

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 638**

51 Int. Cl.:

A23L 13/00 (2006.01)

A23L 13/60 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2012 PCT/US2012/048357**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13016547**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2012 E 12817489 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2736357**

54 Título: **Carne comestible producida artificialmente**

30 Prioridad:

26.07.2011 US 201161511948 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.10.2018

73 Titular/es:

**THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF
MISSOURI (100.0%)
316 University Hall
Columbia, Missouri 65211, US**

72 Inventor/es:

**FORGACS, GABOR;
MARGA, FRANCOISE y
JAKAB, KAROLY, ROBERT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 638 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 comestible producida artificialmente

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. nº 61/511.948, presentada el 26 de julio de 2011.

Antecedentes de la invención

10 Una proteína es un nutriente que el cuerpo humano necesita para el crecimiento y el mantenimiento. Aparte del agua, la proteína es la molécula más abundante en el organismo. De acuerdo con las directrices de Estados Unidos y Canadá de ingesta alimentaria de referencia, las mujeres con una edad de 19-70 años necesitan consumir 46 gramos de proteína al día, mientras que los hombres con una edad de 19-70 necesitan consumir 56 gramos de proteína al día para evitar una carencia. Esta recomendación, sin embargo, es para una persona sedentaria que no tiene ninguna enfermedad. La carencia de proteínas puede conducir a una inteligencia reducida o retraso mental, así como contribuir a la prevalencia de enfermedades tales como el kwashiorkor. La carencia de proteínas es un problema grave en los países en desarrollo, sobre todo, en los países afectados por la guerra, el hambre y la sobrepoblación. Las fuentes animales de proteína, como la carne, son frecuentemente una fuente del complemento completo de todos los aminoácidos esenciales en proporciones adecuadas.

20 Los beneficios nutricionales de la carne se ven atenuados por una degradación medioambiental potencialmente asociada. De acuerdo con un informe del 2006 de la iniciativa "Livestock, Environment And Development Initiative", titulado "Livestock's Long Shadow-Environmental Issues and Options", la industria ganadera es uno de los mayores contribuyentes a la degradación del medio ambiente en todo el mundo, y las prácticas modernas de crianza de animales para la alimentación, contribuye ampliamente a la contaminación del aire y del agua, a la degradación del suelo, el cambio climático y la pérdida de la biodiversidad. La producción y el consumo de carne y de otras fuentes de proteína animal también se asocian con la tala de selvas tropicales y la extinción de especies. Por consiguiente, existe una necesidad de una solución alternativa a las demandas de carne producida a partir de animales vivos.

25 Además, Hopkins y Dacey, "Vegetarian Meat: Could Technology Save Animals and Satisfy Meat Eaters?", J Agric Environ Ethics (2008) 21: 579-596, proponen que la biotecnología naciente de cultivo de tejidos, investigada originalmente para aplicaciones médicas, es una promesa para aquellos que deseen comer carne, pero no dañar a los animales porque la carne se puede cultivar *in vitro* sin matar animales.

30 Both Yang et al., "Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds", Biomaterials (2005) 26: 6415-6422, y Matsuda et al., "Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology", Adv. Mater. (2007) 19: 3089-309999, describen el uso de placas de cultivo sensibles a la temperatura para lograr una adhesión reversible de las células y el desprendimiento de las superficies de la placa, lo que permite una recogida no invasiva de las células cultivadas como una capa celular monocapa sin la necesidad de estructuras biodegradables o el uso de enzimas proteolíticas. Al evitar el uso de cualquier material adicional, tal como sustratos portadores o de sostén, las complicaciones asociadas tradicionalmente con los enfoques de producción artificial de tejidos, tales como respuestas inflamatorias del hospedador frente a materiales polímeros implantados, se pueden evitar. Por lo tanto, la producción artificial de capas celulares permite una regeneración de tejidos a través de un trasplante directo de capas celulares a los tejidos del hospedador o la creación de estructuras tridimensionales a través de la superposición de capas celulares individuales.

40 Sekine et al., "Myocardial tissue reconstruction: The cell sheet engineering approach", Inflammation and Regeneration (2007) 27(3): 171-176, también proponen una producción artificial de tejidos basándose en capas de células, lo que implica el apilamiento de capas celulares cultivadas de forma confluyente para la construcción de tejidos celulares densos 3-D. Después de la superposición, las capas de cardiomiocitos individuales se integran para formar un solo tejido con densidad celular, continuo, que se asemeja al músculo cardíaco natural. Cuando se trasplanta directamente a corazones de hospedadores, estos tejidos miocárdicos producidos artificialmente son capaces de formar conexiones morfológicas con el hospedador, con presencia de uniones de tipo hendidura funcionales. Sekine et al. han intentado favorecer la neovascularización dentro de tejidos del miocardio bioproducidos artificialmente para superar las limitaciones antiguas del espesor del tejido producido artificialmente. Como una posible terapia avanzada, Sekine et al. han intentado fabricar tubos de miocardio funcionales que pueden tener el potencial de un soporte circulatorio.

Aldhous, "Print me a heart and a set of arteries", New Scientist (15 April 2006) p.19, informó sobre la bioimpresión mediante el uso de gotitas de grumos de células de corazón de pollo que tenían unos pocos cientos de micrómetros de diámetro y que fluyeron juntas y se fusionaron con capas alternas de gel de soporte para formar capas, anillos u otras formas de células que parecen funcionar normalmente.

55 En el documento de solicitud de patente de EE.UU. 20050084958, Vein et al., describen un producto cárnico producido artificialmente con tejido no humano y un método para producir un producto cárnico de ese tipo. El producto cárnico comprendía células musculares que se cultivaban *ex vivo* y se utilizaba para el consumo de alimentos. Las

células musculares se podían cultivar y se fijaban a una estructura de soporte y se podían obtener a partir de cualquier célula no humana. El producto cárnico podía comprender también otras células tales como células grasas o células de cartilago o ambas, que se cultivaban ex vivo junto con las células musculares.

5 En el documento de solicitud de patente de EE.UU. 20100041134, Forgacs al., describen estructuras y métodos para la producción artificial de tejidos que incluyen un cuerpo multicelular que incluye una pluralidad de células vivas. Forgacs et al. describen que una pluralidad de cuerpos multicelulares se pueden disponer en un patrón y permitir que se fusionen para formar un tejido producido artificialmente. La disposición puede incluir cuerpos de relleno que incluyen un material biocompatible que resiste la migración y el crecimiento hacia el interior de las células de los cuerpos multicelulares y que resiste la adherencia de las células al mismo. Forgacs et al. dan a conocer que las estructuras artificiales tridimensionales que se pueden ensamblar mediante impresión o de apilar de otro modo los cuerpos multicelulares y los cuerpos de relleno, de tal manera que hay un contacto directo entre los cuerpos multicelulares contiguos, de forma adecuada a lo largo de un área de contacto que tiene una longitud sustancial. El contacto directo entre los cuerpos multicelulares favorece una fusión eficaz y fiable. El aumento del área de contacto entre los cuerpos multicelulares colindantes también favorece una fusión eficaz y fiable. Forgacs et al. también describen métodos de producción de cuerpos multicelulares que tienen características que facilitan el poder ensamblar las estructuras artificiales tridimensionales.

Compendio de la invención

La tecnología de producción artificial de tejidos ofrece nuevas oportunidades para producir fuentes comestibles de proteína animal que no están asociadas con la degradación del medio ambiente de la cría de ganado. La producción artificial de tejidos se ha definido como un campo interdisciplinar que aplica los principios de la producción artificial y las ciencias de la vida frente al desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de un tejido o un órgano completo. Langer R, Vacanti JP, Tissue Engineering, Science 260(5110):920-926 (mayo 1993). A pesar del potencial para aplicar la tecnología de la producción artificial de tejidos para satisfacer las necesidades nutricionales de los seres vivos, no se han desarrollado procedimientos con solidez científica e industrialmente viables para producir carne comestible y no están disponibles productos cárnicos comestibles producidos artificialmente.

La invención proporciona un método para elaborar carne producida artificialmente, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

Un método para elaborar carne producida artificialmente, en donde el método comprende:

- 30 preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos cohesionados entre sí;
- superponer más de un cuerpo multicelular de forma adyacente sobre un sustrato de soporte plano;
- fusionar dichos cuerpos multicelulares al menos parcialmente entre sí para formar una primera capa;
- apilar más de 50 capas adicionales sobre la primera capa;
- 35 fusionar las capas apiladas para formar un volumen de carne producida artificialmente; y
- cultivar las capas apiladas para fusionar las capas mientras que las capas en una región interior del volumen mueren de manera que la mayoría de las células en el volumen están muertas después de que la fusión entre las capas se completa, al menos parcialmente, y
- en donde la carne producida artificialmente es comestible.

40 Como se ha indicado anteriormente, el método de la invención incluye opcionalmente una etapa para preparar la pluralidad de cuerpos multicelulares mediante el cultivo de una pluralidad de células miocitos no humanos y células endoteliales no humanas, al menos hasta que las células se han cohesionado entre sí. Como se ha mencionado anteriormente, cualquier otro tipo de célula no humana apropiada puede estar incluida como parte de algunos o todos los cuerpos multicelulares que forman las capas, incluyendo células endoteliales y/o células adiposas y/o células de fibroblastos.

50 Durante la formación del producto cárnico producido artificialmente, las capas se pueden apilar de forma individual o colectivamente encima de otra capa para crear el volumen de carne producida artificialmente. En algunas variaciones, cada capa sucesiva está orientada de manera diferente con respecto a la o las capas adyacentes. Por ejemplo, a medida que se apilan, las nuevas capas se pueden girar con relación a las otras capas en el volumen. En algunas variaciones, cada capa se gira aproximadamente 90° con relación a las otras capas, cuando se apila.

En cualquier carne producida artificialmente descrita en este documento, las capas se pueden ejercitar a medida que se forman. Como se describe con mayor detalle a continuación, hacer que las capas se ejerciten puede mejorar la formación de una matriz extracelular (ECM). Esto también puede orientar las células (por ejemplo, miocitos) dentro de una capa a medida que se forma. Por tanto, en algunas variaciones del método para elaborar la carne producida

artificialmente, se puede incluir una etapa de aplicación de una fuerza mecánica, eléctrica o electromecánica para ejercitar los miocitos en cada capa.

Como se ha mencionado, la etapa de apilamiento de las capas incluye el apilamiento de más de 50 capas, más de aproximadamente 100 capas o similar.

- 5 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento comprenden además congelar dicha carne.

En otro aspecto, se dan a conocer en el presente documento métodos para elaborar carne producida artificialmente, que comprenden: preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares alargados que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos vivos, en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos vivos en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; superponer más de un cuerpo multicelular alargado y más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte; permitir que dichos cuerpos multicelulares se fusionen para formar una capa; superponer (por ejemplo, apilar) más de 50 capas sobre la primera capa; permitir que dichas capas se fusionen para elaborar carne producida artificialmente; y opcionalmente, congelar dicha carne; siempre que la carne producida artificialmente sea comestible y para ingestión. En algunas realizaciones, se dan a conocer en el presente documento métodos para formar-crear carne producida artificialmente, que comprenden: preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares alargados que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; superponer más de un cuerpo multicelular alargado y más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte; fusionar dichos cuerpos multicelulares para formar una capa; superponer más de 50 capas sobre la primera capa; y fusionar dichas capas para formar un volumen de carne producida artificialmente; siempre que la carne producida artificialmente sea comestible y para ingestión. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento comprenden además congelar dicha carne.

La relación de los cuerpos multicelulares alargados y los cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos puede ser de aproximadamente 0:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100, 5:100, 6:100, 7:100, 8:100, 9:100, 1:10, 11:100, 12:100, 13:100, 14:100, 15:100, 16:100, 17:100, 18:100, 19:100, 1:5, 21:100, 22:100, 23:100, 24:100, 25:100, 26:100, 27:100, 28:100, 29:100, 3:10, 31:100, 32:100, 33:100, 34:100, 35:100, 36:100, 37:100, 38:100, 39:100, 2:5, 41:100, 42:100, 43:100, 44:100, 45:100, 46:100, 47:100, 48:100, 49:100, 1:2, 51:100, 52:100, 53:100, 54:100, 55:100, 56:100, 57:100, 58:100, 59:100, 3:5, 61:100, 62:100, 63:100, 64:100, 65:100, 66:100, 67:100, 68:100, 69:100, 7:10, 71:100, 72:100, 73:100, 74:100, 75:100, 76:100, 77:100, 78:100, 79:100, 4:5, 81:100, 82:100, 83:100, 84:100, 85:100, 86:100, 87:100, 88:100, 89:100, 9:10, 91:100, 92:100, 93:100, 94:100, 95:100, 96:100, 97:100, 98:100, 99:100 o 1:1. La relación de los cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos y los cuerpos multicelulares alargados puede ser de aproximadamente 0:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100, 5:100, 6:100, 7:100, 8:100, 9:100, 1:10, 11:100, 12:100, 13:100, 14:100, 15:100, 16:100, 17:100, 18:100, 19:100, 1:5, 21:100, 22:100, 23:100, 24:100, 25:100, 26:100, 27:100, 28:100, 29:100, 3:10, 31:100, 32:100, 33:100, 34:100, 35:100, 36:100, 37:100, 38:100, 39:100, 2:5, 41:100, 42:100, 43:100, 44:100, 45:100, 46:100, 47:100, 48:100, 49:100, 1:2, 51:100, 52:100, 53:100, 54:100, 55:100, 56:100, 57:100, 58:100, 59:100, 3:5, 61:100, 62:100, 63:100, 64:100, 65:100, 66:100, 67:100, 68:100, 69:100, 7:10, 71:100, 72:100, 73:100, 74:100, 75:100, 76:100, 77:100, 78:100, 79:100, 4:5, 81:100, 82:100, 83:100, 84:100, 85:100, 86:100, 87:100, 88:100, 89:100, 9:10, 91:100, 92:100, 93:100, 94:100, 95:100, 96:100, 97:100, 98:100, 99:100 o 1:1.

En otro aspecto, se dan a conocer en el presente documento métodos para elaborar carne producida artificialmente, que comprenden: preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos vivos, en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; superponer más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte; permitir que dichos cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos se fusionen para formar una capa; superponer más de 50 capas sobre la primera capa; permitir que las capas se fusionen para formar un volumen de carne producida artificialmente; y opcionalmente, congelar dicha carne; siempre que la carne producida artificialmente sea comestible y para ingestión. En algunas realizaciones, se dan a conocer en el presente documento métodos para elaborar carne producida artificialmente, que comprenden: preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; superponer más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte; fusionar dichos cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos para formar una capa; superponer más de 50 capas sobre la primera capa; y fusionar dichas capas para formar un volumen de carne producida artificialmente; siempre que la carne producida artificialmente sea comestible. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento comprenden además congelar dicha carne.

En algunas realizaciones, los métodos para elaborar carne producida artificialmente descritos en este documento comprenden la preparación de una pluralidad de cuerpos multicelulares que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos vivos en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí, en donde los cuerpos multicelulares comprenden además células adiposas y/o células endoteliales no humanas vivas. En algunas realizaciones, los

cuerpos multicelulares comprenden además, células de fibroblastos no humanas vivas. En algunas realizaciones, los métodos para elaborar carne producida artificialmente, descritos en este documento comprenden superponer más de un cuerpo multicelular de forma adyacente sobre un sustrato de soporte, en donde los cuerpos multicelulares se colocan horizontalmente de forma adyacente y/o verticalmente de forma adyacente. En algunas realizaciones, los métodos para elaborar carne producida artificialmente, descritos en este documento comprenden superponer más de una capa de forma adyacente sobre un sustrato de soporte, en donde las capas se colocan horizontalmente de forma adyacente y/o verticalmente de forma adyacente. En algunas realizaciones, el sustrato de soporte es permeable a los líquidos y nutrientes y permite que el medio de cultivo celular entre en contacto con todas las superficies de dichos cuerpos multicelulares y/o capas. En algunas realizaciones, los métodos para elaborar carne producida artificialmente, descritos en este documento comprenden permitir que los cuerpos multicelulares se fusionen para formar una capa, en donde los cuerpos multicelulares se fusionan para formar una capa en un entorno de cultivo celular. En algunas realizaciones, la fusión de los cuerpos multicelulares tiene lugar durante desde aproximadamente 2 horas a aproximadamente 36 horas. En algunas realizaciones, los métodos comprenden permitir que las capas se fusionen para formar carne producida artificialmente, en donde las capas se fusionan para formar carne producida artificialmente en un entorno de cultivo celular. En algunas realizaciones, la fusión de las capas se lleva a cabo durante desde aproximadamente 2 horas a aproximadamente 36 horas. En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares alargados de miocitos no humanos y las células endoteliales no humanas tienen diferentes longitudes. En diversas realizaciones, los cuerpos multicelulares alargados tienen una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mm. En diversas realizaciones, los cuerpos multicelulares alargados tienen una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cm. En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares alargados tienen una longitud que varía desde 1 mm a 10 cm. En realizaciones adicionales, los cuerpos multicelulares alargados tienen una longitud que varía desde aproximadamente 1 cm a aproximadamente 8 cm. En todavía otras realizaciones, los cuerpos multicelulares alargados tienen una longitud que varía desde aproximadamente 2 cm a aproximadamente 6 cm. En algunas realizaciones, los métodos para elaborar carne producida artificialmente, descritos en este documento comprenden superponer más de una capa de forma adyacente sobre un sustrato de soporte y permitir que las capas se fusionen para elaborar carne producida artificialmente. En diversas realizaciones, la carne comprende 50, 60, 70, 80, 90 o 100 capas. En algunas realizaciones, los métodos para elaborar carne producida artificialmente descritos en este documento comprenden la preparación de una pluralidad de cuerpos multicelulares que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos vivos, en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí, en donde los cuerpos multicelulares tienen un diámetro adaptado para permitir una difusión para sostener suficientemente el mantenimiento y el crecimiento de los miocitos no humanos y las células endoteliales no humanas en cultivo. En diversas realizaciones, los cuerpos multicelulares tienen un diámetro de 100, 200, 300, 400 o 500 μm . En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares tienen un diámetro desde 100 μm a 500 μm . En realizaciones adicionales, los cuerpos multicelulares tienen un diámetro desde aproximadamente 200 μm hasta aproximadamente 400 μm . En algunas realizaciones, el diámetro se aplica a los cuerpos multicelulares con forma sustancialmente de varilla o de esfera. En algunas realizaciones, los métodos para elaborar carne producida artificialmente descritos en este documento comprenden la preparación de una pluralidad de cuerpos multicelulares que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos vivos en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí, en donde los cuerpos multicelulares se bioimprimen.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa un ejemplo no limitante de un cuerpo multicelular; en este caso, un cuerpo multicelular 1 con una anchura W_1 que es aproximadamente igual a la altura H_1 y una longitud L_1 que es sustancialmente mayor que la anchura W_1 o la altura H_1 .

La Fig. 2 representa un ejemplo no limitante de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico; en este caso, un cuerpo multicelular sustancialmente esférico 2 con una anchura W_1 que es aproximadamente igual a la altura H_1 .

La Fig. 3 representa un ejemplo no limitante de un cuerpo multicelular; en este caso, un cuerpo multicelular 1 sobre un sustrato de soporte 3.

La Fig. 4 representa un ejemplo no limitante de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico; en este caso, un cuerpo multicelular sustancialmente esférico 2 sobre un sustrato de soporte 3.

La Fig. 5 representa un ejemplo no limitante de un método para preparar los cuerpos multicelulares ilustrados en las Figs. 1-4; en este caso, un método que implica la transferencia de un sedimento celular mezclado 4 a un tubo capilar 5.

La Fig. 6 representa un ejemplo no limitante de una pluralidad de cuerpos multicelulares; en este caso, una pluralidad de cuerpos multicelulares 1 se superpone de forma adyacente sobre un sustrato de soporte 3 de tal manera que se permite que se fusionen.

La Fig. 7 representa un ejemplo no limitante de una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos; en este caso, una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos 2 se superpone de forma adyacente sobre un sustrato de soporte 3 de tal manera que se permite que se fusionen.

La Fig. 8 representa un ejemplo no limitante de un método para preparar una capa que comprende una pluralidad de cuerpos multicelulares; en este caso, un método que implica la extrusión de cuerpos multicelulares 6 desde una extrusora mecánica accionada a presión que comprende un tubo capilar 5 sobre un sustrato de soporte 3.

5 La Fig. 9 representa un ejemplo no limitante de un método para preparar carne producida artificialmente; en este caso, un método que implica superponer más de una capa, que comprende una pluralidad de cuerpos multicelulares 7, 8, de forma adyacente sobre un sustrato de soporte 3.

10 La Fig. 10 representa un ejemplo no limitante de un método para preparar carne producida artificialmente; en este caso, un método que implica superponer más de una capa, que comprende una pluralidad de cuerpos multicelulares 9 y una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos 10, de forma adyacente sobre un sustrato de soporte 3.

La Fig. 11 representa un ejemplo no limitante de un método para preparar carne producida artificialmente; en este caso, un método que implica apilar más de una capa, en donde las capas posteriores a la primera se giran 90 grados con respecto a la capa de abajo.

15 Descripción detallada de la invención

Los productos tisulares producidos artificialmente preparados usando materiales y métodos tradicionales están limitados por el tamaño debido a las cortas distancias que los gases y los nutrientes pueden difundir para nutrir las células del interior. Además, las técnicas existentes no pueden proporcionar una velocidad y un rendimiento adecuados para la producción en masa de productos producidos artificialmente. Como resultado, los métodos existentes de producción artificial de tejidos, utilizados para producir productos cárnicos, dan lugar a láminas y pastas finas poco atractivas, a una escala que es inviable comercialmente.

20 Por lo tanto, un objetivo de los métodos para la preparación de un producto cárnico comestible, descrito en este documento, es proporcionar productos cárnicos comercialmente viables y atractivos. Otro objetivo es proporcionar métodos de alto rendimiento que estén mejorados de forma fiable, precisa y reproducible hasta niveles comerciales. Las ventajas de los métodos para preparar los productos cárnicos comestibles descritos en este documento, incluyen pero no se limitan a, la producción de tejidos personalizados de forma reproducible, con alto rendimiento y fácilmente ampliable, manteniendo un control preciso de la formación de un patrón, en particular en los casos de múltiples tipos de células, lo que puede dar lugar a productos cárnicos producidos artificialmente con sabor, textura, grosor y apariencia atractivos.

30 En este documento se proporcionan, en diversas realizaciones, métodos para elaborar carne producida artificialmente, en donde el método comprende: a) preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos que se cohesionan entre sí; b) superponer más de un cuerpo multicelular de forma adyacente sobre un sustrato de soporte plano; c) fusionar dichos cuerpos multicelulares al menos parcialmente entre sí para formar una primera capa; d) apilar más de 50 capas adicionales sobre la primera capa; e) fusionar las capas apiladas para formar un volumen de carne producida artificialmente; y f) cultivar las capas apiladas para fusionar las capas, mientras que las capas en la región interior del volumen mueren, de manera que la mayoría de las células en el volumen han muerto después de que la fusión entre las capas se completa, al menos parcialmente, y en donde la carne producida artificialmente es comestible; y g) opcionalmente, congelar dicha carne; siempre que la carne producida artificialmente sea comestible y para ingestión.

40 También se proporciona en esta memoria, en diversas realizaciones, métodos para elaborar carne producida artificialmente, que comprenden: a) preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares alargados y/o una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos vivos en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; b) superponer más de un cuerpo multicelular alargado y más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte; c) permitir que dichos cuerpos multicelulares se fusionen para formar una capa; d) apilar más de 50 capas adicionales sobre la primera capa; e) fusionar las capas apiladas para formar un volumen de carne producida artificialmente; y f) cultivar las capas apiladas para fusionar las capas mientras que las capas en una región interior del volumen mueren, de manera que la mayoría de las células en el volumen están muertas después de que la fusión entre las capas se completa, al menos parcialmente, y en donde la carne producida artificialmente es comestible; y g) opcionalmente, congelar dicha carne; siempre que la carne producida artificialmente sea comestible y para ingestión. También se describen en esta memoria, en diversas realizaciones, métodos para elaborar carne producida artificialmente, que comprenden: a) preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares alargados y/o una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; b) superponer más de un cuerpo multicelular alargado y más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte; c) fusionar dichos cuerpos multicelulares para formar una capa; d) apilar más de una capa de forma adyacente entre sí sobre un sustrato de soporte; y e) fusionar dichas capas para formar un volumen de carne producida artificialmente; siempre que la carne producida artificialmente sea comestible. En algunas realizaciones, los métodos comprenden superponer más de un cuerpo multicelular alargado y más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico en diferentes relaciones de

forma adyacente sobre un sustrato de soporte. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además congelar dicha carne.

También se proporcionan en esta memoria, en diversas realizaciones, métodos para elaborar carne producida artificialmente, que comprenden: a) preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos vivos en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; b) superponer más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte; c) permitir que dichos cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos se fusionen para formar una capa; d) apilar más de aproximadamente 50 capas adicionales sobre la primera capa; e) fusionar las capas apiladas para formar un volumen de carne producida artificialmente; y f) cultivar las capas apiladas para fusionar las capas mientras que las capas en una región interior del volumen mueren, de manera que la mayoría de las células en el volumen han muerto después de que la fusión entre las capas se completa, al menos parcialmente, y en donde la carne producida artificialmente es comestible; y g) opcionalmente, congelar dicha carne; siempre que la carne producida artificialmente sea comestible y para ingestión. También se describen en esta memoria, en diversas realizaciones, métodos para elaborar carne producida artificialmente, que comprenden: a) preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos, en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; b) superponer más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte; c) fusionar dichos cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos para formar una capa; d) apilar más de aproximadamente 50 capas adicionales sobre la primera capa; e) fusionar las capas apiladas para formar un volumen de carne producida artificialmente; y f) cultivar las capas apiladas para fusionar las capas mientras que las capas en una zona interior del volumen mueren, de manera que la mayoría de las células en el volumen están muertas después de que la fusión entre las capas se completa, al menos parcialmente, y en donde la carne producida artificialmente es comestible. En algunas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente congelar dicha carne.

Una idea básica subyacente a la producción artificial clásica de tejidos es sembrar células vivas en una estructura biocompatible y, eventualmente, biodegradable, y después cultivar el sistema en un biorreactor de modo que la población inicial de células se pueda expandir en un tejido. La producción artificial clásica de tejidos tiene varias carencias, especialmente cuando se aplica a la producción de productos cárnicos. En primer lugar, el procedimiento de siembra de las células generalmente implica poner en contacto una solución de células con una estructura, de tal manera que las células estén atrapadas dentro de los poros, fibras u otra microestructura de la estructura. Este procedimiento es sustancialmente al azar con respecto a la colocación de las células dentro de la estructura y la colocación de las células una respecto a la otra. Por lo tanto, las estructuras sembradas no son inmediatamente útiles para la producción de estructuras artificiales tridimensionales que muestran patrones o una colocación planeada o predeterminada de las células o de agregados de células. En segundo lugar, una selección de la estructura de biomaterial que sea ideal para un tipo celular dado, es problemática y a menudo se realiza mediante prueba y error. Incluso si está disponible el biomaterial adecuado, una estructura puede interferir con el logro de una alta densidad celular. Por otra parte, la producción artificial de tejidos basada en estructuras no se incrementa fácilmente o de forma fiable hasta niveles industriales.

En algunas realizaciones, los productos cárnicos producidos artificialmente, las capas y los cuerpos multicelulares, se preparan con un método que utiliza una tecnología de creación rápida de prototipos basada en un depósito en tres dimensiones, automatizado, asistido por ordenador de los cuerpos multicelulares (por ejemplo, cilindros y esferoides) y una estructura de soporte biocompatible (por ejemplo, compuesta a base de agarosa) mediante un dispositivo de entrega tridimensional (por ejemplo, una bioimpresora). La expresión "producción artificial", significa normalmente producido por el hombre o dispuesto cuando se utiliza para referirse a las capas y los productos cárnicos que se describen en este documento. Un ejemplo de una carne producida artificialmente puede incluir la disposición o la colocación de cuerpos multicelulares y/o capas para elaborar los productos cárnicos producidos artificialmente por un dispositivo asistido por ordenador (por ejemplo, una bioimpresora) de acuerdo con una secuencia de comandos informáticos. En otras realizaciones, la secuencia de comandos informáticos es, por ejemplo, uno o varios programas informáticos, aplicaciones informáticas o módulos informáticos. En todavía otras realizaciones, las estructuras de tejidos tridimensionales se elaboran a través de una fusión posterior a la impresión de los cuerpos multicelulares de forma similar a los fenómenos de autoensamblaje en la morfogénesis temprana.

A diferencia de otros tejidos producidos artificialmente, la carne producida artificialmente descrita en este documento está formada por un apilamiento de capas de láminas planas bidimensionales de cuerpos multicelulares al menos parcialmente fusionados. Por tanto, los métodos para elaborar incluso grandes volúmenes de carne producida artificialmente, descritos en este documento pueden no tener que requerir simultáneamente la formación de tres patrones dimensionales, pero se pueden realizar mediante un cultivo (en paralelo) de múltiples capas bidimensionales que se pueden ensamblar posteriormente en un conjunto tridimensional o subconjuntos que luego se pueden apilar juntos. Este método ventajoso para elaborar las carnes producidas artificialmente descritas en este documento, puede permitir que el volumen de carne producida artificialmente se forme sin tener la necesidad de armazones o estructuras de soporte tridimensionales, tales como cuerpos de relleno. Además, las capas bidimensionales se pueden formar de forma paralela con un espesor relativamente delgado que permite una difusión de los nutrientes desde un medio de cultivo en la capa plana durante el cultivo (por ejemplo, durante la fusión de los cuerpos multicelulares de los componentes dentro de la capa). Únicamente después de apilar las capas de componentes para formar el volumen, entonces la difusión de los nutrientes puede ser limitante, dando lugar a la muerte celular.

5 Por lo tanto, aunque está disponible una serie de métodos para disponer los cuerpos multicelulares sobre un sustrato de soporte para producir una estructura tridimensional que incluye una colocación manual, incluyendo el posicionamiento mediante una máquina automática, asistida por ordenador, tal como un bioimpresora, tales métodos pueden ser útiles, pero no son necesarios. Las ventajas de una entrega de los cuerpos multicelulares con tecnología de bioimpresión incluyen una colocación rápida, precisa y reproducible de los cuerpos multicelulares para producir estructuras artificiales que muestran orientaciones o patrones planeados o predeterminados de cuerpos multicelulares y/o capas con diversas composiciones. Las ventajas incluyen también asegurar una alta densidad celular, mientras que se minimiza el daño celular asociado frecuentemente con otros métodos de depósito basados en la fabricación con forma libre sólida, centrados en la impresión de células en combinación con hidrogeles.

10 También se describen en este documento métodos para preparar o elaborar carnes producidas artificialmente, y métodos comerciales. En algunas realizaciones, la velocidad y la capacidad de ampliar las técnicas y los métodos descritos en este documento, se utilizan para diseñar, construir y manejar instalaciones industriales y/o comerciales para la producción de productos cárnicos comestibles, producidos artificialmente. En realizaciones adicionales, los productos cárnicos producidos artificialmente son producidos, envasados, congelados, almacenados, distribuidos, comercializados, promocionados y vendidos como, por ejemplo, productos alimenticios para seres humanos, componentes o ingredientes de productos alimenticios para seres humanos, productos alimenticios para animales no humanos o componentes o ingredientes de productos alimenticios para animales no humanos.

Células

20 Muchos tipos de células autoadherentes se pueden usar para elaborar los cuerpos multicelulares, las capas y los productos de carne producida artificialmente descritos en este documento. En algunas realizaciones, los productos de carne producida artificialmente están diseñados para parecerse a productos cárnicos tradicionales y los tipos de células se eligen para que se aproximen a los que se encuentran en los productos cárnicos tradicionales. En realizaciones adicionales, los productos cárnicos producidos artificialmente, las capas y los cuerpos multicelulares incluyen miocitos no humanos. En todavía otras realizaciones, los productos cárnicos producidos artificialmente, las capas y los cuerpos multicelulares incluyen miocitos no humanos, y/o células endoteliales, y/o células adiposas, y/o fibroblastos.

30 En general, las carnes producidas artificialmente descritas en esta memoria pueden diferir de las carnes naturales y de otras carnes producidas artificialmente por carecer de vasos sanguíneos, y también carecer de inervación nerviosa. Incluso en variaciones en las que se incluyen células endoteliales como un componente de uno o varios cuerpos multicelulares, la carne producida artificialmente no incluirá vasos sanguíneos competentes para transmitir sangre. Por tanto, incluso los grandes volúmenes de carne producida artificialmente elaborados por los métodos descritos en este documento, pueden no tener ningún vaso sanguíneo. Además, las carnes producidas artificialmente descritas en este documento pueden carecer de cualquier componente nervioso (por ejemplo, axones, dendritas, cuerpos de células nerviosas), ya que se pueden cultivar sin tales componentes.

35 Los seres humanos comen tradicionalmente varios tipos de tejido muscular animal. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los miocitos son miocitos esqueléticos. En algunas realizaciones, los miocitos son miocitos cardiacos. En algunas realizaciones, los miocitos son miocitos lisos. En algunas realizaciones, las células endoteliales son células endoteliales microvasculares.

40 En otras realizaciones, los productos de carne producida artificialmente incluyen células neurales, tejido conectivo (incluyendo hueso, cartílago, células que se diferencian en células formadoras de hueso y condrocitos, y tejidos linfáticos), células epiteliales (incluyendo células endoteliales que forman los revestimientos en cavidades y vasos o canales, células epiteliales secretoras exocrinas, células epiteliales absorbentes, células epiteliales queratinizantes y células secretoras de la matriz extracelular), y células no diferenciadas (tales como células embrionarias, células madre y otras células precursoras), entre otras.

45 En algunas realizaciones, las células utilizadas para elaborar un cuerpo multicelular se obtienen a partir de un animal vivo y se cultivan como una línea celular primaria. Por ejemplo, en realizaciones adicionales, las células se obtienen mediante biopsia y se cultivan *ex vivo*. En otras realizaciones, las células se obtienen a partir de fuentes comerciales.

50 Los productos de carne producida artificialmente y las capas que comprenden una pluralidad de cuerpos multicelulares para uso en la producción de dicha carne descrita en este documento, son comestibles y están destinados al consumo por seres humanos, animales no humanos o ambos. En algunas realizaciones, los productos de carne producida artificialmente son productos alimenticios humanos. En otras realizaciones, los productos de carne producida artificialmente son un alimento animal, tal como un alimento para el ganado, alimento para la acuicultura o alimento para animales domésticos. Por lo tanto, de cara a la descripción proporcionada en el presente documento, los expertos en la técnica reconocerán que las células no humanas procedentes de una gran variedad de fuentes son adecuadas para uso en la producción de tales productos y con los métodos descritos en este documento. En diversas realizaciones, los cuerpos multicelulares, las capas que comprenden los cuerpos multicelulares y los productos de carne producida artificialmente comprenden células no humanas obtenidas a partir de, a modo de ejemplos no limitantes, mamíferos, aves, reptiles, peces, crustáceos, moluscos, cefalópodos, insectos, invertebrados no artrópo-

dos y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, las células adecuadas se obtienen a partir de mamíferos tales como antílope, oso, castor, bisonte, jabalí, camello, caribú, vaca, ciervo, elefante, alce, zorro, jirafa, cabra, liebre, caballo, cabra montesa, canguro, león, llama, alce americano, saíno, cerdo, conejo, foca, oveja, ardilla, tigre, ballena, yak y cebra o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células adecuadas se obtienen a partir de aves tales como pollo, pato, emú, ganso, urogallo, avestruz, faisán, paloma, codorniz y pavo o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, las células adecuadas se obtienen a partir de reptiles, tales como tortuga, serpiente, cocodrilo y caimán o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células adecuadas se obtienen a partir de peces tales como boquerón, lubina, bagre, carpa, bacalao, anguila, platija, fugu, mero, eglefino, fletán, arenque, caballa, lampugo, marlín, emperador, perca, lucio, abadejo, salmón, sardina, tiburón, pargo, lenguado, pez espada, tilapia, trucha, atún y lucioperca o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células adecuadas se obtienen a partir de crustáceos tales como cangrejo, cangrejo de río, langosta, gamba y camarón o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células adecuadas se obtienen a partir de moluscos tales como oreja de mar, almeja, concha, mejillón, ostra, vieira y caracol o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células adecuadas se obtienen a partir de cefalópodos tales como sepia, pulpo y calamar o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células adecuadas se obtienen a partir de insectos tales como hormiga, abeja, escarabajo, mariposa, cucaracha, grillo, caballito del diablo, libélula, tijereta, pulga, mosca, saltamontes, mantis, efímera, polilla, lepismas, termita, avispa o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células adecuadas se obtienen a partir de invertebrados no artrópodos (por ejemplo, gusanos) tales como gusanos planos, tenias, trematodos, triquinas, ascárides, anquilostomas, gusanos segmentados (por ejemplo, lombrices, poliquetos, etc.) o combinaciones de los mismos.

Organismos multicelulares

Se describen en el presente documento cuerpos multicelulares que incluyen una pluralidad de células vivas no humanas en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí. También se describen en este documento métodos que comprenden: preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos vivos, en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí; superponer más de un cuerpo multicelular de forma adyacente sobre un sustrato de soporte; y permitir que los cuerpos multicelulares se fusionen para formar una capa sustancialmente plana para uso en la elaboración de carne producida artificialmente. En algunas realizaciones, un cuerpo multicelular comprende una pluralidad de células adheridas y/o cohesionadas entre sí en una forma tridimensional deseada con consistencia viscoelástica e integridad suficiente para facilitar la manipulación y el manejo durante un procedimiento de bioproducción artificial, tal como una producción artificial de tejidos. En algunas realizaciones, una integridad suficiente significa que el cuerpo multicelular, durante la manipulación posterior, es capaz de conservar su forma física, que no es rígida, pero que tiene una consistencia viscoelástica, y de mantener la vitalidad de las células.

En algunas realizaciones, un cuerpo multicelular es homocelular. En otras realizaciones, un cuerpo multicelular es heterocelular. En los cuerpos multicelulares homocelulares, la pluralidad de células vivas incluye una pluralidad de células vivas de un solo tipo de célula. Sustancialmente, todas las células vivas en un cuerpo multicelular homocelular son sustancialmente células de un solo tipo de célula. Por el contrario, un cuerpo multicelular heterocelular incluye un número significativo de células de más de un tipo celular. Las células vivas en un cuerpo heterocelular pueden permanecer sin clasificar o se pueden "ordenar" (por ejemplo, autoensamblar) durante el proceso de fusión para formar una estructura interna particular para el tejido producido de forma artificial. La ordenación de las células es consistente con las predicciones de la hipótesis de adhesión diferencial (DAH, del inglés "Differential Adhesion Hypothesis"). La DAH explica el comportamiento de tipo líquido de poblaciones de células en términos de tensiones en la superficie del tejido e interfaciales, generadas por interacciones adhesivas y cohesivas entre los componentes celulares. En general, las células se pueden ordenar basándose en diferencias en las fuerzas adhesivas de las células. Por ejemplo, los tipos de células que se ordenan hacia el interior de un cuerpo multicelular heterocelular tienen generalmente una resistencia a la adherencia más fuerte (y por lo tanto una tensión superficial más elevada) que las células que se ordenan en la parte exterior del cuerpo multicelular.

En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares descritos en este documento también incluyen uno o varios componentes de una matriz extracelular (ECM) o uno o varios derivados de uno o varios componentes de la ECM, además de la pluralidad de células. Por ejemplo, los cuerpos multicelulares pueden contener diversas proteínas de la ECM incluyendo, a modo de ejemplos no limitantes, gelatina, fibrinógeno, fibrina, colágeno, fibronectina, laminina, elastina y proteoglicanos. Los componentes de la ECM o los derivados de los componentes de la ECM se pueden añadir a una pasta de células empleada para crear un cuerpo multicelular. Los componentes de la ECM o los derivados de los componentes de la ECM añadidos a una pasta de células se pueden purificar a partir de una fuente animal o ser producidos por métodos recombinantes conocidos en la técnica. Alternativamente, los componentes de la ECM o los derivados de los componentes de la ECM se pueden secretar de forma natural por las células en el cuerpo multicelular.

En algunas realizaciones, un cuerpo multicelular incluye un medio de cultivo tisular. En realizaciones adicionales, el medio de cultivo tisular puede ser cualquier medio fisiológicamente compatible y normalmente se selecciona de acuerdo con el tipo o tipos de células implicadas, tal y como se conoce en la técnica. En algunos casos, el medio de

cultivo tisular adecuado comprende, por ejemplo, nutrientes básicos, tales como azúcares y aminoácidos, factores de crecimiento, antibióticos (para minimizar la contaminación), etc.

La adhesión y/o la cohesión de las células en un cuerpo multicelular es de forma adecuada lo suficientemente fuerte como para permitir que el cuerpo multicelular conserve una forma tridimensional mientras se sostiene a sí mismo sobre una superficie plana. Por ejemplo, en algunos casos, un cuerpo multicelular que se sujeta a sí mismo sobre un sustrato plano, puede presentar una cierta deformación menor (por ejemplo, en donde el cuerpo multicelular se pone en contacto con la superficie), sin embargo, el cuerpo multicelular es suficientemente cohesivo para conservar una altura que es al menos la mitad de su anchura, y en algunos casos, aproximadamente igual a la anchura. En algunas realizaciones, dos o más cuerpos multicelulares colocados en una relación contigua uno al lado del otro, frente a otro sobre un sustrato plano, forman un espacio vacío debajo de sus lados y por encima de la superficie de trabajo. Véanse, por ejemplo, las Figs. 3 y 4. En realizaciones adicionales, la cohesión de las células en un cuerpo multicelular es lo suficientemente fuerte para permitir que el cuerpo multicelular soporte el peso de al menos un cuerpo multicelular de tamaño y forma similares, cuando el cuerpo multicelular se ensambla para formar una estructura artificial en la que los cuerpos multicelulares están apilados uno encima de otro. Véanse, por ejemplo, las Figs. 9 y 10. En otras realizaciones adicionales, la adhesión y/o la cohesión de las células en un cuerpo multicelular es también de forma adecuada lo suficientemente fuerte como para permitir que el cuerpo multicelular pueda ser recogido con un instrumento (por ejemplo, una micropipeta capilar).

De cara a la descripción proporcionada en el presente documento, los expertos en la técnica reconocerán que los cuerpos multicelulares que tienen diferentes tamaños y formas están dentro del alcance de las realizaciones proporcionadas en este documento. En algunas realizaciones, un cuerpo multicelular es sustancialmente cilíndrico y tiene una sección transversal sustancialmente circular. Por ejemplo, un cuerpo multicelular, en diversas realizaciones, tiene una forma alargada (por ejemplo, una forma cilíndrica) con una forma de sección transversal cuadrada, rectangular, triangular o cualquier otra forma no circular. Del mismo modo, en diversas realizaciones, un cuerpo multicelular tiene una forma generalmente esférica, una forma cilíndrica no alargada o una forma cuboidal.

En diversas realizaciones, el diámetro de un cuerpo multicelular es de aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 μm o incrementos cuantificables en los mismos. En algunas realizaciones, un cuerpo multicelular se configura para limitar la necrosis celular causada por la incapacidad del oxígeno y/o los nutrientes para difundir a porciones centrales del cuerpo multicelular. Por ejemplo, un cuerpo multicelular se configura convenientemente de tal manera que ninguna de las células vivas en el mismo está a más de aproximadamente 250 μm de una superficie exterior del cuerpo multicelular, y más adecuadamente de modo que ninguna de las células vivas en el mismo está a más de aproximadamente 200 μm del exterior del cuerpo multicelular.

En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares tienen longitudes diferentes. En otras realizaciones, los cuerpos multicelulares tienen longitudes sustancialmente similares. En diversas realizaciones, la longitud de un cuerpo multicelular es de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10 mm o incrementos cuantificables en las mismas. En otras diversas realizaciones, la longitud de un cuerpo multicelular es de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10 cm o incrementos cuantificables en las mismas. En algunas realizaciones, la longitud de los cuerpos multicelulares se elige de modo que dé lugar a una forma y/o un tamaño de producto cárnico producido artificialmente que se aproxime al de un producto cárnico tradicional, por ejemplo, una tira de tocino, una hamburguesa, un filete de pescado, una pechuga de pollo o un bistec.

Haciendo referencia a la Fig. 1, en algunas realizaciones, un cuerpo multicelular 1 es sustancialmente cilíndrico con una anchura W_1 aproximadamente igual a una altura H_1 y tiene una sección transversal sustancialmente circular. En realizaciones adicionales, un cuerpo multicelular 1 es alargado con una longitud L_1 . En todavía otras realizaciones, W_1 y H_1 son de forma adecuada desde aproximadamente 300 a aproximadamente 600 μm y L_1 es de forma adecuada desde aproximadamente 2 cm a aproximadamente 6 cm.

Haciendo referencia a la Fig. 2, en algunas realizaciones, un cuerpo multicelular 2 es sustancialmente esférico con una anchura W_1 aproximadamente igual a una altura H_1 . En realizaciones adicionales, W_1 y H_1 son de forma adecuada desde aproximadamente 300 a aproximadamente 600 μm .

Capas

La carne producida artificialmente obtenida por el método de acuerdo con la invención incluye más de 50 capas sobre la primera capa, en donde cada capa incluye una pluralidad de cuerpos multicelulares que comprenden una pluralidad de células vivas no humanas, en donde las células se adhieren y/o se cohesionan entre sí. También se describen en este documento métodos que comprenden las etapas para superponer cuerpos multicelulares de forma adyacente sobre un sustrato de soporte y permitir que los cuerpos multicelulares se fusionen para formar una capa sustancialmente plana para uso en la formación de productos de carne comestible producidos artificialmente. En algunas realizaciones, cada capa se bioimprime, utilizando las técnicas descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, una capa incluye cuerpos multicelulares homocelulares. En otras realizaciones, una capa incluye cuerpos multicelulares heterocelulares. En aún otras realizaciones, una capa incluye cuerpos multicelulares

tanto homocelulares como heterocelulares. En realizaciones adicionales, una capa incluye miocitos no humanos. En todavía otras realizaciones, una capa incluye miocitos no humanos, células endoteliales no humanas y células adiposas y/o células fibroblastos. En todavía otras realizaciones, una capa incluye miocitos no humanos, células endoteliales no humanas, y otros tipos de células descritas en este documento.

5 En realizaciones que incluyen tanto miocitos no humanos como células endoteliales no humanas, una capa puede incluir miocitos no humanos y células endoteliales no humanas en una proporción de aproximadamente 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 y 1:1 o incrementos en las mismas. En algunas realizaciones, una capa contiene miocitos no humanos y células endoteliales no humanas en una proporción desde aproximadamente 19:1 a aproximadamente 3:1. En diversas realizaciones, una capa incluye células endoteliales no humanas que comprenden aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% y 25% o incrementos en los mismos, de la población celular total. En algunas realizaciones, una capa incluye células endoteliales no humanas que comprenden desde aproximadamente 5% a aproximadamente 15% de la población celular total. En realizaciones adicionales, la presencia de células endoteliales contribuye a la endotelialización, descrita adicionalmente en este documento.

10 En diversas realizaciones, el espesor de cada capa es de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000 o 5000 μm o incrementos cuantificables en los mismos. En algunas realizaciones, el espesor de cada capa se elige para que permita una difusión para favorecer suficientemente el mantenimiento y crecimiento de sustancialmente todas las células en la capa en cultivo.

15 En diversas realizaciones, la pluralidad de las capas incluye aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 capas o incrementos en las mismas. En algunas realizaciones, el número de capas se elige para dar lugar a un producto cárnico producido artificialmente con un grosor que se aproxima al de un producto cárnico tradicional, por ejemplo, una tira de tocino, una hamburguesa, un filete de pescado, una pechuga de pollo o un bistec.

20 En algunas realizaciones, las capas producidas artificialmente están diseñadas para parecerse a productos cárnicos tradicionales y los parámetros del diseño (por ejemplo, tipos de células, aditivos, tamaño, forma, etc.) se eligen para que se aproximen a los que se encuentran en los productos cárnicos tradicionales. En realizaciones adicionales, una capa se caracteriza por una composición nutricional que es sustancialmente similar a los productos cárnicos tradicionales. En todavía otras realizaciones, una capa se caracteriza por una composición nutricional que es sustancialmente en un 60-80 por ciento fluido acuoso, 14-35 por ciento proteína, 1-25 por ciento grasa, 1-5 por ciento carbohidratos y 1-5 por ciento otras sustancias. En algunas realizaciones, los miocitos de las capas producidas artificialmente o la carne endotelizada, están alineados. En algunas realizaciones, los miocitos se alinean mediante la aplicación de un campo eléctrico como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, los miocitos se alinean mediante la aplicación de un estímulo mecánico, como un estiramiento y relajación cíclicos del sustrato, como se conoce en la técnica. En realizaciones adicionales, los miocitos alineados (por ejemplo, electro-orientados y mecano-orientados) tienen sustancialmente la misma orientación en relación uno con otro que la que se encuentra en muchos tejidos musculares animales. En algunas realizaciones, las capas de los cuerpos multicelulares proporcionados en este documento, están expuestas a una estimulación eléctrica y/o mecánica para facilitar la formación de una disposición fisiológica de las células musculares.

Aditivos

25 En algunas realizaciones, los productos de carne producida artificialmente, las capas producidas artificialmente y/o los cuerpos multicelulares incluyen uno o varios suplementos nutricionales. En realizaciones adicionales, uno o varios suplementos nutricionales se seleccionan a partir de: vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos y aminoácidos. En algunas realizaciones, los productos de carne producida artificialmente, las capas y/o los cuerpos multicelulares incluyen uno o varios aditivos para mejorar el atractivo comercial (por ejemplo, la apariencia, el sabor, el color, el olor, etc.). En realizaciones adicionales, los productos de carne producida artificialmente, las capas y/o los cuerpos multicelulares incluyen uno o varios agentes saborizantes, uno o varios colorantes y/o uno o varios agentes odoríferos.

30 En algunas realizaciones, los productos de carne producida artificialmente, las capas producidas artificialmente y/o los cuerpos multicelulares incluyen uno o varios a partir de: proteínas matriciales, proteoglicanos, antioxidantes, perfluorocarbonos y factores de crecimiento. La expresión "factor de crecimiento", tal y como se utiliza en este documento, se refiere a una proteína, un polipéptido o un complejo de polipéptidos, que incluyen citocinas, que son producidas por una célula y que pueden afectar a ella misma y/o a una variedad de otras células vecinas o distantes. Típicamente, los factores de crecimiento afectan al crecimiento y/o la diferenciación de tipos específicos de células, ya sea en el desarrollo o como respuesta a una multitud de estímulos fisiológicos o ambientales. Algunos, pero no todos los factores de crecimiento son hormonas. Factores de crecimiento a modo de ejemplo son insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), incluyendo FGF básico (bFGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs), incluyendo PDGF-AA y PDGF-AB, factor

de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), incluyendo TGF β 1 y TGF β 3, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina 6 (IL-6), IL-8 y similares.

- 5 En algunas realizaciones, los productos de carne producida artificialmente, las capas producidas artificialmente y/o los cuerpos multicelulares incluyen uno o varios conservantes de alimentos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los conservantes son conservantes antimicrobianos que incluyen, a modo de ejemplos no limitantes, propionato de calcio, nitrato de sodio, nitrito de sodio, sulfitos (por ejemplo, dióxido de azufre, bisulfito de sodio, hidrógeno sulfito de potasio, etc.) y ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA). En algunas realizaciones, los conservantes son conservantes antioxidantes que incluyen, a modo de ejemplos no limitantes, hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT).

Sustrato de soporte

- 15 En el presente documento se describe, en algunas realizaciones, una pluralidad de cuerpos multicelulares dispuestos de forma adyacente sobre un sustrato de soporte para formar una capa sustancialmente plana para uso en la elaboración de carne comestible producida artificialmente. También se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, métodos que comprenden disponer los cuerpos multicelulares de forma adyacente sobre un sustrato de soporte para formar capas sustancialmente planas, superponer más de una capa de forma adyacente sobre un sustrato de soporte individual y permitir que las capas se fusionen para elaborar carne producida artificialmente. Por ejemplo, se puede formar una pluralidad de capas como se ha descrito anteriormente, al mismo tiempo sobre diferentes sustratos, después se retiran de su sustrato cuando los cuerpos multicelulares se han fusionado lo suficiente para que se puedan retirar y se apilan uno encima de otro, o encima de un único sustrato.

- 20 En general, cada capa incluye miocitos no humanos. A las células en las porciones centrales de tales estructuras artificiales se les suministra normalmente oxígeno y nutrientes mediante difusión; sin embargo, los gases y los nutrientes normalmente difunden aproximadamente 200-300 μ m dentro de las estructuras artificiales celulares tridimensionales.

- 25 En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares descritos en este documento tienen un diámetro adaptado para permitir la difusión para favorecer suficientemente el mantenimiento y el crecimiento de dichos miocitos no humanos en cultivo. Como resultado, en realizaciones adicionales, las capas descritas en este documento tienen un grosor adaptado para permitir una difusión para favorecer suficientemente el mantenimiento y el crecimiento de dicho miocitos no humanos en cultivo.

- 30 Para facilitar y mejorar la difusión, en algunas realizaciones, un sustrato de soporte es permeable a los fluidos, gases y nutrientes, y permite que el medio de cultivo celular se ponga en contacto con todas las superficies de los cuerpos multicelulares y/o las capas durante, por ejemplo, el crecimiento, la maduración y la fusión. En diversas realizaciones, un sustrato de soporte se prepara a base de biomateriales naturales, biomateriales sintéticos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los biomateriales naturales incluyen, a modo de ejemplos no limitantes, colágeno, fibronectina, laminina y otras matrices extracelulares. En algunas realizaciones, los biomateriales sintéticos pueden incluir, a modo de ejemplos no limitantes, hidroxiapatita, alginato, agarosa, poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) y sus copolímeros. En algunas realizaciones, un sustrato de soporte es sólido. En algunas realizaciones, un sustrato de soporte es semisólido. En realizaciones adicionales, un sustrato de soporte es una combinación de elementos de soporte sólidos y semisólidos.

- 35 En algunas realizaciones, el sustrato de soporte se levanta o se eleva por encima de una superficie no permeable, tal como una porción de un entorno de cultivo celular (por ejemplo, una placa de Petri, un frasco de cultivo celular, etc.) o un biorreactor. En todavía otras realizaciones, un sustrato de soporte elevado facilita además la circulación del medio de cultivo de las células y mejora el contacto con todas las superficies de los cuerpos multicelulares y/o las capas.

Métodos para elaborar cuerpos multicelulares

- 40 Hay varias maneras de preparar cuerpos multicelulares que tienen las características descritas en este documento. En algunas realizaciones, un cuerpo multicelular se puede preparar a partir de una pasta de células que contiene una pluralidad de células vivas o con una densidad celular y viscosidad deseadas. En realizaciones adicionales, la pasta celular se puede conformar en una forma deseada y un cuerpo multicelular se forma mediante maduración (por ejemplo, incubación). En una realización particular, un cuerpo multicelular se produce mediante la conformación de una pasta de células que incluye una pluralidad de células vivas en una forma deseada (por ejemplo, un cilindro, una esfera). En realizaciones adicionales, la pasta de células se incuba en un entorno controlado para permitir que las células se adhieran y/o se cohesionen entre sí para formar el cuerpo multicelular. En otra realización particular, un cuerpo multicelular se produce mediante la conformación de una pasta de células que incluye una pluralidad de células vivas en un dispositivo que sostiene la pasta de células en una forma tridimensional. En realizaciones adicionales, la pasta de células se incuba en un entorno controlado, mientras que se mantiene en la forma tridimensional durante un tiempo suficiente para producir un cuerpo que tiene una cohesión suficiente para sujetarse a sí mismo

sobre una superficie plana, como se describe en el presente documento.

En diversas realizaciones, una pasta de células es proporcionada mediante: (A) la mezcla de células o agregados de células (de uno varios tipos de células) y un medio de cultivo celular (por ejemplo, en una relación predeterminada) para dar lugar a una suspensión de células, y (B) compactar la suspensión celular para producir una pasta de células con una densidad celular y viscosidad deseadas. En diversas realizaciones, la compactación se consigue mediante una serie de métodos, tales como mediante la concentración de una suspensión celular particular que es el resultado de un cultivo de células para conseguir la concentración deseada de células (densidad), la viscosidad y la consistencia requerida para la pasta de células. En una realización particular, una suspensión de células relativamente diluida procedente del cultivo de células se centrifuga durante un tiempo determinado para alcanzar una concentración de células en el sedimento que permite la conformación en un molde. Una filtración con flujo tangencial ("TFF") es otro método adecuado para concentrar o compactar las células. En algunas realizaciones, los compuestos se combinan con la suspensión de células para conferir las propiedades de extrusión requeridas. Los compuestos adecuados incluyen, a modo de ejemplos no limitantes, colágeno, hidrogeles, Matrigel, nanofibras, nanofibras que se autoensamblan, gelatina, fibrinógeno, etc.

En algunas realizaciones, la pasta de células se produce mediante la mezcla de una pluralidad de células vivas con un medio de cultivo de tejidos, y la compactación de las células vivas (por ejemplo, por centrifugación). Uno o varios componentes de la ECM (o derivados de un componente de la ECM) se incluyen opcionalmente resuspendiendo el sedimento celular en uno o varios tampones fisiológicamente aceptables que contienen el o los componentes de la ECM (o uno o varios derivados del o de los componentes de la ECM) y la suspensión de células resultante se centrifuga de nuevo para formar la pasta de células.

En algunas realizaciones, la densidad celular de la pasta de células deseada para un posterior procesamiento, puede variar con los tipos de células. En realizaciones adicionales, las interacciones entre las células determinan las propiedades de la pasta de células, y diferentes tipos de células tendrán una relación diferente entre la densidad celular y la interacción célula-célula. En todavía otras realizaciones, las células se pueden tratar previamente para aumentar las interacciones celulares antes de la conformación de la pasta de células. Por ejemplo, las células se pueden incubar en el interior de un tubo de centrifuga después de la centrifugación, con el fin de mejorar las interacciones célula-célula antes de la conformación de la pasta de células.

En diversas realizaciones, se emplean muchos métodos para dar forma a la pasta de células. Por ejemplo, en una realización particular, la pasta de células se moldea o se presiona de forma manual (por ejemplo, después de la concentración/compactación) para conseguir una forma deseada. A modo de ejemplo adicional, la pasta de células se puede recoger (por ejemplo, aspirada) en un instrumento preformado, tal como una micropipeta (por ejemplo, una pipeta capilar), que da forma a la pasta de células para conformarse en una superficie interior del instrumento. La forma de la sección transversal de la micropipeta (por ejemplo, una pipeta capilar) es alternativamente circular, cuadrada, rectangular, triangular, u otra forma de sección transversal no circular. En algunas realizaciones, la pasta de células se conforma mediante el depósito en un molde preformado, tal como un molde de plástico, molde de metal o un molde de gel. En algunas realizaciones, un moldeo centrífugo o un moldeo continuo se emplean para dar forma a la pasta de células.

Haciendo referencia a la Fig. 5, en un ejemplo particular, la conformación incluye retener la pasta celular 4 en un dispositivo de conformación 5 (por ejemplo, una pipeta capilar) para permitir que las células se adhieran parcialmente y/o se cohesionen entre sí en el dispositivo de conformación. A modo de ejemplo adicional, la pasta de células se puede aspirar dentro de un dispositivo de conformación y se mantiene en el dispositivo de conformación durante un período de maduración (también denominado en el presente documento periodo de incubación) para permitir que al menos parcialmente, las células se adhieran y/o se cohesionen entre sí. En algunas realizaciones, el dispositivo de conformación (por ejemplo, una pipeta capilar) forma parte de un cabezal de impresión de una bioimpresora o un aparato similar, operativo para colocar automáticamente el cuerpo multicelular en una estructura artificial tridimensional. Sin embargo, existe un límite en la cantidad de tiempo que las células pueden permanecer en un dispositivo de conformación, tal como una pipeta capilar, el cual proporciona a las células solo un acceso limitado en el mejor de los casos, al oxígeno y/o los nutrientes, antes de que se vea afectada la viabilidad de las células.

En algunas realizaciones, una pasta de células parcialmente adherida y/o cohesionada se transfiere desde el dispositivo de conformación (por ejemplo, una pipeta capilar) a un segundo dispositivo de conformación (por ejemplo, un molde) que permite que los nutrientes y/o el oxígeno se suministren a las células mientras que se mantienen en el segundo dispositivo de conformación durante un periodo de maduración adicional. Un ejemplo de un dispositivo de conformación adecuado que permite suministrar a las células nutrientes y oxígeno, es un molde para la producción de una pluralidad de cuerpos multicelulares (por ejemplo, cuerpos multicelulares sustancialmente idénticos). A modo de ejemplo adicional, un molde de este tipo incluye un sustrato biocompatible a base de un material que es resistente a la migración y el crecimiento hacia el interior de las células dentro del sustrato y que es resistente a la adherencia de las células al sustrato. En diversas realizaciones, el sustrato puede estar formado de forma adecuada a base de Teflon[®], (PTFE), acero inoxidable, agarosa, polietilenglicol, vidrio, metal, plástico o materiales de gel (por ejemplo, gel de agarosa u otro hidrogel), y materiales similares. En algunas realizaciones, el molde también está configurado de forma adecuada para permitir el suministro de un medio de cultivo tisular hasta la pasta de células (por ejemplo, suministrando los medios de cultivo tisulares sobre la parte superior del molde).

En una realización particular, se forma una pluralidad de ranuras alargadas en el sustrato. En una realización particular adicional, la profundidad de cada ranura está en el intervalo desde aproximadamente 500 micrómetros a aproximadamente 1000 micrómetros, y la parte inferior de cada ranura tiene una forma con sección transversal semicircular para la formación de cuerpos multicelulares alargados cilíndricos que tienen una forma con sección transversal sustancialmente circular. En una realización adicional particular, la anchura de las ranuras es adecuadamente un poco más grande que la anchura del cuerpo multicelular que se va a producir en el molde. Por ejemplo, la anchura de las ranuras está adecuadamente en el intervalo desde aproximadamente 300 micrómetros a aproximadamente 1000 micrómetros.

Por lo tanto, en realizaciones en las que se utiliza un segundo dispositivo de conformación, la pasta de células parcialmente adheridas y/o cohesionadas se transfiere desde el primer dispositivo de conformación (por ejemplo, una pipeta capilar) al segundo dispositivo de conformación (por ejemplo, un molde). En realizaciones adicionales, la pasta de células parcialmente adheridas y/o cohesionadas se puede transferir a través del primer dispositivo de conformación (por ejemplo, la pipeta capilar) a las ranuras de un molde. En todavía otras realizaciones, después de un período de maduración en el que se incuba el molde junto con la pasta de células retenida en el mismo, en un entorno controlado para permitir que las células en la pasta de células se adhieran y/o se cohesionen adicionalmente entre sí para formar el cuerpo multicelular, la cohesión de las células será lo suficientemente fuerte como para permitir que el cuerpo multicelular resultante se recoja con un instrumento (por ejemplo, una pipeta capilar). En otras realizaciones adicionales, la pipeta capilar forma parte adecuadamente de un cabezal de impresión de una bioimpresora o un aparato similar que puede actuar para colocar automáticamente el cuerpo multicelular dentro de una estructura artificial tridimensional.

En algunas realizaciones, la forma de la sección transversal y el tamaño de los cuerpos multicelulares se corresponderá sustancialmente con las formas de la sección transversal y los tamaños del primer dispositivo de conformación y, opcionalmente, el segundo dispositivo de conformación utilizado para preparar los cuerpos multicelulares, y el experto en la técnica será capaz de seleccionar los dispositivos de conformación adecuados que tengan formas de sección transversal, superficies de sección transversal, diámetros y longitudes adecuadas para la creación de cuerpos multicelulares que tengan las formas de sección transversal, superficies de sección transversal, diámetros y longitudes descritas anteriormente.

Como se ha descrito en este documento, se puede emplear una gran variedad de tipos celulares para elaborar los cuerpos multicelulares de las presentes realizaciones. Por lo tanto, uno o varios tipos de células o agregados de células incluyendo, por ejemplo, todos los tipos celulares mencionados en el presente documento, se pueden emplear como materiales de partida para crear la pasta de células. Por ejemplo, se emplean opcionalmente células, tales como miocitos no humanos, células endoteliales, células adiposas y fibroblastos. Como se ha descrito en este documento, un cuerpo multicelular es homocelular o heterocelular. Para preparar cuerpos multicelulares homocelulares, la pasta de células es adecuadamente homocelular, es decir, incluye una pluralidad de células vivas de un solo tipo de células. Para preparar cuerpos multicelulares heterocelulares, por otro lado, la pasta de células incluirá convenientemente una serie significativa de células de más de un tipo de célula (es decir, la pasta de células será heterocelular). Como se ha descrito en este documento, cuando se utiliza una pasta de células heterocelulares para crear los cuerpos multicelulares, las células vivas se pueden "ordenar" durante el proceso de maduración y cohesión basándose en diferencias en las fuerzas adhesivas de las células, y pueden recuperar su conformación fisiológica.

En algunas realizaciones, además de la pluralidad de células vivas, uno o varios componentes de la ECM o uno o varios derivados de uno o varios componentes de la ECM (por ejemplo, gelatina, fibrinógeno, colágeno, fibronectina, laminina, elastina y/o proteoglicanos) se pueden incluir de forma adecuada en la pasta de células para incorporar estas sustancias en los cuerpos multicelulares, como se ha señalado en el presente documento. En realizaciones adicionales, la adición de componentes de la ECM o derivados de componentes de la ECM a la pasta de células puede favorecer la cohesión de las células en el cuerpo multicelular. Por ejemplo, la gelatina y/o el fibrinógeno se añaden opcionalmente a la pasta de células. Más particularmente, una solución de 10-30% de gelatina y una solución de 10-80 mg/ml de fibrinógeno se mezclan opcionalmente con una pluralidad de células vivas para formar una suspensión de células que contiene gelatina y fibrinógeno.

Están disponibles diversos métodos para facilitar el proceso de maduración adicional. En una realización, la pasta de células se puede incubar a aproximadamente 37°C durante un período de tiempo (que puede depender del tipo celular) para fomentar la adhesión y/o la cohesión. Alternativamente o además, la pasta de células se puede conservar en presencia del medio de cultivo celular que contiene factores y/o iones para fomentar la adhesión y/o la cohesión.

Disposición de los cuerpos multicelulares sobre un sustrato de soporte para formar capas

Una serie de métodos son adecuados para disponer los cuerpos multicelulares sobre un sustrato de soporte para producir una estructura tridimensional deseada (por ejemplo, una capa sustancialmente plana). Por ejemplo, en algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares se colocan manualmente en contacto entre sí, se depositan en su lugar mediante extrusión a partir de una pipeta, una boquilla o una aguja o se posicionan en contacto con una máquina automatizada, tal como una bioimpresora.

Tal y como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, el sustrato de soporte es permeable a los fluidos, gases y nutrientes y permite que los medios de cultivo celular se pongan en contacto con todas las superficies de los cuerpos multicelulares y/o las capas durante la disposición y la posterior fusión. Tal y como se describe adicionalmente en este documento, en algunas realizaciones, un sustrato de soporte está hecho a base de biomateriales naturales tales como colágeno, fibronectina, laminina y otras matrices extracelulares. En algunas realizaciones, un sustrato de soporte está hecho a base de biomateriales sintéticos, tales como hidroxiapatita, alginato, agarosa, poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) y sus copolímeros. En algunas realizaciones, un sustrato de soporte es sólido. En algunas realizaciones, un sustrato de soporte es semisólido. En otras realizaciones, un sustrato de soporte es una combinación de elementos de soporte sólidos y semisólidos. En realizaciones adicionales, un sustrato de soporte es plano para facilitar la producción de capas planas. En algunas realizaciones, el sustrato de soporte se alza o se eleva por encima de una superficie no permeable, tal como una porción de un entorno de cultivo celular (por ejemplo, una placa de Petri, un frasco de cultivo celular, etc.) o un biorreactor. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un sustrato de soporte permeable, elevado contribuye a la prevención de una muerte celular prematura, contribuye a la mejora del crecimiento celular y facilita la fusión de los cuerpos multicelulares para formar capas.

Tal y como se describe en este documento, en diversas realizaciones, los cuerpos multicelulares tienen muchas formas y tamaños. En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares son alargados y en forma de cilindro. Véanse, por ejemplo, las Figs. 1 y 3. En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares proporcionados en este documento tienen longitudes y/o diámetros similares. En otras realizaciones, los cuerpos multicelulares proporcionados en este documento tienen diferentes longitudes y/o diámetros. En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares son sustancialmente esféricos. Véanse, por ejemplo, las Figs. 2 y 4. En algunas realizaciones, las capas incluyen cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que tienen un tamaño sustancialmente similar. En otras realizaciones, las capas incluyen cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que tienen diferentes tamaños.

Haciendo referencia a la Fig. 6, en algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares 1 están dispuestos sobre un sustrato de soporte 3 horizontalmente adyacentes a, y en contacto con, uno o varios otros cuerpos multicelulares para formar una capa sustancialmente plana.

Haciendo referencia a la Fig. 7, en algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos 2 están dispuestos sobre un sustrato de soporte 3 horizontalmente adyacentes a, y en contacto con, uno o varios otros cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos. En realizaciones adicionales, este procedimiento se repite para construir un patrón de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos, tal como una rejilla, para formar una capa sustancialmente plana.

Haciendo referencia a la Fig. 8, en una realización particular, un cuerpo multicelular 6 se superpone sobre un sustrato de soporte 3 a través de un instrumento tal como una pipeta capilar 5, de modo que es adyacente de forma horizontal, y está en contacto con uno o varios otros cuerpos multicelulares. En realizaciones adicionales, un cuerpo multicelular se coloca sobre un sustrato de soporte de manera que es paralelo a una pluralidad de otros cuerpos multicelulares.

Haciendo referencia a la Fig. 9, en algunas realizaciones, una serie posterior de cuerpos multicelulares 8 están dispuestos verticalmente de forma adyacente a, y en contacto con, una serie previa de cuerpos multicelulares 9 sobre un sustrato de soporte 3 para formar una capa más gruesa.

En otras realizaciones, las capas de diferentes formas y tamaños están formadas mediante la disposición de cuerpos multicelulares de varias formas y tamaños. En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares de varias formas, tamaños, densidades, composiciones celulares y/o composiciones de aditivos, se combinan en una capa y contribuyen, por ejemplo, a la apariencia, el sabor y la textura de la capa resultante.

Haciendo referencia a la Fig. 10, en algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares alargados 9 están dispuestos de forma adyacente y en contacto con cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos 10 sobre un sustrato de soporte 3 para formar una capa compleja.

Una vez que se completa el ensamblaje de una capa, en algunas realizaciones, un medio de cultivo tisular se vierte sobre la parte superior de la estructura artificial. En realizaciones adicionales, el medio de cultivo tisular entra en los espacios entre los cuerpos multicelulares para sustentar las células en los cuerpos multicelulares. Los cuerpos multicelulares en la estructura artificial tridimensional se pueden fusionar entre sí para producir una capa sustancialmente plana para uso en la formación de carne comestible producida artificialmente. Por "fusionar", "fusionado" o "fusión", se entiende que las células de los cuerpos multicelulares contiguos se adhieren y/o se cohesionan entre sí, ya sea directamente a través de interacciones entre las proteínas de la superficie celular o indirectamente a través de interacciones de las células con componentes de la matriz extracelular (ECM) o derivados de componentes de la ECM. En algunas realizaciones, las células dentro de los cuerpos multicelulares producen su propia ECM específica de las células (por ejemplo, colágeno), que proporciona la integridad mecánica de los cuerpos multicelulares y del producto cárnico comestible. En algunas realizaciones, una capa fusionada está completamente fusionada y los cuerpos multicelulares se han vuelto sustancialmente contiguos. En algunas realizaciones, una capa fusionada está sustancialmente fusionada o parcialmente fusionada y las células de los cuerpos multicelulares se han adherido y/o cohesionado en la medida necesaria para permitir el movimiento y la manipulación de la capa intacta.

En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares se fusionan para formar una capa en un entorno de cultivo celular (por ejemplo, una placa de Petri, un matraz de cultivo celular, un biorreactor, etc.). En realizaciones adicionales, los cuerpos multicelulares se fusionan para formar una capa en un entorno con condiciones adecuadas para facilitar el crecimiento de los tipos celulares incluidos en los cuerpos multicelulares. En diversas realizaciones, la fusión tiene lugar durante aproximadamente más de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 minutos, e incrementos en los mismos. En otras diversas realizaciones, la fusión tiene lugar durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, y 48 horas, e incrementos en las mismas. En aún otras diversas realizaciones, la fusión tiene lugar durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, y 14 días, e incrementos en los mismos. En realizaciones adicionales, la fusión se lleva a cabo durante desde aproximadamente 2 horas a aproximadamente 36 horas. Diversos factores influyen en el tiempo de fusión requerido, incluyendo, a modo de ejemplos no limitantes, los tipos de células, las relaciones de tipo de células, las condiciones de cultivo y la presencia de aditivos, tales como factores de crecimiento.

Una vez que la fusión de una capa se ha completado, en algunas realizaciones, la capa y el sustrato de soporte se separan. En otras realizaciones, la capa y el sustrato de soporte se separan cuando la fusión de una capa es sustancialmente completa o parcialmente completa, pero las células de la capa se adhieren y/o se cohesionan entre sí en la medida necesaria para permitir mover, manipular y apilar la capa sin romperla. En realizaciones adicionales, la capa y el sustrato de soporte se separan a través de procedimientos convencionales para la fusión, disolución o degradación del sustrato de soporte. En todavía otras realizaciones, el sustrato de soporte se disuelve, por ejemplo, por un cambio de temperatura, luz u otros estímulos que no afectan negativamente a la capa. En una realización particular, el sustrato de soporte se prepara a base de un material flexible y que se despega de la capa.

En algunas realizaciones, la capa separada se transfiere a un biorreactor para una maduración adicional. En algunas realizaciones, la capa separada madura y se fusiona adicionalmente después de la incorporación en un producto cárnico producido artificialmente.

En otras realizaciones, la capa y el sustrato de soporte no están separados. En realizaciones adicionales, el sustrato de soporte se degrada o se biodegrada antes del envasado, congelación, venta o consumo del producto cárnico producido artificialmente ensamblado.

Disposición de las capas sobre un sustrato de soporte para elaborar carne producida artificialmente

Una serie de métodos son adecuados para disponer las capas sobre un sustrato de soporte para producir carne producida artificialmente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las capas se colocan manualmente en contacto una con otra, o se depositan en su lugar por medio de una máquina automática, asistida por ordenador tal como una bioimpresora, de acuerdo con una secuencia de comandos informáticos. En realizaciones adicionales, las capas sustancialmente planas se apilan para elaborar carne producida artificialmente.

En diversas realizaciones, se apilan aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 capas o incrementos en las mismas. En realizaciones adicionales, el apilamiento se repite para desarrollar un espesor que se aproxima a un producto cárnico tradicional tal como un carpacho, una tira de tocino, una hamburguesa, un filete de pescado, una pechuga de pollo o un bistec. En diversas realizaciones, las capas apiladas comprenden un producto cárnico producido artificialmente con un espesor de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mm o incrementos en los mismos.

En algunas realizaciones, una capa tiene una orientación definida por la colocación, el patrón o la orientación de los cuerpos multicelulares. En otras realizaciones, cada capa se apila con una orientación particular en relación con el sustrato de soporte y/o una o varias otras capas. En diversas realizaciones, una o varias capas se apilan con una orientación que incluye una rotación en relación con el sustrato de soporte y/o la capa de abajo, en donde la rotación es de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 y 180 grados o incrementos en los mismos. En otras realizaciones, todas las capas están orientadas sustancialmente de manera similar.

Haciendo referencia a la Fig. 11, en una realización particular, las capas tienen una orientación definida por la colocación en paralelo de cuerpos multicelulares utilizados para formar la capa. En una realización particular adicional, las capas se apilan con una orientación que incluye 90 grados de rotación con respecto a la capa de abajo para formar carne producida artificialmente.

Una vez que el apilamiento de las capas se completa, en algunas realizaciones, a las capas en la estructura artificial tridimensional se les permite fusionarse entre sí para producir carne producida artificialmente. En algunas realizaciones, las capas se fusionan para formar carne producida artificialmente en un entorno de cultivo celular (por ejemplo, una placa de Petri, un matraz de cultivo celular, un biorreactor, etc.). En diversas realizaciones, la fusión tiene lugar durante más de aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 minutos, e incrementos en los mismos. En otras diversas realizaciones, la fusión tiene lugar durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 y 48 horas, e incrementos en las mismas. En realizaciones adicionales, la fusión se lleva a cabo durante desde aproximadamente 2 horas a aproximadamente 36 horas.

En algunas realizaciones, una vez apiladas, las células de los cuerpos multicelulares y las capas comienzan a morir

- debido a la incapacidad para difundir de los gases, líquidos y nutrientes, o para llegar de otro modo a las porciones interiores de la estructura artificial. En realizaciones adicionales, la muerte gradual de las células es similar a la muerte celular natural que se produce en los tejidos de un organismo después de la muerte. En algunas realizaciones, las capas de la estructura artificial de carne producida artificialmente se fusionan entre sí simultáneamente con una muerte progresiva de las células. En algunas realizaciones, los cuerpos multicelulares de las capas continúan fusionándose entre sí simultáneamente con la muerte progresiva de las células. En realizaciones adicionales, la fusión dentro y entre las capas es completa o sustancialmente completa antes de la muerte de una mayoría de las células de la estructura artificial. En realizaciones adicionales, la fusión dentro y entre las capas se completa o se completa sustancialmente antes de la muerte de todas las células de la estructura artificial.
- Una vez que se completa el ensamblaje de la carne producida artificialmente, en algunas realizaciones, la carne y el sustrato de soporte se separan. En realizaciones adicionales, la carne y el sustrato de soporte se separan a través de procedimientos convencionales para la fusión, disolución o degradación del sustrato de soporte. En todavía otras realizaciones, el sustrato de soporte se disuelve, por ejemplo, por un cambio de temperatura, luz u otros estímulos que no afectan adversamente a la carne. En una realización particular, el sustrato de soporte está hecho a base de un material flexible y que se despega de la carne. En algunas realizaciones, la carne separada se transfiere a un biorreactor para su posterior maduración. En otras realizaciones, la carne y el sustrato de soporte no están separados. En realizaciones adicionales, el sustrato de soporte se degrada o se biodegrada antes de la venta o el consumo.
- En algunas realizaciones, la carne se radia. En algunas realizaciones, la carne se congela para evitar una descomposición o degradación antes de la distribución, la venta y el consumo. En realizaciones adicionales, la carne congelada se envasa al vacío.

Carne producida artificialmente

- En el presente documento, en algunas realizaciones, se describen productos cárnicos producidos artificialmente, obtenidos de acuerdo con los métodos de la invención.
- En algunas realizaciones, los productos cárnicos producidos artificialmente son frescos. En otras realizaciones, los productos cárnicos producidos artificialmente están conservados. En realizaciones adicionales, la carne se conserva, por ejemplo, mediante cocción, secado, ahumado, enlatado, encurtido, curado con sal o congelación.
- En algunas realizaciones, los productos cárnicos producidos artificialmente están sustancialmente exentos de microorganismos patógenos. En realizaciones adicionales, métodos controlados y sustancialmente estériles para la preparación de células, cultivo celular, preparación de cuerpos multicelulares, preparación de capas y preparación de carne producida artificialmente dan lugar a un producto sustancialmente exento de microorganismos patógenos. En realizaciones adicionales, una ventaja adicional de un producto de este tipo es una utilidad y seguridad incrementadas.
- En algunas realizaciones, los productos de carne producida artificialmente están conformados. En realizaciones adicionales, la carne se conforma, por ejemplo, mediante el control de la cantidad, el tamaño y la disposición de los cuerpos multicelulares y/o las capas utilizadas para la construcción de la carne. En otras realizaciones, la carne se conforma, por ejemplo, mediante corte, prensado, moldeo o estampación. En algunas realizaciones, la forma de un producto cárnico se selecciona para que se parezca a un producto cárnico tradicional, tal como una tira de tocino, una ristra de salchichas, un filete ruso, una hamburguesa, un perrito caliente, un filete de pescado, una pechuga de pollo, una tira de pollo, trozos de pollo empanado, un pastel de carne o un bistec. En otras realizaciones, los productos de carne producida artificialmente están picados.

Ejemplos

- Los siguientes ejemplos ilustrativos son representativos de realizaciones descritas en el presente documento y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.
- Ejemplo 1 - Preparación del sustrato de soporte**
- Para preparar una solución de agarosa al 2%, se disolvieron 2 g de agarosa ultrapura de bajo punto de fusión (LMP) en 100 ml de agua ultrapura/solución tampón (1:1, v/v). La solución tampón es opcionalmente PBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1x) o HBSS (solución salina equilibrada de Hanks 1x). La solución de agarosa se colocó en un vaso de precipitados que contenía agua caliente (más de 80°C) y se mantuvo sobre la placa caliente hasta que la agarosa se disolvió completamente. La solución de agarosa permanecía líquida, siempre y cuando la temperatura estuviera por encima de 36°C. Por debajo de 36°C, se produce una transición de fase, la viscosidad aumenta y, finalmente, la agarosa forma un gel.
- Para preparar el sustrato de soporte de agarosa, se depositaron 10 ml de agarosa líquida al 2% (temperatura >40°C) en una placa de Petri con un diámetro de 10 cm y se extendieron horizontalmente para formar una capa uniforme. Se permitió que la agarosa formara un gel a 4°C en un refrigerador.

Ejemplo 2 - Cultivo de células musculares lisas aórticas porcinas

Células de músculo liso aórticas porcinos (PASCs) recién aisladas se cultivaron en DMEM bajo en glucosa con 10% de suero bovino fetal (Hyclone Laboratories, UT), 10% de suero porcino (Invitrogen), ácido L-ascórbico, sulfato de cobre, HEPES, L-prolina, L-alanina, L-glicina y penicilina G (todos los complementos mencionados anteriormente se adquirieron en Sigma, St. Louis, MO). Las líneas celulares se cultivaron en placas recubiertas con 0,5% de gelatina (gelatina de piel porcina; Sigma) (Techno Plastic Products, St. Louis, MO) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. Las PASCs se subcultivaron hasta el pase 7, antes de ser utilizadas para formar los cuerpos multicelulares.

Ejemplo 3 - Preparación de esferoides y cilindros multicelulares

Los cultivos celulares se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen) y se trataron durante 10 min con 0,1% de tripsina (Invitrogen) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Las células se resuspendieron en 4 ml de medio específico del tipo de célula y se incubaron en frascos de cultivo de tejido de 10 ml (Bellco Glass, Vineland, NJ) a 37°C con 5% de CO₂ en un agitador giratorio (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) durante una hora, para recuperar la adhesión y se centrifugaron a 3500 rpm. Los sedimentos resultantes se transfirieron a micropipetas capilares de 300 µm (Sutter Instrument, CA) o 500 µm (Drummond Scientific Company, Broomall, PA) de diámetro y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 15 min. Para los cuerpos multicelulares esféricos, se cortaron cilindros extruidos en fragmentos iguales que se redondearon durante una noche en un agitador giratorio. Dependiendo del diámetro de las micropipetas, este procedimiento proporcionaba esferoides regulares con un tamaño y cantidad de células definidos. Para los cuerpos multicelulares cilíndricos, los cilindros se extruyeron mecánicamente en moldes de Teflon® no adhesivo o de agarosa, preparados específicamente utilizando una bioimpresora. Después de madurar durante una noche en el molde, los cilindros celulares eran lo suficientemente cohesivos como para ser depositados.

Los cuerpos multicelulares se envasaron en cartuchos (micropipetas de 300-500 µm de diámetro interior). Los cartuchos se insertaron en una bioimpresora y se distribuyeron sobre un sustrato de soporte de acuerdo con una secuencia de comandos informáticos, que codificaba la forma de la estructura que se deseaba imprimir.

Ejemplo 4 - Preparación de carne producida artificialmente

Los cuerpos multicelulares cilíndricos se preparan como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los cuerpos multicelulares son heterocelulares y están compuestos por las PASCs del Ejemplo 2 y células endoteliales de arteria coronaria porcina (PCAEC, Genlantis, San Diego, CA, Producto n° PP30005). La relación entre los miocitos y las células endoteliales en los cuerpos multicelulares es de aproximadamente 6:1. Los cuerpos multicelulares tienen un diámetro de sección transversal de 300 µm y una longitud de 2 cm, 3 cm, 4 cm o 5 cm. Los cuerpos multicelulares y madurados se envasan en cartuchos (micropipetas de 300 µm de diámetro interior), que a continuación se insertan en una bioimpresora.

Un sustrato de soporte de agarosa se prepara como se ha descrito en el Ejemplo 1. El sustrato de soporte se eleva por encima de la parte inferior de una placa de Petri grande mediante un pedestal de malla fina, de tal manera que el medio de cultivo de las células puede ponerse en contacto con todas las superficies de los cuerpos multicelulares y las capas depositadas sobre el sustrato.

Una bioimpresora distribuye los cuerpos multicelulares sobre el sustrato de soporte de acuerdo con las instrucciones de una secuencia de comandos informáticos. La secuencia de comandos codifica la colocación de los cuerpos multicelulares cilíndricos para formar una monocapa sustancialmente cuadrada con una anchura promedio de aproximadamente 10 cm y una longitud promedio de aproximadamente 10 cm. Los cuerpos multicelulares se colocan paralelos entre sí con cuerpos de diferentes longitudes, colocados extremo con extremo para formar la forma codificada.

El medio de cultivo se vierte sobre la parte superior de la capa y se permite que la estructura artificial se fusione parcialmente durante el transcurso de aproximadamente 12 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Durante este tiempo, las células de los cuerpos multicelulares se adhieren y/o se cohesionan en la medida necesaria para permitir el movimiento y la manipulación de la capa sin romperla.

Las capas parcialmente fusionadas se separan del soporte y se apilan. Se apilan sesenta y cinco capas para formar la carne producida artificialmente, que tiene una anchura y altura total de aproximadamente 2 cm y una longitud y anchura de aproximadamente 10 cm. Cada capa se gira 90 grados con respecto a la capa de abajo. Una vez apiladas, las células comienzan a morir debido a la falta de oxígeno, ya que el medio de cultivo no se cambia. La muerte celular se inicia en el interior del apilamiento, ya que estas células son las primeras privadas de oxígeno, y alcanza progresivamente las células externas, ya que en el medio de cultivo circundante se agota gradualmente el oxígeno. Simultáneamente a la muerte celular, se siguen fusionando las capas parcialmente fusionadas, aunque empiezan a fusionarse también en dirección vertical. Dado que el proceso de fusión dura alrededor de 6 horas, aunque la muerte celular dura alrededor de 20 horas, la estructura artificial después de la muerte celular está totalmente fusionada y asume una forma similar a una hamburguesa de cerdo cuadrada.

REIVINDICACIONES

1. Un método para elaborar carne producida artificialmente, comprendiendo el método:
- preparar una pluralidad de cuerpos multicelulares que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos cohesionados entre sí;
- 5 superponer más de un cuerpo multicelular de forma adyacente sobre un sustrato de soporte plano;
- fusionar dichos cuerpos multicelulares al menos parcialmente entre sí para formar una primera capa;
- apilar más de 50 capas adicionales sobre la primera capa;
- fusionar las capas apiladas para formar un volumen de carne producida artificialmente; y
- 10 cultivar las capas apiladas para fusionar las capas mientras que las capas en una región interior del volumen mueren de manera que la mayoría de las células en el volumen están muertas después de completar la fusión entre las capas, al menos parcialmente, y
- en donde la carne producida artificialmente es comestible.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además congelar dicho volumen de carne producida artificialmente.
- 15 3. El método según la reivindicación 1, en el que la preparación de la pluralidad de cuerpos multicelulares comprende la preparación de una pluralidad de cuerpos multicelulares alargados que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos cohesionados entre sí y la preparación de una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos cohesionados entre sí; y además en donde la superposición de más de un cuerpo multicelular comprende superponer más de un cuerpo multicelular alargado y
- 20 más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte plano.
4. El método según la reivindicación 3, en el que dichos cuerpos multicelulares alargados tienen una longitud que varía desde 1 mm a 10 cm.
5. El método según la reivindicación 1, en el que la preparación de la pluralidad de cuerpos multicelulares comprende la preparación de una pluralidad de cuerpos multicelulares sustancialmente esféricos que comprenden una pluralidad de miocitos no humanos cohesionados entre sí; y además en donde la superposición de más de un cuerpo multicelular comprende superponer más de un cuerpo multicelular sustancialmente esférico de forma adyacente sobre un sustrato de soporte plano.
- 25 6. El método según la reivindicación 1, en el que el sustrato de soporte plano es permeable a líquidos y nutrientes y permite que el medio de cultivo celular se ponga en contacto con todas las superficies de los cuerpos multicelulares.
- 30 7. El método según la reivindicación 1, en el que dichos cuerpos multicelulares tienen un diámetro de 50 μm a 1000 μm para permitir una difusión con el fin de apoyar de manera suficiente el mantenimiento y el crecimiento de dichos miocitos no humanos y células endoteliales no humanas en cultivo.
8. El método según la reivindicación 1, en el que dichos cuerpos multicelulares tienen un diámetro de 100 μm a 500 μm .