present application as filed. Example 11 of the present application relates to a specific composition.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following documents; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

D1: WO 2006/085075 A (DA VOLTERRA [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; STEVENS IAN EDWARD [GB]) 17 August 2006 (2006-08-17)

D2: CHANG K L B ET AL: "Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 43, no. 2, October 2000 (2000-10), pages 163-169, XP004200073 ISSN: 0144-8617

D3: MUNJERI O ET AL: "Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 46, no. 3,

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/062968

2 June 1997 (1997-06-02), pages 273-278, XP004092173 ISSN: 0168-3659

D4: ATYABI F ET AL: "In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 61, no. 1, 4 July 2005 (2005-07-04), pages 39-51, XP004932741 ISSN: 0144-8617

2. Document D1 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see table 6; page 50, lines 4-7,10,11). The intestinal test medium comprises a pectinolytic enzyme (Pectinex Ultra SPL; see page 43, lines 7-9). This enzyme is the same enzyme used in example 2 of the present application for the preparation of the oligogalacturonans.

Therefore document D1 deems to destroy novelty of subject-matter of claims 1-18 of the present application.

3. Document D2 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see paragraph 2.2.). The test medium comprises a pectinase (see paragraph 2.4.).

Therefore document D2 deems to destroy novelty of subject-matter of claims 1-18 of the present application.

4. Document D3 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see paragraph 2.2). The test medium comprises pectinolytic enzymes (see paragraph 2.3.). The pectinolytic enzymes (Pectinex Ultra SP-L; see paragraph 2.1.) deem to be the same enzymes used in example 2 of the present application.

Therefore document D3 deems to destroy novelty of subject-matter of claims 1-18 of the present application.

5. Document D4 discloses a composition comprising pectin (PLMA), N,N,N-trimethyl chitosan chloride (TMC) and zinc or calcium (see paragraph 2.3.). The test medium

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/062968

comprises a pectinase (Pectinex Ultra SPL)(see page 43).

Therefore document D4 deems to destroy novelty of subject-matter of claims 1-18 of the present application.

6. The subject-matter of claims 15, 17, 18 would not be in agreement with Article 53(c) EPC. Claim 18 for example seems to concern by the term "Use of the composition.... in the treatment of wounds healing" a method for treatment of the human body. The term "Use of a composition.... for the manufacture of a medicament" is in agreement with this Article. Also the term "Use of a composition ... for the manufacture of a medicament for the treatment of disease YY" would be in agreement with Article 53(c) EPC.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

1. The subject-matter of independent claim 1 of the present application is not in agreement with Article 6 PCT. According to claim 1 the composition comprises an oligogalacturonan. But according to the description for example on page 1 the composition may comprise instead of an oligogalacturonan any other oligosaccharide in an egg box conformation.
2. The subject-matter of claims 14-18 of the present application is unclear (Article 6 PCT) insofar as they relate to claims 11 and 12, because these two claims do not concern a composition, but a biomaterial (claim 11), resp. a textile (claim 12).

42

MAIN REQUEST

CLAIMS

1. A composition comprising one or more oligogalacturonan(s) with a degree of polymerization comprised between 9 and 20 and having a dimeric egg box conformation further stabilized by one or more polycationic saccharide(s).
2. The composition of claim 1, wherein the dimeric eggbox conformation is detected by the 2F4 antibody.
3. The composition according to claim 1 or 2, wherein the polycationic saccharide is a chitosan oligosaccharide or a chitosan polysaccharide.
4. The composition according to claim 3, wherein the chitosan oligo or polysaccharide has a degree of polymerization higher than 5.
5. The composition according to claim 4, wherein the chitosan oligo saccharide has a degree of polymerization lower than 12.
6. The composition according to claims 3 to 5, wherein the chitosan oligo or polysaccharide has a degree of acetylation lower than 50%.
7. The composition according to any of the preceding claims which is an aqueous solution.
8. The composition according to any of the preceding claims which further comprises one or more element(s) selected from the group consisting of other saccharides, growth regulators or growth factors, minerals, ions, nutriments, food additives, flavourings, colours, vitamins, phytonutrients, KH_2PO_4 or a bioactive molecule.
9. The composition according to any of the preceding claims which is a product selected from the group

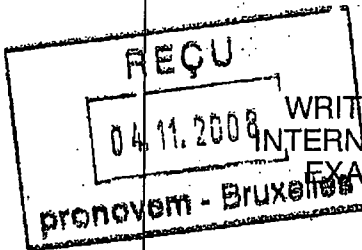
- consisting of a pharmaceutical composition, a nutraceutical composition, a food or feed composition including a functional food or a functional feed, a phytosanitary product, an elicitor, a fertilizer, an adjuvant of these products, a phytohormone replacement, a phytohormone enhancement or a phytohormone modulator.
10. The composition of claim 9, wherein the phytosanitary product is a fungicide.
 11. A biomaterial comprising the composition according to any of the preceding claims.
 12. A textile comprising the composition of claims 1 to 10.
 13. Use of the composition according to any of the preceding claims in food, feed, textile, cosmetic, industrial and/or environmental applications.
 14. Use of the composition according to claims 1 to 12 to induce protection of plants against infection by plant pathogens.
 15. Use of the composition according to claims 1 to 12 as a growth promoter.
 16. Use of the composition according to claims 1 to 12 as a coating for seeds.
 17. The use of the composition according to claims 1 to 11 as an anti-fungal adjuvant.
 18. Use of the composition according to any of the preceding claims 1 to 12, for the manufacture of a medicament, in the treatment of wounds healing.

44

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To: PRONOVEM - OFFICE VAN MALDEREN Avenue Josse Goffin 158 B-1082 Brussels BELGIQUE		PCT WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY (PCT Rule 66)	
		Date of mailing (day/month/year) 31.10.2008	
Applicant's or agent's file reference BP.FNDP.023CWO		REPLY DUE within 3 month(s) from the above date of mailing	
International application No. PCT/EP2007/062968	International filing date (day/month/year) 28.11.2007	Priority date (day/month/year) 28.11.2006	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C08L5/06			
Applicant Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix			



1. ☒ The written opinion established by the International Searching Authority: ☒ is ☐ is not considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority.
2. This <u>second</u> opinion contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application
3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion. When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(e). How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9. Also: For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4bis. For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6. For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4. If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.
4. The final date by which the international preliminary report on patentability (Chapter II of the PCT) must be established according to Rule 69.2 is: <u>28.03.2009</u>

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Lanz, Sandra Telephone No. +49 89 2399-7869
---	--



**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/062968

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the elements of the international application, this opinion has been established on the basis of *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed")*:

Description, Pages

1-31 as originally filed

Claims, Numbers

1-18 received on 24.09.2008 with letter of 16.09.2008

Drawings, Sheets

1/7-7/7 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

4. ☒ This opinion has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☒ the claims, Nos. 5, 8
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 66.1(d-bis)).

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/062968

Box No. V Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	<u>1-18</u>
Inventive step (IS)	Claims	<u>1-18</u>
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>15,17,18</u>

2. Citations and explanations:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

42

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/062968

Re Item I

Basis of the report

1. Only the main request filed with letter of 16.09.08 is considered because subsidiary requests are not foreseen under the PCT.
2. The amendments filed with the letter dated 16.09.08 introduce subject-matter which extends beyond the content of the application as filed, contrary to Article 34(2)(b) PCT. The amendments concerned are the following:
 - (a) Claim 5 concerns a composition comprising a chitosan oligosaccharide having a degree of polymerization of lower than 12. This value cannot be found in the originally filed application. Table 1 of the application as filed relates to the MS-spectra of a specific chitooligosaccharide.
 - (b) Claim 8 concerns a composition comprising KH₂PO₄. KH₂PO₄ cannot be found in the general description of the present application as filed. Example 11 of the present application relates to a specific composition.

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

1. Reference is made to the following documents; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

D1: WO 2006/085075 A (DA VOLTERRA [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; STEVENS IAN EDWARD [GB]) 17 August 2006 (2006-08-17)

D2: CHANG K L B ET AL: "Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 43, no. 2, October 2000 (2000-10), pages 163-169, XP004200073 ISSN: 0144-8617

48

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/062968

- D3: MUNJERI O ET AL: "Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 46, no. 3, 2 June 1997 (1997-06-02), pages 273-278, XP004092173 ISSN: 0168-3659
- D4: ATYABI F ET AL: "In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 61, no. 1, 4 July 2005 (2005-07-04), pages 39-51, XP004932741 ISSN: 0144-8617

2. Document D1 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see table 6; page 50, lines 4-7,10,11). The intestinal test medium comprises a pectinolytic enzyme (Pectinex Ultra SPL; see page 43, lines 7-9). This enzyme is the same enzyme used in example 2 of the present application for the preparation of the oligogalacturonans.

Therefore document D1 deems to destroy novelty of subject-matter of claims 1-18 of the present application.

3. Document D2 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see paragraph 2.2.). The test medium comprises a pectinase (see paragraph 2.4.).

Therefore document D2 deems to destroy novelty of subject-matter of claims 1-18 of the present application.

4. Document D3 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see paragraph 2.2). The test medium comprises pectinolytic enzymes (see paragraph 2.3.). The pectinolytic enzymes (Pectinex Ultra SP-L; see paragraph 2.1.) deem to be the same enzymes used in example 2 of the present application.

49

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/062968

Therefore document D3 deems to destroy novelty of subject-matter of claims 1-18 of the present application.

5. Document D4 discloses a composition comprising pectin (PLMA), N,N,N-trimethyl chitosan chloride (TMC) and zinc or calcium (see paragraph 2.3.). The test medium comprises a pectinase (Pectinex Ultra SPL)(see page 43).

Therefore document D4 deems to destroy novelty of subject-matter of claims 1-18 of the present application.

6. The subject-matter of claims 15,17,18 would not be in agreement with Article 53(c) EPC. Claim 18 for example deems to concern by the term "Use of the composition.... in the treatment of wounds healing" a method for treatment of the human body. The term "Use of a composition.... for the manufacture of a medicament" is in agreement with this Article. Also the term "Use of a composition ... for the manufacture of a medicament for the treatment of disease YY" would be in agreement with Article 53(c) EPC.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

1. The subject-matter of independent claim 1 of the present application is not in agreement with Article 6 PCT. According to claim 1 the composition comprises an oligogalacturonan. But according to the description for example on page 1 the composition may comprise instead of an oligogalacturonan any other oligosaccharide in an egg box conformation.
2. The subject-matter of claims 14-18 of the present application is unclear (Article 6 PCT) insofar as they relate to claims 11 and 12, because these two claims do not concern a composition, but a biomaterial (claim 11), resp. a textile (claim 12).

50

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/062968

57

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below	
International application No. PCT/EP2007/062968	International filing date (day/month/year) 28.11.2007	Priority date (day/month/year) 28.11.2006	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C08L5/06 A61L26/00			
Applicant FACULTE NOTRE-DAME DE LA PAIX			

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Lanz, Sandra Telephone No. +49 89 2399-7869
--	--	--

52

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/062968

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

53

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/062968

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-17</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-17</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-13,15</u>
	No: Claims	<u>14,16,17</u>

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/062968

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

1. Reference is made to the following documents; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

- D1: WO 2006/085075 A (DA VOLTERRA [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; STEVENS IAN EDWARD [GB]) 17 August 2006 (2006-08-17)
- D2: CHANG K L B ET AL: "Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 43, no. 2, October 2000 (2000-10), pages 163-169, XP004200073 ISSN: 0144-8617
- D3: MUNJERI O ET AL: "Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 46, no. 3, 2 June 1997 (1997-06-02), pages 273-278, XP004092173 ISSN: 0168-3659
- D4: ATYABI F ET AL: "In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 61, no. 1, 4 July 2005 (2005-07-04), pages 39-51, XP004932741 ISSN: 0144-8617
- D5: RODRÍGUEZ M S ET AL: "New chitosan-calcium pectinate pellets and their adsorption capacity" COLLOID AND POLYMER SCIENCE ; KOLLOID-ZEITSCHRIFT UND ZEITSCHRIFT FÜR POLYMERE, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 285, no. 1, 30 August 2006 (2006-08-30), pages 119-124, XP019442847 ISSN: 1435-1536
- D6: HIORTH ET AL: "Immersion coating of pellets with calcium pectinate and chitosan" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, AMSTERDAM, NL, vol. 308, no. 1-2, 3 February 2006 (2006-02-03), pages 25-32, XP005249231 ISSN: 0378-5173
- D7: NURJAYA ET AL: "Effects of microwave on drug release properties of matrices of pectin" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 62, no. 3, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 245-257,

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/EP2007/062968

XP005193121 ISSN: 0144-8617

D8: DORNENBURG H ET AL: "Semicontinuous processes for anthraquinone production with immobilized *Cruciata glabra* cell cultures in a three-phase system" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 50, no. 1, 13 September 1996 (1996-09-13), pages 55-62, XP004037066 ISSN: 0168-1656

D9: WO 2005/108596 A (FRIEDRICH ALEXANDER UNI ERLANG [DE]; DOERNENBURG HEIKE [DE]; SEYDEL PE) 17 November 2005 (2005-11-17)

2. Document D1 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see table 6; page 50, lines 4-7,10,11). The intestinal test medium comprises a pectinolytic enzyme (see page 43, lines 7-9).

Therefore document D1 destroys novelty of subject-matter of claims 1-17 of the present application.

3. Document D2 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see paragraph 2.2.). The test medium comprises a pectinase (see paragraph 2.4.).

Therefore document D2 destroys novelty of subject-matter of claims 1-17 of the present application.

4. Document D3 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see paragraph 2.2). The test medium comprises pectinolytic enzymes (see paragraph 2.3.).

Therefore document D3 destroys novelty of subject-matter of claims 1-17 of the present application.

5. Document D4 discloses a composition comprising pectin (PLMA), N,N,N-trimethyl chitosan chloride (TMC) and zinc or calcium (see paragraph 2.3.). The test medium

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/EP2007/062968

comprises a pectinase (Pectinex Ultra SPL)(see page 43).

Therefore document D4 destroys novelty of subject-matter of claims 1-17 of the present application.

6. Document D5 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see page 120).

Therefore document D5 destroys novelty of subject-matter of claims 1-17 of the present application.

7. Document D6 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see Figure 1).

Therefore document D6 destroys novelty of subject-matter of claims 1-17 of the present application.

8. Document D7 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see paragraph 2.3.2.).

Therefore document D7 destroys novelty of subject-matter of claims 1-17 of the present application.

9. Document D8 discloses a composition comprising pectin, chitosan and calcium (see paragraph 2.2.).

Therefore document D8 destroys novelty of subject-matter of claims 1-17 of the present application.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/EP2007/062968

10. Document D9 discloses a composition comprising pectinic acid, chitosan and calcium (see page 32).

Therefore document D9 destroys novelty of subject-matter of claims 1-17 of the present application.

11. The subject-matter of claims 14, 16, 17 would not be in agreement with Article 53(c) EPC. Claim 17 for example deems to concern by the term "Use of the composition.... in the treatment of wounds healing" a method for treatment of the human body. The term "Use of a composition.... for the manufacture of a medicament" is in agreement with this Article. Also the term "Use of a composition ... for the manufacture of a medicament for the treatment of disease YY" would be in agreement with Article 53(c) EPC.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

1. The subject-matter of independent claim 1 of the present application is not in agreement with Article 6 PCT. According to claim 1 the composition comprises an oligogalacturonan. But according to the description for example on page 1 the composition may comprise instead of an oligogalacturonan any other oligosaccharide in an egg box conformation.

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN 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 ☐

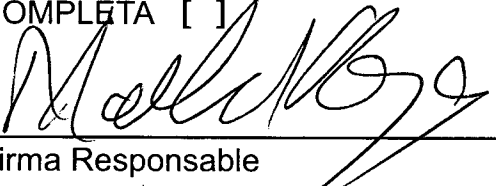
INCOMPLETA ☐

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha.



No. 09-063560- -00000-0000

Fecha: 2009-06-18 17:08:25 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 379 FASENACIONAL II
Act. 411 PRESENTACION Folios: 57

arrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

REFERENCIA	Radicación No.	9 63560
	Solicitud internacional	PCT/EP2007/062968
	Fecha inicio fase nacional	28/06/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	

Nº 07619

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 traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
3. 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, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

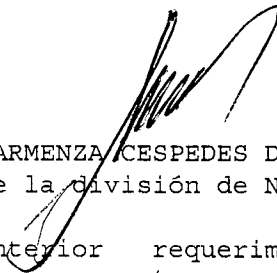
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud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

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 63560



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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____ 10 JUL. 2009
jfernand