

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046437**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента 2024.03.14	(51) Int. Cl. <i>C12M 1/00</i> (2006.01) <i>C12M 1/12</i> (2006.01) <i>C12M 1/42</i> (2006.01) <i>C12N 5/071</i> (2010.01) <i>C07K 16/06</i> (2006.01) <i>A23C 9/152</i> (2006.01) <i>A23L 33/10</i> (2016.01)
(21) Номер заявки 202293398	
(22) Дата подачи заявки 2021.05.26	

(54) КОМПОЗИЦИИ МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА

(31) 63/030,149; 63/200,480; 17/301,216	(56) US-A1-20150079584
(32) 2020.05.26; 2021.03.09; 2021.03.29	CHO, Y. et al.: "Construction of a 3D mammary duct based on spatial localization of the extracellular matrix", NPG Asia Materials, 2018, Vol. 10, No. 10, pages 970-981, abstract; page 980, conclusion; figures 1, 6
(33) US	US-A1-20180066220
(43) 2023.03.20	US-A1-20170267970
(86) PCT/US2021/034267	US-A1-20190211296
(87) WO 2021/242866 2021.12.02	
(71)(73) Заявитель и патентовладелец: БАЙОМИЛК, ИНК. (US)	
(72) Изобретатель: Стрикленд Лэйла (US)	
(74) Представитель: Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В., Христофоров А.А., Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю. (RU)	

(57) В изобретении предлагаются культивированные молочные продукты для применения в качестве питательных добавок. Также предлагаются живые клеточные конструкции для получения культивированных молочных продуктов и биореакторы для получения культивированных молочных продуктов. Также предлагаются композиции с секреторным IgA и способы применения.

B1

046437

**046437
B1**

Ссылка

По настоящей заявке испрашивается преимущество приоритета предварительной заявки США № 63/030149 зарегистрированной 26 мая 2020 г., предварительной заявки США № 63/200480, зарегистрированной 9 марта 2021 г., и заявки США № 17/301216, зарегистрированной 29 марта 2021 г., содержимое каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в формате ASCII и включен, таким образом, посредством ссылки полностью. Указанная копия ASCII, созданная 24 мая 2021 г., называется BMQ_002WO_SL.txt и имеет размер 29447 байт.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Это раскрытие относится к композициям молочного продукта, которые содержат белковые, липидные и олигосахаридные компоненты и концентрации компонентов, которые имитируют грудное молоко человека, вырабатываемое кормящей женщиной, причем молочные композиции производятся *in vitro* и/или *ex vivo* культивируемыми клетками молочной железы.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Молоко является основным продуктом питания человека, как в младенчестве, так и на протяжении всей жизни. Американская академия педиатрии и Всемирная организация здравоохранения рекомендуют, чтобы младенцы находились на исключительно грудном вскармливании в течение первых 6 месяцев жизни, и потребление молочных продуктов после младенческого возраста является основой питания человека, представляющее мировую индустрию стоимостью 700 млрд долларов. Однако лактация является трудоемким и метаболически интенсивным процессом, который может представлять биологические и практические проблемы для кормящих матерей, а молочная продуктивность связана с воздействием на окружающую среду, общество и благополучие животных в сельскохозяйственных контекстах.

Возможность использования культур клеток млекопитающих для производства продуктов питания в последние годы вызывает все больший интерес, и было разработано несколько успешных прототипов мясных и морских пищевых продуктов из культивируемых мышечных и жировых клеток (Stephens et al. 2018 Trends Food Sci Technol. 78:155-166). Кроме того, ведутся работы по коммерциализации производства яичных и молочных белков с использованием микробных экспрессирующих систем. Однако этот основанный на ферментации способ, связанный с экспрессией генно-инженерного продукта и очисткой отдельных компонентов, неспособен воспроизвести полный молекулярный профиль молока или молочных продуктов.

Сущность изобретения

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления раскрыты способы получения выделенного культивируемого молочного продукта из клеток молочной железы, предусматривающие: (a) культивирование клеточной конструкции в биореакторе при условиях, в которых получают культивируемый молочный продукт, указанная клеточная конструкция содержит: (i) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности; (ii) матриал матрикса, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса; (iii) среды для культивирования, расположенные во внутренней полости и находящиеся в жидкостном контакте с внутренней поверхностью; (iv) множество плазматических клеток, расположенных на материале матрикса; и (v) конфлюэнтный монослой поляризованных клеток молочной железы, расположенный на множестве плазматических клеток, где клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы, где поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность; и (b) выделение культивируемого молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления монослой поляризованных клеток молочной железы имеет конфлюэнтность по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100% клеток молочной железы поляризованы в одной и той же ориентации. В некоторых вариантах осуществления культивируемый молочный продукт содержит секреторный IgA (sIgA). В некоторых вариантах осуществления биореактор содержит апикальное отделение, которое, по существу, изолировано от внутренней полости клеточной конструкции. В некоторых вариантах осуществления базальная поверхность клеток молочной железы находится в жидкостном контакте со средами для культивирования. В некоторых вариантах осуществления апикальное отделение находится в жидкостном контакте с апикальной поверхностью клеток молочной железы. В некоторых вариантах осуществления культивируемый молочный продукт секреторируется с апикальной поверхности клеток молочной железы в апикальное отделение. В некоторых вариантах осуществления среды для культивирования по существу не контактируют с культивируемым молочным продуктом. В некоторых вариантах осуществления общая плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет, по меньшей мере, 10^{11} ; и альтернативно, где общая площадь поверхности клеток молочной железы в биореакторе составляет по меньшей мере $1,5 \text{ м}^2$. В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плот-

ность плазматических клеток в биореакторе составляет приблизительно от 200 до 500 плазматических клеток на мм². В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят при температуре приблизительно от 27°C до приблизительно 39°C. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят при концентрации CO₂ в атмосфере приблизительно от 4% до приблизительно 6%.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления раскрыты клеточные конструкции, содержащие: (a) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость/базальную камеру, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности; (b) материал матрикса, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса; (c) среды для культивирования, расположенные во внутренней полости/базальной камере и находящиеся в жидкостном контакте с внутренней поверхностью; (d) множество плазматических клеток, расположенных на материале матрикса; и (e) по меньшей мере, на 70% конфлюэнтный монослой поляризованных клеток молочной железы, расположенный на множестве плазматических клеток, где клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы. В некоторых вариантах осуществления поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность. В некоторых вариантах осуществления базальная поверхность клеток молочной железы находится в жидкостном контакте со средами для культивирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100% клеток молочной железы поляризованы в одной и той же ориентации. В некоторых вариантах осуществления монослой поляризованных клеток молочной железы имеет конфлюэнтность по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат конститутивно активный белок рецептора пролактина. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пролактин.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления раскрыты культивированные молочные продукты, содержащие бета-казеин, альфа-лактальбумин, каппа-казеин, альфа-S1-казеин, лактоферрин, лактадгерин, лизоцим, C12:0 (лауриновую кислоту), C14:0 (миристиновую кислоту), C16:0 (пальмитиновую кислоту), лактозу, глюкозу, 3'-SL и 6'-SL; где композиция не содержит или по существу не содержит стойких органических загрязнителей (СОЗ), тяжелых металлов, рецептурных лекарственных средств, рекреационных лекарственных средств, аллергенов, клеток, гормонов или вирусов при условии, что композиция может содержать человеческую эпителиальную клетку молочной железы (чЭКМЖ) или плазматическую клетку (ПК). В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, содержит C18:2n-6 (линолевую кислоту, LA), C18:3n-3 (альфа-линоленовую кислоту, ALA), бутрофинин, остеопонтин, муцин-4, муцин-1, C8:0 (каприловую кислоту), C10:0 (каприновую кислоту), C13:0 (тридекановую кислоту, C16:1 (пальмитолеиновую кислоту), C20:3n-6 (дигомо-гама-линоленовую кислоту, DGLA), C20:4n-6 (арахидоновую кислоту, АК), C20:5n-3 (эйкозопентановую кислоту, EPA), C22:6n-3 (докозагексаеновую кислоту, ДНА), C22:1n9 (эруковую кислоту), C24:1 (нервоновую кислоту), LNT или LNT. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, дополнительно содержит, по меньшей мере, один оксипириновый метаболит полиненасыщенной жирной кислоты или, по меньшей мере, один эндоканнабиноид. В некоторых вариантах осуществления оксипириновый метаболит представляет собой 9-гидроксиоктадекадиеновую кислоту (9-HODE), 13-гидроксиоктадекадиеновую кислоту (13-HODE), 5,15-дигидроксиэйкозатетраеновую кислоту (5,15-DiHETE), 17,18-дигидроксиэйкозатетраеновую кислоту (17,18-DiHETE), 8,9-дигидроксиэйкозатриеновую кислоту (8,9-DiHETe), 11,12-дигидроксиэйкозатриеновую кислоту (11,12-DiHETe), 9,10-дигидроксиоктадеценую кислоту (9,10-DiHOME), 12,13-дигидроксиоктадеценую кислоту (12,13-DiHOME), 14(15)-эпоксиейкозатриеновую кислоту (14(15)-EpETe), 19(20)-эпоксидокозапентаеновую кислоту (19(20)-EpDPE), 17-гидроксидокозагексаеновую кислоту (17-HDoHE), 5-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (5-HETE), 8-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (8-HETE), 9-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (9-HETE), 11-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (11-HETE), 12-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (12-HETE), 9-гидроксиоктадекатриеновую кислоту (9-HOTe), 9-оксо-октадекадиеновую кислоту (9-оксо-ODE) или 13-оксооктадекадиеновую кислоту (13-оксо-ODE), 17,18-эпоксиейкозатетраеновую кислоту (17(18)-EpETE), 6-кето-простагландин F1-альфа (6-кето-PGF1a) или 15(S)-гидроксиэйкозатриеновую кислоту (15(S)-HETe). В некоторых вариантах осуществления эндоканнабиноид представляет собой анандамид или 2-арахидоноилглицерин (2-AG). В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, дополнительно содержит секреторный IgA (sIgA). В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит стойких органических загрязнителей (СОЗ). В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит полихлоринированных дибензо-р-диоксинов (PCDD), полихлоринированных дибензофуранов (PCDF), полихлоринированных бифенилов (PCB) и пестицидов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит ДДТ. В некоторых вариантах осуществления культиви-

рованный молочный продукт не содержит или по существу не содержит тяжелых металлов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит ртути, свинца, мышьяка, кадмия, никеля, хрома, кобальта или цинка. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит фармацевтических или рекреационных лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит химиотерапевтических средств, антидепрессантов или противотревожных препаратов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит бензодиазепинов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит лития, карбамазепина, хлорпромазина и клозапина. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит спирта, марихуаны, опиоидов, фенциклидина или кокаина. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит аллергенов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит овомукоида, овальбумина, кональбумина, арахина 6, арахина 3, конарахина, Arah1 и арахина Arah2. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит стволовых клеток человека, иммунных клеток человека или бактериальных клеток при условии, что культивированный молочный продукт содержит одну или несколько эпителиальных клеток молочной железы человека (чЭКМЖ) или плазматических клеток (ПК). В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит миоэпителиальных клеток, миелоидных клеток-предшественников, нейтрофилов, гранулоцитов или Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит Staphylococcus, Acinetobacter, Streptococcus, Pseudomonas, Lactococcus, Enterococcus или Lactobacillus. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит вируса. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит вирус гепатита В, вирус гепатита С, цитомегаловирус, вирус Западного Нила, лимфотропный вирус Т-клеток человека и вирус иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит гормонов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит лептина, грелина, адипонектина, тироксина (Т4), трийодтиронина (Т3), тиреотропного гормона (ТТГ), эпидермального фактора роста, бета-эндорфина, релаксина, кортизола или эритропоэтина.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления раскрыты культивированные молочные продукты, содержащие бета-казеин, альфа-лактальбумин, каппа-казеин, альфа-S1-казеин, лактоферрин, бутрофилин, остеоопонтин, лактадерин, лизоцим, муцин-4, муцин-1, C8:0 (каприловую кислоту), C10:0 (каприновую кислоту), C12:0 (лауриновую кислоту), C13:0 (тридекановую кислоту), C14:0 (миристиновую кислоту), C16:0 (пальмитиновую кислоту), C16:1 (пальмитолеиновую кислоту), C18:2n-6 (линолевую кислоту, LA), C18:3n-3 (альфа-линоленовую кислоту, ALA), C20:3n-6 (дигомо-гамалиноленовую кислоту, DGLA), C20:4n-6 (арахидоновую кислоту, АК), C20:5n-3 (эйкозопентановую кислоту, EPA), C22:6n-3 (докозагексаеновую кислоту, ДГК), C22:1n9 (эруковую кислоту), C24:1 (нервоновую кислоту), лактозу, глюкозу, 3'-SL, 6'-SL, LNT, LNnT, 9-гидроксиоктадекадиеновую кислоту (9-HODE), 13-гидроксиоктадекадиеновую кислоту (13-HODE), 5,15-дигидроксиэйкозатетраеновую кислоту (5,15-DiHETE), 17,18-дигидроксиэйкозатетраеновую кислоту (17,18-DiHETE), 8,9-дигидроксиикозатриеновую кислоту (8,9-DiHETrE), 11,12-дигидроксиикозатриеновую кислоту (11,12-DiHETrE), 9,10-дигидроксиоктадеценую кислоту (9,10-DiHOME), 12,13-дигидроксиоктадеценую кислоту (12,13-DiHOME), 14(15)-эпоксиейкозатриеновую кислоту (14(15)-EpETre), 19(20)-эпикодокозапентановую кислоту (19(20)-EpDPE), 17-гидроксидокозагексаеновую кислоту (17-HDoHE), 5-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (5-HETE), 8-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (8-HETE), 9-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (9-HETE), 11-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (11-HETE), 12-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (12-HETE), 9-гидроксиоктадекатриеновую кислоту (9-HOTrE), 9-оксооктадекадиеновую кислоту (9-оксо-ODE), или 13-оксооктадекадиеновую кислоту (13-оксо-ODE), 17,18-эпоксиейкозатетраеновую кислоту (17(18)-EpETE), 6-кето-простагландин F1-альфа (6-кето-PGF1a) или 15(S)-гидроксиэйкозатриеновую кислоту (15(S)-HETrE), и sIgA, где композиция не содержит или по существу не содержит стойких органических загрязнителей (СОЗ), тяжелых металлов, рецептурных лекарственных средств, рекреационных лекарственных средств, аллергенов, клеток, гормонов или вируса, при условии, что композиция может содержать человеческие эпителиальные клетки молочной железы или плазматические клетки. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, дополнительно содержит консервант, стабилизатор, антиоксидант, эмульгатор или загуститель. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, дополнительно содержит лецитин. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, дополнительно содержит каррагенан. В некоторых вариантах осуществления культивированный молоч-

ный продукт, описываемый в настоящем документе, дополнительно содержит бета-каротин. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, дополнительно содержит витамин Е. В некоторых вариантах осуществления а культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, дополнительно содержит аскорбилпальмитат или аскорбиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, дополнительно содержит лецитин, аскорбилпальмитат и витамин Е. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, является дегидратированным, лиофилизированным или замороженным. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, является пищевым.

В настоящем документе в конкретных вариантах осуществления раскрыты способы кормления нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающие введение индивидууму культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления человек является младенцем. В некоторых вариантах осуществления у человека есть иммунодефицит. В некоторых вариантах осуществления у человека есть заболевание, выбранное из тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), ВИЧ/СПИД, рака или аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления человек болен волчанкой или сахарным диабетом (например, сахарным диабетом I типа или сахарным диабетом II типа). В некоторых вариантах осуществления человек является реципиентом трансплантата органа или костного мозга. В некоторых вариантах осуществления человек страдает от недоедания. В некоторых вариантах осуществления у человека есть синдром мальабсорбции. В некоторых вариантах у человека есть синдром истощения. В некоторых вариантах осуществления человек находится в пожилом или старческом возрасте.

В настоящем документе в конкретных вариантах осуществления раскрыты способы лечения или профилактики микробной инфекции у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающие введение индивидууму культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления бактериальная инфекция представляет собой инфекцию *E.coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *C.difficile* или *Vibrio cholerae*. В некоторых вариантах осуществления паразитарная инфекция представляет собой инфекцию *Giardia lamblia*, *Entameba histolytica*, *Cryptosporidium spp.* или *Cystoisospora belli*. В некоторых вариантах осуществления грибковая инфекция представляет собой инфекцию *Aspergillus*, *Струптосoccus* или *Pneumocystis jirovecii*. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой желудочно-кишечную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления желудочно-кишечная инфекция представляет собой гастроэнтерит. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой кандидоз.

В настоящем документе в конкретных вариантах осуществления раскрыты способы получения sIgA из клеток молочной железы, способ, предусматривающий: (a) культивирование клеточной конструкции в биореакторе в условиях, при которых производится культивированный молочный продукт, указанная клеточная конструкция, содержащая: (i) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности; (ii) материал матрикса, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса; (iii) среды для культивирования, расположенные во внутренней полости и находящиеся в жидкостном контакте с внутренней поверхностью; (iv) множество плазматических клеток, расположенных на материале матрикса; и (v) конфлюэнтный монослой поляризованных клеток молочной железы, расположенный на множестве плазматических клеток, где клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы, где поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность; и (b) выделение sIgA из культивированного молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления монослой поляризованных клеток молочной железы имеет конфлюэнтность по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100% клеток молочной железы поляризованы в одной и той же ориентации. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт содержит секреторный IgA (sIgA). В некоторых вариантах осуществления биореактор содержит апикальное отделение, которое, по существу, изолировано от внутренней полости клеточной конструкции. В некоторых вариантах осуществления базальная поверхность клеток молочной железы находится в жидкостном контакте со средами для культивирования. В некоторых вариантах осуществления апикальное отделение находится в жидкостном контакте с апикальной поверхностью клеток молочной железы. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт секреторируется с апикальной поверхности клеток молочной железы в апикальное от-

деление. В некоторых вариантах осуществления среды для культивирования по существу не контактируют с культивированным молочным продуктом. В некоторых вариантах осуществления общая плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет по меньшей мере 10^{11} ; и альтернативно, где общая площадь поверхности клеток молочной железы в биореакторе составляет по меньшей мере $1,5 \text{ м}^2$. В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность плазматических клеток в биореакторе составляет приблизительно от 200 до 500 плазматических клеток на мм^2 . В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят при температуре приблизительно от 27 до приблизительно 39°C . В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят при концентрации CO_2 в атмосфере приблизительно от 4 до приблизительно 6%.

В настоящем документе в конкретных вариантах осуществления раскрыты фармацевтические композиции, содержащие (a) sIgA и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент; где sIgA производят способом, описываемым в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой стабилизатор, поверхностно-активное вещество, буфер или средство придания тоничности. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит, гистидин, аргинин, глицин, полисорбат 20, полисорбат 80, полоксамер 188, этилендиаминтетрауксусную кислоту или ее соли (например, ЭДТА), глутатион, метакрезол, фенол, бензиловый спирт, хлорид бензалкония, метионин или цистеин.

В настоящем документе в конкретных вариантах осуществления раскрыты способы лечения или профилактики микробной инфекции у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающие введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей (a) sIgA и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент; где sIgA производят способом, описываемым в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой стабилизатор, поверхностно-активное вещество, буфер или средство придания тоничности. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит, гистидин, аргинин, глицин, полисорбат 20, полисорбат 80, полоксамер 188, этилендиаминтетрауксусную кислоту или ее соли (например, ЭДТА), глутатион, метакрезол, фенол, бензиловый спирт, хлорид бензалкония, метионин или цистеин. В некоторых вариантах осуществления человек является младенцем. В некоторых вариантах осуществления у человека есть иммунодефицит. В некоторых вариантах осуществления у человека есть заболевание, выбранное из тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), ВИЧ/СПИД, рака или аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума есть волчанка или сахарный диабет (например, сахарный диабет I типа или сахарный диабет II типа). В некоторых вариантах осуществления человек является реципиентом трансплантата органа или костного мозга. В некоторых вариантах осуществления человек страдает от недоедания. В некоторых вариантах осуществления у человека есть синдром мальабсорбции. В некоторых вариантах осуществления у человека есть синдром истощения. В некоторых вариантах осуществления человек находится в пожилом или старческом возрасте. В некоторых вариантах осуществления у человека есть кистозный фиброз, ХОБЛ или бронхоэктазы без муковисцидоза. В некоторых вариантах осуществления инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления бактериальная инфекция представляет собой инфекцию *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *C. difficile* или *Vibrio cholerae*. В некоторых вариантах осуществления паразитарная инфекция представляет собой инфекцию *Giardia lamblia*, *Entameba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. или *Cystoisospora belli*. В некоторых вариантах осуществления грибковая инфекция представляет собой инфекцию *Aspergillus*, *Cryptococcus* или *Pneumocystis jirovecii*. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой желудочно-кишечную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления желудочно-кишечная инфекция представляет собой гастроэнтерит. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой кандидоз. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой респираторную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления респираторная инфекция представляет собой пневмонию, бронхит, аспергиллез или криптококкоз. В некоторых вариантах осуществления респираторная инфекция представляет собой инфекцию, вызванную *B. ceratonia*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* или *Pneumocystis*. В некоторых вариантах осуществления композицию формулируют для ингаляций. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой порошок. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой состав для введения с помощью небулайзера.

Настоящее раскрытие относится к молочным композициям, которые содержат белковые, липидные и олигосахаридные компоненты и концентрации компонентов, которые имитируют и/или по существу сходны с грудным молоком человека, вырабатываемым кормящей женщиной, причем молочные композиции производятся *in vitro* и/или *ex vivo* культивируемыми клетками молочной железы.

Таким образом, один из аспектов раскрытия относится к молочным продуктам, содержащим определенные концентрации или количества по массе белковых компонентов, липидных компонентов, олигосахаридных компонентов молока человека и лактозы, где по меньшей мере один из белковых компонен-

тов, липидных компонентов, НМО и лактозы продуцируются культивируемыми эпителиальными клетками молочной железы человека.

В одном из вариантов осуществления в настоящем документе раскрыты способы получения выделенного культивируемого молочного продукта из клеток молочной железы, способ, предусматривающий: (а) культивирование клеточной конструкции в биореакторе, в условиях, позволяющих получить культивируемый молочный продукт, указанная клеточная конструкция, содержащая: (i) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности; (ii) материал матрикса, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса; (iv) множество плазматических клеток, расположенных на материале матрикса; и (v) конфлюэнтный монослой поляризованных клеток молочной железы, расположенный на множестве плазматических клеток, где клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы, где поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность; и (b) выделение культивируемого молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления культивируемый молочный продукт содержит секреторный IgA (sIgA).

В некоторых вариантах осуществления биореактор содержит апикальное отделение, которое по существу изолировано от внутренней полости клеточной конструкции. В некоторых вариантах осуществления базальная поверхность клетки молочной железы находится в жидкостном контакте со средами для культивирования. В некоторых вариантах осуществления апикальное отделение находится в жидкостном контакте с апикальной поверхностью клеток молочной железы. В некоторых вариантах осуществления культивируемый молочный продукт секретируется с апикальной поверхности клеток молочной железы в апикальное отделение. В некоторых вариантах осуществления среды для культивирования по существу не контактируют с культивируемым молочным продуктом. В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет по меньшей мере 10^{11} . В некоторых вариантах осуществления общая площадь поверхности клеток молочной железы в биореакторе составляет по меньшей мере $1,5 \text{ м}^2$. В некоторых вариантах осуществления материал матрикса содержит один или несколько белков внеклеточного матрикса. В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность плазматических клеток в биореакторе составляет приблизительно от 200 до 500 плазматических клеток на мм^2 . В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят при температуре приблизительно от 27 до приблизительно 39°C. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят при концентрации CO_2 в атмосфере приблизительно от 4 до приблизительно 6%.

В настоящем документе в конкретных вариантах осуществления описаны клеточные конструкции, содержащие: (а) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость/базальную камеру, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности; (b) материал матрикса, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса; (c) среды для культивирования, расположенные во внутренней полости/базальной камере и находящиеся в жидкостном контакте с внутренней поверхностью; и (d) множество плазматических клеток, расположенных на материале матрикса; и (e) по меньшей мере, на 70% конфлюэнтный монослой поляризованных клеток молочной железы, расположенный на множестве плазматических клеток, где клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы. В некоторых вариантах осуществления поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность. В некоторых вариантах осуществления базальная поверхность клеток молочной железы находится в жидкостном контакте со средами для культивирования.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100% клеток молочной железы поляризованы в одной и той же ориентации. В некоторых вариантах осуществления монослой поляризованных клеток молочной железы имеет конфлюэнтность по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат конститутивно активный белок рецептора пролактина. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит источник углерода, химическую буферную систему, одну или несколько незаменимых аминокислот, один или несколько витаминов и/или кофакторов и одну или несколько неорганических солей. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования дополнительно содержит пролактин. В некоторых вариантах осуществления материал матрикса содержит один или несколько белков внеклеточного матрикса. В некоторых вариантах осуществления трехмерный каркас содержит природный полимер, биосовместимый синтетический полимер, синтетический пептид, композитный материал, полученный из любого из предыдущих, или любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления природный полимер представляет собой коллаген, хитозан, целлюлозу, агарозу, альгинат, желатин, эластин, гепарансульфат, хондроитинсульфат, кератансульфат и/или гиалуроновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления биосовместимый синтетиче-

ский полимер представляет собой полисульфон, поливинилиденфторид, сополимер винилацетата и полиэтилена, поливиниловый спирт, натрия полиакрилат, акрилатный полимер и/или полиэтиленгликоль.

В определенных аспектах в настоящем документе описан молочный продукт, содержащий приблизительно 6-14 г на литр (г/л) белковых компонентов, приблизительно 18-89 г/л липидных компонентов, приблизительно 7-14 г/л олигосахаридов молока человека (НМО), приблизительно 64-77 г/л лактозы, где, по меньшей мере, один из белковых компонентов, липидных компонентов, НМО и лактозы вырабатывается культивируемыми эпителиальными клетками молочной железы человека.

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт дополнительно содержит один или несколько иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулин представляет собой секреторный IgA.

В некоторых вариантах осуществления белковый компонент содержит приблизительно 55-65% сухой массы молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления белковый компонент содержит бета-казеин, каппа-казеин и альфа-казеин. В некоторых вариантах осуществления бета-казеин имеет концентрацию приблизительно 0,5-1,5 г/л, каппа-казеин имеет концентрацию приблизительно 0,5-0,6 г/л, альфа-казеин имеет концентрацию приблизительно 0,5 г/л, 1-0,5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления бета-казеин, каппа-казеин и альфа-казеин вместе составляют приблизительно 35-45% сухой массы белкового компонента молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления бета-казеин составляет более чем приблизительно 50% от общего содержания казеина.

В некоторых вариантах осуществления белковый компонент дополнительно содержит один или несколько из альфа-лактальбумина, лизоцима, лактоферрина, гаптокоррина, бутирофилина, остеопонтина, муцина MC5, муцина BgE3 и лактадгерина. В некоторых вариантах осуществления белковый компонент дополнительно содержит сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления альфа-лактальбумин имеет концентрацию приблизительно 2,7-3,3 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления лизоцим имеет концентрацию приблизительно 0,2-0,5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления лактоферрин имеет концентрацию приблизительно 1,0-2,0 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления гаптокоррин имеет концентрацию приблизительно 0,07-0,7 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления бутирофилин имеет концентрацию приблизительно 0,03-0,05 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления остеопонтин имеет концентрацию приблизительно 0,05-0,2 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления муцин MC5 имеет концентрацию приблизительно 0,5-0,6 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления муцин BgE3 имеет концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления лактадгерин имеет концентрацию приблизительно 0,06-0,07 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления сывороточный альбумин имеет концентрацию приблизительно 0,025-3,5 г/л, или приблизительно 0,01-2 г/л, или приблизительно 0,15-1 г/л, или приблизительно 0,2-0,7 г/л. В некоторых вариантах осуществления белковые компоненты имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления липидный компонент содержит один или несколько из насыщенных жирных кислот, мононенасыщенных жирных кислот, полиненасыщенных жирных кислот, холестерина, фосфолипидов, плазмалогенов и сфинголипидов. В некоторых вариантах осуществления насыщенные жирные кислоты имеют концентрацию приблизительно 5-34 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления насыщенные жирные кислоты содержат пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту и лауриновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления пальмитиновая кислота содержит по меньшей мере приблизительно 50% формы sn-2. В некоторых вариантах осуществления пальмитиновая кислота имеет концентрацию приблизительно 3-18 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления стеариновая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,7-5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления лауриновая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,5-5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления мононенасыщенные жирные кислоты имеют концентрацию приблизительно 7-46 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления мононенасыщенная жирная кислота содержит олеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления олеиновая кислота содержит по меньшей мере приблизительно 50% формы sn-1. В некоторых вариантах осуществления олеиновая кислота имеет концентрацию приблизительно 7-45 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления полиненасыщенные жиры имеют концентрацию приблизительно 2-20 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления полиненасыщенные жиры содержат одну или несколько из линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эйкозодиеновой кислоты, арахидоновой кислоты, дигомо-гамма-линоленовой кислоты и докозагексадиеновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления линолевая кислота имеет концентрацию приблизительно 2-19 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления линолевая кислота содержит по меньшей мере приблизительно 50% формы sn-3. В некоторых вариантах осуществления альфа-линоленовая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления эйкозодиеновая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления арахидоновая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления ди-

гомо-гамма-линоленовая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,3-0,5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления докозагексадиеновая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,02-0,4 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления линолевая кислота имеет концентрацию приблизительно 2-19 г/л, альфа-линоленовая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л, эйкозадиеновая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л, арахидоновая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л, дигомо-гамма-линоленовая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,3-0,5 г/л и докозагексадиеновая кислота имеет концентрацию приблизительно 0,02-0,4 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту и линолеовую кислоту, где олеиновая кислота содержит по меньшей мере приблизительно 50% формы sn-1, пальмитиновая кислота содержит по меньшей мере приблизительно 50% формы sn-2 и линолевая кислота содержит по меньшей мере приблизительно 50% формы sn-3. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит холестерин, имеющий концентрацию приблизительно 0,09-0,15 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления фосфолипиды, плазмалогены и сфинголипиды вместе имеют концентрацию приблизительно 0,1-0,4 г/л в молочном продукте.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный компонент молока человека содержит один или несколько нейтральных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный компонент молока человека содержит один или несколько кислых олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный компонент молока человека содержит нейтральные олигосахариды и/или кислые олигосахариды. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозу), 2'-FL (2'-фукозиллактозу), DF-LNНН (дифукозиллакто-N-гексаозу), LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), LNDFHI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), LNT (лакто-N-тетраозу), LNnT (лакто-N-неотетраозу), DF-L (дифукозиллактозу) и 3-FL (3-фукозиллактозу).

74. Молочный продукт по п.65 или 66, в котором один или несколько кислых олигосахаридов содержат 6'-SL (6'-сиалиллактозу), DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), LSTc (сиалил-лакто-N-тетраозу c) и 3'-SL (3'-сиалиллактозу). В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 1-4 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат 2'-FL (2'-фукозиллактозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 1-4 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат DF-LNНН (дифукозиллакто-N-гексаозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 1-4 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат LNFP I (лакто-N-фукопентаозу I), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,5-2 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат LNDFHI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,2-2 г/л в молочном продукте.

80. Молочный продукт по любому из пп.64, 66, 67 или 70-74, в котором один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат LNT (лакто-N-тетраозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,3-1,5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат LNnT (лакто-N-неотетраозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,5-1,5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат DF-L (дифукозиллактозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,1-1 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат 3-FL (3-фукозиллактозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,2-1,5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат 6'-SL (6'-сиалиллактозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,2-1,2 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,05-1 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,05-0,7 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат LST c (сиалил-лакто-N-тетраозу c), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,05-0,7 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат 3'-SL (3'-сиалиллактозу), причем олигосахарид имеет концентрацию приблизительно 0,1-0,3 г/л в молочном продукте.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозу), 2'-FL (2'-фукозиллактозу), DF-LNНН (дифукозиллакто-N-гексаозу), LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), LNDFHI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), LNT (лакто-N-тетраозу), LNnT (лакто-N-неотетраозу), DF-L (дифукозиллактозу) и 3-FL (3-фукозиллактозу) и где один

или несколько кислых олигосахаридов содержат 6'-SL (6'-сиалиллактозу), DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), LST с (сиалил-лакто-N-тетраозу с) и 3'-SL (3'-сиалиллактозу). В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 1-4 г/л TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозу), приблизительно 1-4 г/л 2'-FL (2'-фукозиллактозу), приблизительно 1-4 г/л DF-LNnIII (дифукозиллакто-N-гексаозу), приблизительно 0,5-2 г/л LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), приблизительно 0,2-2 г/л LNDFHI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), приблизительно 0,3-1,5 г/л LNT (лакто-N-тетраозу), приблизительно 0,5-1,5 г/л LNnT (лакто-N-неотетраозу), приблизительно 0,1-1 г/л DF-L (дифукозиллактозу), приблизительно 0,2-1,5 г/л 3-FL (3-фукозиллактозу), приблизительно 0,2-1,2 г/л 6'-SL (6'-сиалиллактозу), приблизительно 0,05-1 г/л DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), приблизительно 0,05-0,7 г/л FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), приблизительно 0,05-0,7 г/л LST с (сиалил-лакто-N-тетраозу с), приблизительно 0,1-0,3 г/л 3'-SL (3'-сиалиллактозу). В некоторых вариантах осуществления содержание нейтральных олигосахаридов, по меньшей мере, приблизительно в 2 раза, или приблизительно в 3 раза, или приблизительно в 4 раза, или приблизительно в 5 раз, или приблизительно в 6 раз, или приблизительно в 7 раз, или приблизительно в 8 раз, или приблизительно в 9 раз, или приблизительно в 10 раз, или приблизительно в 11 раз, или приблизительно в 12 раз, или приблизительно в 13 раз, или приблизительно в 14 раз, или приблизительно в 15 раз больше по массе, чем содержание кислых олигосахаридов.

В определенных аспектах в настоящем документе описаны молочные продукты, содержащие приблизительно 6-14 граммов на литр (г/л) белковых компонентов, приблизительно 18-89 г/л липидных компонентов, приблизительно 7-14 г/л олигосахаридов молока человека (НМО), приблизительно 64-77 г/л лактозы, где белковые компоненты содержат бета-казеин, каппа-казеин, альфа-казеин, альфа-лактальбумин, лизоцим, лактоферрин, гаптокоррин, бутирофиллин, остеопонтин, муцин MC5, муцин BrE3 и лактадгерин, где липидные компоненты содержат пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту и лауриновую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, альфа-линоленовую кислоту, эйкозодиеновую кислоту, арахидоновую кислоту, дигомо-гамма-линоленовую кислоту, докозагексадиеновую кислоту, холестерин, фосфолипиды, плазмалогены и сфинголипиды, где олигосахариды молока человека содержат TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозу), 2'-FL (2'-фукозиллактозу), DF-LNnIII (дифукозиллакто-N-гексаозу), LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), LNDFHI (лакто-N-фукопентаозу I), -N-дифукозилгексаозу I), LNT (лакто-N-тетраозу), LNnT (лакто-N-неотетраозу), DF-L (дифукозиллактозу), и 3-FL (3-фукозиллактозу), 6'-SL (6'-сиалиллактозу), DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), LSTс (сиалил-лакто-N-тетраозу с) и 3'-SL (3'-сиалиллактозу), и где по меньшей мере один из белковых компонентов, липидных компонентов, FIMO и лактозы вырабатывается культивированными эпителиальными клетками молочной железы человека.

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,5-1,5 г/л бета-казеина, приблизительно 0,5-0,6 г/л каппа-казеина, приблизительно 0,1-0,5 г/л альфа-казеина, приблизительно 2,7-3,3 г/л альфа-лактальбумина, приблизительно 0,2-0,5 г/л лизоцим, приблизительно 1,0-2,0 г/л лактоферрин, приблизительно 0,07-0,7 г/л гаптокоррина, приблизительно 0,03-0,05 г/л бутирофилина, приблизительно 0,05-0,2 г/л остеопонтин, приблизительно 0,5-0,6 г/л муцина MC5, приблизительно 0,5-0,7 г/л муцина BrE3, приблизительно 0,06-0,07 г/л лактадгерина, приблизительно 2-19 г/л линолевой кислоты, приблизительно 0,5-0,7 г/л альфа-линоленовой кислоты, приблизительно 0,5-0,7 г/л эйкозодиеновой кислоты, приблизительно 0,5-0,7 г/л арахидоновой кислоты, приблизительно 0,3-0,5 г/л дигомо-гамма-линоленовой кислоты, приблизительно 0,02-0,4 г/л докозагексадиеновой кислоты, приблизительно 0,09-0,15 г/л холестерина, приблизительно 0,1-0,4 г/л вместе взятых фосфолипидов, плазмалогенов и сфинголипидов, приблизительно 1-4 г/л TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозу), приблизительно 1-4 г/л 2'-FL (2'-фукозиллактозу), приблизительно 1-4 г/л DF-LNnIII (дифукозиллакто-N-гексаозу), приблизительно 0,5-2 г/л LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), приблизительно 0,2-2 г/л LNDFHI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), приблизительно 0,3-1,5 г/л LNT (лакто-N-тетраозу), приблизительно 0,5-1,5 г/л LNnT (лакто-N-неотетраозу), приблизительно 0,1-1 г/л DF-L (дифукозиллактозу), приблизительно 0,2-1,5 г/л 3-FL (3-фукозиллактозу), приблизительно 0,2-1,2 г/л 6'-SL (6'-сиалиллактозу), приблизительно 0,05-1 г/л DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), приблизительно 0,05-0,7 г/л FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), приблизительно 0,05-0,7 г/л LSTс (сиалил-лакто-N-тетраозу с) и приблизительно 0,1-0,3 г/л 3'-SL (3'-сиалиллактозу).

В определенных аспектах в настоящем документе описаны молочные продукты, содержащие приблизительно 3-15 процентов белка по массе, приблизительно 9-92 процента липидов по массе, приблизительно 4-15 процентов олигосахаридов молока человека (НМО) по массе, приблизительно 33-80 процентов лактозы по массе, где, по меньшей мере, один из белка, липида, НМО и лактозы вырабатываются культивированными эпителиальными клетками молочной железы человека. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт дополнительно содержит сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,025-3,5 г/л, или приблизительно 0,01-2 г/л, или приблизительно 0,15-1 г/л, или приблизительно 0,3-0,7 г/л сывороточного альбумина.

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт дополнительно содержит один или несколько иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулины содержат один

или несколько из IgA, IgG и IgM. В некоторых вариантах осуществления IgA содержит один или несколько из IgA2 (секреторного) и IgA1 (несекреторного). В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,2-1,0 г/л секреторного IgA. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,15-1,6 г/л общего IgA. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,03-0,3 г/л IgG. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,01-0,1 г/л IgM. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,2-2 процента иммуноглобулинов по массе.

В некоторых вариантах осуществления белковые компоненты, липидные компоненты, НМО и лактозу выделяют из культивированных эпителиальных клеток молочной железы. В некоторых вариантах осуществления культивированные эпителиальные клетки молочной железы содержат одну или несколько иммортализованных линий клеток молочной железы. В некоторых вариантах осуществления культивированные эпителиальные клетки молочной железы получают из одного или нескольких образцов первичной ткани молочной железы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько образцов первичной ткани молочной железы содержат альвеолярную и/или полостную ткань или клетки, собранные из альвеолярной структуры молочной железы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько образцов первичной ткани молочной железы получают путем аспирации ткани молочной железы иглой. В некоторых вариантах осуществления первичная ткань молочной железы дополнительно содержит одну или несколько миоэпителиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления первичная ткань молочной железы дополнительно содержит одну или несколько стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления первичная ткань молочной железы дополнительно содержит одну или несколько иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки содержат В-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки содержат плазматические клетки.

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт выделяют из культивированных эпителиальных клеток молочной железы от одного или нескольких конкретных людей. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт, выделенный из культивированных эпителиальных клеток молочной железы от конкретного донора, предоставляется только этому донору или лицам, уполномоченным этим донором. В некоторых вариантах осуществления культивированные эпителиальные клетки молочной железы культивируют совместно с одной или несколькими линиями плазматических клеток. В некоторых вариантах осуществления культивированные эпителиальные клетки молочной железы культивируют совместно с одной или несколькими линиями миоэпителиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления культивированные эпителиальные клетки молочной железы культивируют совместно с одной или несколькими линиями стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%, или по меньшей мере приблизительно 97%, или по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 99% от общего молекулярного состава грудного молока человека. В некоторых вариантах осуществления содержание небелкового азота составляет по меньшей мере приблизительно 10%, или по меньшей мере приблизительно 15%, или по меньшей мере приблизительно 20%, или по меньшей мере приблизительно 25%, или по меньшей мере приблизительно 30% от общего содержания азота.

В определенных аспектах в настоящем документе описаны замороженные молочные продукты, содержащие молочный продукт, описываемый в настоящем документе, который был заморожен. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт был лиофилизирован. В определенных аспектах в настоящем документе описан упакованный в контейнер молочный продукт, содержащий молочный продукт, описываемый в настоящем документе, который упаковывают в контейнер. В определенных аспектах в настоящем документе описан упакованный в контейнер замороженный молочный продукт, содержащий замороженный молочный продукт, который упаковывают в контейнер. В определенных аспектах в настоящем документе описан упакованный в контейнер лиофилизированный молочный продукт, содержащий лиофилизированный молочный продукт, который упаковывают в контейнер.

В определенных аспектах в настоящем документе описаны экстрагированные молочные продукты, состоящие из одного или нескольких компонентов, экстрагированных из молочного продукта, раскрытого в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов, экстрагированных из собранного молочного продукта, лиофилизируют или концентрируют с получением лиофилизованного или концентрированного компонента экстрагированного молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов, экстрагированных из собранного молочного продукта, концентрируют мембранной фильтрацией или обратным осмосом. В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов, экстрагированных из собранного молочного продукта, содержат молочный белок, липид, углевод, витамины и минералы.

В определенных аспектах в настоящем документе описаны упакованные в контейнеры экстрагиро-

ванные молочные продукты, включающие экстрагированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, который упаковывают в контейнер. В некоторых вариантах осуществления контейнер является стерильным. В некоторых вариантах осуществления контейнер является герметичным. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой пищевой контейнер. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой канистру, банку, бутылку, мешок, коробку или пакет.

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 500-1150 ккал/л доступной энергии. В некоторых вариантах осуществления от 40 до 55% доступной энергии молочного продукта приходится на липиды. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно от 95,8 до 195,2 г/л макромолекулярных соединений.

В определенных аспектах в настоящем документе описаны способы лечения пациента, страдающего инфекционным заболеванием, предусматривающие введение пациенту эффективного количества молочного продукта, содержащего приблизительно 6-14 граммов на литр (г/л) белковых компонентов, приблизительно 18-89 г/л липидных компонентов, приблизительно 7-14 г/л олигосахаридов молока человека (НМО), приблизительно 64-77 г/л лактозы, где, по меньшей мере, один из белковых компонентов, липидных компонентов, НМО и лактозы. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт дополнительно содержит один или несколько иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулины содержат один или несколько из IgA, IgG и IgM. В некоторых вариантах осуществления IgA содержит один или несколько из IgA2 (секреторный) и IgA1 (несекреторный).

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,2-1,0 г/л секреторного IgA. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,15-1,6 г/л общего IgA. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,03-0,3 г/л IgG. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,01-0,1 г/л IgM. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,2-2 процента иммуноглобулинов по массе. В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой инфекцию желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет ослабленный иммунитет.

В определенных аспектах в настоящем документе описаны способы лечения младенца, страдающего желудочно-кишечной инфекцией, предусматривающие введение эффективного количества молочного продукта, содержащего приблизительно 6-14 граммов на литр (г/л) белковых компонентов, приблизительно 18-89 г/л липидных компонентов, приблизительно 7-14 г/л олигосахаридов молока человека (НМО), приблизительно 64-77 г/л лактозы, где по меньшей мере один из белковых компонентов, липидных компонентов, НМО и лактозы. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт дополнительно содержит один или несколько иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулины содержат один или несколько из IgA, IgG и IgM. В некоторых вариантах осуществления IgA содержит один или несколько из IgA2 (секреторный) и IgA1 (несекреторный). В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,2-1,0 г/л секреторного IgA. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,15-1,6 г/л общего IgA. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,03-0,3 г/л IgG. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,01-0,1 г/л IgM. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,2-2 процента иммуноглобулинов по массе.

Эти и другие аспекты раскрытия более подробно изложены в описании раскрытия ниже.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен пример сбора молока для использования в пищу из эпителиальных клеток молочной железы, выращенных в виде конфлюэнтного монослоя в культуральном аппарате с отделениями, в котором либо свежая, либо переработанная среда подается в базальное отделение, а молоко собирается из апикального отделения. TEER, трансэпителиальное электрическое сопротивление.

На фиг. 2 представлен пример поляризованного поглощения питательных веществ и секреции молока через конфлюэнтный монослой эпителиальных клеток молочной железы, прикрепленный к каркасу на базальной поверхности.

На фиг. 3 представлен пример каркаса с микроструктурой, который обеспечивает увеличенную площадь поверхности для раздельного всасывания питательных веществ и секреции молока конфлюэнтным монослоем эпителиальных клеток молочной железы.

На фиг. 4 представлены три примера половолоконного биореактора, изображенного в виде пучка капиллярных трубочек (вверху), которые могут поддерживать выстилку эпителиальными клетками молочной железы либо на внешней (вверху и внизу слева), либо на внутренней (внизу справа) поверхности капилляров, обеспечивая направленное и раздельное всасывание питательных веществ и секрецию молока.

На фиг. 5 приведен пример поперечного сечения трехмерной клеточной конструкции. Конструкция состоит из каркаса, имеющего внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость/базальную камеру, и внешней поверхностью. Внутренняя полость/базальная камера содержит сре-

ды для культивирования клеток. Матриксный материал расположен на внешней поверхности каркаса. Поры пересекают каркас от внутренней поверхности к внешней поверхности, позволяя клеточным средам контактировать с базальной поверхностью клеточного монослоя, расположенного на материале матрикса.

На фиг. 6 показан пример биореактора для получения культивированного молочного продукта. Биореактор состоит из клеточной конструкции и апикальной камеры. Клеточная конструкция состоит из каркаса, имеющего внутреннюю поверхность ограничивающую внутреннюю полость/базальную камеру, и внешнюю поверхность. Полость содержит среды для культивирования клеток. Матриксный материал расположен на внешней поверхности каркаса. Поры пересекают каркас от внутренней поверхности к внешней поверхности, позволяя клеточным средам контактировать с базальной поверхностью клеточного монослоя, расположенного на материале матрикса. Апикальная поверхность клеточного монослоя секретирует молоко/культивированный молочный продукт в апикальную камеру. Апикальная камера и внутренняя полость/базальная камера разделены клеточным монослоем.

На фиг. 7 показан пример клеточной конструкции. Конструкция состоит из каркаса, имеющего внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость/базальную камеру, и внешнюю поверхность. Внутренняя полость/базальная камера содержит клетку.

На фиг. 8 показан пример клеточной конструкции, содержащей эпителиальные клетки молочной железы (ЭКМЖ) и плазматические клетки. Плазматические клетки прилегают к каркасу. ЭКМЖ образуют конфлюэнтный монослой над плазматическими клетками (а в некоторых случаях и между ними), причем апикальная сторона ЭКМЖ обращена к апикальному отделению (или молочному отделению). Плазматические клетки секретируют IgA, который затем связывается с рецепторами на базолатеральной поверхности ЭКМЖ, запуская интернализацию комплекса антитело-рецептор и дальнейший процессинг антитела в sIgA по мере его продвижения к апикальной поверхности (не показано).

Фиг. 9: Производство клеточно-культивированного молока человека. (А) Культивирование эпителиальных клеток молочной железы для производства молока в биореакторе с полыми волокнами. ЭКМЖ размножают во флаконах для тканевых культур (1), а затем инокулируют во внекапиллярное пространство половолоконного биореактора (2), где они прикрепляются к компонентам внеклеточного матрикса, покрывающим поверхность волокон для дальнейшей пролиферации на большую площадь поверхности. Среда (3) циркулирует по волокнам с помощью перистальтического насоса (4). Клеточный метаболизм контролируют ежедневным измерением утилизации глюкозы (5). Когда ЭКМЖ достигают конфлюэнтности и становятся контактно-ингибированными, среда для культивирования переключают на лактогенный состав, содержащий пролактин, и собирают продукт из экстракапиллярного пространства (6). (В) Мониторинг роста эпителиальных клеток молочной железы и биосинтеза молока в биореакторе с полыми волокнами. Утилизацию глюкозы (сплошная линия) и синтез лактозы (точечная линия) контролировали ежедневно после инокуляции эпителиальных клеток молочной железы человека в половолоконный биореактор с использованием монитора глюкозы для диабетиков (AccuCheck) и фторметрического анализа лактозы (Sigma-Aldrich), соответственно. (С) Выявление синтеза молочного белка. Проводили капиллярный электрофорез образцов, собранных из внекапиллярного пространства, и иммунодетекцию бета-казеина человека. (D) Количественное определение общего белка в апикальном (внекапиллярное пространство) и базальном (среда для культивирования) отделениях половолоконного биореактора с культурой ЭКМЖ человека.

Подробное описание настоящего изобретения

Молоко представляет собой богатую питательными веществами жидкую пищу, вырабатываемую в молочной железе млекопитающих. Это первичный источник питания для младенцев млекопитающих (включая людей, находящихся на грудном вскармливании), прежде чем они смогут переваривать другие виды пищи. Молоко представляет собой сложную биологическую матрицу, состоящую из тысяч уникальных молекул, обладающих питательными и функциональными свойствами, которые идеально подходят для поддержки роста и развития младенцев млекопитающих.

Натуральное молоко содержит много макронутриентов, включая белки, липиды, полисахариды и лактозу. Каждый вид производит молоко с уникальным составом, который отражает его различные физиологические потребности (Beck KL, et al., *JProteome Res.* 2015;14(5):2143-2157). Поскольку состав молока оптимизирован для каждого вида животных, грудное молоко считается золотым стандартом детского питания человека и рекомендовано Всемирной организацией здравоохранения в качестве эксклюзивного источника питания в течение первых 6 месяцев (Mordor Intelligence, *Global dairy market* (2016-2024)).

По сравнению с коровьим молоком, человеческое молоко содержит меньше белка, но больше жира и углеводов (Ballard O, et al., *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60(1):49-74). Многие компоненты перекрываются, но проходят разные этапы обработки у людей и коров и, таким образом, различаются по своим конечным конформациям и физиологическим свойствам. Например, положения специфических жирных кислот в триглицеридах различаются между коровьим молоком и грудным молоком, и было показано, что эти различия влияют на абсорбцию (Andreas NJ, et al., *Early Hum Dev.*; 91 (11):629-635). Кроме того, человеческое молоко содержит сотни уникальных олигосахаридов, способствующих созреванию кишеч-

ника и иммунитета у развивающегося младенца, которых нет в смесях на основе молока крупного рогатого скота (Totten SM, et al., JProteome Res. 2012;11(12):6124). -6133).

Человеческое молоко не просто питательно. Скорее, человеческое молоко содержит множество факторов с биологически активными свойствами, которые играют важную роль в выживании и здоровье младенцев. Раннее молоко млекопитающих содержит антитела, обеспечивающие защиту новорожденного. К дополнительным факторам, способствующим восполнению активного потенциала натурального молока против заболеваний, относятся лейкоциты, гормоны, противомикробные пептиды, цитокины, хемокины и другие биологически активные факторы.

Секреторный IgA (sIgA) обнаружен в природном грудном молоке. IgA продуцируется плазматическими клетками, находящимися внутри ткани молочной железы. IgA связывается с рецептором (полимерный рецептор Ig) на базальной поверхности эпителиальных клеток молочной железы. IgA и рецептор транспортируются внутрь эпителиальных клеток молочной железы, где клетки молочной железы обрабатывают IgA путем расщепления внеклеточного домена полимерного рецептора Ig, связанного с IgA, оставляя растворимый эктодомен рецепторов Ig ("секреторный компонент") связанным с IgA. sIgA секретируется с апикальной поверхности эпителиальных клеток молочной железы. sIgA, передаваемый детям с грудным молоком, является неотъемлемым компонентом иммунной системы младенцев, позволяющим им бороться с инфекциями. Кроме того, sIgA является важным компонентом иммунных систем всех людей, а дефицит sIgA связан с повышенной восприимчивостью к заболеваниям. Терапия на основе sIgA дает возможность предотвращать и лечить инфекционные заболевания в местах их проникновения.

Иммунные клетки, включая CD20+ В-клетки, которые являются предшественниками sIgA-секретирующих плазматических клеток, присутствуют в нормальной ткани некормлящей молочной железы. Во время лактации хоуминг иммунных клеток по отношению к молочной железе способствует местному иммунитету слизистых оболочек, который помогает предотвратить инфекцию внутри молочной железы. Кроме того, хоуминг иммунных клеток по отношению к молочной железе позволяет передавать sIgA антитела младенцу через кормление молочной железой.

К сожалению, усилия по массовому производству sIgA затруднены тем фактом, что это поливалентный и сильно посттрансляционно модифицированный белок, который требует взаимодействия с эпителием слизистой оболочки для процессинга в свою биоактивную форму. Таким образом, трудно производить sIgA для использования с неприродным грудным молоком или в качестве терапевтических средств для людей.

Это несколько факторов, которые вносят вклад в неспособность детской смеси воспроизводить свойства грудного молока. Таким образом, существует необходимость в улучшении молочных продуктов для развивающихся младенцев и детей, которые более точно имитируют состав грудного молока человека, вырабатываемого кормящей женщиной.

Ранее было продемонстрировано, что эпителиальные клетки молочной железы (ЭКМЖ) в культуре демонстрируют организацию и поведение, сходное с наблюдаемым *in vivo* (Arevalo et al. 2016 Am J Physiol Cell Physiol. 310(5):C348-356; Chen et al. и др. 2019 Curr Protoc Cell Biol. 82(1):e65). У Arevalo et al. специфические биомаркеры популяций ЭКМЖ были обнаружены в иммортализованных эпителиальных клетках молочной железы крупного рогатого скота (BME-UV1) и иммортализованных альвеолярных клетках молочной железы крупного рогатого скота (MAC-T), культивируемых на адгезивных 2-D пластинах, ультранизко прикрепленных поверхностях 3D-микропланшетах с ультранизкой поверхностью прикрепления и 3D-планшетах, покрытых матригелем. Кроме того, у Chen et al. подробно описаны протоколы для выделения и культивирования стволовых клеток/клеток-предшественников эпителия молочной железы человека из ткани молочной железы человека и последующего создания маммосфер с использованием 3D-культуры органоидов на желатиновых губках и матрицах Matrigel. Однако ни Arevalo, ни Chen не пытались стимулировать выработку молока этими культурами ЭКМЖ.

В частности, при выращивании на подходящем внеклеточном матриксе и стимуляции пролактином культивированные эпителиальные клетки молочной железы крупного рогатого скота поляризуются и организуются в структуры, способные секретировать определенные компоненты молока (Blatchford et al. 1999 Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects 10:141-145). У Blatchford et al. ЭКМЖ крупного рогатого скота поляризовались и образовали маммосферы. Из культур выделяли казеин и бутирофилин. Однако клетки не поляризовались в одном направлении. Blatchford и др. отметили, что белки молока распределялись между клетками и рассеялись по всем маммосферам. Из-за отсутствия единой направленности поляризации пришлось изолировать выделяемые белки от сред для культивирования.

Кроме того, двухмерные модели *in vitro*, такие как те, что использовались у Blatchford et al. обеспечивают низкое отношение площади поверхности к объему (формат низкой плотности). Площадь поверхности, доступная для прикрепления клеток, ограничивает количество клеток, которые можно выращивать.

Единственная известная попытка культивирования эпителиальных клеток молочной железы мыши в формате высокой плотности, например в биореакторе с полыми волокнами, не позволила добиться разделения, необходимого для производства и экстракции культивированного молочного продукта (Sharfstein et al. 1992 Biotechnology and Bioengineering 40:672-680). В исследовании Sharfstein et al. были иссле-

дованы рост, длительная экспрессия, функциональная дифференцировка и метаболизм СОММА-1D (им-мортализованная линия эпителиальных клеток молочной железы мыши) в двух различных системах: расширенной периодической культуре и культуре в реакторе с полыми волокнами. С использованием СОММА-1D, посеянных на культуральные вставки из поликарбонатных мембран Costar Transwell®, Sharfstein et al. создали конфлюэнтный монослой, способный к образованию барьера, и поляризованный метаболизм между апикальной и базальной сторонами, что поддерживало градиенты глюкозы и лактата. Однако, используя культуру в биореакторе с полыми волокнами, Sharfstein et al. не удалось добиться разделения базального и апикального отделений. Кроме того, не было определено, было ли поглощение питательных веществ поляризованным в культуре с полыми волокнами (Sharfstein et al., 1992). Важно отметить, что ни в одной предшествующей работе не было возможности культивирования эпителиальных клеток молочной железы от людей или других сходных по питанию видов в трехмерном компарментализованном формате с высокой плотностью.

Настоящее раскрытие более подробно поясняется ниже. Это описание не предназначено для того, чтобы быть подробным каталогом всех различных способов, которыми раскрытие может быть реализовано, или всех признаков, которые можно добавлять к настоящему описанию. Например, признаки, в отношении одного из вариантов осуществления, могут быть включены в другие варианты осуществления, а признаки, проиллюстрированные в отношении конкретного варианта осуществления, могут быть удалены из этого варианта осуществления. Многочисленные вариации и дополнения к различным вариантам осуществления, предлагаемым в настоящем документе, будут очевидны специалистам в данной области в свете настоящего описания, которые не отходят от настоящего описания. Таким образом, следующее описание предназначено для примера некоторых конкретных вариантов осуществления раскрытия, а не для исчерпывающего указания всех их перестановок, комбинаций и вариаций.

Если в контексте не указано иное, конкретно подразумевают, что различные характеристики раскрытия, описываемые в настоящем документе, можно использовать в любой комбинации. Кроме того, по настоящему раскрытию также предусмотрено, что в некоторых вариантах осуществления раскрытия любой признак или комбинация признаков, изложенные в настоящем документе, могут быть исключены или опущены. Для примера, если в описании указано, что комплекс содержит компоненты А, В и С, конкретно подразумевают, что любой из компонентов А, В или С или их сочетание может быть опущен и исключен отдельно или в любой комбинации.

Определения

Если не определено иначе, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, в котором их обычно понимает специалист в области, к которой относится настоящее раскрытие. Терминология, применяемая в описании раскрытия в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения раскрытия.

Терминология, применяемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. Как применяют в настоящем документе, формы единственного числа также включают формы множественного числа, если контекст явно не указывает на иное. Кроме того, следует понимать, что термины "содержит" и/или "содержащий", когда их применяют в данном описании, указывают на наличие указанных признаков, элементов и/или компонентов, но не исключают наличия или добавления одного или нескольких других признаков, элементов, компонентов и/или их групп. Как применяют в настоящем документе, термин "и/или" включает любые и все комбинации одного или нескольких связанных перечисленных элементов. Как применяют в настоящем документе, фразы, такие как "между X и Y" и "приблизительно между X и Y", должны интерпретироваться как включающие X и Y. Как применяют в настоящем документе, фразы, такие как "приблизительно между X и Y" означает "приблизительно между X и приблизительно Y". Как применяют в настоящем документе, фразы, такие как "приблизительно от X до Y", означают "приблизительно от X до приблизительно Y".

Кроме того, по настоящему раскрытию также предусмотрено, что в некоторых вариантах осуществления любой признак или комбинация признаков, изложенные в настоящем документе, могут быть исключены или опущены.

Кроме того, термин "приблизительно", как применяют в настоящем документе, когда речь идет об измеримой величине, такой как количество соединения или средства по настоящему раскрытию, доза, время, температура и т.п., подразумевает охват вариаций $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$ или даже $\pm 0,1\%$ от указанного количества.

Как применяют в настоящем документе, переходная фраза "состоящий по существу из" должна интерпретироваться как включающая перечисленные материалы или стадии и те, которые существенно не влияют на основную и новую характеристику (характеристики) раскрытия. Таким образом, термин "состоящий по существу из", как применяют в настоящем документе, не должен толковаться как эквивалентный термину "содержащий".

Как применяют в настоящем документе, композиции, описанные в настоящем раскрытии, обозна-

чают взаимозаменяемо как (формы единственного или множественного числа) "пищевые композиции, по существу сходные с человеческим молоком", "молочные продукты", "молочные композиции", "культивированные молочные продукты" или эквивалент, как понятно из контекста.

Как применяют в настоящем документе, под "выделением" (или в качестве грамматических эквивалентов, например, под "экстрагированием") продукта, предполагают, что продукт, по меньшей мере, частично отделен, по меньшей мере, от некоторых других компонентов в исходном веществе.

Как применяют в настоящем документе, термин "полипептид" охватывает как пептиды, так и белки, и не требует какой-либо конкретной длины аминокислоты или третичной структуры, если не указано иное.

Термины "культивированный молочный продукт" и "молочный продукт" используют взаимозаменяемо для обозначения продукта, секретируемого апикальной поверхностью живой клеточной конструкции (или культуры клеток), содержащей эпителиальную клетку молочной железы человека (чЭКМЖ). В некоторых вариантах осуществления живую клеточную конструкцию культивируют в биореакторе.

Термин "поляризованный", как применяют в настоящем документе по отношению к клеткам и/или монослоям клеток, относится к пространственному статусу клеток, где есть две различные поверхности клеток, например, апикальная поверхность и базальная поверхность, которые могут быть разными. В некоторых вариантах осуществления отдельные поверхности поляризованной клетки содержат разные поверхности и/или трансмембранные рецепторы и/или другие структуры. В некоторых вариантах осуществления отдельные поляризованные клетки в непрерывном монослое имеют одинаково ориентированные апикальные поверхности и базальные поверхности. В некоторых вариантах осуществления отдельные поляризованные клетки в непрерывном монослое имеют контактные структуры между отдельными клетками (например, плотные соединения), чтобы обеспечить перекрестную связь между отдельными клетками и создать разделение (например, компарментализацию) апикального и базального отделений.

Как применяют в настоящем документе, "апикальная поверхность" означает поверхность клетки, которая обращена к внешней среде или к полости или камере, например, полости внутреннего органа. В отношении эпителиальных клеток молочной железы апикальная поверхность является поверхностью, из которой секретируется культивированный молочный продукт.

Как применяют в настоящем документе, "базальная поверхность" означает поверхность клетки, которая находится в контакте с поверхностью, например, матрикса биореактора.

Как применяют в настоящем документе, "биореактор" означает устройство или систему, которая поддерживает биологически активную среду, позволяющую производить культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, клетками молочной железы, описываемыми в настоящем документе.

Термин "лактогенный", как применяют в настоящем документе, относится к способности стимулировать выработку и/или секрецию молока. Ген или белок (например, пролактин) может быть лактогенным, как и любой другой натуральный и/или синтетический продукт. В некоторых вариантах осуществления лактогенная среда для культивирования содержит пролактин, тем самым стимулируя выработку молока клетками при контакте со средой для культивирования.

Как применяют в настоящем документе, термин "пищевой класс" относится к материалам, считающимся нетоксичными и безопасными для употребления (например, потребление человеком и/или другим животным), например, в соответствии со стандартами, установленными Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

Клеточные конструкции

В настоящий документ включены клеточные конструкции для получения культивированного молочного продукта, представляющего собой продукт биосинтеза культивированных эпителиальных клеток молочной железы (иммортизированных или из образцов первичной ткани) и IgA-продуцирующих клеток, например, плазматических клеток. В определенных аспектах в настоящем документе раскрыты клеточные конструкции для получения культивированных молочных продуктов, содержащих sIgA, клеточные конструкции, содержащие: (a) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость/базальную камеру, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности; (b) матриксный материал, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса; (c) среды для культивирования, расположенные во внутренней полости/базальной камере и находящиеся в жидкостном контакте с внутренней поверхностью; (d) популяцию плазматических клеток (ПК), расположенных на матриксном материале и (e) конфлюэнтный монослой клеток молочной железы, расположенных на популяции плазматических клеток, клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из: (i) эпителиальных клеток молочной железы, (ii) миоэпителиальных клеток молочной железы, и (iii) клеток-предшественников молочной железы.

Клетки молочной железы

В некоторых вариантах осуществления молочные клетки содержат молокопродуцирующие эпителиальные клетки молочной железы (ЭКМЖ), сократительные миоэпителиальные клетки и/или клетки-предшественники, которые могут давать как эпителиальные клетки молочной железы (ЭКМЖ), так и сократительные миоэпителиальные клетки молочной железы. Эпителиальные клетки молочной железы

(ЭКМЖ) являются единственными клетками, производящими молоко. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат эпителиальные клетки молочной железы (ЭКМЖ), первичные эпителиальные клетки молочных желез, миоэпителиальные клетки молочной железы и клетки-предшественники молочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы получают из биопсии ткани молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы получают из стволовых клеток, полученных из грудного молока, или стволовых клеток молочной железы, полученных из биопсии ткани молочной железы. Эпителиальный компонент грудного молока включает не только зрелые эпителиальные клетки, но и их предшественники и стволовые клетки в культуре. Субпопуляция стволовых клеток, полученных из грудного молока, обладает очень высоким мультилинейным потенциалом, напоминающим таковой, характерный для эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК). Стволовые клетки молочной железы могут также происходить из биопсии ткани молочной железы и включать терминально дифференцированные ЭКМЖ. И стволовые клетки, полученные из грудного молока, и стволовые клетки молочной железы, полученные из биопсии ткани молочной железы, являются мультипотентными клетками, которые могут давать ЭКМЖ или миоэпителиальные клетки.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 55% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 60% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 65% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 85% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 100% клеток молочной железы из клеточной культуры являются поляризованными. В некоторых вариантах осуществления по существу все клеточные конструкции молочной железы являются поляризованными (т.е. имеют апикальную поверхность и базальную поверхность). В некоторых вариантах осуществления по существу все клеточные конструкции молочной железы являются поляризованными, и по существу все поляризованные клетки ориентированы в одном направлении. Например, в некоторых вариантах осуществления по существу все клетки молочной железы имеют апикальную поверхность и базальную поверхность, где апикальная поверхность по существу всех клеток ориентирована в одном направлении и базальная поверхность по существу всех клеток ориентирована в одном направлении.

В некоторых вариантах осуществления непрерывный монослой клеток молочной железы имеет по меньшей мере 70% конфлюэнтности над каркасом. В некоторых вариантах осуществления непрерывный монослой клеток молочной железы имеет по меньшей мере 75% конфлюэнтности над каркасом. В некоторых вариантах осуществления непрерывный монослой клеток молочной железы имеет по меньшей мере 80% конфлюэнтности над каркасом. В некоторых вариантах осуществления непрерывный монослой клеток молочной железы имеет по меньшей мере 85% конфлюэнтности над каркасом. В некоторых вариантах осуществления непрерывный монослой клеток молочной железы имеет по меньшей мере 90% конфлюэнтности над каркасом. В некоторых вариантах осуществления непрерывный монослой клеток молочной железы имеет по меньшей мере 95% конфлюэнтности над каркасом. В некоторых вариантах осуществления непрерывный монослой клеток молочной железы имеет по меньшей мере 99% конфлюэнтности над каркасом. В некоторых вариантах осуществления непрерывный монослой клеток молочной железы имеет по меньшей мере 100% конфлюэнтности над каркасом.

Генетические модификации клеток молочной железы

В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат конститутивно активный белок рецептора пролактина. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат конститутивно активный белок рецептора пролактина человека. В тех случаях, когда первичная эпителиальная клетка молочной железы или иммортализованная эпителиальная клетка молочной железы содержат конститутивно активный рецептор пролактина, среда для культивирования не содержит пролактин.

В некоторых вариантах осуществления конститутивно активный белок рецептора пролактина человека содержит делецию аминокислот с 9 по 187, где нумерация основана на референсной аминокислотной последовательности рецептора пролактина человека, идентифицированного как SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1: Рецептор пролактина человека (номер доступа GenBank AAD32032.1)

MKENVASATVFTLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGTD
 GGLPTNYSLTYHREGETLMHECPDYITGGPNSCHFQKQYTSMWRTYIMMVNATNQMGSSF
 SDELVYVDVTYIVQDPPELEAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIRLKPE
 KAAEWEIHFAQQTEFKILSLHPGQKYLQVVRCKPDHGYWSAWSPATFIQIPSDFTMNDTT
 VWISVAVL SAVICLIIVVAVALKGYSMTVCIFPPVPGPKIKGFDAHLLKKGSEELLSALGC
 QDFPPTSDYEDLLVEYLEVDDSEDQHLMMSVHSKEHPSQGMKPTYLDPDTDSDGRGSCDPSL
 LSEKCEEPQANPSTFYDPEVIEKPENPETTHTWDPQCISMEGKIPYFHAGGSKCSTWPLPQPS
 QHNPRSSYHNITDVCELA VGPAGAPATLLNEAGKDALKSSQTIKSREEGKATQQREVESFH
 SETDQDTPWLLPQEKTPFGSAKPLDYVEIHKVNKDGALSLLPKQRENSGKPKKPGTPENNK
 EYAKVSGVMDNNILVLPDPHAKNVACFEESAKEAPPSLEQNQAELANFTATSSKCR
 QLGGLDYLDPACTHSHF

В некоторых вариантах осуществления конститутивно активный белок рецептора пролактина человека содержит делецию следующих аминокислот:

VFTLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGTDGGLPTNYSLTYHREGETL
 MHECPDYITGGPNSCHFQKQYTSMWRTYIMMVNATNQMGSSFDELVYVDVTYIVQDPPEL
 ELAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIRLKPEKAA

(например, аминокислотные положения с 10 по 178 из SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат мутацию потери функции, введенную в циркадный родственный ген PER2. В некоторых вариантах осуществления мутация с потерей функции, введенная в циркадный родственный ген PER2, способствует увеличению синтеза компонентов культивированного молока. В некоторых вариантах осуществления мутация потери функции в гене PER2 включает делецию из 87 аминокислот с положения 348 до 434 в PER2, где нумерация основана на референсной аминокислотной последовательности человека PER2, идентифицированной как SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2: Гомолог 2 периодического циркадного белка человека (номер доступа GenBank NM 022817)

MNGYAEFPPSPNPTKEPVEPQSQVPLQEDVDMSSGSSGHETNENCSTGRDSQGSDCDDSD
 GKJELGMLVEPPDARQSPDTFSLMMAKSEHNPSTSGCSSDQSSKVDTHKELIKTLKELKVH
 LPADKKAAGKASTLATLKYALRSVKQVKANEEYYQLLMSSEGHPCGADVPSYTVVEEMES
 VTSEHIVKNADMFAVAVSLVSGKILYISDQVASIFHCKRDAFSDAKFVEFLAPHDVGVFHSF
 TSPYKLP LWSMCSGADSFTECEMEEKSFFCRVSVRKSHENEIRYHPFRMTPYLKVRDQQG
 AESQLCCLLLAERVHSGYEAPRIPPEKRIFTTHTPNCLFQDQVDERAVPLLGYPQLDIET
 PVLVQLHPSDRPLMLAIHKILQSGGQPFQDYSPIRFRANGEYITLDTSWSSFINPWSR
 KISFIIGRHKVVRVGPLNEDVFAAHPCTEEKALHPSIQELTEQIHRLLLPVPHSGSSGYGSL
 GSNGSHEHLSMTSSSDSNGHEDSRRRRAEICKNGNKTKNRSHYSHESGEQKKKSVTEMQ
 TNPPAEKKA VPAMEKDSLGSFPEELACKNQPTCSYQQISCLDSVIRYLESCNEAATLKRKC
 EFPANVPALRSSDKRKA TVSPGPHAGEAEPSPRVNSRTGVGTHLTSALPGKAESVASLTSQ
 CSYSSTIVHVGDKKPQPELEMVEDAASGPESLDCLAGPALACGLSKEKEPFKLGTLKEVL
 AAHTQKEEQSFLQKFKIRKLSIFQSHCHYLYQERSKGQPSERTAPGLRNTSGIDSPWKKTG
 KNRKLSKRVKPRDSESTGSGGPVSARPPVLVGLNATAWSPSDTSQSSCPAVFPAPVPAAY
 SLPVFPAPGTV AAPPAPPHASFTVPAVPVDLQHQAFAVQPPFPAPLAPVMAFMLPSYFSPSG
 TPNLPQAFFPSQPQFPHPTLTSEMASASQPEFPEGGTGAMGTTGATETA AVGADCKPGTSR
 DQPKAPLTRDEPSDTQNSDALSTSSGLNLLLNEDLCSASGSAASESLGSGSLGCDASPSG
 AGSSDTSHTSKYFGSIDSENHAKMNTGMEESEHFIKCVLQDPIWLLMADADSSVMMT
 YQLPSRNLEAVLKEDREKLLQKLQPRFTESQKQELREVHQWMTGGLPAAIDVAECVY
 CENKEKGNICIPYEEDIPSLGLSEVSDTKEDENGSPLNHRIEET

В некоторых вариантах осуществления мутация потери функции, введенная в PER2, содержит делецию следующих аминокислот:

CLFQDQVDERAVPLLGYPQLDIETPVLVQLHPSDRPLMLAIHKILQSGGQPFQDYSPIRFRAR
 NGEYITLDTSWSSFINPWSRKISFIIGRHKV (например, аминокислотные положения с 341 до 434 из SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат полинуклеотид, кодирующий рецептор пролактина, содержащий модифицированный домен внутриклеточной сигнализации. В некоторых вариантах осуществления мутация с потерей функции, введенная в циркадный родственный ген PER2, способствует увеличению синтеза отдельных компонентов культивированного молока. В некоторых вариантах осуществления рецептор пролактина содержит укорочение, где позиция 154 экзона

10 сплайсирована до 3'-последовательности экзона 11. В некоторых вариантах осуществления рецептор пролактина содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 3: Изоформа 4 рецептора пролактина человека (номер доступа GenBank AF416619; Trott et al. 2003 J. Mol Endocrinol 3Q(I):31-47)

MKENVASATVFTLLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGTD
 GGLPTNYSLTYHREGETLMHECPDYITGGPNSCHFQKQYTSMWRTYIMMVNATNQMGSSF
 SDELYVDVTVYVQDPPELELAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIRLKPE
 KAAEWEIHFAGQQTEFKILSLHPGQKYLQVVRCKPDHGYWSAWSPATFIQPSDFTMNDTT
 VWISVAVLSAVICLIHVVAVALKGYSMVTCIFPPVPGPKIKGFDAHLEKKGSEELLSALGC
 QDFPPTSDYEDLLVEYLEVDDSEDQHLMSVHSHENPSQGDPLMLGASHYKNLKSYPKRS
 SQRLAVFTKATLTTVQ

В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат полинуклеотид, кодирующий модифицированный (например, рекомбинантный) эффектор белка пролактина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный эффектор белка пролактина содержит тирозинкиназный домен Янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах осуществления модифицированный эффектор содержит тирозинкиназный домен JAK2, слитый с тирозинкиназным доменом трансдуктора сигнала и активатора транскрипции-5 (STAT5) (например, полинуклеотид, кодирующий тирозинкиназный домен JAK2, связанный с 3'-концом полинуклеотида, кодирующего тирозинкиназный домен STAT5). В некоторых вариантах осуществления модифицированный эффектор белка пролактина способствует увеличению синтеза отдельных компонентов культивируемого молока. В некоторых вариантах осуществления модифицированный эффектор имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4. Жирным шрифтом выделены аминокислоты, соответствующие киназному домену JAK2 в аминокислотных положениях с 757 по 1129 референсной аминокислотной последовательности JAK2 человека.

SEQ ID NO: 4: Трансдуктор сигнала и активатор транскрипции 5A STA5A человека, слитый на 3'-конце с аминокислотами 757-1129 из тирозинпротеинкиназы JAK2 человека

MAGWIAAQL QGDALRQMQV LYGHFPIEV RHYLAQWIES
 QPWDAIDLND PDRQAATQL LEGLVQELQK KAENQVGEDG FLLKIKLGHY
 ATQLQKTYDR CPLELVCIR HILYNEQLRV REANNCSSPA GILVDAMSQK HLQINQTFEE
 LRLVTQDTEN ELKKLQQTQE YFIQYQESL RIAQFAQLA QLSPQERLSR ETALQKQVVS
 LEAWLQREAQ TLQYRVELA EKHQKTLQLL RKQQTILDD ELIQWKRQQ
 LAGNGGPEG SLDVLQSWCE KLAEPWQNR QQIRRAEHL CQLPIGPVE EMLAEVNATI
 TDHISALVTS TFIKQPPQ VLKTQTKFAA TVRLLVGGKL NVHMNPPQVK ATISEQQAK
 SLLKNENTRN ECSGEILNNC CVMEYHQATG TLAHFRNMS LKRIKRARR
 GAESVTEEF TVLFESQFSV GSNELVFQVK TSLPWVIV HGSQDHNATA TVLWDNAFAE
 PGRVPFAVPD KVLWPQLCEA LNMKFKAEVQ SNRGLTKENL VFLAQKLFNN
 SSSHLEDYSG LSVSWSQFNR ENLPGWNYTF WQWFDGVMEV LKKHHKPHWN
 DGAILGFVNK QQAHDLLINK PDGTFLLRFS DSEIGGITA WKFDSPERNL WNLKPFTRD
 FSIRSLADRL GDLSYLIYVF PDRPKDEVFS KYYPVLAKA VDGYVKPQIK QWPEFVNAS
 ADAGGSSATY MDQAPPAVC PQAPYNYMPQ NPDHVLDDQDG EFDLDETMDV
 ARHVEELLRR PMDSLDSRLS PPAGLFTSAR GSLSDSQ RKLQFYEDRH QLPAPKWAEL
 ANLINCMDY EPDFRPSFRA IIRDLNSLFT PDYELLTEND MLPNMRIGAL GFSGAFEDRD
 PTQFEERHLK FLQQLGKGNF GSVEMCRYDP LQDNTGEWA VKKLQHSTEE HLRDFEREIE
 ILKSLQHDNI VKYKGCYSA GRRNLKLIME YLPYGLRDY LQKHKERIDH IKLLQYTSQI
 CKGMEYLGTK RYIHRDLATR NILVENENRV KIGDFGLTKV LPQDKEYYKV KEPGESPIFW
 YAPESLTESK FSVASDVWSF GWLYELFTY IEKSKSPPAE FMRMIGNDKQ GQMIVFHLE
 LLKNNGRLPR PDGCPDEIYM IMTECWNNNV NQRPSFRDLA LRVQIRDN.

В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы являются иммортализованными. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT) или обезьяньего вируса 40 (SV40). В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат короткошпилечную РНК (кшРНК) к р16 (ингибитору циклин-зависимой киназы 4) (p16(INK4)) и главному регулятору входа в клеточный цикл и пролиферативного метаболизма (с-MYC).

В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает введение в клетку молочной железы: (а) полинуклеотида, кодирующего рецептор пролактина, содержащий модифицированный внутриклеточный сигнальный домен, необязательно, где рецептор пролактина содержит укорочение, где позиция 154 экзона 10 сплайсирована до 3'-последовательности экзона 11; (б) полинуклеотида, кодирующего химерный рецептор пролактина, который связывается с лигандом, способным активировать синтез моло-

ка при отсутствии пролактина; (с) полинуклеотида, кодирующего конститутивно или условно активный белок рецептора пролактина, необязательно, где полинуклеотид кодирует конститутивно активный белок рецептора пролактина человека, содержащий делецию аминокислот с 9 по 187 (например, делецию аминокислот с 9 по 187, где нумерация основана на референсной аминокислотной последовательности рецептора пролактина человека, идентифицированной как SEQ ID NO: 1); (d) полинуклеотида, кодирующего модифицированный (например, рекомбинантный) эффектор белка пролактина, содержащий (i) тирозинкиназный домен Янус-киназы 2 (JAK2), необязательно, где тирозинкиназный домен JAK2 слит с тирозинкиназным доменом трансдуктора сигнала и активатора транскрипции-5 (STAT5) (например, полинуклеотид, кодирующий тирозинкиназный домен JAK2, связанный с 3'-концом полинуклеотида, кодирующего тирозинкиназный домен STAT5); и/или (ii) внутриклеточный домен рецептора пролактина, слитый с тирозинкиназным доменом JAK2; (e) мутации потери функции в циркадный родственный ген PER2 (гомолог 2 периодического циркадного белка); и/или (f) полинуклеотида, кодирующего один или несколько генов переносчиков глюкозы GLUT1 и/или GLUT12, тем самым увеличивая скорость поглощения питательных веществ базальной поверхностью монослоя.

Плазматические клетки

Плазматические клетки получают от человека-донора. В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки получают из костного мозга, селезенки и/или лимфоузла, образца первичной ткани молочной железы. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки получают из эпителиальных клеток слизистой оболочки, отличных от клеток молочной железы (например, из ротовой, желудочно-кишечной или респираторной ткани). В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки получают из линии плазматических клеток. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки получают из линии плазмочитарных клеток. В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки выделяют и сортируют от неплазматических клеток посредством активированной флуоресценцией сортировки клеток, магнитно-активируемой сортировки клеток и/или микроструйного устройства для сортировки клеток. В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки, плазмобласты или преплазмобласты сортируют и выделяют с помощью анализа FACS с использованием маркеров, известных в данной области (например, CD38, CD138 и/или CD19). В определенных вариантах осуществления плазматические клетки культивируют вместе с иммортализованными эпителиальными клетками молочной железы на каркасе, тем самым производя клеточную конструкцию для получения культивированного молочного продукта с секреторными продуктами плазматических клеток и клеток молочной железы (например, sIgA). В определенных вариантах осуществления плазматические клетки выращивают на каркасе ниже монослоя клеток молочной железы. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки выращивают в виде популяций плазматических клеток с низкой плотностью, покрытых монослоем клеток молочной железы. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки стимулируют выработку иммуноглобулинов при совместном культивировании с клетками молочной железы. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки продуцируют один или несколько иммуноглобулинов класса, выбранных из IgG, IgM и IgA. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки продуцируют IgA. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки продуцируют IgA, и IgA обрабатывается эпителиальными клетками молочной железы с образованием sIgA, который связан с секреторным компонентом, и sIgA секретируется апикальной поверхностью клеток молочной железы.

Каркасы

В некоторых вариантах осуществления клеточная конструкция содержит каркас, имеющий верхнюю поверхность/внешнюю поверхность и нижнюю поверхность/внутреннюю поверхность. В некоторых вариантах осуществления каркас представляет собой двухмерную поверхность или трехмерную поверхность (например, трехмерную поверхность с микроузлом и/или в виде цилиндрической конструкции, собранной в пучки). Неограничивающим примером каркаса с двухмерной поверхностью является фильтр Transwell®. В некоторых вариантах осуществления каркас представляет собой трехмерную поверхность. Неограничивающие примеры трехмерной поверхности с микроузлом включают микроструктурированный биореактор, бесклеточную ткань (например, бесклеточную ткань молочной железы или бесклеточную растительную ткань), каркасы с микроузлом, изготовленные путем литья или трехмерной печати из биологических или биосовместимых материалов, текстурированную поверхность. В некоторых вариантах осуществления каркас изготавливают путем электропрядения целлюлозных нановолокон и/или цилиндрической структуры, которую можно собирать в пучки (например, биореактор с полыми волокнами). В некоторых вариантах осуществления каркас является пористым. В некоторых вариантах осуществления каркас представляет собой трехмерный каркас. В некоторых вариантах осуществления трехмерный каркас представляет собой любую структуру, имеющую замкнутую внутреннюю полость/центральную полость. В некоторых вариантах осуществления трехмерный каркас соединяется с одной или несколькими поверхностями, образуя замкнутую внутреннюю камеру/базальное отделение. Например, каркас может соединяться с одной или несколькими стенками биореактора, образуя внутреннюю камеру/базальное отделение. В некоторых вариантах осуществления каркас представляет собой биореактор с полыми волокнами. В некоторых вариантах осуществления 3D-каркас представляет собой

трубку, в которой центральная полость образована внутренней поверхностью каркаса. В некоторых вариантах осуществления 3D-каркас представляет собой полую сферу, в которой центральная полость образована внутренней поверхностью каркаса.

Для способов культивирования *in vitro* для изучения кишечной абсорбции в качестве стандарта уже давно используют каркасы с двухмерной поверхностью, такие как Transwells®, поскольку они обеспечивают как апикальное, так и базолатеральное пространство для имитации барьера кишечник-кровь и делают возможным и активный, и пассивный транспорт лекарственных средств и питательных веществ. Однако фенотипы клеток, посеянных на плоские подложки, заметно отличаются от фенотипов клеток *in vivo*, отчасти из-за плохой представленности трехмерного внеклеточного микроокружения.

Трехмерный каркас позволяет клеткам (например, ЭКМЖ и плазматическим клеткам) расти или взаимодействовать с окружающей средой во всех трех измерениях. В отличие от 2D-окружения, 3D-культура клеток позволяет клеткам *in vitro* расти во всех направлениях, приближаясь к окружению молочной железы *in vivo*. Кроме того, трехмерный каркас позволяет увеличить площадь поверхности для культуры клеток и для обмена газов и метаболитов, а также обеспечивает необходимую компартиментализацию, позволяя секретировать культивированный молочный продукт в одно отделение, в то время как среды для культивирования клеток контактируют с клетками молочной железы и плазматическими клетками в другом отделении. До настоящего времени не удавалось получить конфлюэнтный монослой с поляризованным разделением базальной и апикальной клеточных поверхностей с использованием эпителиальных клеток молочной железы на трехмерной поверхности (Sharfstein et al. 1992).

В некоторых вариантах осуществления каркас является пористым. В некоторых вариантах осуществления каркас является проницаемым для клеточных сред, что позволяет клеточным средам контактировать с клетками из клеточного монослоя. В некоторых вариантах осуществления каркас имеет, по меньшей мере, одну пору, что позволяет клеточным средам контактировать с клеточной базальной поверхностью клеточного монослоя.

В некоторых вариантах осуществления верхняя поверхность/внешняя поверхность каркаса покрыта материалом матрикса. В некоторых вариантах осуществления матрикс состоит из одного или нескольких белков внеклеточного матрикса. Неограничивающие примеры белка внеклеточного матрикса включают коллаген, ламинин, энтактин, тенасцин и/или фибронектин. В некоторых вариантах осуществления каркас содержит природный полимер, биосовместимый синтетический полимер, синтетический пептид и/или композит, полученный из любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления природный полимер, используемый в этом изобретении, в качестве неограничивающих примеров включает коллаген, хитозан, целлюлозу, агарозу, альгинат, желатин, эластин, гепарансульфат, хондроитинсульфат, кератансульфат и/или гиалуроновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления биосовместимый полимер, используемый в этом изобретении, в качестве неограничивающих примеров включает целлюлозу, полисульфон, поливинилиденфторид, полиэтилен-ко-винилацетат, поливиниловый спирт, натрия полиакрилат, акрилатный полимер и/или полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления верх каркаса покрывают ламинином и коллагеном.

В некоторых вариантах осуществления материал матрикса является пористым. В некоторых вариантах осуществления материал матрикса проницаем для клеточных сред, что позволяет клеточным средам контактировать с клетками из клеточного монослоя. В некоторых вариантах осуществления материал матрикса имеет, по меньшей мере, одну пору, что позволяет клеточным средам контактировать с клеточной базальной поверхностью клеточного монослоя.

В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 0,1 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 0,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 0,3 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 0,4 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 0,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 0,6 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 0,7 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 0,8 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 0,9 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет, по меньшей мере, приблизительно 1,0 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 1,1 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет, по меньшей мере, приблизительно 1,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 1,3 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 1,4 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет, по

меньшей мере, приблизительно 1,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 1,6 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 1,7 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 1,8 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 1,9 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,0 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,1 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,3 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,4 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,6 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,7 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,8 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 2,9 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор каркаса и/или материала матрикса составляет по меньшей мере приблизительно 3,0 мкм.

В некоторых вариантах осуществления клеточная конструкция содержит: (a) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость/базальную камеру, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности; (b) материал матрикса, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса; (c) среды для культивирования, расположенные во внутренней полости/базальной камере и находящиеся в жидкостном контакте с внутренней поверхностью; (d) популяцию плазматических клеток (ПК), расположенных на материале матрикса и (d) конфлюэнтный монослой клеток молочной железы, расположенных на популяции плазматических клеток, клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из: (i) эпителиальных клеток молочной железы, (ii) миоэпителиальных клеток молочной железы и (iii) клеток-предшественников молочной железы; где конфлюэнтный монослой эпителиальных клеток молочной железы имеет апикальную поверхность и базальную поверхность (например, клетки образуют поляризованный и конфлюэнтный монослой клеток).

Биореактор

В конкретных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты биореакторы, содержащие: (a) апикальное отделение, содержащее культивированный молочный продукт; и (b) по меньшей мере, одну клеточную конструкцию, содержащую: (a) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость/базальную камеру, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности; (b) материал матрикса, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса; (c) среды для культивирования, расположенные во внутренней полости/базальной камере и находящиеся в жидкостном контакте с внутренней поверхностью; (d) популяцию плазматических клеток (ПК), расположенных на материале матрикса, и (e) конфлюэнтный монослой клеток молочной железы, расположенных на популяции плазматических клеток, клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из: i) эпителиальных клеток молочной железы, (ii) миоэпителиальных клеток молочной железы и (iii) клеток-предшественников молочной железы. В определенных вариантах осуществления клеточная конструкция биореактора содержит по меньшей мере на 70% конфлюэнтный монослой поляризованных клеток молочной железы, расположенный на материале матрикса, где клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы; где апикальная поверхность клеток молочной железы находится в жидкостном контакте с апикальным отделением.

В некоторых вариантах осуществления биореактор представляет собой закрытый биореактор. В некоторых вариантах осуществления апикальная камера по существу изолирована от внутренней полости/базального отделения.

Биореактор с полыми волокнами является иллюстративным биореактором для использования с раскрытыми в настоящем документе способами. Биореактор с полыми волокнами представляет собой систему непрерывного перфузионного культивирования с высокой плотностью, которая максимально приближена к среде, в которой клетки растут *in vivo*. Он состоит из тысяч полупроницаемых трехмерных каркасов (т.е. полых волокон) в параллельном массиве внутри оболочки картриджа, снабженной входными и выходными портами. Эти пучки волокон залиты или герметизированы с каждого конца, так что

любая жидкость, попадающая на концы картриджа, обязательно будет протекать через внутреннюю часть волокон. Клетки обычно высевают вне волокон внутри картриджа в экстракапиллярном пространстве (ЭКП).

Три фундаментальные характеристики отличают волоконное культивирование клеток от других способов: (1) клетки связаны с пористым матриксом почти так же, как и *in vivo*, а не с пластиковой чашкой, микроносителем или другой непроницаемой подложкой, (2) порог молекулярной массы опорного матрикса можно контролировать, и (3) чрезвычайно высокое отношение площади поверхности к объему (150 см^2 и более на мл), что обеспечивает большую площадь для обмена метаболитов и газов для эффективного роста клеток-хозяев.

Структура биореактора обеспечивает волокнистый матрикс, который позволяет проникать питательным веществам, газам и другим компонентам основных сред, а также продуктам жизнедеятельности клеток, но не клеткам, при этом клетки можно наращивать. Технологию биореактора с полыми волокнами используют для получения наращивания клеток с высокой плотностью за счет использования полых волокон для создания полупроницаемого барьера между камерой для роста клеток и потоком среды. Так как площадь поверхности, обеспечиваемая такой конструкцией, велика, использование этого волокна в качестве культурального субстрата позволяет производить большое количество клеток. Клетки, растущие в трехмерной среде внутри биореактора, омываются свежей средой, проникающей через полые волокна.

Чтобы воспроизвести топографию кишечника, Costello et al. разработали 3D-печатный биореактор, который может содержать пористые каркасы ворсинок посредством микроформования (Costello et al. 2017 *Scientific Reports* 7(12515): 1-10). Этот геометрически сложный формованный каркас обеспечивает разделение апикального и базолатерального пространств таким образом, что поток жидкости подвергает кишечную эпителиальную клетку воздействию соответствующих сдвиговых напряжений (Costello et al. 2017). Аналогичным образом, длительная культура *in vitro* в моделируемой среде, подобной кишечнику, была создана Morada et al. с использованием биореактора с полыми волокнами, который позволял использовать две контролируемые отдельные среды (двухфазный) для обеспечения клеток-хозяев кислородом и питательными веществами из базального слоя, в то же время позволяя создавать среду с низким содержанием кислорода, богатую питательными веществами, на апикальной поверхности (Morada et al. 2016 *International Journal for Parasitology* 26: 21-29).

При выборе конфигурации биореактора с полыми волокнами существуют конструктивные факторы и параметры, которые могут варьировать в зависимости от целей, связанных с размножением клеток. Одним из таких конструктивных факторов является размер пор в стенке волокна. Как правило, это делают для того, чтобы позволить питательным веществам попасть в клетку, вынести отходы, обеспечить клетку нужными продуктами (такими как факторы роста), удалить из клетки нужные продукты и исключить попадание в клетку определенных присутствующих факторов. Таким образом, размер пор в стенках волокон можно варьировать, чтобы модифицировать, какие компоненты будут проходить через стенки.

Например, размер пор может привести к прохождению крупных белковых молекул, включая факторы роста, включая в качестве неограничивающих примеров эпидермальный фактор роста и фактор роста, полученный из тромбоцитов. Специалисту в данной области понятно, как может варьироваться размер пор в зависимости от компонентов, которым желательно пройти через стенки волокон, чтобы достичь клетки или доставить материал из клеток.

В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,1 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,3 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,4 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,6 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,7 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,8 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 0,9 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,0 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,1 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,3 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,4 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,6 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,7 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,8 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 1,9 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,0 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,1 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет прибли-

зительно 2,3 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,4 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,6 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,7 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,8 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 2,9 мкм. В некоторых вариантах осуществления размер пор составляет приблизительно 3,0 мкм.

Способы создания клеточных конструкций

В конкретных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы создания клеточной конструкции для получения культивированного молочного продукта, содержащего иммуноглобулины. В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает (a) размещение (i) выделенных эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы и (ii) выделенных плазматических клеток на верхней поверхности каркаса, имеющего верхнюю поверхность и нижнюю поверхность, с получением смешанной популяции плазматических клеток и клеток молочной железы (т.е., эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы); (b) культивирование смешанной популяции клеток молочной железы и плазматических клеток (a) на каркасе, для получения монослоя поляризованных клеток молочной железы, расположенных рядом с плазматическими клетками и над ними, где плазматические клетки расположены рядом и над верхней поверхностью каркаса, где верхняя поверхность расположена рядом с нижней поверхностью каркасом и над ней, и где поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность, тем самым создавая клеточную конструкцию для получения культивированного молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы представляют собой первичные клетки молочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы получают из культуры клеток. В некоторых вариантах осуществления эпителиальные клетки молочной железы, миоэпителиальные клетки молочной железы и/или клетки-предшественники молочной железы выделяют из костного мозга, ткани селезенки, ткани лимфоузла, эксплантатов молочной железы из ткани молочной железы (например, молочная железа, вымени, ткани соска), или сырого грудного молока. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат эпителиальные клетки молочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат миоэпителиальные клетки молочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы содержат клетки-предшественники молочной железы. В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки выделяют из любой подходящей ткани человека или культуры клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы и плазматические клетки размещают одновременно. В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки размещают на поверхности каркаса до размещения клеток молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает (a) размещение (i) выделенных иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы, и (ii) выделенных плазматических клеток на верхней поверхности каркаса, имеющего верхнюю поверхность и нижнюю поверхность, с получением смешанной популяции плазматических клеток и иммортализованных клеток молочной железы (т.е., иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы, иммортализованных миоэпителиальных клеток молочной железы и/или иммортализованных клеток-предшественников молочной железы); (b) культивирование смешанной популяции иммортализованных клеток молочной железы и плазматических клеток (a) на каркасе, с получением монослоя иммортализованных поляризованных клеток молочной железы, расположенных вплотную с плазматическими клетками и над ними, где плазматические клетки расположены вплотную и над верхней поверхностью каркаса, где верхняя поверхность расположена вплотную с нижней поверхностью каркасом и над ней, и где поляризованные иммортализованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность, тем самым создавая клеточную конструкцию для получения культивированного молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления иммортализованные клетки молочной железы содержат иммортализованные эпителиальные клетки молочной железы. В некоторых вариантах осуществления иммортализованные клетки молочной железы содержат иммортализованные миоэпителиальные клетки молочной железы. В некоторых вариантах осуществления иммортализованные клетки молочной железы содержат иммортализованные клетки-предшественники молочной железы. В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки выделяют из любой подходящей ткани человека или культуры клеток. В некоторых вариантах осуществления иммортализованные клетки молочной железы и плазматические клетки размещают одновременно. В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки размещают на поверхности каркаса до размещения иммортализованных клеток молочной железы. В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки добавляются к культуре иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы для получения совместной культуры клеток молочной железы и плазматических клеток. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки культивируют с иммортализованными эпителиальными

ми клетками молочной железы на каркасе, тем самым получая клеточную конструкцию для получения культивированного молочного продукта с секреторными продуктами иммунных клеток и клеток молочной железы (например, sIgA). В определенных вариантах осуществления выделенные клетки молочной железы иммортализуют перед совместным культивированием клеток.

В определенных вариантах осуществления иммунные клетки стимулируют для продукции иммуноглобулинов во время совместного культивирования. В определенных вариантах осуществления иммунные клетки продуцируют один или несколько иммуноглобулинов из класса, выбранного из IgG, IgM и IgA. В определенных вариантах осуществления иммунные клетки продуцируют секреторный IgA. Классы иммуноглобулинов, продуцируемых иммунными клетками, включают один или несколько из IgA, IgM и IgG. В определенных вариантах осуществления иммунные клетки культивируют совместно с ЭКМЖ в биореакторе способами, описываемыми в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления биореактор представляет собой биореактор с полыми волокнами, описываемый в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления клетки молочной железы модифицируют и/или стимулируют пролактином, способами, описываемыми в настоящем документе, для стимуляции и оптимизации молочной продуктивности. В определенных вариантах осуществления клетки молочной железы модифицированы для экспрессии конститутивно активного белка рецептора пролактина.

В определенных вариантах осуществления клетки молочной железы идентифицируют и выделяют из образцов ткани молочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы выделяют и сортируют посредством активируемой флуоресценцией сортировки клеток, магнитно-активируемой сортировки клеток и/или микроструйного устройства для сортировки клеток. В определенных вариантах осуществления популяции эпителиальных клеток молочной железы сортируют с помощью анализа FACS с использованием маркеров, известных в данной области, для идентификации популяций клеток. В определенных вариантах осуществления миоэпителиальные клетки молочной железы и клетки люминального эпителия молочной железы выделяют с помощью анализа FACS. В определенных вариантах осуществления клетки-предшественники миоэпителия молочной железы и/или клетки-предшественники люминального эпителия молочной железы выделяют с помощью анализа FACS. Можно использовать любой подходящий способ, известный в данной области, для сортировки эпителиальных клеток молочной железы (например, клеток люминального эпителия), миоэпителиальных клеток, клеток-предшественников и иммунных клеток. Например, клетки молочной железы можно сортировать с помощью маркеров клеточной поверхности CD24, EPCAM и/или CD49f.

В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки идентифицируют и выделяют из первичной ткани слизистой оболочки (например, рото-носовой, желудочно-кишечной, респираторной или молочной железы). В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки идентифицируют и выделяют из образцов первичной ткани молочной железы. В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки выделяют и сортируют посредством активируемой флуоресценцией сортировки клеток, магнитно-активируемой сортировки клеток и/или микроструйного устройства для сортировки клеток. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки сортируют и выделяют с помощью анализа FACS. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки, плазмобласты или преплазмобласты сортируют и выделяют с помощью анализа FACS с использованием маркеров, известных в данной области (например, CD20, CD38, CD138 и/или CD19).

В некоторых вариантах осуществления культивирование и/или выращивание клеток молочной железы и плазматических клеток для клеточной конструкции проводят при температуре приблизительно от 35 до приблизительно 39°C (например, температуре приблизительно 35°C, 35,5°C, 36°C, 36,5°C, 37°C, 37,5°C, 38°C, 38,5°C или приблизительно 39°C, или при любом значении или диапазоне в этих пределах, например, приблизительно от 35 до приблизительно 38°C, приблизительно от 36 до приблизительно 39°C, приблизительно от 36,5 до приблизительно 39°C, приблизительно от 36,5 до приблизительно 37,5°C, или приблизительно от 36,5 до приблизительно 38°C). В некоторых вариантах осуществления культивирование и/или выращивание проводят при температуре приблизительно 37°C.

В некоторых вариантах осуществления культивирование и/или выращивание клеток молочной железы и плазматических клеток для клеточной конструкции проводят при содержании CO₂ в атмосфере приблизительно от 4% до приблизительно 6%, например, при содержании CO₂ в атмосфере приблизительно 4%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5%, 5,25%, 5,5%, 5,75% или 6%, при любом значении или диапазоне в этих пределах, например, приблизительно от 4 до приблизительно 5,5%, приблизительно от 4,5 до приблизительно 6%, приблизительно от 4,5 до приблизительно 5,5%, или приблизительно от 5 до приблизительно 6%). В некоторых вариантах осуществления культивирование и/или выращивание проводят при содержании CO₂ в атмосфере приблизительно.

В некоторых вариантах осуществления культивирование и/или выращивание клеток молочной железы и плазматических клеток для получения клеточной конструкции предусматривает культивирование и/или выращивание в среде для культивирования, которую заменяют приблизительно раз в 1-10 суток (например, каждые сутки, каждые 2 суток, каждые 3 суток, каждые 4 суток, каждые 5 суток, каждые 6 суток, каждые 7 суток, каждые 8 суток, каждые 9 суток, каждые 10 суток, или любое значение или диапа-

зон в этих пределах, например, приблизительно от раза в сутки до приблизительно раза в 3 суток, приблизительно от раза в 3 суток до приблизительно раза в 10 суток, приблизительно от раза в 2 суток до приблизительно раза в 5 суток). В некоторых вариантах осуществления культивирование и/или выращивание дополнительно предусматривает культивирование в среде для культивирования, которую заменяют приблизительно от раза в сутки до приблизительно раза в несколько часов до приблизительно раза в 10 суток, например, приблизительно от раза в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа до приблизительно раза в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 суток, или любое значение или диапазон в этих пределах. Например, в некоторых вариантах осуществления культивирование и/или выращивание предусматривает культивирование и/или выращивание в среде для культивирования, которую заменяют приблизительно от раза в 12 ч до приблизительно раза в 10 суток, приблизительно от раза в 10 ч до приблизительно раза в 5 суток или приблизительно от раза в 5 ч до приблизительно раза в 3 суток.

В некоторых вариантах осуществления клеточную конструкцию хранят в морозильной камере или в жидком азоте. Температура хранения зависит от желаемой продолжительности хранения. Например, можно использовать температуру морозильной камеры (например, хранение при температуре приблизительно от 0 до приблизительно -80°C или менее, например, приблизительно 0°C, -10°C, -20°C, -30°C, -40°C, -50°C, -60°C, -70°C, -80°C, -90°C, -100°C при любом значении или диапазоне в этих пределах), если клетки будут использованы в течение 6 месяцев (например, в течение 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев). Например, жидкий азот можно использовать (например, хранить при температуре -100°C или ниже (например, приблизительно -100°C, -110°C, -120°C, -130°C, -140°C, -150°C, -160°C, -170°C, -180°C, -190°C, -200°C или менее) для более длительного срока хранения (например, хранение 6 месяцев или дольше, например, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или 1, 2, 3, 4, 5, 6 и более лет.

Культивированные молочные продукты

Настоящее изобретение относится к культивированным молочным продуктам, которые содержат белковые, липидные и олигосахаридные компоненты, и концентрации компонентов которых имитируют грудное молоко человека, вырабатываемое кормящей женщиной, причем композиции производятся, по меньшей мере, частично, культивируемыми *in vitro* и/или *ex vivo* клетками молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления можно получать два продукта с определенным составом в зависимости от клеточных входов и условий культивирования: (а) функциональный пищевой продукт, представляющий собой биосинтетический продукт культивируемых эпителиальных клеток молочной железы (иммортизированных или из образцов первичной ткани) и (б) аналогичный продукт, дополнительно содержащий иммуноглобулины, получаемые при совместном культивировании плазматических клеток (ПК) с эпителиальными клетками молочной железы. Плазматические клетки могут быть получены из образца первичной ткани молочной железы или, например, из линии плазматических клеток.

Предлагаемые композиции продуктов по настоящему изобретению могут быть определены по общему уровню белков, липидов и углеводов (табл. 1А-1С) и/или по характеристике конкретных макро-нутриентных компонентов (табл. 2А-2С), присутствующих в концентрациях и пропорциях, соответствующих молоку человека.

Таблица 1А. Макромолекулярный состав функциональных пищевых продуктов, собранных из эпителиальных клеток молочной железы человека, культивированных в присутствии или в отсутствие плазматических клеток

Макромолекулярная фракция	Концентрация, г/л	% масс.	Источник
Белок	3-21 ^a	1-44	ЭКМЖ
Общий иммуноглобулин ^b	0,4-1,8	0,14-3,75	ПК
Липид	9-135	3,1-95+	ЭКМЖ
НМО		1,2-44	
Лактоза	3,5-21	11-95+	ЭКМЖ
Общее содержание макромолекул	32-115 48-293		ЭКМЖ ЭКМЖ ± ПК
Энергия(ккал/л)	375-1725		

НМО, олигосахарид молока человека. ЭКМЖ, эпителиальная клетка молочной железы; ПК, плазматическая клетка.

^a Содержание неиммуноглобулинового белка.

^b Составы без содержания иммуноглобулина можно получать из культуры ЭКМЖ в отсутствие плазматических клеток. Составы с содержанием иммуноглобулина можно получать при совместном культивировании ЭКМЖ с плазматитами.

^c Длинноцепочечные жирные кислоты, линолевая кислота и альфа-линолевая кислота, не синтезируются клетками млекопитающих и их добавляют в среды для культивирования клеток.

Таблица 1В. Макромолекулярный состав функциональных пищевых продуктов, собранных из эпителиальных клеток молочной железы человека, культивированных в присутствии или в отсутствие плазматических клеток

Макромолекулярная фракция	Концентрация, г/л	% масс.	Источник
Белок	4,5-17,5 ^a	1,8-24	ЭКМЖ
Общий иммуноглобулин ^b	0,6-1,5	0,25-2,1	ПК
Липид	13,5-111	5,5-95+	ЭКМЖ
НМО	5,25-17,5	2,2-24	ЭКМЖ
Лактоза	48-96	20-95+	ЭКМЖ
Общее содержание макромолекул	71,9-244		ЭКМЖ ± ПК
Энергия (ккал/л)	375-1438		

НМО, олигосахарид молока человека. ЭКМЖ, эпителиальная клетка молочной железы; ПК, плазматическая клетка.

^a Содержание неиммуноглобулинового белка.

^b Составы без содержания иммуноглобулина можно получать из культуры ЭКМЖ в отсутствие плазматических клеток. Составы с содержанием иммуноглобулина можно получать при совместном культивировании ЭКМЖ с плазматическими клетками.

^c Длинноцепочечные жирные кислоты, линолевая кислота и альфа-линолевая кислота, не синтезируются клетками млекопитающих и их добавляют в среды для культивирования клеток.

Таблица 1С. Макромолекулярный состав функциональных пищевых продуктов, собранных из эпителиальных клеток молочной железы человека, культивированных в присутствии или в отсутствие плазматических клеток

Макромолекулярная фракция	Концентрация, г/л	% масс.	% об.	Источник
Белок	6-14 ^a	3-15	1	ЭКМЖ
Общий иммуноглобулин ^b	0,8-1,2	0,4-1,3	0,1	ПК
Липид	18-89	9-92	4	ЭКМЖ
НМО	7-14	4-15	2,4	ЭКМЖ
Лактоза	64-77	33-80	4,6	ЭКМЖ
Общее содержание макромолекул	95,8-195,2		10-15	ЭКМЖ ± ПК
Энергия (ккал/л)	500-1150			

НМО, олигосахарид молока человека. ЭКМЖ, эпителиальная клетка молочной железы; ПК, плазматическая клетка.

^a Содержание неиммуноглобулинового белка.

^b Составы без содержания иммуноглобулина можно получать из культуры ЭКМЖ в отсутствие плазматических клеток. Составы с содержанием иммуноглобулина можно получать при совместном культивировании ЭКМЖ с плазматическими клетками.

^c Длинноцепочечные жирные кислоты, линолевая кислота и альфа-линолевая кислота, не синтезируются клетками млекопитающих и их добавляют в среды для культивирования клеток.

В некоторых вариантах осуществления концентрации компонентов, указанных в табл. 1А-1С, могут варьироваться у каждого в отдельности, например, иметь концентрацию, которая больше чем указанная в 0,1, или 0,2, или 0,3 раза, или 0,4 раза, или 0,5 раза, или 0,6 раза, или 0,7 раза, или 0,8 раза, или 0,9 раза, или в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз.

В некоторых вариантах осуществления концентрации компонентов, указанных в табл. 1А-1С, могут варьироваться у каждого в отдельности, например, иметь концентрацию, которая меньше указанной в 0,1, или 0,2, или 0,3 раза, или 0,4 раза, или 0,5 раза, или 0,6 раза, или 0,7 раза, или 0,8 раза, или 0,9 раза.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предусматриваются молочные продукты, которые содержат подмножество компонентов (т.е., макромолекулярные фракции) из табл. 1А-1С. В других вариантах осуществления из молочных продуктов, предусматриваемых в настоящем документе, может быть исключен один или несколько компонентов (т.е., макромолекулярных фракций) из табл. 1А-1С.

Таблица 2А. Диапазоны концентраций и содержание макромолекул из функциональных пищевых продуктов, полученных из эпителиальных клеток молочной железы человека, культивированных в присутствии или в отсутствие плазматических клеток

Макромолекулярная фракция	Концентрация, г/л
Белок	
Р-Казеин	0,25-1,9
К-Казеин	0,25-0,9
α -казеин	0,05-0,75
α -лактальбумин	1,35-4,9
Лизоцим	0,2-0,75
Лактоферрин	0,5-3
Гаптокоррин	0,03-1,1
Бутирофилин	0,02-0,075
Остеопонтин	0,025-0,3
Муцин МС5	0,25-0,9
Муцин ВгЕЗ	0,25-1,1
Лактадгерин	0,03-1,1
Имуноглобулины	0,1-3
Секреторный IgA	0,1-1,5
Общий IgA	0,07-2,4
Общий IgG	0,02-0,45
Общий IgM	0,005-0,2
Липиды	
Насыщенные жирные кислоты	2,5-51
Пальмитиновая кислота (C16:0)	2-27
Стеариновая кислота (C18:0)	0,35-7,5
Лауриновая кислота (C12:0)	0,25-7,5
Мононенасыщенные жирные кислоты	3,5-69
Олеиновая кислота (C18:1 n-9 Z)	3,5-68
Полиненасыщенные жирные кислоты	1-30
Линолевая кислота, LA (C18:2 n-6 Z)	1-29
α -линоленовая кислота, ALA (C18:3 n-3)	0,25-1,1
Эйкозодиеновая кислота (C20:2)	0,25-1,1

Арахидоновая кислота, AA (C20:4 n-6)	0,25-1,1
Дигомо-γ-линоленовая кислота, DGLA (C20:3 n-6)	0,15-0,8
Докозагексадиеновая кислота, DHA (C22:6 n-3)	0,01-0,6
Холестерин	0,045-0,22
Фосфолипиды, плазмалогены, сфинголипиды	0,05-0,6
Олисахариды молока человека	
Нейтральные	
TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаоза)	
2'-FL (2'-фукозиллактоза)	0,8-4,8
DF-LNHI (дифукозиллакто-N-гексаоза)	0,8-4,8
LNFP1 (лакто-A-фукопентаоза I)	0,8-4,8
LNDFHI (лакто-N-дифукозилгексаоза I)	0,4-2,4
LNT (лакто-A-тетраоза)	0,16-2,4
LNnT (лакто-A-неотетраоза)	0,23-1,8
DF-L (Дифукозиллактоза)	0,4-1,8
3-FL (3-фукозиллактоза)	0,08-1,2
Кислые	0,16-1,8
6'-SL (6'-сиалиллактоза)	0,16-1,44
DS-LNT (дисиалиллакто-A-тетраоза)	0,04-1,2
FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаоза I)	0,04-0,84
LSTc (сиалил-лакто-A-тетраоза c)	0,04-0,84
3'-SL (3'-сиалиллактоза)	0,08-0,36
Лактоза	34-104

Таблица 2В. Диапазоны концентраций и содержание макромолекул из функциональных пищевых продуктов, полученных из эпителиальных клеток молочной железы человека, культивированных в присутствии или в отсутствие плазматических клеток

Макромолекулярная фракция	Концентрация, г/л
Белок	
В-Казеин	0,38-1,9
К-Казеин	0,38-0,75
α-Казеин	0,08-0,63

α-лактальбумин	2,0-4,13
Лизоцим	0,15-0,63
Лактоферрин	0,8-2,5
Гаптокоррин	0,05-0,89
Бутирофинин	0,02-0,063
Остеопонтин	0,04-0,25
Муцин MC5	0,38-0,75
Муцин BrE3	0,38-0,89
Лактадгерин	0,045-0,09
Иммуноглобулины	0,15-2,5
Секреторный IgA	0,15-1,25
Общий IgA	0,11-2
Общий IgG	0,02-0,38
Общий IgM	0,0075-0,13
Липиды	
Насыщенные жирные кислоты	3,75-43
Пальмитиновая кислота (C16:0)	2,25-23
Стеариновая кислота (C18:0)	0,53-6,3
Лауриновая кислота (C12:0)	0,38-6,3
Мононенасыщенные жирные кислоты	5,25-58
Олеиновая кислота (C18:1 n-9 Z)	5,3-56
Полиненасыщенные жирные кислоты	1,5-25
Линолевая кислота, LA (C18:2 n-6 Z)	1,5-25
α-линоленовая кислота, ALA (C18:3 n-3)	0,38-0,89
Эйкозодиеновая кислота (C20:2)	0,38-0,89
Арахидоновая кислота, AA (C20:4 n-6)	0,38-0,89
Дигомо-γ-линоленовая кислота, DGLA (C20:3 n-6)	0,23-0,63
Докозагексадиеновая кислота, DHA (C22:6 n-3)	0,015-0,5
Холестерин	0,07-0,19
Фосфолипиды, плазмалогены, сфинголипиды	0,075-0,5
Олисахариды молока человека	
Нейтральные	
TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексоза)	0,9-4,4
2'-FL (2'-фукозиллактоза)	0,9-4,4
DF-LNHII (дифукозиллакто-N-гексаоза)	0,9-4,4
LNFP I (лакто-A-фукопентаоза I)	0,45-2,2
LNDFHI (лакто-N-дифукозилгексаоза I)	0,18-2,2
LNT (лакто-A-тетраоза)	0,27-1,7
LNnT (лакто-A-неотетраоза)	0,4-1,7
DF-L (Дифукозиллактоза)	0,09-1,1
3-FL (3-фукозиллактоза)	0,18-1,7
Кислые	
6'-SL (6'-сиалиллактоза)	0,18-1,3
DS-LNT (дисиалиллакто-A-тетраоза)	0,04-1,1
FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаоза I)	0,04-0,8
LSTc (сиалил-лакто-A-тетраоза c)	0,04-0,8
3'-SL (3'-сиалиллактоза)	0,09-0,33
Лактоза	50-98

Таблица 2С. Диапазоны концентраций и содержание макромолекул из функциональных пищевых продуктов, полученных из эпителиальных клеток молочной железы человека, культивированных в присутствии или в отсутствие плазматических клеток

Макромолекулярная фракция	Концентрация, г/л
Белок	
В-Казеин	0,5-1,5
К-Казеин	0,5-0,6
α -казеин	0,1-0,5
α -лактальбумин	2,7-3,3
Лизоцим	0,2-0,5
Лактоферрин	1-2
Гаптокоррин	0,07-0,7
Бутирофилин	0,03-0,05
Остеопонтин	0,05-0,2
Муцин МС5	0,5-0,6
Муцин ВгЕ3	0,5-0,7
Лактадгерин	0,06-0,07
Иммуноглобулины	0,2-2
Секреторный IgA	0,2-1,0
Общий IgA	0,15-1,6
Общий IgG	0,03-0,3
Общий IgM	0,01-0,1
Липиды	
Насыщенные жирные кислоты	5-34
Пальмитиновая кислота (C16:0)	3-18
Стеариновая кислота (C18:0)	0,7-5
Лауриновая кислота (C12:0)	0,5-5
Мононенасыщенные жирные кислоты	7-46
Олеиновая кислота (C18:1 n-9 Z)	7-45
Полиненасыщенные жирные кислоты	2-20
Линолевая кислота, LA (C18:2n-6 Z)	2-19
α -линоленовая кислота, ALA (C18:3 n-3)	0,5-0,7
Эйкозодиеновая кислота (C20:2)	0,5-0,7
Арахидоновая кислота, AA (C20:4 n-6)	0,5-0,7
Дигомо- γ -линоленовая кислота, DGLA (C20:3 n-6)	0,3-0,5
Докозагексадиеновая кислота, DHA (C22:6 n-3)	0,02-0,4
Холестерин	0,09-0,15
Фосфолипиды, плазмалогены, сфинголипиды	0,1-0,4
Олисахариды молока человека	
Нейтральные	
TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексоза)	1-4
2'-FL (2'-фукозиллактоза)	1-4
DF-LNHI (дифукозиллакто-N-гексаоза)	1-4
LNFP1 (лакто-A-фукопентаоза I)	0,5-2

LNDFHI (лакто-N-дифукозилгексаоза I)	0,2-2
LNT (лакто-A-тетраоза)	0,3-1,5
LNT (лакто-A-неотетраоза)	0,5-1,5
DF-L (Дифукозиллактоза)	0,1-1
3-FL (3-фукозиллактоза)	0,2-1,5
Кислые	
6'-SL (6'-сиалиллактоза)	0,2-1,2
DS-LNT (дисиалиллакто-A-тетраоза)	0,05-1
FS-LNT (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаоза I)	0,05-0,7
LSTc (сиалил-лакто-A-тетраоза c)	0,05-0,7
3'-SL (3'-сиалиллактоза)	0,1-0,3
Лактоза	67-78

В некоторых вариантах осуществления концентрации компонентов, указанных в табл. 2А-С, могут варьироваться у каждого в отдельности, например, иметь концентрацию, которая больше чем указанная в 0,1, или 0,2, или 0,3 раза, или 0,4 раза, или 0,5 раза, или 0,6 раза, или 0,7 раза, или 0,8 раза, или 0,9 раза, или в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз.

В некоторых вариантах осуществления концентрации компонентов, указанных в табл. 2А-С, могут варьироваться у каждого в отдельности, например, иметь концентрацию, которая меньше указанной в 0,1, или 0,2, или 0,3 раза, или 0,4 раза, или 0,5 раза, или 0,6 раза, или 0,7 раза, или 0,8 раза, или 0,9 раза.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предусматриваются молочные продукты, которые содержат подмножество компонентов (т.е., макромолекулярные фракции) из табл. 2А-С. В других вариантах осуществления из молочных продуктов, предусматриваемых в настоящем документе, может быть исключен один или несколько компонентов (т.е., макромолекулярных фракций) из табл. 2А-С.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предусматриваются молочные продукты, которые дополнительно содержат сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления сывороточный альбумин может иметь концентрацию приблизительно 0,025-3,5 г/л. В некоторых вариантах осуществления сывороточный альбумин может иметь концентрацию приблизительно 0,01-2 г/л. В некоторых вариантах осуществления сывороточный альбумин может иметь концентрацию приблизительно 0,15-1 г/л, и в некоторых вариантах осуществления сывороточный альбумин может иметь концентрацию приблизительно 0,2-0,7 г/л.

Один из аспектов настоящего раскрытия относится к молочному продукту, содержащему приблизительно 6-14 г на литр (г/л) белковых компонентов, приблизительно 18-89 г/л липидных компонентов, приблизительно 7-14 г/л олисахаридов молока человека. (НМО), приблизительно 64-77 г/л лактозы, где, по меньшей мере, один из белковых компонентов, липидных компонентов, НМО и лактозы вырабатывается культивированными эпителиальными клетками молочной железы человека.

В некоторых вариантах осуществления белковый компонент содержит приблизительно 55-65% сухой массы молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления белковый компонент содержит один или несколько из бета-казеина, каппа-казеина и альфа-казеина, и в некоторых вариантах осуществления бета-казеин может иметь концентрацию приблизительно 0,5-1,5 г/л, каппа-казеин может иметь концентрацию приблизительно 0,5-0,6 г/л и альфа-казеин может иметь концентрацию приблизительно 0,1-0,5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления молочного продукта бета-казеин, каппа-казеин и альфа-казеин вместе составляют приблизительно 35-45% сухой массы белкового компонента. В некоторых вариантах осуществления бета-казеин содержит больше чем приблизительно 50% от общего содержания казеина.

В некоторых вариантах осуществления белковый компонент дополнительно содержит, например, один или несколько из альфа-лактальбумина, лизоцима, лактоферрина, гаптокоррина, бутирофилина, остеопонтина, муцина МС5, муцина ВгЕ3 и лактадгерина. Некоторые варианты осуществления дополнительно содержат сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления молочного продукта альфа-лактальбумин может иметь концентрацию приблизительно 2,7-3,3 г/л и в некоторых вариантах осуществления лизоцим может иметь концентрацию приблизительно 0,2-0,5 г/л, и в некоторых вариантах осуществления лактоферрин может иметь концентрацию приблизительно 1,0-2,0 г/л. В некоторых вариантах осуществления гаптокоррин может иметь концентрацию приблизительно 0,07-0,7 г/л и в некоторых вариантах осуществления бутирофилин может иметь концентрацию приблизительно 0,03-0,05 г/л. В некоторых вариантах осуществления остеопонтин может иметь концентрацию приблизительно 0,05-0,2 г/л и в некоторых вариантах осуществления муцин МС5 может иметь концентрацию приблизительно 0,5-0,6 г/л. В некоторых вариантах осуществления муцин ВгЕ3 может иметь концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л, а в некоторых вариантах осуществления лактадгерин может иметь концентрацию приблизительно 0,06-0,07 г/л. В некоторых вариантах осуществления сывороточный альбумин может

иметь концентрацию приблизительно 0,025-3,5 г/л, или приблизительно 0,01-2 г/л, или приблизительно 0,15-1 г/л, или приблизительно 0,2-0,7 г/л.

В некоторых вариантах осуществления молочного продукта, белковые компоненты имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления липидный компонент содержит один или несколько из насыщенных жирных кислоты мононенасыщенных жирных кислот, полиненасыщенных жирных кислот, холестерина, фосфолипидов, плазмалогенов и сфинголипидов. В некоторых вариантах осуществления молочного продукта насыщенные жирные кислоты могут иметь концентрацию приблизительно 5-34 г/л. Насыщенные жирные кислоты могут содержать, например, одну или несколько из пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты и лауриновой кислоты и их сочетания. В некоторых вариантах осуществления пальмитиновая кислота содержит по меньшей мере приблизительно 50% формы sn-2. В некоторых вариантах осуществления молочного продукта пальмитиновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 3-18 г/л в некоторых вариантах осуществления стеариновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,7-5 г/л, и в некоторых вариантах осуществления лауриновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,5-5 г/л.

В некоторых вариантах осуществления мононенасыщенные жирные кислоты могут иметь концентрацию приблизительно 7-46 г/л в молочном продукте. Компонент насыщенных жирных кислот может содержать, например, олеиновую кислоту, в некоторых вариантах осуществления олеиновая кислота содержит по меньшей мере приблизительно 50% формы sn-1, и в некоторых вариантах осуществления олеиновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 7-45 г/л в молочном продукте.

В некоторых вариантах осуществления молочного продукта, полиненасыщенные жиры могут иметь концентрацию приблизительно 2-20 г/л. Полиненасыщенные жиры могут содержать, например, одну или несколько из линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эйкозодиеновой кислоты, арахидоновой кислоты, дигомо-гамма-линоленовой кислоты и докозагексадиеновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления линолевая кислота содержит по меньшей мере приблизительно 50% формы sn-3, и в некоторых вариантах осуществления линолевая кислота может иметь концентрацию приблизительно 2-19 г/л, и в некоторых вариантах осуществления альфа-линоленовая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л. В некоторых вариантах осуществления эйкозодиеновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л, и в некоторых вариантах осуществления арахидоновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л. В некоторых вариантах осуществления дигомо-гамма-линоленовая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,3-0,5 г/л, и в некоторых вариантах осуществления докозагексадиеновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,02-0,4 г/л. Некоторые варианты осуществления молочного продукта содержат все вышеперечисленные полиненасыщенные жиры, где линолевая кислота может иметь концентрацию приблизительно 2-19 г/л, альфа-линоленовая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л, эйкозодиеновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л, арахидоновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,5-0,7 г/л, дигомо-гамма-линоленовая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,3-0,5 г/л, а докозагексадиеновая кислота может иметь концентрацию приблизительно 0,02-0,4 г/л в молочном продукте.

В некоторых вариантах осуществления холестерин может иметь концентрацию приблизительно 0,09-0,15 г/л в молочном продукте, и в некоторых вариантах осуществления фосфолипиды, плазмалогены, и сфинголипиды вместе могут иметь концентрацию приблизительно 0,1-0,4 г/л в молочном продукте.

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит один или несколько нейтральных олигосахаридов, один или несколько кислых олигосахаридов или один или несколько по отдельности нейтральных олигосахаридов и кислых олигосахаридов.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексозу), 2'-FL (2'-фукозиллактозу), DF-LNHI (дифукозиллакто-N-гексаозу), LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), LNDFI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), LNT (лакто-N-тетраозу), LNnT (лакто-N-неотетраозу), DF-L (дифукозиллактозу) и 3-FL (3-фукозиллактозу).

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат 6'-SL (6'-сиалиллактозу), DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), LSTc (сиалил-лакто-N-тетраозу c) и 3'-SL (3'-сиалиллактозу).

В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 1-4 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат 2'-FL (2'-фукозиллактозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 1-4 г/л в молочном продукте, и в некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат DF-LNHI (дифукозиллакто-N-гексаозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 1-4 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), при этом олигосахарид может иметь концентрацию of приблизительно 0,5-2 г/л в молочном продукте, и в некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосаха-

ридов содержат LNDfHI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,2-2 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат LNT (лакто-N-тетраозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,3-1,5 г/л в молочном продукте, и в некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат LNnT (лакто-N-неотетраозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,5-1,5 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат DF-L (дифукозиллактозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,1-1 г/л в молочном продукте, и в некоторых вариантах осуществления один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат 3-FL (3-фукозиллактозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,2-1,5 г/л в молочном продукте.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат 6'-SL (6'-сиалиллактозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,2-1,2 г/л в молочном продукте, и в некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,05-1 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат FS- LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,05-0,7 г/л в молочном продукте, и в некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат LSTc (сиалил-лакто-N-тетраозу c), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,05-0,7 г/л в молочном продукте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кислых олигосахаридов содержат 3'-SL (3'-сиалиллактозу), при этом олигосахарид может иметь концентрацию приблизительно 0,1-0,3 г/л в молочном продукте.

В некоторых вариантах осуществления молочного продукта один или несколько нейтральных олигосахаридов содержат TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозу), 2'-FL (2'-фукозиллактозу), DF-LNnHI (дифукозиллакто-N-гексаозу), LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), LNDfHI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), LNT (лакто-N-тетраозу), LNnT (лакто-N-неотетраозу), DF-L (дифукозиллактозу) и 3-FL (3-фукозиллактозу) и один или несколько кислых олигосахаридов содержат 6'-SL (6'-сиалиллактозу), DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), LSTc (сиалил-лакто-N-тетраозу c) и 3'-SL (3'-сиалиллактозу).

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 1-4 г/л TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозу), содержит приблизительно 1-4 г/л 2'-FL (2'-фукозиллактозы), содержит приблизительно 1-4 г/л DF-LNnHI (дифукозиллакто-N-гексаозу), содержит приблизительно 0,5-2 г/л LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), содержит приблизительно 0,2-2 г/л LNDfHI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), содержит приблизительно 0,3-1,5 г/л LNT (лакто-N-тетраозу), содержит приблизительно 0,5-1,5 г/л LNnT (лакто-N-неотетраозу), содержит приблизительно 0,1-1 г/л DF-L (дифукозиллактозы), содержит приблизительно 0,2-1,5 г/л 3-FL (3-фукозиллактозы), содержит приблизительно 0,2-1,2 г/л 6'-SL (6'-сиалиллактозы), содержит приблизительно 0,05-1 г/л DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), приблизительно 0,05-0,7 г/л FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), содержит приблизительно 0,05-0,7 г/л LSTc (сиалил-лакто-N-тетраозу C) и содержит приблизительно 0,1-0,3 г/л 3'-SL (3'-сиалиллактозы).

В некоторых вариантах осуществления содержание нейтральных олигосахаридов составляет по меньшей мере приблизительно в 2 раза, или приблизительно в 3 раза, или приблизительно в 4 раза, или приблизительно в 5 раз, или приблизительно в 6 раз, или приблизительно в 7 раз, или приблизительно в 8 раз, или приблизительно в 9 раз, или приблизительно в 10 раз, или приблизительно в 11 раз, или приблизительно в 12 раз, или приблизительно в 13 раз, или приблизительно в 14 раз, или приблизительно в 15 раз больше по массе чем содержание кислых олигосахаридов.

В другом аспекте раскрытия предлагается молочный продукт, содержащий приблизительно 6-14 граммов на литр (г/л) белковых компонентов, приблизительно 18-89 г/л липидных компонентов, приблизительно 7-14 г/л олигосахаридов молока человека (НМО), приблизительно 64-77 г/л лактозы, где белковые компоненты содержат один или несколько из бета-казеина, каппа-казеина, альфа-казеина, альфа-лактальбумина, лизоцима, лактоферрина, гаптокоррина, бутирофилина, остеопонтина, муцина МС5, муцина BrE3 и лактадгерина, где липидные компоненты содержат одну или несколько из пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты и лауриновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эйкозодиеновой кислоты, арахидоновой кислоты, дигомо-гамма-линоленовой кислоты, докозагексадиеновой кислоты, холестерина, фосфолипидов, плазмалогенов и сфинголипидов, где олигосахариды молока человека содержат одну или несколько из TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозу), 2'-FL (2'-фукозиллактозы), DF-LNnHI (дифукозиллакто-N-гексаозу), LNFPI (лакто-N-фукопентаозу I), LNDfHI (лакто-N-дифукозилгексаозу I), LNT (лакто-N-тетраозу), LNnT (лакто-N-неотетраозу), DF-L (дифукозиллактозы) и 3-FL (3-фукозиллактозы), 6'-SL (6'-сиалиллактозы), DS-LNT (дисиалиллакто-N-тетраозу), FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозу I), LSTc (сиалил-лакто-N-тетраозу c) и 3'-SL (3'-сиалиллактозы), и где, по меньшей мере, один из белковых компонентов, липидных компонентов,

НМО и лактозы продуцируется культивируемыми эпителиальными клетками молочной железы человека. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт дополнительно содержит сывороточный альбумин.

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,5-1,5 г/л бета-казеина, содержит приблизительно 0,5-0,6 г/л каппа-казеина, содержит приблизительно 0,1-0,5 г/л альфа-казеина, содержит приблизительно 2,7-3,3 г/л альфа-лактальбумина, содержит приблизительно 0,2-0,5 г/л лизоцима, содержит приблизительно 1,0-2,0 г/л лактоферрина, содержит приблизительно 0,07-0,7 г/л гаптокоррина, содержит приблизительно 0,03-0,05 г/л бутирофилина, содержит приблизительно 0,05-0,2 г/л остеопонтина, содержит приблизительно 0,5-0,6 г/л муцина МС5, содержит приблизительно 0,5-0,7 г/л муцина ВгЕ3, содержит приблизительно 0,06-0,07 г/л лактадгерина, содержит приблизительно 2-19 г/л линолевой кислоты, содержит приблизительно 0,5-0,7 г/л альфа-линоленовой кислоты, приблизительно 0,5-0,7 г/л эйкозодиеновой кислоты, приблизительно 0,5-0,7 г/л арахидоновой кислоты, приблизительно 0,3-0,5 г/л дигомо-гамма-линоленовой кислоты, содержит приблизительно 0,02-0,4 г/л докозагексадиеновой кислоты, содержит приблизительно 0,09-0,15 г/л холестерина, вместе содержит приблизительно 0,1-0,4 г/л фосфолипидов, плазмалогенов и сфинголипидов, содержит приблизительно 1-4 г/л TF-LNH (трифукозиллакто-N-гексаозы), содержит приблизительно 1-4 г/л 2'-FL (2'-фукозиллактозы), содержит приблизительно 1-4 г/л DF-LNHI (дифукозиллакто-N-гексаозы), содержит приблизительно 0,5-2 г/л LNFP I (лакто-N-фукопентаоза I), содержится приблизительно 0,2-2 г/л LNDFHI (лакто-N-дифукозилгексаозы I), содержит приблизительно 0,3-1,5 г/л LNT (лакто-N-тетраозы), содержит приблизительно 0,5-1,5 г/л LNnT (лакто-N-неотетраозы), содержит приблизительно 0,1-1 г/л DF-L (дифукозиллактозы), содержит приблизительно 0,2-1,5 г/л 3-FL (3-фукозиллактозы), содержит приблизительно 0,2-1,2 г/л 6'-SL (6'-сиалиллактозы), содержит приблизительно 0,05-1 г/л DS-LNT (диссиалиллакто-N-тетраозы), содержит приблизительно 0,05-0,7 г/л FS-LNnHI (фукозил-сиалил-лакто-N-неогексаозы I), содержит приблизительно 0,05-0,7 г/л LSTc (сиалил-лакто-N-тетраозы c), и содержит приблизительно 0,1-0,3 г/л 3'-SL (3'-сиалиллактозы). В некоторых вариантах осуществления молочный продукт дополнительно содержит сывороточный альбумин, который имеет концентрацию приблизительно 0,025-3,5 г/л, или приблизительно 0,01-2 г/л, или приблизительно 0,15-1 г/л, или приблизительно 0,3-0,7 г/л.

В другом аспекте раскрытия предлагается молочный продукт, содержащий приблизительно 3-15% белка по массе, приблизительно 9-92% липида по массе, приблизительно 4-15% по массе олисахаридов молока человека (НМО) и приблизительно 33-80% по массе лактозы, где по меньшей мере один из белка, липида, НМО и лактозы продуцируется культивируемыми эпителиальными клетками молочной железы человека.

В некоторых вариантах осуществления некоторых аспектов раскрытия молочный продукт содержит по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% всей макромолекулярной композиции грудного молока человека.

В некоторых вариантах осуществления молочного продукта по раскрытию, содержание небелкового азота составляет по меньшей мере приблизительно 10%, или по меньшей мере приблизительно 15%, или по меньшей мере приблизительно 20%, или по меньшей мере приблизительно 25%, или по меньшей мере приблизительно 30% от общего содержания азота.

В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 500-1150 ккал/л доступной энергии, и в некоторых вариантах осуществления приблизительно 40-55% доступной энергии приходится на липиды. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно от 95,8 до 195,2 г/л макромолекул.

В некоторых вариантах осуществления культивируемый молочный продукт содержит бета-казеин, альфа-лактальбумин, каппа-казеин, альфа-Si-казеин, лактоферрин, лактадгерин, лизоцим, C12:0 (лауриновую кислоту), C14:0 (миристиновую кислоту), C16:0 (пальмитиновую кислоту), лактозу, глюкозу, 3'-SL и 6'-SL.

В некоторых вариантах осуществления культивируемый молочный продукт содержит бета-казеин, альфа-лактальбумин, каппа-казеин, альфа-Si-казеин, лактоферрин, лактадгерин, лизоцим, C12:0 (лауриновую кислоту), C14:0 (миристиновую кислоту), C16:0 (пальмитиновую кислоту), C18:2n-6 (линолевую кислоту, LA), C18:3n-3 (альфа-линоленовую кислоту, ALA), лактозу, глюкозу, 3'-SL и 6'-SL.

В некоторых вариантах осуществления культивируемый молочный продукт содержит бета-казеин, альфа-лактальбумин, каппа-казеин, альфа-Si-казеин, лактоферрин, бутрофилин, остеопонтин, лактадгерин, лизоцим, муцин-4, муцин-1, C8:0 (каприловую кислоту), C10:0 (каприновую кислоту), C12:0 (лауриновую кислоту), C13:0 (тридекановую кислоту), C14:0 (миристиновую кислоту), C16:0 (пальмитиновую кислоту), C16:1 (пальмитолеиновую кислоту), C18:2n-6 (линолевую кислоту, LA), C18:3n-3 (альфа-линоленовую кислоту, ALA), C20:3n-6 (дигомо-гамма-линоленовую кислоту, DGLA), C20:4n-6 (арахидоновую кислоту, AA), C20:5n-3 (эйкозопентановую кислоту, EPA), C22:6n-3 (докозагек-

саеновую кислоту, ДНА), C22:1n9 (эрковую кислоту), C24:1 (нервоновую кислоту), лактозу, глюкозу, 3'-SL, 6'-SL, LNT и LNnT.

В некоторых вариантах осуществления культивированные молочные продукты, описываемые в настоящем документе, дополнительно содержат по меньшей мере один оксипириновый метаболит полиненасыщенной жирной кислоты или по меньшей мере один эндоканнабиноид. В некоторых вариантах осуществления оксипириновый метаболит представляет собой 9-гидроксиоктадекадиеновую кислоту (9-HODE); 13-гидроксиоктадекадиеновую кислоту (13-HODE); 5,15-дигидроксиэйкозатетраеновую кислоту (5,15-DiHETE); 17,18-дигидроксиэйкозатетраеновую кислоту (17,18-DiHETE); 8,9-дигидроксиикозатриеновую кислоту (8,9-DiHETrE); 11,12-дигидроксиикозатриеновую кислоту (11,12-DiHETrE); 9,10-дигидроксиоктадеценую кислоту (9,10-DiHOME); 12,13-дигидроксиоктадеценую кислоту (12,13-DiHOME); 14(15)-эпоксиэйкозатриеновую кислоту (14(15)-EpETrE); 19(20)-эпоксидокозапентановую кислоту (19(20)-EpDPE); 17-гидроксидокозагексаеновую кислоту (17-HDoHE); 5-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (5-HETE); 8-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (8-HETE); 9-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (9-HETE); 11-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (11-HETE); 12-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (12-HETE); 9-гидроксиоктадекатриеновую кислоту (9-HOTrE); 9-оксо-октадекадиеновую кислоту (9-оксо-ODE); или 13-оксо-октадекадиеновую кислоту (13-оксо-ODE); 17,18-эпоксиэйкозатетраеновую кислоту (17(18)-EpETE); 6-кето-простагландин F1-альфа (6-keto-PGF1a); или 15(S)-гидроксиэйкозатриеновую кислоту (15(S)-HETrE). В некоторых вариантах осуществления эндоканнабиноид представляет собой анандамид или 2-арахидоноилглицерин (2-AG).

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт дополнительно содержит консервант, стабилизатор, антиоксидант, эмульгатор или загуститель. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт дополнительно содержит лецитин. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт дополнительно содержит каррагенан. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт дополнительно содержит бета-каротин. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт дополнительно содержит витамин Е. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт дополнительно содержит аскорбилпальмитат или аскорбиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт дополнительно содержит лецитин, аскорбилпальмитат и витамин Е. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт содержит лецитин, аскорбиновую кислоту и витамин Е.

В другом аспекте настоящего раскрытия предлагается упакованный в контейнер молочный продукт, содержащий молочный продукт по определенным вариантам осуществления раскрытия, который упаковывают в контейнер.

В другом аспекте по раскрытию предлагается замороженный молочный продукт, содержащий молочный продукт по определенным вариантам осуществления раскрытия, который был заморожен. В некоторых вариантах осуществления замороженный молочный продукт упаковывают в контейнер, в результате чего получают замороженный молочный продукт в контейнере. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт хранят при температуре приблизительно от -18 до приблизительно -80°C. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт хранят приблизительно при -18°C. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт хранят приблизительно при -20°C. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт хранят приблизительно при -80°C.

В другом аспекте раскрытия предлагается лиофилизированный молочный продукт, содержащий молочный продукт по определенным вариантам осуществления раскрытия, который был лиофилизирован. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный молочный продукт упаковывают в контейнер, в результате чего получают лиофилизированный молочный продукт в контейнере.

В другом аспекте раскрытия предлагается экстрагированный молочный продукт, содержащий один или несколько компонентов, экстрагированных из молочного продукта по определенным вариантам осуществления раскрытия. Неограничивающие примеры компонентов, которые могут быть экстрагированы из молочного продукта, включают белок, липид, углевод, витамин и/или минеральные вещества. В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов, экстрагированных из собранного молочного продукта, лиофилизируют или концентрируют с получением лиофилизованного или концентрированного экстрагированного компонента молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов, экстрагированных из собранного молочного продукта, концентрируют мембранной фильтрацией или обратным осмосом, в то время как в других вариантах осуществления весь неэкстрагированный молочный продукт концентрируют мембранной фильтрацией или обратным осмосом. В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов, экстрагированных из собранного молочного продукта, содержат белки молока, липиды, углеводы, витамины и минералы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько экстрагированных компонентов молочного продукта упаковывают в контейнер, а в некоторых вариантах осуществления концентрированный цельный неэкстрагированный молочный продукт упаковывают в контейнер.

В некоторых вариантах осуществления контейнер является стерильным, запаянным под вакуумом

или классифицируется как пищевой, или любое их сочетание. Неограничивающие примеры контейнеров включают канистру, банку, бутылку, мешок, коробку или пакет. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой канистру, банку, бутылку, мешок, коробку или пакет.

Иммуноглобулины

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт содержит один или несколько иммуноглобулинов или sIgA. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт содержит один или несколько из IgA, IgG и IgM. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт содержит IgA2 (секреторный) и IgA1 (несекреторный). В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки клеточной конструкции продуцируют IgA, а эпителиальные клетки молочной железы обрабатывают IgA с образованием sIgA (IgA2). sIgA содержит секреторный компонент, внеклеточный домен полимерного рецептора Ig, прикрепленный к IgA. Эпителиальные клетки молочной железы обрабатывают IgA путем расщепления внеклеточного домена полимерного рецептора Ig с образованием sIgA. В некоторых вариантах осуществления sIgA секретируется с апикальной поверхности эпителиальных клеток молочной железы.

В определенных вариантах осуществления иммуноглобулины связываются с антигеном микроорганизма (т.е., бактерии или вируса). В определенных вариантах осуществления иммуноглобулины связываются с вирусными или бактериальными антигенами, способными вызывать инфекционное заболевание. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулины связываются с вирусными или бактериальными антигенами, вызывающими инфекции респираторного или желудочно-кишечного эпителия. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулины связываются с антигенами микроорганизмов, вызывающих энтероколит или сепсис у младенцев.

В определенных вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,2-1,0 г/л секреторного IgA. В определенных вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 или 1,0 г/л секреторного IgA. В определенных вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,15-1,6 г/л общего IgA. В определенных вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,0, 1,05, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 1,55 или 1,6 г/л общего IgA.

В некоторых вариантах осуществления, содержащих IgG, молочный продукт содержит приблизительно 0,03-0,3 г/л IgG. В некоторых вариантах осуществления, содержащих IgG, молочный продукт содержит приблизительно 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,3 г/л. В некоторых вариантах осуществления, содержащих IgM, молочный продукт содержит приблизительно 0,01-0,1 г/л IgM. В определенных вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,1 г/л IgM. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит приблизительно 0,2-2,0 процента общего иммуноглобулина по массе. В некоторых вариантах осуществления молочный продукт содержит 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0 процента по массе общего иммуноглобулина.

В настоящий документ включены иммуноотерапевтические композиции, содержащие (a) IgA и sIgA, полученные из секретируемых продуктов эпителиальных клеток молочной железы, совместно культивируемых с плазматическими клетками, и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления IgA и sIgA выделяют из продукта, полученного в результате совместного культивирования эпителиальных клеток молочной железы и плазматических клеток (например, культивированного молочного продукта). В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой стабилизатор, поверхностно-активное вещество, буфер или средство придания тоничности. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит, гистидин, аргинин, глицин, полисорбат 20, полисорбат 80, полксамер 188, эдетовую кислоту/или ее соли (например, ЭДТА), глутатион, метакрезол, фенол, бензиловый спирт, хлорид бензалкония, метионин или цистеин.

В некоторых вариантах осуществления IgA продуцируется плазматическими клетками в клеточной конструкции. IgA связывается с рецептором (полимерным рецептором Ig) на базальной поверхности эпителиальных клеток молочной железы. IgA и рецепторы транспортируются в эпителиальные клетки молочной железы. Клетки молочной железы обрабатывают IgA. Внеклеточный домен рецептора, связанный с IgA (секреторный компонент), расщепляется протеиназой внутри эпителиальных клеток молочной железы, и IgA, связанный с секреторным компонентом, секретируется с апикальной поверхности эпителиальных клеток молочной железы с образованием sIgA. В некоторых вариантах осуществления sIgA секретируется в составе культивированного молочного продукта с апикальной поверхности клеток молочной железы в апикальное отделение. В некоторых вариантах осуществления sIgA выделяют из культивированного молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления sIgA не выделяют из культивированного молочного продукта.

Основные среды для культивирования и лактогенные среды

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит источник углерода,

химическую буферную систему, одну или несколько незаменимых аминокислот, один или несколько витаминов и/или кофакторов и одну или несколько неорганических солей. В некоторых вариантах осуществления источник углерода, химическая буферная система, одна или несколько незаменимых аминокислот, один или несколько витаминов и/или кофакторов, и/или одна или несколько неорганических солей являются пищевыми.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования представляет собой лактогенную среду для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования дополнительно содержит пролактин (например, пролактин млекопитающего, например, пролактин человека), линолевую и альфа-линолевую кислоту, эстроген и/или прогестерон. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пролактин (или пролактин добавляют) в количестве приблизительно от 20 до приблизительно 200 нг/л среды для культивирования, например, приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 нг/мл или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пролактин (или пролактин добавляют) в количестве приблизительно от 20 до приблизительно 195 нг/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 150 нг/мл, приблизительно от 25 до приблизительно 175 нг/мл, приблизительно от 45 до приблизительно 200 нг/мл, или приблизительно от 75 до приблизительно 190 нг/мл среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования дополнительно содержит другие факторы для улучшения эффективности, включая в качестве неограничивающих примеров, инсулин, эпидермальный фактор роста и/или гидрокортизон.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит источник углерода в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 15 г/л среды для культивирования (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 г/л или любое значение или диапазон в этих пределах), или приблизительно от 1, 2, 3, 4, 5 или 6 г/л до приблизительно 7, 8, 9 или 10, 11, 12, 13, 14 или 15 г/л среды для культивирования. Неограничивающие примеры источника углерода включают глюкозу и/или пируват. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит глюкозу в количестве приблизительно от 1 г/л до приблизительно 12 г/л среды для культивирования, например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 г/л, или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит глюкозу в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 6 г/л, приблизительно от 4 до приблизительно 12 г/л, приблизительно от 2,5 до приблизительно 10,5 г/л, приблизительно от 1,5 до приблизительно 11,5 г/л, или приблизительно от 2 до приблизительно 10 г/л среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит глюкозу в количестве приблизительно от 1, 2, 3 или 4 г/л до приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 г/л или приблизительно от 1, 2, 3, 4, 5 или 6 г/л до приблизительно 7, 8, 9, 10, 11 или 12 г/л. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пируват в количестве приблизительно от 5 до приблизительно 15 г/л среды для культивирования, например, приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 г/л или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пируват в количестве приблизительно от 5 до приблизительно 14,5 г/л, приблизительно от 10 до приблизительно 15 г/л, приблизительно от 7,5 до приблизительно 10,5 г/л, приблизительно от 5,5 до приблизительно 14,5 г/л или приблизительно от 8 до приблизительно 10 г/л среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пируват в количестве приблизительно от 5, 6, 7 или 8 г/л до приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 г/л или приблизительно от 5, 6, 7, 8, 9 или 10 г/л до приблизительно 11, 12, 13, 14 или 15 г/л.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит химическую буферную систему в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 4 г/л (например, приблизительно 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 г/л или любое значение или диапазон в этих пределах) среды для культивирования или приблизительно от 10 до приблизительно 25 мМ (например, приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах). В некоторых вариантах осуществления химическая буферная система в качестве неограничивающих примеров включает бикарбонат натрия и/или 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES). Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит бикарбонат натрия в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 4 г/л среды для культивирования, например, приблизительно 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 г/л или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит бикарбонат натрия в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 3,75 г/л, приблизительно от 1,25 до приблизительно 4 г/л, приблизительно от 2,5 до приблизительно 3 г/л, приблизительно от 1,5 до приблизительно 4 г/л, или приблизительно от 2 до приблизительно 3,5 г/л среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит HEPES в количестве приблизительно от 10 до приблизительно 25 мМ, например, приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит HEPES в количестве приблизительно от 11 до приблизительно 25 мМ, приблизи-

тельно от 10 до приблизительно 20 мМ, приблизительно от 12,5 до приблизительно 22,5 мМ, приблизительно от 15 до приблизительно 20,75 мМ, или приблизительно от 10 до приблизительно 20 мМ.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит одну или несколько незаменимых аминокислот в количестве приблизительно от 0,5 до приблизительно 5 мМ (например, приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах) или приблизительно от 0,5, 1, 1,5, 2 мМ до приблизительно 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько незаменимых аминокислот представляет собой гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин и/или аргинин. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит аргинин в количестве приблизительно от 0,5 до приблизительно 5 мМ, например, приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит незаменимые аминокислоты в количестве приблизительно от 0,5 до приблизительно 4,75 мМ, приблизительно от 2 до приблизительно 3,5 мМ, приблизительно от 0,5 до приблизительно 3,5 мМ, приблизительно от 1 до приблизительно 5 мМ, или приблизительно от 3,5 до приблизительно 5 мМ.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит один или несколько витаминов и/или кофакторов в количестве приблизительно от 0,01 до приблизительно 50 мкМ (например, приблизительно 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 или 50 мкМ или любое значение или диапазон в этих пределах) или приблизительно от 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 или 0,9 мкМ до приблизительно 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 мкМ или приблизительно от 0,02, 0,025, 0,05, 0,075, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мкМ до приблизительно 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49,025, 49,05, 49,075 или 50 мкМ. В некоторых вариантах осуществления один или несколько витаминов и/или кофакторов в качестве неограничивающих примеров включают тиамин и/или рибофлавин. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит тиамин в количестве приблизительно от 0,025 до приблизительно 50 мкМ, например, приблизительно 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 или 50 мкМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит тиамин в количестве приблизительно от 0,025 мкМ до приблизительно 45,075 мкМ, приблизительно от 1 мкМ до приблизительно 40 мкМ, приблизительно от 5 мкМ до приблизительно 35,075 мкМ, приблизительно от 10 мкМ до приблизительно 50 мкМ, или приблизительно от 0,05 мкМ до приблизительно 45,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит рибофлавин в количестве приблизительно от 0,01 мкМ до приблизительно 3 мкМ, например, приблизительно 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 или 3 мкМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит рибофлавин в количестве приблизительно от 0,01 до приблизительно 2,05 мкМ, приблизительно от 1 до приблизительно 2,95 мкМ, приблизительно от 0,05 до приблизительно 3 мкМ, приблизительно от 0,08 до приблизительно 1,55 мкМ, или приблизительно от 0,05 до приблизительно 2,9 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит одну или несколько неорганических солей в количестве приблизительно от 100 до приблизительно 150 мг/л среды для культивирования (например, приблизительно 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 мг/л или любое значение или диапазон в этих пределах) или приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 150 мг/л среды для культивирования (например, приблизительно 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 мг/л или любое значение или диапазон в этих пределах). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько неорганических солей в качестве неограничивающих примеров включают кальций и/или магний. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит кальций в количестве приблизительно от 100 до приблизительно 150 мг/л среды для культивирования, например приблизительно 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 мг/л или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит аргинин в количестве приблизительно от 100 до приблизительно 125 мг/л, приблизительно от 105 до приблизительно 150 мг/л, приблизительно от 120 до приблизительно 130 мг/л, или приблизительно от 100 до приблизительно 145 мг/л среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит магний в количестве приблизительно от 0,01 мМ до приблизительно 1 мМ, например, приблизительно 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 или 1 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит магний в количестве приблизительно от 0,05 мМ до приблизительно 1 мМ, приблизительно от 0,01 мМ до приблизительно 0,78 мМ, приблизительно от 0,5 мМ до приблизительно 1 мМ, приблизительно от 0,03 мМ до приблизительно 0,75 мМ, или приблизительно от 0,25 мМ до приблизительно 0,95 мМ.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит источник углерода в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 15 г/л среды для культивирования (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 г/л или любое значение или диапазон в этих пределах), или приблизительно от 1, 2, 3, 4, 5 или 6 г/л до приблизительно 7, 8, 9 или 10, 11, 12, 13, 14 или 15 г/л среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления источник углерода в качестве неограничивающих примеров включает глюкозу и/или пируват. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит глюкозу в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 12 г/л среды для культивирования, например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 г/л или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит глюкозу в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 6 г/л, приблизительно от 4 до приблизительно 12 г/л, приблизительно от 2,5 до приблизительно 10,5 г/л, приблизительно от 1,5 до приблизительно 11,5 г/л, или приблизительно от 2 до приблизительно 10 г/л среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пируват в количестве приблизительно от 5 до приблизительно 15 г/л среды для культивирования, например приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 г/л или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пируват в количестве приблизительно от 5 до приблизительно 14,5 г/л, приблизительно от 10 до приблизительно 15 г/л, приблизительно от 7,5 до приблизительно 10,5 г/л, приблизительно от 5,5 до приблизительно 14,5 г/л или приблизительно от 8 до приблизительно 10 г/л среды для культивирования.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит химическую буферную систему в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 4 г/л (например, приблизительно 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 г/л или любое значение или диапазон в этих пределах) среды для культивирования или приблизительно от 10 до приблизительно 25 мМ (например, приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах). В некоторых вариантах осуществления химическая буферная система в качестве неограничивающих примеров включает бикарбонат натрия и/или HEPES. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит бикарбонат натрия в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 4 г/л среды для культивирования, например приблизительно 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 г/л или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит бикарбонат натрия в количестве приблизительно от 1 до приблизительно 3,75 г/л, приблизительно от 1,25 до приблизительно 4 г/л, приблизительно от 2,5 до приблизительно 3 г/л, приблизительно от 1,5 до приблизительно 4 г/л, или приблизительно от 2 до приблизительно 3,5 г/л среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит HEPES в количестве приблизительно от 10 до приблизительно 25 мМ, например приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит HEPES в количестве приблизительно от 1 мМ до приблизительно 25 мМ, приблизительно от 10 мМ до приблизительно 20 мМ, приблизительно от 12,5 мМ до приблизительно 22,5 мМ, приблизительно от 15 мМ до приблизительно 20,75 мМ, или приблизительно от 10 мМ до приблизительно 20 мМ.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит одну или несколько незаменимых аминокислот в количестве приблизительно от 0,5 до приблизительно 5 мМ (например, приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах) или приблизительно от 0,5, 1, 1,5, 2 мМ до приблизительно 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько незаменимых аминокислот представляет собой аргинин и/или цистеин. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит аргинин в количестве приблизительно от 0,5 до приблизительно 5 мМ, например приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит аргинин в количестве приблизительно от 0,5 мМ до приблизительно 4,75 мМ, приблизительно от 2 мМ до приблизительно 3,5 мМ, приблизительно от 0,5 мМ до приблизительно 3,5 мМ, приблизительно от 1 мМ до приблизительно 5 мМ, или приблизительно от 3,5 мМ до приблизительно 5 мМ. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит цистеин в количестве приблизительно от 0,5 мМ до приблизительно 5 мМ, например, приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит цистеин в количестве приблизительно от 0,5 мМ до приблизительно 4,75 мМ, приблизительно от 2 мМ до приблизительно 3,5 мМ, приблизительно от 0,5 мМ до приблизительно 3,5 мМ, приблизительно от 1 мМ до приблизительно 5 мМ, или приблизительно от 3,5 мМ до приблизительно 5 мМ.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит один или несколько витаминов и/или кофакторов в количестве приблизительно от 0,01 до приблизительно 50 мкМ (например, приблизительно 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 или 50 мкМ или любое значение или диапазон в этих пре-

делах) или приблизительно 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 или 0,9 мкМ до приблизительно 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 мкМ или приблизительно 0,02, 0,025, 0,05, 0,075, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мкМ до приблизительно 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49,025, 49,05, 49,075 или 50 мкМ. В некоторых вариантах осуществления один или несколько витаминов и/или кофакторов в качестве неограничивающих примеров включает тиамин и/или рибофлавин. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит тиамин в количестве приблизительно от 0,025 до приблизительно 50 мкМ, например 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 или 50 мкМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит тиамин в количестве приблизительно от 0,025 до приблизительно 45,075 мкМ, приблизительно от 1 до приблизительно 40 мкМ, приблизительно от 5 до приблизительно 35,075 мкМ, приблизительно от 10 до приблизительно 50 мкМ или приблизительно от 0,05 до приблизительно 45,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит рибофлавин в количестве приблизительно от 0,01 до приблизительно 3 мкМ, например 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 или 3 мкМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит рибофлавин в количестве приблизительно от 0,01 до приблизительно 2,05 мкМ, приблизительно от 1 до приблизительно 2,95 мкМ, приблизительно от 0,05 до приблизительно 3 мкМ, приблизительно от 0,08 до приблизительно 1,55 мкМ или приблизительно от 0,05 до приблизительно 2,9 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит одну или несколько неорганических солей в количестве приблизительно от 100 до приблизительно 150 мг/л среды для культивирования (например, приблизительно 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 мг/л или любое значение или диапазон в этих пределах) или приблизительно от 100 до приблизительно 150 мг/л среды для культивирования (например, приблизительно 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 мг/л или любое значение или диапазон в этих пределах). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько иллюстративных неорганических солей представляет собой кальций и/или магний. Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит кальций в количестве приблизительно от 100 до приблизительно 150 мг/л среды для культивирования, например приблизительно 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 мг/л или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит аргинин в количестве приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 125 мг/л, приблизительно от 105 мг/л до приблизительно 150 мг/л, приблизительно от 120 мг/л до приблизительно 130 мг/л, или приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 145 мг/л среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит магний в количестве приблизительно от 0,01 до приблизительно 1 мМ, например приблизительно 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 или 1 мМ или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит магний в количестве приблизительно от 0,05 мМ до приблизительно 1 мМ, приблизительно от 0,01 мМ до приблизительно 0,78 мМ, приблизительно от 0,5 мМ до приблизительно 1 мМ, приблизительно от 0,03 мМ до приблизительно 0,75 мМ или приблизительно от 0,25 мМ до приблизительно 0,95 мМ.

В некоторых вариантах осуществления источник углерода, химическая буферная система, одна или несколько незаменимых аминокислот, один или несколько витаминов и/или кофакторов и/или одна или несколько неорганических солей являются пищевыми.

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования представляет собой лактогенную среду для культивирования, например, среда для культивирования дополнительно содержит пролактин (например, пролактин млекопитающего, например, пролактин человека). Например, в некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пролактин (или пролактин добавляют) в количестве приблизительно от 20 до приблизительно 200 нг/л среды для культивирования, например приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 нг/мл или любое значение или диапазон в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит пролактин (или пролактин добавляют) в количестве приблизительно от 20 до приблизительно 195 нг/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 150 нг/мл, приблизительно от 25 до приблизительно 175 нг/мл, приблизительно от 45 до приблизительно 200 нг/мл, или приблизительно от 75 до приблизительно 190 нг/мл среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно предусматривают добавление пролактина к среде для культивирования, тем самым обеспечивая лактогенную среду для культивирования. В некоторых вариантах осуществления пролактин продуцируется микробной клеткой и/или клеткой человека, экспрессирующей рекомбинантный пролактин (например, пролактин, содержащий замену серина в положении 179 гена пролактина на аспаратат (S179D), например, S179D-пролактин). В некоторых вариантах осуществления добавление пролактина в среду для культивирования предусматривает кондиционированную среду для культивирования путем культивирования клеток, экспрессирующих и секретирующих пролактин, и нанесения кондицио-

ванной среды для культивирования, содержащей пролактин, на базальную поверхность монослоя клеток молочной железы (например, эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы).

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования дополнительно содержит другие факторы для улучшения эффективности, включая в качестве неограничивающих примеров, инсулин, эпидермальный фактор роста и/или гидрокортизон. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно предусматривают добавление других факторов (например, инсулина, эпидермального фактора роста и/или гидрокортизона) к среде для культивирования, например, для улучшения эффективности.

Способы производства культивированных молочных продуктов

В настоящем документе предлагаются способы производства культивированного молочного продукта, представляющего результат биосинтеза культивированных эпителиальных клеток молочной железы (ЭКМЖ) и плазматических клеток.

В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает культивирование клеточной конструкции, содержащей плазматическую клетку и клетки молочной железы, описываемые в настоящем документе, в биореакторе, содержащем базальное отделение и апикальное отделение, где базальное отделение содержит среды для культивирования, и плазматические клетки и клетки молочной железы секретируют культивированный молочный продукт, содержащий иммуноглобулины, в апикальное отделение.

В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает: (а) выделение эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток и/или клеток-предшественников молочной железы из эксплантатов молочной железы из ткани молочной железы (например, ткань молочной железы, вымени, соска), образца биопсии или сырого молока для получения выделенных эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы; (b) выделение плазматических клеток из ткани молочной железы, образца биопсии или сырого молока для получения выделенных первичных плазматических клеток; (с) культивирование выделенных эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы; (d) культивирование выделенных первичных плазматических клеток; (е) размещение культивированных выделенных эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы и выделенных первичных плазматических клеток на каркасе, имеющем верхнюю поверхность и нижнюю поверхность, для получения смешанной популяции первичных плазматических клеток на каркасе и эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы, где плазматические клетки находятся под эпителиальными клетками молочной железы, миоэпителиальными клетками молочной железы и клетками-предшественниками молочной железы; (f) культивирование смешанной популяции из (е) на каркасе для получения монослоя поляризованных клеток молочной железы для получения монослоя поляризованных первичных эпителиальных клеток молочной железы, расположенных вплотную и над плазматическими клетками, где плазматические клетки расположены вплотную и над верхней поверхностью каркаса, где верхняя поверхность расположена вплотную и над нижней поверхностью каркаса, и где поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность, и где поляризованный монослой содержит апикальную поверхность и базальную поверхность, тем самым создавая клеточную конструкцию для получения культивированного молочного продукта, содержащего иммуноглобулины.

В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает: а) выделение эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток и/или клеток-предшественников молочной железы из эксплантатов молочной железы из ткани молочной железы (например, ткань молочной железы, вымени, соска), образца биопсии или сырого молока для получения выделенных эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы; (b) выделение плазматических клеток из ткани молочной железы, образца биопсии или сырого молока для получения выделенных первичных плазматических клеток; (с) культивирование выделенных эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы для получения смешанной популяции первичных эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы; (d) культивирование выделенных первичных плазматических клеток; (е) сортировку смешанной популяции эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клеток-предшественников молочной железы (например, отбор первичных эпителиальных клеток молочной железы) для получения популяции первичных эпителиальных клеток молочной железы; и (f) размещение отсортированной популяции первичных эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток и/или клеток-предшественников молочной железы и выделенных первичных плазматических клеток на каркасе, имеющем верхнюю поверхность и нижнюю поверхность, (g) культивирование отсортированной популяции эпителиальных клеток молочной железы и плазматических клеток на каркасе для получения монослоя поляризованных первичных эпителиальных клеток молочной железы, расположенных вплотную и над плазматическими клетками, где плазматические клетки распо-

ложены вплотную и над верхней поверхностью каркаса, где верхняя поверхность расположена вплотную и над нижней поверхностью каркаса, и где поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность, и где поляризованный монослой содержит апикальную поверхность и базальную поверхность, тем самым создавая клеточную конструкцию для получения культивированного молочного продукта, содержащего иммуноглобулины.

В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает (а) культивирование иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы для получения повышенного количества иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы; и (б) культивирование плазматических клеток для получения увеличенного количества плазматических клеток; (в) культивирование иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы и плазматических клеток (а) и (б) на каркасе, который имеет верхнюю поверхность и нижнюю поверхность, для получения монослоя поляризованных иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы над плазматическими клетками на верхней поверхности каркаса, где поляризованный монослой имеет апикальную поверхность и базальную поверхность, тем самым образуя клеточную конструкцию для получения культивированного молочного продукта, содержащего иммуноглобулины.

В определенных вариантах осуществления плазматические клетки добавляют к культуре иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки культивируют с иммортализованными эпителиальными клетками молочной железы на каркасе, в результате чего получают культивированный молочный продукт с секреторными продуктами иммунных клеток и клеток молочной железы (например, sIgA). В определенных вариантах осуществления выделенные клетки молочной железы иммортализованы перед совместным культивированием клеток с плазматическими клетками.

Плазматические клетки можно получать из образца первичной ткани молочной железы или, например, из линии плазматических клеток. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки стимулируют выработку иммуноглобулинов при совместном культивировании. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки продуцируют IgA. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки продуцируют секреторный IgA. В возможных вариантах осуществления один или несколько классов иммуноглобулинов включают секреторный IgA (sIgA). В определенных вариантах осуществления иммуноглобулины связываются с антигеном микроорганизма (т.е., бактерии или вируса). В определенных вариантах осуществления иммуноглобулины связываются с вирусными или бактериальными антигенами, способными вызывать инфекционное заболевание у людей. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулины связываются с вирусными или бактериальными антигенами, вызывающими инфекции респираторного или желудочно-кишечного эпителия. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулины связываются с антигенами микроорганизмов, вызывающих энтероколит или сепсис у младенцев. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки культивируют совместно с ЭКМЖ в биореакторе способами, описываемыми в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления биореактор представляет собой биореактор с полыми волокнами, описываемый в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления клетки молочной железы модифицированы и/или стимулированы пролактином способами, описываемыми в настоящем документе, для стимуляции и оптимизации молочной продуктивности. В определенных вариантах осуществления клетки молочной железы модифицированы для экспрессии конститутивно активного рецептора пролактина.

В определенных вариантах осуществления популяции эпителиальных клеток молочной железы идентифицируют и выделяют из первичной ткани молочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки молочной железы выделяют и сортируют посредством активируемой флуоресценцией сортировки клеток, магнитно-активируемой сортировки клеток и/или микроструйного устройства для сортировки клеток. В определенных вариантах осуществления миоэпителиальные клетки молочной железы и люминальные эпителиальные клетки молочной железы выделяют с помощью анализа FACS. В определенных вариантах осуществления клетки-предшественники миоэпителиальных клеток молочной железы и/или клетки-предшественники люминальных эпителиальных клеток молочной железы выделяют с помощью анализа FACS. Можно использовать любой подходящий способ, известный в данной области, для сортировки эпителиальных клеток молочной железы (например, люминальных эпителиальных клеток), миоэпителиальных клеток, клеток-предшественников и иммунных клеток. Например, клетки молочной железы можно сортировать с использованием маркеров клеточной поверхности CD24, EPСAM и/или CD49f.

В некоторых вариантах осуществления плазматические клетки выделяют и сортируют посредством активируемой флуоресценцией сортировки клеток, магнитно-активируемой сортировки клеток и/или микроструйного устройства для сортировки клеток. В определенных вариантах осуществления плазматические клетки сортируют путем анализа FACS с использованием маркеров, известных в данной области для идентификации плазматических клеток. В определенном варианте осуществления плазматические клетки, плазмобласты или преплазмобласты сортируют и выделяют с помощью анализа FACS с использованием маркеров, известных в данной области (например, CD20, CD38, CD138 и/или CD19).

В некоторых вариантах осуществления клеточная конструкция содержит каркас, содержащий верхнюю поверхность и нижнюю поверхность и непрерывный монослой поляризованных эпителиальных клеток молочной железы, непрерывный монослой поляризованной смешанной популяции эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы и/или непрерывный монослой поляризованных иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы, где непрерывный монослой расположен на верхней поверхности каркаса.

В некоторых вариантах осуществления нижняя поверхность каркаса прилегает к базальному отделению. В некоторых вариантах осуществления апикальная поверхность непрерывного монослоя прилегает к апикальному отделению. В некоторых вариантах осуществления непрерывный монослой выделяет молоко и sIgA или IgA через свою апикальную поверхность в апикальное отделение, в результате чего образуется молоко, содержащее IgA и/или sIgA в культуре.

В некоторых вариантах осуществления монослой клеток молочной железы образует барьер, который разделяет апикальное отделение и базальное отделение, где базальная поверхность клетки молочной железы прикреплена к каркасу, а апикальная поверхность ориентирована в сторону апикального отделения.

В некоторых вариантах осуществления базальное отделение прилегает к нижней поверхности каркаса. В некоторых вариантах осуществления базальное отделение содержит среду для культивирования, находящуюся в жидкостном контакте с базальной поверхностью монослоя эпителиальных клеток молочной железы (например, поляризованного монослоя эпителиальных клеток молочной железы, поляризованного монослоя смешанной популяции клеток молочной железы или поляризованного монослоя иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы).

В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит источник углерода, химическую буферную систему, одну или несколько незаменимых аминокислот, один или несколько витаминов и/или кофакторов, и одну или несколько неорганических солей.

В некоторых вариантах осуществления биореактор содержит апикальное отделение, примыкающее к апикальной поверхности монослоя. В некоторых вариантах осуществления апикальное отделение прилегает к верхней поверхности каркаса.

В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет, по меньшей мере, 10^{11} клеток молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет по меньшей мере 10^{12} клеток молочной железы. В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет по меньшей мере 10^{13} клеток молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет приблизительно от 20 до 55 клеток на 100 мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет приблизительно 20 клеток на 100 мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет 25 клеток на 100 мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет приблизительно 30 клеток на 100 мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет приблизительно 35 клеток на 100 мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет приблизительно 40 клеток на 100 мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет приблизительно 45 клеток на 100 мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет приблизительно 50 клеток на 100 мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет приблизительно 55 клеток на 100 мкм^2 .

В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность плазматических клеток в биореакторе составляет приблизительно от 200 до 500 плазматических клеток на мм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность плазматических клеток в биореакторе составляет приблизительно 200 плазматических клеток на мм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность плазматических клеток в биореакторе составляет приблизительно 300 плазматических клеток на мм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность плазматических клеток в биореакторе составляет приблизительно 400 плазматических клеток на мм^2 . В некоторых вариантах осуществления общая клеточная плотность плазматических клеток в биореакторе составляет приблизительно 500 плазматических клеток на мм^2 .

В некоторых вариантах осуществления общая площадь поверхности клеток молочной железы в биореакторе составляет, по меньшей мере, приблизительно $1,5 \text{ м}^2$. В некоторых вариантах осуществления общая площадь поверхности клеток молочной железы в биореакторе составляет, по меньшей мере, приблизительно 2 м^2 . В некоторых вариантах осуществления общая площадь поверхности клеток молочной железы в биореакторе составляет, по меньшей мере, приблизительно $2,5 \text{ м}^2$. В некоторых вариантах осуществления общая площадь поверхности клеток молочной железы в биореакторе составляет по

В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает мониторинг концентрации глюкозы и/или скорости потребления глюкозы в среде для культивирования и/или в лактогенной среде для культивирования. В некоторых вариантах осуществления пролактин добавляют, когда скорость потребления глюкозы в среде для культивирования находится в равновесном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает применение трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) для измерения поддержания монослоя эпителиальных клеток. TEER измеряет разность потенциалов между жидкостями (например, средами) в двух отделениях (например, между апикальным и базальным отделениями), где, если барьер между отсеками теряет целостность, жидкости в двух отсеках могут смешиваться. При перемешивании жидкости разница в напряжении будет уменьшена или устранена; разница в напряжении указывает на то, что барьер интактен. В некоторых вариантах осуществления при обнаружении потери напряжения с помощью TEER картридж (например, фильтр Transwell®, микроструктурированный биореактор, децеллюляризованная ткань, половолоконный биореактор и т.д.) повторно засеивают дополнительными клетками и дают время для восстановления барьера (например, монослоя) перед возобновлением производства культивированного молочного продукта (например, производства молока).

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает сбор культивированного молочного продукта из апикального отделения для получения собранного культивированного молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления сбор осуществляется через порт, под действием силы тяжести и/или через вакуум. В некоторых вариантах осуществления к порту присоединен вакуум.

В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает замораживание собранного культивированного молочного продукта для получения замороженного культивированного молочного продукта и/или лиофилизацию собранного культивированного молочного продукта для получения лиофилизированного культивированного молочного продукта.

В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает упаковку собранного культивированного молочного продукта, замороженного культивированного молочного продукта и/или лиофилизированного культивированного молочного продукта в контейнер.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает экстракцию одного или нескольких компонентов из собранного культивированного молочного продукта. Неограничивающие примеры компонентов из собранного культивированного молочного продукта включают белок молока, липид, углевод, витамин и/или минеральные вещества. В некоторых вариантах осуществления компоненты из собранного культивированного молочного продукта лиофилизируют и/или концентрируют для получения лиофилизированного или концентрированного компонента культивированного молочного продукта. В некоторых вариантах осуществления компоненты из собранного культивированного молочного продукта концентрируют, например, с помощью мембранной фильтрации и/или обратного осмоса. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный или концентрированный компонент культивированного молочного продукта упаковывают в контейнер, необязательно, где контейнер является стерильным и/или пищевым контейнером. В некоторых вариантах осуществления контейнер герметичен. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой канистру, банку, бутылку, мешок, коробку или пакет. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт представляет собой стандартизированный, стерильный культивированный молочный продукт. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт предназначен для употребления в пищу.

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт производят любым способом, описываемым в настоящем документе.

Исключенные компоненты

В силу того факта, что культивированные молочные продукты, производимые способами, описываемыми в настоящем документе, вырабатываются вне организма человека, культивированные молочные продукты не содержат или по существу не содержат определенных компонентов, обнаруженных в природном грудном молоке. В некоторых случаях компоненты являются вредными (например, загрязнители окружающей среды и аллергены), а в других случаях природные компоненты просто присутствуют из-за естественного производства природного молока. Кроме того, дизайн живой клеточной конструкции и биореактора позволяет производить культивированные молочные продукты, описываемые в настоящем документе, которые свободны или по существу свободны от сред для культивирования клеток и их компонентов.

Среды для культивирования клеток

Определенные компоненты сред для культивирования клеток могут переходить в культивированный молочный продукт. Например, сывороточный альбумин, линолевая кислота и альфа-линоленовая кислота могут активно секретироваться чЭКМЖ в апикальное отделение с компонентами культивированного молочного продукта, продуцируемого чЭКМЖ. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит приблизительно от 1% мас./мас., приблизительно до 20% компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта,

раскрытого в настоящем документе, содержит приблизительно от 5% мас./мас., приблизительно до 10% компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит приблизительно 5% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит приблизительно от 20% мас./мас., до приблизительно 40% компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит приблизительно от 25% мас./мас., до приблизительно 35% компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит приблизительно от 25% мас./мас., до приблизительно 30% компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит приблизительно 25% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа.

В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 80% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 85% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 90% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 95% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 97% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 98% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 99% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой более 150 кДа.

В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 60% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 65% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 70% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 75% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 77% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 78% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 79% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления общая сухая масса культивированного молочного продукта, раскрытого в настоящем документе, содержит менее 80% мас./мас., компонентов клеточной среды, массой менее 150 кДа.

Загрязнители окружающей среды и лекарственные средства

Грудное молоко содержит небольшие, но измеримые концентрации загрязнителей окружающей среды, вредных для здоровья промышленных химикатов и производственных продуктов, которые широко распространены в окружающей среде. Загрязнители окружающей среды частично выделяются в грудное молоко. Уровни загрязнения в грудном молоке отражают уровни загрязнения в организме матери и идеально подходят для мониторинга уровней воздействия. Токсичные загрязнители окружающей среды могут передаваться от матери ребенку через грудное вскармливание. Стойкие органические загрязнители (СОЗ) представляют собой семейство липофильно стабильных химических веществ, которые биоаккумулируются в жировых тканях и создают длительную токсическую нагрузку на организм. Грудное вскармливание представляет собой значительный источник воздействия СОЗ в начале жизни человека, последствия которого неизвестны.

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит одного или нескольких загрязнителей окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит стойких

органических загрязнителей (СОЗ). В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит полихлорированные дибензо-п-диоксины (ПХДД), полихлорированные дибензофураны (ПХДФ), полихлорированные бифенилы (ПХБ) и пестициды, такие как ДДТ.

Тяжелые металлы, так как ртуть, свинец, мышьяк, кадмий, никель, хром, кобальт, цинк и другие потенциально токсичные металлы, которые диспергируются во всей окружающей среде, также обладают свойствами биоаккумуляции, и известно, что они накапливаются в молоке человека и таким образом являются проблемой для грудного ребенка. Металл попадает в грудное молоко из экзогенных источников, т.е., поступает через загрязненный воздух, пищу и питьевую воду, и эндогенное выделение вместе с жизненно необходимыми микроэлементами. Например, свинец и ртуть одинаково распределены в пищевой цепи человека, и их влияние на развитие плода во многом определяется диетой матери и состоянием питания. Воздействие токсичных металлов имеют существенное значение для здравоохранения, даже в малых концентрациях и остром воздействии эти металлы остаются токсичными для людей. Грудной ребенок может подвергаться воздействию токсичных металлов в период наибольшей восприимчивости. Младенцы, находящиеся на грудном вскармливании, могут подвергаться воздействию тяжелых металлов через грудное молоко более должного, и воздействие может иметь последствия для здоровья младенцев. У младенцев, в частности, эти воздействия могут иметь неблагоприятное влияние на развивающуюся центральную нервную систему, оставляя пожизненное нарушение когнитивных способностей.

Грудное молоко может содержать остатки любых фармацевтических или рекреационных лекарственных средств, используемых матерью. Некоторые рецептурные лекарственные средства, такие как химиотерапевтические препараты, противопоказаны при грудном вскармливании из-за риска для младенца. Широко используемые рекреационные интоксиканты, такие как каннабис и спирт, попадают в грудное молоко. Кроме того, психоактивные вещества обнаруживают в грудном молоке женщин, употребляющих эти лекарственные средства в период лактации, и метаболиты запрещенных лекарственных средств обнаруживают в волосах детей, находившихся на грудном вскармливании у матерей, принимавших эти вещества во время грудного вскармливания.

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит одного или нескольких тяжелых металлов, таких как мышьяк, свинец, кадмий, никель, ртуть, хром, кобальт и цинк. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит мышьяка. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит свинца. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит кадмия. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит никеля. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит ртути. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит хрома. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит кобальта. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит цинка. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит мышьяка, свинца, кадмия, никеля, ртути, хрома, кобальта и цинка.

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит лекарственных средств из группы, состоящей из химиотерапевтических препаратов, антидепрессантов, противотревожных препаратов, бензодиазепинов, спирта, марихуаны, опиоидов, фенциклидина, кокаина или их метаболитов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит лекарственных средств из группы, состоящей из лития, карбамазепина, хлорпромазина и клозапина.

Аллергены

Чужеродные аллергенные белки может быть трудно отличить от эндогенных белков молока человека. Пищевые белки с аллергенным потенциалом, обнаруженные в молоке человека, включают куриные яйца и белки арахиса. Существует восемь основных пищевых аллергенов, известных как "большая восьмерка", которые ответственны за большинство серьезных аллергических реакций на пищу в США. Список "большой восьмерки" состоит из аллергенов молока, яиц, рыбы, ракообразных моллюсков, лесных орехов, арахиса, пшеницы и сои. Белки, вызывающие аллергию на яйца, включают овомукоид, овальбумин и кональбумин. Белки арахиса включают арахин 6, арахин 3, конарахин, основной аллерген Arah1 и арахин Arah2. В качестве примера переноса белка из рациона матери в молоко показано, что потребление одного яйца в сутки приводит к более высокому содержанию аллергена овальбумина из куриного яйца (OVA) в молоке человека по сравнению с матерями, избегающими яиц.

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит одного или нескольких пищевых аллергенов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит яиц, рыбы, ракообразных моллюсков, лесных орехов, арахиса, пшеницы и соевых аллергенов. В некоторых вариантах осу-

ществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит яичных аллергенов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит рыбных аллергенов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит аллергенов ракообразных. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит аллергенов лесного ореха. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит аллергенов арахиса. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит аллергенов пшеницы. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит соевых аллергенов.

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит арахина 6, арахина 3, конарахина, Arah1 и Arah2.

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит овальбумина (OVA).

Клетки

Натуральное грудное молоко содержит значительную популяцию живых клеток, представляющих различные типы клеток, включая стволовые клетки человека, иммунные клетки человека и бактериальные клетки. Грудное молоко содержит приблизительно 146000 клеток/мл, и это количество снижается в переходном (8-12 дней после родов) и зрелом молоке (26-30 дней после родов) до 27500 и 23650 клеток/мл, соответственно. Клетки включают предшественники миелоидных клеток (9-20%), нейтрофилы (12-27%), незрелые гранулоциты (8-17%) и нецитотоксические Т-клетки (6-7%). Существование микробиома молока человека было обнаружено всего десять лет назад. Подсчитано, что младенец, питающийся 800 мл грудного молока в сутки, может проглотить 10^7 - 10^8 бактериальных клеток ежедневно. Наиболее часто в молоке человека обнаруживаются бактерии, принадлежащие к видам *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Lactobacillus*.

В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит клеток. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт содержит человеческую эпителиальную клетку молочной железы и/или плазматическую клетку. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит клеток, кроме одной или нескольких человеческих эпителиальных клеток молочной железы и/или одной или нескольких плазматических клеток. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит клеток, выбранных из группы, состоящей из стволовых клеток, миоэпителиальных клеток, миелоидных клеток-предшественников, нейтрофилов, гранулоцитов, Т-клеток, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Lactobacillus*. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт содержит эпителиальную клетку молочной железы и/или плазматическую клетку человека. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит клеток, кроме одной или нескольких человеческих эпителиальных клеток молочной железы и/или одной или нескольких плазматических клеток.

Вирусы

Натуральное грудное молоко может передавать определенные возбудители инфекции, такие как вирус гепатита В, вирус гепатита С, цитомегаловирус, вирус Западного Нила, Т-клетка лимфотропный вирус Т-клеток человека и вирус иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит вирусов. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит вирусов, выбранных из группы, состоящей из вируса гепатита В, вируса гепатита С, цитомегаловируса, вируса Западного Нила, лимфотропного вируса Т-клеток человека и вируса иммунодефицита человека.

Гормоны

Натуральное грудное молоко может содержать гормоны из материнского кровообращения, такие как лептин, грелин и адипонектин, которые синтезируются вне молочных желез и транспортируются в молоко через эпителий молочной железы. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит гормона. В некоторых вариантах осуществления культивированный молочный продукт не содержит гормонов, выбранных из группы, состоящей из лептина, грелина, адипонектина, тироксина (Т4), трийодтиронина (Т3), тиреотропного гормона (ТТГ), эпидермального фактора роста, бета-эндорфина, релаксина, кортизола и эритропоэтина.

Способы применения

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагаются способы лечения и/или профилактики микробной инфекции у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающие введение культивированного молочного продукта, содержащего IgA или sIgA, описываемые в настоящем документе, и/или иммуноотерапевтической композиции, содержащей выделенные IgA или sIgA, описываемые в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах

осуществления человек является младенцем. В некоторых вариантах осуществления у человека есть иммунодефицит. В некоторых вариантах осуществления человек имеет заболевание, выбранное из тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), ВИЧ/СПИД, рака или аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления человек болеет волчанкой или сахарным диабетом (например, сахарным диабетом I типа или сахарным диабетом II типа). В некоторых вариантах осуществления человек является реципиентом трансплантата органа или костного мозга. В некоторых вариантах осуществления человек страдает от недоедания. В некоторых вариантах осуществления у человека есть синдром мальабсорбции. В некоторых вариантах осуществления у человека есть синдром истощения. В некоторых вариантах осуществления человек находится в пожилом или старческом возрасте. В некоторых вариантах осуществления человек страдает кистозным фиброзом, ХОБЛ или бронхоэктазами без муковисцидоза.

В определенных вариантах осуществления иммунотерапевтические композиции и культивированный молочный продукт, содержащие IgA и/или sIgA, вводят пациентам в эффективном количестве для лечения или профилактики микробной инфекции. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию.

В определенных вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию. Неограничивающие примеры бактериальных инфекций, которые можно лечить и/или предотвращать, включают инфекции, вызванные *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *C. difficile* или *Vibrio cholerae*.

В определенных вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой вирусную инфекцию. Неограничивающие примеры вирусной инфекции, которую можно лечить и/или предотвратить, включают инфекции, вызванные вирусом гриппа, вирусом парагриппа, респираторно-синцитиальным вирусом, риновирусом и метапневмовирусом человека.

В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой паразитарную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления паразитарная инфекция представляет собой инфекцию *Giardia lamblia*, *Entameba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. или *Cystoisospora belli*.

В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой грибковую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления грибковая инфекция представляет собой инфекцию *Aspergillus*, *Cryptococcus* или *Pneumocystis jirovecii*.

В определенных вариантах осуществления культивированный иммунный молочный продукт, содержащий IgA или sIgA, или терапевтическую композицию, содержащую IgA или sIgA, вводят перорально индивидууму для лечения или профилактики желудочно-кишечной инфекции. В определенных вариантах осуществления желудочно-кишечная инфекция представляет собой бактериальный или вирусный гастроэнтерит. В определенных вариантах осуществления у индивидуума есть язва, вызванная инфекцией *Helicobacter pylori*.

В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой кандидоз.

В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой респираторную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления респираторная инфекция представляет собой пневмонию, бронхит, аспергиллез или криптококкоз. В некоторых вариантах осуществления респираторная инфекция представляет собой инфекцию, вызванную *B. ceracia*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* или *Pneumocystis*.

В определенных вариантах осуществления иммунотерапевтические композиции, описываемые в настоящем документе, вводят индивидууму в качестве назального ингаляционного средства для лечения или профилактики респираторной инфекции. В некоторых вариантах осуществления композиции формулируют для ингаляции. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой порошок. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой состав для введения с помощью небулайзера.

В определенных вариантах осуществления иммунотерапевтические композиции и/или культивированные молочные продукты вводят в организм с другим противомикробным средством (т.е., антибиотиком или противовирусным средством). В определенных вариантах осуществления культивированный молочный продукт, описываемый в настоящем документе, вводят с дополнительным питательным продуктом для лечения и/или профилактики желудочно-кишечной инфекции.

После описания настоящего раскрытия оно будет объяснено более подробно в следующих примерах, которые включены в настоящий документ исключительно с иллюстративными целями и не предназначены для ограничения раскрытия.

Примеры

Примеры, которые следуют ниже, иллюстрируют конкретные варианты осуществления раскрытия и их различные применения. Они изложены только в пояснительных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем раскрытия.

Пример 1. Получение молочных компонентов из эпителия молочной железы человека

В этом примере воспроизводят эпителий молочной железы человека и производят молоко *in vitro*.

Описанные система и способ являются иллюстративными и могут быть масштабированы для производства многолитровых объемов компонентов молока. Предполагается, что эпителиальные клетки молочной железы образуют поляризованный монослой на волокнах биореактора, предварительно покрытых одним или несколькими из ламинина и коллагена или других белков внеклеточного матрикса, а также на непокрытых волокнах. При слиянии монослой образует барьер, разделяющий интра- и экстракапиллярное пространство (ЭКП), при этом базальная поверхность прикреплена к волокнам, а апикальная поверхность ориентирована в сторону ЭКП. Выработку молочных компонентов стимулируют добавлением пролактина к среде. Секретируемые компоненты молока собирают из ЭКП и отправляют на последующий анализ содержания белков, липидов и углеводов по сравнению с грудным молоком человека, продуцируемым *in vivo*.

Материалы для применения в этом примере показаны в табл. 3.

Таблица 3. Материалы

Предмет	Поставщик	Каталожный номер
Первичные эпителиальные клетки молочной железы	ATCC	PCS-600-010
Минимальная среда для эпителиальных клеток молочной железы	ATCC	PCS-600-30
Набор для роста эпителиальных клеток молочной железы	ATCC	PCS-600-040
Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (D-PBS)	ATCC	ATCC 30-2200
Трипсин-ЭДТА	ATCC	PCS-999-003
Раствор, нейтрализующий трипсин	ATCC	PCS-999-004
ENS (Ламинин-1/111)	Sigma	L2020-1MG
Коллаген-IV	Sigma	C5533-5MG
Пролактин	Shenandoah Biotechnology	100-45-500 мкг

Способы

Наращивание первичных эпителиальных клеток молочной железы человека (чЭКМЖ)

Эпителиальные клетки молочной железы человека (1 ампула; 5×10^5 клеток) наращивают в одной колбе T300, покрытую коллагеном IV (или в двух колбах T175) в среде для эпителиальных клеток молочной железы, приготовленной с добавками, представленными в наборе, указанном в табл. 3. После получения соответствующего количества клеток клетки промывают D-PBS и собирают с планшетов с использованием трипсин-ЭДТА. Как только клетки отделяются, активность трипсина останавливают с помощью раствора, нейтрализующего трипсин. Клетки ресуспендируют в среде и высевают в биореактор с полыми волокнами (Fibercell Systems), приготовленный так, как описано ниже.

Получение биореактора с полыми волокнами (C2025D, 20 кДа MWCO) Перед посевом получают картридж биореактора (Fibercell Systems) путем предварительного культивирования с PBS в течение как минимум 24 ч. Картридж биореактора необязательно предварительно покрывают добавлением приблизительно 50-100 мкг одного или нескольких из коллагена I, коллагена IV, ламинина-III (например, ламинина-III, выделенного из опухоли Энгельбрета-Холма-Сварма), альфа-4, альфа-5, фибронектина, и/или энтактина в 3,2 мл PBS и оставляют для проведения ультрафильтрации вдоль волокна при комнатной температуре в течение ночи. В картридже без покрытия или с предварительно нанесенным покрытием заменяют среду и инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. Затем среду заменяют клетками, собранными из колб T300 (или T175). Объем резервуара составляет не более 125 мл. Картридж поворачивают на 180° после посева клеток.

Рост клеток в биореакторе и стимуляция пролактином

После посева в биореактор клетки выращивают в среде для выращивания эпителиальных клеток молочной железы, дополненной 10-25 мл DMEM/10% CDM-HD на 100 мл среды (модифицированная по Дульбекко среда Игла; среда с химически определенным составом для культивирования клеток с высокой плотностью). Соотношение DMEM/CDM-HD можно регулировать в зависимости от скорости потребления глюкозы.

Перед стимуляцией секреции молока среду в ЭКП сливают и заменяют на PBS. Для стимуляции секреции компонента молока добавляют среду, дополненную 100 нг/мл пролактина. Лактогенная среда также может быть дополнена повышенной концентрацией глюкозы и необходимыми пищевыми предшественниками жирных кислот молока, линолевой кислоты и α -линоленовой кислоты. Биореактор поддерживают в течение 10 суток с отбором образцов, как описано ниже.

Сбор и получение образцов

Образцы, состоящие из супернатанта из ЭКП и эквивалентного объема среды из резервуара, соби-

рают один раз в сутки в течение 10 суток после добавления пролактина в среду. Образцы центрифугируют для сбора дебриса и ресуспендируют в эквивалентном объеме PBS. Супернатанты образцов ЭКП и сред разделяют на аликвоты по 0,5 мл в микроцентрифужных пробирках и замораживают при -80°C . Осадок дебриса ресуспендируют в объеме PBS, эквивалентном исходному раствору, и замораживают при -80°C . Образцы обрабатывают для определения относительных концентраций вырабатываемых компонентов молока.

Масштабирование для многолитрового производства

Чтобы масштабировать для многолитрового производства, проводят предыдущий способ с соответствующей корректировкой объемов реагентов для более крупного биореактора (например, Fibercell Systems, каталожный номер C2018).

Пример 2.

Система культивирования клеток, разработанная для сбора молока, должна поддерживать разделенную секрецию продукта таким образом, чтобы молоко не подвергалось воздействию сред, которые обеспечивают клетки питательными веществами. В организме молокопродуцирующие эпителиальные клетки выстилают внутреннюю поверхность молочной железы в виде непрерывного монослоя. Монослой ориентирован таким образом, что базальная поверхность прикреплена к нижележащей базальной мембране, а молоко секретруется с апикальной поверхности и хранится в люминальном отделе железы, или альвеоле, до тех пор, пока не будет удалено во время доения или кормления. Плотные соединения вдоль боковых поверхностей клеток обеспечивают барьер между подлежащими тканями и молоком, находящимся в альвеолярном отделе. Таким образом, *in vivo* ткань молочной железы устроена так, что секреция молока компартментализована, при этом эпителиальные клетки молочной железы сами устанавливают раздел фаз и поддерживают направленное всасывание питательных веществ и секрецию молока.

В настоящем раскрытии описан аппарат для культивирования клеток, который воспроизводит компартментализирующую способность молочной железы, которую используют для сбора молока из эпителиальных клеток молочной железы, выращенных вне организма. Такой аппарат может содержать каркас для поддержания пролиферации клеток молочной железы на границе двух отделений, так что эпителиальный монослой обеспечивает физическую границу между питательной средой и секретиремым молоком. В дополнение к обеспечению поверхности для роста, каркас обеспечивает пространственные сигналы, которые направляют поляризацию клеток и обеспечивают направленность поглощения и секреции. В этом изобретении описано получение, культивирование и стимуляция эпителиальных клеток молочной железы в компартментализирующем аппарате для культивирования клеток для производства и сбора молока для пищевых целей (см., например, фиг. 1).

Получение эпителиальных клеток молочной железы

Эпителиальные клетки молочной железы получают из хирургических эксплантатов рассеченной ткани молочной железы (например, молочной железы, вымени, соска), биопсийного образца или сырого грудного молока. Как правило, после хирургического рассечения ткани молочной железы любую жировую или стромальную ткань удаляют вручную в асептических условиях, а оставшуюся ткань молочной железы ферментативно расщепляют коллагеназой и/или гиалуронидазой, приготовленной в химически определенной питательной среде, которая должна быть состоять из компонентов, которые являются "общепризнанно безопасными" (GRAS). Образец выдерживают при 37°C с несильным помешиванием. После расщепления собирают суспензию отдельных клеток или органоидов либо путем центрифугирования, либо путем проливания образца через стерильное сито для клеток из нейлона. Клеточную суспензию затем переносят на планшет для культивирования тканей, покрытый соответствующими компонентами внеклеточного матрикса (например, коллагеном, ламинином, фибронектином).

Альтернативно, образцы эксплантатов можно измельчить на мелкие кусочки, например, путем измельчения стерильным скальпелем. Кусочки ткани высевают на подходящую поверхность, например, на желатиновую губку или пластиковый планшет для культивирования тканей, покрытые соответствующим внеклеточным матриксом.

Посеянные клетки выдерживают при 37°C в инкубаторе с атмосферой, содержащей 5% CO_2 . Во время инкубации среду заменяют приблизительно каждые 1-3 суток и клетки пересевают до достижения достаточного количества жизнеспособных клеток для последующей обработки, которая включает получение препарата для хранения в жидком азоте; развитие иммортализованных линий клеток путем стабильной трансфекции генов, таких как SV40, TERT или других генов, ассоциированных со старением; выделение эпителиального, миоэпителиального и стволового типов клеток молочной железы путем, например, активируемой флуоресценцией сортировки клеток; и/или внесение в компартментализированный аппарат для культивирования тканей для производства и сбора молока для потребления человеком.

Культивирование эпителиальных клеток молочной железы для производства молока. Молоко для пищевых целей производят эпителиальные клетки молочной железы, выделенные как описано выше и культивируемые в формате, который поддерживает разделенную секрецию, так что сохраняется разделение между питательной средой и продуктом. Система основана на способности эпителиальных клеток молочной железы образовывать непрерывный монослой с соответствующей апикально-базальной полярированностью при посеве на соответствующий каркас, расположенный на границе между апикальным отделе-

нием, в которое секретируется молоко, и базальным отделением, через которое обеспечивается поступление питательных сред (см., например, фиг. 2). Фильтры Transwell®, помещаемые в планшеты для культивирования тканей, а также биореакторы на основе полых волокон или микроструктурированные каркасы, например, используют для поддержки этих характеристик.

После выделения и размножения эпителиальных клеток молочной железы, клетки суспендируют в определенной химически питательной среде, состоящей из пищевых компонентов, и инокулируют в культуральный аппарат, который был предварительно покрыт смесью белков внеклеточного матрикса, таких как коллаген, ламинин и/или фибронектин. Аппарат для культивирования клеток представляет собой любую конструкцию, позволяющую разделять абсорбировать питательные вещества и выделять продукт из поляризованного конфлюэнтного эпителиального монослоя. Примеры включают биореакторы с полыми волокнами и микроструктурированными каркасами (см., например, фиг. 3 и 4 соответственно). Альтернативы включают другие виды трехмерной тканевой культуры, такие как получение бесклеточной молочной железы в качестве каркаса, заселенного стволовыми клетками для получения функционального органа *in vitro*, или сбор молока из просвета эпителиальных клеток органоидов молочных желез или "маммосферы", выращенные либо в гидрогелевой матрице, либо в суспензии.

Аппарат содержит герметичный корпус, поддерживающий температуру приблизительно 37°C во влажной атмосфере с содержанием CO₂ приблизительно 5%. Контролируют захват глюкозы для оценки роста культуры по мере пролиферации клеток в биореакторе. Стабилизация потребления глюкозы свидетельствует о достижении клетками конфлюэнтного, контактно-ингибированного состояния. Целостность монослоя обеспечивают с помощью трансэпителиального электрического сопротивления. Датчики контролируют концентрацию растворенного O₂ и CO₂ в среде в нескольких местах. Компьютеризированный насос обеспечивает циркуляцию сред через биореактор со скоростью, которая уравнивает доставку питательных веществ с удалением метаболических отходов, таких как аммиак и лактат. Среда может рециркулировать через систему после удаления отходов с использованием технологии добавления и адаптации лактата (Freund et al. 2018 *Int J Mol Sci.* 19(2)) или путем пропускания через камеру с упакованным цеолитом.

Стимуляция молочной продуктивности

In vivo и в культивируемых эпителиальных клетках молочной железы продукцию и секрецию молока стимулируют пролактином. В культуре пролактин можно поставлять экзогенно в питательную среду при концентрации, близкой к наблюдаемой в организме во время лактации, например, приблизительно от 20 нг/мл до приблизительно 200 нг/мл. Очищенный пролактин можно получить коммерчески; однако используют альтернативные способы обеспечения пролактина или стимуляции лактации, в том числе экспрессия и очистка рекомбинантных белков из культуры клеток микроорганизмов или млекопитающих. Альтернативно, кондиционированную среду, приготовленную путем культивирования клеток, экспрессирующих и секретирующих пролактин, можно наносить на эпителиальные клетки молочной железы для стимуляции лактации. Биореакторы могут быть установлены последовательно таким образом, чтобы среда, проходящая через культуру клеток, экспрессирующих пролактин или другие ключевые добавки к средам, кондиционировалась до воздействия на клетки молочной железы, выращенные в культуральном аппарате с отделениями, как описано.

Другие подходы к повышению молочной продуктивности и/или экономии экзогенного пролактина предусматривают молекулярные манипуляции с путями передачи сигнала, которые регулируются связыванием пролактина с его рецепторами на поверхности эпителиальных клеток молочной железы, такие как следующие: (а) экспрессия конструкций, нацеленных на посттрансляционную модификацию пролактина; (b) экспрессия альтернативных изоформ рецептора пролактина; (с) экспрессия химерного рецептора пролактина, в котором внеклеточный домен заменяют участком связывания для другого лиганда; (d) введение гена, кодирующего конститутивно или условно активный рецептор пролактина или модифицированные варианты его нижерасположенных эффекторов, таких как STAT5 или Akt; (e) нокаут или модификация циркадного гена PER2; и/или (f) молекулярные подходы, направленные на увеличение скорости поглощения питательных веществ на базальной поверхности монослоя эпителия молочной железы.

Сбор молока

Сбор секретируемого молока осуществляют непрерывно или через определенные промежутки времени, например, через порт, установленный в апикальном отделении культурального аппарата. К порту присоединяют вакуум для облегчения сбора, а также для стимуляции дальнейшей продукции. Собранное молоко упаковывают в контейнеры и запечатывают для распространения, замораживают или лиофилизируют для хранения, либо перерабатывают для извлечения специфических компонентов.

Настоящее изобретение относится к культурам эпителиальных клеток молочной железы для производства молока для пищевых целей. В дополнение к грудному молоку человека этот способ можно использовать для производства молока от других видов млекопитающих, например, для потребления человеком или для ветеринарного использования. Поскольку ранее было невозможно производить молоко вне организма, эта технология может привести новым коммерческим возможностям, в дополнение к обеспечению альтернативного способа производства существующих продуктов. Социально-экономические последствия коммерческого развития этой технологии являются обширными и далеко

идущими. Производство грудного молока человека из культивируемых клеток может стать средством для решения проблемы нарушения питания у младенцев в условиях дефицита продовольствия, обеспечить необходимыми питательными веществами недоношенных детей, которые не могут питаться грудью, и предложить матерям новый вариант вскармливания их детей, обеспечивающий оптимальное питание с удобством детской смеси. Производство коровьего или козьего молока дает возможность уменьшить экологические, социальные воздействия и воздействия на здоровье животных в животноводстве. Описанный здесь способ направлен на решение важных проблем в развивающейся области клеточного сельского хозяйства и дает возможность радикально обновить снабжение человека продовольствием, не ставя под угрозу нашу биологическую и культурную привязанность к наиболее фундаментальным из наших источников питания.

Пример 3. Производство молочных композиций, содержащих иммуноглобулины

Первичную ткань молочной железы получают от здорового донора. Популяции CD20+ иммунных клеток и эпителиальных клеток молочной железы сортируют с помощью анализа FACS с использованием известных маркеров для популяций миоэпителиальных и люминальных эпителиальных клеток. Выделенные клетки молочной железы и иммунные клетки иммортализуют до совместного культивирования клеток. Иммортализованные иммунные клетки культивируют совместно с иммортализованными выделенными эпителиальными клетками молочной железы в биореакторе с полыми волокнами и выращивают до конfluence. Культуру стимулируют пролактином для стимуляции молочной продуктивности. Секреторный продукт культуры клеток, содержащий иммуноглобулины, в том числе секреторный IgA, затем собирают путем неразрушающего механизма вывода.

Пример 4. Производство иммунотерапевтических композиций from из совместно культивируемых эпителиальных клеток слизистой оболочки и иммунных клеток

Первичные эпителиальные клетки молочной железы и CD20+ иммунные клетки собирают из ткани, полученной от пациентов, выздоровевших от инфекции слизистой оболочки. Выбирали пациентов с положительным результатом теста на сыворотку, которая проявляет активность по нейтрализации вирусов. Иммунные клетки CD20+ культивируют совместно с эпителиальными клетками молочной железы в биореакторе с полыми волокнами. Иммунные клетки выращивают в 2-D культуре с последующей инокуляцией в биореактор с полыми волокнами и выращивают до максимальной плотности (т.е., суперконfluence) внутри биореактора. Совместное культивирование эпителиальных клеток слизистой оболочки и иммунных клеток стимулирует выработку иммуноглобулинов, в том числе секреторного IgA. Совместную культуру стимулируют одним или несколькими стимуляторами, выбранными из вирусного белка, вирусного белкового фрагмента, пролактина, TGF- β и интерлейкина 10 (IL-10). Продукты совместной культуры эпителиальных клеток слизистой оболочки и стимулированных иммунных клеток собирают стандартным вакуумным способом. В определенных вариантах осуществления секретированный продукт очищают. Иммуноглобулины очищают из собранного секретированного продукта. Очищенный секретированный продукт формулируют как ингаляционное средство для легочного введения человеку и он эффективен при лечении респираторной инфекции.

Пример 5. Лечение респираторной инфекции иммунотерапевтической композицией из совместно культивированных эпителиальных клеток слизистой оболочки и иммунных клеток

Иммунотерапевтическую композицию, как описано выше в примере 3, формулируют в виде ингаляционного средства и вводят для пациенту, страдающему респираторной инфекцией, в количестве эффективном для лечения инфекции. Иммунотерапевтическая композиция эффективна для уменьшения выраженности симптомов инфекции у пациента.

Пример 6. Культивированный молочный продукт

Эпителиальные клетки молочной железы (ЭКМЖ) продуцируют большинство компонентов молока и регулируют состав молока в организме во время лактации. В этом документе авторы описывают композицию клеточно-культивированных молочных продуктов человека, которые можно получить путем культивирования ЭКМЖ человека (чЭКМЖ) в биореакторе с полыми волокнами (HFBR), который обеспечивает проницаемый каркас и позволяет формировать адгезивную культуру, которая поддерживает эпителиальный барьер между среды для культивирования клеток, которые циркулируют по капиллярам биореактора, и секретированным продуктом, который собирают из внекапиллярного пространства (ЭКП).

Получение и анализ

Композиции продукта, описанные в этом примере, представляют собой продукт биосинтеза чЭКМЖ, полученных из различных источников, культивируемых в HFBR в лактогенных условиях (фиг. 9A). Вводимые клетки включают общедоступные первичные и иммортализованные чЭКМЖ (табл. 4).

Таблица 4. Вводимые клетки и составы сред для культивирования для получения молочных продуктов человека

Вводимые клетки	Основные среды	Среды для выращивания	Лактогенные среды
Первичные чЭКМЖ Донор #1	Среды для эпителиальных клеток молочной железы	Набор для роста эпителиальных клеток молочной железы ATCC	Среды для выращивания + 200–400 нг/мл пролактин
Первичные чЭКМЖ Донор #2	Среды для эпителиальных клеток молочной железы (ATCC)	Основные среды + Набор для роста эпителиальных клеток молочной железы (ATCC)	Среды для выращивания + 200–400 нг/мл пролактина (Sigma)
Иммортиализованные чЭКМЖ PMC42-LA	RPMI-1640 (Gibco)	Основные среды + 10% FBS (Sigma)	Среды для выращивания + 200–800 нг/мл пролактина (Sigma)
Иммортиализованные чЭКМЖ MCF10A	MEBM (Lonza)	MEGM (Lonza)	MEGM + 200–400 нг/мл пролактина (Sigma)

В кратком изложении, после наращивания в флаконах для тканевых культур, чЭКМЖ инокулировали в ЭКП HFBR, а оксигенированную среду для культивирования пропускали через капилляры с использованием перистальтического насоса.

Среды для выращивания для поддержки пролиферативной фазы способа соответствуют обозначенным основным средам, дополненным необходимыми факторами роста для поддержания пролиферации.

После инокуляции пролиферацию контролировали путем оценки суточного коэффициента использования глюкозы (GUR) с помощью глюкометра (AccuCheck). Увеличение GUR соответствует повышенной метаболической активности в результате увеличения числа клеток в пролиферативной фазе процесса. Стабилизация или снижение GUR указывает на то, что клетка достигла конfluenceнтного состояния и рост стал контактно-ингибированным. После достижения конfluenceнтности среды для культивирования, циркулирующие по капиллярам HFBR, заменяли на лактогенные среды, дополненные рекомбинантным пролактином человека (Sigma). Следует отметить, что наблюдали, что переход на лактогенные среды соответствовал второй фазе нарастания GUR, связанной с повышенными метаболическими потребностями биосинтеза молока, в том числе продукции лактозы (фиг. 9Б). Во время лактогенной фазы способа, отбирали образцы из ЭКП через одинаковые интервалы для аналитического тестирования с использованием шприца для введения свежего PBS в один порт доступа к ЭКП одновременно с забором равного объема образца продукта через шприц через другой порт доступа к ЭКП.

При лактогенной стимуляции чЭКМЖ достигали состояния терминальной дифференцировки, образуя конfluenceнтный монослой с апикальной/базальной полярностью и плотными соединениями на латеральных поверхностях, что приводило к образованию непроницаемого барьера между базальным отделением и апикальным отделением. Базальная поверхность прикреплена к внеклеточному матриксу, расположенному над капиллярами, а апикальная поверхность ориентирована в сторону ЭКП. При такой ориентации чЭКМЖ собирали свои механизмы абсорбции и секреции вдоль апикально-базальной оси, обеспечивая поглощение питательных веществ на базальной поверхности из среды, перфузируемой через капилляры, и секрецию продукта на апикальной поверхности в ЭКП, где он накапливался, пока его не забирали. Накопление продукта демонстрировали обнаружением лактозы, бета-казеина и повышением содержания общего белка в ЭКП (фиг. 9В-Д).

Скорость накопления продукта в ЭКП определяли по количеству клеток, которые мог вместить HFBR, что было ограничено доступной площадью поверхности для прикрепления клеток и перфузией среды. Этот процесс проводили с использованием доступных HFBR, которые могут вместить приблизительно от 10^8 (Fibercell Systems, C2025D) до 10^{11} (Fibercell Systems, C2018) клеток. Авторы подсчитали, что молочная железа лактирующего человека, представляющая приблизительно 1 кг ткани, содержит приблизительно 10^{11} клеток, и что HFBR, способный поддерживать это количество клеток, сможет давать ежедневный выход, аналогичный таковому из лактирующей молочной железы. Теоретический выход, основанный на этих оценках, подтверждается количественным анализом общего содержания белка в наших образцах из ЭКП, полученных во время лактогенной стимуляции (фиг. 9Д). Кроме того, повышенное содержание белка в продукте, выведенном из ЭКП, по сравнению со средами для культивирования подтверждает, что клетки обеспечивают функциональный барьер между отделениями и препятству-

ют диффузионному переносу компонентов среды в продукт.

Композиция макромолекулярного продукта

В дополнение к подтверждению того, что общая продукция белков с помощью чЭКМЖ, выращенных в HFBR, соответствует ожидаемой для молока, авторы провели серию нецелевых и целевых анализов для оценки молекулярного состава этих продуктов и подтверждения наличия компонентов молока человека. Использовали масс-спектрометрию для исследования содержания белков, липидов и углеводов в этих продуктах с течением времени во время циклов, охватывающих до 90 суток, и 10 самых распространенных компонентов молока человека из каждой категории представлены в табл. 5. Соответствующий анализ составов сред для культивирования клеток, использованных в каждом цикле, подтверждает, что перечисленные компоненты были синтезированы чЭКМЖ, поскольку они не присутствовали в средах.

Таблица 5. Основные белковые, липидные и углеводные компоненты человеческого молока, наблюдаемые в образцах, собранных из чЭКМЖ, культивируемых при лактогенной стимуляции в биореакторе с полыми волокнами, перечисленные в порядке возрастания содержания

Фракция	Компонент
Белок	Бета-казеин
	Альфа-лактальбумин
	Каппа-казеин
	Альфа-S1-казеин
	Лактоферрин
	Бутрофилин
	Остеопонтин
	Лактадгерин
	Лизоцим
	Муцин-4
	Муцин-1
Жирные кислоты	C8:0, каприловая кислота
	C10:0, каприновая кислота
	C12:0, лауриновая кислота
	C13:0, тридекановая кислота
	C14:0, миристиновая кислота
	C16:0, пальмитиновая кислота
	C16:1, пальмитолеиновая кислота
	C18:2n-6, линолевая кислота, LA
	C18:3n-3, альфа-линоленовая кислота, ALA
	C20:3n-6, дигомо-гама-линоленовая кислота, DGLA
	C20:4n-6, арахидоновая кислота, AA
	C20:5n-3, эйкозопентановая кислота, EPA
	C22:6n-3, докозагексаеновая кислота, DHA
C22:1n9, эруковая кислота	
C24:1, нервоновая кислота	
Углевод	Лактоза
	Глюкоза
	3'-SL
	6'-SL
	LNT
	LNTn

Помимо содержания питательных веществ, важно отметить, что обнаруженные компоненты представляют собой ряд известных биологически активных видов в грудном молоке и связаны с развитием

иммунной системы и иммунной защиты младенцев, с развитием кишечника и развитием головного мозга. Что особенно интересно, авторы также обнаружили многочисленные свободные оксипиноловые метаболиты полиненасыщенных жирных кислот, такие как 9-гидроксиоктадекадиеновая кислота, которые, как сообщается, обладают противовоспалительной и провоспалительной активностью.

Вывод

Эти результаты и наши текущие анализы подтверждают возможность производства молочных продуктов человека из культивируемых чЭЖМЖ, включая ключевые питательные и биологически активные компоненты. Описанная здесь композиция представляет собой объединенные данные по продуктам, поскольку коммерческий способ может предусматривать постпроизводственное смешивание продуктов, полученных из нескольких единиц, для получения определенной композиции.

Указанные выше примеры иллюстрируют настоящее раскрытие и не должны рассматриваться как ограничивающие его. Несмотря на то, что раскрытие было подробно описано со ссылкой на предварительные варианты осуществления, существуют вариации и модификации в пределах объема и сущности раскрытия, которые описаны и определены в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения выделенного культивированного молочного продукта, содержащего секреторный IgA (sIgA), из клеток молочной железы и плазматических клеток, включающий:

а) культивирование клеточной конструкции в биореакторе, в условиях, позволяющих получить культивированный молочный продукт, причем указанная клеточная конструкция содержит:

i) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности;

ii) материал матрикса, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса;

iii) среду для культивирования, расположенную во внутренней полости и находящуюся в жидкостном контакте с внутренней поверхностью;

iv) множество плазматических клеток, расположенных на материале матрикса; и

v) конфлюэнтный монослой поляризованных клеток молочной железы, расположенный на множестве плазматических клеток, в котором клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы, причем поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность и базальную поверхность;

причем указанный биореактор содержит апикальное отделение, которое находится в жидкостном контакте с апикальной поверхностью живых клеток молочной железы, по существу изолировано от внутренней полости живой клеточной конструкции и по существу не содержит среду для культивирования клеток; и

б) выделение культивированного молочного продукта, секреторируемого в апикальное отделение с апикальной поверхности живых клеток молочной железы и плазматических клеток.

2. Способ по п.1, в котором монослой поляризованных клеток молочной железы является по меньшей мере на 70% конфлюэнтным, по меньшей мере на 80% конфлюэнтным, по меньшей мере на 90% конфлюэнтным, по меньшей мере на 95% конфлюэнтным, по меньшей мере на 99% конфлюэнтным или 100% конфлюэнтным.

3. Способ по п.1, в котором по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100% клеток молочной железы поляризованы в одной и той же ориентации.

4. Способ по п.1, в котором общая клеточная плотность клеток молочной железы в биореакторе составляет по меньшей мере 10^{11} и, альтернативно, в котором общая площадь поверхности клеток молочной железы в биореакторе составляет по меньшей мере $1,5 \text{ м}^2$.

5. Способ по п.1, в котором общая клеточная плотность плазматических клеток в биореакторе приблизительно составляет от 200 до 500 плазматических клеток на мм^2 .

6. Способ по п.1, в котором культивирование проводят при температуре приблизительно от 27 до приблизительно 39°C.

7. Способ по п.1, в котором культивирование проводят при концентрации CO_2 в атмосфере приблизительно от 4 до приблизительно 6%.

8. Живая клеточная конструкция, содержащая:

а) трехмерный каркас, имеющий внешнюю поверхность, внутреннюю поверхность, ограничивающую внутреннюю полость/базальную камеру, и множество пор, идущих от внутренней поверхности к внешней поверхности;

б) материал матрикса, расположенный на внешней поверхности трехмерного каркаса;

с) множество плазматических клеток, расположенных на материале матрикса;

д) по меньшей мере на 70% конфлюэнтный монослой поляризованных клеток молочной железы,

расположенный на множестве плазматических клеток, причем клетки молочной железы выбраны из группы, состоящей из эпителиальных клеток молочной железы, миоэпителиальных клеток молочной железы и клеток-предшественников молочной железы, и причем живые поляризованные клетки молочной железы содержат апикальную поверхность, из которой секретируется молочный продукт, и базальную поверхность; и

е) среду для культивирования, расположенную во внутренней полости/базальной камере и находящуюся в жидкостном контакте с внутренней поверхностью, причем среда для культивирования по существу изолирована от апикальной поверхности живых клеток молочной железы.

9. Клеточная конструкция по п.8, в которой базальная поверхность клеток молочной железы находится в жидкостном контакте со средой для культивирования.

10. Клеточная конструкция по п.8, в которой по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100% клеток молочной железы поляризованы в одной и той же ориентации.

11. Клеточная конструкция по п.8, в которой монослой поляризованных клеток молочной железы является по меньшей мере на 70% конфлюэнтным, по меньшей мере на 80% конфлюэнтным, по меньшей мере на 90% конфлюэнтным, по меньшей мере на 95% конфлюэнтным, по меньшей мере на 99% конфлюэнтным или 100% конфлюэнтным.

12. Клеточная конструкция по п.8, в которой клетки молочной железы содержат конститутивно активный белок рецептора пролактина.

13. Клеточная конструкция по п.8, в которой среда для культивирования содержит пролактин.

14. Культивированный молочный продукт, содержащий бета-казеин, альфа-лактальбумин, каппа-казеин, альфа-S1-казеин, лактоферрин, лактадгерин, лизоцим, C12:0 (лауриновую кислоту), C14:0 (миристиновую кислоту), C16:0 (пальмитиновую кислоту), лактозу, глюкозу, 3'-SL (3'-сиалиллактозу) и 6'-SL (6'-сиалиллактозу);

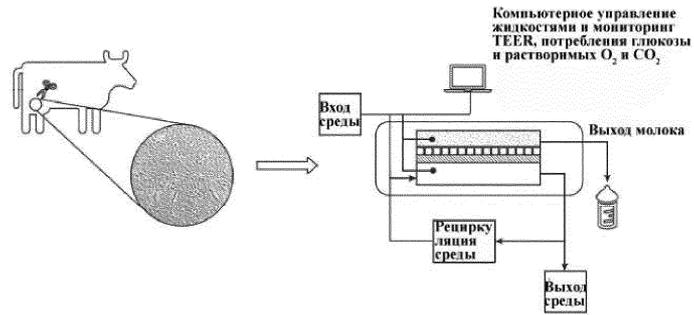
причем культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит стойких органических загрязнителей (СОЗ), тяжелых металлов, рецептурных лекарственных средств, рекреационных лекарственных средств, немолочных аллергенов, клеток, гормонов или вирусов.

15. Культивированный молочный продукт, содержащий бета-казеин, альфа-лактальбумин, каппа-казеин, альфа-S1-казеин, лактоферрин, бутрофилин, остеопонтин, лактадерин, лизоцим, муцин-4, муцин-1, C8:0 (каприловую кислоту), C10:0 (каприновую кислоту), C12:0 (лауриновую кислоту), C13:0 (тридекановую кислоту), C14:0 (миристиновую кислоту), C16:0 (пальмитиновую кислоту), C16:1 (пальмитолеиновую кислоту), C18:2n-6 (линолевую кислоту, LA), C18,3n-3 (альфа-линоленовую кислоту, ALA), C20:3n-6 (дигомо-гама-линоленовую кислоту, DGLA), C20:4n-6 (арахидоновую кислоту, АК), C20:5n-3 (эйкозопентановую кислоту, EPA), C22:6n-3 (докозагексаеновую кислоту, ДГК), C22:1n9 (эруковую кислоту), C24:1 (нервоновую кислоту), лактозу, глюкозу, 3'-SL, 6'-SL, LNT, LNnT, 9-гидроксиоктадекадиеновую кислоту (9-HODE), 13-гидроксиоктадекадиеновую кислоту (13-HODE), 5,15-дигидроксиэйкозатетраеновую кислоту (5,15-DiHETE), 17,18-дигидроксиэйкозатетраеновую кислоту (17,18-DiHETE), 8,9-дигидроксиэйкозатриеновую кислоту (8,9-DiHETrE), 11,12-дигидроксиэйкозатриеновую кислоту (11,12-DiHETrE), 9,10-дигидроксиоктадеценую кислоту (9,10-DiHOME), 12,13-дигидроксиоктадеценую кислоту (12,13-DiHOME), 14(15)-эпоксиэйкозатриеновую кислоту (14(15)-EpETrE), 19(20)-эпоксидокозапентановую кислоту (19(20)-EpDPE), 17-гидроксидокозагексаеновую кислоту (17-HDoHE), 5-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (5-HETE), 8-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (8-HETE), 9-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (9-HETE), 11-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (11-HETE), 12-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (12-HETE), 9-гидроксиоктадекатриеновую кислоту (9-HOTrE), 9-оксооктадекадиеновую кислоту (9-оксо-ODE) или 13-оксооктадекадиеновую кислоту (13-оксо-ODE), 17,18-эпоксиэйкозатетраеновую кислоту (17(18)-EpETE), 6-кето-простагландин F1-альфа (6-кето-PGF1a) или 15(S)-гидроксиэйкозатриеновую кислоту (15(S)-HETrE) и sIgA,

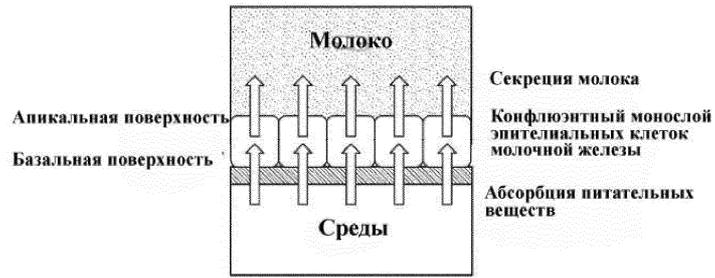
причем культивированный молочный продукт не содержит или по существу не содержит стойких органических загрязнителей (СОЗ), тяжелых металлов, рецептурных лекарственных средств, рекреационных лекарственных средств, немолочных аллергенов, клеток, гормонов или вирусов.

16. Культивированный молочный продукт по п.14, где клетки представляют собой человеческие эпителиальные клетки молочной железы (чЭКМЖ) или плазматические клетки (ПК).

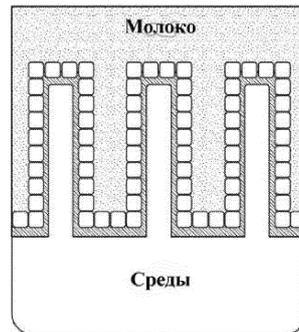
17. Культивированный молочный продукт по п.15, где клетки представляют собой эпителиальные клетки молочной железы или плазматические клетки человека.



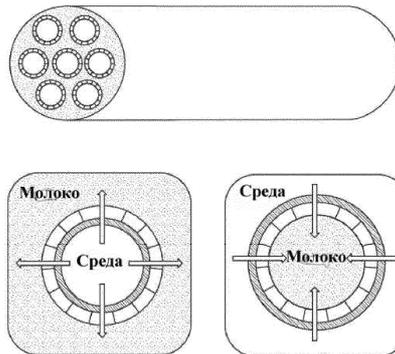
Фиг. 1



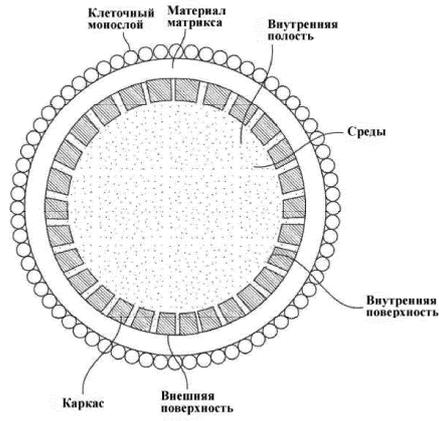
Фиг. 2



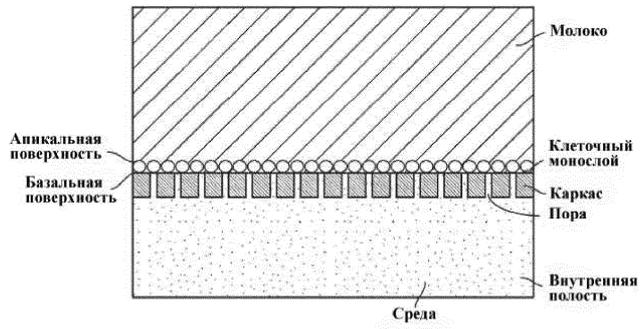
Фиг. 3



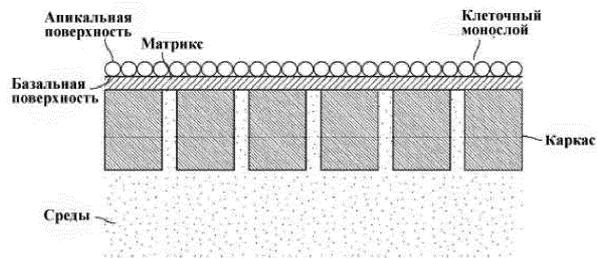
Фиг. 4



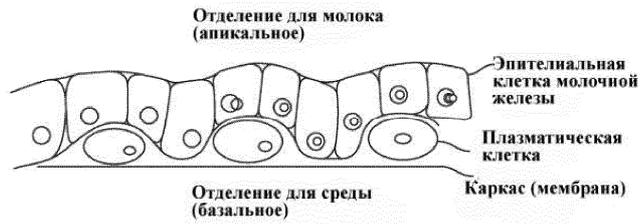
Фиг. 5



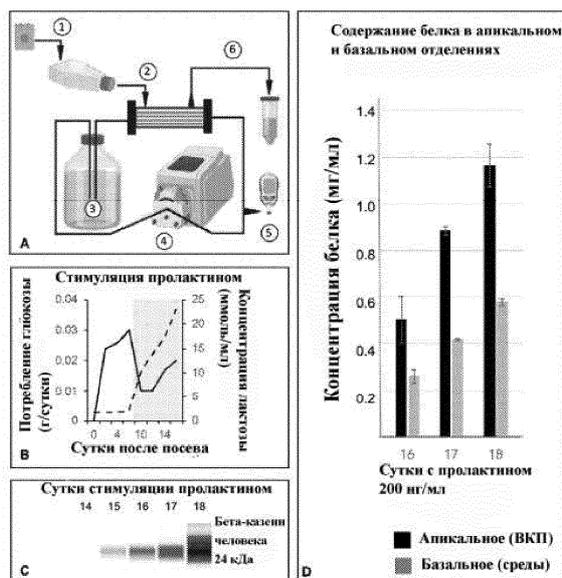
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

