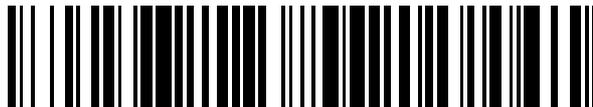


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 822**

51 Int. Cl.:  
**A23L 1/31** (2006.01)  
**C12N 5/077** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04788826 .8**  
96 Fecha de presentación: **17.09.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1789063**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **Carne de ingeniería tisular para el consumo y método para producir carne de ingeniería tisular para el consumo**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.04.2012**

73 Titular/es:  
**JON VEIN**  
**101 NORTH LAS PALMAS AVENUE**  
**LOS ANGELES, CA 90004, US**

72 Inventor/es:  
**Vein, Jon**

74 Agente/Representante:  
**de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 378 822 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Carne de ingeniería tisular para el consumo y método para producir carne de ingeniería tisular para el consumo.

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

5 El campo de la presente invención se refiere a la producción y cultivo de productos cárnicos para el consumo. En particular, se refiere a carne de ingeniería tisular para el consumo

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

10 Los productos cárnicos como carne de vacuno, cerdo, cordero, aves o pescado son productos deseables para el consumo alimenticio. Los productos cárnicos se producen actualmente a partir de animales enteros, que es un método de producción muy ineficaz porque una porción significativa de todo el cereal producido agrícolamente se utiliza para los animales en lugar de para consumo humano. En los Estados Unidos, por ejemplo, la alimentación del ganado representa aproximadamente el 70% de todo el trigo, el maíz y otros cereales producidos. Además, para producir una libra de carne de vacuno, se requieren miles de libras de agua para que el animal beba y para cultivar el alimento para el ganado. Mientras tanto, en todo el mundo, según algunos cálculos, más de 800 millones de personas están desnutridas y 50.000 personas, mueren de hambre cada día.

15 Los actuales métodos de producción de carne también son perjudiciales para el medio ambiente. Las selvas tropicales se agotan a un ritmo de aproximadamente 500 pies cuadrados de bosque tropical por cada libra de carne de vacuno producida. Del mismo modo, las técnicas modernas de pesca marina se han vuelto tan eficaces que los océanos y los lagos están sobreexplotados. Las especies que alguna vez fueron comunes están ahora en peligro de extinción o se han extinguido.

20 Los actuales esfuerzos científicos para hacer frente a estos problemas se han centrado en aumentar la eficacia de la cría o producción de ganado. Por ejemplo, se han utilizado hormonas de crecimiento para hacer crecer el ganado más rápido y de este modo, consumir menos cereales y agua. Las hormonas de crecimiento típicamente se inyectan en el ganado, pero también se han desarrollado nuevos métodos de introducción de la hormona de crecimiento utilizando tecnologías de ingeniería genética, tales como transgénicos o la clonación de animales completos. Los actuales métodos de producción de carne, sin embargo, requieren agua, cereal, y tierra para criar el ganado.

25 Otro problema de los actuales métodos de producción de carne implica la contaminación de los alimentos. Todos los años, en promedio, cada americano enferma y 9.000 personas mueren a causa de algo que han ingerido. Para controlar la contaminación de los alimentos, la estrategia actual del Gobierno es inspeccionar la carne durante el procesado. El USDA (Departamento de Agricultura de EE.UU) y la FDA (Administración de drogas y alimentación), sin embargo, rara vez regulan las granjas donde se originan los patógenos porque carecen de potestad reglamentaria sobre las granjas. Sin embargo, a excepción de E. coli 0156: H7, las bacterias peligrosas se consideran legalmente "inherentes" a la carne cruda. Sin embargo, dos de las "bacterias inherentes", - Campylobacter y Salmonella - representan el 80% de todas las enfermedades y el 75% de las muertes por consumo de carne y aves de corral.

35 En la industria avícola según se informa, por ejemplo, se permite que hasta un 25% del pollo para asar y un 45% de la carne picada de pollo, den un resultado positivo para salmonela. El Centro para el Control de Enfermedades estima que Campylobacter infecta entre 70% y 90% de todos los pollos. Las infecciones por Campylobacter causan retortijones, diarrea con sangre y fiebre. Cada año en los Estados Unidos, las infecciones por Campylobacter tienen como resultado aproximadamente 800 muertes. Las infecciones por Campylobacter también pueden conducir al síndrome de Guillian-Barré, una enfermedad que requiere de cuidados intensivos durante varias semanas. La incidencia de enfermedades graves y muertes a causa de estas bacterias puede aumentar a medida que se desarrollan más cepas resistentes a antibióticos. Esto ha hecho que algunos científicos se cuestionen el uso continuo de antibióticos como suplemento alimenticio para el ganado.

45 Por lo tanto, existe una necesidad de producir productos cárnicos para el consumo que sean más eficaces, más seguros y más sanos que los métodos actuales de producción.

**COMPENDIO DE LA INVENCIÓN**

50 La presente invención está dirigida a productos cárnicos no humanos de ingeniería tisular y métodos para producir tales productos cárnicos no humanos. La invención proporciona un método para producir un producto cárnico no humano para el consumo como se establece en las reivindicaciones de la 1 a 14. En una realización preferida de la invención, el producto cárnico está sustancialmente libre de cualquier contaminación microbiana o parasitaria perjudicial. Otra realización de la invención está dirigida a un producto cárnico no humano como se establece en cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22.

**DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA**

En general, los productos cárnicos proceden de los músculos de los animales. Los carniceros realizan los cortes correspondientes de carne de vacuno, aves, cordero, pescado o carne de cerdo para su venta como filetes, pechugas de pollo, chuletas de cordero, filetes de pescado, chuletas de cerdo, etc. También se incluyen derivados de productos cárnicos, tales como la carne picada que puede ser procesada en albóndigas, filetes rusos, albóndigas de pescado, salchichas, salami, mortadela, jamón, etc. Los productos cárnicos también pueden incluir tejidos musculares o carne que ha sido sazonada o secada, tales como la cecina.

Una realización de la presente invención implica un método como se ha definido anteriormente para producir carne no humano para el consumo. El método puede incluir cultivar células madre de músculo *in vitro* y permitir que estas células se diferencien en tipos específicos de células musculares, tales como células del músculo esquelético o células de músculo liso *ex vivo*. Las células musculares pueden derivar de cualquiera de los animales no humanos que consumen los seres humanos, como mamíferos (p. ej. bovinos, búfalos, cerdos, ovejas, ciervos, etc), aves (p. ej. pollo, patos, avestruces, pavos, faisanes, etc), peces (p. ej. pez espada, salmón, atún, lubina, trucha, bagre, etc), invertebrados (p. ej., langosta, cangrejo, camarón, almejas, ostras, mejillones, erizos de mar, etc), reptiles (p. ej. serpiente, cocodrilo, tortuga, etc), y anfibios (p. ej., ancas de rana). Preferiblemente, las células musculares derivan de células madre mesenquimales embrionarias pluripotentes que dan origen a células musculares, células de grasa, células de hueso y células del cartilago. Las células musculares también pueden derivar de células madre embrionarias totipotentes como las células de blastocisto, de huevos fecundados, de placenta o del cordón umbilical de estos animales.

Las células musculares pueden crecer en un cultivo dentro de los tejidos musculares que están unidos a una estructura de soporte tal como un armazón de dos o tres dimensiones o una estructura de soporte. Las células musculares pueden crecer en la estructura de soporte bidimensional, tal como una placa petri formando varias capas de células que pueden ser separadas y procesadas para el consumo. Otros ejemplos de estructuras de soporte bidimensionales pueden incluir membranas porosas que permitan la difusión de nutrientes de los medios de cultivo desde un lado de la membrana hacia el otro lado donde las células están sujetas. En este tipo de condiciones de cultivo, se pueden lograr capas adicionales de células mediante la exposición de las células al medio de cultivo a ambos lados de la membrana, es decir, las células reciben nutrientes por difusión desde un lado de la membrana y también del medio de cultivo que rodean a las células que crecen en la membrana.

Las células musculares también pueden ser cultivadas sobre, alrededor, o dentro de una estructura de soporte tridimensional. La estructura de soporte se puede modelar en diferentes tamaños, configuraciones y formas, según se desee, para proporcionar la configuración y forma para que las células musculares crezcan y se asemejen a los diferentes tipos de tejidos musculares, tales como filete, lomo, pierna, pechuga de pollo, muslo, chuletas de cordero, filete de pescado, cola de langosta, etc. La estructura de soporte se puede hacer con biomateriales naturales o sintéticos, que sean preferiblemente no tóxicos por lo que no serán dañinos si se ingieren. Los biomateriales naturales pueden incluir, por ejemplo, colágeno, fibronectina, laminina, u otras matrices extracelulares. Los biomateriales sintéticos pueden incluir, por ejemplo, hidroxapatita, alginato, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, o sus copolímeros. La estructura de soporte puede estar formada como un soporte sólido o semisólido.

Para proporcionar el crecimiento celular y del tejido óptimo, la estructura de soporte, preferiblemente, tiene alta porosidad para proporcionar un área superficial máxima para la fijación celular. También se puede modelar una estructura de soporte tridimensional para incluir una red vascular ramificada en el interior de la masa del producto cárnico que proporcione el suministro de nutrientes al interior y que traslade los metabolitos fuera de las células. En esta realización particular, la red vascular ramificada puede ser comestible utilizando biomateriales naturales o sintéticos no tóxicos como se ha mencionado anteriormente. Además, la estructura de soporte puede incluir también péptidos de adhesión, moléculas de adhesión celular, u otros factores de crecimiento asociados covalentemente o no covalentemente con la estructura de soporte. Ejemplos de los péptidos incluyen secuencias tales como Arg-Gly-Asp o Arg-Glu-Asp-Val. Niklason, L., et. al., *Advances in Tissue Engineering of Blood Vessels and Other Tissues, Transplant Immunology*, 5(4):303-306 (1997)

Por otro lado, las condiciones de cultivo para estas células musculares pueden incluir condiciones de flujo estático, de agitación, o dinámico. Para la producción a gran escala, el método preferido es en utilizar un biorreactor, que produzca un mayor volumen de las células y permita un mayor control sobre el flujo de nutrientes, gases, metabolitos y moléculas reguladoras. Además, los biorreactores pueden proporcionar señales físicas y mecánicas tales como la compresión para estimular a que las células produzcan biomoléculas específicas. Vacanti, J., et. al., *Tissue Engineering: the Design and Fabrication of Living Replacement Devices for Surgical Reconstruction and Transplantation, Lancet*. 354 Supl. 1, pS132-34 (1999).

En otra realización de la invención, tal y como se ha definido anteriormente los productos cárnicos no humanos, derivados de las células musculares cultivadas *ex vivo* incluyen células grasas derivadas también de cualesquiera animales no humanos. La carne más grasa suele ser más sabrosa, pero con un mayor contenido de grasa aparece un mayor riesgo de efectos adversos para la salud tales como enfermedades cardíacas. Así, la relación de células musculares a células grasas se puede regular *in vitro* para producir los productos cárnicos con un sabor óptimo y efectos saludables. La regulación se puede lograr mediante el control de la proporción de células musculares y

grasas, que se siembra inicialmente en cultivo y / o variando, según se desee, las concentraciones y la relación de los factores de crecimiento o factores de diferenciación que actúan sobre las células musculares o células grasas.

En otra realización de la invención, el cartílago derivado de condrocitos puede formar primero una capa o estructura de soporte subyacente junto con la estructura de soporte. Después, las células musculares y células de grasa, se siembran sobre la capa de condrocitos. La interacción de las células musculares y condrocitos puede además proporcionar las señales reguladoras necesarias requeridas para la formación de tejido. Ejemplos de productos cárnicos no humanos que tienen células musculares y células del cartílago incluyen pechuga de pollo o costillas de cerdo.

En una realización preferida de la invención, se pueden utilizar técnicas asépticas para cultivar las células musculares que dan como resultado productos cárnicos no humanos que están sustancialmente libres de microbios dañinos, tales como bacterias, hongos, virus, priones, protozoos, o cualquier combinación de los anteriores. Entre los microbios dañinos se pueden incluir microorganismos patógenos, tales como salmonella, campylobacter, E. coli\_0156: H7, etc. Además, las células musculares que han crecido en el cultivo puede estar sustancialmente libres de parásitos tales como las tenias que infectan los músculos de animales enteros y que se transmiten a los seres humanos a través del consumo de carne insuficientemente cocida. También se pueden emplear técnicas asépticas en el empaquetado de los productos cárnicos cuando salen de la línea de producción biológica. Tal garantía de calidad puede ser controlada por ensayos estándar para microorganismos o sustancias químicas que son conocidos en la técnica. "Sustancialmente libre" significa que la concentración de microbios o parásitos está por debajo de un nivel clínicamente significativo de contaminación, es decir, por debajo de un nivel en el que la ingestión daría lugar a enfermedades o estados adversos para la salud.

En otra realización preferida de la invención, el producto cárnico no humano derivado de células musculares que han crecido ex vivo puede estar expuesto a una corriente eléctrica u oscilante. A diferencia de los tejidos musculares derivados de animales enteros, puede que los tejidos musculares que han crecido ex vivo o in vitro nunca hayan sido ejercitados (p. ej. nunca se hayan utilizado para mover una pierna). De este modo, la exposición de las células del músculo, del tejido muscular, o de los productos cárnicos no humanos in vitro a una corriente eléctrica u oscilante puede imitar el ejercicio y aumentar la similitud entre la textura de la carne que ha crecido ex vivo y la carne procedente de animales enteros. La corriente eléctrica u oscilante también puede aumentar la tasa de crecimiento de las células musculares ex vivo. La corriente eléctrica u oscilante se puede aplicar a las células madre de músculo o a las células musculares después de que se han diferenciado de las células madre.

En otra realización de la invención, otros nutrientes tales como vitaminas de las que normalmente carecen los productos cárnicos de animales enteros se pueden añadir para aumentar el valor nutritivo de la carne. Esto se puede conseguir ya sea mediante la adición directa de los nutrientes al medio de crecimiento o mediante técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, el gen o genes responsables de las enzimas de la biosíntesis de una vitamina particular, tal como vitamina D, A, o los diferentes complejos de vitamina B, pueden ser transfectados en las células musculares cultivadas para producir la vitamina particular.

En otra realización de la invención, también se pueden introducir genéticamente factores de regulación, factores de crecimiento, u otros productos génicos en las células musculares. Estos factores, conocidos como factores de regulación miogénica ("MRF"), pueden estimular y regular el crecimiento de los músculos in vivo, pero normalmente no pueden ser producidos por las células musculares in vivo o in vitro. Así, la expresión de factores reguladores miogénicos en las células musculares cultivadas puede aumentar la producción de células musculares in vitro.

En otra realización de la invención, los productos cárnicos no humanos derivados de células musculares in vitro pueden incluir diferentes derivados de productos cárnicos no humanos. Estos derivados se pueden preparar, por ejemplo, moliendo o triturando los tejidos musculares que han crecido in vitro y mezclándolos con el aderezo apropiado para hacer albóndigas, albóndigas de pescado, filetes rusos, etc. Los derivados también se pueden preparar a partir de capas de células musculares cortadas y condimentadas, por ejemplo, cecina, jamón, mortadela, salami, etc. Por lo tanto, los productos cárnicos no humanos de la presente invención se puede ser utilizar para generar cualquier tipo de producto alimenticio procedente de la carne de un animal.

Los siguientes ejemplos ilustran cómo los expertos en la técnica pueden hacer uso de la invención actual para producir productos cárnicos in vitro. Los métodos de biología celular, cultivos celulares, e inmunohistoquímica que no se describen explícitamente en esta descripción ya han sido ampliamente descritos en la bibliografía científica.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO I

Este ejemplo ilustra el aislamiento de células madre mesenquimales pluripotentes para su uso en la producción de productos cárnicos no humanos in vitro. Las células madre mesenquimales dan lugar a células musculares (miocitos), células grasas (adipocitos), células óseas (osteocitos) y células de cartílago (condrocitos). Las células madre mesenquimales pueden ser diseccionadas y aisladas de los tejidos embrionarios de cualesquiera embriones

de animales no humanos. En el ganado vacuno, por ejemplo, los tejidos mesenquimales embrionarios que son ricos en células madre musculares pluripotentes se aíslan preferentemente de los embriones entre los días 30 y 40 o antes. Una vez diseccionados, los tejidos embrionarios pueden ser picados en trozos pequeños de aproximadamente un milímetro por un milímetro de tamaño en una solución salina amortiguada con fosfato ("PBS"), pH 7,45. Se pueden incubar de cinco a diez trozos del tejido picado en 300 µl de tripsina al 0,25% y EDTA al 0,1% en PBS durante treinta minutos a 37°C con agitación suave. Posteriormente, los tejidos se pueden dejar sedimentar en el fondo del tubo por gravedad o centrifugación suave. Entonces el sobrenadante que contiene la disolución de tripsina/EDTA puede ser aspirado y reemplazado con 300 µl de colagenasa al 0,1% en PBS durante diez a treinta minutos a 37° C. La digestión con colagenasa se puede repetir durante varios ciclos, según se desee. Dependiendo de la viscosidad de la disolución debido al ADN liberado de las células dañadas, se puede añadir a la solución de colagenasa 40 µl de DNasa I en una proporción de 1 mg/ ml en PBS, entre los ciclos.

La reacción se puede detener añadiendo un medio como DMEM o Ham F-12, o ambos en una relación 1:1, (Life Technologies, Rockville, Maryland) que se complementa con HEPES 10mM, L-glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich), 10-20% de suero fetal de ternera inactivado por calor o suero bovino (Hyclone Laboratories, Logan, Utah), 100 unidades / ml de penicilina y 100 µg / ml de estreptomina ("medio completo"). Las células se pueden disociar completamente pipeteando suavemente los tejidos hacia arriba y hacia abajo seguido por el lavado de las células en el medio completo una o dos veces utilizando una centrifuga. Después las células se pueden depositar en una placa Petri de tamaño apropiado que puede estar recubierta con biomateriales naturales (p. ej., colágeno, fibronectina, laminina, u otras matrices extracelulares) o biomateriales sintéticos (p. ej., hidroxiapatita, alginato, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, o sus copolímeros), o ambos, y se pueden hacer crecer a 37° C y equilibrarse con CO<sub>2</sub> al 5%.

## EJEMPLO II

Después de que las células madre mesenquimales han sido aisladas, se pueden enriquecer en el cultivo en mioblastos o células madre musculares. Inicialmente, las células se pueden depositar diferencialmente en placas Petri diferentes después de la disociación y lavado como se ha descrito en el Ejemplo I. Utilizando una placa Petri de 60 mm, las células pueden ser incubadas primero en un medio completo de dos a cuatro horas. Durante este tiempo, las células epiteliales tenderán a unirse rápidamente a la placa de Petri, mientras que los mioblastos permanecen en el sobrenadante. Entonces el sobrenadante puede ser recogido y los mioblastos pueden depositarse en una placa Petri diferente recubierta con biomateriales naturales o sintéticos tales como los mencionados en el Ejemplo I. Los mioblastos se pueden enriquecer complementando los medios de cultivo con factores de crecimiento como el factor de crecimiento del músculo esquelético, prostaglandina F<sub>2α</sub> ("PGF<sub>2α</sub>"), y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 ("IGF-1").

Además, los mioblastos se pueden diferenciar en miocitos específicos o en células musculares mediante el cultivo de los mioblastos en un medio completo o en un medio mínimo (p. ej., medio completo menos suero fetal de ternera) complementado con factores de crecimiento o diferenciación específicos del músculo tales como PGF<sub>2α</sub> a concentraciones que van de 24 pg/ml a 28 pg/ml, e insulina desde 10<sup>-6</sup> M a 10<sup>-5</sup> M. Para imitar lo mejor posible a las células musculares in vivo, que normalmente están inervadas por células neuronales, el medio de cultivo también se puede complementar con los neurotransmisores apropiados tales como acetilcolina.

## EJEMPLO III

Alternativamente, los mioblastos pueden ser enriquecidos a partir de células madre embrionarias totipotentes. Las células totipotentes se pueden derivar de huevos de un animal fecundados in vitro, utilizando técnicas de fecundación in vitro, a partir de células madre presentes en cordones umbilicales o la placenta, o de células madre embrionarias (ES) aisladas a partir de células en fase de blastocisto. Las células ES, por ejemplo, pueden ser recogidas, disociadas suavemente con tripsina, y cultivadas in vitro con factor inhibidor de leucemia recombinante (Chemicon, San Diego, CA) y células alimentadoras tales como células embrionarias de fibroblastos con crecimiento detenido. Estas células totipotentes se pueden tratar con factores de crecimiento tales como PGF<sub>2α</sub> o IGF-1 para inducir a las células a diferenciarse en mioblastos.

## EJEMPLO IV

Utilizando la inmunohistoquímica estándar o las técnicas de hibridación in situ, se pueden identificar mioblastos o miocitos (células musculares diferenciadas). Brevemente, los mioblastos o miocitos que se han hecho crecer en cultivo pueden ser transferidos a portaobjetos de vidrio recubiertos con una matriz extracelular apropiada como se ha descrito anteriormente. Estas células se pueden hacer crecer hasta el número y diferenciación deseadas usando las condiciones descritas anteriormente. Después de un crecimiento y período de diferenciación suficiente, las células se pueden fijar con formaldehído al 4%. Si se van a usar marcadores intracelulares de anticuerpos o sondas nucleótidas, las membranas de las células se pueden permeabilizar con NP-40 o Triton-X al 1%. Se pueden utilizar anticuerpos contra marcadores específicos para mioblastos o miocitos, tales como miosina, titina, alfa-actinina disponibles en Sigma® para identificar las células utilizando técnicas de inmunohistoquímica fluorescente estándar. Alternativamente, se puede utilizar para la hibridación in situ ARN monocatenario o sondas de ADN para estos

marcadores.

Además, cuando las células musculares se han unido a una estructura de soporte tridimensional, como se describe a continuación, pueden ser crio-congeladas, seccionadas e identificadas utilizando marcadores de anticuerpos tales como anticuerpos contra miosina, titina, 12101, troponina T, alfa actinina disponibles de Sigma®

#### 5 EJEMPLO V

Se pueden modelar armazones o soportes de dos o tres dimensiones a partir de biomateriales naturales (p. ej. colágeno, fibronectina, laminina, u otra matriz extracelular) o de biomateriales sintéticos (p. ej. hidroxiapatita, alginato, ácido poliglicólico, ácido poliláctico y sus copolímeros), o de ambos. Preferiblemente, los armazones tridimensionales se modelan con vías ramificadas para que los nutrientes y medios de cultivo lleguen a la masa interna de los tejidos musculares que se forman. Ejemplos de los materiales y métodos de construcción de estos armazones se describen en las patentes de EE.UU. N° 5.686.091, titulada "Biodegradable Foams For Cell Transplantation"; N° 5.863.984, titulada "Biostable Porous Material Comprising Composite Biopolymers"; N° 5.770.417, titulada "Three-Dimensional Fibrous Scaffold Containing Attached Cells for Producing Vascularized Tissue in vivo"; y N° 5.916.265, titulada "Method of Producing a Biological Extracellular Matrix for Use as a Cell Seeding Scaffold and Implant".

La estructura de soporte se modela preferentemente en diferentes tamaños, configuraciones y formas que permitan el crecimiento de tejidos musculares que se asemejen a los diferentes tipos de productos cárnicos, tales como filetes, lomo, codillo, pechuga de pollo, pierna, chuletas de cordero, filetes de pescado, cola de langosta, etc .

#### EJEMPLO VI

20 Los adipocitos, condrocitos, y osteoblastos pueden diferenciarse a partir de células madre mesenquimales pluripotentes o de células madre embrionarias totipotentes. Las células madre se pueden aislar tal y como se ha descrito en el Ejemplo I o III. Las células madre pueden cultivarse en DMEM, o en Ham-F12, o en ambos, en una relación 1:1. El medio puede ser complementado con hormonas tiroideas, transferrina, insulina, así como con otros factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico, y la hormona del crecimiento.

En el caso de los adipocitos, la diferenciación puede lograrse mediante el tratamiento de las células madre con proteínas morfogenéticas óseas ("BMP") tales como BMP-4 y BMP-2, que son conocidas por que inducen la diferenciación al linaje de adipocitos. Ahrens et al. "Expresion of human bone morphogenetic proteins -2 o -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages," DNA Cell Biol., 12:871-880 (1993); Wang et al., "Bone Morphogenetic protein 2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells" Growth Factors 9:57 (1993).

Además de con BMP, la diferenciación de los adipocitos puede ser mejorada con el agonista del receptor gamma activado por los proliferadores de peroxisomas ("PPAR gamma"), tal como BRL 49653 (rosiglitazona). Sottile y Seuwen, "Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 496539 (rosiglitzaone)", FEBS Lett, 475 (3):201-204 (2000).

En ciertas situaciones, se puede incluso inducir la transdiferenciación de los mioblastos en adipoblastos (precursores de los adipocitos) mediante tratamiento de las células de mioblastos o de las células musculares satélite con ácidos grasos de cadena larga ("LCFA") o tiazolidinedionas, o con ambos. Grimaldi et al., "Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones" Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 57 (1):71-75 (1997); Teboul et. al., "Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells", J. Biol. Chem.270 (47):28183 a 28187 (1995).

Por lo tanto, se pueden producir productos cárnicos no humanos con la cantidad deseada de contenido en grasa, por siembra y cultivo conjunto de células musculares y adipocitos en una determinada proporción. Alternativamente, se puede dejar que las células madre se diferencien inicialmente en mioblastos y luego en otro momento, se puede añadir AGCL o tiadolidinedionas a diferentes concentraciones y con tiempos de exposición diferentes para transdiferenciar los mioblastos en adipocitos como se desea. Además, el crecimiento de las células musculares y células grasas se puede regular controlando la concentración de los factores de crecimiento y de diferenciación. Por ejemplo, si se desean menos células grasas en el producto cárnico final, se pueden añadir concentraciones menores de los factores BMP al cultivo mientras que se puede añadir una concentración mayor de PGF2α y/o insulina para promover el crecimiento de las células musculares.

#### EJEMPLO VII

Los condrocitos o células de cartílago también se pueden aislar de la rodilla o costillas de una animal. Utilizando técnicas similares a las descritas en el Ejemplo I, el tejido diseccionado de la rodilla o costillas se puede picar, digerir con colagenasa, y lavar con medio completo. Las células pueden entonces depositarse diferencialmente en placas

para aumentar la pureza de las células condrocíticas.

Se sabe que los condrocitos se diferencian en respuesta al esfuerzo mecánico. Así, preferiblemente, las células pueden ser sometidas a esfuerzo de flujo por cizalla como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.928.945, titulada "Application of Shear Flow Stress to Chondrocytes or Chondrocyte Stem Cells to Produce Cartilage.

- 5 Inicialmente los condrocitos pueden formar una primera capa de células de soporte en un armazón tridimensional. Las células de mioblastos o de adipocitos, o de ambos, pueden entonces sembrarse sobre la capa de condrocitos y crecer hasta el tamaño deseado. Como tal, la capa de condrocitos puede proporcionar una adherencia adicional o factores de crecimiento a las células musculares.

#### **EJEMPLO VIII**

- 10 Las células musculares que han crecido in vitro difieren de las células musculares que han crecido in vivo en que las células in vivo se utilizan durante el ejercicio o los movimientos del cuerpo. Como los músculos se utilizan in vivo, las células musculares, de las extremidades, por ejemplo, se contraen y se relajan de acuerdo con el movimiento de las extremidades. Por lo tanto, para imitar lo mejor posible el crecimiento de las células musculares in vivo, las células que han crecido in vitro se pueden exponer a una corriente eléctrica u oscilante, o a impulsos de corriente eléctrica u
- 15 oscilante para contraer las células musculares. Se pueden sumergir sondas eléctricas en los medios de cultivo para distribuir una corriente suave. Alternativamente, la estructura de soporte puede estar recubierta con materiales conductores de electricidad. Ejemplos de materiales conductores de electricidad y un método para recubrir con ellos la estructura de soporte se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.843.741, titulada "Method for Altering the Differentiation of Anchorage Dependent Cells on an Electrically Conducting Polymer,"
- 20 Los ejemplos anteriores ilustran los procedimientos para la producción de productos cárnicos no humanos ex vivo. Se trata solamente de ejemplos y no se pretende limitar la invención a estos ejemplos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir un producto cárnico no humano para el consumo que comprende las etapas:  
cultivar conjuntamente células musculares no humanas y adipocitos no humanos ex vivo; después  
sembrar las células musculares no humanas y los adipocitos no humanos en una estructura de soporte; y  
5 hacer crecer las células musculares no humanas y adipocitos no humanos para producir un producto cárnico no humano.
2. Un método según la reivindicación 1, donde las células musculares no humanas derivan de células madre mesenquimales embrionarias pluripotentes no humanas o de células madre embrionarias totipotentes no humanas.
3. Un método según la reivindicación 1, donde la etapa de crecimiento de las células musculares no humanas  
10 comprende hacer crecer células madre musculares no humanas y diferenciar las células madre musculares no humanas en diferentes tipos de células musculares no humanas.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además la etapa de exponer las células musculares no humanas y los adipocitos no humanos a una corriente eléctrica u oscilante, donde la exposición a la corriente eléctrica u oscilante produce en el producto cárnico no humano una textura es más similar a la carne  
15 natural.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además la etapa de añadir nutrientes que se incorporan a los productos cárnicos no humanos.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células musculares no humanas se derivan de animales seleccionados del grupo que consiste en mamíferos, pájaros, peces, invertebrados, reptiles y  
20 anfibios.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el producto cárnico no humano está libre substancialmente de contaminación microbiana dañina.
8. Un método para producir carne no humana para el consumo que comprende las etapas de:  
cultivar células madre musculares no humanas ex vivo;  
25 sembrar las células madre musculares no humanas en una estructura de soporte;  
tratar las células madre musculares no humanas con ácidos grasos para trans diferenciar las células madre no humanas en adipocitos; y  
hacer crecer las células para producir un producto cárnico no humano
9. Un método para producir productos cárnicos no humanos para el consumo que comprende las etapas de:  
30 cultivar células de cartílago no humanas ex vivo;  
sembrar las células de cartílago no humanas en una estructura de soporte;  
cultivar a) células musculares no humanas o b) ambas células musculares no humanas y adipocitos junto con células de cartílago no humanas sobre o alrededor de la estructura de soporte; y  
35 hacer crecer las células musculares no humanas o células musculares no humanas y adipocitos para producir un producto cárnico no humano.
10. Un método según la reivindicación 9, donde las células de cartílago no humanas se exponen a un esfuerzo mecánico, preferiblemente a un esfuerzo de flujo por cizalla.
11. Un método según la reivindicación 1, donde la estructura de soporte es  
40 (a) una estructura de soporte bidimensional; o  
(b) una estructura de soporte tridimensional.
12. Un método según la reivindicación 1, donde la estructura de soporte esta hecha de biomaterial natural o sintético apto para el consumo.
13. Un método según la reivindicación 1, donde la estructura de soporte tiene una capa de soporte cartilaginosa

derivada de condrocitos.

14. Un producto cárnico no humano para el consumo que comprende células musculares no humanas y una o más células no humanas seleccionadas del grupo que consiste en adipocitos y células cartilaginosas que se han hecho crecer ex vivo.

5 15. Un producto cárnico no humano según la reivindicación 14 que comprende además una estructura de soporte, donde las células musculares no humanas y una o más células no humanas se seleccionan del grupo que consiste en adipocitos y células de cartílago se adhieren a la estructura de soporte.

10 16. Un producto cárnico no humano según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, donde las células musculares no humanas son células del músculo esquelético, y/o donde las células musculares no humanas derivan de animales seleccionados del grupo que consiste en mamíferos, aves, peces, invertebrados, reptiles y anfibios.

17. Un producto cárnico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde el producto cárnico no humano está substancialmente libre de contaminación con microbios dañinos.

18. Un producto cárnico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde las células musculares no humanas derivan de células pluripotentes o totipotentes.

15 19. Un producto cárnico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde las células musculares no humanas han sido expuestas a una corriente eléctrica, donde la exposición a dicha corriente da al producto cárnico no humano una textura que le asemeja mas a la carne natural.

20. Un producto cárnico no humano según la reivindicación 14 que comprende

20 (i) adipocitos no humanos que se han hecho crecer ex vivo; donde opcionalmente los adipocitos no humanos están (a) transdiferenciados a partir de mioblastos no humanos; o (b) derivadas de células madres no humanas pluripotentes o totipotentes.

25 21. Un producto cárnico no humano según la reivindicación 14, que comprende células de cartílago no humanas que se han hecho crecer ex vivo; donde las células de cartílago no humanas (a) se colocan entre una estructura de soporte y las células musculares no humanas; y/o (b) han sido expuestas a un esfuerzo mecánico preferiblemente esfuerzo de flujo por cizalla.