



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0125295
(43) 공개일자 2022년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A23C 9/00 (2022.01)
C12M 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0631 (2013.01)
A23C 9/00 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-7027016
(22) 출원일자(국제) 2020년12월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/066209
(87) 국제공개번호 WO 2021/141762
국제공개일자 2021년07월15일
(30) 우선권주장
62/958,407 2020년01월08일 미국(US)
63/199,164 2020년12월10일 미국(US)

(71) 출원인
바이오밀크, 인크.
미국 27709 노스캐롤라이나주 더럼 레보터리 드라
이브 5 스위트 2250
(72) 발명자
스트릭랜드 라일라
미국 27709 노스캐롤라이나주 더럼 레보터리 드라
이브 5 스위트 2250
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 배양 유제품의 생산을 위한 생세포 구축물 및 이것을 사용하는 방법

(57) 요약

본 발명은 유방 세포로부터의 배양 유제품의 시험관내 및/또는 생체외 생산을 위한 생세포 구축물, 유방 세포로부터, 단리된 배양 유제품을 생산하는 방법, 단리된 배양 유제품의 생산을 위한 생물반응기, 및 배양 유제품에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12M 21/00 (2013.01)

C12N 2500/02 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2523/00 (2013.01)

C12N 2533/52 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

C12N 2533/72 (2013.01)

C12N 2533/74 (2013.01)

C12N 2533/90 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

생세포 구축물로서,

(a) 외면, 내부 공동/기저 챔버를 획정하는 내면, 및 내면으로부터 외면으로 연장되는 복수의 세공을 가진 삼차원 스캐폴드;

(b) 삼차원 스캐폴드의 외면 상에 배치된 매트릭스 물질;

(c) 내부 공동/기저 챔버 내에 배치되고 내면과 유체 접촉하는 배양 배지; 및

(d) 매트릭스 물질 상에 배치된 분극화된 유방 세포의 적어도 70% 합류 단층으로서, 유방 세포는 살아있는 일차 유방 상피 세포, 살아있는 유방 근상피 세포, 살아있는 유방 전구 세포, 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포, 살아있는 불멸화된 유방 근상피 세포, 및 살아있는 불멸화된 유방 전구 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 상기 단층

을 포함하는 생세포 구축물.

청구항 2

제1항에 있어서, 분극화된 유방 세포는 선단면 및 기저면을 포함하는 것인 생세포 구축물.

청구항 3

제2항에 있어서, 유방 세포의 기저면은 배양 배지와 유체 접촉하는 것인 생세포 구축물.

청구항 4

제1항에 있어서, 유방 세포의 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100%가 동일한 방향으로 분극화되는 것인 생세포 구축물.

청구항 5

제1항에 있어서, 분극화된 유방 세포의 단층은 적어도 70% 합류, 적어도 80% 합류, 적어도 90% 합류, 적어도 95% 합류, 적어도 99% 합류, 또는 100% 합류인 생세포 구축물.

청구항 6

제1항에 있어서, 유방 세포는 구성적으로 활성인 프로락틴 수용체 단백질을 포함하는 것인 생세포 구축물.

청구항 7

제1항에 있어서, 배양 배지는 탄소원, 화학적 완충 시스템, 하나 이상의 필수 아미노산, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자, 및 하나 이상의 무기 염을 포함하는 것인 생세포 구축물.

청구항 8

제7항에 있어서, 배양 배지는 프로락틴을 추가로 포함하는 것인 생세포 구축물.

청구항 9

제1항에 있어서, 매트릭스 물질은 하나 이상의 세포외 기질 단백질을 포함하는 것인 생세포 구축물.

청구항 10

제1항에 있어서, 삼차원 스캐폴드는 천연 폴리머, 생체적합성 합성 폴리머, 합성 펩타이드, 전술한 어느 것으로부터 유래된 복합물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인 생세포 구축물.

청구항 11

제10항에 있어서, 천연 폴리머는 콜라겐, 키토산, 셀룰로스, 아가로스, 알긴산염, 젤라틴, 엘라스틴, 헤파란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 및/또는 히알루론산인 생세포 구축물.

청구항 12

제10항에 있어서, 생체적합성 합성 폴리머는 폴리설푼, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리에틸렌 코-비닐 아세테이트, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산 나트륨, 아크릴레이트 폴리머, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜인 생세포 구축물.

청구항 13

유방 세포로부터 단리된 배양 유제품을 생산하는 방법으로서,

(a) 생세포 구축물을 생물반응기에서 배양 유제품을 생산하는 조건 하에 배양하는 단계로서, 상기 생세포 구축물은

(i) 외면, 내부 공동/기저 챔버를 획정하는 내면, 및 내면으로부터 외면으로 연장되는 복수의 세공을 가진 삼차원 스캐폴드;

(ii) 삼차원 스캐폴드의 외면 상에 배치된 매트릭스 물질;

(iii) 내부 공동/기저 챔버 내에 배치되고 내면과 유체 접촉하는 배양 배지; 및

(iv) 매트릭스 물질 상에 배치된 분극화된 유방 세포의 적어도 70% 함유 단층으로서, 유방 세포는 살아있는 일차 유방 상피 세포, 살아있는 유방 근상피 세포, 살아있는 유방 전구 세포, 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포, 살아있는 불멸화된 유방 근상피 세포, 및 살아있는 불멸화된 유방 전구 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 상기 단층

을 포함하는 것인 단계; 및

(b) 배양 유제품을 단리하는 단계

를 포함하는, 유방 세포로부터 단리된 배양 유제품을 생산하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 분극화된 유방 세포는 선단면 및 기저면을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 유방 세포의 기저면은 배양 배지와 유체 접촉하는 것인 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 생물반응기는 폐쇄형 생물반응기인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 생물반응기는, 생세포 구축물의 내부 공동/기저 챔버로부터 실질적으로 분리된 선단 구획을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 선단 구획은 유방 세포의 선단면과 유체 접촉하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 배양 유제품은 유방 세포의 선단면으로부터 선단 구획으로 분비되는 것인 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 배양 배지는 배양 유제품과 실질적으로 접촉하지 않는 것인 방법.

청구항 21

제13항에 있어서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 세포 밀도는 적어도 10^{11} 인 방법.

청구항 22

제13항에 있어서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 1.5 m^2 인 방법.

청구항 23

제13항에 있어서, 배양 배지는 탄소원, 화학적 완충 시스템, 하나 이상의 필수 아미노산, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자, 및 하나 이상의 무기 염을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제13항에 있어서, 매트릭스 물질은 하나 이상의 세포의 기질 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제13항에 있어서, 스캐폴드는 천연 폴리머, 생체적합성 합성 폴리머, 합성 펩타이드, 전술한 어느 것으로부터 유래된 복합물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 천연 폴리머는 콜라겐, 키토산, 셀룰로스, 아가로스, 알긴산염, 젤라틴, 엘라스틴, 헤파란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 및/또는 히알루론산인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 생체적합성 합성 폴리머는 폴리설폰, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리에틸렌 코-비닐 아세테이트, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산 나트륨, 아크릴레이트 폴리머, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜인 방법.

청구항 28

제13항에 있어서, 배양은 약 27°C 내지 약 39°C 의 온도에서 수행되는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 배양은 약 30°C 내지 약 37°C 의 온도에서 수행되는 것인 방법.

청구항 30

제13항에 있어서, 배양은 약 4% 내지 약 6%의 CO_2 의 대기 농도에서 수행되는 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 배양은 약 5%의 CO_2 의 대기 농도에서 수행되는 것인 방법.

청구항 32

생물반응기로서,

(a) 배양 유제품을 포함하는 선단 구획; 및

(b) (i) 외면, 내부 공동/기저 챔버를 획정하는 내면, 및 내면으로부터 외면으로 연장되는 복수의 세공을 가진 삼차원 스캐폴드;

(ii) 삼차원 스캐폴드의 외면 상에 배치된 매트릭스 물질;

(iii) 내부 공동/기저 챔버 내에 배치되고 내면과 유체 접촉하는 배양 배지; 및

(iv) 매트릭스 물질 상에 배치된 분극화된 유방 세포의 적어도 70% 합류 단층으로서, 유방 세포는 살아있는 일차 유방 상피 세포, 살아있는 유방 근상피 세포, 살아있는 유방 전구 세포, 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포, 살아있는 불멸화된 유방 근상피 세포, 및 살아있는 불멸화된 유방 전구 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 상기 단층

을 포함하는 적어도 하나의 생세포 구축물

을 포함하며, 유방 세포의 선단면은 선단 구획과 유체 접촉하는, 생물반응기.

청구항 33

제32항에 있어서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 세포 밀도는 적어도 10^{11} 인 생물반응기.

청구항 34

제32항에 있어서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 1.5 m^2 인 생물반응기.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 1월 8일에 출원된 미국 가출원 번호 62/958,407, 및 2020년 12월 10일에 출원된 미국 가출원 번호 63/199,164로부터의 우선권의 이익을 주장하며, 상기 각각의 내용은 그 전문이 참조로 본원에 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 배양된 유방 세포(mammary cell)로부터 배양 유제품의 시험관내 및/또는 생체의 생산을 위한 생세포 구축물 및 이것을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 밀크는 유아기 동안과 평생에 걸쳐 인간 식단의 주식이다. 미국소아과학회 및 세계보건기구는 유아는 생후 6개월 동안 전적으로 모유수유할 것을 권장하며, 유아기 이후의 유제품 소비는 전세계적으로 7000억 달러 산업을 대표하는, 인간 영양의 주류이다. 그러나, 수유는 생리적으로 힘들고 모유수유를 하는 엄마들에게 생물학적 및 실제적 문제를 제시할 수 있는 대사적으로 집약적인 과정이며, 밀크 생산은 농업적 맥락에서 환경, 사회적 및 동물 복지 영향과 관련이 있다.

[0006] 식품을 생산하기 위해 포유류 세포 배양을 사용할 가능성은 최근 몇 년 동안, 배양된 근육 및 지방 세포로부터 육류 및 해산물 제품의 여러 성공적인 프로토타입이 개발되면서 관심이 증가하고 있다(Stephens et al. 2018 *Trends Food Sci Technol.* 78:155-166). 추가적으로, 미생물 발현 시스템을 사용하는 난(egg) 및 밀크 단백질의 생산을 상업화하려는 노력이 진행 중이다. 그러나, 이런 발효 기반 과정은 유전자 조작된 발현 및 개별적인 성분의 정제에 의존하며 밀크 또는 유제품의 전체적인 분자 프로파일을 재현할 수 없다.

[0007] 본 발명은 배양된 유방 세포로부터 배양 유제품의 시험관내 및/또는 생체의 생산을 위한 생세포 구축물 및 이것을 사용하는 방법을 제공함으로써 기술분야의 단점을 극복한다.

발명의 내용

[0008] 본원의 특정 구현예에서, (a) 외면, 내부 공동(cavity)/기저 챔버를 획정하는 내면, 및 내면으로부터 외면으로 연장되는 복수의 세공(pores)을 가진 삼차원 스캐폴드; (b) 삼차원 스캐폴드의 외면 상에 배치된 매트릭스 물질; (c) 내부 공동/기저 챔버 내에 배치되고 내면과 유체 접촉하는 배양 배지; 및 (d) 매트릭스 물질 상에 배치된 분극화된(polarized) 유방 세포의 적어도 70% 합류 단층을 포함하는 생세포 구축물이 개시되며, 유방 세포는 살아있는 일차 유방 상피 세포, 살아있는 유방 근상피 세포, 살아있는 유방 전구 세포, 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포, 살아있는 불멸화된 유방 근상피 세포, 및 살아있는 불멸화된 유방 전구 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 분극화된 유방 세포는 선단면(apical surface) 및 기저면(basal surface)을 포함한다. 일부 구현예에서, 유방 세포의 기저면은 배양 배지와 유체 접촉한다. 일부 구현예에서, 유방 세포의

적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100%가 동일한 방향으로 분극화된다. 일부 구현예에서, 분극화된 유방 세포의 단층은 적어도 70% 합류, 적어도 80% 합류, 적어도 90% 합류, 적어도 95% 합류, 적어도 99% 합류, 또는 100% 합류이다. 일부 구현예에서, 유방 세포는 구성적으로 활성인 프로락틴 수용체 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 탄소원, 화학적 완충 시스템, 하나 이상의 필수 아미노산, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자, 및 하나 이상의 무기 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 추가로 프로락틴을 포함한다. 일부 구현예에서, 매트릭스 물질은 하나 이상의 세포의 기질 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 삼차원 스캐폴드는 천연 폴리머, 생체적합성 합성 폴리머, 합성 펩타이드, 전술한 어느 것으로부터 유래된 복합물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 천연 폴리머는 콜라겐, 키토산, 셀룰로스, 아가로스, 알긴산염, 젤라틴, 엘라스틴, 헤파란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 및/또는 히알루론산이다. 일부 구현예에서, 생체적합성 합성 폴리머는 폴리설폰, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리에틸렌 코-비닐 아세테이트, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산 나트륨, 아크릴레이트 폴리머, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0009] 본원의 특정 구현예에서, 유방 세포로부터 단리된 배양 유제품을 제조하는 방법이 개시되며, 방법은 (a) 생세포 구축물을 생물반응기에서 배양 유제품을 생산하는 조건 하에 배양하는 단계로서, 상기 생세포 구축물은: (i) 외면, 내부 공동/기저 챔버를 획정하는 내면, 및 내면으로부터 외면으로 연장되는 복수의 세공을 가진 삼차원 스캐폴드; (ii) 삼차원 스캐폴드의 외면 상에 배치된 매트릭스 물질; (iii) 내부 공동/기저 챔버 내에 배치되고 내면과 유체 접촉하는 배양 배지; 및 (iv) 매트릭스 물질 상에 배치된 분극화된 유방 세포의 적어도 70% 합류 단층을 포함하며, 유방 세포는 살아있는 일차 유방 상피 세포, 살아있는 유방 근상피 세포, 살아있는 유방 전구 세포, 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포, 살아있는 불멸화된 유방 근상피 세포, 및 살아있는 불멸화된 유방 전구 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단계; 및 (b) 배양 유제품을 단리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 분극화된 유방 세포는 선단면 및 기저면을 포함한다. 일부 구현예에서, 유방 세포의 기저면은 배양 배지와 유체 접촉한다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 폐쇄형 생물반응기이다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 실질적으로 생세포 구축물의 내부 공동/기저 챔버로부터 분리된 선단 구획(apical compartment)을 포함한다. 일부 구현예에서, 선단 구획은 유방 세포의 선단면과 유체 접촉한다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 유방 세포의 선단면으로부터 선단 구획으로 분비된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 실질적으로 배양 유제품과 접촉하지 않는다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 세포 밀도는 적어도 10^{11} 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 1.5m^2 이다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 탄소원, 화학적 완충 시스템, 하나 이상의 필수 아미노산, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자, 및 하나 이상의 무기 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 매트릭스 물질은 하나 이상의 세포의 기질 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 천연 폴리머, 생체적합성 합성 폴리머, 합성 펩타이드, 전술한 어느 것으로부터 유래된 복합물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 천연 폴리머는 콜라겐, 키토산, 셀룰로스, 아가로스, 알긴산염, 젤라틴, 엘라스틴, 헤파란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 및/또는 히알루론산이다. 일부 구현예에서, 생체적합성 합성 폴리머는 폴리설폰, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리에틸렌 코-비닐 아세테이트, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산 나트륨, 아크릴레이트 폴리머, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜이다. 일부 구현예에서, 배양은 약 27°C 내지 약 39°C 의 온도에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양은 약 30°C 내지 약 37°C 의 온도에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양은 약 4% 내지 약 6%의 CO_2 의 대기 농도에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양은 약 5%의 CO_2 의 대기 농도에서 수행된다.

[0010] 본원의 특정 구현예에서, (a) 배양 유제품을 포함하는 선단 구획; 및 (b) (i) 외면, 내부 공동/기저 챔버를 획정하는 내면, 및 내면으로부터 외면으로 연장되는 복수의 세공을 가진 삼차원 스캐폴드; (ii) 삼차원 스캐폴드의 외면 상에 배치된 매트릭스 물질; (iii) 내부 공동/기저 챔버 내에 배치되고 내면과 유체 접촉하는 배양 배지; 및 (iv) 매트릭스 물질 상에 배치된 분극화된 유방 세포의 적어도 70% 합류 단층을 포함하는 적어도 하나의 생세포 구축물을 포함하는 생물반응기가 개시되며, 여기서 유방 세포는 살아있는 일차 유방 상피 세포, 살아있는 유방 근상피 세포, 살아있는 유방 전구 세포, 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포, 살아있는 불멸화된 유방 근상피 세포, 및 살아있는 불멸화된 유방 전구 세포로 이루어진 군으로부터 선택되고; 유방 세포의 선단면은 선단 구획과 유체 접촉한다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 세포 밀도는 적어도 10^{11} 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 1.5m^2 이다.

[0011] 본원의 특정 구현예에서, 세포의 공급 및 배양 유제품의 분비를 구축화하는 유방 세포를 포함하는 생세포 구축

물이 개시된다.

- [0012] 본원의 특정 구현예에서, 상부면 및 바닥면을 가진 스캐폴드; 및 (a) 살아있는 일차 유방 상피 세포, (b) 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단, 및/또는 (c) 스캐폴드의 상부면 상의 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 단층, (a) 살아있는 일차 유방 상피 세포, (b) 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단, 및/또는 (c) 선단면 및 기저면을 가진 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 단층(예컨대, 세포는 분극화되고 합류하는 세포 단층을 형성함)을 포함하는 생세포 구축물이 개시되며, 구축물은 (a) 살아있는 일차 유방 상피 세포, (b) 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단, 및/또는 (c) 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 단층의 선단면 위에 인접한 선단 구획 및 스캐폴드의 바닥면 아래에 인접한 기저 구획을 포함한다.
- [0013] 본원의 특정 구현예에서, 배양물에서 밀크를 생산하는 방법이 개시되며, 방법은 본 발명의 생세포 구축물을 배양하고, 그로써 배양물에서 밀크를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0014] 본원의 특정 구현예에서, 배양물에서 밀크를 생산하기 위한 생세포 구축물의 제조 방법이 개시되며, 방법은 (a) 유방 조직(예컨대, 가슴, 유방, 유두 조직), 생검 샘플, 또는 생모유로부터의 유방 외식편으로부터 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포 및/또는 유방 전구 세포를 분리하여 분리된 유방 상피 세포, 근상피 세포 및 유방 전구 세포를 생산하는 단계; (b) 분리된 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포 및 유방 전구 세포를 배양하여 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단을 생산하는 단계; (c) (b)의 혼합 집단을 상부면 및 하부면을 가진 스캐폴드 상에서 배양하여, 스캐폴드의 상부면 상에 혼합 집단의 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 분극화된, 연속(즉, 합류) 단층을 생성하는 단계로서, 분극화된 연속 단층은 선단면 및 기저면을 포함하며, 그로써 배양물에서 밀크를 생산하기 위한 생세포 구축물이 제조되는 단계를 포함한다.
- [0015] 본원의 특정 구현예에서, 배양물에서 밀크를 생산하기 위한 생세포 구축물의 제조 방법이 개시되며, 방법은 (a) 유방 조직(예컨대, 가슴, 유방, 유두 조직), 생검 샘플, 또는 생모유로부터의 유방 외식편으로부터 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포 및/또는 유방 전구 세포를 분리하여 분리된 유방 상피 세포, 근상피 세포 및/또는 유방 전구 세포를 생산하는 단계; (b) 분리된 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포, 및/또는 유방 전구 세포를 배양하여 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단을 생산하는 단계; (c) 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포, 및/또는 유방 전구 세포의 혼합 집단을 분류(sort)하여 일차 유방 상피 세포의 집단을 생성하는 단계; 및 (d) 일차 유방 상피 세포의 집단을 상부면 및 하부면을 가진 스캐폴드 상에서 배양하여, 스캐폴드의 상부면 상에 일차 유방 상피 세포의 분극화된, 연속(즉, 합류) 단층을 생성하는 단계로서, 분극화된 연속 단층은 선단면 및 기저면을 포함하며, 그로써 배양물에서 밀크를 생산하기 위한 생세포 구축물이 제조되는 단계를 포함한다.
- [0016] 본원의 특정 구현예에서, 배양물에서 밀크를 생산하기 위한 생세포 구축물의 제조 방법이 개시되며, 방법은 (a) 불멸화된 유방 상피 세포를 배양하여 증가된 수의 불멸화된 유방 상피 세포를 생산하는 단계; (b) (a)의 불멸화된 유방 상피 세포를 상부면 및 하부면을 가진 스캐폴드 상에서 배양하여, 스캐폴드의 상부면 상에 불멸화된 유방 상피 세포의 분극화된, 연속(즉, 합류) 단층을 생성하는 단계로서, 분극화된 연속 단층은 선단면 및 기저면을 포함하며, 그로써 배양물에서 밀크를 생산하기 위한 생세포 구축물이 제조되는 단계를 포함한다.
- [0017] 본원의 특정 구현예에서, (a) 상부면 및 하부면을 포함하는 스캐폴드 및 선단면 및 기저면을 가지는, 살아있는 일차 유방 상피 세포의 연속(즉, 합류) 분극화된 단층, 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단의 연속 분극화된 단층, 및/또는 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층, 여기서 살아있는 일차 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층, 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단의 연속 분극화된 단층 및/또는 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층은 스캐폴드의 하부면 상에 위치하는 것인 단층, (b) 기저 구획 및 선단 구획을 포함하는 생세포 구축물을 배양하는 단계를 포함하는, 배양물에서 밀크를 생산하는 방법이 개시되며, 여기서 스캐폴드의 하부면은 기저 구획에 인접하고 살아있는 일차 유방 상피 세포의 단층, 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단의 단층, 및/또는 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층의 선단면은 선단 구획에 인접하며, 살아있는 일차 상피 유방 세포의 단층, 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단의 단층의 살아있는 일차 상피 유방 세포, 또는 불멸화된 유방 상피 세포의 단층은 그것의 선단면을 통해 선단 구획으로 밀크를 분비함으로써 배양물에서 밀크를 생산한다.
- [0018] 본원의 특정 구현예에서, 변형된 일차 유방 상피 세포 또는 불멸화된 유방 상피 세포의 생산 방법이 개시되며,

방법은 (a) 변형된 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 프로락틴 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 선택적으로 프로락틴 수용체는 엑손 10의 위치 154가 엑손 11의 3' 서열에 스플라이싱되어 있는 트랜잭션을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드; (b) 프로락틴의 부재 시에 밀크 합성을 활성화할 수 있는, 리간드에 결합하는 키메라 프로락틴 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드; (c) 활성 프로락틴 수용체 단백질을 구성적으로 또는 조건부로 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 선택적으로 폴리뉴클레오타이드는 아미노산 9에서 187까지의 결실을 포함하는 구성적으로 활성인 인간 프로락틴 수용체 단백질을 암호화하는 것인 폴리뉴클레오타이드; (d) (i) STAT5 티로신 키나제 도메인에 융합된 JAK2 티로신 키나제 도메인; 및/또는 (ii) JAK2 티로신 키나제 도메인에 융합된 프로락틴 수용체 세포내 도메인을 포함하는 프로락틴 단백질의 변형된(재조합) 이펙터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드; (e) 개일(circadian) 관련 유전자 *PER2*(주기 개일 단백질 상동체 2)로의 기능 상실 돌연변이; 및/또는 (f) 하나 이상의 글루코스 수송 유전자 *GLUT1* 및/또는 *GLUT12*를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 세포에 도입함으로써, 변형된 일차 유방 상피 세포 또는 불멸화된 유방 상피 세포의 세포 단층의 기저면에서 영양소 흡수율을 증가시키는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0019]

도 1은 구획화 배양 장치에서 합류 단층으로서 성장된 유방 상피 세포로부터 영양적 사용을 위한 밀크 수집의 예를 도시하며 장치에서 신선한 또는 재활용 배지가 기저 구획에 제공되고 밀크가 선단 구획으로부터 수집된다. TEER, 경상피 전기 저항.

도 2는 기저면에서 스캐폴드에 고정된 유방 상피 세포의 합류 단층을 가로지르는 영양소의 분극화된 흡수 및 밀크의 분비의 예를 도시한다.

도 3은 유방 상피 세포의 합류 단층에 의해 영양소의 구획화된 흡수 및 밀크 분비를 위한 증가된 표면적을 제공하는 예시의 미세패턴 스캐폴드를 도시한다.

도 4는 모세관의 외부(좌측 위 및 아래) 또는 내부(우측 아래) 표면을 감싸고 있는 유방 상피 세포를 지지하여 지향적이고 구획화된 영양소 흡수 및 밀크의 분비를 제공할 수 있는, 모세관 다발로서 묘사된 중공 섬유 생물반응기의 3가지 예를 도시한다.

도 5는 삼차원 생세포 구축물의 단면을 예시한다. 구축물은 내부 공동/기저 챔버를 획정하는 내면 및 외면을 가지는 스캐폴드로 구성된다. 내부 공동/기저 챔버는 세포 배양 배지를 포함한다. 매트릭스 물질은 스캐폴드의 외면 위에 있다. 세포가 스캐폴드를 내면으로부터 외면으로 가로질러서, 세포 배지가 매트릭스 물질 위에 배치된 세포 단층의 세포의 기저면과 접촉할 수 있게 한다.

도 6은 배양 유제품을 생산하기 위한 생물반응기의 예시한다. 생물반응기는 생세포 구축물 및 선단 챔버(apical chamber)로 구성된다. 세포 구축물은 내부 공동/기저 챔버를 획정하는 내면 및 외면을 가진 스캐폴드로 구성된다. 공동은 세포 배양 배지를 포함한다. 매트릭스 물질은 스캐폴드의 외면 위에 있다. 세포는 스캐폴드를 내면으로부터 외면으로 가로질러서, 세포 배지가 매트릭스 물질 위에 배치된 세포 단층의 세포의 기저면과 접촉할 수 있게 한다. 세포 단층의 세포의 선단면은 밀크/배양 유제품을 선단 챔버로 분비한다. 선단 챔버 및 내부 공동/기저 챔버는 세포 단층에 의해 분리된다.

도 7은 생세포 구축물을 예시한다. 구축물은 내부 공동/기저 챔버를 획정하는 내면 및 외면을 가진 스캐폴드로 구성된다. 내부 공동/기저 챔버는 세포 배양 배지를 포함한다. 매트릭스 물질은 스캐폴드의 외면 위에 있다. 세포는 스캐폴드를 내면으로부터 외면으로 가로질러서, 세포 배지가 매트릭스 물질 위에 배치된 세포 단층의 세포의 기저면과 접촉할 수 있게 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

밀크는 포유류의 유선에서 생산되는 영양소가 풍부한 유동식이다. 그것은 유아 포유류(모유수유하는 인간을 포함함)가 다른 유형의 식품을 소화할 수 있기 전에 주요 영양 공급원이다. 인유(human milk)는 단순한 영양이 아니다. 오히려, 인유는 유아 생존 및 건강에서 중심 역할을 하는 생리활성 특성을 가진 다양한 인자를 함유한다. 천연 밀크는 단백질, 지질, 다당류 및 락토스를 포함한 많은 다른 다량영양소를 함유한다. 밀크 소비는 2개의 뚜렷한 전체 유형으로 발생한다: 모든 유아 포유류를 위한 천연 영양 공급원 및 식품.

[0021]

거의 모든 포유류에서, 밀크는 모유수유를 통해, 직접적으로 또는 보관하였다가 나중에 먹이도록 젖을 착유함으로써 유아에게 공급된다. 포유류로부터의 초유는 영양소 및 성장 인자뿐만 아니라 신생아에게 보호를 제공하는

항체를 함유한다. 모유는 균일하고, 변하지 않으며, 일정한, 공장에서 만들어진 제품이 아니다; 오히려, 그것은 유전자형, 표현형, 및 식단이 현저하게 다른 여성들에 의해 생산된 생물학적 제품이다. 복잡성을 더하자면, 모유의 조성은 무수히 많은 산모, 유아, 및 환경 인자에 의해 영향을 받는다. 모유는 풍부한 배열의 단백질, 탄수화물, 지질, 지방산, 미네랄, 및 비타민을 함유하지만, 질환과 싸우는 잠재력의 대부분은 과다한 항체, 백혈구, 호르몬, 항미생물 펩타이드, 사이토카인, 케모카인, 및 기타 생리활성 인자에서 비롯된다.

[0022] 배양 중의 유방 상피 세포(MEC)는 생체내에서 관찰된 것과 유사한 조직 및 행동을 나타내는 것으로 이전에 입증되었다(Arevalo et al. 2016 *Am J Physiol Cell Physiol.* 310(5):C348-3 56; Chen et al. 2019 *Curr Protoc Cell Biol.* 82(1):e65). Arevalo 등의 문헌에서, MEC 집단의 특정 바이오마커가 부착성 2D 플레이트, 초저 부착 표면 3D 마이크로플레이트, 및 매트릭젤로 코팅된 3D 플레이트 상에서 배양된 불멸화된 유방 상피 세포(BME-UV1) 및 불멸화된 유방 폐포 세포(MAC-T)에서 검출되었다. 추가적으로, Chen 등의 문헌에서, 인간 유방 조직으로부터 인간 일차 유방 상피 줄기/전구 세포의 분리 및 배양 및 젤라틴 스폰지 및 매트릭젤 매트릭스 상에서의 3D 오가노이드 배양(organoid culture)을 사용하는 맘모스피어(mammosphere)의 후속적인 생성을 위한 프로토콜이 상세하게 기술되어 있다. 그러나, Arevalo 또는 Chen 중 누구도 이들 MEC 배양으로부터 밀크의 생산을 자극하려는 시도를 하지 않았다.

[0023] 특히, 적절한 세포의 매트릭스 상에서 성장되고 프로락틴으로 자극되었을 때, 배양된 유방 상피 세포는 특정 밀크 성분을 분비할 수 있는 구조로 분극화하고 조직화된다(Blatchford et al. 1999 *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* 10:141-145). Blatchford 등의 문헌에서, 소의 MEC는 분극화되고 맘모스피어를 형성하였다. 카제인 및 부티로필린이 배양물로부터 분리되었다. 그러나, 세포는 하나의 균일한 방향으로 분극화하지 않았다. Blatchford 등은 밀크 단백질이 세포 사이에 분포하였고 맘모스피어 전체에 분산된 것을 주지하였다. 균일한 분극화 방향의 결핍으로 인해, Blatchford는 배양 배지로부터 분비된 단백질을 분리하지 못하였다.

[0024] 나아가, Blatchford 등에서 사용된 것과 같은 시험관내 이차원 모델은 낮은 표면적 대 부피 비(저밀도 방식)를 제공한다. 세포 부착에 이용할 수 있는 표면적은 성장할 수 있는 세포의 수를 제한한다.

[0025] 고밀도 방식으로 마우스 유방 상피 세포를 배양하기 위해 유일하게 알려져 있는 시도, 예컨대 중공 섬유 생물반응기는 배양 유제품의 생산 및 추출에 필요한 구획화를 이루지 못하였다(Sharfstein et al. 1992 *Biotechnology and Bioengineering* 40:672-680). Sharfstein 등에서는, COMMA-1D(불멸화된 마우스 유방 상피 세포주)의 성장, 기능성 분화의 장기간 발현, 및 대사가 2가지 상이한 시스템: 확장된 배치 배양 및 중공 섬유 반응기 배양에서 조사되었다. Costar Transwell® 폴리카보네이트 막 세포 배양 삽입물 상에 시딩된 COMMA-1D를 사용하여, Sharfstein 등은 글루코스 및 락테이트의 구배를 유지하는 선단 및 기저 측면 사이에서 장벽 형성 및 분극화된 대사를 할 수 있는 합류 단층을 생성하였다. 그러나, 중공 섬유 생물반응기 배양을 사용하여, Sharfstein 등은 기저 및 선단 구획의 분리를 이룰 수 없었다. 나아가, 영양소 흡수가 중공 섬유 배양에서 분극화되었는지를 측정하지 못하였다(Sharfstein et al. 1992). 중요한 것은, 인간 또는 다른 영양적으로 관련된 종으로부터 유방 상피 세포를 고밀도, 삼차원, 구획화 방식으로 배양할 수 있는 선행 작업이 없었다는 것이다.

[0026] 본원의 특정 구현예에서, 생세포 구축물, 그것의 제조 방법, 및 배양된 유방 세포로부터 배양 유제품의 시험관내 및/또는 생체의 생산을 위한 이것의 사용 방법이 개시된다.

[0027] 본 설명은 발명이 실행될 수 있는 모든 상이한 방법, 또는 본 발명에 첨가될 수 있는 모든 특징의 상세한 카탈로그인 것으로 의도되지 않는다. 예를 들어, 한 구현예와 관련하여 예시된 특징은 다른 구현예에 포함될 수 있고, 특정 구현예와 관련하여 예시된 특징은 그 구현예로부터 삭제될 수 있다. 더불어, 본원에 제시된 다양한 구현예에 대한 수많은 변형 및 첨가가 본 발명으로부터 벗어나지 않는 본 개시의 면에서 기술분야에 숙련된 사람들에게 분명할 것이다. 그러므로, 다음의 명세서는 발명의 일부 특별한 구현예를 예시하려고 의도되며, 그것들의 모든 순열, 조합 및 변형을 철저하게 명시하는 것은 아니다.

[0028] 맥락이 다른 것을 나타내지 않는 한, 본원에서 기술된 다양한 특징은 구체적으로 임의의 조합으로 사용될 수 있는 것으로 의도된다. 더욱이 일부 구현예에서, 본원에 제시된 임의의 특징 또는 특징의 조합은 배제되거나 생략될 수 있다. 예시하자면, 만약 명세서가 복합체가 성분 A, B 및 C를 포함한다고 나타낸다면, 그것은 구체적으로 A, B 또는 C, 또는 그것들의 조합 중 어느 것이 단독으로 또는 임의의 조합으로 생략되고 부인될 수 있는 것으로 의도된다.

[0029] **정의**

[0030] 본 발명의 설명 및 첨부되는 청구범위에서 사용되는 바, 단독 형태를 나타내는 단어는 맥락이 분명하게 다른 것

을 나타내지 않는 한, 복수의 형태를 또한 포함하는 것으로 의도된다.

- [0031] 본원에서 사용되는 바, "및/또는"은 관련된 열거된 항목 중 하나 이상의 임의의 및 모든 가능한 조합, 뿐만 아니라 대안("또는")으로 해석되는 경우 조합의 결여를 나타내며 포함한다.
- [0032] 더욱이, 본원에 제시된 임의의 특징 또는 특징의 조합이 배제되거나 생략될 수 있다.
- [0033] 본원에서 사용되는 바, 용어 "약"은 화합물 또는 작용제의 양, 용량, 온도, 등과 같이 측정 가능한 값을 나타내는 경우 명시된 양의 $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$, 또는 심지어 $\pm 0.1\%$ 의 변형을 포함하는 것을 의미한다.
- [0034] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적이고 과학적인 용어는 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에게 의해 일반적으로 이해되는 것과 같은 의미를 가진다. 본원의 설명에 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 기술할 목적이며 제한하려는 의도가 아니다.
- [0035] 뉴클레오타이드 서열은 구체적으로 다르게 명시되지 않는 한, 5'에서 3' 방향으로 좌측에서 우측으로 단일 가닥에 의해서만 본원에 제공된다. 뉴클레오타이드 및 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회에 의해 권장된 방식으로, 또는 (아미노산의 경우) 37 C.F.R. § 1.822 및 확립된 용법에 따라 한 글자 코드, 또는 세 글자 코드에 의해 본원에 표시된다.
- [0036] 다르게 표시된 것을 제외하고, 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려져 있는 표준 방법이 재조합 및 합성 폴리펩타이드, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 제조, 핵산 서열의 조작, 형질전환된 세포의 제조, 바이러스 벡터 구축물의 구성, 및 일과성으로 및 안정적으로 형질주입된 포장 세포에 대해 사용될 수 있다. 그러한 기법은 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려져 있다. 예컨대, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); F. M. Ausubel *et al.* Current Protocols In Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York) 참고.
- [0037] 본원에서 사용되는 바, 이행 구절 "본질적으로 ~으로 이루어지는"은 인용된 물질 또는 단계 및 청구된 발명의 기본적인이고 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 그러므로, 본원에서 사용되는 용어 "본질적으로 ~으로 이루어지는"은 "포함하는"과 동등하게 해석되지 않아야 한다.
- [0038] 본원에서 사용되는 바, 용어 "폴리펩타이드"는 펩타이드 및 단백질을 모두 포함하며, 다르게 표시되지 않는 한 임의의 특정 아미노산 길이 또는 삼차 구조를 필요로 하지 않는다.
- [0039] 세포 및/또는 세포의 단층과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "분극화된"은 세포의 2개의 별개의 표면, 예컨대 상이할 수 있는 선단면 및 기저면이 있는 세포의 공간적 상태를 나타낸다. 일부 구현예에서, 분극화된 세포의 구별되는 표면은 상이한 표면 및/또는 경막 수용체 및/또는 다른 구조를 포함한다. 일부 구현예에서, 연속 단층의 개별 분극화된 세포는 유사하게 배향된 선단면 및 기저면을 가진다. 일부 구현예에서, 연속 단층의 개별 분극화된 세포는 개별 세포 사이에 소통 구조(예컨대, 밀착 접합)를 가져서 개별 세포 사이의 교차 소통이 허용되고 선단 구획과 기저 구획의 분리(예컨대, 구획화)가 생성된다.
- [0040] 본원에서 사용되는 바, "선단면"은 외부 환경에 직면하거나 공동 또는 챔버, 예를 들어 내부 장치의 공동을 향하는 세포의 표면을 의미한다. 유방 상피 세포와 관련하여 선단면은 배양 유제품이 분비되는 표면이다.
- [0041] 본원에서 사용되는 바, "기저면"은 표면, 생물반응기의 매트릭스와 접촉하는 세포의 표면을 의미한다.
- [0042] 본원에서 사용되는 바, "생물반응기"는 본원에 기술된 유방 세포로부터 본원에 기술된 배양 유제품의 생산을 가능하게 하는 생물학적으로 활성인 환경을 지지하는 장치 또는 시스템을 의미한다.
- [0043] 본원에서 사용되는 용어 "락토제닉(lactogenic)"은 밀크의 생산 및/또는 분비를 자극하는 능력을 나타낸다. 유전자 또는 단백질(예컨대, 프로락틴)은 임의의 다른 천연 및/또는 합성 제품과 같이 락토제닉일 수 있다. 일부 구현예에서, 락토제닉 배양 배지는 프로락틴을 포함하며, 그로써 배양 배지와 접촉하는 세포에 의한 밀크의 생산이 자극된다.
- [0044] 본원에서 사용되는 바, 용어 "식품 등급"은 예컨대, 미국 식품의약국에 의해 설정된 표준에 의해 규제되는 것과 같이, 무독성이고 소비(예컨대, 인간 및/또는 다른 동물 소비)에 대해 안전한 것으로 간주되는 물질을 나타낸다.
- [0045] 일부 구현예에서, 일차 유방 상피 세포(예컨대, 단리된 살아있는 일차 유방 상피 세포로부터의 일차 유방 상피 세포 및/또는 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및/또는 유방 전구 세포의 혼합 집단으로부터의

일차 유방 상피 세포) 또는 불멸화된 유방 상피 세포에 의해 생산된 밀크는 세포의 선단면을 통해 선단 구획으로 분비된다. 일부 구현예에서, 기저 구획은 배양 배지를 포함하고 배양 배지는 살아있는 일차 유방 상피 세포, 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단, 및/또는 불멸화된 유방 상피 세포의 기저면과 접촉한다.

[0046] **생세포 구축물**

[0047] 본원의 특정 구현예에서, 배양물에서 밀크를 생산하기 위한 생세포 구축물이 개시되며, 생세포 구축물은 (a) 살아있는 일차 유방 상피 세포, (b) 살아있는 유방 근상피 세포, (c) 살아있는 유방 전구 세포, 및/또는 (d) 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 살아있는 유방 세포의 연속 단층을 포함한다.

[0048] 일부 구현예에서, 유방 세포는 밀크 생산 유방 상피 세포, 수축성 근상피 세포, 및/또는 유방 상피 및 유방 수축성 근상피 세포 둘 다를 유발할 수 있는 전구 세포를 포함한다. 유방 상피 세포는 밀크를 생산하는 유일한 세포이다. 일부 구현예에서, 유방 세포는 유방 상피 세포, 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포를 포함한다.

[0049] 일부 구현예에서, 유방 세포는 포유류의 가슴 조직, 유방 조직, 및/또는 유두 조직으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 유방 세포는 임의의 포유류, 예컨대, 영장류(예컨대, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 원숭이(예컨대, 구세계, 신세계), 여우원숭이, 인간), 개, 고양이, 토끼, 마우스, 래트, 말, 소, 염소, 양, 황소(예컨대, 보스종), 돼지, 사슴, 사향노루, 소, 고래, 돌고래, 하마, 코끼리, 코뿔소, 기린, 얼룩말, 사자, 치타, 호랑이, 판다, 붉은 판다, 및 수달로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 유방 세포는 멸종위기 종, 예컨대, 멸종위기 포유류로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 유방 세포는 인간으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 유방 세포는 소(예컨대, 암소)로부터 유래된다.

[0050] 일부 구현예에서, 살아있는 유방 세포의 연속 단층은 모유 유래 줄기 세포 또는 유선의 조직 생검으로부터 기원하는 유방 줄기 세포로부터 유래된다. 모유의 상피 성분으로는 성숙한 상피 세포뿐만 아니라, 그것의 전구체 및 배양 중의 줄기 세포를 들 수 있다. 모유 유래 줄기 세포의 하위집단은 인간 배아 줄기 세포(hESC)에 대해 전형적인 것을 닮은 매우 높은 다중계통 잠재력을 나타낸다. 유방 줄기 세포는 또한 유선의 조직 생검으로부터 기원할 수 있고, 말단 분화된 MEC를 포함한다. 모유 유래 줄기 세포 및 유선의 조직 생검으로부터 기원하는 유방 줄기 세포는 모두 MEC 또는 근상피 세포를 유발할 수 있는 다능 세포이다.

[0051] 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 50%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 55%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 60%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 65%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 70%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 75%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 80%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 85%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 90%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 95%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 배양의 유방 세포의 적어도 100%가 분극화된다. 일부 구현예에서, 생세포 구축물의 실질적으로 모든 유방 세포가 분극화된다(즉, 선단면 및 기저면을 가진다). 일부 구현예에서, 생세포 구축물의 실질적으로 모든 유방 세포가 분극화되고 실질적으로 모든 분극화된 세포가 동일한 방향으로 배향된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 실질적으로 모든 유방 세포가 선단면 및 기저면을 가지며, 실질적으로 모든 세포의 선단면이 동일한 방향으로 배향되고 실질적으로 모든 세포의 기저면이 동일한 방향으로 배향된다.

[0052] 일부 구현예에서, 상피 유방 세포의 단층은 스캐폴드에 대해 적어도 70%의 합류를 가진다. 일부 구현예에서, 유방 상피 세포의 단층은 스캐폴드에 대해 적어도 75%의 합류를 가진다. 일부 구현예에서, 상피 유방 세포의 단층은 스캐폴드에 대해 적어도 약 80%의 합류를 가진다. 일부 구현예에서, 상피 유방 세포의 단층은 스캐폴드에 대해 적어도 약 85%의 합류를 가진다. 일부 구현예에서, 상피 유방 세포의 단층은 스캐폴드에 대해 적어도 약 90%의 합류를 가진다. 일부 구현예에서, 상피 유방 세포의 단층은 스캐폴드에 대해 적어도 약 95%의 합류를 가진다. 일부 구현예에서, 상피 유방 세포의 단층은 스캐폴드에 대해 적어도 약 99%의 합류를 가진다. 일부 구현예에서, 상피 유방 세포의 단층은 스캐폴드에 대해 100%의 합류를 가진다.

[0053] **유방 세포에 대한 유전자 변형**

[0054] 일부 구현예에서, 유방 세포는 구성적으로 활성인 프로락틴 수용체 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 유방 세포는 구성적으로 활성인 인간 프로락틴 수용체 단백질을 포함한다. 일차 유방 상피 세포 또는 불멸화된 유방

상피 세포가 구성적으로 활성인 프로락틴 수용체를 포함하는 경우, 배양 배지는 프로락틴을 함유하지 않는다.

[0055] 일부 구현예에서, 구성적으로 활성인 인간 프로락틴 수용체 단백질은 아미노산 9 내지 187의 결실을 포함하며, 여기서 넘버링은 SEQ ID NO: 1로서 확인된 인간 프로락틴 수용체의 참조 아미노산 서열을 토대로 한다.

[0056] SEQ ID NO: 1: 인간 프로락틴 수용체(GenBank 등록 번호 AAD32032.1)

MKENVASATVFTLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGTDG
GLPTNYSLTYHREGETLMHECPDYITGGPNSCHFGKQYTSMWRTYIMMVNATNQMG
SFSDELYVDVTYIVQDPPELAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIR
LKPEKAAEWEIFHAGQQTEFKILSLHPGQKYLQVRCKPDHGYWSAWSPATFIQIPSD
TMNDTTVWISVAVLSAVICLIIVWAVALKGYSMVTCIFPPVPGPKIKGFD AHLLEK GKSE
ELLSALGCQDFPPTSDYEDLLVEYLEVDDSEDQHLMSVHSKEHPSQGMKPTYLDPDTDS
GRGSCDSPSLLSEKCEEPQANPSTFYDPEVIEKPENPETTHTWDPQCISMEGKIPYFHAGG
SKCSTWPLPQPSQHNPRSSYHNITDVCELAGVPAGAPATLLNEAGKDALKSSQTIKSREE
GKATQQREVESFHSETDQDTPWLLPQEKTPFGSAKPLDYVEIHKVNKD GALSLLPKQRE
NSGKPKKPGTPENNKEYAKVSGVMDNNILVLPDPHAKNVACFEESAKEAPPSLEQNQ
AEKALANFTATSSKRLQLGGLDYLD PACFTHSFH

[0057]

[0058] 일부 구현예에서, 다음의 아미노산의 결실을 포함하는 구성적으로 활성인 인간 프로락틴 수용체 단백질:

VFTLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGTDGGLPTNYSLTYHREGE
TLMHECPDYITGGPNSCHFGKQYTSMWRTYIMMVNATNQMGSSFSDELYVDVTYIVQ
DPPELAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIRLKPEKAA (예컨대, SEQ

[0059] ID NO: 1의 아미노산 위치 9 내지 187).

[0060] 일부 구현예에서, 유방 세포는 개일 관련 유전자 *PER2*로 도입된 기능 상실 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 개일 관련 유전자 *PER2*로 도입된 기능 상실 돌연변이는 배양된 밀크 성분의 증가된 합성을 촉진한다. 일부 구현예에서, *PER2* 유전자의 기능 상실 돌연변이는 *PER2*의 위치 348로부터 434의 87개 아미노산 결실을 포함하며, 여기서 넘버링은 SEQ ID NO:2로서 확인된 인간 *PER2*의 참조 아미노산 서열을 토대로 한다.

[0061] SEQ ID NO: 2: 인간 주기 개일 단백질 상동체 2(GenBank 등록 번호 NM 022817)

MNGYAEFPSPSPNTKEPVEPQPSQVPLQEDVDMSSGSSGHETNENCSTGRDSQG
SDCDDSGKJELGMLVEPPDARQSPDTFSLMMAKSEHNPSTSGCSDQSSKVDTHKELIK
TLKELKVHLPADKKAKGKASTLATLKYALRSVKQVKANEEYYQLMSSEGHPCGADV
PSYTVEEMESVTSEHIVKNADMFVAVSLVSGKILYISDQVASIFHCKRDAFSDAKFVEF
LAPHDVGVFHSFTSPYKLPLWSMCSGADSFTQECMEEKSFRCRVSVRKSHENEIRYHPF
RMTPYLVKVRDQQAESQLCCLLLAERVHSGYEAPRIPPEKRIFTTTHTPNCLFQDQD
ERAVPLLGYPQLDIETPVLVQLHPSDRPLMLAIHKKILQSGGQPFDYSPIRFRARN
GEYITLDTSSWSSFINPWSRKISFIIGRHKVRVGPLNEDVFAAHPCTEEKALHPSIQELT
EQIHRLLLQPVPHSGSSGYGSLGNGSHEHLMSQTSSSDSNGHEDSRRRRAEICKNGNKT
KNRSHYSHESGEQKKKSVTEMQTNPPAEKKAVPAMEKDSLGVSFPEELACKNQPTCSY
QQISCLDSVIRYLESCNEAATLKRKCEFPANVPALRSSDKRKATVSPGPHAGEAEPSPRV
NSRTGVGTHLTSLALPGKAESVASLTSQCSYSSTIVHVGDKKPQPELEMVEDAASGPESL
DCLAGPALACGLSQEKEPFKKLGLTKEVLAHAHTQKEEQSFLQKFKEIRKLSIFQSHCHYY
LQERSKGQPSERTAPGLRNTSGIDSPWKKTGKNRKLKSKRVKPRDSSESTGSGGPVSAR
PPLVGLNATAWSPSDTSQSSCPAVFPAPVPAAYSLPVFPAPGTVAAPPAPPHASFTVPA
VPVDLQHQFAVQPPFPAPLAPVMAFMLPSYSFSPSGTPNLPQAFFPSQPQFSPHPTLTSEM
ASASQPEFPEGGTGAMGTTGATETAAGADCKPGTSRDQPKAPLTRDEPSDTQNSDA
LSTSSGLLNLLNEDLCSASGSAASESLGSGSLGCDASPGAGSSDTSHTSKYFGSIDSSE
NNHKAKMNTGMEESEHFIKCVLQDPIWLLMADADSSVMMTYQLPSRNLEAVLKEDRE
KLKLLQKLQPRFTESQKQELREVHQWMQTGGLPAAIDVAECVYCENKEKGNICIPYEE
DIPSLGLSEVSDTKEDENGSPLNHRIEEQT

[0062]

[0063] 일부 구현예에서, *PER2*에 도입된 기능 상실 돌연변이는 다음의 아미노산: CLFQDQDERAVPLLGYPQLDIETPVLVQLHPSDRPLMLAIHKKILQSGGQPFDYSPIRFRARNGEYITLDTSSWSSFINPWSRKISFIIGRHKV(예컨대, SEQ ID NO:2의 아미노산 위치 348 내지 434)의 결실을 포함한다.

[0064]

일부 구현예에서, 유방 세포는 변형된 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 프로락틴 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 개일 관련 유전자 *PER2*에 도입된 기능 상실 돌연변이는 개별 배양된 밀크 성분의 증가된 합성을 촉진한다. 일부 구현예에서, 프로락틴 수용체는 엑손 10의 위치 154가 엑손 11의 3' 서열에 스플라이싱되어 있는 트랜케이션을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로락틴 수용체는 SEQ ID NO: 3에 따르는 서열을 포함한다.

[0065]

SEQ ID NO: 3: 프로락틴 수용체의 인간 동형(isoform) 4(GenBank 등록 번호 AF416619; Trott et al. 2003 *J. Mol. Endocrinol* 3Q(1):31-47)

MKENVASATVFTLLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGTDG
GLPTNYSLTYHREGETLMHECPDYITGGPNSCHFQKQYTSMWRTYIMMVNATNQMG
SFSDELYVDVTYIVQDPPELAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIR
LKPEKAAEWEIHFAQQTEFKILSLHPGQKYLQVVRCKPDHGYWSAWSPATFIQIPSD
TMNDTTVWISVAVLSAVICLIIVWAVALKGYSMVTCIFPPVPGPKIKGFD AHLLEK GKSE
ELLSALGCQDFPPTSDYEDLLVEYLEVDDSEDQHLSMVHSKEHPSQGDPLMLGASHYK
NLKSYRPRKISSQGR LAVFTKATLTTVQ

[0066]

[0067] 일부 구현예에서, 유방 세포는 프로락틴 단백질의 변형된(예컨대, 재조합) 이펙터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로락틴 단백질의 변형된 이펙터는 야누스 키나제-2(JAK2) 티로신 키나제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 이펙터는 시그널 트랜스듀서 및 전사 활성인자-5(STAT5) 티로신 키나제 도메인에 융합된 JAK2 티로신 키나제 도메인(예컨대, STAT5 티로신 키나제 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 단부에 결합된 JAK2 티로신 키나제 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로락틴 단백질의 변형된 이펙터는 개별 배양된 밀크 성분의 증가된 합성을 촉진한다. 일부

구현예에서, 변형된 이펙터는 SEQ ID NO: 4에 따르는 서열을 가진다. 진하게 표시된 아미노산은 참조 인간 JAK2 아미노산 서열의 아미노산 위치 757 내지 1129의 JAK2 키나제 도메인에 상응한다.

[0068] SEQ ID NO: 4. JAK2 인간 티로신-단백질 키나제의 아미노산 757-1129에 대해 3' 단부에서 융합된 STA5A 인간 시그널 트랜스듀서 및 전사 활성인자 5A

MAGWIAQQQL QGDALRQMQV LYGQHFPIEV RHYLAQWIES QPWAIDLDN
 PQDRAQATQL LEGLVQELQK KAEHQVGEDG FLLKIKLGHY ATQLQKTYDR
 CPLELVRCIR HILYNEQRLV REANNCSSPA GILVDAMSQK HLQINQTFEE
 LRLVTQDTEN ELKKLQQTQE YFIIQYQESL RIQAQFAQLA QLSPQERLSR
 ETALQQKQVS LEAWLQREAA TLQQYRVELA EKHQKTLQLL RKQQTHLDD
 ELIQWKRRQQ LAGNGGPPEG SLDVLQSWCE KLAELIHWQNR QQIRRAEHLA
 QQLPIPGPVE EMLAEVNATI TDIISALVTS TFIIEKQPPQ VLKTQTKFAA TVRLLVGGKL
 NVHMNPPQVK ATIIEQQAK SLLKNENTRN ECSGEILNNC CVMEYHQATG
 TLSAHRNMS LKRIKRRDRR GAESVTEEFK TVLFESQFSV GSNELVFQVK
 TSLPWVIV HGSQDHNATA TVLWDNAFAE PGRVPFAVPD KVLWPQLCEA
 LNMKFKAQVQ SNRGLTKENL VFLAQKLFNN SSSHLEDYSG LSVSWSQFNR
 ENLPGWNYTF WQWFDGVMEV LKKHHKPHWN DGAILGFVNK QQAHDLLINK
 PDGTFLLRFS DSEIGGITIA WKFDSPERNL WNLKPFTTRD FSIRSLADRL GDLSYLIYVF
 PDRPKDEVFS KYYTPVLAKA VDGYPKQIK QWPEFVNAS ADAGGSSATY
 MDQAPSPAVC PQAPYNMYPQ NPDHVLDDQD EFDLDETMDV ARHVEELLRR
 PMDSLDSRLS PPAGLFTSAR GSLSLDSQ RKLQFYEDRH QLPAPKWAEI
 ANLNNCMDY EPDFRPSFRA IIRDLNSLFT PDYELLTEND MLPNMRIGAL
 GFSGAFEDRD PTQFEERHLK FLQQLGKGNF GSVEMCRYDP LQDNTGEWA
 VKKLQHSTEE HLRDFEREIE ILKSLQHDNI VKYKGVCYSA GRRNLKLIME
 YLPYGLRDY LQKHKERIDH IKLLQYTSQI CKGMEYLGTK RYIHRDLATR
 NILVENENRV KIGDFGLTKV LPQDKEYYKV KEPGESPIFW YAPESLTSK
 FSVASDVVSF GWLYELFTY IEKSKSPAE FMRMIGNDKQ GQMIVFHLIE
 LLKNNGRLLPR PDGCPDEIYM IMTECWNNNV NQRPSFRDLA LRVDQIRDN.

[0069]

[0070] 일부 구현예에서, 유방 세포는 불멸화된다. 일부 구현예에서, 유방 세포는 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT) 또는 유인원 바이러스 40(SV40)을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 유방 세포는 p16에 대한 작은 헤어핀 RNA(shRNA)(사이클린 의존성 키나제 4의 억제자)(p16(INK4)) 및 세포 주기 진입 및 증식성 대사의 마스터 조절자(c-MYC)를 포함한다.

[0071]

일부 구현예에서, 방법은 (a) 변형된 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 프로락틴 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 선택적으로 프로락틴 수용체는 엑손 10의 위치 154가 엑손 11의 3' 서열에 스플라이싱되어 있는 트랜잭션을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드; (b) 프로락틴의 부재 시에 밀크 합성을 활성화할 수 있는, 리간드에 결합하는 키메라 프로락틴 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드; (c) 활성 프로락틴 수용체 단백질을 구성적으로 또는 조건부로 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 선택적으로 폴리뉴클레오타이드는 아미노산 9에서 187까지의 결실(예컨대, 아미노산 9에서 187까지의 결실, 여기서 넘버링은 SEQ ID NO: 1로서 확인된 인간 프로락틴 수용체의 참조 아미노산 서열을 토대로 함)을 포함하는 구성적으로 활성인 인간 프로락틴 수용체 단백질을 암호화하는, 폴리뉴클레오타이드; (d) (i) 야누스 키나제-2(JAK2) 티로신 키나제 도메인, 선택적으로 JAK2 티로신 키나제 도메인은 시그널 트랜스듀서 및 전사 활성인자-5(STAT5) 티로신 키나제 도메인에 융합되는, JAK2 티로신 키나제 도메인 (예컨대, STAT5 티로신 키나제 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 단부에 결합된 JAK2 티로신 키나제 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드); 및/또는 (ii) JAK2 티로신 키나제 도메인에 융합된 프로락틴 수용체 세포내 도메인을 포함하는 프로락틴 단백질의 변형된(예컨대, 재조합) 이펙터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드; (e) 개일 관련 유전자 *PER2*(주기 개일 단백질 상동체 2)로의 기능 상실 돌연변이; 및/또는 (f) 하나 이상의 글루코스 수송 유전자 GLUT1 및/또는 GLUT12를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 세포에 도입함으로써, 단층의 기저면에서 영양소 흡수율을 증가시키는 단계를 포함한다.

- [0072] 스캐폴드
- [0073] 일부 구현예에서, 생세포 구축물은 상부면/외면 및 바닥면/내면을 가진 스캐폴드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 이차원 표면 또는 삼차원 표면이다(예컨대, 삼차원 미세패턴 표면, 및/또는 다발로 조립되는 원통형 구조로서). 이차원 표면 스캐폴드의 비제한적인 예는 Transwell® 필터이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 삼차원 표면이다. 삼차원 미세패턴 표면의 비제한적인 예로는 미세구조 생물반응기, 탈세포화된 조직(예컨대, 탈세포화된 유선 또는 탈세포화된 식물 조직), 생물학적 또는 생체적합성 물질로 주조 또는 삼차원 인쇄를 통해 제작된 미세패턴 스캐폴드, 질감이 있는 표면을 들 수 있다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 셀룰로스 나노섬유 및/또는 다발(예컨대, 중공 섬유 생물반응기)로 조립될 수 있는 원통형 구조체를 전기방사함으로써 제조된다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 다공성이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 3D 스캐폴드이다. 일부 구현예에서, 삼차원 스캐폴드는 둘러싸인 중공 내부/중심 공동을 가진 임의의 구조체이다. 일부 구현예에서, 삼차원 스캐폴드는 하나 이상의 표면과 연합하여 둘러싸인 내부 챔버/기저 구획을 형성한다. 예를 들어, 스캐폴드는 생물반응기의 하나 이상의 벽과 연합하여 내부 챔버/기저 구획을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 중공 섬유 생물반응기이다. 일부 구현예에서, 3D 스캐폴드는 중심 공동이 스캐폴드의 내면에 의해 한정되는 튜브이다. 일부 구현예에서, 3D 스캐폴드는 중심 공동이 스캐폴드의 내면에 의해 한정되는 중공 구이다.
- [0074] 장 흡수의 연구를 위한 시험관내 배양 방법의 경우, Transwells®과 같은 이차원 표면 스캐폴드는 그것이 장-혈액 장벽을 시뮬레이션하고 약물과 영양소의 능동 및 수동 수송을 모두 가능하게 하는 선단 및 기저외측 공간을 모두 제공하기 때문에 오랫동안 표준으로서 사용되어 왔다. 그러나, 평평한 지지체 상에 시딩된 세포는, 부분적으로는 삼차원 세포의 미세환경의 불량한 제공으로 인해 생체내에서 세포에 현저하게 상이한 표현형을 나타낸다.
- [0075] 삼차원 스캐폴드는 유방 세포(예컨대, MEC)가 삼차원 전부에서 성장하거나 그것의 주변과 상호작용할 수 있게 한다. 2D 환경과 달리, 3D 세포 배양은 생체내 유방 환경과 거의 유사하게, 시험관내에서 세포가 모든 방향으로 성장할 수 있게 한다. 추가로, 3D 스캐폴드는 세포 배양 및 대사산물과 가스 교환을 위해 더 큰 표면적을 허용하며, 또한 필요한 구획화를 가능하게 하여 배양 유제품이 한 구획으로 분비되지만, 세포 배양 배지는 또 다른 구획에서 유방 세포와 접촉하는 것을 가능하게 한다. 지금까지, 3D 표면 상에서 유방 상피 세포를 사용하여 기저 및 선단 세포 표면의 분극 분리를 수반하는 합류 단층은 달성되지 않았다(Sharfstein et al. 1992).
- [0076] 일부 구현예에서, 스캐폴드는 다공성이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 세포 배지에 대해 투과성이어서, 세포 배지가 세포 단층의 세포와 접촉하는 것이 허용된다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 세포 배지가 세포 단층의 세포의 기저면과 접촉하는 것을 허용하는 적어도 하나의 세공이 가로지른다.
- [0077] 일부 구현예에서, 스캐폴드의 상부면/외면은 매트릭스 물질로 코팅된다. 일부 구현예에서, 매트릭스는 하나 이상의 세포의 기질 단백질로 구성된다. 세포의 기질 단백질의 비제한적인 예로는 콜라겐, 라미닌, 엔타틴, 테나신, 및/또는 피브로넥틴을 들 수 있다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 천연 폴리머, 생체적합성 합성 폴리머, 합성 펩타이드, 및/또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래된 복합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 유용한 천연 폴리머로, 한정하는 것은 아니지만, 콜라겐, 키토산, 셀룰로스, 아가로스, 알긴산염, 젤라틴, 엘라스틴, 해파란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 및/또는 히알루론산을 들 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 유용한 생체적합성 합성 폴리머로, 한정하는 것은 아니지만, 셀룰로스, 폴리설푼, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리에틸렌 코-비닐 아세테이트, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산 나트륨, 아크릴레이트 폴리머, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜을 들 수 있다. 일부 구현예에서, 스캐폴드의 상부는 라미닌 및 콜라겐으로 코팅된다.
- [0078] 일부 구현예에서, 매트릭스 물질은 다공성이다. 일부 구현예에서, 매트릭스 물질은 세포 배지에 대해 투과성이어서, 세포 배지가 세포 단층의 세포와 접촉하는 것이 허용된다. 일부 구현예에서, 매트릭스 물질은 세포 배지가 세포 단층의 세포의 기저면과 접촉하는 것을 허용하는 적어도 하나의 세공이 가로지른다.
- [0079] 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 0.1 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 0.2 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 0.3 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 0.4 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 0.5 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 0.6 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 0.7 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 0.8 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의

세공 크기는 적어도 약 0.9 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.0 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.1 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.2 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.3 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.4 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.5 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.6 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.7 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.8 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 1.9 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.0 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.1 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.2 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.2 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.3 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.4 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.5 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.6 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.7 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.8 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 2.9 μm 이다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 매트릭스 물질의 세공 크기는 적어도 약 3.0 μm 이다.

[0080] 일부 구현예에서, 생세포 구축물은 상부면/외면 및 바닥면/내면을 가진 스캐폴드; 및 (a) 살아있는 일차 유방 상피 세포, (b) 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단, 및/또는 (c) 스캐폴드의 상부면 상의 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 단층, (a) 살아있는 일차 유방 상피 세포, (b) 살아있는 일차 유방 상피 세포 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단, 및/또는 (c) 선단면 및 기저면을 가진 불멸화된 유방 상피 세포(예컨대, 세포는 분극화되고 합류인 세포 단층을 형성함)의 연속 단층을 포함하며, 구축물은 (a) 살아있는 일차 유방 상피 세포, (b) 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단, 및/또는 (c) 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 단층의 선단면 위에 인접한 선단 구획 및 스캐폴드의 바닥면 아래에 인접한 기저 구획을 포함한다.

[0081] 생물반응기

[0082] 본원의 특정 구현예에서, (a) 배양 유제품을 포함하는 선단 구획; 및 (b) (i) 외면, 내부 공동/기저 챔버를 형성하는 내면, 및 내면으로부터 외면으로 연장되는 복수의 세공을 가진 삼차원 스캐폴드; (ii) 삼차원 스캐폴드의 외면 상에 배치된 매트릭스 물질; (iii) 내부 공동/기저 챔버 내에 배치되고 내면과 유체 접촉하는 배양 배지; 및 (iv) 매트릭스 물질 상에 배치된 분극화된 유방 세포의 적어도 70% 합류 단층을 포함하는 적어도 하나의 생세포 구축물을 포함하는 생물반응기가 개시되며, 여기서 유방 세포는 살아있는 일차 유방 상피 세포, 살아있는 유방 근상피 세포, 살아있는 유방 전구 세포, 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포, 살아있는 불멸화된 유방 근상피 세포, 및 살아있는 불멸화된 유방 전구 세포로 이루어진 군으로부터 선택되고; 유방 세포의 선단면은 선단 구획과 유체 접촉된다.

[0083] 일부 구현예에서, 생물반응기는 폐쇄형 생물반응기이다. 일부 구현예에서, 선단 챔버는 실질적으로 내부 공동/기저 구획으로부터 분리된다.

[0084] 중공 섬유 생물반응기는 본원에 개시된 방법과 사용하기 위한 예시의 생물반응기이다. 중공 섬유 생물반응기는 세포가 생체내에서 성장하는 환경과 밀접하게 유사한 고밀도, 연속 관류 배양 시스템이다. 그것은 입구 및 출구 포트가 장착된 카트리지 셸 내에서 병렬 배열의 수 천개의 반투과성 3D 스캐폴드(즉, 중공 섬유)로 이루어진다. 이들 섬유 다발은 카트리지 단부로 진입하는 임의의 액체가 반드시 섬유의 내부를 통해 흐르도록 각각의 단부에서 포팅되거나 밀봉된다. 세포는 일반적으로 여분의 모세관 공간(ECS)에서 카트리지 내의 섬유 외부에 시딩된다.

[0085] 3가지의 기본적인 특징이 중공 섬유 세포 배양을 다른 방법과 구별하게 한다: (1) 세포는 플라스틱 접시, 미세 담체 또는 다른 불침투성 지지체가 아닌, 생체 내에 있는 것과 같은 다공성 매트릭스에 결합되고, (2) 지지체 매트릭스의 분자량 컷오프는 제어될 수 있으며, 그리고 (3) 매우 높은 표면적 대 부피 비($\text{mL 당 } 150 \text{ cm}^2$ 또는 그 이상)가 숙주 세포의 효율적인 성장을 위해 대사산물과 가스 교환을 위한 큰 영역을 제공한다.

- [0086] 생물반응기 구조는 영양소, 가스 및 다른 기본적인 배지 성분과, 뿐만 아니라 세포가 증폭될 수 있는, 세포가 아닌 세포 폐기물의 투과를 허용하는 섬유 매트릭스를 제공한다. 중공 섬유 생물반응기 기술은 세포 성장 챔버와 배지 흐름 사이에서 반투과성 장벽을 생성하기 위해 중공 섬유를 활용함으로써 고밀도 세포 증폭을 얻기 위해 사용되어 왔다. 이 설계에 의해 제공된 표면적이 크기 때문에, 이런 섬유를 배양 기질로서 사용하면 많은 수의 세포를 생산할 수 있다. 생물반응기 내에서 삼차원 환경에서 성장하는 세포는 중공 섬유를 통해 관류될 때 신선한 배지로 씻겨진다.
- [0087] 장의 토포그래피를 복제하기 위하여, Costello 등은 마이크로몰딩을 통해 다공성 용모 스캐폴드를 모두 포함할 수 있는 3D 인쇄된 생물반응기를 개발하였다(Costello et al. 2017 Scientific Reports 7(12515): 1-10). 이런 기하학적으로 복잡한 성형 스캐폴드는 유체 흐름이 생리학적으로 관련된 전단 응력에 장 상피 세포를 노출시키는 방식으로 전단 및 기저외측 공간의 분리를 제공하였다(Costello et al. 2017). 유사하게, 자극된 장-유사 환경에서의 장기간 시험관내 배양은 기저층으로부터 산소 및 영양소를 숙주 세포에 제공하기 위하여 2가지의 제어된 분리 환경(2상)을 허용하는 한편, 선단면 상에서 저산소 영양소 풍부한 환경이 발생하는 것을 허용하는 중공 섬유 발생기를 사용하여 Morada 등에 의해 생성되었다(Morada et al. 2016 International Journal for Parasitology 26: 21-29).
- [0088] 중공 섬유 생물반응기를 구성할 때, 세포 팽창과 관련된 목표에 따라 달라질 수 있는 설계 고려사항 및 매개변수가 있다. 한 가지 그러한 설계 고려사항은 섬유 벽의 세공의 크기이다. 이것은 일반적으로 영양소가 세포로 통과되도록 하고, 노폐물을 운반해가고, 원하는 생성물(예컨대 성장 인자)을 세포에 제공하고, 원하는 생성물을 세포로부터 제거하고, 그리고 세포에 도달하는 데 존재할 수 있는 특정 인자를 배제하도록 설계된다. 따라서, 섬유 벽의 세공 크기는 어떤 성분이 벽을 통과할 것인지를 변형시키기 위해 달라질 수 있다. 예를 들어, 세공 크기는 한정하는 것은 아니지만, 표피 성장 인자 및 혈소판 유래 성장 인자를 포함한 성장 인자를 포함하여, 큰 단백질성 분자의 통과를 허용할 수 있다. 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람은 섬유 벽을 통해 지나가 세포에 도달하거나 세포로부터 물질을 운반하는 것이 바람직한, 성분에 따라 세공 크기를 다르게 하는 방법을 이해할 것이다.
- [0089] 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.2 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.1이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.2 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.3 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.4 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.5 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.6 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.7 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.8 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 0.9 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.0 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.1 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.2 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.3 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.4 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.5 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.6 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.7 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.8 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 1.9 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.0 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.1 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.2 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.3 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.4 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.5 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.6 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.7 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.8 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 2.9 μm 이다. 일부 구현예에서, 세공 크기는 약 3.0 μm 이다.
- [0090] 생세포 구축물의 제조 방법
- [0091] 본원의 특정 구현예에서, 배양 유제품을 생산하기 위한 생세포 구축물의 제조 방법이 개시된다. 일부 구현예에서, 방법은 (a) 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포 및/또는 유방 전구 세포를 유방 조직(예컨대, 가슴, 유방, 유두 조직), 생검 샘플, 또는 생모유로부터의 유방 외식편으로부터 단리하여, 단리된 유방 상피 세포, 근상피 세포 및/또는 유방 전구 세포를 생산하는 단계; (b) 단리된 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포 및/또는 유방 전구 세포를 배양하여 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단을 생산하는 단계; (c) (b)의 혼합 집단을 상부면 및 하부면을 가진 스캐폴드 상에서 배양하여, 스캐폴드의 상부면 상에 혼합 집단의 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 분극화된, 단층을 생성하는 단계로서, 분극화된 단층은 선단면 및 기저면을 포함하며, 그로써 배양 유제품을 생산하기 위한 생세포 구축물이 제조되는 단계를 포함한다.
- [0092] 일부 구현예에서, 방법은 (a) 유방 조직(예컨대, 가슴, 유방, 유두 조직), 생검 샘플, 또는 생모유로부터의 유

방 외식편으로부터 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포, 및/또는 유방 전구 세포를 분리하여 분리된 유방 상피 세포, 근상피 세포, 및/또는 유방 전구 세포를 생산하는 단계; (b) 분리된 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포, 및/또는 유방 전구 세포를 배양하여 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단을 생산하는 단계; (c) 일차 유방 상피 세포, 근상피 세포, 및/또는 유방 전구 세포의 혼합 집단을 분류하여(예컨대, 일차 유방 상피 세포를 선택함) 일차 유방 상피 세포의 집단을 생성하는 단계; 및 (d) 일차 유방 상피 세포의 집단을 상부면 및 하부면을 가진 스캐폴드 상에서 배양하여, 스캐폴드의 상부면 상에 일차 유방 상피 세포의 분극화된 단층을 생성하는 단계로서, 분극화된 단층은 선단면 및 기저면을 포함하며, 그로써 배양 유제품을 생산하기 위한 생세포 구축물이 제조되는 단계를 포함한다.

[0093] 일부 구현예에서, 방법은 (a) 불멸화된 유방 상피 세포를 배양하여 증가된 수의 불멸화된 유방 상피 세포를 생산하는 단계; (b) (a)의 불멸화된 유방 상피 세포를 상부면 및 하부면을 가진 스캐폴드 상에서 배양하여, 스캐폴드의 상부면 상에 불멸화된 유방 상피 세포의 분극화된 단층을 생성하는 단계로서, 분극화된 단층은 선단면 및 기저면을 포함하며, 그로써 배양 유제품을 생산하기 위한 생세포 구축물이 제조되는 단계를 포함한다.

[0094] 일부 구현예에서, 생세포 구축물에 대한 유방 세포의 배양 및/또는 생육은 약 35℃ 내지 약 39℃의 온도(예컨대, 약 35℃, 35.5℃, 36℃, 36.5℃, 37℃, 37.5℃, 38℃, 38.5℃ 또는 약 39℃, 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위, 예컨대, 약 35℃ 내지 약 38℃, 약 36℃ 내지 약 39℃, 약 36.5℃ 내지 약 39℃, 약 36.5℃ 내지 약 37.5℃, 또는 약 36.5℃ 내지 약 38℃의 온도)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양 및/또는 생육은 약 37℃의 온도에서 수행된다.

[0095] 일부 구현예에서, 생세포 구축물에 대한 유방 세포의 배양 및/또는 생육은 약 4% 내지 약 6%의 CO₂의 대기 농도, 예컨대, 약 4%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 또는 6% 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위, 예컨대, 약 4% 내지 약 5.5%, 약 4.5% 내지 약 6%, 약 4.5% 내지 약 5.5%, 또는 약 5% 내지 약 6%의 CO₂의 대기 농도)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양 및/또는 생육은 약 5%의 CO₂의 대기 농도에서 수행된다.

[0096] 일부 구현예에서, 생세포 구축물에 대한 유방 세포의 배양 및/또는 생육은 약 매일 내지 약 10일마다(예컨대, 1일마다, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 7일마다, 8일마다, 9일마다, 10일마다, 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위, 예컨대, 약 매일 내지 3일마다, 약 3일마다 내지 10일마다, 약 2일마다 내지 5일마다) 교환되는 배양 배지에서의 배양 및/또는 생육을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 및/또는 생육은 추가로 약 매일 내지 약 수시간마다 내지 약 10일마다, 예컨대, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24시간마다 내지 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일마다 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위로 교환되는 배양 배지에서의 배양을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 및/또는 생육은 추가로 약 12시간마다 내지 약 10일마다, 약 10시간마다 내지 약 5일마다, 또는 약 5시간마다 내지 약 3일마다 교환되는 배양 배지에서의 배양 및/또는 생육을 포함한다.

[0097] 일부 구현예에서, 생세포 구축물은 냉동고에서 또는 액체 질소에서 보관된다. 보관 온도는 원하는 보관 길이에 따라 달라진다. 예를 들어, 냉동고 온도(예컨대, 약 0℃ 내지 약 -80℃ 이하, 예컨대, 약 0℃, -10℃, -20℃, -30℃, -40℃, -50℃, -60℃, -70℃, -80℃, -90℃, -100℃ 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 온도에서의 보관)은 세포가 6개월 내에(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개월 내에) 사용된다면 사용될 수 있다. 예를 들어, 액체 질소는 장기간 보관(예컨대, 6개월 이상, 예컨대, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6년 또는 그 이상의 보관)을 위해 사용될 수 있다(예컨대, -100℃이하, 예컨대, 약 -100℃, -110℃, -120℃, -130, -140, -150, -160, -170, -180, -190℃, -200℃, 또는 그 이하의 온도에서의 보관).

[0098] 일부 구현예에서, 유방 세포는 형광 활성화 세포 분류, 자기 활성화 세포 분류, 및/또는 미세유체 세포 분류를 통해 분리되고 분류된다.

[0099] 기본적인 배양 배지 및 락토제닉 배지

[0100] 일부 구현예에서, 배양 배지는 탄소원, 화학적 완충 시스템, 하나 이상의 필수 아미노산, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자, 및 하나 이상의 무기 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 탄소원, 화학적 완충 시스템, 하나 이상의 필수 아미노산, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자, 및/또는 하나 이상의 무기 염은 식품 등급이다.

[0101] 일부 구현예에서, 배양 배지는 락토제닉 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 프로락틴(예컨대, 포유류 프로락틴, 예컨대, 인간 프로락틴), 리놀레산 및 알파 리놀레산, 에스트로젠 및/또는 프로그스테론을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 20 ng/mL 내지 약 200 ng/L의 배양 배지, 예컨대, 약

20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 또는 200 ng/mL 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 프로락틴을 포함한다(또는 프로락틴이 첨가된다). 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 20 ng/mL 내지 약 195 ng/mL, 약 50 ng/mL 내지 약 150 ng/mL, 약 25 ng/mL 내지 약 175 ng/mL, 약 45 ng/mL 내지 약 200 ng/mL, 또는 약 75 ng/mL 내지 약 190 ng/mL의 배양 배지의 양으로 프로락틴을 포함한다(또는 프로락틴이 첨가된다). 일부 구현예에서, 배양 배지는 한정하는 것은 아니지만, 인슐린, 포피 성장 인자, 및/또는 하이드로코르티손을 포함한, 효율을 개선하기 위한 다른 인자를 추가로 포함한다.

[0102] 일부 구현예에서, 배양 배지는 탄소원을 약 1 g/L 내지 약 15 g/L의 배양 배지(예컨대, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위), 또는 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 g/L 내지 약 7, 8, 9, 또는 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 g/L의 배양 배지의 양으로 포함한다. 탄소원의 비제한적인 예로는 글루코스 및/또는 피루브산염을 들 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 글루코스를 약 1 g/L 내지 약 12 g/L의 배양 배지, 예컨대, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 글루코스를 약 1 g/L 내지 약 6 g/L, 약 4 g/L 내지 약 12 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 10.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 11.5 g/L, 또는 약 2 g/L 내지 약 10 g/L의 배양 배지의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 글루코스를 약 1, 2, 3, 또는 4 g/L 내지 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 g/L 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 g/L 내지 약 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 g/L의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 피루브산염을 약 5 g/L 내지 약 15 g/L의 배양 배지, 예컨대, 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 피루브산염을 약 5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 10 g/L 내지 약 15 g/L, 약 7.5 g/L 내지 약 10.5 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 또는 약 8 g/L 내지 약 10 g/L의 배양 배지의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 피루브산염을 약 5, 6, 7, 또는 8 g/L 내지 약 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 g/L 또는 약 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 g/L 내지 약 11, 12, 13, 14 또는 15 g/L의 양으로 포함한다.

[0103] 일부 구현예에서, 배양 배지는 화학적 완충 시스템을 약 1 g/L 내지 약 4 g/L(예컨대, 약 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 또는 4 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위)의 배양 배지 또는 약 10 mM 내지 약 25 mM(예컨대, 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위)의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 화학적 완충 시스템으로, 한정하는 것은 아니지만, 중탄산 나트륨 및/또는 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산(HEPES)을 들 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 중탄산 나트륨을 약 1 g/L 내지 약 4 g/L의 배양 배지, 예컨대, 약 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 또는 4 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 중탄산 나트륨을 약 1 g/L 내지 약 3.75 g/L, 약 1.25 g/L 내지 약 4 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 4 g/L, 또는 약 2 g/L 내지 약 3.5 g/L의 배양 배지의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 HEPES를 약 10 mM 내지 약 25 mM, 예컨대, 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 HEPES를 약 11 mM 내지 약 25 mM, 약 10 mM 내지 약 20 mM, 약 12.5 mM 내지 약 22.5 mM, 약 15 mM 내지 약 20.75 mM, 또는 약 10 mM 내지 약 20 mM의 양으로 포함한다.

[0104] 일부 구현예에서, 배양 배지는 하나 이상의 필수 아미노산을 약 0.5 mM 내지 약 5 mM(예컨대, 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위) 또는 약 0.5, 1, 1.5, 2 mM 내지 약 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 mM의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 필수 아미노산은 히스티딘, 아이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 및/또는 아르기닌이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 아르기닌을 약 0.5 mM 내지 약 5 mM, 예컨대, 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 필수 아미노산을 약 0.5 mM 내지 약 4.75 mM, 약 2 mM 내지 약 3.5 mM, 약 0.5 mM 내지 약 3.5 mM, 약 1 mM 내지 약 5 mM, 또는 약 3.5 mM 내지 약 5 mM의 양으로 포함한다.

[0105] 일부 구현예에서, 배양 배지는 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자를 약 0.01 μ M 내지 약 50 μ M(예컨대, 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075, 또는 50 μ M 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위) 또는 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 또는 0.9 μ M 내지 약 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2,

2.3, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6 μM 또는 약 0.02, 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 μM 내지 약 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075, 또는 50 μM 의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자로, 한정하는 것은 아니지만, 티아민 및/또는 리보플라빈을 들 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 티아민을 약 0.025 μM 내지 약 50 μM , 예컨대, 약 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075, 또는 50 μM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 티아민을 약 0.025 μM 내지 약 45.075 μM , 약 1 μM 내지 약 40 μM , 약 5 μM 내지 약 35.075 μM , 약 10 μM 내지 약 50 μM , 또는 약 0.05 μM 내지 약 45.5 μM 의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 리보플라빈을 약 0.01 μM 내지 약 3 μM , 예컨대, 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 또는 3 μM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 리보플라빈을 약 0.01 μM 내지 약 2.05 μM , 약 1 μM 내지 약 2.95 μM , 약 0.05 μM 내지 약 3 μM , 약 0.08 μM 내지 약 1.55 μM , 또는 약 0.05 μM 내지 약 2.9 μM 의 양으로 포함한다.

[0106] 일부 구현예에서, 배양 배지는 하나 이상의 무기 염을 약 100 mg/L 내지 약 150 mg/L의 배양 배지(예컨대, 약 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 또는 150 mg/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위) 또는 약 100 mg/L 내지 약 150 mg/L의 배양 배지(예컨대, 약 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 또는 150 mg/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위)의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 무기 염으로, 한정하는 것은 아니지만, 칼슘 및/또는 마그네슘을 들 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 칼슘을 약 100 mg/L 내지 약 150 mg/L의 배양 배지, 예컨대, 약 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 또는 150 mg/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 아르기닌을 약 100 mg/L 내지 약 125 mg/L, 약 105 mg/L 내지 약 150 mg/L, 약 120 mg/L 내지 약 130 mg/L, 또는 약 100 mg/L 내지 약 145 mg/L의 배양 배지의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 마그네슘을 약 0.01 mM 내지 약 1 mM, 예컨대, 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 0.91, 0.92, 0.93, 0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, 0.99, 또는 1 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 마그네슘을 약 0.05 mM 내지 약 1 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.78 mM, 약 0.5 mM 내지 약 1 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.75 mM, 또는 약 0.25 mM 내지 약 0.95 mM의 양으로 포함한다.

[0107] 일부 구현예에서, 배양 배지는 탄소원을 약 1 g/L 내지 약 15 g/L의 배양 배지(예컨대, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위), 또는 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 g/L 내지 약 7, 8, 9, 또는 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 g/L의 배양 배지의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 탄소원으로, 한정하는 것은 아니지만, 글루코스 및/또는 피루브산염을 들 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 글루코스를 약 1 g/L 내지 약 12 g/L의 배양 배지, 예컨대, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 글루코스를 약 1 g/L 내지 약 6 g/L, 약 4 g/L 내지 약 12 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 10.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 11.5 g/L, 또는 약 2 g/L 내지 약 10 g/L의 배양 배지의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 피루브산염을 약 5 g/L 내지 약 15 g/L의 배양 배지, 예컨대, 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 피루브산염을 약 5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 10 g/L 내지 약 15 g/L, 약 7.5 g/L 내지 약 10.5 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 또는 약 8 g/L 내지 약 10 g/L의 배양 배지의 양으로 포함한다.

[0108] 일부 구현예에서, 배양 배지는 화학적 완충 시스템을 약 1 g/L 내지 약 4 g/L(예컨대, 약 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 또는 4 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위)의 배양 배지 또는 약 10 mM 내지 약 25 mM(예컨대, 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위)의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 화학적 완충 시스템으로, 한정하는 것은 아니지만, 중탄산 나트륨 및/또는 HEPES를 들 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 중탄산 나트륨을 약 1 g/L 내지 약 4 g/L의 배양 배지, 예컨대, 약 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 또는 4 g/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 중탄산 나트륨을 약 1 g/L 내지 약 3.75 g/L, 약 1.25 g/L 내지 약 4 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 4 g/L, 또는 약 2 g/L 내지 약 3.5 g/L의 배양 배지의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 HEPES를 약 10 mM 내지 약 25 mM, 예컨대, 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다.

일부 구현예에서, 배양 배지는 HEPES를 약 1 mM 내지 약 25 mM, 약 10 mM 내지 약 20 mM, 약 12.5 mM 내지 약 22.5 mM, 약 15 mM 내지 약 20.75 mM, 또는 약 10 mM 내지 약 20 mM의 양으로 포함한다.

[0109] 일부 구현예에서, 배양 배지는 하나 이상의 필수 아미노산을 약 0.5 mM 내지 약 5 mM(예컨대, 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위) 또는 약 0.5, 1, 1.5, 2 mM 내지 약 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 mM의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 필수 아미노산은 아르기닌 및/또는 시스테인이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 아르기닌을 약 0.5 mM 내지 약 5 mM, 예컨대, 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 아르기닌을 약 0.5 mM 내지 약 4.75 mM, 약 2 mM 내지 약 3.5 mM, 약 0.5 mM 내지 약 3.5 mM, 약 1 mM 내지 약 5 mM, 또는 약 3.5 mM 내지 약 5 mM의 양으로 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 시스테인을 약 0.5 mM 내지 약 5 mM, 예컨대, 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 시스테인을 약 0.5 mM 내지 약 4.75 mM, 약 2 mM 내지 약 3.5 mM, 약 0.5 mM 내지 약 3.5 mM, 약 1 mM 내지 약 5 mM, 또는 약 3.5 mM 내지 약 5 mM의 양으로 포함한다.

[0110] 일부 구현예에서, 배양 배지는 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자를 약 0.01 μ M 내지 약 50 μ M(예컨대, 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075, 또는 50 μ M 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위) 또는 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 또는 0.9 μ M 내지 약 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6 μ M 또는 약 0.02, 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 μ M 내지 약 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075, 또는 50 μ M의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자로, 한정하는 것은 아니지만, 티아민 및/또는 리보플라빈을 들 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 티아민을 약 0.025 μ M 내지 약 50 μ M, 예컨대, 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075, 또는 50 μ M 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 티아민을 약 0.025 μ M 내지 약 45.075 μ M, 약 1 μ M 내지 약 40 μ M, 약 5 μ M 내지 약 35.075 μ M, 약 10 μ M 내지 약 50 μ M, 또는 약 0.05 μ M 내지 약 45.5 μ M의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 리보플라빈을 약 0.01 μ M 내지 약 3 μ M, 예컨대, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 또는 3 μ M 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 리보플라빈을 약 0.01 μ M 내지 약 2.05 μ M, 약 1 μ M 내지 약 2.95 μ M, 약 0.05 μ M 내지 약 3 μ M, 약 0.08 μ M 내지 약 1.55 μ M, 또는 약 0.05 μ M 내지 약 2.9 μ M의 양으로 포함한다.

[0111] 일부 구현예에서, 배양 배지는 하나 이상의 무기 염을 약 100 mg/L 내지 약 150 mg/L의 배양 배지(예컨대, 약 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 또는 150 mg/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위) 또는 약 100 mg/L 내지 약 150 mg/L의 배양 배지(예컨대, 약 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 또는 150 mg/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 예시의 하나 이상의 무기 염은 칼슘 및/또는 마그네슘이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 칼슘을 약 100 mg/L 내지 약 150 mg/L의 배양 배지, 예컨대, 약 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 또는 150 mg/L 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 아르기닌을 약 100 mg/L 내지 약 125 mg/L, 약 105 mg/L 내지 약 150 mg/L, 약 120 mg/L 내지 약 130 mg/L, 또는 약 100 mg/L 내지 약 145 mg/L의 배양 배지의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 마그네슘을 약 0.01 mM 내지 약 1 mM, 예컨대, 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 0.91, 0.92, 0.93, 0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, 0.99, 또는 1 mM 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 마그네슘을 약 0.05 mM 내지 약 1 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.78 mM, 약 0.5 mM 내지 약 1 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.75 mM, 또는 약 0.25 mM 내지 약 0.95 mM의 양으로 포함한다.

[0112] 일부 구현예에서, 탄소원, 화학적 완충 시스템, 하나 이상의 필수 아미노산, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자, 및/또는 하나 이상의 무기 염은 식품 등급이다.

- [0113] 일부 구현예에서, 배양 배지는 락토제닉 배양 배지이고, 예컨대, 배양 배지는 프로락틴(예컨대, 포유류 프로락틴, 예컨대, 인간 프로락틴)을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 20 ng/mL 내지 약 200 ng/L의 배양 배지, 예컨대, 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 또는 200 ng/mL 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위의 양으로 프로락틴을 포함한다(또는 프로락틴이 첨가된다). 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 20 ng/mL 내지 약 195 ng/mL, 약 50 ng/mL 내지 약 150 ng/mL, 약 25 ng/mL 내지 약 175 ng/mL, 약 45 ng/mL 내지 약 200 ng/mL, 또는 약 75 ng/mL 내지 약 190 ng/mL의 배양 배지의 양으로 프로락틴을 포함한다(또는 프로락틴이 첨가된다). 일부 구현예에서, 방법은 프로락틴을 배양 배지에 첨가하고, 그로써 락토제닉 배양 배지를 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 프로락틴은 재조합 프로락틴(예컨대, 프로락틴 유전자의 위치 179의 세린 잔기의 아스파테이트로의 치환(S179D)을 포함하는 프로락틴, 예컨대, S179D-프로락틴)을 발현하는 미생물 세포 및/또는 인간 세포에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, 프로락틴을 배양 배지에 첨가하는 단계는 프로락틴을 발현하고 분비하는 세포를 배양함으로써 배양 배지를 조건화하고, 프로락틴을 포함하는 조건화된 배양 배지를 일차 유방 상피 세포의 단층의 기저면, 혼합 집단의 단층의 기저면, 또는 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 단층의 기저면에 적용하는 것을 포함한다.
- [0114] 일부 구현예에서, 배양 배지는, 한정하는 것은 아니지만, 인슐린, 표피 성장 인자, 및/또는 하이드로코르티손을 포함한, 효율을 개선하기 위한 다른 인자를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 다른 인자(예컨대, 인슐린, 표피 성장 인자, 및/또는 하이드로코르티손)를 배양 배지에, 예컨대 효율을 개선하기 위해 첨가하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0115] **배양 유제품의 생산 방법**
- [0116] 본원의 특정 구현예에서, 배양 유제품의 제조 방법이 개시된다. 일부 구현예에서, 방법은 본원에 기술된 생세포 구축물을 기저 구획 및 선단 구획을 포함하는 생물반응기에서 배양하는 단계를 포함하며, 기저 구획은 배양 배지를 포함하고 유방 세포는 배양 유제품을 선단 구획으로 분비한다.
- [0117] 일부 구현예에서, 생세포 구축물은 상부면 및 하부면을 포함하는 스캐폴드 및 선단면 및 기저면을 가지는, 살아있는 일차 유방 상피 세포의 분극화된 단층, 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단의 연속 분극화된 단층, 및/또는 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층을 포함하며, 여기서 살아있는 일차 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층, 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단의 연속 분극화된 단층 및/또는 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층은 스캐폴드의 상부면 상에 위치한다.
- [0118] 일부 구현예에서, 스캐폴드의 하부면은 기저 구획에 인접한다. 일부 구현예에서, 살아있는 일차 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층, 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단의 연속 분극화된 단층, 및/또는 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층의 선단면은 선단 구획에 인접한다. 일부 구현예에서, 살아있는 일차 상피 유방 세포의 연속 분극화된 단층, 살아있는 일차 유방 상피 세포, 유방 근상피 세포 및 유방 전구 세포의 혼합 집단의 연속 분극화된 단층의 살아있는 일차 상피 유방 세포, 또는 불멸화된 유방 상피 세포의 연속 분극화된 단층은 그것의 선단면을 통해 선단 구획으로 밀크를 분비하고, 그로써 배양물에서 밀크를 생산한다.
- [0119] 일부 구현예에서, 상피 유방 세포의 분극화된 단층은 선단 구획과 기저 구획을 나누는 장벽을 형성하며, 유방 세포의 기저면은 스캐폴드에 부착되고 선단면은 선단 구획을 향해 배향된다.
- [0120] 일부 구현예에서, 기저 구획은 스캐폴드의 하부면에 인접한다. 일부 구현예에서, 기저 구획은 유방 상피 세포의 분극화된 단층(예컨대, 일차 유방 상피 세포의 분극화된 단층, 혼합 집단의 분극화된 단층, 또는 살아있는 불멸화된 유방 상피 세포의 분극화된 단층)의 기저면과 유체 접촉한다.
- [0121] 일부 구현예에서, 배양 배지는 탄소원, 화학적 완충 시스템, 하나 이상의 필수 아미노산, 하나 이상의 비타민 및/또는 보조 인자, 및 하나 이상의 무기 염을 포함한다.
- [0122] 일부 구현예에서, 생물반응기는 단층의 선단면에 인접한 선단 구획을 포함한다. 일부 구현예에서, 선단 구획은 스캐폴드의 상부면에 인접한다.
- [0123] 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 적어도 10^{11} 유방 세포이다. 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 적어도 10^{12} 유방 세포이다. 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방

세포의 총 세포 밀도는 적어도 10^{13} 유방 세포이다.

[0124] 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 $100 \mu\text{m}^2$ 당 약 20 내지 55개 세포이다. 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 $100 \mu\text{m}^2$ 당 약 20개 세포이다. 일부 구현예에서 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 $100 \mu\text{m}^2$ 당 25개 세포이다. 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 $100 \mu\text{m}^2$ 당 약 30개 세포이다. 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 $100 \mu\text{m}^2$ 당 약 35개 세포이다. 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 $100 \mu\text{m}^2$ 당 약 40개 세포이다. 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 $100 \mu\text{m}^2$ 당 약 45개 세포이다. 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 $100 \mu\text{m}^2$ 당 약 50개 세포이다. 일부 구현예에서, 생물반응기에서 유방 세포의 총 세포 밀도는 $100 \mu\text{m}^2$ 당 약 55개 세포이다.

[0125] 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 1.5 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 2 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 2.5 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 3 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 4 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 5 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 10 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 15 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 20 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 25 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 50 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 100 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 250 m^2 이다. 일부 구현예에서, 생물반응기 내의 유방 세포의 총 표면적은 적어도 약 500 m^2 이다.

[0126] 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 27°C 내지 약 39°C 의 온도(예컨대, 약 27°C , 28°C , 29°C , 30°C , 31°C , 32°C , 33°C , 34°C , 35°C , 35.5°C , 36°C , 36.5°C , 37°C , 37.5°C , 38°C , 38.5°C 또는 약 39°C , 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위, 예컨대, 약 27°C 내지 약 38°C , 약 36°C 내지 약 39°C , 약 36.5°C 내지 약 39°C , 약 36.5°C 내지 약 37.5°C , 또는 약 36.5°C 내지 약 38°C 의 온도)를 유지한다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 37°C 의 온도를 유지한다.

[0127] 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 4% 내지 약 6%의 CO_2 의 대기 농도, 예컨대, 약 4%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 또는 6% 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위, 예컨대, 약 4% 내지 약 5.5%, 약 4.5% 내지 약 6%, 약 4.5% 내지 약 5.5%, 또는 약 5% 내지 약 6%의 CO_2 의 대기 농도를 가진다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 5%의 CO_2 의 대기 농도를 가진다.

[0128] 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 4% 내지 약 6%의 CO_2 의 대기 농도, 예컨대, 약 4%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 또는 6% 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위, 예컨대, 약 4% 내지 약 5.5%, 약 4.5% 내지 약 6%, 약 4.5% 내지 약 5.5%, 또는 약 5% 내지 약 6%의 CO_2 의 대기 농도를 가진다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 5%의 CO_2 의 대기 농도를 가진다.

[0129] 일부 구현예에서, 방법은 용해된 O_2 및 CO_2 의 농도를 모니터링하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 용해된 O_2 의 농도는 약 10% 내지 약 25% 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위(예컨대, 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25%)로 유지된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 용해된 O_2 의 농도는 약 12% 내지 약 25%, 약 15% 내지 약 22%, 약 10% 내지 약 20%, 약 15%, 약 20%, 또는 약 22%로 유지된다. 일부 구현예에서, CO_2 의 농도는 약 4% 내지 약 6%로, 예컨대, 약 4%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5%, 5.25%, 5.5%, 5.75%,

또는 6% 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위, 예컨대, 약 4% 내지 약 5.5%, 약 4.5% 내지 약 6%, 약 4.5% 내지 약 5.5%, 또는 약 5% 내지 약 6%)의 CO₂의 농도로 유지된다. 일부 구현예에서, CO₂의 농도는 약 5%로 유지된다.

[0130] 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 매일 내지 약 10일마다(예컨대, 1일마다, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 7일마다, 8일마다, 9일마다, 10일마다, 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위, 예컨대, 약 매일 내지 3일마다, 약 3일마다 내지 10일마다, 약 2일마다 내지 5일마다) 교환된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 매일 내지 약 수 시간마다 내지 약 10일마다, 예컨대, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24시간마다 내지 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일마다 또는 그 안의 임의의 값 또는 범위로 교환된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 12시간마다 내지 약 10일마다, 약 10시간마다 내지 약 5일마다, 또는 약 5시간마다 내지 약 3일마다 교환된다.

[0131] 일부 구현예에서, 방법은 배양 배지에서 및/또는 락토제닉 배양 배지에서 글루코스 농도 및/또는 글루코스 소비율을 모니터링하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로락틴은 배양 배지에서의 글루코스 소비율이 정상 상태일 때 첨가된다.

[0132] 일부 구현예에서, 방법은 상피 세포의 단층의 유지를 측정하기 위해 정상피 전기 저항(TEER)을 적용하는 단계를 추가로 포함한다. TEER는 2개 구획에서(예컨대, 선단 구획과 기저 구획 사이에서) 유체(예컨대, 배지)간 전압 차이를 측정하며, 만약 구획간 장벽이 무결성을 상실하면, 두 구획의 유체가 혼합될 수 있다. 유체 혼합이 있는 경우, 전압 차이는 감소되거나 제거될 것이다; 전압 차이는 장벽이 온전한 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, TEER에 의해 전압 상실이 검출될 때, 스캐폴드(예컨대, Transwell® 필터, 미세구조 생물반응기, 탈세포화된 조직, 중공 섬유 생물반응기, 등)는 추가적인 세포로 재집종되고 배양 유제품의 생산(예컨대, 밀크 생산)이 재개되기 전에 장벽(예컨대, 단층)이 재확립될 시간이 허용된다.

[0133] 일부 구현예에서, 방법은 선단 구획으로부터 배양 유제품을 수집하여 수집된 배양 유제품을 생산하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 수집은 포트를 통해, 중력을 통해, 및/또는 진공을 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 진공은 포트에 부착된다.

[0134] 일부 구현예에서, 방법은 수집된 배양 유제품을 냉동하여 냉동된 배양 유제품을 생산하고/하거나 수집된 배양 유제품을 동결건조하여 동결건조된 배양 유제품을 생산하는 단계를 추가로 포함한다.

[0135] 일부 구현예에서, 방법은 수집된 배양 유제품, 냉동된 배양 유제품 및/또는 동결건조된 배양 유제품을 용기에 포장하는 단계를 추가로 포함한다.

[0136] 일부 구현예에서, 방법은 수집된 배양 유제품으로부터 하나 이상의 성분을 추출하는 단계를 포함한다. 수집된 배양 유제품으로부터의 성분의 비제한적인 예로는 밀크 단백질, 지질, 탄수화물, 비타민, 및/또는 미네랄 내용물을 들 수 있다. 일부 구현예에서, 수집된 배양 유제품으로부터의 성분은 동결건조되고/되거나 농축되어, 동결건조된 또는 농축된 배양 유제품 성분 제품이 생산된다. 일부 구현예에서, 수집된 배양 유제품으로부터의 성분은, 예컨대, 막 여과 및/또는 역삼투에 의해 농축된다. 일부 구현예에서, 동결건조된 또는 농축된 배양 유제품 성분 제품은 용기에 포장되며, 선택적으로 용기는 멸균된 및/또는 식품 등급 용기이다. 일부 구현예에서, 용기는 진공 밀봉된다. 일부 구현예에서, 용기는 캐니스터, 항아리, 병, 가방, 상자, 또는 파우치이다.

[0137] **배양 유제품**

[0138] 본원의 특정 구현예에서, 배양 유제품이 개시된다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 표준화된, 멸균 배양 유제품이다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 영양용이다.

[0139] 일부 구현예에서, 배양 유제품은 본원에 개시된 임의의 방법에 의해 생산된다.

[0140] 모유는 낮지만 측정 가능한 농도의 환경 오염물질, 산업체 및 환경에 널리 퍼져 있는 제조 제품으로부터의 건강을 해치는 화학물질을 함유한다. 환경 오염물질은 부분적으로 모유에서 분비된다. 모유에서의 오염물질 수준은 모체에서의 오염물질 수준을 반영하는 것이므로 노출 수준을 모니터링하는 데 이상적이다. 독성 환경 오염물질은 어머니로부터 유아에게 모유수유를 통해 전달될 수 있다. 잔류성 유기 오염물질(POP)은 지방 조직에 생체 축적되고 지속적인 독성 신체 부담을 생성하는 친유성 안정적 화학물질 계열이다. 모유수유는 인간 삶의 초기에 POP에 대한 노출의 중요한 공급원을 제공하며, 그 효과는 알려져 있지 않다.

[0141] 일부 구현예에서, 배양 유제품은 하나 이상의 환경 오염물질을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 잔류성 유기 오염물질(POP)을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양

유제품은 폴리염화 다이벤조-p-다이옥신(PCDD), 폴리염화 다이벤조퓨란(PCDF), 폴리염화 비페닐(PCB) 및 DDT와 같은 살충제를 포함하지 않거나 실질적으로 없다.

[0142] 수은, 납, 비소, 카드뮴, 니켈, 크롬, 코발트, 아연, 및 환경 전체에 분산되어 있는 기타 잠재적으로 독성인 금속과 같은 중금속이 또한 인유에서 축적되는 것으로 알려진 생체축적 특징을 가지며 그로써 수유 중인 유아에게 관심이 있다. 모유의 금속은 외인성 공급원, 즉, 오염된 공기, 식품, 및 식수를 통한 흡수, 및 필수 미량 원소와 함께 내인성 방출로부터 기원한다. 예를 들어, 납과 수은은 인간 먹이 사슬에 똑같이 분산되어 있고, 그것들의 태아 발달에 미치는 영향은 어머니의 식단과 영양 상태에 의해 크게 결정된다. 독성 금속에 대한 노출은 작은 농도 및 급성 노출에서도 공중 보건에 중요한 영향을 미치며, 이들 금속은 인간에게 독성을 남긴다. 수유 중인 유아는 최고 민감한 기간에 독성 금속에 노출될 수 있다. 수유 중인 유아는 모유를 통해 적정량을 초과하여 중금속에 노출될 수 있고, 노출은 유아에게 건강상의 영향을 미칠 수 있다. 특히 유아의 경우, 이들 노출은 발달 중인 중추신경계에 해로운 영향을 미쳐서, 그들의 인지 능력에 평생 결함을 남긴다.

[0143] 일부 구현예에서, 배양 유제품은 하나 이상의 중금속, 예컨대 비소, 납, 카드뮴, 니켈, 수은, 크롬, 코발트, 및 아연을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 비소를 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 납을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 카드뮴을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 니켈을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 수은을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 크롬을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 코발트를 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 아연을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 비소, 납, 카드뮴, 니켈, 수은, 크롬, 코발트, 및 아연을 포함하지 않거나 실질적으로 없다.

[0144] 외래 알레르기 유발 단백질은 내인성 인유 단백질과 구별하기 어려울 수 있다. 인유에서 검출된 알레르기 유발 잠재력을 가진 식품 단백질로는 계란 및 땅콩 단백질을 들 수 있다. 미국에서 심각한 식품 알레르기 반응의 대부분의 원인이 되는, 빅 8로서 알려져 있는 8가지의 주요 식품 알레르겐이 있다. 빅 8 목록은 밀크, 난, 생선, 갑각류 조개류, 견과류, 땅콩, 밀, 및 대두 알레르겐으로 구성된다. 난 알레르기를 유발하는 것으로 알려져 있는 단백질로는 오보뮤코이드, 오브알부민, 및 콘알부민을 들 수 있다. 땅콩 단백질로는 아라킨 6, 아라킨 3, 콘아라킨, 주요 알레르겐 Arah1, 및 아라킨 Arah2를 들 수 있다. 모유로 전달되는 산모의 식이 단백질 수송의 예로서, 하루에 한 개의 난의 소비가 난을 피하는 어머니와 비교하여 인유에서 더 높은 농도의 계란 알레르겐 오브알부민(OVA)으로 이어지는 것으로 나타났다.

[0145] 일부 구현예에서, 배양 유제품은 하나 이상의 식품 알레르겐을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 난, 생선, 갑각류 조개류, 견과류, 땅콩, 밀, 및 대두 알레르겐을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 난 알레르겐을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 생선 알레르겐을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 갑각류 알레르겐을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 견과류 알레르겐을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 땅콩 알레르겐을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 밀 알레르겐을 포함하지 않거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 배양 유제품은 대두 알레르겐을 포함하지 않거나 실질적으로 없다.

[0146] 일부 구현예에서, 배양 유제품은 아라킨 6, 아라킨 3, 콘아라킨, 및 아라킨 Arah2를 포함하지 않거나 실질적으로 없다.

[0147] 일부 구현예에서, 배양 유제품은 오브알부민(OVA)을 포함하지 않거나 실질적으로 없다.

[0148] 본 발명이 기술되었고, 이것은 단지 예시의 목적으로 본원에 포함되고, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는 다음의 실시예에서 더욱 상세하게 설명될 것이다.

[0149] 실시예

[0150] 실시예 1:

[0151] 밀크의 수집을 위해 설계된 세포 배양 시스템은 밀크가 세포에 영양소를 제공하는 배지에 노출되지 않도록 제품의 구획화된 분비를 지지해야 한다. 몸에서 밀크를 생산하는 상피 세포는 연속 단층으로서 유선의 내면에 있어서 있다. 단층은 기저면이 밑에 있는 기저막에 부착되도록 배향되어 있는 한편, 밀크는 선단면으로부터 분비되어 착유 또는 수유 중에 제거될 때까지 폐포, 또는 유선의 루미날 구획에 보관된다. 세포의 측면을 따라 밀착된

접합은 밑에 있는 조직과 폐포 구획에 위치한 밀크 사이의 장벽을 보장한다. 그러므로, 생체내에서, 유선의 조직은 밀크 분비가 구획화되도록 배열되고, 이때 유방 상피 세포는 자체적으로 계면을 확립하고 지향적인 영양소 흡수 및 밀크 분비를 유지한다.

[0152] 본 개시는 신체 외부에서 성장한 유방 상피 세포로부터 밀크를 수집하기 위해 사용되는 유선의 구획화 능력을 요약하여 설명하는 세포 배양 장치를 기술한다. 그러한 장치는 두 구획 사이의 계면에서 유방 세포의 증식을 지지하는 스캐폴드를 포함하여서, 상피 단층이 영양 배지와 분비된 밀크 사이에 물리적 경계를 제공할 수 있다. 성장을 위한 표면을 제공하는 것 외에, 스캐폴드는 세포의 분극화를 안내하고 흡수 및 분비의 지향성을 보장하는 공간적 신호를 제공한다. 본 발명은 영양용 밀크의 생산 및 수집을 위한 구획화 세포 배양 장치에서 유방 상피 세포의 제조, 배양, 및 자극을 기술한다(예컨대, 도 1 참고).

[0153] 유방 상피 세포의 제조. 유방 상피 세포를 절개된 유방 조직(예컨대, 가슴, 유방, 유두)의 외과적 외식편, 생검 샘플, 또는 생모유로부터 얻는다. 일반적으로, 유방 조직의 외과적 절개 후, 임의의 지방 또는 간질 조직을 무균 조건 하에서 수동으로 제거하고, 남아 있는 유선 조직을 화학적으로 정의된 영양 배지에서 제조한, "일반적으로 안전한 것으로 인정된"(GRAS) 성분으로 구성되어야 하는 콜라게나제 및/또는 히알루로니다제로 효소적으로 소화시킨다. 샘플을 부드럽게 교반하면서 37℃에서 유지시킨다. 소화 후에, 원심분리에 의해 또는 샘플을 멸균 나일론 세포 스트레이너를 통해 부음으로써 단일 세포 또는 오가노이드의 현탁액을 수집한다. 세포 현탁액을 그런 후 적절한 세포의 매트릭스 성분(예컨대, 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴)으로 코팅된 조직 배양 플레이트로 옮긴다.

[0154] 대안으로, 외식편 표본을 예를 들어 멸균된 메스로 다짐으로써 작은 조각으로 처리할 수 있다. 조직 조각을 젤라틴 스폰지 또는 적절한 세포의 매트릭스로 코팅된 플라스틱 조직 배양 플레이트와 같은 적합한 표면 위로 플레이팅한다.

[0155] 플레이팅된 세포를 5% CO₂ 분위기의 가슴 인큐베이터에서 37℃로 유지한다. 인큐베이션 중에, 배지를 1일 내지 3일마다 교환하고 세포를 후속 처리를 위해 충분한 생존 세포 수가 달성될 때까지 계대배양하며, 후속 처리는 액체 질소에서의 보관을 위한 제조; SV40, TERT, 또는 노화와 관련된 다른 유전자와 같은 유전자의 안정적인 형질주입을 통한 불멸화된 세포주의 개발; 예를 들어, 형광 활성화 세포 분류에 의한 유방 상피, 근상피, 및 줄기/전구 세포 유형의 분리; 및/또는 인간 소비를 위한 밀크의 생산 및 수집을 위한 구획화 조직 배양 장치로의 도입을 포함한다.

[0156] 밀크 생산을 위한 유방 상피 세포의 배양. 영양용 밀크는, 상기 기술된 것과 같이 분리되고 영양 배지와 생성물 사이의 분리가 유지되도록 구획화된 분비를 지지하는 방식으로 배양된 유방 상피 세포에 의해 생산된다. 시스템은 유방 상피 세포가 밀크가 분비되는 곳인 선단 구획과 영양 배지가 제공되는 곳인 기저 구획 사이의 계면에 위치한 적절한 스캐폴드 위로 시딩될 때 적절한 선단-기저 극성을 가진 연속 단층을 확립하는 능력에 의존한다(예컨대, 도 2 참고). 예를 들어, 조직 배양 플레이트에 위치한 Transwell® 필터, 뿐만 아니라 중공 섬유 또는 미세구조 스캐폴드를 토대로 한 생물반응기가 이들 특징을 지지하기 위해 사용된다.

[0157] 유방 상피 세포의 분리 및 팽창 후에, 세포를 식품 등급 성분으로 구성된 화학적으로 정의된 영양 배지에 현탁하고 세포의 기질 단백질, 예컨대 콜라겐, 라미닌, 및/또는 피브로넥틴의 혼합물로 사전 코팅되어 있는 배양 장치에 접종한다. 세포 배양 장치는 영양소의 구획화된 흡수 및 분극화된, 합류, 상피 단층으로부터 제품의 분비를 허용하는 임의의 설계이다. 예로는 중공 섬유 및 미세구조 스캐폴드 생물반응기를 들 수 있다(예컨대, 각각 도 3 및 4 참고). 대안으로 다른 삼차원 조직 배양 방법, 예컨대 탈세포화된 유선의 스캐폴드로서의 제조, 시험관 내에서 기능적 기관을 생성하기 위한 줄기 세포로의 재증식, 또는 하이드로겔 매트릭스 또는 현탁액에서 성장된 유선 상피 세포 오가노이드 또는 "맘모스피어"의 루멘으로부터의 밀크의 수집을 들 수 있다.

[0158] 장치는 약 5% CO₂의 가슴 분위기에서 약 37℃의 온도를 유지하는 밀봉된 하우징을 포함한다. 글루코스 흡수를 모니터링하여 세포가 생물반응기 내에서 증식함에 따른 배양의 성장을 평가하였다. 글루코스 소비의 안정화는 세포가 합류, 접촉 억제 상태에 도달한 것을 나타낸다. 단층의 무결성을 경상피 전기 저항을 사용하여 보장한다. 센서는 다수의 위치에서 배지의 용해된 O₂ 및 CO₂의 농도를 모니터링한다. 전산화된 펌프는 생물반응기를 통해 영양소의 전달을 암모니아 및 락테이트와 같은 대사 폐기물의 제거와 균형을 이루는 속도로 배지를 순환시킨다. 배지는 폐기물의 제거 후에 락테이트 보충 및 적응 기술을 사용하여 시스템을 통해(Freund et al. 2018 *Int J Mol Sci.* 19(2)) 또는 패키징된 제올라이트 챔버를 통과함으로써 재활용될 수 있다.

[0159] 밀크 생산의 자극. 생체내에서 및 배양된 유방 상피 세포에서, 밀크의 생산 및 분비는 프로락틴에 의해 자극된

다. 배양물에서, 프로락틴은 수유 중에 몸에서 관찰되는 것과 거의 유사한 농도, 예컨대, 약 20 ng/mL 내지 약 200 ng/mL로 영양 배지로 외부에서 공급될 수 있다. 정제된 프로락틴은 상업적으로 입수 가능할 수 있다; 그러나, 미생물 또는 포유류 세포 배양으로부터의 재조합 단백질의 발현 및 정제를 포함한, 프로락틴을 제공하는 또는 수유를 자극하는 대체 방법이 사용된다. 대안으로, 프로락틴을 발현하고 분비하는 세포를 배양함으로써 제조된 조건화된 배지가 수유를 자극하기 위해 유방 상피 세포 배양물에 적용될 수 있다. 생물반응기는 프로락틴을 발현하는 세포의 배양을 통해 계대되는 배지 또는 다른 핵심 배지 보충물이 기술된 구획화 배양 배지에서 성장된 유방 세포에 노출되기 전에 조건화되도록 연속적으로 설정될 수 있다.

[0160] 밀크 생산을 상향조절하고/하거나 외인성 프로락틴의 사용을 비축하기 위한 다른 접근법으로는, 예컨대 다음과 같이 프로락틴을 유방 상피 세포의 표면 상의 그것의 수용체에 결합시킴으로써 조절되는 신호전달 경로의 분자 조작을 들 수 있다: (a) 프로락틴의 번역후 변형을 표적화하는 구축물의 발현; (b) 프로락틴 수용체의 대체 아이소타입의 발현; (c) 세포의 도메인이 상이한 리간드에 대한 결합 부위로 교환되는 키메라 프로락틴 수용체의 발현; (d) 구성적으로 또는 조건부로 활성화된 프로락틴 수용체 또는 STAT5 또는 Akt와 같은 그것의 하류 이펙터의 변형된 버전을 암호화하는 유전자의 도입; (e) PER2 개일 유전자의 녹아웃 또는 변형; 및/또는 (f) 유방 상피 단층의 기저면에서 영양소 흡수율을 증가시킬 목적의 분자 접근법.

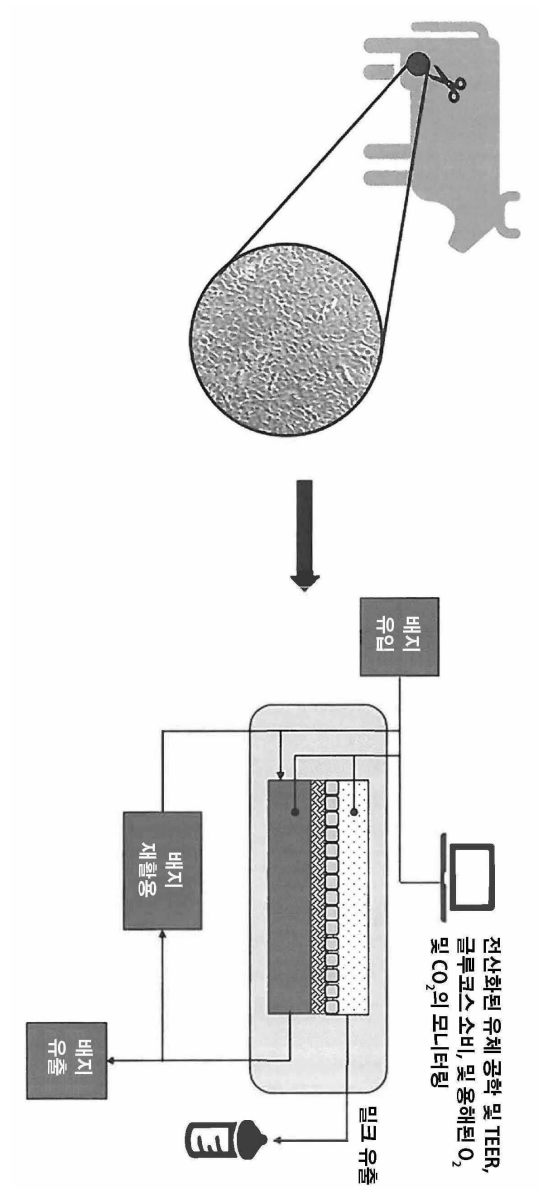
[0161] 밀크의 수집. 분비된 밀크를, 예를 들어, 배양 장치의 선단 구획에 설치된 포트를 통해 연속적으로 또는 간격을 두고 수집한다. 진공을 포트에 적용하여 수집을 용이하게 하고 또한 추가 생산의 자극에 기여한다. 수집된 밀크를 멸균 용기에 포장하고 분배를 위해 밀봉하고, 보관을 위해 냉동 또는 동결건조하거나, 또는 특정 성분의 추출을 위해 처리한다.

[0162] 본 발명은 영양용 밀크의 생산을 위한 유방 상피 세포 배양을 제공한다. 인유 외에, 이 방법은 예를 들어, 인간이 소비하거나 또는 수의학적으로 사용하기 위해 다른 포유류 종으로부터 밀크를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 이전에는 몸 밖에서 밀크를 생산하는 것이 가능하지 않았기 때문에, 이 기술은 기존 제품에 대한 대체 생산 방식을 제공하는 것 외에 신규한 상업적 기회를 초래할 수 있다. 이 기술의 상업적 개발의 사회적 및 경제적 효과는 광범위하고 멀리까지 도달한다. 배양된 세포로부터 인유의 생산은 식량이 부족한 지역사회에서 유아 영양실조를 해결하기 위한 수단을 제공할 수 있고, 모유수유를 할 수 없는 미숙아에게 필수 영양소를 제공하고, 유아용 조제 분유의 편리함으로 최적의 영양을 제공하는 자신의 아기들에 대한 새로운 수유 옵션을 엄마에게 제공한다. 소 또는 염소 밀크의 생산은 동물 농업의 환경적, 사회적, 및 동물 복지 효과를 감소시키는 효과를 제공한다. 본원에서 기술된 공정은 부상하는 세포 농업 분야의 중요한 격차를 해결하며 가장 기본적인 우리의 영양 공급원에 대한 생물학적 및 문화적 애착을 손상시키지 않으면서 인간의 식량 공급을 극적으로 업데이트할 수 있는 기회를 도입한다.

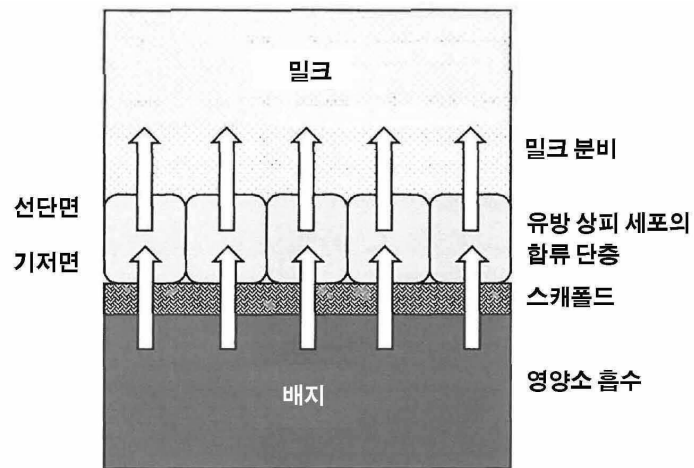
[0163] 전술한 실시예는 본 발명의 예시이며, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 비록 발명이 바람직한 구현예를 참조로 상세하게 기술되었지만, 변형 및 수정이 다음의 청구범위에서 기술되고 정의된 본 발명의 범주 및 사상 내에 존재한다.

도면

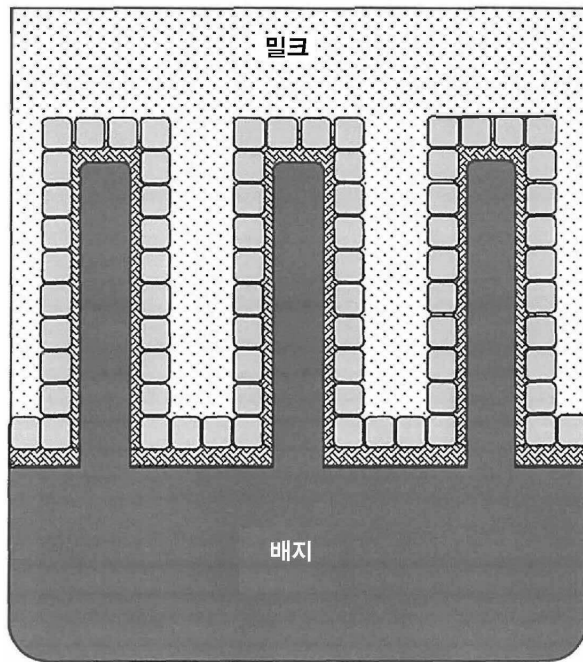
도면1



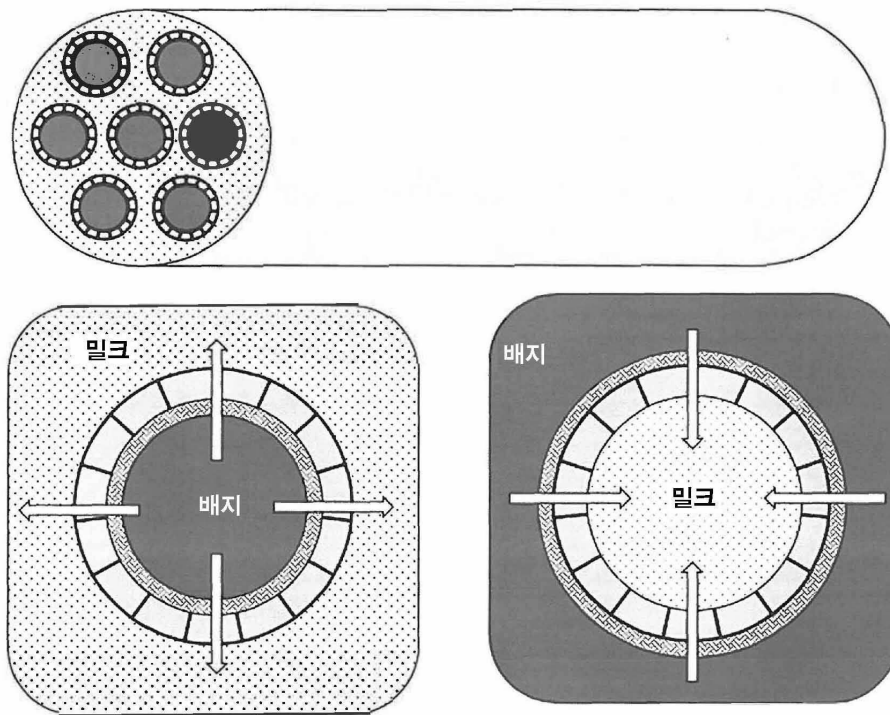
도면2



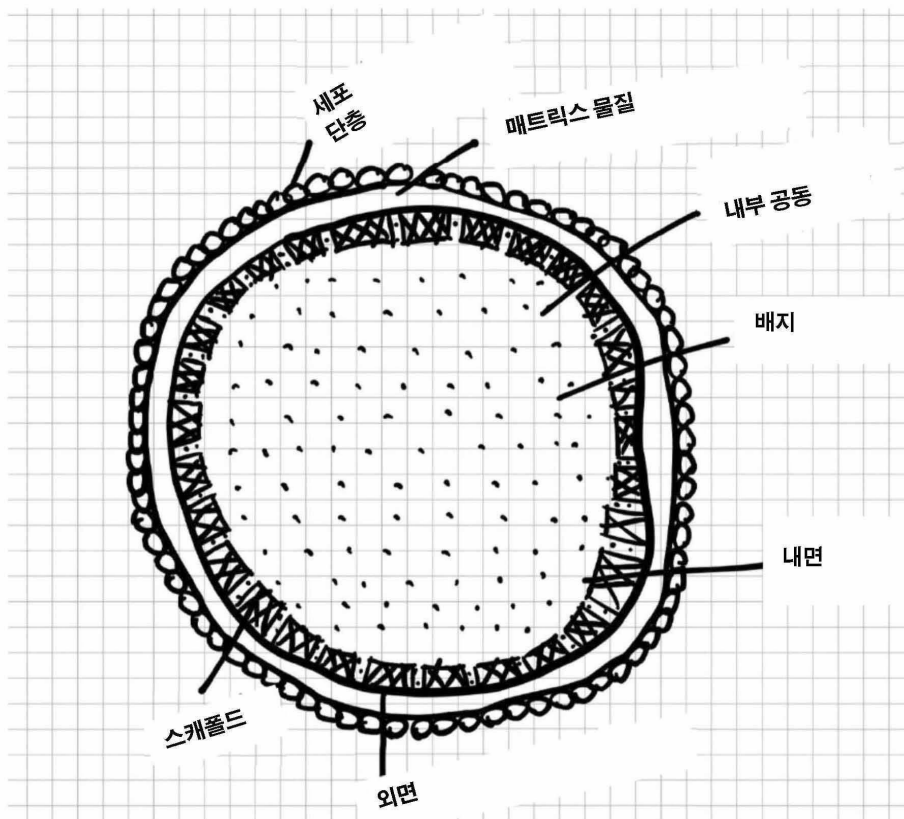
도면3



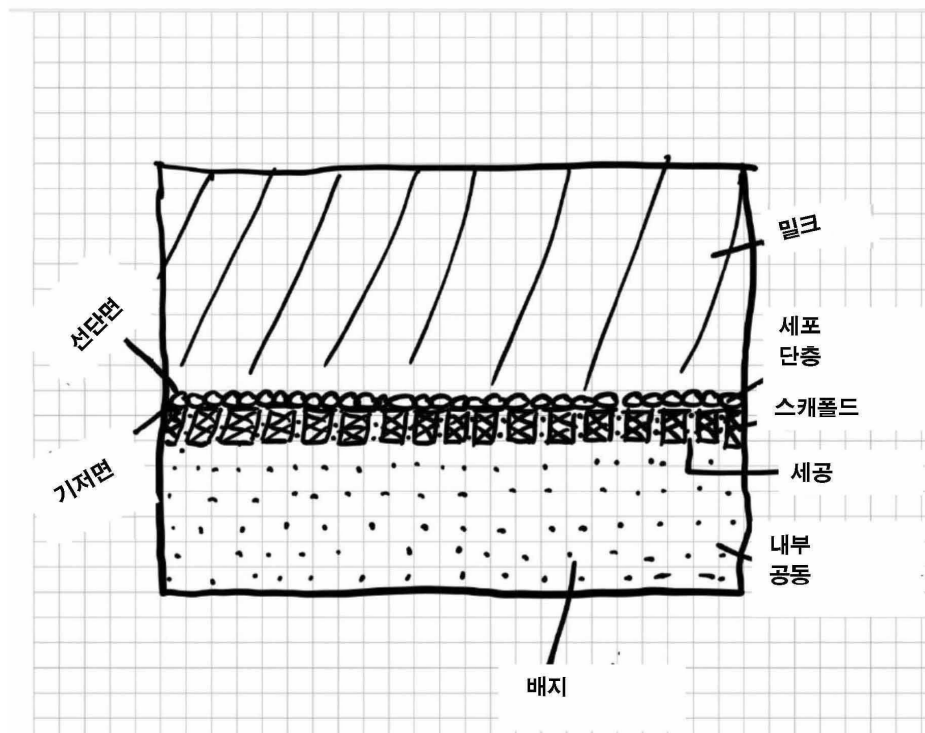
도면4



도면5



도면6



도면7

