(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0094554
(43) 공개일자 2021년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0735 (2010.01) *A23J 1/00* (2006.01)
A23K 10/20 (2016.01) *A23L 13/50* (2016.01)
A23L 13/60 (2016.01) *A23L 23/00* (2016.01)
A23L 33/17 (2016.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0606 (2013.01)
A23J 1/00 (2021.05)
(21) 출원번호 10-2021-7016496
(22) 출원일자(국제) 2019년11월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년05월28일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/082218
(87) 국제공개번호 WO 2020/104650
국제공개일자 2020년05월28일
(30) 우선권주장
18208055.6 2018년11월23일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
발네바 에스이
프랑스, 생-헤블랑 낭트 - 44800 알랑 봉바르 루 6
(72) 발명자
게헨네 파비엔느
프랑스 44360 르 떵쁠르 드 브흐따뉴 4 뤼 드 라 클로즈 뒤 뤼아드
레옹 아르노
프랑스 44000 낭트 3 뤼 프랑수아 리즈
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 **조류 줄기 세포를 포함하는 식품**

(57) 요 약

인간 및 동물 소비를 위한 합성 고기 제품 및 그러한 식품을 생산하는 방법이 개시된다. 합성 식품은 제어된 조건 하에서 화학적으로 정의된 무혈청 배양 배지에서 *시험관 내* 성장한 조류 세포의 세포 바이오매스를 포함하거나 이것으로 본질적으로 구성되며 임의의 위험한 오염물질을 함유하지 않는다.

(52) CPC특허분류
A23K 10/20 (2016.05)
A23L 13/50 (2016.08)
A23L 13/65 (2016.08)
A23L 23/00 (2016.08)
A23L 33/17 (2016.08)
C12N 2501/105 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/125 (2013.01)
C12N 2501/2306 (2013.01)
(72) 발명자
마들린느 브라이스
프랑스 44220 꾸에홍 13 비 뤼 데 프헤리
모로 카린느
프랑스 44680 숍므 엉 헷쯔 2 뤼 데 모아소누아-셰메히

명 세 서

청구범위

청구항 1

조류 세포주를 현탁액에서 배양하는 것을 포함하는, 인간 또는 동물 소비를 위한 영양 식품을 "시험관 내에서" 생산하는 공정으로서, 상기 조류 세포주는 i) 조류 배아 줄기 세포로부터 유래되고, ii) 외인성 성장 인자, 피더 세포(feeder cell) 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 기초 배양 배지에서 증식할 수 있으며, iii) 현탁액에서 연속적으로 성장할 수 있는, 공정.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조류 세포주는

a) 산란 주위의 발달 단계에서 배아(들)로부터 조류 배아 줄기 세포를 단리하는 단계;

b) 적어도 하나의 외인성 성장 인자 SCF, IGF-1, bFGF, IL-6, IL-6R 및/또는 CNTF, 피더 세포 층 및 동물 혈청을 포함하는 기초 배양 배지에서 적어도 20 계대(passage) 동안 상기 세포를 배양하는 단계;

c) 상기 성장 인자, 피더 세포 및 동물 혈청의 점진적 박탈에 의해 상기 배양 배지를 변형시키고 적어도 여러 계대 동안 상기 세포를 추가로 배양하는 단계; 및

d) 단계 c)의 세포를 현탁액에 적응시켜,

적어도 50일 동안 외인성 성장 인자, 피더 세포 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 기초 배양 배지에서 증식할 수 있는 확립된 조류 세포주를 수득하는 단계를 포함하는 공정에 의해 수득되는, 공정.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조류 세포주는

a) 산란 주위의 발달 단계에서 배아(들)로부터 조류 배아 줄기 세포를 단리하는 단계;

b) 외인성 성장 인자 IGF-1 및 CNTF, 피더 세포 층 및 동물 혈청을 포함하는 기초 배양 배지에서 적어도 1 계대 동안 상기 세포를 배양하는 단계;

c) 단계 b)의 배양물로부터 상기 성장 인자를 점진적으로 회수하고 적어도 1 계대 동안 추가로 성장시키는 단계;

d) 단계 c)의 배양물로부터 상기 피더 세포를 점진적으로 회수하고 적어도 1 계대 동안 추가로 성장시키는 단계;

e) 단계 d)의 배양물로부터 상기 동물 혈청을 점진적으로 회수하고 적어도 1 계대 동안 추가로 성장시키는 단계; 및

f) 단계 e)의 세포를 현탁액에 적응시켜,

외인성 성장 인자, 피더 세포 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 기초 배지에서 증식할 수 있는 연속 조류 세포주를 수득하는 단계를 포함하는 공정에 의해 수득되는, 공정.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조류 세포주는 닭 배아 줄기 세포로부터 유래되는, 공정.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조류 세포주는 오리 배아 줄기 세포로부터 유래되는, 공정.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조류 세포주는 기능적 내인성 레트로바이러스 또는 다른 바이

러스 입자가 없는, 공정.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조류 세포주는 SPF 종으로부터 유래되는, 공정.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조류 세포주는 닭 EB14, 닭 EB 라인 0, 닭 EBv13, 닭 DL43, 닭 DL46, 오리 EB24, 오리 EB26 및 오리 EB66 세포주로 구성된 군으로부터 선택되는, 공정.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조류 세포주는 닭 DL43, 닭 DL46, 오리 EB24 및 오리 EB26 세포주로 구성된 군으로부터 선택되는, 공정.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조류 세포주는 닭 DL43 또는 오리 EB26인, 공정.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포주는 인간 및/또는 동물에 대한 유해 물질이 없는 합성 또는 화학적으로 정의된(CD) 배지인 배양 배지에서 성장되는, 공정.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 합성 배지는 Ex-Cell® GRO-I 및/또는 HYQ CDM4 조류 배지인, 공정.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 합성 또는 CD 배지는 아미노산, 뉴클레오티드, 비타민, 당류, 지방산, 베타-메르캅토-에탄올, 인슐린, 글리신, 콜린, 플루론산 F-68 및 피루브산 나트륨으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 성분(들)으로 추가로 보충되는, 공정.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 성분은 0 내지 12 mM, 바람직하게는 1 내지 5 mM, 보다 바람직하게는 약 2.5 mM의 농도로 사용되는 L-글루타민인, 공정.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 배지는 식물 및/또는 효모 가수분해물을 추가로 함유하는, 공정.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 배지는 혈청을 포함하는 임의의 동물성 생성물이 없는, 공정.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포주는 유가(fed-batch) 조건 하에서 배양되는, 공정.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포주는 관류(perfusion) 조건 하에서 배양되는, 공정.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 30 리터, 50 리터, 100 리터, 1000 리터, 바람직하게는 10,000 리터 이상의 부피를 갖는 생물 반응기에서 배양되는, 공정.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포주는 온도 약 37℃, pH 7.2, pO_2 약 50%에서 약 40 rpm 이상의 교반 속도로 배양되는, 공정.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포주는 세포 밀도가 약 10^7 세포/mL에 도달할 때까지 배양되는, 공정.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포주는 세포 밀도가 약 10^8 세포/mL에 도달할 때까지 배양되는, 공정.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포주는 세포 밀도가 10^8 세포/mL 초과에 도달할 때까지 배양되는, 공정.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공정의 수율은 배지 g당 적어도 약 0.5 내지 1 g 바이오매스(biomass)인, 공정.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 침강 및 경사 분리에 의한 세포 바이오매스 수확 단계를 추가로 포함하는, 공정.

청구항 26

제25항에 있어서, 세포 침강은 세포 현탁액에 칼슘 염을 첨가함으로써 수행되는, 공정.

청구항 27

제26항에 있어서, 칼슘 염은 10 내지 500 mg/L, 바람직하게는 50 내지 300 mg/L, 더 바람직하게는 50 mg/L의 최종 농도에서 사용되는 염화칼슘인, 공정.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, (비타민, 공-비타민(co-vitamin), 미네랄, 필수 아미노산, 필수 지방산, 효소 및 항산화제를 포함하는 군으로부터 선택된) 식품의 영양가를 증가시키는 하나 이상의 성분(들)을 상기 세포 바이오매스에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 공정.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 향미제(들), 향미 방향족(들) 및/또는 착색제(들)를 상기 세포 바이오매스에 첨가하는 것을 추가로 포함하는, 공정.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 냉각, 냉동, 고형화, 건조, 산세(pickling), 비등, 조리, 베이킹, 튀김, 훈연, 3D 인쇄 및 포장으로부터 선택된 하나 이상의 식품 가공 단계(들)를 추가로 포함하는, 공정.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 공정에 의해 생산된 영양 식품.

청구항 32

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 공정에 의해 생산된 세포 바이오매스.

청구항 33

인간 또는 동물 소비를 위한 합성 식품을 생산하기 위한 제32항의 세포 바이오매스의 용도.

청구항 34

제32항의 세포 바이오매스를 포함하거나 이것으로 본질적으로 구성되는 합성 식품.

청구항 35

제31항 또는 제34항에 있어서, 비-인간 근육 세포, 지방 세포 또는 연골 세포 또는 이들의 조합과 같은 다른 세포를 추가로 포함하며, 이는 조류 세포와 함께 시험관 내에서 성장하거나 조류 세포 수확 후에 첨가되는, 합성 식품.

청구항 36

제31항, 제34항 및 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 미네랄, 비타민, 공-비타민, 필수 지방산, 필수 아미노산, 효소 및 항산화제, 또는 이들의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된 영양가를 향상시키는 추가 성분을 추가로 포함하는, 합성 식품.

청구항 37

제31항, 제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 향미제(들), 향미 방향족(들) 및/또는 착색제(들), 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는, 합성 식품.

청구항 38

제31항, 제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식품은 페이스트, 퓌레(puree), 수프, 파이, 분말, 과립, 칩, 정제, 캡슐, 스프레드 및 소시지를 포함하는 군으로부터 선택된 임의의 소비 형태로 가공되는, 합성 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 분야는 인간 및/또는 동물 소비를 위한 합성 영양 식품의 산업적 생산에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 음식 또는 영양 보충제로 적합한 세포 바이오매스(biomass)를 생산하기 위한 조류 세포주, 특히 배아 유래의 줄기 세포로부터 유래된 닭 또는 오리 ES 세포주의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 이러한 합성 식품을 생산하는 방법 및 제품 자체를 포함한다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계 고기 생산은 지난 50년 동안 빠르게 증가했다. 즉, 1961년 이후 전 세계 총 생산량은 4배 내지 5배 증가했다(문헌[Ritchie and Roser, 2018]). 2014년에 총 고기 생산량은 약 3억 톤이었으며 대부분 가금류, 돼지고기, 소고기였다. 동시에 총 가축은 약 14억 마리의 소, 12억 마리의 양, 10억 마리의 염소, 약 10억 마리의 돼지였으며 주로 아시아 수요 증가로 인해 매우 강한 증가 추세를 보였다. 1인당 총 고기 소비는 지난 50년 동안 두 배로 증가했다. 즉, 고기 소비는 개체군(population) 증가보다 더 높다. 또한 2030년에 세계 고기 소비는 2015년에 비해 25% 증가할 것이고 2050년에는 4억 6천만 톤에 이를 것으로 예상된다(GEAS 2012).

[0003] 이 인상적인 성장의 다른 측면은 예상되는 추세에 따라 더 증가할 현재의 동물 고기 생산과 관련된 심각한 문제이다.

[0004] 첫째, 통상적인 동물 고기 생산 방법은 매우 비효율적이다. 모든 농업적으로 생산된 곡물의 상당 부분은 동물 소비에 사용된다. 또한, 1파운드의 고기를 생산하려면 수천 파운드의 물이 필요하다. 예를 들어, 1 kg의 돼지, 양/염소 또는 소 고기를 생산하려면 각각 5988, 8768 및 15415 리터의 물이 필요하다(문헌[Mekonnen and

Hoekstra, 2010]). 그럼에도 불구하고, 현재의 노력은 호르몬과 항생제를 사용하여 곡물과 물을 덜 소비함으로써 가축 성장을 고정시키는 데 초점을 맞추고 있다. 그러나, 이러한 개발은 가축 고기가 성장 호르몬(특히 테스토스테론, 프로게스테론, 에스트로겐 또는 이들의 합성 유도체와 같은 스테로이드 호르몬)으로 오염되고 항생제가 공중 보건에 위협이 되는 다른 문제로 이어진다(문헌[Galbraith, 2002; Jeong et al. al., 2010]).

[0005] 둘째, 축산업의 강화는 전 세계에 걸쳐 병원균과 신종 질병의 빠른 확산과 관련이 있다(문헌[Greger, 2007]). 살모넬라(Salmonella), 캠피로박터(Campylobacter) 및 대장균(Escherichia coli)과 같은 식품매개성(foodborne) 병원균은 매년 수백만 건의 질병을 유발하며 인간 및 동물 건강 시스템에 막대한 비용을 초래한다.

[0006] 셋째, 축산 부문에서 이산화탄소와 메탄의 엄청난 배출은 심각한 환경 문제이다(문헌[GEAS 2012; Opio et al., 2013; Hedenus et al., 2014]). 세계 은행은 전 세계 CO_2 배출량의 18%가 현재의 비효율적인 고기 생산에 의해 초래된다고 추정한다. 월드워치 연구소(Worldwatch Institute)는 실제 수치가 51%라고 주장한다(https://www.independent.co.uk/environment/climate-change/study-claims-meat-creates-half-of-all-greenhouse-gases-1812909.html 참조).

[0007] 넷째, 고기를 생산하는 현재의 방법은 오늘날 많은 사람들이 반대하는 동물의 고통을 수반한다.

[0008] 다섯째, 천연 고기를 소비에 사용하는 추가 단점은 식이 및 건강을 위협하는 문제를 초래하는 콜레스테롤 및 포화 지방과 같은 유해 물질의 높은 함량과 관련된다.

[0009] 따라서, 전술한 문제를 적어도 부분적으로 해결하거나 줄일 수 있는 고기 및/또는 고기 유사 제품의 생산을 위한 새로운 접근법을 개발할 필요가 있다.

[0010] 한 가지 접근법은 *생체 외에서* 생성된 비전통적인 고기 제품을 개발하는 것일 수 있다. "세포 배양 고기", "인공 고기", "배양육(clean meat)" 또는 "실험실 성장 고기"라고도 하는 소위 "합성 또는 *시험관 내* 고기"는 *시험관 내에서* 배양되고 원래 동물에서 유래된 세포를 사용하여 제조된다. 이러한 합성 고기는 천연 자원(토지, 에너지, 물) 사용의 효율성, 온실 가스 생산 감소 및 동물 복지 개선의 측면에서 통상적인 고기에 비해 많은 이점이 있다(문헌[Tuomisto, 2014]). 또한 배양된 고기의 영양 조성을 철저히 제어하여 콜레스테롤, 포화 지방, 호르몬, 항생제, 감염 미생물과 같은 유해 성분에 의한 오염을 방지할 수 있다.

[0011] 이론적으로, 합성 고기는 통상적인 고기 제품과 함께 보충적인 역할을 할 수 있으며, 심지어 물리적 특성, 색상, 풍미, 향, 질감, 기호성 및 영양가가 전통적 동물 고기와 비슷하거나 단순히 인간에게 허용 가능한 것이라면 고기의 대안으로 간주될 수도 있다. 최근 몇 년 동안 약간의 진전이 있었지만, 합성 고기 또는 고기 유사 생산 분야의 기술은 여전히 구현 초기 단계에 있다(문헌[Kadim et al., 2015]에서 검토됨). 적절한 세포 유형의 선택, 배양 조건의 완전성 및 비용 효율적이고 위험한 오염 물질이 없는 배양 배지의 개발을 포함하여 중요한 문제가 해결되어야 했다.

[0012] 무엇보다도 본 발명에 의해 해결되는 한 가지 중요한 문제는 합리적인 가격으로 대량의 고기 유사 제품을 생산하기 위한 확장(scale up)이다.

[0013] 본 발명자들은 배양에서 지속적으로 성장하고 큰 세포 바이오매스를 생산할 수 있는 조류 세포주를 개발하였다. 특히, 본원에서 제시된 세포주는 높은 산업 규모의 배양을 가능하게 하는 데 필요한 모든 특성을 가지고 있다.

발명의 내용

[0014] 항생제가 없고 에너지와 물을 덜 필요로 하는 식품을 생산할 수 있는 대안적 방법을 찾아야 할 필요성이 높다. 예기치 않게도, 현탁액에서 조류 세포주를 배양하는 것은 그러한 식품에 대해 매우 높은 수율 공급원을 제공했다.

[0015] 본 출원은 전통적인 접근법과 관련된 심각한 환경, 건강 및 윤리적 문제를 해결하는 데 도움이 되고 빠르게 증가하는 소비자의 요구를 충족시킬 수 있는 합성 고기 제품을 생산하는 새로운 방법을 제공한다. 개시되는 방법은 조직 공학의 번거로운 절차를 수반하지 않지만 저비용 세포 배양을 기반으로 한다. 본 발명의 양태는 특히 다음을 제공한다:

[0016] A1. 조류 세포주를 현탁액에서 배양하는 것을 포함하는, 인간 또는 동물 소비를 위한 영양 식품을 "*시험관 내에서*" 생산하는 공정/방법으로서, 상기 조류 세포주는 i) 조류 배아 줄기 세포로부터 유래되고, ii) 외인성 성장 인자, 피더 세포(feeder cell) 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 기초 배양 배지에서 증식할 수 있으며, iii)현탁

액에서 연속적으로 성장할 수 있는, 공정/방법.

[0017] A2. 양태 A1에 있어서, 상기 조류 세포주는

[0018] a) 산란 주위의 발달 단계에서 배아(들)로부터 조류 배아 줄기 세포를 단리하는 단계;

[0019] b) 적어도 하나의 외인성 성장 인자 SCF, IGF-1, bFGF, IL-6, IL-6R 및/또는 CNTF, 피더 세포(feeder cell) 층 및 동물 혈청을 포함하는 기초 배양 배지에서 적어도 20 계대(passage) 동안 상기 세포를 배양하는 단계;

[0020] c) 상기 성장 인자, 피더 세포 및 동물 혈청의 점진적 박탈(deprivation)에 의해 상기 배양 배지를 변형시키고 적어도 여러 계대 동안 상기 세포를 추가로 배양하는 단계; 및

[0021] d) 단계 c)의 세포를 현탁액에 적응시켜,

[0022] 적어도 50일 동안 외인성 성장 인자, 피더 세포 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 기초 배양 배지에서 증식할 수 있는 확립된 조류 세포주를 수득하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득되는, 공정/방법.

[0023] A3. 양태 A1 또는 A2에 있어서, 상기 조류 세포주는

[0024] a) 산란 주위의 발달 단계에서 배아(들)로부터 조류 배아 줄기 세포를 단리하는 단계;

[0025] b) 외인성 성장 인자 IGF-1 및 CNTF, 피더 세포 층 및 동물 혈청을 포함하는 기초 배양 배지에서 적어도 1 계대 동안 상기 세포를 배양하는 단계;

[0026] c) 단계 b)의 배양물로부터 상기 성장 인자를 점진적으로 회수(withdraw)하고 적어도 1 계대 동안 성장시키는 단계;

[0027] d) 단계 c)의 배양물로부터 상기 피더 세포를 점진적으로 회수하고 적어도 1 계대 동안 성장시키는 단계;

[0028] e) 단계 d)의 배양물로부터 상기 동물 혈청을 점진적으로 회수하고 적어도 1 계대 동안 성장시키는 단계;

[0029] f) 단계 e)의 세포를 현탁액에 적응시켜,

[0030] 외인성 성장 인자, 피더 세포 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 기초 배지에서 증식할 수 있는 연속 조류 세포주를 수득하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득되는, 공정/방법.

[0031] A4. 양태 A1 내지 양태 A3 중 어느 하나에 있어서, 상기 조류 세포주는 닭 배아 줄기 세포로부터 유래되는, 공정/방법.

[0032] A5. 양태 A1 내지 양태 A4 중 어느 하나에 있어서, 상기 조류 세포주는 오리 배아 줄기 세포로부터 유래되는, 공정/방법.

[0033] A6. 양태 A1 내지 양태 A5 중 어느 하나에 있어서, 상기 조류 세포주는 기능적 내인성 레트로바이러스 또는 다른 바이러스 입자가 없는 공정/방법.

[0034] A7. 양태 A1 내지 양태 A6 중 어느 하나에 있어서, 상기 조류 세포주는 SPF 종으로부터 유래되는, 공정/방법.

[0035] A8. 양태 A1 내지 양태 A7 중 어느 하나에 있어서, 상기 조류 세포주는 닭 EB14, 닭 EB 라인 0, 닭 EBv13, 닭 DL43, 닭 DL46, 오리 EB24, 오리 EB26 및 오리 EB66 세포주로 구성된 군으로부터 선택되는, 공정/방법.

[0036] A9. 양태 A1 내지 양태 A8 중 어느 하나에 있어서, 상기 조류 세포주는 닭 DL43, 닭 DL46, 오리 EB24, 오리 EB26인, 공정/방법.

[0037] A10. 양태 A1 내지 양태 A9 중 어느 하나에 있어서, 상기 조류 세포주는 닭 DL43 또는 오리 EB26인, 공정/방법.

[0038] A11. 양태 A1 내지 양태 A10 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포주는 인간 및/또는 동물에 대한 유해 물질이 없는 합성 또는 화학적으로 정의된(CD) 배지인 배양 배지에서 성장되는, 공정/방법.

[0039] A12. 양태 A11에 있어서, 상기 합성 배지는 Ex-Cell® GRO-I 및/또는 HYQ CDM4 조류 배지인, 공정/방법.

[0040] A13. 양태 A11에 있어서, 상기 합성 또는 CD 배지는 아미노산, 뉴클레오티드, 비타민, 당류, 지방산, 베타-메르캅토-에탄올, 인슐린, 글리신, 콜린, 플루론산 F-68 및 피루브산 나트륨으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 성분(들)으로 추가로 보충되는, 공정/방법.

[0041] A14. 양태 A13에 있어서, 상기 추가 성분은 0 내지 12 또는 1 내지 5 mM, 바람직하게는 약 2.5 mM의 농도로 사

용되는 L-글루타민인, 공정/방법.

[0042] A15. 양태 A11 내지 양태 A13 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 식물 및/또는 효모 가수분해물을 추가로 함유하는, 공정/방법.

[0043] A16. 양태 A11 내지 양태 A15 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 혈청을 포함하는 임의의 동물성 생성물이 없는, 공정/방법.

[0044] A17. 양태 A1 내지 양태 A16 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포주는 유가(fed-batch) 조건 하에서 배양되는, 공정/방법.

[0045] A18. 양태 A1 내지 양태 A16 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포주는 관류(perfusion) 조건 하에서 배양되는, 공정/방법.

[0046] A19. 양태 A1 내지 양태 A18 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 30 리터, 50 리터, 100 리터, 1000 리터, 바람직하게는 10,000 리터 이상의 부피를 갖는 생물 반응기에서 배양되는, 공정/방법.

[0047] A20. 양태 A1 내지 양태 A19 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포주는 온도 약 37℃, pH 7.2, pO_2 약 50%에서 약 40 rpm 이상의 교반 속도로 배양되는, 공정/방법.

[0048] A21. 양태 A1 내지 양태 A20 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포주는 세포 밀도가 약 10^7 세포/mL에 도달할 때까지 배양되는, 공정/방법.

[0049] A22. 양태 A1 내지 양태 A21 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 세포 밀도가 약 10^8 세포/mL에 도달할 때까지 배양되는, 공정/방법.

[0050] A23. 양태 A1 내지 양태 A21 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포주는 세포 밀도가 약 10^8 세포/mL에 도달할 때까지 배양되는, 공정/방법.

[0051] A24. 양태 A1 내지 양태 A23 중 어느 하나에 있어서, 상기 공정의 수율은 배지 g당 적어도 약 0.5 내지 1 g 바이오매스인, 공정/방법.

[0052] A25. 양태 A1 내지 양태 A24 중 어느 하나에 있어서, 침강 및 경사 분리에 의한 세포 바이오매스 수확 단계를 추가로 포함하는, 공정/방법.

[0053] A26. 양태 A25에 있어서, 세포 침강은 세포 현탁액에 칼슘 염을 첨가함으로써 수행되는, 공정/방법.

[0054] A27. 양태 A26에 있어서, 칼슘 염은 10 내지 500 mg/L, 바람직하게는 50 내지 300 mg/L, 더 바람직하게는 50 mg/L의 최종 농도에서 사용되는 염화칼슘인, 공정/방법.

[0055] A28. 양태 A1 내지 양태 A27 중 어느 하나에 있어서, 비타민, 공-비타민(co-vitamin), 미네랄, 필수 아미노산, 필수 지방산, 효소 및 항산화제를 포함하는 군으로부터 선택된 식품의 영양가를 증가시키는 하나 이상의 성분(들)을 세포 바이오매스에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 공정/방법.

[0056] A29. 양태 A1 내지 양태 A28 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 향미제(들), 향미 방향족(들) 및/또는 착색제(들)를 세포 바이오매스에 첨가하는 것을 추가로 포함하는, 공정/방법.

[0057] A30. 양태 A1 내지 양태 A29 중 어느 하나에 있어서, 냉각, 냉동, 고형화, 건조, 산세(pickling), 비등, 조리, 베이킹, 튀김, 훈연, 3D 인쇄 및 포장으로부터 선택된 하나 이상의 식품 가공 단계(들)를 추가로 포함하는, 공정/방법.

[0058] B1. 양태 A1 내지 A30 중 어느 하나의 공정/방법으로 생산되는 식품.

[0059] C1. 양태 A1 내지 A27 중 어느 하나의 공정/방법으로 생산되는 세포 바이오매스.

[0060] D1. 인간 또는 동물 소비를 위한 합성 식품을 생산하기 위한 양태 C1의 세포 바이오매스의 용도.

[0061] B2. 양태 C1의 세포 바이오매스를 포함하거나 이것으로 본질적으로 구성되는 식품.

[0062] B3. 양태 B1 또는 B2에 있어서, 비-인간 근육 세포, 지방 세포 또는 연골 세포, 또는 이들의 조합과 같은 다른 세포를 추가로 포함하며, 이는 조류 세포와 함께 시험관 내에서 성장하거나 조류 세포 수확 후에 첨가되는, 식

품.

[0063] B4. 양태 B1, B2 또는 B3에 있어서, 미네랄, 비타민, 공-비타민, 필수 지방산, 필수 아미노산, 효소 및 항산화제, 또는 이들의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된 영양가를 향상시키는 추가 성분을 추가로 포함하는, 식품.

[0064] B5. 양태 B1, B2 내지 양태 B4 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 향미제(들), 향미 방향족(들) 및/또는 착색제(들), 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는, 식품.

[0065] B6. 양태 B1, B2 내지 양태 B5 중 어느 하나에 있어서, 상기 식품은 페이스트, 퓌레(puree), 수프, 파이, 분말, 과립, 칩, 정제, 캡슐, 스프레드 및 소시지를 포함하는 군으로부터 선택된 임의의 소비 형태로 가공되는, 식품.

도면의 간단한 설명

[0066] 본 발명은 추가의 특징, 실시형태 및 이점이 취해질 수 있는 하기 도면, 표 및 실시예에 의해 추가로 예시된다. 이와 같이, 논의되는 특정 변형들은 본 발명의 범위에 대한 제한으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 다양한 등가물, 변경 및 변형이 이루어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이며, 따라서 그러한 등가의 실시형태들은 본원에 포함되어야 한다는 것이 이해되어야 한다.

본 발명과 관련하여

도 1: 뱅킹(banking) 전 CDM4 조류 배지에 대한 조류 줄기 세포 적응 공정.

도 2: CD 배지에서 조류 줄기 세포 적응에 따른 세포 성장 파라미터. (A) 세포 밀도(실선) 및 생존율(점선). (B) 개체군 배가 시간(Population Doubling Time, PDT).

도 3: 해동 후 세포 회복. (A) 해동 후 세포 밀도(실선) 및 생존율(점선). (B) 개체군 배가 시간(PDT).

도 4: 다양한 농도에서 시딩된 조류 줄기 세포의 성장 동역학. (A) 2.5 mM L-글루타민이 보충된 CD 배지에서 배양 3 또는 4일 후에 얻은 세포 밀도. (B) 상이한 농도에서 시딩한 후 3일 및 4일에 얻은 생존율의 백분율.

도 5: 30 L 생물 반응기의 시딩을 위해 세포를 증폭하는 확장(Scale-up) 공정.

도 6: 조류 줄기 세포 확장 중에 얻은 전형적인 밀도. 증폭 공정 중 조류 줄기 세포의 세포 밀도(실선) 및 생존율(점선).

도 7: 30 L 생물 반응기에서 CD 적응된 조류 줄기 세포의 세포 성장. 생물 반응기에서 증폭 공정 동안 조류 줄기 세포의 세포 밀도(실선) 및 생존율(점선).

도 8: 30 L 생물 반응기에서 수확한 세포 현탁액을 함유하는 1 L 병.

도 9: 30 L 생물 반응기에서 생산된 조류 줄기 세포 펠릿을 함유하는 500 mL 튜브.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 본 발명자들에 의해 가금(domestic) 조류의 고기, 특히 닭 및 오리 고기가 식용 단백질의 주요 공급원이라는 것이 인식되었다. 또한 일반적으로 가금류(poultry) 고기 또는 고기를 생산하는 전통적인 접근법은 효율적이지도 않고 빠르게 성장하는 소비자의 요구와 성장하는 고기 소비자의 수를 감당하기에 충분한 양의 건강 제품을 생산하지도 못한다는 것이 인식되었다.

[0068] *시험관 내* 성장한 "가금류" 식품은 통상적으로 생산된 가금류 고기의 대안이거나 식품의 보충제일 수 있다. 중요하게도, *시험관 내* 배양은 제어된 멸균 조건에서 수행되므로 유해한 오염이 없는 합성 식품을 생성을 가능하게 한다. 또한, 본원에서 설명되는 배양 공정은 합리적인 가격을 위해 산업적 규모로 세포 바이오매스를 생산하는 데 적합하다.

[0069] 따라서, 본 발명의 목적은 통상적인 닭 또는 오리 고기의 대체물로서 사용될 수 있는 *시험관 내* 성장한 조류 세포로부터 생산된 식품, 또는 임의의 고기 또는 합성 고기 제품에 대한 보충제를 제공하는 것이다.

[0070] 일 양태에서, 본 출원은 시험 관내에서 배양된 합성 식품을 생산하는 방법을 제공한다.

[0071] 용어 "합성 식품"은 소비에 유용한 비인간 동물로부터 단리된 세포의 배양에서 생산된 제품을 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "합성 식품"은 "고기 유사 제품", "합성 고기", 시험관 내 고기", "배양 고기", "세포 배양 고기", "배양육", "인공 고기" 및 "실험실 성장 고기"와 같은 용어와 상호 교환 가능하다.

[0072] "*시험관 내*"는 살아있는 유기체 외부의 단리된 세포, 특히 합성 배양 배지에서 성장한 단리된 세포에서 공정이 수행됨을 의미한다.

[0073] 조류 세포주

[0074] 일 실시형태에서, 본 발명의 방법은 조류 세포주에서 수행되지만 배타적이지는 않다. 용어 "조류" 또는 "새"는 분류학적 부류 "아바(ava)"의 유기체의 임의의 종, 아종 또는 종족을 지칭한다. 보다 구체적으로, "새"는 분류학적 순서 기러기목(Anseriformes)(오리, 거위, 백조 및 동족), 순계목(Galliformes)(닭, 메추라기, 칠면조, 꿩 및 동족) 및 비둘기목(Columbiformes)(비둘기 및 동족)의 임의의 동물을 지칭한다.

[0075] 일 실시형태에서, 새는 감염성 내인성 레트로바이러스 입자를 생성하지 않는 특정 병원체 없는(specific-pathogen-free, SPF) 종 중에서 선택된다. "내인성 레트로바이러스 입자"는 일부 조류 세포 게놈에 존재하는 ALV-E 또는 EAV 프로바이러스 서열로부터 코딩되고/되거나 발현되는 레트로바이러스 입자 또는 레트로바이러스를 의미한다. 예를 들어, ALV-E 프로바이러스 서열은 가금 닭(라인(Line)-0 닭 제외), 붉은 정글 가금(red jungle fowl) 및 링넥 꿩(Ringneck Pheasant)의 게놈에 존재하는 것으로 알려져 있다. EAV 프로바이러스 서열은 가금 닭, 라인-0 닭, 붉은 정글 가금, 녹색 정글 가금, 회색 정글 가금, 실론(Ceylonese) 정글 가금 및 동족을 포함하는 모든 갈루스(gallus) 속에 존재하는 것으로 알려져 있다(문헌[Resnick et al., 1990] 참조). 따라서, 바람직하게는 새는 오리, 거위, 백조, 칠면조, 메추라기, 일본 메추라기, 뿔닭, 공작을 포함하는 군에서 선택되며, 이는 감염성 내인성 ALV-E 및/또는 EAV 입자를 생성하지 않는다.

[0076] 바람직한 실시형태에서, 새는 닭, 특히 갈루스 속의 닭이다. 예를 들어, 닭 균주는 ev-0 가금 닭 종(갈루스 갈루스 아종 *도메스티쿠스(domesticus)*) 중에서, 특히 균주 ELL-0, DE 또는 PE11로부터 선택된다. 다른 바람직한 실시형태에서, 닭은 세망내피증 바이러스(REV) 및 조류 외인성 백혈병 바이러스(ALV-A, ALV-B, ALV-C, ALV-D 또는 ALV-J)의 부재에 대해 스크리닝된 SPF 종으로부터, 특히 백색 레그혼(White Leghorn) 균주, 가장 바람직하게는 발로(Valo) 균주로부터 선택된다.

[0077] 다른 바람직한 실시형태에서, 새는 오리, 더 바람직하게는 가금 페킨(Pekin) 또는 무스코비(Muscovy) 오리, 가장 바람직하게는 페킨 오리 균주 M14 또는 GL30이다.

[0078] 또 하나의 실시형태에서, 본 발명의 세포주는 조류 다능성 배아 줄기(ES)세포로부터 유래된다. "다능성"은 세포가 분화되지 않거나 세포가 여러 가지 다른 세포 유형, 예를 들어 근육 세포, 지방 세포, 뼈 세포 또는 연골 세포를 생성할 수 있지만 완전한 살아있는 유기체로 발달할 수는 없음을 의미한다. 바람직하게는, 조류 다능성 ES 세포는 특히 매우 초기 발달 단계, 예를 들어 포배 단계에서 조류 배아(들)로부터 수득된다. 보다 구체적으로, ES 세포는 산란 주위, 예를 들어 산란 전, 산란 시 또는 산란 후 배아로부터 단리된다. 바람직하게는, ES 세포는 산란 시 배아로부터 단리된다. 당업자는 적절한 세포를 수집할 수 있게 하는 산란 이전의 시간 프레임을 정의할 수 있다(문헌[Sellier et al., 2006; Eyal-Giladi 및 Kochan, 1976] 참조).

[0079] 대안적으로, 조류 세포주는 수정란의 배반포 단계의 세포와 같은 전능성 ES 세포로부터 유래될 수 있다.

[0080] 대안적으로, ES 세포주는 원시 생식세포(Primordial Germ Cell)(PGC)에서 얻을 수 있다. 예를 들어, PGC는 햄버거 및 해밀턴(Hamburger & Hamilton)의 분류의 단계 12 내지 14에서 닭 배아의 등쪽 대동맥에서 수집된 배아 혈액에서 단리될 수 있다(문헌[Hamburger & Hamilton, 1951]). 그렇지 않으면, PGC는 조류 배아의 기계적 해부에 의해 생식 초승달로부터 또는 생식선으로부터 수집될 수 있다(예를 들어, 문헌[Chang et al., 1992; Yasuda et al., 1992; Naito et al., 1994] 참조).

[0081] 또한, 본 발명의 조류 세포주는 조류 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로부터 유래될 수 있다.

[0082] 그러나 대안적으로, 본 발명의 조류 세포주는 조류 체세포 줄기 세포로부터 유래될 수 있다.

[0083] 다른 실시형태에서, 본 발명의 조류 세포주는 부분적으로 분화된 또는 분화된 세포를 얻기 위해 전구체 세포로서 역할을 할 수 있다. 실제로, 이러한 줄기 세포는 다능성이며, 이는 다수의 분화 경로, 특히 근육 세포, 지방 세포, 연골 세포 또는 기타 적절한 세포로의 전환에서 유도될 가능성이 있음을 의미한다.

[0084] 또 하나의 실시형태에서, 조류 세포주는 연속 세포주이다. "연속적"은 세포가 장기간에 걸쳐 배양에서 복제할 수 있음을 의미한다. 보다 구체적으로, 본 발명의 세포는 배양물에서 50일 이상, 75일 이상, 100일 이상, 125일 이상, 150일 이상, 175일 이상, 200일 이상, 250일 이상 또는 무기한 동안 증식할 수 있다.

[0085] 다른 일 실시형태에서, 조류 세포주. 예를 들어 오리 또는 닭 세포주는 연속적이고 안정적이다. "안정적"이라는

것은, 정의된 조건에서 유지될 때 세포가 안정적인 개체군 배가 시간 및 제어된 증식을 수행하는 안정적인 세포 주기 지속기간, 안정적인 표현형(형상, 크기, 미세 구조, 핵 세포질 비), 안정적인 최적 밀도, 및 단백질(예를 들어, 텔로머라제) 및 마커(예를 들어, SSEA1 및 EMA-1)의 안정적인 발현을 갖는다는 것을 의미한다. 바람직한 실시형태에서, 조류 세포주, 특히 EBx 세포주는 높은 핵-세포질 비, 높은 텔로머라제 활성 및 하나 이상의 ES 세포 마커, 예컨대 알칼리성 포스파타제 및 SSEA-1, EMA-1 및 ENS1 에피토프의 발현을 특징으로 하는 안정적인 표현형(형상, 크기, 미세 구조, 핵 세포질 비)을 가지며, 그리고 안정적인 세포 주기를 갖는다. 이들 파라미터는 당업계에 잘 알려진 기술에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어 안정적인 표현형은 전자 현미경으로 측정될 수 있다. 세포 주기는 브로모데옥시우리딘(BromoDeoxyuridine, BrDU) 및 프로피디움 요오드화물(Propidium Iodide, PI)과의 공-염색을 사용하여 유세포 분석을 통해 DNA 함량을 모니터링하여 측정될 수 있다. 당업자는 또한 다른 방법을 사용할 수도 있다.

[0086] 하나의 추가 실시형태에서, 본 발명의 세포주는 유전적으로 안정적이며, 이는 모든 세포가 계대를 따라 유사한 핵형을 유지한다는 것을 의미한다.

[0087] 바람직하게는, 본 발명의 조류 ES 세포는 무기한 복제를 위해 어떠한 특별히 도입된 유전적 변형도 겪지 않는다. 연속 세포주는 ES 세포 특이적 마커(예를 들어, 텔로머라제, SSEA-1, EMA-1)의 발현과 같은 ES 세포의 고유한 생물학적 특성 중 일부를 유지하는 안정적인 세포의 선택, 시험관 내에서 무기한 자가 재생하는 능력 및 장기적인 유전적 안정성을 허용하는 다단계 공정을 따라 자발적으로 유도될 수 있다(문헌[Olivier et al., 2010; Biswas and Hutchins, 2007]).

[0088] 대안적으로, 연속 세포 표현형은 유전적 변형 및/또는 불멸화 공정에 의해 얻어질 수 있다. "불멸화"는 일반적으로 무기한 증식하지는 않지만 돌연변이(들)로 인해 정상적인 세포 노화를 회피하고 분열을 계속할 수 있는 세포를 의미한다. 돌연변이(들)는 예를 들어 물리적, 화학적 또는 유전적 변형에 의해 의도적으로 유도될 수 있다. 물리적 변형은 UV, X-선 또는 감마선 조사에 의해 달성될 수 있다. 화학적 변형은 화학적 돌연변이 유도물(DNA를 손상시키는 물질)에 의해 달성될 수 있다. 유전자 변형이란 세포가 유전자 과발현, 예를 들어 원 종양 유전자, 텔로머라제 또는 전사 인자, 예컨대 OCT4, Klf4, Myc, Nanog, LIN28 등을 위해 바이러스 또는 비-바이러스 벡터로 일시적으로 또는 안정적으로 형질 감염될 수 있음을 의미한다. 세포의 불멸화 방법은, 예를 들어 특허 출원: WO2009137146(UV-광으로 불멸화된 메추라기 세포), WO2005042728(바이러스 형질 감염에 의해 불멸화된 오리 세포) 및 WO2009004016(비-바이러스 벡터로 형질 감염된 오리 세포)에 기재되어 있는데, 이들은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0089] 하나의 추가 실시형태에서, 본 발명의 조류 세포주는 비-부착성 세포주이며, 이는 세포가 어떠한 지지 표면 또는 매트릭스없이 현탁액에서 성장할 수 있음을 의미한다. 본 발명의 세포는 배양 동안 자발적으로 비-부착성이 될 수 있거나 또는 비-부착성이 피더 층의 회수에 의해 얻어진다. 비-부착성 세포는 높은 세포 밀도에 도달할 때까지 오랜 기간 동안 배양 현탁액에서 증식할 수 있다. 따라서, 이들은 생물 반응기에서의 대규모 제조에 완벽하게 적합하다.

[0090] 또한, 본 발명의 세포는 다음 특성들 중 하나 이상을 갖는다: 큰 핵, 높은 핵-세포질 비, 안정된 수의 염색체, 상승된 텔로머라제 활성, 양성 알칼리성 포스파타제 활성 및 EMA1, ENS1 및 SSEA-1 표면 에피토프(ES-특이적 마커)의 발현. 대안적으로, 이들 세포는 관심 물질, 예를 들어 단백질, 지질, 효소, 비타민 등을 생산하기 위해 유전적으로 변형될 수 있다.

[0091] 일 실시형태에서, 본 발명의 조류 세포주는 그 전체가 본원에 참고로 포함되는 WO2003076601, WO2005007840 또는 WO2008129058에 이전에 기재된 방법에 의해 수득된다. 간단히 말해서, 조류 ES 세포는 산란 주위의 새 배아(들)로부터 단리된다. 세포는 인슐린 성장 인자 1(IGF-1), 섬모 신경 영양 인자(CNTF), 인터루킨 6(IL-6), 인터루킨 6 수용체(IL-6R), 줄기 세포 인자(SCF) 및/또는 섬유 아세포 성장 인자(FGF), 동물 혈청 및 피더 층 세포와 같은 적어도 하나, 바람직하게는 두 가지 성장 인자로 추가로 보충된 세포 성장을 지원하는 모든 인자를 포함하는 기초 배양 배지에서 배양된다. 여러 계대 후, 배양 배지는 성장 인자, 동물 혈청 및 피더 층 세포를 감소 및/또는 완전히 회수한 다음 세포를 현탁액에 추가로 적응시킴으로써 점진적으로 변형된다. 배양된 세포를 기초 합성 배지에 이와 같이 점진적으로 적응시키면 부착성 또는 비-부착성 조류 세포주(본원에서는 "EBx" 또는 "EBx 세포주"라고도 함)가 얻어지며, 이는 장기간 동안, 특히 적어도 50일 동안, 적어도 250일 동안, 바람직하게는 무기한 동안 배양에서 증식할 수 있다. 확립된 EBx 세포주는 적어도 50일, 100일, 150일, 300일 또는 600일 동안 외인성 성장 인자, 동물 혈청 및 피더 층 세포가 없는 기초 배양 배지의 현탁액에서 성장할 수 있다.

[0092] 보다 구체적으로, 조류 세포주는

[0093] a) 산란 주위의 발달 단계에서 배아(들)로부터 조류 배아 줄기 세포를 단리하는 단계;

[0094] b) 적어도 하나의 외인성 성장 인자 SCF, IGF-1, bFGF, IL-6, IL-6R 및 CNTF, 피더 세포 층 및 동물 혈청을 포함하는 기초 배양 배지에서 적어도 20 계대 동안 상기 세포를 배양하는 단계;

[0095] c) 상기 성장 인자, 피더 세포 및 동물 혈청의 점진적 박탈(deprivation)에 의해 상기 배양 배지를 변형시키고 적어도 여러 계대 동안 상기 세포를 추가로 배양하는 단계; 및

[0096] d) 단계 c)의 세포를 현탁액에 적응시켜,

[0097] 적어도 50일, 바람직하게는 적어도 600일 동안 외인성 성장 인자, 피더 세포 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 기초 배양 배지에서 증식할 수 있는 확립된 세포주를 수득하는 단계를 포함하는 공정에 의해 수득될 수 있다.

[0098] 대안적으로, 조류 세포주는

[0099] a) 산란 주위의 발달 단계에서 배아(들)로부터 조류 배아 줄기 세포를 단리하는 단계;

[0100] b) 외인성 성장 인자 IGF-1 및 CNTF, 피더 세포 층 및 동물 혈청을 포함하는 기초 배양 배지에서 적어도 1 계대 동안 상기 세포를 배양하는 단계;

[0101] c) 단계 b)의 배양물로부터 상기 성장 인자를 점진적으로 회수하고 적어도 1 계대 동안 추가로 성장시키는 단계;

[0102] d) 단계 c)의 배양물로부터 상기 피더 세포를 점진적으로 회수하고 적어도 1 계대 동안 추가로 성장시키는 단계;

[0103] e) 단계 d)의 배양물로부터 상기 동물 혈청을 점진적으로 회수하고 적어도 1 계대 동안 추가로 성장시키는 단계; 및

[0104] f) 단계 e)의 세포를 현탁액에 적응시켜,

[0105] 장기간(적어도 50일), 바람직하게는 무기한 동안 외인성 성장 인자, 피더 세포 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 기초 배지에서 증식할 수 있는 확립된 조류 세포주를 수득하는 단계를 포함하는 공정에 의해 수득될 수 있다.

[0106] "계대"는 하나의 배양 용기로부터 다른 배양 용기로 희석을 하거나 하지 않고 세포를 이동하는 것을 의미한다. 이 용어는 '계대 배양(sub-culture)'이라는 용어와 동의어이다. 계대 횟수는 세포가 계대 배양되거나 새 용기에 전달되는 횟수이다. 이 용어는 개체군 배가 시간(PTD) 또는 세포 집단이 한번 복제하는 데 필요한 시간인 세대(generation)와는 동의어가 아니다. 예를 들어, 전술한 공정의 단계 a)의 단리된 조류 ES 세포는 약 >40 시간의 PDT를 갖는다. 확립된 조류 세포주의 세포는 약 <30 시간 또는 약 <20 시간의 PDT를 갖는다. ES 세포의 경우 일반적으로 3 세대마다 1 계대가 발생한다.

[0107] "점진적 박탈 또는 회수"는 시간이 지남에 따라 퍼져 나가는 완전한 소멸(전체 회수)까지 임의의 성분의 점진적인 감소를 의미한다. 본 발명의 세포주의 확립을 위해, 성장 인자, 혈청 및/또는 피더 층의 회수는 염기성 배양 배지에서 무기한 성장할 수 있는 조류 배아 유래 줄기 세포의 집단의 단리로 이어진다.

[0108] "현탁액에 적응하는 것"은 어떠한 지지 표면, 매트릭스 또는 담체없이 비-부착성 세포로서 성장하도록 세포를 적응시키는 것을 의미한다.

[0109] 본 발명에 따르면, "기초 배양 배지"는 그 자체로 적어도 세포 생존 및 더 나은 세포 성장을 허용하는 고전적 배지 제제를 갖는 배양 배지를 의미한다. 바람직하게는, 기초 배지는 합성 또는 화학적으로 정의된(CD) 배지이다. 이러한 매질은 무기 염(예를 들어, $CaCI_2$, KCI, NaCI, $NaHCO_3$, NaH_2PO_4, $MgSO_4$), 아미노산(예를 들어, L-글루타민), 비타민(예를 들어, 티아민, 리보플라빈, 엽산, D-Ca 판토테네이트) 및 선택적으로 기타 성분, 예컨대 글루코스, 수크로스, 베타-메르캅토-에탄올 및 피루브산 나트륨을 포함한다. 기초 배지의 비제한적인 예는 SAFC Excell 배지, BME(기초 이글 배지), MEM(최소 이글 배지), 배지 199, DMEM(둘베코 변형 이글 배지), GMEM(글래스고 변형 이글 배지), DMEM-HamF12, Ham-F12(Gibco) 및 Ham-F10(Gibco), IMDM(Iscove의 변형 둘베코 배지), 맥코이(MacCoy)의 5A 배지, RPMI 1640 및 GTM3이다.

[0110] 일부 실시형태에서, 기초 합성 배지는 IL-6, IL-6R, SCF, FGF, IGF-1 및 CNTF를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 성장 인자로 보충될 수 있다. 상기 공정의 단계 b)에서 사용된 각 성장 인자의 최종 농도는 바람직하게는 약 1 ng/mL이다.

[0111] 또한, 일부 실시형태에서, 기초 합성 배지는 1 내지 50 mg/L, 특히 1 내지 10 mg/L, 바람직하게는 약 10 mg/L 농도로 인슐린으로 보충될 수 있다.

[0112] 또한, 일부 실시형태에서, 기초 합성 배지는 0 내지 12 mM, 바람직하게는 1 내지 5 mM, 보다 바람직하게는 약 2.5 mM 농도로 L-글루타민(L-Gln)으로 보충될 수 있다.

[0113] 또한, 일부 실시형태에서, 기초 합성 배지는 아미노산, 뉴클레오티드, 비타민, 당류, 지방산, 베타-메르캅토-에탄올, 글리신, 콜린, 플루론산 F-68 및 피루브산 나트륨으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 성분(들)으로 보충될 수 있다.

[0114] 또한, 기초 합성 배지는 1% 내지 10% 농도로 동물 혈청(예를 들어, 우 태아 혈청)으로 보충될 수 있다. 바람직하게는, 상기 공정의 단계 b)에서 동물 혈청 농도는 약 5 내지 10%이다. 일부 실시형태에서, 무혈청 기초 배양 배지가 사용된다.

[0115] 동물 혈청 대신에 비-동물 기원의 단백질 가수분해물을 사용하여 기초 배지를 보완할 수 있다. 비-동물 기원의 단백질 가수 분해물은 박테리아 트립톤, 효모 트립톤, 효모 또는 식물 가수 분해물, 예컨대 대두 가수 분해물 또는 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 비-동물 기원의 단백질 가수 분해물은 대두 가수 분해물이다.

[0116] 본 발명의 조류 세포주의 확립을 위해, 바람직한 기초 배지는 2 mM L-글루타민, 1 mM 나트륨 피루베이트, 1% 비필수 아미노산, 비타민 1%, 0.16 mM 베타-메르캅토 에탄올로 보완되고 선택적으로 1x 효모 가수 분해물로 보완된 DMEM-HamF12 배지이다.

[0117] 조류 세포주 확립에 사용되는 조건에 대한 더 세부사항은 WO2003076601, WO2005007840 및 WO2008129058에서 찾을 수 있다.

[0118] 일 실시형태에서, 전술한 방법에 따라 확립된 세포주는 닭 세포주이다. 다른 실시형태에서, 전술한 방법에 따라 확립된 세포주는 오리 세포주이다. 전술한 방법에 따라 확립된 세포주는 유전적으로 안정하고 연속적이며 외인성 성장 인자, 피더 세포 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 염기성 합성 배지의 현탁액에서 성장할 수 있다. 또한 이들은 장기 배양 조건에서 지속적인 생존율과 복제 능력을 나타내며, 이에 따라 식품으로 사용할 수 있는 고수율 바이오매스를 생산하기 위해 산업 규모로 재배하기에 이상적으로 적합하다.

[0119] 다른 실시형태에서, 본 발명의 조류 세포주는, 세포주가 전술한 모든 특징을 갖는다면 특허출원 WO2003076601, WO2005007840 및 WO2008129058에 이미 기술된 조류 EBx 세포주로부터 선택되지만 이에 제한되지 않는다. 따라서, 본 발명의 세포주는 닭 세포주, 특히 EB1, EB3, EB4, EB5, EB14, EB 라인 0 및 EBv13 세포주(WO2003076601 및 WO2005007840에 기재됨)로 구성된 군에서 선택된 비-부착성 닭 세포주일 수 있다. 바람직하게는, 닭 세포주는 EB 라인 0으로서 감염성 내인성 레트로바이러스가 없거나, 닭 세포주는 EBv13으로서 SPF 종으로부터 유래되며, 상기 둘 다는 WO2008129058에 기재되어 있다. 가장 바람직하게는, 닭 세포주는 발명의 내용란에서 전술한 양태 A3의 공정에 의해 수득되는 EBv13, 특히 DL43 및 DL46으로부터 유래된 세포주이다.

[0120] 바람직한 실시형태에 따르면, 세포주는 WO2008129058에 기재된 임의의 오리 EBx 세포주일 수 있다. 특히, 오리 세포주는 EB24, EB26 및 EB66 세포주로 구성된 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 가장 바람직하게는 오리 세포주는 EB24(WP24) 또는 EB26(WP26)이다. 본 출원에서 사용되는 바와 같이 세포주 이름 EB24와 WP24, 및 EB26과 WP26은 서로 바꿔 사용할 수 있다. 모든 오리 EBx 세포주는 공통된 특징을 가지고 있다: 이들은 오리 ES 세포에서 유래하고 안정적이고 연속적이며, 장기간에 걸쳐 또는 무기한 외인성 성장 인자, 피더 세포 및/또는 동물 혈청의 부재 하에 합성 배지에서 고밀도 현탁액에서 성장할 수 있다. 중요하게도, 이들은 게놈에 ALV-E 및/또는 EAV 프로바이러스 서열을 포함하지 않으므로 내인성 복제 능력이 있는 레트로바이러스 입자가 없다.

[0121] 다른 일 실시형태에서, 본 발명의 세포주는 전술한 공정들 중 하나에 의해 수득된 새로운 조류 세포주이며, 여기서 상기 세포주는 안정적이고 연속적이며 임의의 내인성 또는 외인성 바이러스 입자, 게놈 프로바이러스 및/또는 종양 원성 서열이 없으며, 추가 성장 인자(들), 예컨대 천연 또는 합성 호르몬 또는 그 유도체, 피더 세포 및/또는 임의의 추가 동물성 생성물(혈청 포함)의 부재 하에 기초 합성 배지에서 증식할 수 있으며, 세포 밀도가 높아질 때까지 현탁액에서 성장하고 높은 수율의 바이오매스를 생성할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0122] 대안적으로, 조류 세포주는 오리 세포주 AGE1.CR®.pIX(WO2005042728에 기재됨), DuckCelt®-T17 세포주(WO2009004016에 기재됨) 및 메추라기 세포주 QOR/2E11(WO2009137146에 기재됨)를 포함하나 이에 제한되지 않

는 임의의 상업적으로 입수 가능한 세포주로부터 선택될 수 있다. 간단히 말해서, AGE1.CR®.pIX는 아데노바이러스 유전자의 형질 감염에 의해 불멸화된 망막 또는 배아 섬유 아세포에서 유래된 유전적으로 변형된 오리 세포주이다. 다른 유전적으로 변형된 오리 세포주 DuckCelt®-T17은 E1A 서열의 게놈에 통합됨으로써 카이리나 모스카타(Cairina moschata)의 일차 배아 세포로부터 생성되었다. 메추라기 QOR/2E11 세포주는 부착성 세포주로서 UV 조사에 의해 메추라기 배아에서 수득되었으나 현탁액에서 성장하기 위한 적응도 보고되었다(문헌[Kraus et al., 2011] 참조).

[0123] 본 발명의 조류 세포주는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 추가로 특성화될 수 있다. 예를 들어, 세포주의 특정 특징(들)을 특성화하고 결정하는 잠재적인 방법은 상기 세포주의 게놈 시퀀싱(sequencing)일 수 있다. 완전한 게놈이 알려지면, 세포주의 복사는 매우 유사한 게놈 서열의 세포주로 시작한 다음 CRISPR-Cas 9 방법과 같은 유전자 편집으로 서열을 변경함으로써 얻어질 수 있다(문헌[Hsu et al., 2014] 참조).

[0124] 조류 세포 바이오매스의 생산 공정

[0125] 다른 양태에서, 본 출원은 전술한 조류 세포주로부터 유래된 세포 바이오매스의 대규모 및 고수율 생산의 공정을 제공한다. 간단히 말해서, 본 공정은, 마스터 또는 작동(working) 뱅크의 세포를 세포 배양 배지에 적응시키는 단계; 다양한 크기의 T-플라스크 또는 에를렌마이어(Erlenmeyer)에서 적응된 세포 계대 배양을 확장하고, 적합한 생물 반응기를 적응된 세포로 시딩하는 단계; 고밀도 세포에 도달할 때까지 합성 배양 배지에서 적응된 조류 세포의 현탁액을 배양하는 단계; 및 여과, 원심 분리, 침전(침강 및 경사 분리), 또는 배지로부터 세포를 분리할 수 있는 임의의 종류의 방법에 의해 세포 바이오매스를 수확하는 단계를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0126] 또한, 큰 세포 바이오매스의 생산을 야기할 상기 언급된 공정의 변형이 또한 본 발명에 포함된다는 점에 유의해야 한다.

[0127] 본 출원은 또한 조류 세포 바이오매스의 대규모 생산을 위한 조건을 제공한다.

[0128] 특히, 본 출원은 인간 및/또는 동물에 유해한 물질이 없는 합성 배지인 세포 배양 배지를 제공한다. 보다 구체적으로, 배지는 BME(basal Eagle Medium), MEM(minimum Eagle Medium), 배지 199, DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium), GMEM(Glasgow's modified Eagle medium), DMEM-HamF12, Ham-F12, Ham-F10, IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's medium), 맥코이(MacCoy)의 5A 배지, RPMI 1640, GTM3, Ex-Cell®EBx™ GRO-I, HYQ CDM4 PermAb 및 HYQ CDM4 조류 배지(Hyclone), L-15(Leibovitz), OptiPRO™ SFM 및 293 SFM II 또는 이들의 조합을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, 배양 배지는 예를 들어 상업적 배지의 조합 또는 변형에 의해 실험적으로 개발된 새로운 합성 배지일 수 있다. 세포 성장을 개선하기 위해 배지에 추가 성분들이 첨가될 수 있다. 여기에는 아미노산(비필수 또는 필수 아미노산), 특히 L-글루타민, 메티오닌, 글루타메이트, 아스파르테이트, 아스파라긴, 뉴클레오티드, 인슐린, 비타민(예를 들어, 티아민, 리보플라빈, 엽산, D-Ca 판토테네이트), 당류(예를 들어, D-글루코스, D-수크로스, D-갈락토스 또는 이들의 혼합물), 지방산, 베타-메르캅토-에탄올, 글리신, 콜린, 플루론산 F-68 및 나트륨 피루베이트가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 배양 배지에서 L-글루타민(L-Gln)의 최종 농도는 0 내지 12 mM 또는 0 내지 10 mM, 특히 1 내지 5, 더욱 특히 2 내지 4 mM, 바람직하게는 약 2.5 mM의 범위일 수 있다. 배지 내 인슐린의 최종 농도는 1 내지 50 mg/L, 특히 1 내지 10 mg/L, 바람직하게는 약 10 mg/L 범위일 수 있다.

[0129] 바람직하게는, 배양 배지에는 동물성 생성물이 없고, 특히 동물 혈청이 없다. "무혈청 배지"(SFM)는 동물 혈청이 필요하지 않은 바로 사용할 수 있는 세포 배양 배지를 의미한다. 본 발명의 SFM 배지는 아미노산, 비타민, 유기 및 무기 염, 탄수화물 공급원을 포함하는 다수의 성분을 포함하며, 각 성분은 시험관 내 세포 배양을 지원하는 양으로 존재한다. 이 배지는 반드시 화학적으로 정의된 것은 아니며, 다양한 기원, 예를 들어 식물(예를 들어, 콩)또는 효모로부터의 가수 분해물을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 배양 배지는 동물 또는 인간 기원의 성분을 포함하지 않는("동물 기원 없음") 화학적으로 정의된 SFM이다.

[0130] 바람직하게는, 세포 배양은 HYQ CDM4 조류 배지 또는 이들의 조합, 특히 2.5 내지 4 mM 농도로 사용되는 L-Gln이 보충된 HYQ CDM4 조류 배지에서 수행된다.

[0131] 본 발명의 다른 실시형태에 따르면, 세포는 지지체 또는 매트릭스없이 현탁액에서 성장된다. 대안적으로, 세포는 기질에 부착되거나, 스캐폴드(scaffold)에 부착되거나, 마이크로 캐리어 비드 또는 겔에 부착될 수 있다.

[0132] 본 발명의 다른 실시형태에 따르면, 세포 배양은 배치, 유가, 관류 또는 연속 모드로 수행될 수 있다.

[0133] 간단히 말해서, 유가 배양은 가장 넓은 의미에서 하나 이상의 영양소가 배양 중에 생물 반응기에 공급되고 생성물이 실행(run)의 끝까지 생물 반응기에 남아있는 생명공학 공정에서의 조작 기술로서 정의된다(문헌[Yamane & Shimizu, 1984]). 유가 전략은 전형적으로 생물 반응기에서 높은 세포 밀도에 도달하기 위해 바이오 산업 공정에서 사용된다. 대부분 공급(feed) 용액은 생물 반응기의 희석, pH 및 삼투압의 증가를 피하기 위해 고 농축된다. 영양소의 조절된 첨가는 배양의 성장 속도에 직접적인 영향을 미치며 영양 고갈, 오버플로우(overflow) 대사 및 산소 제한을 방지하는 데 도움이 된다(문헌[Jeongseok Lee et al., 1999]).

[0134] 지속적으로 공급되는 배치 배양은 성장 제한 기질의 공급 속도가 일정한, 즉 배양 중에 공급 속도가 변하지 않는 것이다. 세포의 기하 급수적 성장 속도에 비례하여 성장 제한 기질의 공급 속도가 증가되면, 지수적 공급 배치 배양이라 불리는 기하 급수적 세포 성장 속도를 장기간 유지하는 것이 가능하다.

[0135] 관류 배양은 세포가 반응기에 유지되는 동안 동등한 부피의 배지가 동시에 첨가 및 제거되는 생물 반응기에서 세포 배양을 유지하는 것을 의미한다. 이는 신선한 영양소의 안정적인 공급 및 세포 폐기물의 일정한 제거를 제공한다.

[0136] 본 발명의 배양 용기는 교반 플라스크, 삼각 플라스크, 스피너 플라스크 및 교반 패들 또는 웨이브 생물 반응기 중에서 선택될 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 특히, 배양 용기는 연속 교반 탱크 생물 반응기, Wave™ 생물 반응기, Bello™ 생물 반응기, 모비우스(Mobius) 생물 반응기, 교반 생물 반응기(예를 들어, Orbshake), 관류 시스템을 갖는 생물 반응기 중에서 선택될 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 대규모 생산의 경우 바람직한 배양 용기는 생물 반응기이다. 생물 반응기의 부피는 20 리터 이상, 100 리터 이상, 1,000 리터 이상, 바람직하게는 최대 10,000 리터일 수 있다. 바람직한 실시형태에 따르면, 배양 용기는 온도, 폭기, pH 및 기타 제어된 조건을 제어할 수 있는 연속 교반 탱크 생물 반응기이며, 이는 세포, 멸균 산소, 배양을 위한 다양한 배지를 도입하기 위한 적절한 입구, 및 프로브를 설치하고 세포 및 배지를 제거하기 위한 출구, 및 생물 반응기에서 배양 배지를 교반하기 위한 수단을 갖추고 있다.

[0137] 전형적으로 세포는 다양한 크기의 T 플라스크, 에를렌마이어, 롤러 병 또는 Wave™ 생물 반응기를 통해 마스터 또는 작동 세포 뱅크 바이알에서 확장된다. 그 다음, 생성된 세포 현탁액은 추가 배양을 위해 더 큰 생물 반응기에 공급된다. 예를 들어, 약 160억 개의 세포가 30 L 생물 반응기를 시딩하는 데 사용된다.

[0138] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 세포 배양은 pH 7.2(CO_2 또는 NaOH 주입으로 조절됨), 50% pO_2, 40 rpm의 교반 속도 및 37℃의 온도에서 수행된다.

[0139] 유가 배양에서 개체군 배가 시간(PDT)은 10 내지 40 시간, 바람직하게는 10 내지 20 시간, 더욱 바람직하게는 10 내지 15 시간, 가장 바람직하게는 약 12시간(또는 그 미만) 범위일 수 있다.

[0140] 현탁 배양에서 동물 세포에 대해 얻을 수 있는 이론적 최대 세포 농도(세포 밀도)는 약 10^9 내지 10^{11} 세포s/mL로 간주된다. 산업 생산에 사용되는 많은 통상적 세포주의 경우, 세포 밀도는 유가 모드에서 얻은 $2x10^6$ 내지 $4x10^6$ 세포/mL 범위이고 관류 모드에서 얻은 최대 $3x10^7$ 세포/mL이다(문헌[Tapia et al., 2016] 참조).

[0141] 본 발명의 공정에 사용되는 조류 세포주는 산업적 규모의 생산 가능성이 높으며 적절한 세포주의 선택이 중요하다. 주요 선택 기준은 일부 계대에 걸쳐 안정적이고 가능한 한 짧은 시간에 가능한 한 많은 양의 바이오매스를 안전하게 생산할 수 있는 능력에 있다. 예를 들어, EB66 세포주는 관류 모드에서 배양될 때 $1.6x10^8$ 세포/mL 초과의 세포 밀도에 도달할 수 있다(문헌[Nikolay et al., 2018] 참조). 전형적으로 유가 배양에서 EBx 세포에 대해 얻을 수 있는 세포 밀도는 $1x10^7$ 내지 $2x10^7$ 세포/mL 범위이다. 바람직한 실시형태에서, 배양 세포 밀도는 약 $1x10^7$ 세포/mL 이상, 약 $2x10^7$ 세포/mL 이상, 약 $5x10^7$ 세포/mL 이상, 약 10^8 세포/mL 이상에 이른다.

[0142] 전형적으로, 세포 바이오매스는 백만 세포당 0.5 내지 1.0 mg 이상, 바람직하게는 백만 세포당 0.7 내지 1.0 mg 이상, 더욱 바람직하게는 백만 세포당 약 1 mg 이상의 범위이다. 본 공정으로 달성할 수 있는 벌크 세포 수율은 10^{11} 세포/L를 초과할 것으로 예상된다.

[0143] 조류 세포 현탁액을 배양하는 전형적인 공정은 다음의 단계를 포함한다:

[0144] 1) 냉동 바이알에 포함된 1천만 내지 2천만 개의 CD 배지 적응 세포를 37℃ 수조에서 해동하고, 약 30 mL의 예열된 CD 배지에 현탁하고, 150 rpm, 37℃, 가습 분위기(80% 초과) 중 7.5% CO_2에서 25 mm 궤도 쓰로우 쉐이커

(throw shaker)에서 교반 하에 인큐베이터에 넣으며,

[0145] 2) 회수 후, 단계 1의 세포를 계대 배양하고 약 $0.3x10^6$ 내지 $0.5x10^6$ 세포/mL의 농도로 시딩된 더 큰 삼각 플라스크 내에서 3 계대 동안 증폭한다. 각 계대 배양 사이에 삼각 플라스크는 37℃, 7.5% CO_2 및 150 rpm에서 3일 동안 배양된다.

[0146] 3) 3 계대 후, 세포는 약 1:10의 부피비로 20 L의 CD 배지에 있는 30 L 생물 반응기에 시딩되고; 세포는 적어도 10^7 세포/mL의 세포 밀도에 도달할 때까지 37℃, 40 rpm, 50% O_2에서 3일 동안 배양된다.

[0147] 4) 세포는 10분 동안 3450 g에서의 원심 분리, 여과 또는 침전에 의해 수확된다.

[0148] 일 실시형태에서, 세포 침전은 칼슘 염을 세포 현탁액에 첨가함으로써 수행될 수 있다. 칼슘 염은 염화칼슘, 아세트산 칼슘, 탄산 칼슘, 시트르산 칼슘 및 젖산 칼슘으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 염화칼슘이 사용된다. 염화칼슘의 최종 농도는 10 내지 500 mg/L, 바람직하게는 50 내지 300 mg/L, 더욱 바람직하게는 50 mg/L의 범위이다. 염화칼슘을 첨가한 후, 조류 세포는 침전되는 큰 응집체(덩어리)를 형성한다. 염화칼슘은 세포 증폭 공정이 끝날 때 생물 반응기에 첨가될 수 있다. 결과적으로, 세포 바이오매스는 용기 바닥에 침전물이 되고 상층액은 경사 분리에 의해 제거될 수 있다. 수확 포트(port)가 용기의 가장 낮은 부분에 있는 경우, 감소된 부피의 농축된 세포 "페이스트"가 수집되고 다음 단계의 바이오 공정에서 사용될 수 있다.

[0149] 생물 반응기에서 조류 EBx 세포주, 특히 EB66 세포주의 관류 배양의 예가 문헌[Nikolay at el., 2018]에 기재되어 있다. 간단히 말해서, 1 L 생물 반응기는 확장 가능한(scalable) 중공 섬유 기반 접선 흐름 여과(TFF) 및 교대 접선 흐름 여과(ATF) 관류 시스템으로 작동되었다.

[0150] 관류 생물 반응기에서의 배양은 CSPR=D_{perf}/X_v로서 계산된 고정 세포 특이적 관류 속도(CSPR)에서 수행되었으며, 여기서 D_{perf}는 관류된 배지 부피이고, X_v는 생존 세포 농도이다. CSPR은 바이오 공정들 간에 크게 변할 수 있으며 전형적으로 피딩 프로필에 따라 50 내지 500 pL/세포/일 범위에서 선택된다(문헌[Konstantinov et al., 2006]). 34 pL/세포/일의 CSPR에서 화학적으로 정의된 CDM4 조류 배지에서 성장하는 EB66 세포는 1.6×10^8 세포/mL의 세포 농도에서 초래되었다. 관류의 다른 예, 약 60 pL/세포/일의 CSPR에서 수동 모드에서 수행된 AGE1.CR.pIX® 세포주의 배양에서, 5.0×10^7 세포/mL의 세포 농도가 달성되었다(문헌[Vazquez-Ramirez et al., 2018]).

[0151] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 무균(aseptic) 기술은 조류 세포를 배양하고 박테리아, 진균, 바이러스, 프리온, 원생 동물 또는 이들의 임의의 조합과 같은 위험 미생물이 실질적으로 없는 최종 식품을 제조하기 위해 사용되어야 한다. 바람직하게는, 생산은 임의의 유해한 오염을 방지하는 GMP(Good Manufacturing Practice) 조건에서 수행된다.

[0152] 다른 양태에서, 본 출원은 *시험관 내에서* 배양된 조류 세포주로부터 유래된 세포 바이오매스를 제공한다. 세포 바이오매스는 *시험관 내에서* 배양된 조류 세포를 포함하거나 이것으로 본질적으로 구성된다. 세포 바이오매스는 본원에 제공된 공정 또는 임의의 변형된 공정에 의해 얻어질 수 있다. 조류 세포 배양에 적합한 모든 생산 공정이 탐색될 수 있다. 산업 규모로 수행되는 고 수율 세포 배양이 바람직하다.

[0153] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 또는 동물 소비를 위한 합성 식품의 생산을 위한 전술한 조류 세포주 및 세포 바이오매스의 용도에 관한 것이다.

[0154] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 또는 동물 소비에 적합한 *시험관 내에서* 성장한 조류 세포로부터 유래된 합성 식품을 제공한다.

[0155] 일 실시형태에서, 본 발명의 합성 식품은 전술한 임의의 공정에 따라 생산된 조류 세포 바이오매스를 포함하거나 이것으로 본질적으로 구성된다. 하나의 특정 실시형태에서, 합성 식품은 닭 세포주, 바람직하게는 전술한 EB1, EB3, EB4, EB5, EB14, EB 라인 0 및 EBv13, DL43 및 DL46 세포주로 구성되는 군으로부터 선택되지만 이에 제한되지 않는 닭 세포주로부터 유래된 세포 바이오매스를 포함하거나 이것으로 본질적으로 구성된다. 다른 특정 실시형태에서, 세포주는 오리 EB24, EB26 및 EB66 세포주로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, 합성 식품은 본원에 기재된 임의의 공정에 의해 수득된 조류 세포주로부터 유래된

세포 바이오매스를 포함하거나 이것으로 본질적으로 구성될 수 있다.

[0156] 바람직하게는, 본 발명의 합성 식품은 닭 세포주 DL43 또는 오리 세포주 EB26(WP26)으로부터 수득된 세포 바이오매스를 포함하거나 이것으로 본질적으로 구성된다.

[0157] 일 실시형태에서, 본 발명의 합성 식품은 세포, 단백질, 폴리펩티드, 효소, 지질, 체지방, 동물 조직, 혈청 등과 같은 동물 기원으로부터 유래된 어떠한 추가 성분(들)도 함유하지 않는다.

[0158] 본 발명의 다른 실시형태에서, 본 발명의 합성 식품은 근육, 지방 또는 연골 세포 또는 이들의 조합과 같은 임의의 동물 조직으로부터 유래된 다른 세포를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 세포는 포유 동물(예를 들어, 소, 버팔로, 토끼, 돼지, 양, 사슴 등), 새(예를 들어, 닭, 오리, 타조, 칠면조, 꿩 등), 어류(예를 들어, 황새치, 연어, 참치, 농어, 송어, 메기 등), 무척추 동물(예를 들어, 랍스터, 게, 새우, 조개, 굴, 홍합, 성게 등), 파충류(예를 들어, 뱀, 악어, 거북이, 등) 및 양서류(예를 들어, 개구리 다리)와 같은 임의의 동물에서 유래한 1차 체세포일 수 있다. 대안적으로, 이들 세포는 분화된 세포로 유도된 다능성 배아 줄기 세포로부터 유래된 세포일 수 있다. 예를 들어, 근육 세포는 일차 근육 세포일 수 있거나 근육 세포, 지방 세포, 뼈 세포 및 연골 세포를 생성하는 다능성 배아 중간엽 줄기 세포로부터 유래될 수 있다. 조류 세포의 예는 WO2018011805에 기재된 ATTC 세포주 DF1(CRL-12203 닭), QM7(메추라기), DE(오리) 및 닭 배아 섬유 아세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들 세포는 조류 세포와 함께 *시험관 내에서* 성장되거나 조류 세포 수확 후 첨가될 수 있다. 이러한 세포의 첨가는 합성 고기의 맛, 향 및/또는 영양 품질을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 더 기름진 고기는 더 맛있고 제품의 맛 특성을 향상시킬 수 있다. 고기 세포 대 지방 세포의 비는 최적의 맛과 건강 효과를 가진 식품을 생산하도록 *시험관 내에서* 조절될 수 있다. 근육 및 연골 세포는 제품의 질감(일관성)을 향상시킬 수 있다. 근육 세포 및 연골 세포를 갖는 합성 식품의 예는 닭 가슴살 또는 돼지 갈비를 포함한다.

[0159] 또 다른 실시형태에서, 일반적으로 동물 전체(whole animal)의 고기 제품에서 부족한 비타민과 같은 다른 영양소가 첨가되어 합성 식품의 영양 가치를 높일 수 있다. 이는 성장 배지에의 영양소의 직접 첨가 또는 유전 공학 기술을 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 비타민 D, A 또는 다른 비타민 B 복합체와 같은 특정 비타민의 생합성을 담당하는 효소에 대한 유전자 또는 유전자들은 특정 비타민을 생산하기 위해 배양된 조류 세포에서 형질 감염될 수 있다. 기타 영양소에는 필수 미량 원소, 미네랄, 공-비타민, 필수 지방산, 필수 아미노산, 효소, 항산화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0160] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 공정은 또한 향미제 및/또는 향미 방향족을 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 향미제는 혼합 단계 중에 첨가될 수 있거나, 혼합 단계 전에 임의의 성분(예를 들어, 배양된 세포)과 혼합될 수 있다. 미각 및 감각 생성 향미제의 예로는 인공 감미료, 글루탐산 염, 글리신 염, 구아닐산 염, 이노신산 염, 리보뉴클레오티드 염, 및 아세트산, 구연산, 말산, 타르타르산 및 폴리페놀을 포함한 유기산이 있다. 일반적인 향미 방향족의 몇 가지 대표적인 예는 이소아밀 아세테이트(바나나), 계피 알데히드(계피), 에틸 프로피오네이트(과일), 리모넨(오렌지), 에틸-(E,Z)-2,4-데카디에노에이트(배), 알릴 헥사노에이트(파인애플), 에틸말톨(설탕, 솜사탕), 메틸 살리실레이트(윈터그린) 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0161] 또한, 본 발명은 식품을 시각적으로 더 매력적으로 만들기 위해 배양된 세포에 첨가될 수 있는 색 증진제(착색제)를 제공한다. 또한 착색제는 생리적 항산화제로서 기능하여 다른 필수 영양소를 제공할 수 있다. 예를 들어, 토마토, 블랙 커런트, 포도, 블루 베리, 크랜베리 등으로부터의 일부 플라보노이드, 카로티노이드, 안토시아닌 등과 같은 착색된 항산화제가 사용될 수 있다. 바람직하게는, 착색제는 천연 제품 또는 정제 또는 부분 정제된 제품이다. 예를 들어, 정제된 카테킨, 레스베라트롤, 안토시아닌, 베타-카로틴, 리코펜, 루테인, 제아잔틴 등이 착색제로서 사용될 수 있다.

[0162] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 식품은 맛, 질감 및 영양 함량에 기여할 수 있는 임의의 종류의 식품을 생성하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 합성 식품은 절임, 끓임, 조리, 훈제, 튀김, 구운, 건조 또는 냉동될 수 있으며, 전형적으로 간식으로 또는 식사의 일부로 먹을 수 있다. 본 발명의 공정에 따라 수득된 최종 식품(식용)은 수프, 퓌레, 페이스트, 파이, 펠릿, 크럼블, 젤, 분말, 과립, 정제, 칩, 캡슐, 스프레드, 소시지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 소비 형태로 구성될 수 있다. 최종 식품은 3D 프린터로 제조될 수 있다. 3D 인쇄 식품은 Novameat, Jet-Eat, Meatech 및 기타 회사에 의해 개발되었다. 특히 Novameat는 쇠고기 또는 닭고기의 질감이 있는 합성 3D 프린팅 고기를 개발했다(https://www.novameat.com/ 참조). 3D 식품 인쇄에 대한 완전한 탐색 관련(예를 들어, 문헌[Sun J. et al., 2015] 참조).

[0163] 최종 식품은 각각 배양된 조류 세포의 일부를 필수 성분으로서 포함하지만, 또한 다른 무독성 물질, 예를 들어

식물 유래 물질(배양된 식물 세포 포함)을 포함할 수 있다.

[0164] 마지막으로, 상기 실시형태는 단지 본 발명의 기술적 솔루션을 예시하기 위해 사용되며, 상기 실시형태를 참조하더라도 이에 제한되지 않는다는 점에 유의한다. 특정 구현 방식은 변형되거나 동등하게 대체될 수 있지만, 이러한 변형 또는 변경은 본 발명의 청구범위의 보호 범위로부터 벗어나지 않는다.

[0165] 실시예

[0166] **실시예 1.** 세포 바이오매스 생산

[0167] **물질 및 방법**

[0168] *세포 뱅크*

[0169] 2.5 mM의 L-글루타민(L-Gln)이 보충된 Ex-Cell® EBx™ GRO-I 무혈청 배지(SAFC, ref. 14530C)에서 성장하도록 적응된 세포로부터 제조된 조류 줄기 세포 뱅크(Valneva, 오리 세포주, GMP 작동 세포 뱅크)가 출발 물질로서 사용되었다.

[0170] 세포주는 처음에 오리 배반 배엽으로부터 단리되었고 스캐폴드 또는 매트릭스없이 무혈청 배지의 현탁액에서 성장하도록 적응되었다. 세포는 37℃에서 작은 규모로(삼각 플라스크에서) 또는 생물 반응기에서 더 큰 규모로 담체없이 현탁액에서 성장하는 특성을 특징으로 한다. 세포는 일정한 교반 하에 유지될 때 덩어리로서 증식한다.

[0171] *CD 성장 배지 준비*

[0172] 본 공정을 따라 사용된 배지는 2.5 또는 4 mM L-Gln(LONZA, ref. BE17-605E)으로 보충된 화학적으로 정의된 배지 HYQ CDM4 조류 배지(Hyclone, ref. SH31036.02)이었다.

[0173] *냉동 혼합물(mix)*

[0174] 1.46 M 수크로스 용액이 100 mL의 멸균 수(B Braun)에 50 g의 수크로스 분말(Sigma, S1888)을 용해시킴으로써 제조되었다. 이어서 용액을 0.22 μm 필터(Millipore)를 통해 멸균 여과하였다. 동결 혼합물은 20% 디메틸설폭사이드(DMSO)(Sigma, D2438) 및 2.5 mM L-Gln이 보충된 신선한 CD 배지에 희석된 0.2M 수크로스를 함유한다. 이 동결 혼합물은 즉석에서 준비되고 사용하기 전에 4℃에 두었다.

[0175] *동결 전 세포 뱅크 해동 및 CD 배지 적응*

[0176] 세포 해동은 37℃ 수조에 냉동 바이알(cryovial)을 배치함으로써 가능한 한 빨리 수행되었다. 이어서 세포는 2.5 mM L-Gln으로 보충된 예열된 CD 성장 배지 30 mL에 희석되었다. 트립판 배제 방법(Vi-Cell XR, Beckman Coulter)에 기반한 세포 계수기를 사용하여 세포 분취량에서 세포 수 및 생존율이 평가되었다. 동결 배지를 제거하기 위해 10분 동안 1200 rpm에서 세포 원심 분리가 적용되었다. 원심 분리 후, 세포 펠릿이 완전 성장 배지에 재현탁되어 0.5 내지 $1.5x10^6$ 세포/mL의 최종 시딩 농도를 얻었고, 세포 현탁액은 125 mL 삼각 플라스크로 옮겨졌다. 세포는 125 rpm(IKA 교반기, ref. KS260)에서 일정한 교반 하에 37℃ 및 7.5% CO_2에서 약 90% 습도(Thermo Incubator, Model 311, Hepa Class 100)에서 배양되었다.

[0177] 재생(revitalization) 후, 세포 배양물은 현미경 관찰로 매일 확인되었다. 이러한 해동 후 기간 동안, 세포 회복을 평가하기 위해 세포 계수가 정기적으로 수행되었다. 과밀도를 피하기 위해 2일째 및 3일째에 신선한 CD 성장 배지가 첨가되었다. 4일째에, 세포는 60 mL의 CD 성장 배지 하에서 $0.3x10^6$ 세포/mL로 250 mL 삼각 플라스크에서 시딩되었다. 교반 속도는 135 rpm으로 증가되었다.

[0178] 증폭을 위해, 세포는 공급자 권장 사항에 따라 500 mL 및 1 L 삼각 플라스크에 $0.3x10^6$ 세포/mL로 시딩되었다.

[0179] *마스터 세포 뱅크(MCB) 동결*

[0180] CD 배지에 적응된 세포는 10분 동안 1200 rpm에서 원심 분리에 의해 500 mL 튜브에서 지수 성장 단계에서 수확되었다. 원심 분리 후, 세포 펠릿은 $40x10^6$ 세포/mL로 사용된 배지에 희석되고 동등한 부피의 저온 동결 혼합물이 적가되어 최종적으로 $20x10^6$ 세포/mL로 세포 현탁액을 얻었다. 마지막으로, 동결 보존 배지는 DMSO(10%)(Sigma, ref D2438-50mL), 0.1 M 수크로스(6.5%)(Sigma, ref S188), 배양물에서 회수된 사용된 CD 배지의 50% 및 2.5 mM L-Gln으로 보충된 신선한 CD 배지의 33.5%로 구성되었다. 냉동 바이알(Corning, ref 430488)은 1 mL의 세포 동결 혼합물로 충전되고 장기 보관을 위해 액체 질소(-196℃)로 옮기기 전에 동결 용기

(Nalgene, Mr. Frosty™)에 -80℃에서 정치되었다.

[0181] *CD 배지 적응 세포주의 해동 및 배양*

[0182] CD 배지에서 성장하도록 적응된 세포를 포함하는 냉동 바이알은 15 mL의 신선한 CD 배지 하에 125 mL 삼각 플라스크에서 해동되고 150 rpm 교반 속도, 7.5% CO_2 및 80% 습도로 쉐이커 인큐베이터(Kuhner, ref ISF1-XC)에 정되었다. 1일째 및 2일째에 각각 15 mL 및 20 mL의 배지를 첨가한 후, 세포는 추가 증폭 단계를 위해 3일째에 계대 배양되었다.

[0183] *소규모 배양*

[0184] 해동 후, 세포는 37℃, 80% 습도 및 7.5% CO_2에서 쉐이커 인큐베이터(Kuhner, ref ISF1-XC)에 일정한 교반(150 rpm(250, 500 또는 1 L 삼각 플라스크의 경우) 또는 80 rpm(3L 삼각 플라스크), 25 mm 궤도) 하에 유지되는 250 mL 내지 3 L 삼각 플라스크(Corning, Ref 431144, 431147 및 431253)에서 성장되었다. 세포는 $0.3x10^6$ 세포/mL로 시딩되었고 3일마다 계대 배양되었다. 시딩은 250 mL, 1 L 또는 3 L 삼각 플라스크에서 각각 60 mL, 400 mL 또는 1 L에서 수행되었다.

[0185] *성장 동력학*

[0186] 세포는 2.5 mM L-Gln이 보충된 100 mL CD 배지 하에서 0.1 내지 $0.5x10^6$ 세포/mL로 250 mL 삼각 플라스크에 시딩되었다. 전달 후, 시딩 후 세포 농도 및 생존율을 확인하기 위해 매일 세포 계수가 수행되었다.

[0187] *30 L 교반 탱크 생물 반응기에서 대규모 생산에 사용되는 파라미터*

[0188] 3L 삼각 플라스크에서 증폭한 후, 30 L 스테인리스 스틸 생물 반응기(Applikon, Ref ADI 1075)에서 20 L의 예열된 배지에 $0.8x10^6$ 세포/mL로 세포가 시딩되었다. 배양 모니터링은 이후에 설명된 바와 같이 정의되었다: CO_2 또는 NaOH 주입으로 조절된 pH 7.2, O_2 설정 점 50%, 교반 속도 40 rpm 및 온도 37℃. 탄소원(글루코스, 글루타메이트 및 글루타민)의 소비 및 대사 부산물(락테이트 및 암모늄)의 방출은 세포 배양을 따라 매일 모니터링되었다(바이오프로필 플렉스(Bioprofile Flex) 분석기, Nova Biomedical).

[0189] *세포 수확 및 펠릿 준비*

[0190] 시딩 후 3일째에, 1L 병의 생물 반응기로부터 세포가 수집되었고 10분 동안 3450 g에서 원심 분리되었다(Beckman Coulter, Ref AVANTI JXN-26/rotor JL-8.1000). 사용된 배지를 제거한 후, 세포는 헹구기 위해 1xPBS(LONZA, Ref BE17-516F)에 재현탁되고 10분 동안 3450 g(4000 rpm)에서 원심 분리의 두 번째 실행을 위해 500 mL 튜브로 옮겨졌다(ThermoFisher Scientific, Ref Sorvall ST40). 완충액 제거 후, 건조 펠릿을 포함하는 500 mL 튜브의 무게를 재고(스케일: Denver, Ref SI 4002) 보관을 위해 -80℃에 두었다(Sanyo, Ref MDF-U73V). 세포 펠릿의 중량은 총 중량(500 mL 튜브 + 세포 펠릿)에서 500 mL 튜브 중량을 빼서 계산되었다.

[0191] **결과**

[0192] *화학적으로 정의된 배지에 대한 조류 줄기 세포 적응*

[0193] 공정의 첫 번째 단계는 화학적으로 정의된 배지 HYQ CDM4 조류 배지에서 성장하도록 적응된 조류 줄기 세포 뱅크의 제조였다.

[0194] 이 단계의 목적은

[0195] - 여러 적응을 피하기 위해

[0196] - 마스터 세포 뱅크의 가능한 검증/방출을 허용하기 위해

[0197] - 여러 배치의 생산에 동일한 출발 물질을 사용하기 위해

[0198] - 화학적으로 정의된 바이오 생산에 할당된 타임 라인(timeline)을 단축하기 위해

[0199] - 배치 대 배치 변동성을 최소화하기 위해, 고유한 세포 공급원을 준비하는 것이었다.

[0200] *세포 적응 및 뱅킹*

[0201] 각 생산 라운드에 대해 줄기 세포를 CD 배지에 적응시키는 것을 피하기 위해 단일 적응이 수행되었고 아래에 설

명하고 도 1에 나타낸 바와 같이 165 바이알의 작동 뱅크가 준비되었다.

[0202] Ex-cell GRO-I SFM에서 원래 성장한 조류 줄기 세포의 일 냉동 바이알이 2.5 mM의 L-Gln이 보충된 30 mL의 CDM4 조류 CD 배지에서 직접 해동되었다. 원심 분리 후, $7.2x10^6$ 세포가 회수되었고 125 mL-에를렌마이어에 $0.6x10^6$ 세포/mL 농도로 12 mL 배지 하에 시딩되었다. 세포는 125 rpm에서 쉐이커 상의 인큐베이터에 두었다. 해동 후 2일째 및 3일째에 각각 8 mL 및 15 mL의 CD 배지가 첨가되었다. 4일째에, 세포 계수를 위해 분취량이 수집되었고 원심 분리에 의해 세포가 수확되었다. 세포 펠릿을 신선한 CD 배지에 재현탁시킨 다음; 하나의 250 mL-에를렌마이어가 $0.3x10^6$ 세포/mL 농도로 60 mL 하에서 시딩되었고 135 +/-15 rpm에서 교반 하에 배양되었다. 다음 두 계대는 다음과 같이 수행되었다: 7일째 또는 10일째에 세포를 수확하고 3개의 새로운 500 mL-에를렌마이어 또는 3개의 L-에를렌마이어로 옮겼으며, 각각 CD 배지의 200 mL 또는 1 L 하에 $0.3x10^6$ 세포/mL로 희석했다. 13일째에 3개의 L-에를렌마이어에서 약 110억 개의 세포가 수집되었다. 최종 세포 농도는 $9.1x10^6$ 세포/mL이었고 생존율은 91%였다.

[0203] HYQ CDM4 조류 배지에서의 직접 적응은 매우 효율적이었으며; CD 배지에서 해동 후 10일 후에, 세포는 $5x10^6$ 세포/mL의 예상 밀도 및 양호한 생존율(80% 초과)로 회수되었다(도 2a 참조). 결과적으로, 빠르게 달성된 개체군 배가 시간(PDT)은 15 내지 16시간의 예상 범위에 있었다(도 2b 참조). 형태의 면에서 세포는 1 다스(dozen)의 세포 덩어리로서 현탁액에서 성장하는 특성을 유지했으며, 이는 피펫팅에 의해 쉽게 재현탁될 수 있었다. 13일째에 세포 농도는 $9.1x10^6$ 세포/mL에 도달했고 세포 생존율은 91%에 도달했다. 이를 통해 165 바이알의 세포 뱅크(뱅크 5777)를 생성할 수 있었다. 따라서, 단지 4 계대 및 13일은 고 품질의 마스터 세포 뱅크를 준비하기 위해 HYQ CDM4 조류 CD 배지에서 조류 줄기 세포를 적응시키기에 충분했다.

[0204] *세포 뱅크 검증*

[0205] CD 적응 후 조류 줄기 세포 뱅크의 품질을 보장하기 위해, 세포 뱅크를 해동하고 세포 견고성, 생존율 및 계대에 따른 세포 밀도 및 PDT의 안정성을 제어했다.

[0206] 세포 견고성 및 안정성을 확인하기 위해, 뱅크 5777이 해동되고 4의 추가 계대 동안 배양에 유지되었다. 도 3에 예시된 바와 같이 해동 직후 뱅크의 생존율은 매우 양호하여 91%에 이르렀다. 바이알에 채워진 세포의 총량이 완전히 회수되었기 때문에 세포 손실은 동결 단계와 관련되지 않았다. 3일 배양 후, 세포 밀도는 약 $5x10^6$ 세포/mL에 도달하여 빠른 세포 증식을 나타내었다. 다음 계대에서 $6x10^6$ 세포/mL보다 높은 농도는 세포 뱅크의 양호한 품질을 확인했다.

[0207] *성장 동력학*

[0208] 적응된 조류 줄기 세포에 의해 잠재적으로 얻을 수 있는 최적의 밀도를 결정하기 위해, 250 mL-에를렌마이어를 상이한 농도로 시딩하고, 배양을 실시하고 매일 세포 밀도와 생존율을 확인했다. 도 4a는 배양 3일 및 4일 후에 얻은 세포 밀도를 보여주고; 도 4b는 대응하는 세포 생존율을 보여준다. 데이터는 $0.4x10^6$ 세포/mL까지의 시딩 밀도 증가가 배양 4일 후 최적의 세포 농도를 개선하지 않았음을 보여준다. 시딩이 $0.2x10^6$ 세포/mL보다 높은 모든 조건에서 생존율은 4일째에 약간 감소하는 경향이 있었다. 생존율 및 세포 농도와 관련하여 250 mL-에를렌마이어에서 양호한 생존율로 최적의 밀도에 도달하기 위한 좋은 절충안은 0.3 내지 $0.4x10^6$ 세포/mL의 양으로 세포를 시딩하는 것이다.

[0209] *30 L 생물 반응기의 시딩을 위한 확장*

[0210] 30 L 생물 반응기를 시딩하는 데 필요한 세포 바이오매스를 생산하기 위해, 우리는 적응된 조류 줄기 세포 뱅크 5777을 해동하고 삼각 플라스크에서 수행된 확장 공정에 따라 세포를 증폭했다.

[0211] 30 L 스테인리스 스틸 생물 반응기를 사용하여 *시험관 내* 최종 조류 세포 바이오매스를 생산했다. 30 L 생물 반응기를 $0.8x10^6$ 세포/mL 농도에서 20 L 세포 현탁액으로 시딩하기 위해 160억 개의 세포가 필요했다. 조류 줄기 세포가 높은 세포 밀도에서 성장하는 특성으로 인해, 필요한 양의 세포는 단지 2L 현탁액으로 얻어졌기 때문에 확장 절차는 번거롭지 않았다. 도 5는 생물 반응기를 시딩하기 위한 세포의 빠른 증폭을 위한 전형적인 공정을 예시한다.

[0212] 도 6은 확장 공정을 따라 각 계대에서 얻은 세포 밀도를 보여준다. 증폭의 마지막 단계에서 달성된 세포 농도는 $10.3x10^6$ 세포/mL로 총 206억 개의 세포를 수확할 수 있었다.

[0213] *30 L 생물 반응기에서 배치 세포 성장*

[0214] 3 L-에를렌마이어 둘 다에서 수확된 세포는 4 mM의 L-Gln이 보충된 20 리터의 예열된 CD 배지 하에서 $0.8x10^6$ 세포/mL의 농도로 30 L 생물 반응기에 시딩되었다. pH 및 산소 조절 설정 점은 각각 7.2 및 50%로 조정되었으며 교반 속도는 40 rpm이었다. 글루코스와 글루타민은 배치 방법으로 공정이 수행되었기 때문에 조정되지 않았다. 탄소원(글루코스, 글루타메이트 및 글루타민)의 소비 및 대사 부산물(락테이트 및 암모늄)의 방출은 세포 배양을 따라 매일 모니터링되었다(바이오프로필 플렉스 분석기, Nova Biomedical).

[0215] 앞서 설명한 파라미터를 사용하여 세 번의 실행을 수행했다. 도 7은 생산 3일을 따른 세포 성장 및 생존율을 보여준다. 시딩 후, 지연 단계가 관찰되지 않았고 세포 증식은 시딩과 1일째 사이의 짧은 개체군 배가 시간(12 시간 미만)에 의해 나타낸 바와 같이 매우 빨랐다(표 1 참조). 3일째에, 우리는 생존율 감소와 결합된 증식 속도 저하를 보여주는 PDT의 증가(35 시간 초과)를 관찰하였다.

표 1. 30 L 생물 반응기에 시딩 후 개체군 배가 시간 추적

(A) 개체군 배가 시간(시간); (B) 생존 세포 밀도($x10^6$ 세포/mL); (C) 세포 생산에 따른 생존율(%).

A

	실행 1	실행 2	실행 3
1 일째	12	11.4	9.6
2 일째	14.7	13.1	13.7
3 일째	35.3	108.2	48.9

B

	실행 1	실행 2	실행 3
1 일째	2.7	2.4	3.1
2 일째	7.7	10	8.9
3 일째	12.5	11.5	12.7

C

	실행 1	실행 2	실행 3
1 일째	98	97.4	98
2 일째	97.4	97.5	98.4
3 일째	88.7	86.3	87.5

[0216]

[0217] 세 번의 실행에 대해 얻은 더 높은 세포 농도의 평균 및 대응하는 생존율에 기초하여, 최적의 밀도는 대략 $14x10^6$ 세포/mL의 총 농도로 2일과 3일 사이에 도달했다고 결론지었다.

[0218] 세 번의 실행 동안에 수행된 대사산물 연구는 글루타민, 글루타메이트 및 글루코스의 높은 소비를 보여주었다(데이터는 표시되지 않음).

[0219] *세포 수확*

[0220] *원심 분리*

[0221] 생물 반응기에서 세포 성장 3일 후, 조류 세포는 고속(3450 g)으로 원심 분리에 의해 1 L-병(도 8 참조)에서 수확되고, PBS에서 헹구고, 500 mL 튜브로 옮기고, 원심 분리의 두번째 실행에 의해 펠릿화되었다(도 9 참조).

[0222] 원심 분리의 마지막 실행 후 펠릿의 무게를 측정했다. 각각 304 g, 282 g 및 281 g이 실행 1, 실행 2 및 실행 3에서 얻어져 바이오매스 생산 측면에서 공정 재현성을 입증했다. 마지막으로, 펠릿은 보관을 위해 -80℃에서 냉동되었다.

[0223] *침강 및 경사 분리*

[0224] 원심 분리에 의한 세포 바이오매스 수확은 번거로운 공정이며, 냉각 시스템 없이는 생물학적 물질의 변경 위험이 있는 여러 원심 분리 실행 후 온도 상승이 관찰될 수 있다. 따라서 원심 분리(또는 여과)전 경사 분리 단계가 고려되어 현탁액의 부피를 감소시켰다.

[0225] EBx 세포가 작은 응집체로서 성장함에 따라, 세포 침강을 촉진하기 위해 세포 응괴(clumping)를 유도하는 조건이 연구되었다. 배지에의 염화칼슘의 첨가는 세포 덩어리의 형성을 촉진한다. 오리와 닭 세포는 동일한 범위의 칼슘 농도에 민감하지 않기 때문에 다른 조건들이 시험되었다. 지수 단계의 끝에 닭 또는 오리 세포 현탁액은 50, 100, 150, 200 또는 300 mg/L의 염화칼슘으로 보충되었고 교반 하에 37℃에서 2 내지 6시간 동안 배양되었다. EBx 세포주의 경우, 2시간 배양 후 응집이 이미 관찰되었다. 가장 큰 덩어리는 가장 높은 칼슘 농도로 생성되었다. 칼슘 농도에 따라 덩어리 크기가 점진적으로 증가하는 것으로 나타났다. 거의 모든 세포가 50 mg/mL의 염화칼슘의 존재 하에 2시간 배양 후 응집되기 때문에 오리 세포의 경우 세포 응괴가 더욱 두드러진다.

[0226] 염화칼슘으로 6시간 배양 및 20분의 침전 후 튜브 바닥에 침강된 세포 개체군의 비율을 보다 정확하게 평가하기 위해, 상층액에 남아있는 세포의 세포 계수를 하였다. 얻은 데이터는 표 2 및 3에 요약되어 있다. 42.8%의 닭 세포 현탁액이 칼슘 첨가없이 20분 내에 침강될 수 있음이 관찰되었다. 6시간 처리는 가장 높은 시험 용량의 염화칼슘(300 mg/L)으로 최대 75.5%에 도달하여 이 침강 비율을 개선한다. 오리 세포의 경우, 칼슘없이 20분 후에 명확한 침강이 관찰되지 않았지만, 50 mg/L의 염화칼슘의 첨가는 세포 바이오매스의 95% 침전에 충분했다.

[0227] 유사하게, 세포 침강 단계는 세포 증폭 공정의 끝에서 생물 반응기에 적용될 수 있다. 결과적으로, 세포 바이오매스는 용기 바닥에 침전될 것이다. 수확 포트(port)가 용기의 가장 낮은 부분에 있는 경우, 감소된 부피의 농축된 세포 "페이스트"가 수집되고 다음 단계의 바이오 공정에서 사용될 수 있다.

표 2. 닭 세포의 침강에 대한 염화칼슘의 영향

[0228]

	닭 세포주				
침강 시간 (분)	0	20			
$CaCl_2$ 농도 (mg/L)	0	0	100	200	300
상층액에서의 총 세포 밀도 ($x10^6$ 세포/mL)	8.2	4.7	2.3	2.1	2.0
침강 비율 (%)	0	42.8	71.8	74.0	75.5

표 3. 오리 세포 침강에 대한 염화칼슘의 영향

[0229]

	오리 세포주				
침강 시간 (분)	0	20			
$CaCl_2$ 농도 (mg/L)	0	0	50	100	150
상층액에서의 총 세포 밀도 ($x10^6$ 세포/mL)	17.0	16.9	0.8	0.5	0.5
침강 비율 (%)	0	0.9	95.4	97.0	97.2

[0230] 아세트산 칼슘, 탄산 칼슘, 시트르산 칼슘 및 젖산 칼슘 등과 같은 다른 칼슘 염이 대안으로 고려될 수 있다.

[0231] *생산 수율*

[0232] 실행 1, 실행 2 및 실행 3은 각각 304 g, 282 g 및 281 g의 조류 줄기 세포를 생성했다. 따라서 생물 반응기에서 수확한 세포 양(표 2 참조)에 기초할 때, 바이오매스 생산성(총 중량을 수확된 총 세포로 나눈 값)은 백만

세포당 1.18 +/-0.07 mg이었다. 20 L 생물 반응기를 수행하기 위해 385.6 g의 배지 분말이 필요했기 때문에 생산 수율은 배지 분말 g 당 약 0.75 g의 바이오매스였다.

표 4. 생산 수율 및 생산성

	실행 1	실행 2	실행 3	평균
3 일째 밀도 ($x10^6$ 세포/mL)	12.5	11.5	12.7	12.3
수확된 총 세포 ($x10^9$ 세포)	250	230	254	245
바이오매스 중량 (g)	304	282	281	289
세포 mg/$x10^6$ 세포	1.22	1.23	1.1	1.18
비 바이오매스 g/배지 분말 g	0.79	0.73	0.73	0.75

[0233]

[0234] 따라서 에를렌마이어의 동역학 및 대사 산물 소비 동안에 얻은 데이터에 기초할 때, 생성물 수율의 개선이

[0235] - 3일째 후 세포 성장을 연장하기 위해 초기 세포 시딩을 변형함으로써;

[0236] - 고갈을 피하기 위해 CD 배지를 보충함으로써;

[0237] - 유가 또는 관류 공정을 적용함으로써 달성될 수 있다.

[0238] **참고문헌의 목록:**

[0239] Biswas and Hutchins. 2007. "Embryonic Stem Cells." *Stem cells and Development* 16:213-221.

[0240] Chang et al., 1992. "Simple method for isolation of primordial germ cells from chick embryos." Cell Biol Int. Reports 16(9):853-857.

[0241] Eyal-Giladi and Kochan, 1976. "From cleavage to primitive steak formation: a complementary normal table and a new look at the first stage of the development of the chick." *Developmental Biology* 49:321-337.

[0242] Galbraith H. 2002. "Hormones in international meat production: biological, sociological and consumer issues." *Nutrition Research Reviews* 15:293-314.

[0243] GEAS. October 2012. "Growing greenhouse gas emissions due to meat production."

[0244] Greger M. 2007. "The human/animal interface: emergence and resurgence of zoonotic infection diseases". *Critical Reviews in Microbiology* 33:243-299.

[0245] Hamburger V. and Hamilton H. 1951. "A series of normal stages in the development of the chick embryo".

[0246] Hedenus F., Wirsenius D. and Johansson J.A. 2014. "The importance of reduced meat and dairy comsimption for meeting stringent climate change targets". *Climatic Change* 124:79-91.

[0247] Hsu P., Lander E.S., and Zhang F. 2014. "Development and application of CRISPR_Cas9 for genome engineering". *Cell* 157, June 5:1262-1278.

[0248] Jeong SH. et al., 2010. "Risk assessment of growth hormones and antimicrobial residues in meat:" *Toxicol. Res.* 26(4):301.313.

[0249] Jeongseok Lee et al. 1999. "Control of fed-batch fermentations." *Biotechnol Adv* 17:29-48.

[0250] Kadim I.T. et al. 2015. "Cultured meat from muscle stem cells: a review of challenges and prospects." *J. Integrative Agriculture* 14(2):222-233.

[0251] Konstantinov K. et al. 2006. "The "push-to-low" approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells." *Adv Biochem Engin Biotechnol* 101:75-98.

[0252] Kraus B. et al. 2011. "Avian cell line - technology for large scale vaccine production." BMC Proceedings 5(suppl 8):52.

[0253] Mekonnen and Hoekstra. "The green, blue and gray water footprint of farm animals and animal products." UNESCO-IHE, Research Report Series No. 48. December 2010.

[0254] Naito M. et al. 1994. "Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells." *Molecule Reproduction and Development* 39:153-161.

[0255] Nikolay A. et al. 2018. "Process intensification of EB66 cell cultivations leads to high-yield yellow fever and Zika virus production." *Applied Microbiol Biotechnol* 102:8725-8737.

[0256] Olivier S. et al. 2010. "EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antoibodies with enhanced ADCC activity." *MAbs* 2(4):405-15.

[0257] Opio C., Gerber P., Falcucci A., et al., 2013. "Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains. A global life cycle assessment." Report prepared by Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO), Rome.

[0258] Resnick R. et al. 1990. "Phylogenetic Distribution of the Novel Avian Endogenous Provirus Family EAV-0." L Virology 64(10):4640:4653.

[0259] Ritchie and Roser. 2018. "Meat and Seafood Production & Consumption."

[0260] Sellier N., Brillard J-P and Bakst M.R. 2006. "Comparative staging of embryo development in chicken, turkey, duck, goose, Guinea fowl, and Japanese quail assessed from five hours after fertilization through seventy-two hours of incubation." *J Appl Poult Res* 15:219-228.

[0261] Sun J. et al. 2015. "A Review on 3D Printing for Customized Food Fabrication", *Procedia Manufacturing* 1: 308-319.

[0262] Tapia F. et al. 2016. "Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivations: options for process intensification in cell culture-based viral vaccine production." *Appl Microbiol Biotechnol* 100:2121-2132.

[0263] Tuomisto H, Ellis M.J. and Haastrup P. "Environmental impacts of cultured meat: alternative production scenarios." *Proceedings of the 9th International Conference on Life Cycle Assessment in the Agri-Food Sector*. 2014

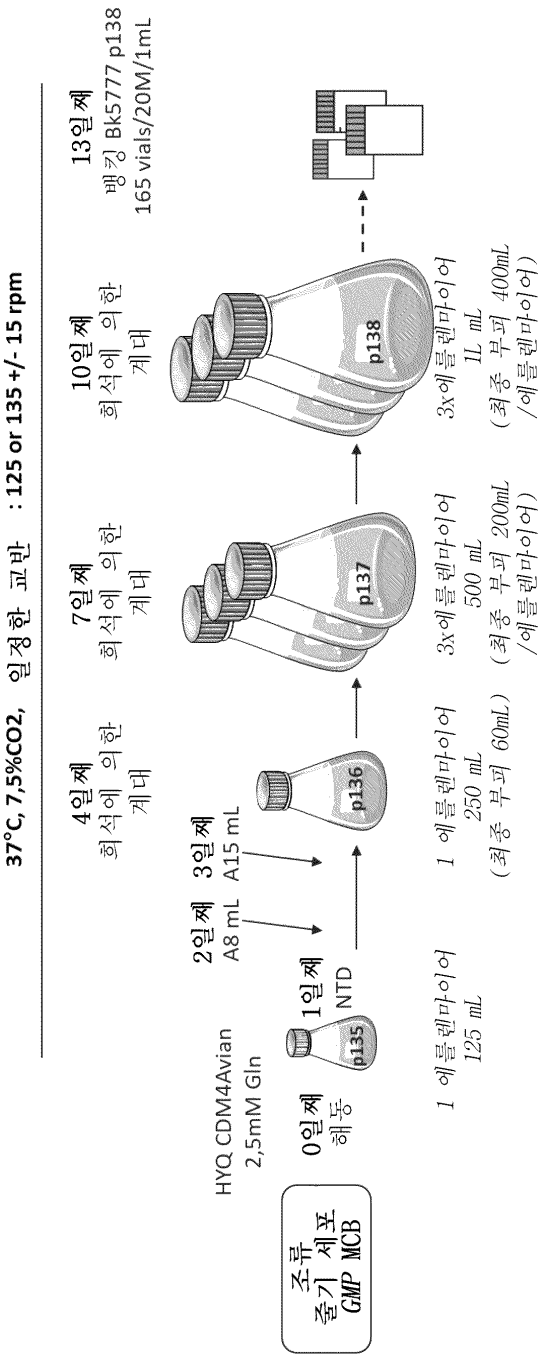
[0264] Vazquez-Ramirez D. et al. 2018. "High-cell-density cultivations to increase MVA virus production." *Vaccine* 36:3124-3133.

[0265] Yamane & Shimizu. 1984. "Fed-batch Techniques in Microbial Processes." *Advances in Biochem Eng. Biotechnol* 30:147-194.

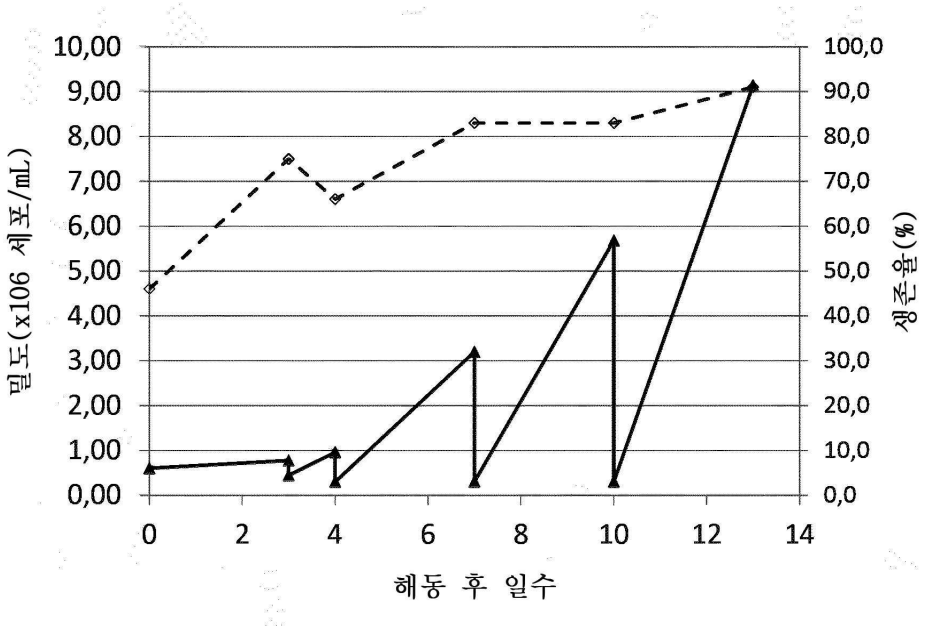
[0266] Yasuda Y. et al. "A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells." *J Reprod. Fert.* 96:521-528. 1992.

도면

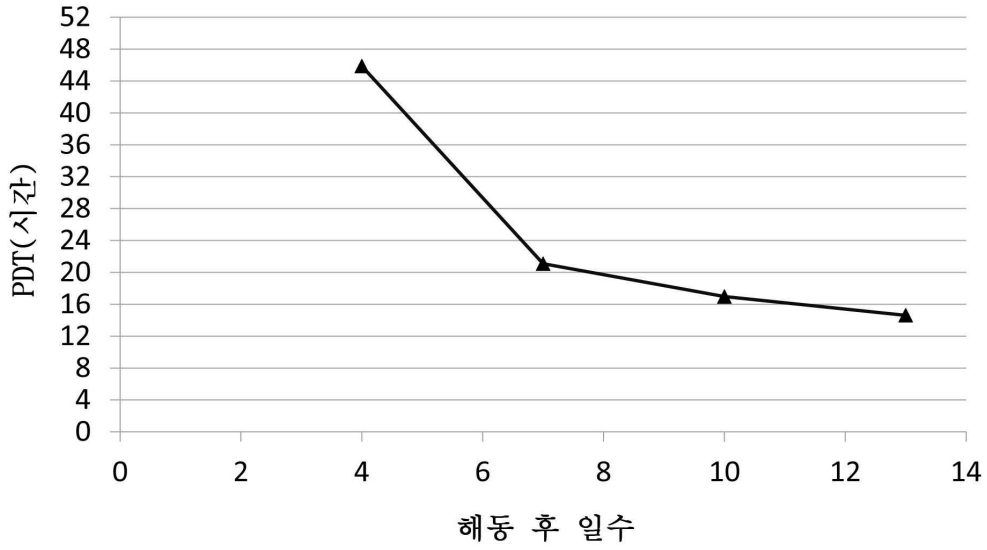
도면1


37°C, 7,5%CO2, 일정한 교반 : 125 or 135 +/- 15 rpm
조류 줄기 세포 GMP MCB
0일째 해동
1 에를렌마이어 125 mL
HYQ CDM4Avian 2,5mM Gln
1일째 NTD
p135
2일째 A8 mL
3일째 A15 mL
p136
1 에를렌마이어 250 mL (최종 부피 60mL)
4일째 희석에 의한 계대
7일째 희석에 의한 계대
p137
3x에를렌마이어 500 mL (최종 부피 200mL /에를렌마이어)
10일째 희석에 의한 계대
p138
3x에를렌마이어 1L mL (최종 부피 400mL /에를렌마이어)
13일째 뱅킹 Bk5777 p138 165 vials/20M/1mL

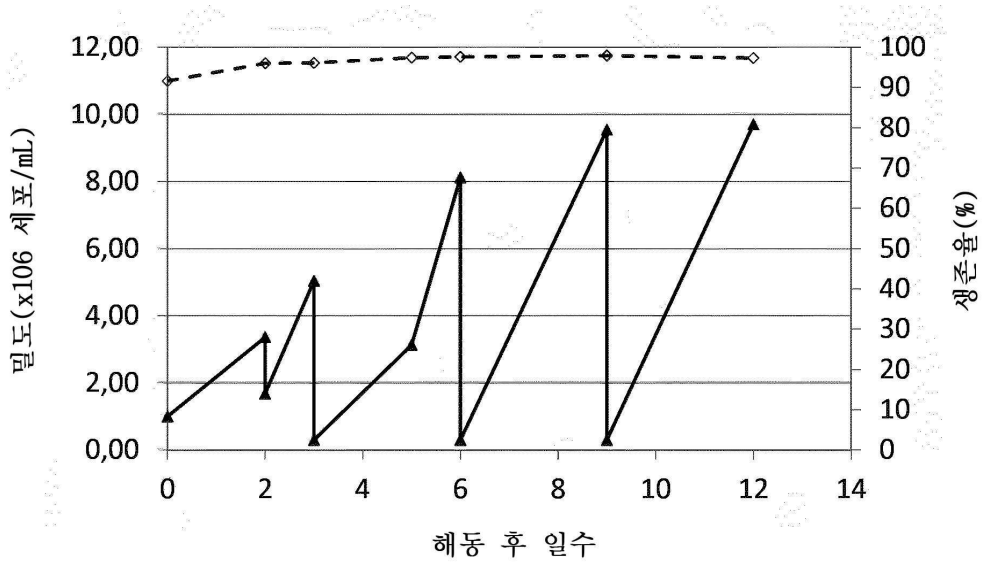
도면2a


10,00
9,00
8,00
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
밀도(x106 세포/mL)
100,0
90,0
80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
생존율(%)
0
2
4
6
8
10
12
14
해동 후 일수

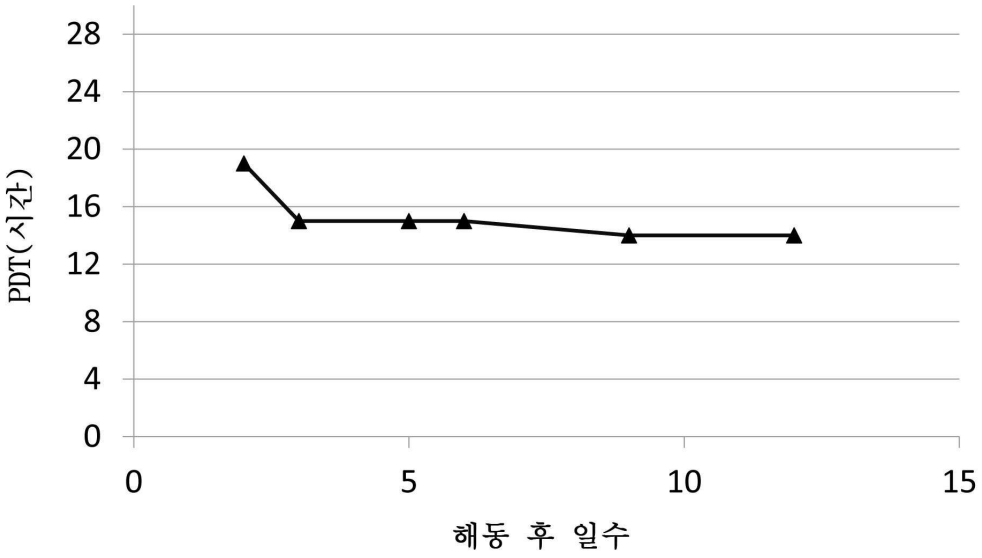
도면2b


52
48
44
40
36
32
28
24
20
16
12
8
4
0
PDT(시간)
0
2
4
6
8
10
12
14
해동 후 일수

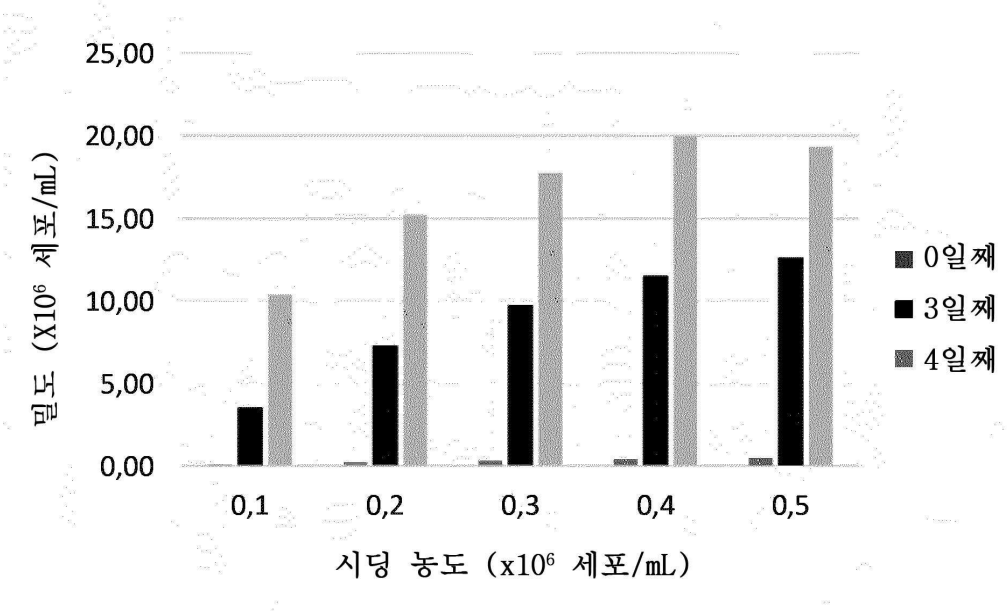
도면3a


12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
2,00
0,00
밀도(x106 세포/mL)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
생존율(%)
0
2
4
6
8
10
12
14
해동 후 일수

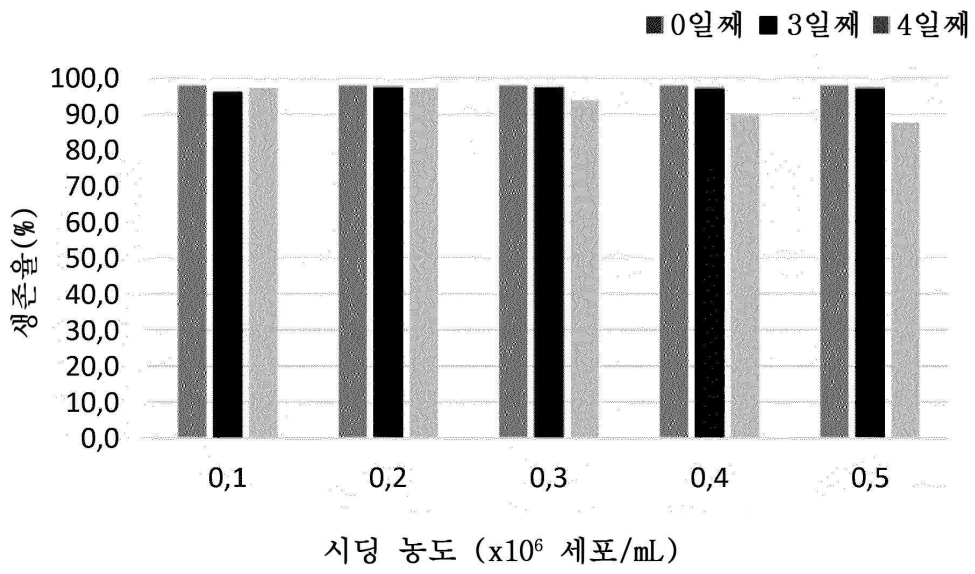
도면3b


28
24
20
16
12
8
4
0
PDT(시간)
0
5
10
15
해동 후 일수

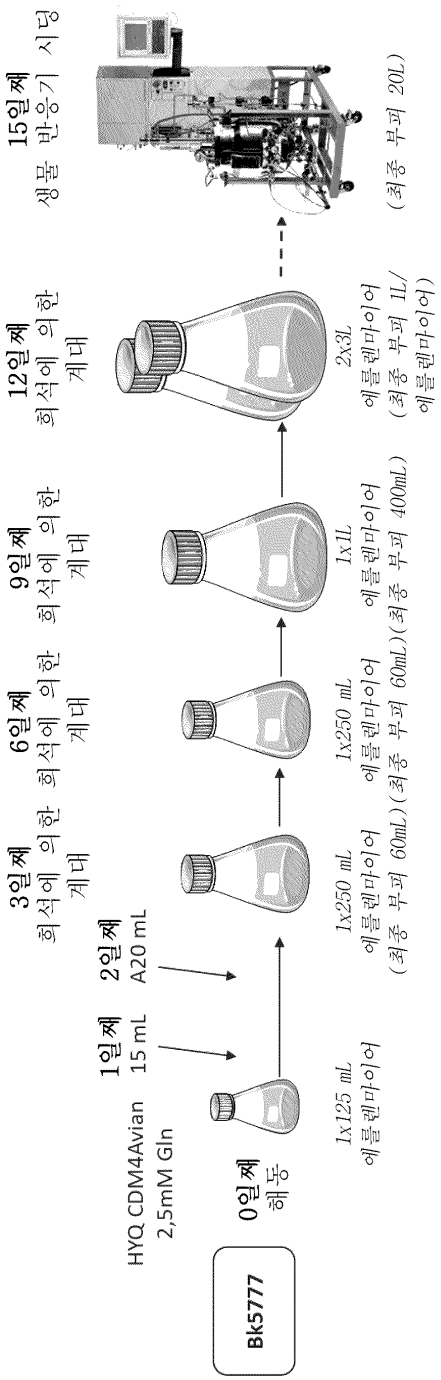
도면4a


25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
밀도 (X10⁶ 세포/mL)
0일째
3일째
4일째
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
시딩 농도 (x10⁶ 세포/mL)

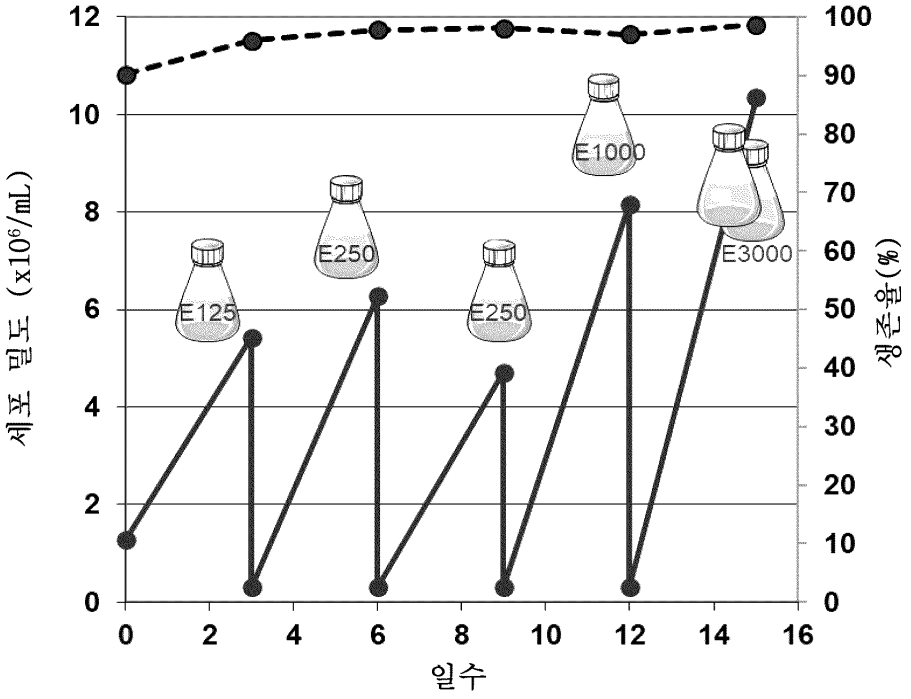
도면4b


0일째
3일째
4일째
100,0
90,0
80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
생존율(%)
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
시딩 농도 (x10⁶ 세포/mL)

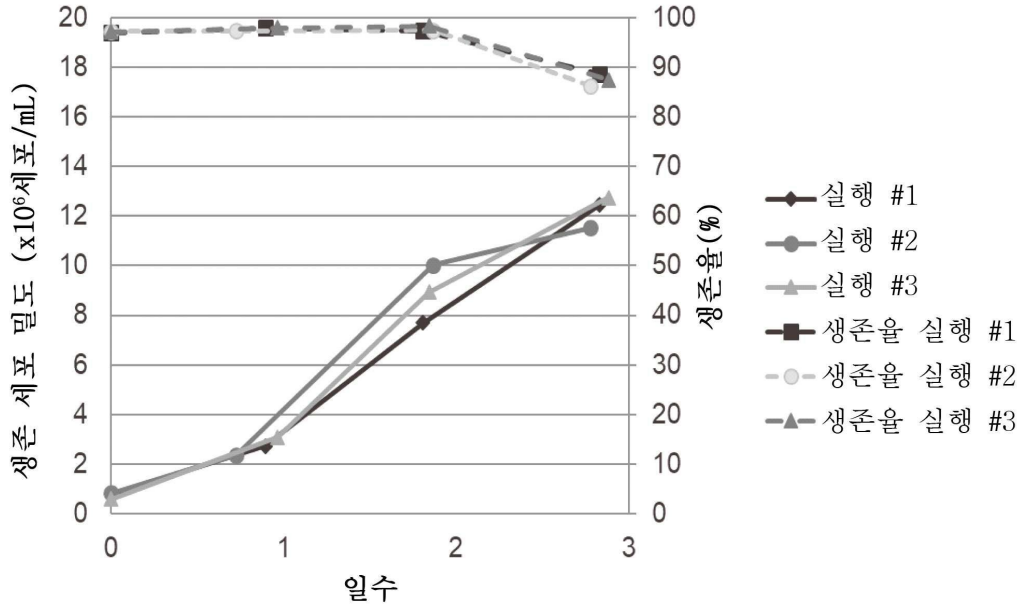
도면5


Bk5777
0일째
해동
HYQ CDM4Avian
2,5mM Gln
1일째
15 mL
2일째
A20 mL
3일째
희석에 의한
계대
6일째
희석에 의한
계대
9일째
희석에 의한
계대
12일째
희석에 의한
계대
15일째
생물 반응기 시딩
1x125 mL
에를렌마이어
1x250 mL
에를렌마이어
(최종 부피 60mL)
1x250 mL
에를렌마이어
(최종 부피 60mL)
1x1L
에를렌마이어
(최종 부피 400mL)
2x3L
에를렌마이어
(최종 부피 1L/
에를렌마이어)
(최종 부피 20L)

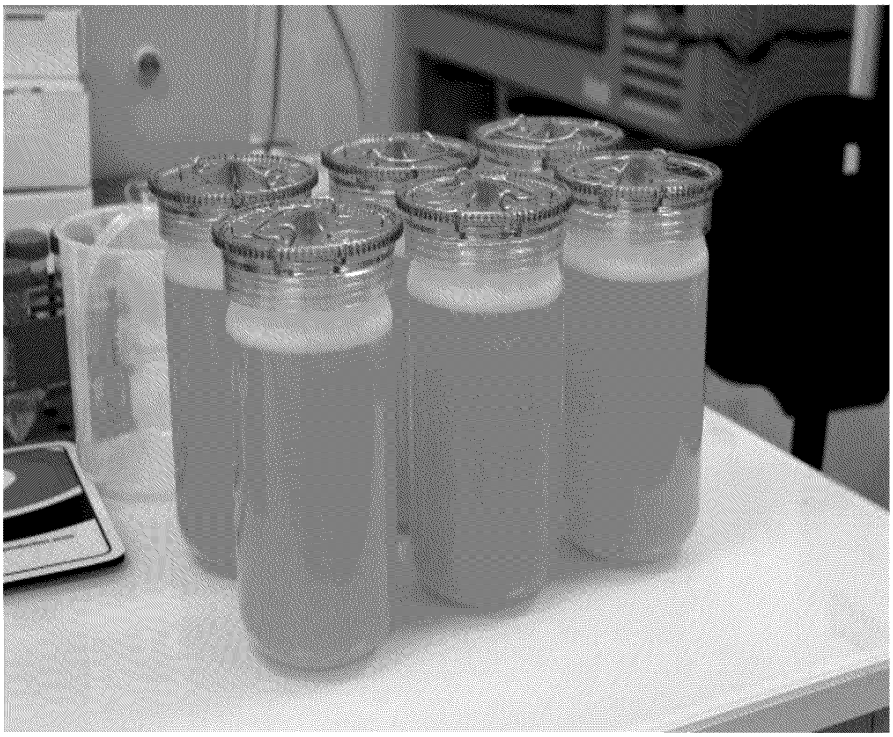
도면6


12
10
8
6
4
2
0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
세포 밀도 (x10⁶/mL)
생존율(%)
일수
E125
E250
E250
E1000
E3000

도면7


20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
생존 세포 밀도 (x10⁶세포/mL)
생존율(%)
일수
실행 #1
실행 #2
실행 #3
생존율 실행 #1
생존율 실행 #2
생존율 실행 #3

도면8



도면9

