

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-506401
(P2004-506401A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int.Cl.⁷A01K 61/00
A61K 35/56
A61P 35/00

F 1

A01K 61/00
A61K 35/56
A61P 35/00

U

テーマコード(参考)

2B104
4C087

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2000-546581 (P2000-546581)
 (86) (22) 出願日 平成11年5月5日 (1999.5.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年11月6日 (2000.11.6)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB1999/001402
 (87) 國際公開番号 WO1999/056535
 (87) 國際公開日 平成11年11月11日 (1999.11.11)
 (31) 優先権主張番号 9809588.8
 (32) 優先日 平成10年5月5日 (1998.5.5)
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)
 (31) 優先権主張番号 9905018.9
 (32) 優先日 平成11年3月4日 (1999.3.4)
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)
 (31) 優先権主張番号 9905021.3
 (32) 優先日 平成11年3月4日 (1999.3.4)
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)

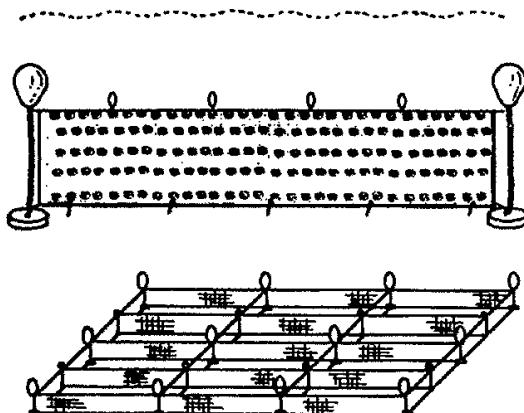
(71) 出願人 592060824
 ファーマ マー, ソシエダッド アノニマ
 スペイン国マドリッド, 28760 トレ
 ス カントス, ポリゴノ インダストリア
 ル ド トレス カントス, カルレ ド
 ラ カレラ ナンバー 3
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 譲
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 譲
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 晉夫
 (74) 代理人 100102897
 弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】付着性海生動物の培養

(57) 【要約】

本発明は、着生海洋生物の培養に関する。着生海洋生物は、多数の海洋医薬物質の供給源である。本発明は、このような海洋医薬物質の製造方法を提供し、この方法は、海水中に複数の基体様物質を配置し、これら複数の基体上で当該生物を増殖させ、増殖した生物を採取し、次いで採取した生物から、医薬物質を抽出することを包含する方法である。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

着生海洋生物からの抽出による海洋医薬物質の製造方法であって、海水中に複数の基体様物質を配置し、これら複数の基体上で着生海洋生物を増殖させ、増殖した生物を採集し、次いで採集した生物から医薬物質を抽出することを包含する、上記製造方法。

【請求項 2】

海洋生物が、エクティナシジア タルビナータ (*Ecteinascidia turbinate*) であり、および海洋医薬物質が、エクティナシジン化合物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

海洋生物が、アブリジウム アルビカンス (*Apelidium albicans*) であり、および海洋医薬物質が、ジデムニン化合物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

海洋医薬物質を抽出するための着生海洋生物の養殖方法であって、海水中に複数の基体様物質を配置し、着生海洋生物のコロニイからの幼生を基体に接種し、これらの生物を複数の基体上で増殖させ、次いで増殖した生物を採集することを包含する、上記養殖方法。

【請求項 5】

基体を、コロニイに隣接して配置する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

基体を備えた支持体を包含する少なくとも 1 個の採集器を、コロニイに隣接して配置し、幼生を採集する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

採集器を、別の場所に移し、生物を増殖させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

海洋医薬物質を抽出するための着生海洋生物の養殖方法であって、海水中に複数の基体様物質を配置し、着生海洋生物を基体上に移植し、これらの生物を複数の基体上で増殖させ、次いで増殖した生物を採集することを包含する、上記養殖方法。

【請求項 9】

個々の生物を基体上に移植する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

生物の断片を、基体上に移植する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

基体が、生物を直接に固定するためのカゴ、ならびにケーブル、ロープ、メッシュ、ネット、棒、厚板およびケージを備えている、請求項 8 ~ 10 のいずれ一つに記載の方法。

【請求項 12】

基体を含む海中の構造体を、底部いかりデバイスと浮動デバイスとの間に保持する、請求項 8 ~ 11 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 13】

基体を含む海中の構造体を、天然または人工の海盆の側面間に保持する、請求項 8 ~ 11 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 14】

着生海洋生物の培養用装置であって、支持枠および浮動構造体、付着ガイド、付着ガイドに確保するための基体、固定およびいかりシステム、ならびに任意に、光よけを備えている、上記培養用装置。

【請求項 15】

着生海洋生物を基体上で増殖させるための装置であって、垂直に伸びている基体配列および任意に、基体上に入射する光を減少させる光よけを包含し、上記基体配列はそれぞれ、いかりシステムまたはもやいシステムを備えた支持浮動枠に確保され、またこの枠により支持されている水平付着ガイド配列のそれぞれ一つに結合されている、上記増殖用装置。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

着生海洋生物を基体上で増殖させるための装置であって、いかりシステムまたはもやいシステムを備えた支持浮動システムに確保されている付着および増殖構造体を形成している基体配列を包含する、上記増殖装置。

【請求項 17】

エクティナシジア タルビナータ (*Ecteinascidia turbinata*) の増殖方法であって、浅瀬海岸ラグーンの底に、いかりで固定することにより完全に海中に保持されており、また浮動デバイスによりほぼ垂直に維持されている、2~8 cm のホールを有する長さ約 0.5~4 m の幅の広いプラスチックメッシュを包含する装置を、基体および支持体として使用し、この基体に、上記生物のコロニイの断片を移植することを包含する、上記増殖方法。

10

【請求項 18】

エクティナシジア タルビナータ (*Ecteinascidia turbinata*) 幼生を、0.2~2 m 長さのロープまたは木製棒上に捕獲する方法であって、光よけを備えており、その上に上記ロープまたは木製棒が固定され、生物のコロニイ附近で、水中に水平または垂直に沈められ、保持されている、約 1~2 m x 3~6 m の浮動枠を包含する装置を使用し、このように接種された、これらのロープまたは棒から、後刻に、成熟したコロニイが増殖できるように、この装置に幼生を付着させる、上記捕獲方法。

【請求項 19】

エクティナシジア タルビナータ (*Ecteinascidia turbinata*) を、0.2~2 m 長さのロープまたは木製棒上に、コロニイ断片を移植することによって、増殖させる方法であって、光よけを備えた、約 1~2 m x 3~6 m の浮動枠を包含し、この枠から、コロニイが付着したロープまたは木製棒が水中に垂直に沈められ、つり下げる、これにより生物が増殖される装置

20

を使用する、上記増殖方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、海洋薬剤抽出のための付着性 (sessile) 海生動物の培養に関する。特に、本発明は、被囊類として知られた海洋生物の培養方法および装置に関する。

【0002】

過去何年にもわたって、薬理学的用途を有するであろう天然化合物を見つけるために、数多くの海洋生物の系統的スクリーニングがなされてきた。付着性海洋無脊椎動物は、試してみて価値のある有用な天然産物源と見なされてきた。無脊椎動物の中でも、被囊類およびほや類 (*Tunicata*、*Ascidiae*) が、かかる天然産物源として特に興味を引くものとされている。様々な地域における調査によれば、被囊類、主に *ecteinascidin* および *didemnin* より単離されたいくつかの化合物は人間の癌を治療する可能性があることが示されている。

30

【0003】

例えば、*Ecteinascidia turbinata* の抽出により、*ecteinascidin* 743 およびその他の抗腫瘍 *ecteinascidin* 化合物が得られている。また、被囊類 *Aplidium albicans* の抽出により、デヒドロ *didemnin* B およびその他の抗腫瘍 *didemnin* 化合物が得られている。同様に、多くの活性化合物がその他の付着性海洋生物、特に海綿動物から単離されている。被囊類、海綿動物およびかかる生物から抽出されたこれら化合物の多くは、化学合成が難しい複雑な構造を持っている。

40

【0004】

ecteinascidin 743 およびその他多くの当該化合物については、所望の活性化合物を後に単離するために天然物からバルクで生物を収集するという問題が残っている。*Ecteinascidia turbinata* (Herdman, 1880, *Ascidiae*、*Perophoridae*) は透明な膜で通常明るいオレンジ色のコロニーほやである。コロニーは、密集した群または細長いややダイヤ形の独立細

50

胞からなっており、コロニーが成長する対象表面に接合するストロン網状組織により基部で連結されている。コロニーは、通常、浅海(0~15m)およびラグーンに生息しており、赤色マングローブの根、色、貝、亀草、海底の砂、*Caulerpa*や*Posidonia*種のような植物において成長する。マングローブ領域が一般に広がっているのはカリブ海と地中海である。*E. turbinata*が両性周期により繁殖し、卵が育児嚢内で内部孵化し、独立細胞がストロンまたはベースから出芽することにより成熟、または無性生殖すると、幼生が放出される。*Ecteinascidia turbinata*は、現在、カリブ海においてコロニー中でこれが行われている水中のマングローブの根から集められている。潜水は困難なしには行えず、コロニーを絡まった根から見つけることも問題となっている。しかも、収集は継続して行わなければならない。

10

【0005】

従って、これら動物が天然に十分豊富でないこと、そして薬剤としての活性成分を製造するのに必要な量を与えるだけ十分な量を継続的に収集することは難しいということからこれらの源からの新薬の開発は妨げられている。

【0006】

発明の目的

本発明は、被囊類およびその他付着性海洋生物の培養方法および装置の提供に関する。特に、本発明は、*Ecteinascidia turbinata*の飼養による生成に関する。

20

【0007】

発明の概要

本発明は、複数の同種の基質を海水中に配置し、生物を複数の基質上で成長させ、成長した生物を採取して、採取した生物から薬剤を抽出することにより、付着性海洋生物からの抽出による海洋薬剤の生成方法を提供するものである。

【0008】

関連の態様において、本発明は、複数の同種の基質を海水中に配置し、生物のコロニーからの幼生に基質に種苗させ(seed)、複数の基質上で生物を成長させて、成長した生物を採取することにより、海洋薬剤抽出用の付着性海洋生物を飼養する方法を提供する。

【0009】

他の関連の態様において、本発明は、複数の同種の基質を海水中に配置し、生物を基質に移植し、複数の基質上で生物を成長させて、成長した生物を採取することにより、海洋薬剤抽出用の付着性海洋生物を飼養する方法を提供する。

30

【0010】

好ましい実施形態

好ましい海生生物は*Ecteinascidia turbinata*であり、好ましい海洋薬剤は、ecteinascidin化合物、特にecteinascidin 743である。他の好ましい実施形態において、海洋生物は、*Aplidium albicans*であり、海洋薬剤はdidemnin化合物、特にデヒドロdidemnin Bである。

【0011】

本発明は、付着性海洋動物、特に*E. turbinata*のような被囊類の原生地近辺または原生地からは離れた上水中での単一培養およびその抽出物からの薬剤の工業生産に十分な量での採取を可能とする装置および方法を提供する。場合によっては、本発明は、特に、地中海沿岸ラグーン領域、港湾領域または適正に構築された水槽または用水路に適用され、また場合によっては、カリブ海、特にカリブ海マングローブ湿地、要所(keys)、用水路、港湾領域または赤色マングローブの根、岩、貝殻、亀草、海底の砂や植物上で成長させるのに適正に構築された水槽に用いるのに特に好適である。

40

【0012】

本発明の飼養方法における一態様には、生物を基質上に移植して採取のために成長させることが含まれる。一実施形態において、個々の生物が基質上に移植される。あるいは、例

50

えば、海綿動物については、生物の断片が基質上に移植される。

【0013】

移植組織による種苗については、幼体の成長しているコロニーから切り取った小片（約20グラム）を装置に移植して、好ましくは、支持バスケットまたは箱に配置、あるいはネットの穴または装置の個々のロープまたはロッド間の空間に固定する。必要であれば、コロニーのストロンと装置表面の間の接触を保つ長さの糸、ゴムまたはその他方法を用いて固定することができる。生物の無性成長により適正な水の条件下で被囊類の量が正味で増大していく。

【0014】

本発明の他の飼養方法は、生物のコロニーからの幼生に基質に種苗させ、採取のために成長させることが含まれる。一実施形態において、基質はコロニーに近接配置される。あるいは、少なくとも1つのコレクターをコロニーに近接配置して幼生を収集して、続いてコレクターの幼生を用いて基質に種苗させる。この場合、幼生の入ったコレクターを局地で扱うことが必要であれば、基質はコロニーの一般産地にあってもよいし、あるいは、幼生の入ったコレクターを基質に近接して移植できるよう、基質はコロニーから離れていてもよい。

【0015】

コレクターを用いるこの態様については、本発明にはさらに、複数の幼生コレクターを被囊類コロニー付近に配置して、コロニーから放出された幼生を幼生コレクターに集めることにより、被囊類を採取する方法が含まれる。幼生の入ったコレクターは幼生を成熟させる場所に置くか、または幼生を成熟させる新鮮な領域に移す。

【0016】

本発明はまた、被囊類コロニーから幼生を受けるための1つ以上の幼生基質のある被囊類コロニーでマングローブの根に固定することのできる担体を有する幼生コレクターも提供する。本発明のコレクターは、幼生によるコロニー形成に好適な擬マングローブ根まで延びる細長いコードまたはその他の形態の基質を持つ担体を含むのが好ましい。この担体は、周囲に基質を備えた円状であるのが一般に好ましい。担体は、内側に延びている可撓性の固定用つめの内部端により画定される中央開口部がある。少なくとも1つのスロットが担体の周囲から開口部まで通じている。コレクターは、通常、1つの担体と4～8個の細長い基質からできている。ただし、担体は、特に基質に剛性がなく、根が垂直でない場合には各端部に与えることができる。

【0017】

本方法には、このスロットに沿って担体を可撓させながら開いて、根を中央開口部に通すことが含まれる。固定用つめの内部端を調整して、必要であれば、損傷を与えることなく根に咬持させて、担体を定位置に保持することができる。幼生を受けるのにコードが自由に垂れ下がるよう注意する。

【0018】

本発明の変形例において、必要であればいくらか重りをつけて、幼生基質が水中に垂れ下がるようにして担体を浮かべる。担体は、マングローブの木またはその他好適な固定位置につなぐのが好ましい。

【0019】

幼生捕獲による種苗については、成体コロニーを装置に近接させる、あるいは装置を近接させて、これら生物の性周期の結果放出される浮遊する幼生を自身に固定させる。そこで付着性成体が得られこれが分化してより大きなコロニーへと成長する。

【0020】

移植または種苗後、移植組織または幼生を成長させてコロニーを形成させ、天然または人口の清浄な海水に沈める。これにより海水に含まれる天然プランクトンや微生物のような連続的に再生可能資源の栄養素となる。適正なサイズになれば、コロニーを採取することができる。

【0021】

10

20

30

40

50

最初の種苗コロニーまたは成長コロニーの一部を用いて、次の採取のための種子材料を与えてよい。残りの成長部分は適宜収集して保管する。

【0022】

採取の際、水を流すことによりコロニーの堆積物を洗って、関係のない生物は手で取り除く。成長期後の被囊類コロニーの採取は、ダイバーにより手で行うか、投錨地から装置を取り除いて好適な容器で船により運搬して、採取した被囊類を担体ロッドまたはメッシュから分離する。その後直ちに、ビニール袋の中またはその他便利な手段で被囊類を保管する。

【0023】

本発明はまた、好ましくは、垂直に延びる基質を含む複数の基質を含む付着性海洋生物を成長させるための装置も提供する。 10

【0024】

被囊類を種苗し、成長させて大量に増やすことのできる本発明の特に好ましい装置は、付着装置、成長構造体および必要であれば支持システムから実質的になる。付着装置および成長構造体によって、培養している生物の種苗部分または移植組織を直接固定または付着させることができ、支持システムは付着構造体を定位置に保つ。被囊類コロニーの部分（幼生で小さい）は、手で移植して、必要であれば弾性帯または同様のものを用いて支持構造体に固定して、採取するのに適正なサイズになるまで成長させる。装置は、海底投錨地と浮いている装置の間、または天然または人工海盆の両側間に保持される水中構造体として、直接固定基質を取り付けるための手段として用いることができる。浮遊する筏状の枠または台を用いて、直接固定基質を取り付けることもできる。 20

【0025】

本発明によればまた、付着装置を形成する複数の列の基質と、投錨システムまたは係留システムに備わっている支持浮きシステムに固定された成長構造体とを有する、付着性海洋生物を基質上で成長させるための装置も提供される。

【0026】

成長装置は、以下のものより組み立てることのできる付着装置および成長構造体および支持システムを備えている。

【0027】

アタッチメントおよび生育構造体 30
(1) 無毒性プラスチックまたは腐蝕耐性金属、木材、または合成物質のような海水と相容性物質から製造したロープ、ケーブル、メッシュ、ネット、ロッド、プランク、ストリップ、バー、フィレット、スチック、ケージ、またはバスケットの基体は投錨システムに取り付けることにより保持される。

(2) 砂の沿岸区域の底に平行の海水耐性ロープまたはストリップの平行ラインはしっかりとリセットした投錨支持体間に延びている。

(3) バスケット、ケージまたは孔を開けた箱上のロープ、ケーブルまたはチェーンの支持体ラインは間隔を置いて配置する。バスケット、ケージまたは孔を開けた箱は尾索類のコロニーまたは他の生物の種子断片を捕集するために閉鎖できる。

隣接するロッドまたはメッシュまたはネットケーブル間の自由空間または孔は水を自由に通し、尾索類移植のアタッチメントおよび生育に対する空間である。バスケットまたは箱の孔は水を自由に通すことができ、しかし初めの種子移植を含有する。 40

【0028】

支持体システム
アタッチメントおよび生育に使用する網細工が十分な硬さである場合、底に横たわる重量物または培養タンクの側面に対する付加的投錨は支持体に対し十分である。海中培養におけるような、必要な場合、投錨システムは底に横たわる重量物と海の表面の高浮揚性フロート間で引張るように仕組まれたロープ、ロッドまたはケーブルにより供される。海の表面に垂直に沈み、伸びた全体デバイスの維持は支持体構造の各端部の投錨ロッド、ロープ、ケーブルまたはチェーンに取付けることにより確保される。網細工または網目が使用さ 50

れる場合、付加的一層小さいフロートまたはブイはメッシュの上部側面で規則正しい間隔で使用していつも広げ、引張って保持する。規則的間隔を置いた底部重量部に対し間隔をあけた付加的投錨は付加的フロートおよびブイと反対に使用する。別法では、溝またはタンクが使用される場合、全体の支持体システムは金属、木材またはプラスチックの固い支持体フレームを使用することにより溝の側面またはタンクの壁に固定できる。バスケット、孔あき箱またはケージを使用する場合、支持体フレームは海底に、または生育タンクにしっかりと付着した投錨ロッド間に引張られたロープ、ケーブルまたはチェーンの1つまたは2つの長いラインから成ることができる。

【0029】

好みの態様では、高密度ポリエチレンのようなロープまたは他の物質のメッシュまたは10
厚いネットはアタッチメントおよび生育に対し使用され、その孔または空間は約2~20mmである。このメッシュまたはネットは重い投錨重量物およびブイ間に張ったケーブルから成る投錨-固定システムにより集められ、広げて保持される。高浮揚力（適当には20~50kg揚力）空気ブイは各ケーブルの1端に取付け、一方海の表面に本質的に垂直に全体構造を置くように他端は底の重量物（ブイの揚力より正味（tared）重い）に固定する。全体のアタッチメント網細工は延びる滞留を確保する投錨システムに固着し、潮流により培養帯から流出しない。

【0030】

別の態様では、フレーム構造は自己支持するのに十分な固さにするためにロープ、スクリューまたは他の要素を使用して或る角度で相互にしっかりと付着した、木材またはプラスチックロッドまたはストリップの2つの平行配列またはセットにより形成される長方形仕切りから成る。別法では、軽金属、木材またはプラスチックの固い枠組を使用して底に付着できる。

【0031】

好みのデバイスは基質および支持体として例えば本質的に図4に記載され、約0.5~4mの長さ、2~8cmの孔を有する広いプラスチックメッシュを含み、狭い沿岸の渦の底に定着して完全に沈み、浮揚デバイスにより畳々垂直に保持されるデバイスを使用して基質に生物のコロニー断片を移植することによりEcteinascidia turbinateを生育させる方法で使用する。

【0032】

無柄の海洋生物、特にE.Turbinateのような尾索類生物を天然コロニーに接近し、または離れた位置で播種し、生育させるのに有用なデバイスも供される。このデバイスは支持-浮揚フレーム内でアタッチメントおよび生育構造体から本質的に成る。これはいかり-固定システムにより保持され、それに付加する遮光器を有することができる。

【0033】

生育デバイスは本質的に、
支持体フレームおよび浮揚構造、
アタッチメントガイド
固定および投錨システムおよび通例
遮光器
から成る。

無柄海洋生物を基体に生育させるデバイスは投錨システムまたはけい留システムを供された支持体浮揚フレームにより安全にされ、支持される水平アタッチメントガイドの配列の各1つに付着した垂直に延びる基質の配列を含み、場合により基質に投射する光を低減する遮光器を有する。

【0034】

支持フレームおよび浮揚構造
この構造はアタッチメントロッドに対する内部ペリメータ支持体およびタンクの壁に全体構造を付着させ、または公海適用に対する浮揚-投錨システムを供する外部ペリメータから本質的に成る。双方のペリメータはそれから生育ロッドを支持できるだけの固さにする

10

20

30

40

50

ためにスクリューまたは他の要素を使用してしっかりと相互に結合した1セットの木材またはプラスチックロッドにより形成される。内部フレームペリメータは外部のものと同じ平面に集められ、または浮揚システムの幾何学および他の特別の培養條件により、外部表面は表面に留まり、一方内部表面は水中に沈むようにより低い平面に保持することができる。

【0035】

アタッチメントガイド

支持体フレームの内部部分は「アタッチメントガイド」に対し固定として働き、ジューント、木材、腐蝕耐性金属または合成物質のような海水と相容性の物質の数個の平行ロッド、ストリップ、フィレットまたはロープである。これらの「アタッチメントガイド」はフックまたは同様の固定具によりフレームに結合するので、各端部はフレームから容易に分離でき、水平の平行配列を形成し、支持フレームの内部部分により水の表面近くに沈む。

10

【0036】

固定および投錨システム

海水培養適用では、全体の装置は水の表面に水平に浮くようにセットされる。これはフレーム構造の外部ペリメータ区域に低い平均密度構造を結合させることにより達成できる。この場合、全体のアタッチメントフレームは水の表面に浮揚するが、潮流により培養帯から流出しないようにロープ、チェーンまたはケーブルにより底に横たわる重量物に投錨する。

20

【0037】

デバイスは任意の十分にしっかりと軽金属、木材またプラスチックの固定枠組によりタンクまたは溝に使用し、底部または側面に固定するのに適応することもできる。本発明の好ましい態様では、膨化前のポリウレタンのような低い平均密度ポリマー物質の十分の大きさのピースは、全体構造が水に浮くように支持フレームの各横のペアを形成するロッド間のスペースに結合する。

【0038】

シェード

被覆材(covering material)を用いて、強い日光に暴露される領域のアタッチメント・ロッドの直接上方の水面上の全光入射を減ずることができる。本発明の好ましい実施態様では、成長する培養物(growing culture)に上方からアクセスするためにシェードの容易な除去を可能にするやり方で、ある長さの丈夫なクロス又は緻密なメッシュを各端部において木製ロッド又はプラスチック・ロッド(シェード・ロッド)に取り付けて用いる。

30

【0039】

0.2~2m長さのロープ又は木製ロッド上にEcteinascidia turbinata幼虫を捕捉する方法に好ましいデバイスを用いる、例えば、本質的に図5、6及び7に示すような、シェード付きの約1~2m×3~6mのフローティング・フレームから成るデバイスを用いる、このフレームにロープ又は木製ロッドが固定され、生物のコロニー近くの水中に、それらに幼虫が取り付くまで、水平又は垂直に沈められて維持され、このように接種されたこれらのロープから成体コロニーが後に成長することができるようになる。

40

【0040】

0.2~2m長さのロープ又は木製ロッド上にコロニーのフラグメントを移植することによってEcteinascidia turbinata幼虫を成長させる方法には他の好ましいデバイスを用いる、例えば、本質的に図8、9及び10に示すような、シェード付きの約1~2m×3~6mのフローティング・フレームから成るデバイスを用いる、このフレームからコロニーが付着したロープ又は木製ロッドが、生物を成長させるために水中に垂直に沈められるように吊るされることがある。

【0041】

(本発明の実施例)

50

本発明を添付図面に示す実施態様によって例示する。

図1は、尾索類(tunicate)コロニー周囲の位置の本発明の幼虫コレクターの透視図である。

図2は、図1の幼虫コレクターに用いるためのサポートの上方からの図を、該サポートの横断面と共に示す。

図3は、本発明の幼虫コレクターのための他のサポートの上方からの図を、該サポートの横断面と共に示す。

【0042】

図4は、地中海に用いるために適したメッシュワーク付着構造付きの成長デバイス(growth device)である。

図5は、幼虫捕捉のフレームを示す。

図6は、図5のフレームの拡大図である。

図7は、幼虫捕捉のフレームの水面下コレクターの細部である。

【0043】

図8は、尾索類成長フレームである。

図9は、図8のフレームの細部である。

図10は、成長ユニットの細部である。

【0044】

最初に図1を参照すると、本発明の幼虫コレクター10は、尾索類コロニー16においてマングローブ根14に固定することができる2個のポリプロピレン・サポート12を有する。ポリプロピレン、ナイロン又はポリエチレンの長さ約60cmの6本のプラスチック・コード18が、コロニーから幼虫を受け取るための幼虫基板(larval substrate)を形成する。

【0045】

図1のコレクター10には、初期の経験は全体的に垂直な根14には上方サポートのみが必要であると示唆しているが、両端部にサポート12が存在する。各サポートは一般に円形であり、図2にも見ることができるように、内側に伸びるフレキシブル・フィンガー22の内部端部21によって画定される中央開口20が存在する。これらのフィンガーは曲げを容易にするために狭くなった区分23を有する。スロット24がサポートの周辺から開口20まで通ずる。

【0046】

使用時には、組み立てたコレクターを尾索類コロニー16が付着したマングローブ根14まで水面下に入れる。サポートをスロット24に沿って曲げて開き、根を中央開口まで通させる。フィンガー22の内部端部21は調節可能であり、必要に応じて、根と係合して、サポートを適所に維持するように強制することができる。

【0047】

幼虫がプラスチック・コード18に移行した後に、幼虫を成体させるために負荷したコレクター10をその場に放置することができる。或いは、負荷したコレクター10を新たな領域に移して、幼虫を他所で成体させることができる。特に、各負荷した基板は新しい領域で新しいコロニーの基礎を形成することができ、次に、この新しいコロニーに本発明を用いた幼虫回収を行うことができる。

図3は、幼虫コレクターのための異なるサポートを、該サポートの横断面と共に示す。図3のサポートの測定値は次の通りである：

【0048】

サポート直径	250 mm
中央円の直径	60 mm
ウイングの先端（端部）によって画定された円の直径	7 mm
ストリング通過のための環状スロットの直径	6 mm
環状スロットのネックの幅	4 mm
ストリング通過のための環状スロットの開口の幅	2 mm
ストリング通過のための環状スロットの開口の長さ	10 mm
サポートの中央円までの開口の幅	1.5 mm
サポートの厚さ	3.5 mm

10

20

30

40

50

【0049】

カリブ海尾索類 *Ecteinascidia turbinata* の場合には、幼虫の放出が約4又は5回／年生じる。予想される放出時期を考慮してコレクターを配置し、次に規則的な間隔でコレクターをモニターすることが望ましい。

本発明を用いることによって、尾索類、特に *Ecteinascidia turbinata* の大規模な養殖を計画することが可能になる。

【0050】

したがって、図1～3の実施態様によって、天然生成資源を持続的に利用するための環境的に好ましい養殖方法、即ち、幼虫を基板上に回収して、幼虫を成体するまで成長させることを含む *Ecteinascidia turbinata* の養殖方法を提供する。成体した尾索類から、又はそれらに続く子孫から、例えばエクティンアシジン (*ecteinascidin*) 743のような望ましい化合物を単離することができる。この単離化合物も本発明の一部である。

【0051】

図4に関しては、地中海に用いるために適したメッシュワーク付着構造付き成長デバイスを示す。基板は、重い錘によって固定され、浮遊ブイによって浮かされるメッシュワークを含む。図4Aは単独成長デバイスを示し、図4Bは複数デバイスの配置を示す。

【0052】

カリブ海マングローブ沿岸領域における尾索類、特に *E. turbinata* の海中養殖のために有用な本発明の好ましい実施態様を図5～9に示す。図5は幼虫捕捉フレームを示す。外周及び内周を図6に示す。図7には、幼虫捕捉コレクターのための木製ロッド又はロープを用いる代替え細部を示す。図8は尾索類成長フレームを示す。図9は、尾索類成長フレームの細部における代替え付着ロッド又は付着ロープを示す。図10は成長ユニットの細部におけるサポート・ロッドに固定された付着ロッドを示す。

【0053】

本出願のために、図面に示すように、一緒にねじ止めされた (screwed) 平行な4対の木製ロッド又はポリマー・プラスチック・ロッドの長方形列を含むフレーム構造を用いる。この方法では、長方形スペースが成長ロッドの取り付けのために自由に残される。幼虫捕捉の用途のために、取り付けロッドが水面下に適当に維持されることを保証するために内周が外周よりも0～50cm低く配置されるフレームを用いることができる。取り付けロッドは木、プラスチックチューブ又はロープから端部の適当な取り付け具によって構成され、内部フレーム上のフックにフィットし、内部フレーム内に水平に配置される。取り付けガイド又は天然基板に付着した成長する尾索類コロニーをデバイスに近づけて、幼虫を放出させる。しばらく経ってから、幼虫が固定されたロッドを一端から取り外して

、成長させるためにサポート・フレームに移す。予め移植した生物を成長させるために、内周は外周と同じ面内であることができ、水面に水平なサポート・ロッド上に存在して、内部フレームを横切る。付着幼虫又は移植尾索類コロニー・フラグメントを有する垂直取り付けロッド又はロープは、尾索類を成長させるために、水平ロッドから下方に吊るされて配置される。完全に成長した尾索類を回収するために、ロッド又はロープを両端部から取り出すことができる。浮遊のために予備発泡ポリウレタン・スラブをフレームの外周と内周の間のスペースに固定する。取り付けフレーム全体をロープを用いて重い錘に固定する。

【0054】

養殖のために従われるプロセスは初期接種、その後の成長段階及び回収を含む。
成体尾索類コロニーを該構造に近づけ、これらの生物の生殖サイクルの結果として放出される幼虫を捕捉する、又は構造が好ましくは水平状態にあるときに、構造のロッドにコロニー自体を固定させることができる。或いは、尾索類幼虫が同様に捕捉されているロープをサポート構造のロッドに取り付ける。そこで、これらの幼虫は保持され、無柄成体 (sessile adult) に分化し、次に、大きいコロニーに成長する。

【0055】

或いは、移植片を接種するために、例えば海綿又は尾索類コロニーのような成長生物から切り取った小フラグメント (例えば、約 20 g) を付着構造に移し、コロニーの芽茎と付着面との間の接触を維持するゴムバンド又は他の方法を用いて、成長ロッドに固定する。或いは、尾索類コロニー又は海綿が同様に固定されたロープを付着構造のロッドに同様に取り付ける。生物の性的成長が正味の質量増加をもたらす。

【0056】

幼虫が付着した又は生存成体生物のフラグメントが付着したロッド又はロープに、幼虫が成長して、コロニーを形成することができる垂直状態をとらせる。生物の性的成長が尾索類の正味の質量増加をもたらす。最初に接種されたコロニーのほんの少量を用いて、次の回収のための接種材料 (seed material) を得ることができ、成長体の残部を回収して、適当に貯蔵する。

回収のために、コロニーから水流によって沈降物を除去し、外来生物を手によって必要に応じて除去し、動物を付着ロッドから分離することによって回収し、適当ならば凍結保存する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、尾索類 (tunicate) コロニー周囲の位置の本発明の幼虫コレクターの透視図である。

【図2】

図2は、図1の幼虫コレクターに用いるためのサポートの上方からの図を、該サポートの横断面と共に示す。

【図3】

図3は、本発明の幼虫コレクターのための他のサポートの上方からの図を、該サポートの横断面と共に示す。

【図4】

図4は、地中海に用いるために適したメッシュワーク付着構造付きの成長デバイス (growth device) である。

【図5】

図5は、幼虫捕捉のフレームを示す。

【図6】

図6は、図5のフレームの拡大図である。

【図7】

図7は、幼虫捕捉のフレームの水面下コレクターの細部である。

【図8】

10

20

30

40

50

図 8 は、尾索類成長フレームである。

【図 9】

図 9 は、図 8 のフレームの細部である。

【図 10】

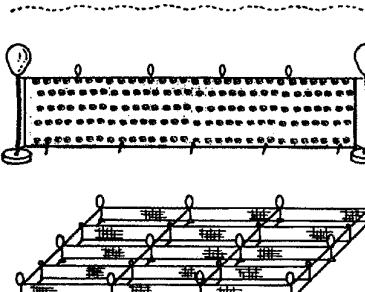
図 10 は、成長ユニットの細部である。

【国際公開パンフレット】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A01K 61/00, 67/033	A1	(11) International Publication Number: WO 99/56535 (43) International Publication Date: 11 November 1999 (11.11.99)
(21) International Application Number: PCT/GB99/01402		[ES/ES]; Pharma Mar, S.A., Calle de la Calera, 3, Polígono Industrial de Tres Cantos, Tres Cantos, E-28760 Madrid (ES).
(22) International Filing Date: 5 May 1999 (05.05.99)		BARBERO GARCIA, Carlos [ES/ES]; Pharma Mar, S.A., Calle de la Calera, 3, Polígono Industrial de Tres Cantos, Tres Cantos, E-28760 Madrid (ES).
(30) Priority Data: 9809588.8 5 May 1998 (05.05.98) GB 9905018.9 4 March 1999 (04.03.99) GB 9905021.3 4 March 1999 (04.03.99) GB		MARTIN BENITEZ, Silvia [ES/ES]; Pharma Mar, S.A., Calle de la Calera, 3, Polígono Industrial de Tres Cantos, Tres Cantos, E-28760 Madrid (ES).
(71) Applicant (for AT AU BE BR CA CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT JP KR LU MC MX NL NZ PT RU SE UA only): PHARMA MAR, S.A. [ES/ES]; Calle de la Calera, 3, Polígono Industrial de Tres Cantos, Tres Cantos, E-28760 Madrid (ES).		(74) Common Representative: RUFFLES, Graham, Keith; Marks & Clerk, 57-60 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LS (GB).
(71) Applicant (for all designated States except AT AU BE BR CA CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT JP KR LU MC MX NL NZ PT RU SE UA only): RUFFLES, Graham, Keith [GB/GB]; 57-60 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LS (GB).		(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SI, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): KÜKÜRTÇÜ TARGOTAY, Bulent [ES/ES]; Pharma Mar, S.A., Calle de la Calera, 3, Polígono Industrial de Tres Cantos, Tres Cantos, E-28760 Madrid (ES). NARANJO LOZANO, Santiago		Published With international search report.
(54) Title: CULTURE OF SESSILE MARINE ANIMALS		
(57) Abstract		
<p>Sessile marine organisms are a source of many marine pharmaceuticals. A method of producing such a marine pharmaceutical is provided which involves positioning a plurality of like substrates in sea water, growing the organism on the plurality of substrates, harvesting the grown organism, and extracting the pharmaceutical from the harvested organism.</p> 		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BY	Belarus and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	JL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NP	Nepal	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NU	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	VU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Republic of Korea	RO	Romania		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	SD	Sudan		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SE	Sweden		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SG	Singapore		
EE	Estonia	LR	Ukraine				

CULTURE OF SESSILE MARINE ANIMALS

The present invention relates to the culture of sessile marine animals for extraction of marine pharmaceuticals. In particular, the present invention relates to methods and devices for the culture of marine organisms known as tunicates.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Over the past years, a systematic screening of many kinds of marine organisms has been undertaken to discover natural compounds that might have pharmacological uses. Sessile marine invertebrates have been shown to be worthwhile sources of potentially useful natural products. Among these invertebrates, tunicates or ascidians (Tunicata, Ascidiacea) have turned out to be especially interesting as sources for such natural products. Research in various places has shown that several compounds isolated from tunicates, principally the ecteinascidins and didemnins, have a potential for therapy of human cancers.

Thus, for example, extraction of the tunicate *Ecteinascidia turbinata* has yielded ecteinascidin 743 and other antitumour ecteinascidin compounds, while extraction of the tunicate *Aplidium albicans* gives dehydrodidemnin B and other antitumour didemnin compounds. Likewise, many active compounds have been isolated from other sessile marine organisms, notably from sponges. Many of these compounds extracted from tunicates, sponges and other such organisms have a complex structure which makes chemical synthesis difficult.

Thus, for ecteinascidin 743 and many other interesting compounds, it remains a matter of collecting the organism in bulk from nature, for subsequent isolation of the desired active compound. *Ecteinascidia turbinata* (Herdman, 1880 / *Ascidacea, Perophoridae*), is a colonial ascidian of transparent tunic and usually bright orange colour. A colony consists of a dense group or cluster of elongated, somewhat club-shaped zooids, which are connected at their bases

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

2

by a network of stolons that adheres to the surface of the object on which the colony grows. The colonies normally live in shallow water (0 to 15 m) and in lagoons, growing on red mangrove roots, rocks, shells, turtle grass, bottom sand or on plants such as *Caulerpa* or *Posidonia* species. It is common and widely distributed in mangroves areas of the Caribbean Sea and the Mediterranean Sea. *E. turbinata* reproduces by both a sexual cycle, in which eggs are hatched internally within a brood pouch and larvae are released when a zooid reaches maturation or asexually, by budding from the stolon or base. *Ecteinascidia turbinata* is currently collected in the Caribbean from underwater mangrove roots, where it occurs in the colonies. Diving is not without difficulties, and finding the colonies among the tangled roots presents further problems. Moreover, the collecting must be done in a sustainable manner.

Accordingly, development of novel drugs from these sources has been hindered by the fact that these animals are not abundant enough in nature and sustainable collection of sufficient mass to provide the amounts needed for manufacturing of their active components as drugs is difficult.

OBJECT OF THE INVENTION

The present invention is concerned with the provision of methods and devices for culture of tunicates and other sessile marine organisms. In particular, the present invention is directed at the production by farming of *Ecteinascidia turbinata*.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a method of producing a marine pharmaceutical by extraction from a sessile marine organism, which method comprises positioning a plurality of like substrates in sea water, growing the organism on the plurality of substrates, harvesting the grown organism, and extracting the pharmaceutical from the harvested organism.

In a related aspect, the present invention provides a method of farming a sessile marine organism intended for extraction of a marine pharmaceutical, which method comprises

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

3

positioning a plurality of like substrates in sea water, allowing larvae from a colony of the organism to seed the substrates, growing the organism on the plurality of substrates, and harvesting the grown organism.

In another related aspect, the present invention provides a method of farming a sessile marine organism intended for extraction of a marine pharmaceutical, which method comprises positioning a plurality of like substrates in sea water, transplanting the organism onto the substrates, growing the organism on the plurality of substrates, and harvesting the grown organism.

PREFERRED EMBODIMENTS

We prefer that the marine organism is *Ecteinascidia turbinata* and the marine pharmaceutical is an ecteinascidin compound, particularly ecteinascidin 743. In another preferred embodiment, the marine organism is *Aplidium albicans*, and the marine pharmaceutical is a didemnin compound, particularly dehydroididemnin B.

This invention provides a device and a method, which allows for monoculture of sessile marine animals, in particular of tunicates such as *E. turbinata*, in clean waters adjacent to or at a distance from their native locations, and their harvesting in amounts sufficient for industrial production of drugs from their extracts. In some versions, the invention is particularly adapted for application in areas of Mediterranean coastal lagoons, harbour areas, or in appropriately constructed tanks or canals, while in other versions it is particularly suited for use in Caribbean waters, notably Caribbean mangrove swamp, keys and canals, harbour areas, or in an appropriately constructed tanks growing on red mangrove roots, rocks, shells, turtle grass, bottom sand or on plants.

In the farming methods of this invention, one aspect involves transplanting the organism onto the substrates which then grow for harvesting. In one embodiment, individual organisms are transplanted onto the substrates. Alternatively, for example with sponges, fragments of organisms are transplanted onto the substrates.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

For seeding by implants, small pieces (say about 20 gr.) cut off from young, growing colonies are transported to the device and preferably placed into support baskets or boxes or affixed to the holes of a net or to the spaces between the individual ropes or rods of the device. Fixation can be achieved if needed, by using lengths of string, rubber, or any other method that maintains contact between the stolon of the colony and the device surface. Asexual growth of the organisms gives rise to net increase of mass of tunicates under appropriate water conditions.

Another aspect of the farming method of this invention involves allowing larvae from a colony of the organism to seed the substrates which then grow for harvesting. In one embodiment, the substrates are placed adjacent the colony. Alternatively, at least one collector is placed adjacent the colony to collect larvae, and then larvae on the collector are subsequently employed to seed the substrates. In this alternative, the substrates can be in the general locality of the colony so that local handling of the collector with larvae is all that is needed, or the substrates can be remote from the colony, so that the collectors with larvae are transported to be adjacent the substrates.

For this aspect involving the use of collectors, the present invention further involves a method of harvesting tunicates, wherein a multiplicity of larval collectors are positioned in the vicinity of tunicate colonies, and larvae released from the colonies are allowed to collect on the larval collectors. The loaded collectors can then be left in position for the larvae to mature, or transferred to a fresh area for the larvae to mature.

The present invention also provides larval collectors each comprising a support which can be secured to a mangrove root at a tunicate colony, with one or more larval substrates for receiving larvae from the colony. The collector of this invention preferably comprises a support with elongate cords or other form of substrate extending therefrom to mimic mangrove roots suitable for colonisation by the larvae. The support is preferably generally circular, with the substrate at the periphery. The support suitably has a central aperture defined by the inner ends of inwardly extending flexible fingers. At least one slot usually leads from the periphery of the support to the aperture. The collector is typically made up of one support and 4 to 8 elongate substrates, though a support can be provided at each end, particularly where the substrates lack

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

5

rigidity and the root is not vertical.

The method then involves flexing open the support along the slot to allow the root to pass to the central aperture. The inner ends of the fingers can be adjusted and moved as necessary to engage the root without damaging it, and hold the support in place. Care is taken to ensure that the cords hang freely for receiving the larvae.

In one variation of the present invention, the support floats with the larval substrates hanging down in the water, if necessary with some weights. The support is preferably tethered to the mangrove plant or some other suitable fixing position.

For seeding by larval capture, adult colonies are brought in proximity to the device or *vice versa*, and the swimming larvae emitted as a result of the sexual cycle of these organisms are allowed to affix themselves. There they take hold, and differentiate into sessile adults which in turn grow into larger colonies.

After transplanting or seeding, the implants or larvae are allowed to grow and form colonies while submerged in clean sea water, natural or artificial, which provide a continuously renewable source of nutrients such as natural plankton or micro-organism contained in sea water. When an appropriate size is reached, the colonies can be harvested.

A fraction of the initially seed colonies or the grown colonies may be used to provide seed material for the next harvest, while the rest of the growth will be collected and stored appropriately.

For harvesting, colonies are cleaned of sediment by means of streams of water, extraneous organisms removed manually. Harvesting of the tunicate colonies after the growth period is achieved either manually by divers or by removing the device from the anchorage and hauling it on board a suitable vessel and the tunicates harvested by separating them from the support rods or mesh. Immediately afterwards, the tunicate can be stored by freezing in plastic bags or any other convenient means.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

6

The present invention also provides devices for growth of sessile marine organisms comprising a plurality of substrates, preferably including vertically extending substrates.

A particularly preferred device for seeding the tunicates and allowing them to grow and increase in mass provided by the present invention consists essentially of an attachment and growth structure and, when necessary, a support system. The attachment and growth structure allows for direct fixing or attachment of seeding fragments or implants of the organism being cultured, while the support system keeps the attachment structure in place. Fragments of tunicate colonies (juvenile and small) are implanted manually or captured onto the support structure, using an elastic band or similar when necessary, and are allowed to grow until they reach an appropriate size for harvesting. The device can be employed as a submerged structure maintained between bottom anchorage and floating device or between sides of natural or artificial basin as means to attach the direct fixing substrates. Floating raft-like frames or platforms can also be employed to attach the direct fixing substrates.

Thus according to the present invention, there is also provided

A device for growing sessile marine organisms on substrates, comprising arrays of substrates forming an attachment and growth structure secured to a support flotation system provided with an anchoring system or a mooring system.

The growing device has an attachment and growth structure and a support system which can be assembled from:

Attachment and growth structure

- (1) A substrate of ropes, cables, meshes, nets, rods, planks, strips, bars, fillets, sticks, cages, or baskets made of materials compatible with sea water, such as non-toxic plastic or corrosion-resistant metal, wood, or synthetic materials, kept taut by attachment to an anchorage system.
- (2) Parallel lines of sea water resistant ropes or strips parallel to the bottom of a sandy coastal area running between firmly set anchoring supports.
- (3) Support lines of ropes, cables or chains onto which baskets, cages or perforated boxes, are

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

7

deployed at intervals. The baskets, cages or perforated boxes can be closed so as to trap seed fragments of tunicate colonies or other organisms.

The free spaces or holes between contiguous rods or cables of the mesh or netting allow free passage of water and space for attachment and growth of the tunicate implants. Perforations on the baskets or boxes allow free passage of water, but contain initial seed implants.

Support system

When the meshwork used for attachment and growth is rigid enough, additional anchorage to bottom-lying heavy weights or sides of culture tanks is sufficient for support. When necessary, such as in mariculture applications, an anchorage system is provided by means of ropes, rods or cables stretched taught between bottom lying heavy weights and high buoyancy floats on the surface of the water. Maintenance of the whole device submerged and outstretched perpendicularly to the water surface is insured by attachment to the anchorage rods, ropes, cables or chains at each end of the support structure. When meshwork or netting is used, additional smaller floats or buoys can be used at regular intervals on the upper side of the mesh, to keep it unfolded and stretched out at all times. Additional anchorage at intervals to regularly spaced bottom weights is used to counter the additional floats or buoys. Alternatively, if canals or tanks are used, the whole support system can be fixed to the sides of the channel or the walls of the tank by using a rigid support frame of metal, wood or plastic. When baskets, perforated boxes or cages are used, the support frame may consist of one or two long lines of rope, cable or chain stretched out between anchor rods firmly affixed into the sea bottom or to the growth tanks.

In a preferred embodiment, a mesh or thick net of rope or other material such as high density polyethylene is used for attachment and growth in which the holes or spaces are between 2 and 20 mm. This mesh or net is assembled onto, and held unfolded by, an anchorage- fixation system, comprising of cables stretched out between a heavy anchoring weights and buoys. High buoyancy (suitably 20 to 50 kg lift) air buoys are attached to one end of each cable, while the other end is fixed to heavy weights (tared heavier than the buoys' lift) at the bottom so that the whole structure rests essentially perpendicular to the water surface. The whole attachment

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

8

meshwork is affixed to the anchor system insuring it stays outstretched and does not float away from the farming zone with the currents.

In an alternative embodiment, the frame structure consists of a rectangular panel formed by two parallel arrays or set of wooden or plastic rods or strips, firmly affixed to each other at an angle by use of ropes, screws or other means so as to make it rigid enough to be self supporting. Alternatively, it can be affixed to the bottom using rigid frameworks of light metal, wood or plastic.

A preferred device is employed in a method of growing *Ecteinascidia turbinata* by transplanting fragments of colonies of the organism to a substrate using as substrate and support a device essentially as described for example in figure 4 and comprising of lengths of an approximately 0.5 to 4 m wide plastic mesh with holes between 2 and 8 cm kept entirely submerged by anchorage to the bottom of a shallow coastal lagoon and held approximately vertically by floatation devices.

A device useful for seeding and growing sessile marine organisms, in particular tunicates such as *E. turbinata*, at sites close to or remote from natural colonies is also provided. This device consists essentially of an attachment and growth structure within a support-flotation frame, which is held by an anchor-fixation system and may have a shade attached to it.

The growing device consists essentially of:

- a support frame and floatation structure,
- attachment guides,
- a fixation and anchorage system and usually
- a shade.

A device for growing sessile marine organisms on substrates, comprising arrays of vertically extending substrates each attached to a respective one of an array of horizontal attachment guides secured to and supported by a support floatation frame provided with an anchoring system or a mooring system, and optionally having a shade to reduce light incident on the substrates.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Support frame and floatation structure

This structure consists essentially of an internal perimeter support for the attachment rods and an external perimeter, which serves to attach the whole structure to the walls of a tank or a floatation-anchorage system for open sea applications. Both perimeters are formed by a set of wooden or plastic rods firmly affixed to each other by use of screws or other means so as to make it rigid enough to allow for support of the growth rods from it. The internal frame perimeter may be assembled in the same plane as the external one or may be held in a lower plane so that it is kept submerged in the water while the external frame remains on the surface, depending on the geometry of the floatation system, and other specific culture requirements.

Attachment guides

The internal part of the support frame serves as fixation for the "attachment guides" which are several parallel rods, strips, fillets or ropes of material compatible with & p sea water, such as jute, wood, corrosion-resistant metal or synthetic materials. These "attachment guides" affixed to the frame by means of hooks or similar fixations so that each end can be detached easily from the frame, forming a horizontal, parallel array and kept submerged close to the surface of the water by the internal part of the support frame.

Fixation and anchorage system

For mariculture applications, the whole device is set to float horizontally on the surface of the water. This may be achieved by attachment of low average density structures to the external perimeter areas of the frame structure. In this case the whole attachment frame is anchored to bottom lying heavy weights by means of ropes, chains or cables, such that it floats on the surface of the water but does not float away from the farming zone with the currents.

The device may also be adapted use in tanks or canals and fixed to the bottom or sides by means or any sufficiently firm fixation framework of light metal, wood or plastic. In a preferred embodiment of this invention, large enough pieces of a low average density polymeric material

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

10

such as pre-expanded polyurethane are attached to the spaces between the rods forming each lateral pair of the support frame, so that the whole structure floats in the water.

Shade.

A covering material may be used to reduce total light incidence on the surface of the water immediately over the attachment rods in areas exposed to intense sunlight. In a preferred embodiment of this invention, a length of a sturdy cloth or dense mesh is used attached at each end to wooden or plastic rods (shade rods) in a way which allows easy removal of the shade for access to the growing culture from above.

A preferred device is employed in a method of capturing *Ecteinascidia turbinata* larvae onto 0.2-2 m lengths of ropes or wooden rods using a device essentially as described for example in Figures 5, 6 and 7 comprising of a floating frame, approximately 1-2 m by 3-6 m with a shade onto which the ropes or wooden rods are affixed and maintained horizontally or vertically submerged in the water in proximity to colonies of the organism until larvae attach to them so that adult colonies can later be grown from these ropes or rods so seeded.

Another preferred device is employed in a method of growing *Ecteinascidia turbinata* by implanting fragments of colonies onto 0.2-2 m lengths of ropes or wooden rods using a device essentially as described for example in Figures 8, 9 and 10 comprising of a floating frame, approximately 1-2 m by 3-6 m with a shade from which the ropes or wooden rods with attached colonies can hang vertically submerged in water for growth of the organism.

EXAMPLES OF THE INVENTION

The present invention is exemplified by the embodiments shown in the accompanying drawings.

THE DRAWINGS

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

11

Figure 1 is a perspective view of a larval collector of this invention in position around a tunicate colony.

Figure 2 is a view from above of a support for use in the larval collector of Figure 1, together with a horizontal cross-section of the support.

Figure 3 is a view from above of a different support for a larval collector of this invention, together with a horizontal cross-section of the support.

Figure 4 is a growth device with meshwork attachment structures suited for use in the Mediterranean Sea.

Figure 5 shows a frame for larval capture.

Figure 6 is an exploded view of the frame of Figure 5.

Figure 7 is a detail of the underwater area, the collectors, of a frame for larval capture.

Figure 8 is a frame for growth of tunicates.

Figure 9 is a detail of the frame of figure 8.

Figure 10 is a detail of a growth unit.

Referring initially to Figure 1, the larval collector 10 of this invention has two polypropylene supports 12 which can be secured to a mangrove root 14 at a tunicate colony 16. Six plastic cords 18 of polypropylene, nylon or polyethylene and about 60 cm in length form larval substrates for receiving larvae from the colony.

In the collector 10 of Figure 1, there are supports 12 at opposite ends, though initial experience suggests that only the upper support is needed for a generally vertical root 14. Each support is generally circular, and as may also be seen in Figure 2, there is a central aperture 20 defined by

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

12

the inner ends 21 of inwardly extending flexible fingers 22. The fingers can have a narrowed section 23 to facilitate flexing. A slot 24 leads from the periphery of the support to the aperture 20.

In use, the assembled collector is taken underwater to a mangrove root 14 with a tunicate colony 16. The support is flexed open along the slot 24 to allow the root to pass to the central aperture 20. The inner ends 21 of the fingers 22 can be adjusted and forced as necessary to engage the root and hold the support in place.

After the larvae have migrated to the plastic cords 18, the loaded collectors 10 can then be left in position for the larvae to mature, to grow to give new colonies 26 indicated by the dashed lines. Alternatively, the loaded collectors can be transferred to a fresh area for the larvae to mature elsewhere. In particular, each loaded substrate can form the basis for a new colony in a new area, which in turn can then be subjected to larval collection using the present invention.

Figure 3 shows a different support for a larval collector with a horizontal cross-section of the support. The measurements of the support of Figure 3 are as follows:

Diameter of the support	250 mm.
Diameter of the central circle	60 mm.
Diameter of the circle described by the tip (end) of the wings	7 mm.
Diameter of the circular slots for the string passing	6 mm.
Width of the neck of the circular slots	4 mm.
Width of the opening to the circular slots for the string passing	2 mm.
Length of the opening to the circular slots for the string passing	10 mm
Width of the opening to the central circle of the support	1.5 mm.
Thickness of the support	3.5 mm.

In the case of the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata* the release of larvae occurs about 4 or 5 times a year. It is desirable to position the collectors in the light of the expected release times, and to then monitor the collectors at regular intervals.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

By the use of the present invention, it becomes possible to envisage the large scale farming of tunicates, especially *Ecteinascidia turbinata*.

Thus, with the embodiment of Figures 1 to 3, we provide an environmentally favourable method of farming for sustainable exploitation of the naturally occurring resource, that is a method of farming *Ecteinascidia turbinata* which comprises collecting the larvae on a substrate and allowing the larvae to grow to maturity. From the mature tunicates, or from their subsequent progeny, the desired compound such as ecteinascidin 743 can be isolated. The isolated compound is also part of the present invention.

Referring to Figure 4, there is shown a growth device with meshwork attachment structures suited for use in the Mediterranean Sea. The substrate comprises a the meshwork which is anchored by heavy weights and buoyed by flotation buoys. Figure 4A shows a single growth device, and Figure 4B shows a grouping of multiple devices.

A preferred embodiment of this invention useful for mariculture of tunicates in Caribbean mangrove coastal areas, in particular of *E. turbinata*, is shown in Figures 5 to 9. Figure 5 shows a frame for larval capture. The external and internal perimeter are shown in Figure 6. In figure 7 are alternative details using wooden rods or ropes for larval capture collectors. Figure 8 depicts a frame for growth of tunicates. Figure 9 shows alternatively attachment rods or attachment ropes in a detail of a frame for growth of tunicates. Figure 10 shows attachment rods secured to support rods in a detail of the growth units.

For this application, frame structures are used comprising of rectangular arrays of 4 parallel pairs of wooden rods or polymeric plastic rods screwed together as depicted in the drawings. In this fashion, an internal rectangular space is left free for attachment of the growth rods. For applications of larval capture, a frame may be used in which the internal perimeter is positioned between 0 and 50 cm below the external one to insure the attachment rods are kept submerged appropriately. The attachment rods are constructed of wood, plastic tubing or ropes with appropriate fixtures at the ends to fit on hooks on the internal frame and placed horizontally within the internal frame. Growing tunicate colonies attached to an attachment guide or to a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

natural substrate are brought in proximity to the device and allowed to emit larvae. After a while, rods with larvae affixed are released from one end and transferred to a support frame for growth. For growth of preimplanted organisms, the internal perimeter may be in the same plane as the external one, and resting on the surface of the water horizontal support rods transverse the internal frame. Vertical attachment rods or ropes bearing either attached larvae or implanted tunicate colony fragments are placed hanging down from the horizontal ones to allow growth of the tunicates. The rods or ropes can be released at both ends in order to harvest the entire growth of tunicate. Pre-expanded polyurethane slabs are affixed to the space between the external and internal perimeter of the frame for floatation. The whole attachment frame is anchored to heavy weights by means of ropes.

The process followed for cultivation includes an initial seeding followed by a growing phase and harvest.

Adult tunicate colonies can be brought in proximity to the structure, and the larvae emitted as a result of the sexual cycle of these organisms are captured, or allowed to affix themselves to the rods of the structure, favourably when in horizontal position. Alternatively, ropes on which tunicate larvae have been similarly captured are attached to the rods of the support structure. There they take hold, and differentiate into sessile adults, which in turn grow into larger colonies.

Alternatively, for seeding by implants, small fragments (say about 20 gr.) cut off from growing organism such as sponges or tunicate colonies are transported to the attachment structure and affixed to the growth rods by means of rubber bands or any other method that maintains contact between the stolon of the colony and the attachment surface. Alternatively, ropes to which tunicate colony or sponge fragments have been similarly affixed are attached to the rods of the attachment structure. Asexual growth of the organisms gives rise to net mass increase.

Rods or ropes with larvae affixed or with fragments of live adult organism are allowed to adopt a vertical position in which larvae are allowed to grow and form colonies. Asexual growth of the organisms gives rise to net increase of mass of tunicates. A fraction of the colonies initially seeded may be used to provide seed material for the next harvest, while the rest of the growth

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

15

will be collected and stored appropriately.

For harvesting, colonies are cleaned of sediment by means of streams of water, extraneous organisms removed manually if needed and the animals harvested by separating them from the attachment rods, and stored frozen as appropriate.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

CLAIMS

1. A method of producing a marine pharmaceutical by extraction from a sessile marine organism, which method comprises positioning a plurality of like substrates in sea water, growing the organism on the plurality of substrates, harvesting the grown organism, and extracting the pharmaceutical from the harvested organism.
2. A method according to claim 1, wherein the marine organism is *Ecteinascidia turbinata* and the marine pharmaceutical is an ecteinascidin compound.
3. A method according to claim 1, wherein the marine organism is *Aplidium albicans*, and the marine pharmaceutical is a didemnin compound.
4. A method of farming a sessile marine organism intended for extraction of a marine pharmaceutical, which method comprises positioning a plurality of like substrates in sea water, allowing larvae from a colony of the organism to seed the substrates, growing the organism on the plurality of substrates, and harvesting the grown organism.
5. A method according to claim 4, wherein the substrates are placed adjacent the colony.
6. A method according to claim 4, wherein at least one collector comprising a support with substrates is placed adjacent the colony to collect larvae.
7. A method according to claim 6, wherein the collector is transferred to another site for growth of the organism.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

8. A method of farming a sessile marine organism intended for extraction of a marine pharmaceutical, which method comprises positioning a plurality of like substrates in sea water, transplanting the organism onto the substrates, growing the organism on the plurality of substrates, and harvesting the grown organism.
9. A method according to claim 8, wherein individual organisms are transplanted onto the substrates.
10. A method according to claim 8, wherein fragments of organisms are transplanted onto the substrates.
11. A method according to any of claims 8 to 10, wherein the substrates are provided by cables, ropes, meshes, nets, rods, planks, cages, and baskets for direct fixing of the organism.
12. A method according to any of claims 8 to 11, wherein submerged structures comprising the substrates are maintained between bottom anchorage devices and flotation devices.
13. A method according to any of claims 8 to 11, wherein submerged structures comprising the substrates are maintained between sides of a natural or artificial basin.
14. A device for culturing of sessile marine organisms which comprises a support frame and flotation structure, attachment guides, substrates for securing to the attachment guides, a fixation and anchorage system, and optionally a shade.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

15. A device for growing sessile marine organisms on substrates, comprising arrays of vertically extending substrates each attached to a respective one of an array of horizontal attachment guides secured to and supported by a support flotation frame provided with an anchoring system or a mooring system, and optionally having a shade to reduce light incident on the substrates.
16. A device for growing sessile marine organisms on substrates, comprising arrays of substrates forming an attachment and growth structure secured to a support flotation system provided with an anchoring system or a mooring system.
17. A method of growing *Ecteinascidia turbinata* by transplanting fragments of colonies of the organism to a substrate using as substrate and support a device comprising of lengths of an approximately 0.5 to 4 m wide plastic mesh with holes between 2 and 8 cm kept entirely submerged by anchorage to the bottom of a shallow coastal lagoon and held approximately vertically by floatation devices.
18. A method of capturing *Ecteinascidia turbinata* larvae onto 0.2-2 m lengths of ropes or wooden rods using a device comprising of a floating frame, approximately 1-2 m by 3-6 m with a shade onto which the ropes or wooden rods are affixed and maintained horizontally or vertically submerged in the water in proximity to colonies of the organism until larvae attach to them so that adult colonies can later be grown from these ropes or rods so seeded.
19. A method of growing *Ecteinascidia turbinata* by implanting fragments of colonies onto 0.2-2 m lengths of ropes or wooden rods using a device comprising of a floating frame, approximately 1-2 m by 3-6 m with a shade from which the ropes or wooden rods with

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

19

attached colonies can hang vertically submerged in water for growth of the organism.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

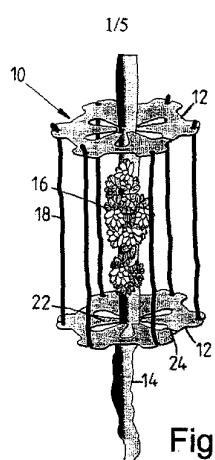


Fig. 1

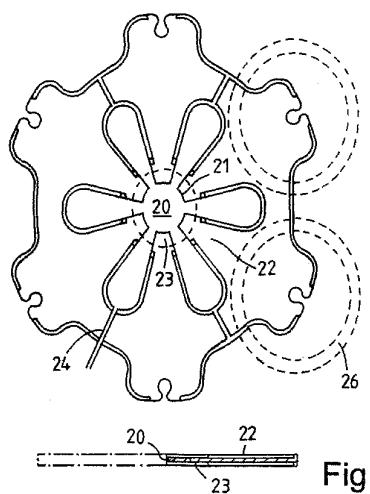


Fig. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

2/5

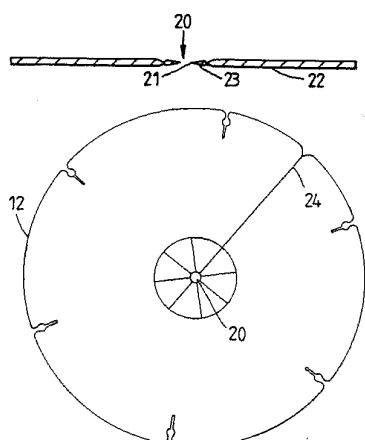


Fig. 3

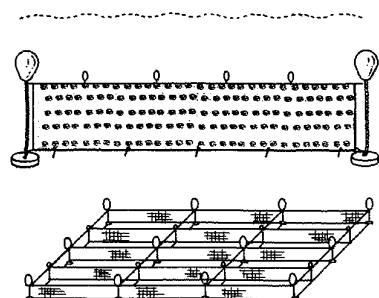


Fig. 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

3/5

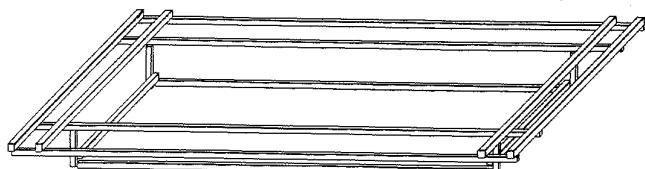


Fig. 5

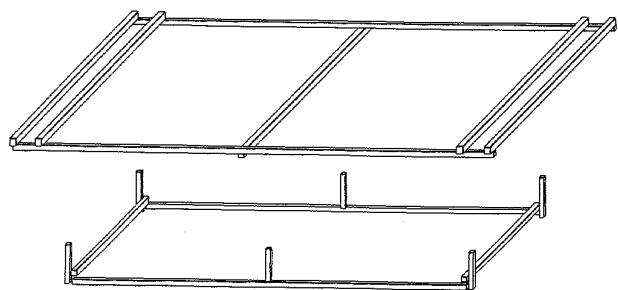


Fig. 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

4/5

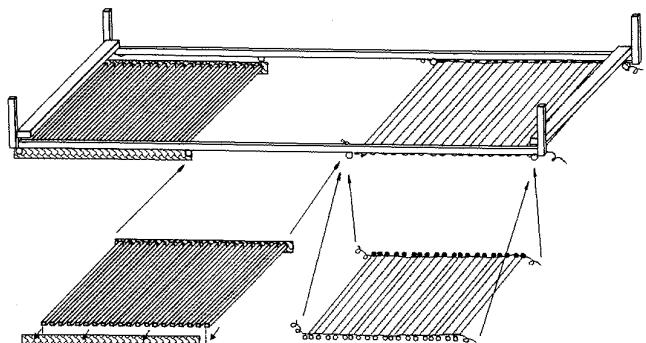


Fig. 7

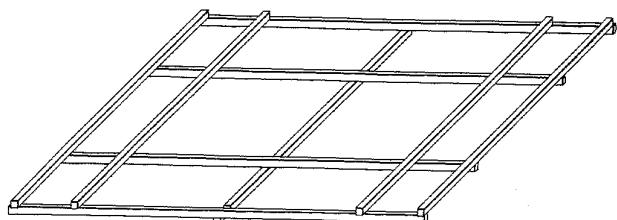


Fig. 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 99/56535

PCT/GB99/01402

5/5

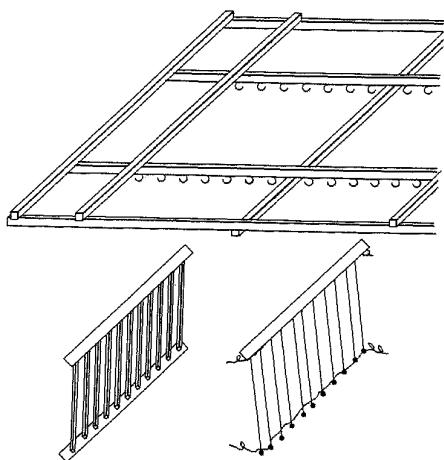


Fig. 9

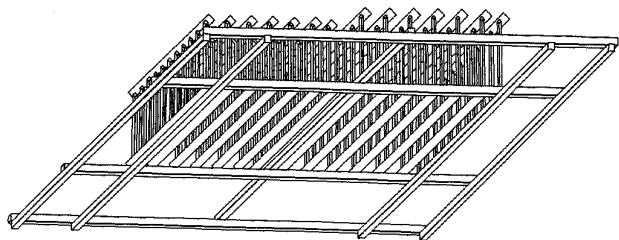


Fig. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		Int. Application No PCT/GB 99/01402
IPC 6 A01K61/00 A01K67/033		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ³	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	FR 2 617 373 A (STREICHENBERGER RODOLPHE) 6 January 1989 (1989-01-06) page 7, line 31 - page 8, line 22 claim 1 ----	1-7, 14-16 8-13, 17-19
P,A	EP 0 860 111 A (PALBOX IND S P A) 26 August 1998 (1998-08-26) the whole document ----	
A	US 3 779 209 A (BUDGE W ET AL) 18 December 1973 (1973-12-18) column 1, line 47 - column 2, line 18 claims ----	
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'E' earlier document but published on or after the international filing date		
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search		Date of mailing of the international search report
6 August 1999		13/08/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Claudel, B

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l. Search Application No PCT/GB 99/01402
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 628 280 A (ERICSSON JOHN D) 13 May 1997 (1997-05-13) claim 15 -----	
L	US 5 089 273 A (RINEHART KENNETH L ET AL) 18 February 1992 (1992-02-18) column 4, line 1 - line 5 column 4, line 26 - line 37 -----	
3		

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Appl. No.
PCT/GB 99/01402

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2617373 A	06-01-1989	US 4872782 A US 4950104 A	10-10-1989 21-08-1990
EP 0860111 A	26-08-1998	IT 85970015 A HR 980083 A	20-08-1998 31-10-1998
US 3779209 A	18-12-1973	FR 2095678 A GB 1289068 A US 3638615 A	11-02-1972 13-09-1972 01-02-1972
US 5628280 A	13-05-1997	US 5438958 A	08-08-1995
US 5089273 A	18-02-1992	US 5256663 A AT 69234 T AU 589282 B AU 7581987 A DE 3774435 A EP 0309477 A FI 885726 A JP 2562162 B JP 1502749 T WO 8707610 A	26-10-1993 15-11-1991 05-10-1989 11-01-1988 12-12-1991 05-04-1989 09-12-1988 11-12-1996 21-09-1989 17-12-1987

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ククルトク タルゴタイ、ブレント

スペイン国マドリッド, トレス カントス, ポリゴノインダストリアル ド トレス カントス,
カルレ ド ラ カレラ 3, ファーマ マー, ソシエダッド アノニマ内

(72)発明者 ナランジョ ロザノ、サンチアゴ

スペイン国マドリッド, トレス カントス, ポリゴノインダストリアル ド トレス カントス,
カルレ ド ラ カレラ 3, ファーマ マー, ソシエダッド アノニマ内

(72)発明者 バルベロ ガルシア、カルロス

スペイン国マドリッド, トレス カントス, ポリゴノインダストリアル ド トレス カントス,
カルレ ド ラ カレラ 3, ファーマ マー, ソシエダッド アノニマ内

(72)発明者 マルチン ベニテズ、シルビア

スペイン国マドリッド, トレス カントス, ポリゴノインダストリアル ド トレス カントス,
カルレ ド ラ カレラ 3, ファーマ マー, ソシエダッド アノニマ内

F ターム(参考) 2B104 AA38 BA06 CC06

4C087 AA01 AA03 BB27 NA20 ZB26