MÉTODO PARA LA SÍNTESIS DE UNA MATRIZ TRIDIMENSIONAL POROSA COMESTIBLE Y ESTERILIZABLE ÚTIL PARA UNA PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA DE CARNE CULTIVADA

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un método para la síntesis a gran escala de una matriz tridimensional (3D) macroporosa comestible y esterilizable que comprende polímeros biocompatibles, con poros interconectados como material de soporte para un crecimiento, una proliferación y una diferenciación de células adherentes, que pueden ser utilizados para tejidos diseñados *in vitro,* también conocidos en la técnica como carne cultivada, carne de base celular, carne celular y/o carne limpia. Estas matrices son adecuadas para soportar la proliferación de tejido celular para aplicaciones biomédicas o alimentarias.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El crecimiento de la población humana, que se prevé que aumente continuamente (alcanzando los 9.770 millones en 2050 y 11.180 millones a final de siglo), traerá consigo una mayor producción de desechos y los requisitos nutritivos de nuestra especie continuarán creciendo, igual que nosotros. La carne se encuentra prominentemente entre los alimentos proteicos.

En los últimos 40 años, la producción global de carne ha crecido de forma significativa, debido principalmente al desarrollo de países. Este crecimiento ha limitado el sistema de producción, afectando de forma adversa al entorno en términos de recursos naturales (tierra y mar), salud humana (pandemias) y bienestar animal (sufrimiento animal), debido a lo cual el consumo de carne cultivada contribuye de forma significativa a la alimentación de todos los habitantes del planeta al ayudar a crear un sistema más sostenible. La FAO estima que en los siguientes 40 años la demanda de proteína animal y, a su vez, los retos para satisfacer esa demanda continuarán creciendo. El modelo actual de producción no podrá satisfacer esta demanda si no se combina con nuevas estrategias tales como la carne cultivada o carne producida mediante cultivo *in vitro* de células musculares extraídas anteriormente de un animal. En consecuencia, existe una necesidad de una solución para las demandas de alternativas a carne producida de animales vivos.

La mayoría de la investigación llevada a cabo sobre carne cultivada puede ser considerada variantes o aplicaciones de ingeniería tisular, que es la disciplina de biomedicina que, al combinar células, materiales y herramientas de diseño, intenta

diseñar estructuras biológicas funcionales para reparar, sustituir o regenerar tejidos dañados. El avance realizado en este campo está basado principalmente en el uso de matrices/estructuras tridimensionales para la proliferación tisular en una gran variedad de aplicaciones biomédicas tales como la regeneración de tejido óseo, tejido cardíaco, tejido hepático, etc.

La solicitud de patente US 2006/0121006 A1, relacionada con el uso de células animales cultivadas para la producción de productos nutricionales o terapéuticos en los que dichas células se derivan de especies poco comunes o en peligro de extinción. También se incluyen productos comestibles que contienen carne, adecuada para un consumo humano o no humano, ya sea como alimento o como suplemento alimentario. La invención también se refiere al uso de métodos de cultivo a gran escala para la proliferación de las células antes de ser añadidas a dichos productos. La invención abarca los métodos para la fabricación de los productos, los propios productos y los métodos de uso de los productos. Se muestra preferencia por el cultivo de células ancladas a soportes, en particular para soportes en forma de microestructuras (microesferas, fibras, etc.) de distintos materiales, tales como colágeno, quitina, poliestireno, poliéster o polipropileno, cuya elección dependerá del uso final del producto y de si la microestructura puede permanecer en el producto final o no.

Las matrices a base de polímeros naturales han demostrado un gran potencial para aplicaciones médicas y farmacéuticas. Las matrices formadas por estos biopolímeros, algunos con la capacidad de comportarse como un hidrogel, ofrecen una serie de ventajas en términos de biocompatibilidad y de biodegradabilidad en comparación con las matrices formadas de polímeros sintéticos. Gracias a sus propiedades inherentes, tales como su gran capacidad para absorber agua (aumento de volumen/hidratación), los hidrogeles biopoliméricos tienen capacidad de encapsular y liberar de forma eficaz una gran variedad de moléculas terapéuticas hidrófobas e hidrófilas de una forma controlada, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, anticuerpos, etc. En aplicaciones biomédicas, han sido utilizados, por ejemplo, para una encapsulación celular. Las células son normalmente mezcladas con la solución polimérica antes del proceso de gelación (formación del hidrogel). Este método hace que sea posible encapsular células individuales o una mezcla de diversos tipos de células en un cierto volumen de material polimérico, tanto esférico como en forma de fibras. La principal limitación de la encapsulación celular es mantener un equilibrio apropiado de difusión para transportar oxígeno y nutrientes a las células, debido a lo cual se han desarrollado estrategias que aumentan la porosidad y la permeabilidad del

hidrogel, dando lugar a hidrogeles porosos. La estructura porosa interna de estos hidrogeles permite una adhesión y una proliferación celulares.

La producción de matrices tridimensionales macroporosas que soportan la proliferación de distintos tipos de células para generar distintos tipos de tejidos es vital para un gran número de aplicaciones, tales como la medicina regenerativa (tejido óseo, tejido conectivo, tejido muscular…) o, últimamente, para la producción de carne cultivada, entre otros, aunque principalmente se ha llevado a cabo trabajo a pequeña escala y en una investigación básica. Normalmente, en la investigación de medicina regenerativa se ha propuesto que las matrices poliméricas concebidas para una regeneración tisular se degraden lentamente según se forma nuevo tejido.

Según se ha mencionado anteriormente, un campo en desarrollo en la biofabricación tiene como objetivo la producción de productos animales para consumo humano (es decir, carne cultivada) sin matar animales. Como tal, comparte el reto de producir grandes cantidades de células y suscita otros retos para matrices. Por lo tanto, sería beneficioso desarrollar un nuevo tipo de matriz con características que pueden incluir: (1) la matriz debería ser comestible, de forma que puedan ser incorporadas en el producto comestible final (por ejemplo, sin material sintético, sin productos químicos tóxicos utilizados para su formación); (2) las matrices necesitan haber sido formadas de una composición libre de productos de origen animal para garantizar que el producto final conserve su carácter no sacrificatorio de animales (por ejemplo, sin colágeno, gelatina, etc.); (3) la producción de las matrices necesita ser escalable y de bajo coste; y (4) las matrices pueden aportar características adicionales al producto final (por ejemplo, un beneficio gustativo, una sensación agradable en la boca, beneficios para la salud, es decir, un mayor contenido de fibras, etc.).

Uno de los principales retos de soportar un crecimiento a gran escala de carne cultivada utilizando la técnica de creación de matrices es la compatibilidad de las matrices con las técnicas de esterilización utilizadas en biorreactores de gran escala. Los procesos de esterilización se basan en una combinación de vapor, presión y tiempo y son operados a gran temperatura y presión para matar microorganismos y esporas. Las matrices conocidas en la técnica no son adecuadas para lograr este proceso sin perder sus propiedades para la ingeniería tisular.

Dada la creciente demanda de sustitutos de la carne obtenida directamente de animales, sería interesante desarrollar nuevos métodos para obtener matrices macroporosas comestibles, esterilizables y tridimensionales, útiles para obtener tejidos nutritivos también conocidos como carne cultivada, que superen las limitaciones

mencionadas anteriormente, principalmente que la matriz obtenida mantenga sus propiedades, tales como resistencia mecánica, porosidad e interconectividad de los poros, cuando estas matrices son sometidas a técnicas de esterilización utilizadas en biorreactores de cultivo de gran escala.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un método para obtener una matriz tridimensional macroporosa esterilizable que comprende al menos un polímero biocompatible y que también tiene poros interconectados, en donde la matriz tridimensional macroporosa esterilizable que puede obtenerse mediante el método divulgado en la presente memoria puede ser utilizada como un material de soporte para un crecimiento, una proliferación y una diferenciación de células adherentes, y puede aplicarse adicionalmente para la biofabricación de tejidos diseñados, también denominados o conocidos por el experto como carne cultivada, carne de base celular, carne celular y/o carne limpia, que son adecuados para un consumo humano y/o para aplicaciones de regeneración tisular.

El método de la invención permite obtener una matriz esterilizable sin perder sus propiedades, tales como resistencia mecánica, porosidad e interconectividad de los poros, como una matriz para una proliferación celular. La composición y la estructura de la matriz obtenida después de la etapa de esterilización son adecuadas para la adhesión celular y las etapas de reticulación y de esterilización no solo no cambian la aplicabilidad de los materiales debido a una posible degradación/desnaturalización, sino que incluso mejoran las propiedades mecánicas para soportar una proliferación celular.

Normalmente se utilizan métodos de esterilización, preferentemente mediante vapor caliente, en instalaciones sanitarias y en la producción de cultivos celulares en la industria farmacéutica, que tiene requisitos similares a los de la industria emergente de carne cultivada. Por lo tanto, la matriz obtenida mediante el método de la presente invención puede ser esterilizada mediante cualquier técnica conocida en la técnica para este fin, pero preferentemente mediante vapor caliente. Por consiguiente, esta matriz facilita su incorporación en procesos industriales que requieren un bajo coste y una producción de gran volumen, dado que puede ser utilizada en el interior de grandes biorreactores mientras se siguen usando los procedimientos comunes de esterilización de bajo coste ya implementados en biorreactores o fermentadores, preferentemente en biorreactores o fermentadores de acero inoxidable.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para

obtener una matriz tridimensional (3D) macroporosa esterilizable que comprende una red de al menos un polímero biocompatible reticulado internamente, en lo sucesivo método de la invención, comprendiendo el método las siguientes etapas:

a) preparar una disolución del al menos un polímero biocompatible,
b) verter la solución de la etapa a) en moldes y congelarla; preferentemente a una temperatura inferior a la temperatura de congelación de la solución,
c) liofilizar la matriz congelada obtenida en la etapa b),
d) curar la matriz liofilizada de la etapa c), y
e) esterilizar la matriz, preferentemente mediante vapor caliente.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos “matriz” o “soporte”, utilizados de forma intercambiable en toda la presente divulgación, están relacionados con una matriz tridimensional o un material que permite la fijación y la proliferación de las células, u otros compuestos tales como aditivos, según la presente invención. Según se utilizan en la presente memoria, “fijación”, “fijar” o “se fija” hacen referencia a células que se adhieren directa o indirectamente a la matriz, al igual que a células que se adhieren a otras células.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión “polímero biocompatible” hace referencia a un material/polímero sintético o natural que es, por ejemplo, no tóxico a sistemas biológicos y/o congruente con procesos biológicos. En este sentido, la biocompatibilidad de materiales poliméricos denota un riesgo mínimo, insignificante o nulo de rechazo inmunitario, lesión, daño y/o toxicidad a células, tejidos, órganos y/o sistemas biológicos vivos.

En una realización preferida, el polímero biocompatible es un polímero natural. En una realización ilustrativa, el polímero natural es uno cualquiera que pueda resistir un proceso de esterilización a presiones y temperatura elevadas sin una degradación y/o una desnaturalización. Por lo tanto, el polímero natural o cualquier derivado del mismo es, por ejemplo, sin limitación, polipéptidos, polinucleótidos, resinas naturales, cauchos, poliésteres naturales y polisacáridos. En una realización más preferida, se selecciona el polímero natural de la lista que consiste en: alginato, quitosán, almidón, dextrano, pululano, heparina, sulfato de heparina, celulosa, hemicelulosa, glucomanano, agar, xantano, goma guar, sulfato de condroitina, gelatina, quitina, un polisacárido, un glicosaminoglicano o cualquier combinación de los mismos. En una realización más preferida, el polímero natural se selecciona entre quitosán y/o alginato.

En el caso particular del uso de gelatina como polímero natural, no es esterilizable mediante vapor caliente y presión elevada dado que es hidrolizada

parcialmente y desnaturalizada si es sometida a estos procedimientos. En el caso de que este polímero natural o similares se encuentre en el interior de la matriz como pequeñas trazas mezcladas con otro biopolímero tal como quitosán, la modificación de las propiedades de la matriz es mínima, manteniendo aún sus propiedades adhesivas.

Estos polímeros naturales pueden ser utilizados directamente sin ningún tratamiento por parte de fuentes comerciales o, de forma alternativa, se pueden llevar a cabo modificaciones químicas antes de ser utilizados para mejorar las propiedades de la matriz de la presente invención, en cualquiera de las etapas de su producción. Según se utiliza en la presente memoria, el término “derivado” es un compuesto similar obtenido cambiando químicamente una parte de un compuesto pero que tiene las mismas propiedades, o incluso mejores, que el compuesto original. Por lo tanto, los derivados de los polímeros naturales de la presente invención hacen referencia a modificaciones químicas que comprenden la incorporación de distintos grupos tales como grupos amino, grupos aldehído, grupos de ácido carboxílico, grupos amida, grupos cetona, grupos éster, grupos alcoxi, grupos sulfato, grupos fosfato o similares.

La matriz obtenida mediante el método de la invención puede comprender el polímero natural mencionado anteriormente, que tiene la ventaja de estar compuesto de biopolímeros naturales autorizados para su uso alimentario por las instituciones competentes, tales como, por ejemplo, la U.S. Food and Drug Administration (FDA) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). En este sentido, los polímeros comestibles, esterilizables y biocompatibles utilizados en la matriz de la invención están diseñados de forma que la matriz sea comestible y no tenga que ser extraída del producto final; es decir, para evitar el proceso de recogida.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “comestible” hace referencia a materiales, preferentemente material alimentario concebido para un contacto oral o consumo mediante ingesta.

En la presente invención se recomienda encarecidamente evitar el uso de un polímero natural seleccionado de la lista que consiste en colágeno, albúmina (todos los tipos y las formas), caseínas, ácido hialurónico, fibrina, fibronectina y elastina, entre otros, dado que no son adecuados para un proceso de esterilización con vapor caliente o en autoclave.

En otra realización preferida, el polímero biocompatible es un polímero sintético o cualquier variante del mismo. Ejemplos de polímeros sintéticos incluyen, sin limitación, polipéptidos sintéticos de microorganismos o preparados mediante técnicas

de síntesis química, bioésteres, obtenidos de la extracción de microorganismos o preparados mediante síntesis química a partir de sus monómeros, tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poli(láctico-co-glicólico) y polihidroxialcanoatos, o cualquier otro polímero sintético preparado a partir de monómeros naturales reconocidos generalmente, tales como monosacáridos (tales como glucosa, fructosa, manosa, galactosa o cualquier derivado o variante, tal como glucosaminas, aminoazúcares, ... o similares), aminoácidos o cualquier derivado, nucleótidos o cualquier derivado, ácidos grasos o cualquier derivado, o similares en cualquier combinación.

En una realización más preferida, el peso molecular (Mw) de los polímeros biocompatibles, o cualquier derivado de los mismos, varía desde 1000 Da hasta 5000000 Da, preferentemente desde 10000 hasta 1000000 Da, más preferentemente desde 100000 hasta 500000 Da.

En una realización más preferida, el polímero biocompatible seleccionado, preferentemente un polímero natural según se ha mencionado anteriormente en la etapa a), se disuelve a la concentración requerida, en un disolvente seleccionado de la lista que consiste en: soluciones acuosas, disolventes orgánicos, medios de cultivo o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización preferida, los disolventes orgánicos se seleccionan de la lista que consiste en etanol, dioxano, acetona, ácido acético, alcohol isopropílico, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, ácido trifluoracético o cualquier otro, puro o como un codisolvente en soluciones acuosas en cualquier relación apropiada.

En otra realización preferida, los medios de cultivo hacen referencia a una solución que contiene nutrientes para soportar la supervivencia celular en condiciones en las que se pueden cultivar las células seleccionadas. Se seleccionan ejemplos de medios adecuados de cultivo entre medios clásicos disponibles comercialmente, tales como medio modificado Eagle de Dulbecco (DMEM, MEM) o cualquier variante del mismo, incluyendo medios de cultivo definidos específicamente para cada tipo de célula utilizado. En este sentido, el experto sabe que el medio específico de cultivo es adecuado para cada tipo de célula utilizado.

En otra realización preferida, la concentración del polímero biocompatible de la invención, o cualquier combinación del mismo, varía desde 0,5 % hasta 16 % (p/p), preferentemente entre 1 % y 8 %, más preferentemente entre 1,5 % y 4 % o, de forma alternativa, en cualquiera de las posibles relaciones relativas cuando hay más de un polímero biocompatible en la matriz final.

En otra realización preferida, el pH de la solución que comprende el disolvente y el polímero biocompatible puede ser neutro o puede ser un pH que puede variar desde 1 hasta 14, preferentemente desde 2 hasta 10, para mejorar la solubilidad del polímero dependiendo del polímero utilizado.

Para mejorar la solubilidad de los polímeros biocompatibles seleccionados, se puede aumentar la temperatura de la etapa a) desde la temperatura ambiente hasta 180 ºC. En una realización preferida, la temperatura varía desde 22 ºC hasta 70 ºC, más preferentemente desde 30 hasta 70 ºC, más preferentemente aún, desde 35 ºC hasta 65 ºC.

Para proporcionar una matriz con características mejoradas, puede formarse y/o combinarse con otras moléculas/sustancias/biomoléculas con un valor nutricional elevado o que produzcan una textura mejorada o añadan aroma al producto final. Para hacerlo, en la etapa a) puede añadirse a la solución, opcionalmente, cualquier compuesto, sustancia o biomolécula con capacidad para modificar o revestir la superficie de la matriz que ha de obtenerse. Estos compuestos o sustancias también pueden mejorar las propiedades de adhesión y la proliferación de las futuras células que pueden ser sembradas y cultivadas con la matriz. Estas sustancias son las denominadas moléculas de adhesión celular tales como la superfamilia de las inmunoglobulinas, cadherinas (E-, N-, P-, ...), selectinas (P-, E-, L-, ...) o integrinas; fibronectinas, poli-L-ornitina, colágeno, vitronectinas, lectina, poli-ornitina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, péptidos cíclicos, péptidos que contienen RGD (Arg-Gly-Asp), péptidos que contienen RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) o cualquier otro compuesto o sustancia reconocido por un experto en el campo que fomente la adhesión celular a la matriz.

Se puede utilizar cualquier técnica, reconocida por cualquier experto en este campo, para llevar a cabo la modificación de la superficie de la matriz porosa tridimensional, pero preferentemente se utiliza la inmersión de las matrices, manteniendo su forma y sus dimensiones iniciales o variando ligeramente sus dimensiones, en una solución acuosa o en un disolvente orgánico en el que se disuelven a cualquier concentración los agentes que han de adherirse. Si se requiere, se controla la temperatura de la solución entre 22 º y 180 ºC para mejorar el proceso de modificación de la superficie. El tiempo del proceso durará entre 1 min hasta 72 h dependiendo de la porosidad de la matriz, de la temperatura, de la concentración de la molécula/sustancia que ha de adherirse y del tipo de molécula/sustancia.

Se controlan las condiciones de modificación de la superficie para obtener una matriz porosa tridimensional con un grado de revestimiento entre 0,000001 % y 100 %.

Con este fin, en otra realización preferida del método de la presente invención, se puede añadir adicionalmente a la etapa a) al menos una molécula/sustancia/biomolécula seleccionada entre un aditivo, moléculas bioactivas y/o un agente reticulante, o cualquier combinación de los mismos para simplificar el proceso de fabricación de las matrices macroporosas tridimensionales esterilizables dadas a conocer en la presente memoria.

Por lo tanto, en otra realización preferida, el método de la presente invención comprende, además, ligandos bioactivos que pueden añadirse opcionalmente a la etapa a) o después de la etapa c) del método de la presente invención. Los ligandos bioactivos interactúan específicamente con una o más biomoléculas de células o unen biomoléculas que interactúan con biomoléculas de las células que se distribuyen en el interior de la matriz o que proliferan en el interior de la matriz, o migran al interior de la misma. Tales interacciones son eficaces para dirigir el destino celular o inducir que las células formen un tejido. Estos compuestos o sustancias también pueden mejorar las propiedades de adhesión y la proliferación de las futuras células que pueden ser sembradas y cultivadas con la matriz. La identidad de los ligandos bioactivos dependerá de la identidad de las células diana, y algunos ejemplos de ligandos bioactivos adecuados incluyen: carboxilo, amina, fenol, guanidina, tiol, indol, imidazol, hidroxilo, sulfato, norborneno, maleimida, laminina, fibrinógeno, secuencias de péptidos, moléculas de adhesión tales como la superfamilia de las inmunoglobulinas, cadherinas (E-, N-, P-, ...), selectinas (P-, E-, L-, ...) o integrinas: fibronectinas, poli-L-ornitina, colágeno, vitronectinas, lectina, poli-ornitina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, péptidos cíclicos, péptidos que contienen RGD, péptidos que contienen RGDS o cualquier otro compuesto o sustancia reconocido por un experto en el campo que fomente la adhesión celular a la matriz. Preferentemente, las moléculas bioactivas de la presente divulgación hacen referencia a aquellas sustancias que resisten el proceso de esterilización sin afectar de forma significativa a su capacidad para fomentar la adhesión celular. En una realización preferida, la molécula bioactiva es poli-L-lisina, más preferentemente, poli-ε-lisina (poli-épsilon-lisina).

La poli-ε-lisina (ε-poli-L-lisina, EPL) es un péptido catiónico antibacteriano que se da de forma natural, un homopolímero de L-lisina, que es soluble en agua, comestible, biodegradable y no tóxico para seres humanos y para el medioambiente. La poli-ε-lisina se utiliza normalmente como conservante alimentario natural, agente emulsionante, al igual que en la industria cosmecéutica y farmacéutica. En este sentido, la poli-ε-lisina se utiliza habitualmente en aplicaciones alimentarias, tales

como arroz hervido, verduras cocinadas, sopas, fideos, pescado en rodajas (sushi) y carne.

Esta es la primera vez que la poli-ε-lisina es utilizada como molécula bioactiva, preferentemente como ligando bioactivo para mejorar la adhesión celular en cultivos celulares *in vitro.* Según se utiliza en la presente invención, la poli-ε-lisina no solo se encuentra en la superficie de la matriz de la invención, sino también en su interior, siendo parte de la estructura tridimensional global de la matriz, permitiendo y mejorando, por lo tanto, la adhesión celular sobre la misma. Además, debido a la actividad antimicrobiana natural de la poli-ε-lisina contra levaduras, hongos y bacterias, ayuda a inhibir el crecimiento de tales microorganismos patógenos en la matriz de la invención.

Además, la poli-ε-lisina ya está disponible en grandes cantidades y a un precio económico para la industria alimentaria, permitiendo el uso industrializado de la misma en la producción de carne cultivada. Por lo tanto, esta propiedad junto con la ventaja sorprendente de las matrices de la invención caracterizadas porque son esterilizables, preferentemente mediante vapor caliente, sin degradación ni/o desnaturalización de los polímeros biocompatibles seleccionados para la composición de las mismas, hacen que sean adecuadas para una producción en reactores industriales de gran escala, que requieren, según se ha mencionado anteriormente, un coste muy bajo de producción.

Los aditivos incluyen, sin limitación, moléculas/sustancias con un valor nutricional elevado o que proporcionan una textura mejorada o añaden aroma al producto final según la presente invención y son, además, aquellas sustancias que resisten el proceso de esterilización sin afectar de forma significativa a su capacidad para fomentar la adhesión celular. El aditivo se selecciona de la lista que consiste en: un aroma, un potenciador del aroma, un colorante, un potenciador del color, sales, reguladores de la acidez, espesantes, emulsionantes, estabilizantes, un potenciador nutricional, tal como vitaminas, aminoácidos, fibra; fructooligosacáridos; inulinas; betacaroteno, ácidos grasos omega; espirulinas; probióticos, prebióticos, saponinas; antioxidantes; ácidos grasos esenciales; minerales; y similares, o cualquier combinación de los mismos. Los aditivos seleccionados para la matriz de la presente invención son, preferentemente, de origen o fuente natural. Adicionalmente, el término aditivo también abarca compuestos que mejoran las propiedades de adhesión y la proliferación de las futuras células que puedan ser sembradas en la matriz.

Ejemplos de grupos reticulantes adecuados son los grupos hidroxilo, grupos

carbonilo, grupos aldehído, grupo carboxilato, grupo carbonato, grupos carboxilo o derivados, grupos carboxamida, grupos imina, grupos imida, grupos tiol y/o cualquier otro grupo, polielectrolitos o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización preferida, los aditivos, las moléculas de adhesión y/o los agentes reticulantes pueden fijarse o unirse a la superficie de la matriz mediante fisisorción o quimisorción. El proceso de modificación de la superficie mediante la adición de aditivos, moléculas de adhesión y/o agentes reticulantes, no está limitado a las partes externas de la matriz porosa tridimensional, sino que, debido a su porosidad y a la tridimensionalidad intrínsecas, la modificación de la superficie se extiende a toda la superficie i) a la que la modificación es susceptible de ocurrir y ii) incluso en la parte más interna.

En otra realización preferida, los agentes reticulantes también son añadidos a la solución de la etapa a) del método de la invención. La adición de un reticulante a la solución de la etapa a) mejora las propiedades mecánicas, térmicas y/o de estabilidad de la matriz durante el proceso de producción. La reticulación formada de esta manera puede obtenerse químicamente, tal como enlaces covalentes que podrían requerir un agente reticulante o puede obtenerse mediante una reacción química entre los grupos funcionales de los polímeros utilizados, físicamente tal como mediante la generación de enlaces no covalentes o enzimáticamente. El proceso de reticulación puede realizarse mediante cualquiera de las técnicas reconocidas por un experto en este campo tales como: solución, tratamiento con rayos ultravioleta, radiación gamma, haz electrónico, tratamiento térmico, presión, tratamiento químico, tratamiento enzimático o similares.

Las condiciones de reticulación son controladas de forma que el grado de reticulación en las matrices macroporosas tridimensionales obtenidas varíe desde 0,0001 % hasta 100 %. Las matrices reticuladas son sometidas a distintas etapas de neutralización, de lavado intensivo (soluciones acuosas y/u otras), de secado y de congelación-liofilización para eliminar cualquier derivado no deseado en la matriz final.

La solución obtenida en la etapa a) del método de la presente invención, que comprende, además, al menos una molécula/sustancia/biomolécula seleccionada entre un aditivo, moléculas bioactivas y/o un agente reticulante, o cualquier combinación de los mismos, es lavada, filtrada y/o centrifugada para eliminar cualquier sólido y/o compuesto no disuelto y para eliminar adicionalmente las burbujas de aire.

Una vez se obtiene la solución de la etapa a), es necesario to adaptarla a la forma y a las dimensiones deseadas. Por lo tanto, en la etapa b) del método de la

invención, la disolución puede ser vertida en moldes y someterla después a un proceso de congelación, u otra posibilidad es el uso de otras técnicas de conformación tales como darle forma mediante extrusión directamente a temperaturas de congelación. Según la organización de estándares internacionales ASTM, extrusión es el nombre oficial dado a un proceso específico de impresión tridimensional en donde se distribuye el material de forma selectiva a través de una boquilla o un orificio.

En el caso de utilizar los moldes, pueden seleccionarse para conferir a la matriz la forma deseada. En una realización preferida, la forma de la matriz de la presente invención puede ser regular (por ejemplo, cilíndrica, esférica, redondeada, rectangular, cuadrada, piramidal, prismática, cónica, etc.) o irregular. En otra realización preferida, el tamaño de los moldes varía en el intervalo de 100×100 µm hasta 10×10 cm (*a*×*b*), preferentemente 1×1 mm hasta 5×5 mm, más preferentemente 1×1 cm hasta 3×3 cm para mejorar la proliferación celular y la formación tisular. Las dimensiones pueden variar dentro de los intervalos indicados en una forma irregular, siendo *a* distinta de *b.* Por ejemplo, la **Fig. 1** ilustra variaciones de matrices que tienen formas cilíndricas. Cualquiera de estas formas puede ser porosa.

En la realización particular para obtener la conformación de la matriz de la invención mediante extrusión, se mantiene la solución de la etapa a) a una temperatura baja que varía desde 0 hasta 5 ºC y posteriormente es bombeada al interior del extrusor e impresa en una superficie congelada desde -15 hasta -80 ºC, en donde las gotas se congelan inmediatamente según se muestra en la **Fig. 2.** El recuadro de la **Fig. 2** muestra una imagen óptica de la matriz obtenida mediante el método de la invención obtenida mediante extrusión.

Según se ha mencionado anteriormente, existe un gran número de variables que determinarán las propiedades finales de las matrices obtenidas mediante el método de la presente invención, incluyendo el grado de reticulación, la composición de la solución de polímero biocompatible (es decir, si hay un único polímero o mezclas de los mismos), temperatura de gelación y la duración y la temperatura del proceso de congelación.

En este sentido, el tamaño final del poro de la matriz de la invención se ve influido por la concentración del polímero utilizado en la etapa a) del método de la presente invención. Además, los polímeros con un comportamiento de hidrogel, con una concentración polimérica elevada, dan lugar a tamaños más pequeños de poro. En este caso, el proceso de producción de la matriz porosa tridimensional proporciona un intervalo de tamaño longitudinal de poro entre 50 µm y 10.000 mm, preferentemente

100 µm a 1000 µm, más preferentemente 100 y 500 µm. En realizaciones particulares, el tamaño longitudinal medio de poro se encuentra en el intervalo de 50 a 1000 µm, 100 µm a 1000 µm o 100 µm a 500 µm. Para obtener macroporos, se puede utilizar un molde específico en el método para la producción de la matriz de la invención, lo que hace que sea posible obtener poros transversales. El tamaño medio del macroporo transversal varía desde 1 µm hasta 10000 µm y, preferentemente, estos macroporos transversales están ubicados por todo el volumen de la matriz.

La disposición de poros longitudinales, obtenida mediante la formación de cristales de agua (disolvente), junto con los macroporos transversales permite la obtención de hidrogeles con estructuras porosas interconectadas y jerárquicas.

Además, un factor importante que ha de ser tenido en cuenta en la formación de la matriz porosa mediante técnicas de congelación, es el porcentaje en peso/volumen de los polímeros biocompatibles utilizados. En una realización preferida, el porcentaje en peso/volumen del polímero biocompatible seleccionado varía desde 0,5 % hasta 16 %. En otra realización preferida, el porcentaje en peso/volumen varía desde 1 % hasta 8 %, más preferentemente varía desde 1,5 % hasta 4 %, más preferentemente aún un 1,5 %, en soluciones acuosas, disolventes orgánicos, medios cultivados o en cualquier combinación de los mismos.

Otro factor importante que ha de ser tenido en cuenta en la formación de la matriz porosa mediante técnicas de congelación es la temperatura, preferentemente en la etapa a) para obtener la disolución y también en la etapa b) de congelación. En este sentido, cuando se lleva a cabo la congelación a temperaturas muy bajas, preferentemente a una temperatura que varía desde -15 ºC hasta -80 ºC, el disolvente se cristaliza más rápidamente, dando lugar a la nucleación de cristales más pequeños de disolvente. Normalmente, se congela la solución de gel a temperaturas que varían entre -5 ºC y -20 ºC. A estas temperaturas, se cristaliza un gran porcentaje del disolvente; sin embargo, una porción del gel permanece en el estado líquido. Según se cristaliza el disolvente, los componentes poliméricos se concentran en microfases líquidas en vez de permanecer en la macrofase cristalizada. Por lo tanto, según aumenta la cristalización del disolvente, las microfases líquidas se concentran más, dando lugar a paredes de poro más densas y delgadas. Las temperaturas utilizadas en el método de la presente invención, que varían, preferentemente, desde -20 ºC hasta -80 ºC son consideradas temperaturas válidas de congelación para la formación de matrices de la presente invención.

Una vez se vierten las soluciones en los moldes, se dejan estos para que

alcancen la temperatura ambiente, si se requiere. En otra realización preferida, los moldes que comprenden las soluciones son congelados a una temperatura que varía desde -20 ºC hasta -80 ºC, durante un periodo que dura, preferentemente, desde 16 hasta 48 horas. Esta matriz tridimensional macroporosa, formada a una temperatura inferior a la temperatura de congelación de la disolución, muestra una facilidad de formación en comparación con otras técnicas de formación de estructura macroporosa, lo que la hace fácilmente escalable a una producción industrial. Además, la obtención de los macroporos a temperaturas inferiores a la temperatura de congelación del disolvente, evita ciertos riesgos, tales como la citotoxicidad de ciertos agentes porógenos, como en el caso de la formación de estructuras tridimensionales utilizando otras técnicas. Para obtener tamaños más grandes de poro, se puede utilizar un molde específico, lo que hace que sea posible obtener poros transversales que varían desde micrómetros hasta milímetros (en todo el volumen de la matriz). La disposición de poros longitudinales, obtenida mediante la formación de cristales de disolvente, junto con los poros transversales, permite la obtención de hidrogeles con estructuras porosas interconectadas y jerárquicas.

En una etapa adicional del método de la invención, la liofilización de la etapa c) se lleva a cabo durante un periodo que varía, preferentemente, desde 16 hasta 96 horas, preferentemente desde 24 hasta 72 h, más preferentemente desde 18 hasta 24 h a una temperatura de condensación que varía desde 25 ºC hasta -100 ºC, preferentemente desde 25 ºC hasta -100 ºC, más preferentemente desde 20 ºC hasta -50 ºC, y más preferentemente desde -15 ºC hasta -45 ºC, y a una presión de 0,01 hasta 0,026 Pa (2,6 x 10^{-4} mbar) más preferentemente 100 hasta 40 Pa (desde 1 hasta 0,4 mbar), más preferentemente 20 hasta 40 Pa (desde 0,2 hasta 0,4 mbar). Los parámetros utilizados en el proceso de liofilización, tales como la duración, la temperatura y la presión, son seleccionados de una forma que las matrices pierdan al menos un 98 % del agua inicial. Véase la **Fig. 3,** en donde el diagrama de fases del agua indica el punto triple cuando se produce la liofilización. Para contribuir a la sublimación, se pueden calentar estantes liofilizados hasta 20 ºC. Se recomienda una diferencia de temperatura de 15 ºC hasta 20 ºC entre la muestra y el condensador.

En una realización más preferida, después de que se liofiliza la matriz, podría ser sometida, opcionalmente, a distintas etapas de neutralización si es necesario, tales como: un lavado intensivo (soluciones acuosas y/u otras) para eliminar cualquier derivado no deseado en la matriz final. Esta matriz podría ser sometida, opcionalmente, a un secado y a congelación-liofilización posteriores, si es necesario

para fines de almacenamiento.

En otra realización preferida del método de la presente invención, se puede añadir adicionalmente a las matrices liofilizadas obtenidas al menos una molécula/sustancia/biomolécula seleccionada entre un aditivo, moléculas bioactivas y/o un agente reticulante, o cualquier combinación de los mismos, según se ha mencionado anteriormente, para proporcionar una nueva matriz con las ventajas mencionadas en la presente memoria.

En otra realización preferida, una vez obtenidas las matrices liofilizadas que comprenden las moléculas/sustancias/biomoléculas mencionadas anteriormente, el método comprende, además, el lavado de la matriz y la repetición, opcional, de las etapas b) a c), tantas veces como el experto considere necesario.

A continuación, se somete a las matrices liofilizadas a un procedimiento de curado, preferentemente a un procedimiento de curado térmico, para inducir la reorganización de los componentes de las matrices y para fomentar o mejorar sus propiedades mecánicas, térmicas y/o de estabilidad del producto final.

En una realización preferida, el tratamiento térmico comprende el curado de la matriz liofilizada a una temperatura que varía desde 30 ºC hasta 180 ºC, preferentemente desde 50 ºC hasta 130 ºC, más preferentemente desde 60 ºC hasta 100 ºC; durante un periodo de tiempo que varía desde 1 minuto hasta 48 horas, preferentemente desde 30 minutos hasta 8 horas, más preferentemente desde 1 hora hasta 5 horas. Las temperaturas y las duraciones seleccionadas deberían evitar la descomposición de los componentes poliméricos de la matriz y/o de los distintos aditivos utilizados, tales como agentes de adhesión celular, reticulantes o similares, utilizados en la producción de las matrices.

En general, las matrices liofilizadas son curadas en hornos. Durante el proceso de curado en los hornos, se controlan el grado de ventilación y la humedad relativa mediante la incorporación de sistemas internos de regulación.

Las matrices macroporosas tridimensionales obtenidas mediante el método mencionado en la presente memoria son esterilizadas antes del proceso de siembra celular. El proceso de esterilización se lleva a cabo mediante el tratamiento de las matrices, preferentemente, mediante esterilización física, esterilización química o cualquier otro método conocido en la técnica y autorizado por las agencias reguladoras en el campo de los alimentos y la biomedicina.

En particular, el proceso de esterilización física comprende vapor caliente, calor seco, tindalización y radiación ionizante o no ionizante, por ejemplo radiación UV para

superficies, rayos x para líquidos, aunque este procedimiento es muy costoso y plantea problemas de seguridad.

En una realización preferida para esterilizaciones económicas a gran escala de líquidos y de equipos, el proceso de esterilización física es vapor caliente. En una esterilización con vapor caliente, la temperatura varía desde 110 ºC hasta 140 ºC y las duraciones desde 5 minutos hasta 40 minutos. El proceso de esterilización química también comprende la esterilización mediante la aplicación de alcoholes, por ejemplo, etanol-agua al 70 % (pH=2), aldehídos, fenoles, óxido de etileno (gas), peróxido de hidrógeno, hipoclorito sódico al 3 %, o similares.

Por lo tanto, mediante el método de la presente invención se obtiene una matriz que puede estar constituida por al menos un polímero biocompatible, preferentemente por un polímero natural biocompatible o mezclas de los mismos, autorizado para un uso alimentario, que tiene una estructura tridimensional y un área superficial grande, que puede servir de soporte para células animales en la producción de carne cultivada, incluso en biorreactores de gran escala, y que puede permanecer en el producto final debido a que está compuesta de un biopolímero natural autorizado para su uso alimentario. Además, la matriz obtenida es/puede ser esterilizada, preferentemente mediante vapor caliente sin perder ninguna de sus propiedades. En este sentido, el método de la invención es adecuado para integrarse en una línea de producción de carne cultivada, contribuyendo a la producción de matrices que pueden ser utilizadas posteriormente en el proceso de producción de carne cultivada; por ejemplo, en el interior de biorreactores.

Por lo tanto, en un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una matriz, en lo sucesivo matriz de la invención, obtenida mediante el método de la presente invención.

En una realización preferida, la matriz es una matriz tridimensional macroporosa comestible y esterilizable de ingeniería tisular que comprende una red de al menos un polímero biocompatible, según se ha mencionado anteriormente.

Uno de los principales retos de soportar un crecimiento a gran escala de carne cultivada utilizando la técnica de creación de matrices es la compatibilidad de las matrices con las técnicas de esterilización utilizadas en biorreactores de gran escala, según se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, las matrices obtenidas mediante el método de la presente invención están adaptadas para lograr un proceso rentable para producciones de gran volumen de productos alimentarios. Según se ha mencionado anteriormente, el proceso de esterilización está basado en una

combinación de vapor, de presión y de tiempo. El proceso de esterilización se lleva a cabo mediante vapor caliente en un autoclave o biorreactor a temperaturas que varían desde 121 ºC hasta 134 ºC (250°F hasta 273°F), y a una presión que varía desde 50 hasta 105 kPa (0,5 hasta 1,05 bar), durante un tiempo que varía desde 10 hasta 60 min, más preferentemente, la esterilización mediante vapor caliente se lleva a cabo durante 20 min a una temperatura de al menos 121 ºC y a una presión de 105 kPa (1,05 bar) para matar microorganismos y esporas. Las matrices conocidas en la técnica no son adecuadas para lograr este proceso sin perder sus propiedades para la ingeniería tisular.

Al contrario, la matriz de la invención tiene la ventaja sorprendente de ser esterilizable, dado que los polímeros biocompatibles seleccionados para la composición de la misma son capaces de resistir presiones elevadas de vapor de agua a temperaturas elevadas sin una degradación ni/o desnaturalización. Es importante hacer notar que la matriz de la invención mantiene intacta su composición y su estructura después de ser sometida a un proceso de esterilización, permitiendo una adhesión y una reticulación celulares apropiadas. Adicionalmente, el proceso de esterilización de la matriz de la invención no solo no cambia la aplicabilidad de los materiales debido a una posible degradación y/o desnaturalización, sino que incluso mejora las propiedades mecánicas para soportar una proliferación celular. Por lo tanto, la matriz de la invención podría ser esterilizable mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica, incluyendo vapor caliente, sin perder sus propiedades como matriz para la proliferación celular, facilitando su incorporación en procesos industriales que requieren un bajo coste y una producción de gran volumen.

La matriz obtenida mediante el método de la presente invención que comprende los aditivos y/o los compuestos reticulantes mencionados anteriormente, puede comprender, además, células vivas, preferentemente células vivas no humanas, que son distribuidas de forma homogénea en toda la matriz.

Las células utilizadas para un cultivo en toda la matriz de la invención para proporcionar el tejido con un contenido nutritivo elevado y/o la carne cultivada descrita en la presente memoria, pueden incluir, sin limitación, por ejemplo, células musculares, preferentemente células musculares lisas; células musculares esqueléticas, células estromales, células endoteliales, células satélite, células de fibroblastos, células de mioblastos, células adiposas tales como células progenitoras de adipocitos, cardiomiocitos, hepatocitos, etc. Gracias a su estructura, la matriz de la invención permite la proliferación y la diferenciación de diversos tipos de células tales como,

entre otros, mioblastos/miotubos/fibroblastos (células musculares), adipocitos (células adiposas), produciendo carne cultivada adecuada para el consumo humano con el contenido deseado de proteína-grasa por parte del consumidor final como el producto final.

En una realización preferida adicional, los cultivos de líneas celulares vivas en toda la matriz podrían obtenerse de diversas fuentes animales, tales como, sin limitación, mamíferos tales como porcino, bovino, ovino, caballo, perro, gato; aviar; reptil; pez; anfibios; crustáceos; cefalópodos o similares. Esto abre las puertas a un mercado inmenso, dado que brinda una oferta muy diversa a los consumidores finales.

En otra realización preferida, la matriz es saturada con un medio de cultivo celular, para facilitar la proliferación o la supervivencia celular, es decir un medio de crecimiento celular. En algunas realizaciones, la matriz puede impregnarse con una biomolécula u otro material concebido para su administración al alimento, preferentemente carne. En una realización más preferida, el medio de crecimiento celular es cualquier medio adecuado que contenga nutrientes para soportar la supervivencia celular en condiciones en las que puedan crecer las células seleccionadas. Se seleccionan ejemplos de medios adecuados de cultivo entre cualquier medio clásico disponible comercialmente, tal como medio modificado Eagle de Dulbecco (DMEM, MEM) y cualquier variante del mismo o medios definidos específicamente de cultivo para cada tipo de célula utilizado.

La matriz comestible y esterilizable obtenida mediante el método de la invención es apropiada para la biofabricación de tejido de contenido nutritivo y/o de carne cultivada para consumo humano. Aunque las matrices y los métodos de formación y de su uso descritos en la presente memoria están dirigidos principalmente a productos cárnicos comestibles diseñados, tal matriz también podría hallar aplicación en la medicina regenerativa y de terapia celular animal (y, particularmente, humana) cuando se desea realizar una expansión celular en ausencia de productos derivados de animales. Por ejemplo, en la presente memoria se describen matrices tridimensionales macroporosas comestibles y esterilizables de ingeniería tisular para su uso en la formación de un producto cárnico cultivado.

Además, gracias a la estructura macroporosa de la matriz obtenida mediante el método de la invención, se permite el transporte de nutrientes, facilitando, de ese modo, la adhesión y la proliferación celulares, y dando lugar a una materia prima que puede ser procesada subsiguientemente en alimentos preparados para su consumo. Además, la matriz distribuye las células en el espacio tridimensional completo. Hasta

ahora, estas matrices nunca habían sido contempladas para este fin, dado que la técnica de producción a gran escala de carne cultivada se encuentra en sus comienzos. El concepto de esta matriz para producir carne cultivada es novedoso y la aplicación de los materiales utilizados para obtener la matriz, en esta forma de matriz comestible y esterilizable muy porosa, también es novedosa.

Por lo tanto, el polímero biocompatible utilizado en la matriz de la presente invención según se ha mencionado anteriormente y, por consiguiente, la matriz de la invención que lo comprende, tienen las siguientes ventajas:

(i) también es utilizado como aglutinante, dando a la carne cultivada una textura y una compactación mejores.

(ii) mejora la dispersión, la biodisponibilidad y la absorción de nutrientes en la etapa de proceso digestivo;

(iii) teniendo en cuenta que el polímero biocompatible podría ser un biopolímero con propiedades de hidrogel, la matriz en donde se cultivan las células también puede proporcionar una textura agradable al paladar y al tacto;

(iv) también puede actuar como un potenciador del aroma y del color, dado que actúa *per se* como un sistema de liberación similar a un sistema (vehículo) de liberación de fármacos;

(v) también actúa como un sistema de suministro selectivo para ciertos nutracéuticos y/o aminoácidos libres, abriendo, de ese modo, un amplio abanico de posibilidades para utilizar estas estructuras comestibles como posibles vehículos de vitaminas, minerales, ácidos nucleicos u otras biomoléculas.

La matriz de la invención satisface requisitos fundamentales de la ingeniería tisular, incluyendo: los macroporos muy interconectados fomentan la difusión de nutrientes y facilitan la proliferación, la difusión, la migración celulares y la comunicación entre células, también la migración celular; una gran área superficial interna produce una gran capacidad para la proliferación de células; distribuir células tridimensionalmente; facilitar el transporte de nutrientes; soportar la migración y la proliferación celulares; y facilitar el soporte mecánico para la nueva producción de tejidos.

Las matrices de la presente invención, según se ha descrito anteriormente, son adecuadas para una variedad de aplicaciones, incluyendo la medicina regenerativa y la ingeniería tisular. Las matrices son particularmente útiles como ingeniería tisular.

Por lo tanto, pueden ser utilizadas para facilitar la proliferación celular y la formación de tejido. La macroporosidad es adecuada para permitir una migración celular, la formación de la matriz intracelular, el suministro de nutrientes, la angiogénesis y similares. Según se ha mencionado en la presente memoria, el material de la matriz es biocompatible.

Adicionalmente, la matriz de la invención es compatible con diversos tipos de reactores o biorreactores, incluso aquellos en los que se aplicarán corrientes eléctricas para estimular la proliferación celular, debido a lo cual también dichas matrices son eléctricamente conductoras.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención hace referencia al uso *in vitro* de la matriz de la presente invención en la formación de productos cárnicos cultivados a partir de células cultivadas.

En una realización preferida, la carne cultivada se caracteriza porque las células cultivadas se seleccionan de la lista que consiste en: mamíferos, aves, peces, reptiles, crustáceos, cefalópodos y anfibios.

En otra realización preferida, la carne cultivada se caracteriza porque las células son, preferentemente, células musculares y, opcionalmente, comprende, además, una pluralidad de células satélite, células estromales, células de mioblastos, células de fibroblastos, células endoteliales, células adiposas, hepatocitos, cardiomiocitos o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización preferida, la carne cultivada se caracteriza porque comprende, además, células adiposas, células satélite, fibroblastos, mioblastos o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización preferida, la carne cultivada se caracteriza porque comprende, además, al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en un aroma, un potenciador del aroma, un colorante, un potenciador del color, un potenciador nutricional o cualquier combinación de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención también hace referencia a un procedimiento de formación de carne cultivada mediante el cultivo de células vivas, preferentemente células musculares con la matriz de la presente invención, teniendo lugar el cultivo en un biorreactor adecuado y en presencia de un medio adecuado de cultivo de nutrientes.

Adicionalmente, un hecho particularmente innovador es que la matriz de la presente invención puede actuar como una portadora para una gran variedad de suplementos alimentarios, tales como, por ejemplo, fibra, vitaminas, aminoácidos o

similares, y es adecuada para procesos de esterilización sin perder las propiedades de creación de matrices de ingeniería tisular.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la matriz de la presente invención como portadora.

En este texto, no se debería entender el término "comprende" y sus derivados (tales como "comprendiendo", etc.) en un sentido excluyente, es decir, no se debería interpretar que estos términos excluyan la posibilidad de que lo que se describe y define pueda incluir elementos, etapas adicionales, etc.

Por otra parte, la invención, evidentemente, no está limitada a la o las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, sino que también abarca cualquier variación que pueda ser considerada por cualquier experto en la técnica (por ejemplo, en lo referente a la elección de materiales, dimensiones, componentes, configuración, etc.), dentro del alcance general de la invención, según se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para completar la descripción y para permitir una mejor comprensión de la invención, se proporciona un conjunto de dibujos. Dichos dibujos forman parte integral de la descripción e ilustran una realización de la invención, que no debería interpretarse que restrinja el alcance de la invención, sino que es únicamente un ejemplo de cómo puede llevarse a cabo la invención. Los dibujos comprenden las siguientes figuras:

Figura 1. Matrices cilíndricas de distintas alturas y distintos diámetros formadas mediante moldeo. Las matrices a), b) y c) se corresponden con los Ejemplos 1, 2 y 3, respectivamente.

Figura 2. Descripción esquemática de una extrusión en una superficie congelada. El recuadro muestra los microgránulos finales que pueden producirse mediante este método.

Figura 3. Diagrama de fases de agua que indica el punto triple, produciéndose el proceso de liofilización por debajo de este punto triple.

Figura 4. Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) de matrices porosas del Ejemplo 1 (**4a**), del Ejemplo 2 (**4b**) y del Ejemplo 3 (**4c**) antes de la siembra celular. Proliferación tisular sobre matrices del Ejemplo 1 (**4d**), del Ejemplo 2 (**4e**) y del Ejemplo 3 (**4f**).

Figura 5. Estudios de porosimetría de mercurio (Hg) antes (**A**) y después (**B**) del proceso de esterilización de la matriz dada a conocer en el Ejemplo 1. Datos de la

porosidad total y del área superficial total.

Figura 6. Estudios de porosimetría de mercurio (Hg) antes (**A**) y después (**B**) del proceso de esterilización de la matriz dada a conocer en el Ejemplo 2. Datos de la porosidad total y del área superficial total.

Figura 7. Estudios de porosimetría de mercurio (Hg) antes (**A**) y después (**B**) del proceso de esterilización de la matriz dada a conocer en el Ejemplo 3. Datos de la porosidad total y del área superficial total.

Figura 8. Espectros de FTIR (*Fourier Transform-Infrared Spectroscopy*, espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier) de muestras antes (línea superior) y después (línea inferior) del procedimiento de esterilización correspondientes a matrices de los Ejemplos 1 (**8A**), 2 (**8B**) y 3 (**8C**), respectivamente.

Figura 9. La figura muestra el consumo de glucosa (expresado como g/l) en distintos tiempos de ensayo (expresados como días) por las células de mamífero sembradas en la matriz obtenida en los Ejemplos 1 a 3 de la invención (Ej 1, Ej 2 y Ej 3, en la leyenda) en comparación con la glucosa inicial (inicial, en la leyenda) y los controles de cultivo celular en ausencia de las matrices de la invención (control, en la leyenda).

EJEMPLOS

Siguen, a continuación, ejemplos de la invención por medio de ensayos llevados a cabo por los inventores, que evidencian la eficacia del producto de la invención. Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no debe considerarse que limiten el alcance de la misma.

Ejemplo 1. Síntesis de una matriz, mediante el método de la invención, que comprende quitosán como polímero biocompatible

En un método típico de producción de la matriz tridimensional macroporosa comestible y esterilizable que será igualmente válido para otros polímeros biocompatibles y mezclas de los mismos, se disolvieron MEM Eagle comercial (medio mínimo esencial de Eagle) con BSS de Earle con aminoácidos no esenciales y L-glutamina, sin calcio en polvo (que oscila entre 0-600 mg, para lograr 0-200 % en relación con el peso de quitosán, más preferentemente 75 mg, 10 % en relación con el peso de quitosán), en ácido acético (0,1 M, 50 ml) y se añadió lentamente quitosán (750 mg, 1,5 %) con agitación. La mezcla fue agitada hasta que se obtuvieron soluciones homogéneas (65 ºC, 2 horas) y se vertió la solución en moldes para proporcionar la forma y las dimensiones deseadas. Todas las muestras fueron congeladas a -20 ºC durante 24 horas y liofilizadas a -40 ºC durante 72 horas, a una presión de 26,3 Pa (0,263 mbar).

Este es un método para la fabricación de matrices con formas controladas, que serán determinadas por el receptáculo en donde se lleve a cabo el proceso.

Se retiraron las matrices de los moldes y fueron colocadas en el interior del horno a 135 ºC durante 1 hora sin ventilación (el curado comienza precalentando el horno a 45 ºC; en cuanto el horno alcanza 135 ºC comienza el tiempo; después de 1 hora se deja que las matrices alcancen la temperatura ambiente en el interior del horno; lleva aproximadamente 1 h 30 minutos. En esta etapa, se lavaron las matrices con agua milliQ (3×100 ml durante 15 minutos), $NaHCO_3$ 0,1 M (3×100 ml durante 15 minutos) y agua (3×100 ml durante 15 minutos).

Los resultados muestran que la matriz obtenida mediante el método de la invención que comprende polvo de MEM (0 %) pierde su consistencia cuando es sumergida en agua. Por lo tanto, parece que la temperatura y el tiempo de reticulación no fueron suficientes para obtener una matriz con las propiedades deseadas en cuanto a la resistencia mecánica y el aspecto. Sin embargo, los resultados muestran que las matrices restantes que comprenden distintas concentraciones de MEM (1 %, 8 %, 16 %, 33 %, 133 %, 200 %, más preferentemente 8 %) presentan una buena consistencia y no pierden su forma. Estos datos indican que los componentes del MEM también actúan como reticulantes, proporcionando consistencia a las matrices, frangibles de lo contrario.

Posteriormente, se esterilizaron las matrices con una concentración de MEM del 8 % en un autoclave a 121 ºC, 105 kPa, durante 20 minutos y fueron sometidas a ensayo. Las matrices son estables, y se ha producido cierto grado de reticulación debido a que las matrices no aumentan excesivamente de volumen; es decir, la reticulación reduce el aumento de volumen.

La macroporosidad de estas matrices obtenidas con un porcentaje en peso/volumen del polímero quitosán (1,5 %), podría controlarse y muestra un volumen poroso elevado y una porosidad total de un 90 % dando lugar a muestras similares a espuma. La matriz optimizada presenta un volumen y un tamaño elevados de macroporosidad interconectada en el intervalo de 1-500 µm como puede observarse mediante formación de imágenes digitales (**Fig. 1a**) y SEM (**Fig. 4a**).

En la **Fig. 5** se muestra el análisis de porosidad por intrusión de Hg (mercurio) de la matriz obtenida en el presente ejemplo. Se utiliza esta técnica para analizar la porosidad conectada total, el volumen de los poros, la distribución del tamaño de poro y el área superficial de materiales sólidos y en polvo. El instrumento, conocido como porosímetro, emplea una cámara a presión para obligar al mercurio a introducirse en

los vacíos en un sustrato poroso. Según se aplica presión, el mercurio llena primero los poros más grandes. Según aumenta la presión, el llenado prosigue a poros cada vez más pequeños. Tanto los poros interparticulares (entre las partículas individuales) como los poros intraparticulares (en la propia partícula) pueden caracterizarse utilizando esta técnica. Se monitoriza el volumen de mercurio que ha entrado en la muestra mediante un cambio de capacitancia en una célula analítica capilar revestida con una capa de metal denominada penetrómetro. Se mantiene la muestra en una sección de la célula penetrométrica, que está disponible en una variedad de volúmenes para acomodar polvo o trozos sólidos intactos. El tamaño de la muestra está limitado a unas dimensiones de aproximadamente 2,5 cm de longitud por 1,5 cm de anchura. Se utilizó esta potente técnica para analizar el cambio en la naturaleza porosa de la matriz antes (**Fig. 5A**) y después (**Fig. 5B**) de la esterilización de los trozos. Como puede verse en la **Fig. 5,** los resultados muestran una ligera reducción del volumen de poro total y del área superficial total debido a la contracción con respecto a la etapa de esterilización. No obstante, los valores después de la esterilización son más que adecuados para la aplicación que muestra el correcto intervalo de volumen de poro y un área superficial elevada disponible para una colonización celular.

Para demostrar que se han producido modificaciones no químicas durante un procedimiento de esterilización con vapor caliente que podrían poner en peligro la idoneidad de las matrices para un cultivo celular, se han analizado las matrices antes y después de la esterilización mediante FTIR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier). La FTIR es una técnica analítica para identificar materiales orgánicos (y, en algunos casos, inorgánicos). Esta técnica mide la absorción de radiación infrarroja por el material de la muestra en función de la longitud de onda. Las bandas de absorción infrarroja identifican componentes y estructuras moleculares. Como puede verse en la **Fig. 8A,** no hay cambios en la forma ni en la posición del espectro de bandas antes y después del proceso de esterilización, demostrando la idoneidad de la identidad química de las matrices.

Ejemplo 2. Síntesis de una matriz, mediante el método de la invención, que comprende alginato como polímero biocompatible y revestida con poli-ε-lisina

Se añadió lentamente a agua (200 ml) sal sódica de ácido algínico (Sigma-Aldrich) a una concentración de 2,0 g con una agitación enérgica. Se agitó la mezcla a 50 ºC durante 3 horas hasta que se obtuvo una solución homogénea y transparente. Se dejó que la solución alcanzase la temperatura ambiente.

A continuación, se vertió la solución en moldes para proporcionar la forma y las

dimensiones deseadas. Todas las muestras fueron congeladas a -20 ºC durante 24 horas y liofilizadas a -40 ºC durante 72 horas a una presión de 26,3 Pa (0,263 mbar).

Las matrices liofilizadas obtenidas fueron retiradas de los moldes y sumergidas en una solución acuosa de cloruro cálcico al 2 % (4g, 200 ml) (se puede utilizar cualquier otra solución acuosa, tal como, sulfato cálcico, carbonato cálcico, gluconato cálcico, citrato de calcio) en agua milliQ (200 ml) durante 15 minutos para provocar la reticulación del polímero. En esta solución, las matrices de alginato se gelificaron inmediatamente y fueron lavadas exhaustivamente con agua milliQ para eliminar los iones de calcio no unidos. Entonces, se sumergieron los microgránulos en una solución de poli-épsilon-lisina al 0,2 % (1,0 g en 500 ml) durante 16 horas, y luego fueron lavados exhaustivamente con agua milliQ. Se volvieron a congelar las matrices a -20 ºC durante 24 horas y fueron liofilizadas a -40 ºC durante 72 horas y a una presión de 26,3 Pa (0,263 mbar).

Las matrices liofilizadas fueron calentadas posteriormente en un horno a 115 ºC durante 1 hora sin ventilación (el curado comienza precalentando el horno a 45 ºC; en cuanto el horno alcanza 115 ºC comienza el tiempo; después de 1 hora se deja que las matrices alcancen la temperatura ambiente en el interior del horno; lleva aproximadamente 1 h 30 minutos) y, posteriormente, son almacenadas hasta ser utilizadas.

Posteriormente, se esterilizaron las matrices en un autoclave a 121 ºC durante 20 minutos a 105 kPa (1,05 bar).

La matriz optimizada presenta un volumen y un tamaño elevados de macroporosidad interconectada en el intervalo de 1-500 µm, como puede observarse mediante formación de imágenes digitales (**Fig. 1b**) y SEM (**Fig. 4b**).

Según se muestra en la **Fig. 6,** el análisis de la porosidad por intrusión de Hg (mercurio), antes (**Fig. 6A**) y después (**Fig. 6B**) de esterilizar los trozos, muestra una ligera reducción del volumen total del poro y del área superficial total. No obstante, los valores después de la esterilización son muy adecuados para la aplicación que muestra el correcto intervalo de volumen de poro y un área superficial elevada disponible para una colonización celular.

Como puede verse en la **Fig. 8B,** no hay cambios en la forma ni en la posición del espectro de bandas antes y después del proceso de esterilización, lo que demuestra la idoneidad de la identidad química de las matrices.

Ejemplo 3. Síntesis de una matriz, mediante el método de la invención, que comprende quitosán como polímero biocompatible y revestida con poli-ε-lisina

Se mezcló quitosán (9,0 g) de calidad alimentaria con ácido acético (0,1 M, 600 ml) con agitación suave a 40 °C hasta que se disolvió el quitosán. Se añadió en porciones poli-ε-L-lisina (360 mg en polvo; M_w: 1000-300000) a la anterior solución con agitación enérgica y se calentó la mezcla hasta 65 °C durante 2 horas y 30 minutos para obtener una solución homogénea y transparente.

Se dejó que la anterior solución alcanzase la temperatura ambiente y fue vertida en los moldes para proporcionar a las matrices la forma y el tamaño deseados (**Fig. 1c**). Se congeló la solución en el interior de los moldes a -20 °C durante 24 horas y fue liofilizada a -40 °C durante 72 horas y a una presión de 26,3 Pa (0,263 mbar).

Se retiraron las matrices de los moldes y fueron gelificadas con etanol absoluto (2 litros) durante 4 horas. Se lavaron las matrices con agua de alta pureza y se sumergieron las matrices en una solución de NaOH (1 %) durante 3 horas. Se lavaron exhaustivamente las matrices con agua de alta pureza hasta que el lixiviado alcanzó un pH neutro (6,5-7,5). Se congelaron las matrices formadas de esta manera a -20 °C durante 24 horas y fueron liofilizadas (72 horas, -40 °C y P = 26,3 Pa (0,263 mbar)). Se utilizaron las matrices directamente sin ningún tratamiento adicional o, de forma alternativa, pueden ser curadas. Las matrices curadas fueron sometidas a un tratamiento térmico introduciéndolas en el interior de un horno a 110 °C durante 1 hora sin ventilación (el curado comienza precalentando el horno a 45 °C; en cuanto el horno alcanza 110 °C comienza el tiempo; después de 1 hora se deja que las matrices alcancen la temperatura ambiente en el interior del horno; lleva aproximadamente 1 h 30 minutos). A continuación, se esterilizaron las matrices en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos a 105 kPa. La matriz optimizada presenta un volumen y un tamaño elevados de macroporosidad interconectada en el intervalo de 1-500 µm como puede observarse mediante formación de imágenes digitales (**Fig. 1c**) y SEM (**Fig. 4c**).

Según se muestra en la **Fig. 7,** el análisis de la porosidad por intrusión de Hg (mercurio), antes (**Fig. 7A**) y después (**Fig. 7B**) de esterilizar los trozos, muestra una ligera reducción del volumen total del poro y del área superficial total. No obstante, los valores después de la esterilización son muy adecuados para la aplicación, lo que muestra el correcto intervalo de volumen de poro y un área superficial elevada disponible para una colonización celular.

Como puede verse en la **Fig. 8C,** no hay cambios en la forma ni en la posición del espectro de bandas antes y después del proceso de esterilización, lo que demuestra la idoneidad de la identidad química de las matrices.

Ejemplo 4. Cultivo de las matrices de los Ejemplos 1 a 3 obtenidas mediante el

método de la invención con células no humanas en un biorreactor

Para verificar que las matrices a base de quitosán (Ejemplos 1 y 3) y las matrices a base de alginato (Ejemplo 2) obtenidas mediante el método de la invención son útiles para obtener carne cultivada, los inventores cultivaron células vivas en todas las matrices mencionadas de la invención en un biorreactor.

Con este fin, se esterilizaron las matrices de los Ejemplos 1, 2 y 3 en un autoclave a 121 ºC durante 20 minutos a 105 kPa (1,05 bar) y fueron sumergidas de forma estéril en un volumen final de medio de cultivo de 2 litros (Gibco™ OptiPRO™). A continuación, se inoculó una densidad celular conocida (13.000 células/cm^2) en las matrices mencionadas y se mantuvieron bajo cultivo durante periodos prolongados de tiempo (10 días o más) en un biorreactor de perfusión de 48 horas. Las células inoculadas fueron principalmente células de mioblastos porcinos, de extracción patentada obtenidas de biopsias musculares y extraídas siguiendo el protocolo descrito en JM Spinazzola et al., Bio Protoc. 5 de noviembre de 2017; 7(21). Las condiciones de cultivo para una proliferación celular adecuada requieren mantener una temperatura de 37 °C y un valor de pH de 7,1-7,4. Adicionalmente, se mantiene un suministro continuo de gases, de forma que la concentración de oxígeno disuelto varíe entre 20 % - 30 %. Después de un periodo de 10 días, se retiraron las matrices del biorreactor y fueron deshidratadas con etanol para llevar a cabo una visualización por SEM (microscopia electrónica de barrido). Las imágenes de SEM (**Figuras 4 d, e y f**), muestran toda la proliferación tisular en la matriz del Ejemplo 1, del Ejemplo 2 y del Ejemplo 3, respectivamente.

Durante el periodo de incubación de 10 días, se midió el consumo de glucosa con un analizador Bioprofile con un biosensor de glucosa. Los biosensores de glucosa son electrodos amperométricos que tienen enzimas inmovilizadas en sus membranas. En presencia de oxígeno y el sustrato que está siendo medido, estas membranas enzimáticas producen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es entonces oxidado en un ánodo de platino mantenido a un potencial constante. El flujo resultante de electrones y el cambio de corriente son proporcionales a la concentración de glucosa de la muestra. Las mediciones fueron llevadas a cabo en distintos tiempos de ensayo como una medición indirecta de la proliferación y de la formación de tejido sobre la matriz de la presente invención. Los datos obtenidos se muestran en la **Fig. 9.** Los resultados muestran la existencia de consumo de glucosa por parte de las células primarias de mioblastos porcinos sembradas en la matriz de la invención con el paso del tiempo (1-10 días de ensayo), dado que se observa una reducción en los valores de

concentración de glucosa en comparación con los niveles iniciales de glucosa del medio de cultivo (aproximadamente 4 g/L). Se realizaron controles positivos cada día de ensayo.

Por lo tanto, los resultados muestran que el método de la presente invención es útil para obtener una buena matriz para el cultivo celular y para obtener carne cultivada *in vitro.*