PROCESO Y DISPOSITIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE CARNE CULTIVADA

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a la producción de tejidos diseñados *in vitro*, también conocidos en la técnica como carne cultivada, carne de base celular, carne celular y/o carne limpia, a partir de células animales, en particular células adherentes tales como células musculares para su uso comestible.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El crecimiento de la población humana, que se prevé que aumente continuamente (alcanzando 9.770 millones en 2050 y 11.180 millones a finales 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. Según se da a conocer en la información proporcionada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, la ONUAA (http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html), la carne está definida por el Codex Alimentarius como “todas las partes de un animal que están previstas para el consumo humano o que se ha considerado que son seguras y adecuadas para el mismo”.

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 ONUAA 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.

El documento WO 2015/038988 A1 da a conocer un método para utilizar microportadoras comestibles para fabricar carne diseñada en un biorreactor, en donde se siembran las microportadoras con células extraídas originalmente de animales vivos e incubadas en el biorreactor durante hasta 12 días, por ejemplo. Se puede permitir que las microportadoras celularizadas se fusionen en aglomerados o capas. El biorreactor dado a conocer es un depósito agitado con una camisa de enfriamiento. Una suspensión de microportadoras en un medio de cultivo llena el volumen interno del biorreactor y se recogen las microportadoras celularizadas mediante decantación al final del periodo de incubación. Dado que no se puede variar el volumen de trabajo del biorreactor dado a conocer en esta publicación, el proceso de siembra que requiere una mayor concentración de células en un medio debe ser llevado a cabo en una cámara separada más pequeña.

El documento WO 2006/041429 A2 da a conocer un método para producir un producto cárnico diseñado que comprende células musculares cultivadas *ex vivo* y fijadas a una estructura de soporte. Se dan a conocer una placa y una membrana como ejemplos de la estructura de soporte. Las células musculares

pueden ser cultivadas en biorreactores con un flujo estático, agitado o dinámico, aunque no se proporcionan detalles de los biorreactores y de las matrices para su uso a escala industrial.

Por lo tanto, sería ventajoso proporcionar un método de producción y un dispositivo para la fabricación de carne cultivada en donde puedan utilizarse estructuras sustancialmente tridimensionales de soporte, en donde tanto la siembra como la incubación puedan llevarse a cabo en el biorreactor y en donde pueda variarse el volumen de trabajo del biorreactor.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Se proporciona un proceso para la producción de carne cultivada. El proceso comprende las etapas de: cargar matrices tridimensionales esterilizables en el interior de una cámara de siembra, la esterilización de las matrices en la cámara de siembra, sembrar las matrices cargando un primer volumen del medio de cultivo en la cámara de siembra, en donde el primer volumen del medio de cultivo tiene una densidad de células en suspensión de 5.000 a 25.000 células/cm^2, más preferentemente desde 10.000 hasta 16.000 células/cm^2, de forma que se puedan sumergir las matrices en el medio de cultivo, dejando las matrices y el primer volumen del medio de cultivo en la cámara de siembra durante un periodo de 2-24 horas a 17-37 ºC, cargando un segundo volumen del medio de cultivo en un biorreactor, siendo mayor el segundo volumen que el primer volumen del medio de cultivo en donde la posición de incubación de una o más rejillas amovibles en el interior del biorreactor acota las matrices al segundo volumen del medio de cultivo, de forma que permanezcan sumergidas durante una etapa de incubación, en donde se incuban las matrices y el segundo volumen del medio de cultivo en el

biorreactor durante un periodo de 10-60 días a 18-37 ºC y a un pH entre 7,2-7,4.

La cámara de siembra puede definirse en el interior del biorreactor por una posición de siembra de la una o más rejillas amovibles.

Se puede dejar a las matrices reposar en la cámara de siembra sin agitación durante la etapa de siembra.

La cámara de siembra puede ser una precámara externa al biorreactor, en donde pueden transferirse las matrices sumergidas en el primer volumen del medio de cultivo al biorreactor antes de que se cargue el segundo volumen del medio de cultivo en el biorreactor.

La precámara externa de siembra puede estar programada para ser sometida a ciclos de 360 º de reposo-giro con un movimiento peristáltico durante la etapa de siembra antes de que se deje a las matrices reposar en la cámara de siembra.

Se puede activar un agitador en el interior del biorreactor después de cargar el segundo volumen del medio de cultivo, de forma que las matrices se muevan libremente en suspensión.

Se puede provocar un movimiento de la una o más rejillas mediante la agitación del segundo volumen del medio de cultivo en el biorreactor, de forma que el volumen de incubación definido por las rejillas sea el volumen ocupado por las matrices que se mueven libremente en suspensión en el biorreactor mientras permanecen sumergidas en el medio de cultivo.

La posición de la una o más rejillas también puede controlarse manual o automáticamente.

El primer volumen del medio de cultivo puede ser un 5-20 % de todo el

volumen del biorreactor, más preferentemente un 5-10 %.

El proceso puede comprender, además, un control continuo o intermitente de los siguientes parámetros durante la incubación: el nivel de oxígeno disuelto que debería mantenerse entre un 30-60 %, el pH que debería mantenerse entre 6,5-8,0, más preferentemente 7,0-7,4, y las concentraciones de nutrientes.

También se proporciona un dispositivo para la producción de carne cultivada. El dispositivo comprende un biorreactor, comprendiendo el biorreactor: un depósito, una cubierta, un agitador y al menos una rejilla amovible en donde una posición de la rejilla define al menos un volumen de incubación en el interior del biorreactor para la incubación de matrices sembradas en un medio de cultivo.

La rejilla amovible puede estar configurada para encontrarse en una posición de siembra que define una cámara de siembra en el interior del biorreactor.

La rejilla amovible también puede estar configurada para ser movida hasta una posición de incubación que define un volumen de incubación en el interior del biorreactor, siendo el volumen de incubación mayor que el volumen de la cámara de siembra.

El dispositivo puede comprender, además, una precámara de siembra externa al biorreactor y un medio de conexión para transferir las matrices sembradas desde la precámara hasta el biorreactor.

La precámara de siembra también puede comprender un medio para hacer girar la precámara en ciclos de 360 º de reposo-giro.

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:

La Figura 1 es una vista frontal simplificada de una primera etapa de un proceso de fabricación según una primera realización de la invención.

La Figura 2 es una vista frontal de la etapa de siembra según la primera realización.

La Figura 3 es una ilustración de la etapa de incubación según la primera realización.

La Figura 4 es una vista frontal simplificada de una precámara de siembra según una segunda realización de la invención.

La Figura 5 es una ilustración de una primera etapa de un proceso de siembra según la segunda realización.

La Figura 6 es una ilustración de una segunda etapa de un proceso de siembra según la segunda realización.

La Figura 7 es una ilustración de una tercera etapa de un proceso de siembra según la segunda realización.

La Figura 8 es una ilustración de la transferencia de matrices sembradas desde la precámara de siembra hasta el biorreactor.

La Figura 9 es una vista frontal del biorreactor durante una etapa de incubación según la segunda realización.

DESCRIPCIÓN DE UNA FORMA DE LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

La Figura 1 muestra una etapa inicial de la fabricación de tejido con un contenido nutritivo o carne cultivada a partir de células adherentes, preferentemente células musculares animales, según una primera realización de la invención. En esta realización de la invención, las células son sembradas y cultivadas en el mismo reactor. El biorreactor comprende un depósito 2 y una cubierta 3. La cubierta y el depósito pueden comprender una o más tomas 16 para la carga del medio de cultivo, la inserción de equipos de medición y de electrodos y la eliminación de gases de desecho. Los equipos de medición pueden incluir equipos para medir la temperatura, el pH, la presión, la concentración de glucosa en el medio y la concentración de productos metabólicos de desecho. La presión de aire en la parte superior del depósito puede ser monitorizada utilizando, por ejemplo, un manómetro, y los gases de desecho pueden ser eliminados sistemáticamente por medio de una toma 16 en la parte superior del reactor 1. El depósito 2 puede estar rodeado por una camisa de calentamiento (no mostrada). El biorreactor puede comprender, además, un agitador 11 y uno o más rociadores de aire (tampoco mostrados). Se pueden utilizar los rociadores de aire para mantener los niveles requeridos de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. El biorreactor puede tener un volumen en el intervalo de 500 ml hasta 30.000 l, más preferentemente desde 2 l hasta 5.000 l.

Se utilizan matrices 12 para proporcionar una estructura para el crecimiento celular. Las matrices 12 pueden comprender polímeros comestibles que forman una arquitectura tridimensional con poros interconectados para el paso de gases y del fluido de cultivo. La forma de la matriz de la presente

invención puede ser regular (por ejemplo, esférica, redondeada, rectangular, cuadrada, piramidal, prismática, cónica, etc.) o irregular. En otra realización preferida, el tamaño de las matrices 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 el crecimiento celular y la formación tisular. Las dimensiones pueden variar dentro de los intervalos indicados en una forma irregular, siendo a distinta de b.

Las matrices 12 se cargan en el biorreactor 1. Se monta al menos una rejilla 5 en el interior del biorreactor. La rejilla comprende huecos o agujeros para optimizar el flujo en torno al depósito, en donde los diámetros de los agujeros son menores que una dimensión máxima de las matrices 12, de forma que estas no pasen a través de los agujeros. La rejilla 5 puede tener una forma bidimensional plana o puede ser tridimensional para formar una bandeja o canasta. La rejilla 5 está soportada en el interior del biorreactor de forma que pueda variarse su posición en la dirección vertical. Por ejemplo, el interior del depósito puede comprender varios surcos verticales y las rejillas 5 pueden comprender salientes que son guiados por los surcos para permitir este movimiento vertical. La rejilla 5 acota las matrices 12 a un volumen determinado del biorreactor 1, garantizando que permanezcan sumergidas en el medio de cultivo cuando es necesario y definiendo el volumen de incubación. Entonces, se esteriliza el biorreactor 1 que contiene las matrices 12 sin ningún medio de cultivo, por ejemplo durante 20 minutos a una temperatura de 121 ºC y una presión de 101,33 kPa. La esterilización puede llevarse a cabo utilizando vapor.

La Figura 2 muestra el proceso subsiguiente de siembra de la primera

realización en donde se añade el medio de cultivo preparado por separado, por ejemplo mediante una toma 16 en el biorreactor 1. El medio de cultivo contiene las células musculares que han de ser cultivadas al igual que los nutrientes requeridos, tales como glucosa. La densidad de células en suspensión en el medio de cultivo puede ser de 5.000 a 25.000 células/cm^2, más preferentemente desde 10.000 hasta 16.000 células/cm^2. Se añade un volumen inicial del medio de cultivo, de forma que se sumerjan las matrices 12 en el medio de cultivo, según se muestra en la Figura 2. Entonces, esto se deja reposar, por ejemplo durante 2-24 horas a 37 ºC. El periodo escogido de tiempo es suficiente para que las células se adhieran a las superficies de las matrices. La temperatura de 37 ºC es la temperatura estándar para células de mamífero pero puede regularse dependiendo del tipo de células que ha de cultivarse. Por ejemplo, se pueden sembrar células de pez o de anfibio a una temperatura inferior.

La Figura 3 muestra el proceso de incubación después de que se añade un segundo volumen del medio de cultivo, de forma que se llene un volumen de incubación del biorreactor. Entonces, se puede activar el agitador 11 para agitar el depósito para garantizar que el medio de cultivo alcance las superficies interiores de las matrices y para garantizar una buena homogeneización. El biorreactor 1 puede comprender un escudo protector 19 para evitar que cualquier matriz 12 quede atrapada en el agitador 11, especialmente en el caso en el que ninguna rejilla 5 separe las matrices 12 del agitador 11. Se puede aplicar una agitación suave durante el proceso de incubación para evitar esfuerzos cortantes sobre las superficies de las matrices.

Entonces, se levanta mecánicamente la posición de la rejilla 5, proporcionando una mayor zona de incubación. El cambio en posición puede efectuarse mediante cualquiera de una variedad de métodos, tales como: traccionando manualmente hacia arriba sobre un vástago metálico que sujeta la rejilla, pudiéndose acceder a una parte del vástago desde el exterior del reactor. De forma alternativa, se puede cambiar la posición de las rejillas mediante soportes neumáticos o un motor magnético sin cojinetes. La posición de las rejillas puede controlarse automáticamente. La posición de incubación de la rejilla 5 permite un mayor volumen para el movimiento del medio de cultivo y de las matrices y para proporcionar a las células el oxígeno disponible en el medio.

Entonces, se incuban las matrices sembradas en el biorreactor 1 durante 10-30 días a 37 ºC. Se pueden monitorizar y controlar varios parámetros, manualmente o utilizando un sistema automatizado de control. Estos incluyen el nivel de oxígeno disuelto, que debería mantenerse entre 30-60 %, el pH, que debería permitirse que varíe entre 7,0-7,4 y las concentraciones de nutrientes.

La Figura 4 muestra una cámara 10 de siembra según una segunda realización, en la que el proceso de siembra tiene lugar por separado del biorreactor 1. La cámara de siembra comprende una toma 14 de carga y un cuerpo principal tubular 15 que tiene un volumen significativamente menor que el reactor, en donde el volumen de la cámara de siembra puede ser un 5-50 % del volumen del reactor. Se carga la cámara 10 de siembra con las matrices 12 a través de la toma 14, que se ilustra en la Figura 5. Entonces, se esterilizan la cámara de siembra y las matrices 12 utilizando, por ejemplo, vapor caliente. Entonces, se inoculan las matrices con una suspensión 17 con una densidad

celular elevada que también se carga a través de la toma 14, según se ilustra en la Figura 6. Entonces, se sella la toma 14 y se somete a la cámara 10 a un programa de ciclos de 360 º axiales de reposo-giro conjuntamente con un movimiento peristáltico en una jaula o cuna a 37 ºC, de forma que la suspensión celular alcance todas las superficies disponibles de la matriz. Esto se ilustra en la Figura 7. Se deja que el cultivo repose en la precámara durante 2 a 24 horas a 37 ºC.

La Figura 8 muestra un proceso de carga de las matrices sembradas 12 en el biorreactor 1. El biorreactor 1 es esterilizado primero y llenado con medio de cultivo a un volumen suficiente para sumergir las matrices 12. Entonces, se conecta la toma 14 de la cámara 10 de siembra con un conducto estéril en una pared del depósito 2 del biorreactor en una posición entre las dos rejillas 5. Las rejillas 5 limitan la zona de incubación.

La Figura 9 muestra un proceso de incubación en el biorreactor 1. Se activa el agitador 11 para homogeneizar el medio. Se mantienen las matrices en cultivo durante 10 a 60 días, preferentemente 15 a 30 días, durante los que se controlarán los mismos parámetros descritos en la primera realización. Después de que se completa el proceso de cultivo, se puede vaciar el biorreactor de líquido y se pueden recolectar las matrices.

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.