

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 380**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)
A61K 35/35 (2015.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
C12N 5/077 (2010.01)
A23L 13/00 (2006.01)
A61K 35/545 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2014 PCT/US2014/063250**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15066377**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2014 E 14858383 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3071040**

54 Título: **Método de especificación y cultivo de linaje del músculo esquelético escalable**

30 Prioridad:

30.10.2013 US 201361962068 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.09.2020

73 Titular/es:

**THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI (50.0%)
316 University Hall
Columbia, MO 65211, US y
MEMPHIS MEATS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GENOVESE, NICHOLAS, J.;
ROBERTS, R., MICHAEL y
TELUGU, BHANU, PRAKASH, V., L.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 782 380 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

Método de especificación y cultivo de linaje del músculo esquelético escalable

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 61/962,068, presentada el 30 de octubre de 2013, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Incorporación de la lista de secuencias

El contenido de la lista de secuencias presentada electrónicamente en el archivo de texto ASCII (Nombre 52553_136621_ST25.txt; Tamaño: 2 962 bytes; y Fecha de creación: 30 de octubre de 2014) presentada con la solicitud se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

10 Declaración sobre la investigación y el desarrollo con patrocinio federal

Esta invención se hizo con el apoyo del Gobierno en virtud de la Subvención No. R01 HD069979/00032722 otorgada por los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Antecedentes

15 La presente descripción se refiere a métodos para mejorar la producción de carne cultivada, tal como la producción de carne independiente del ganado. Las promesas conceptuales de "carne cultivada" (p. ej., producción de carne independiente de animales por métodos de cultivo celular in vitro, ingeniería de tejidos y tecnología de alimentos) incluyen una mayor eficiencia de producción, menos impactos ambientales, mayor utilidad en aplicaciones culinarias, mayor valor nutricional, producción exenta de crueldad y mayor seguridad alimentaria en relación con las carnes producidas de modo convencional. Sin embargo, hasta la fecha, las tecnologías no han avanzado lo suficiente para soportar una producción escalable y económicamente sostenible. El cultivo actual a escala de laboratorio de tejidos prototipo ha utilizado componentes animales primarios, tales como tejidos animales y suero, negando así en gran medida las ventajas de la producción de carne independiente de animales. Por lo tanto, los métodos actuales no resuelven la dependencia animal de la producción de carne cultivada lo suficiente como para cumplir las promesas conceptuales de "carne cultivada" y proporcionar un producto comercialmente ventajoso. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar métodos nuevos y mejorados para el cultivo de carne escalable a partir de una fuente autorrenovable *in vitro* para nutrición alimentaria y otras aplicaciones.

Compendio

30 Las realizaciones de ejemplo proporcionan una plataforma escalable para el cultivo del músculo esquelético que utiliza líneas celulares con el potencial de diferenciarse como músculo esquelético. En ciertos aspectos, las líneas celulares provienen de ganado tal como ganado doméstico, cerdos, ovejas, cabras, camellos, búfalos de agua, conejos y similares. En ciertos aspectos, las líneas celulares provienen de aves de corral tales como pollos domésticos, pavos, patos, gansos, palomas y similares. En ciertos aspectos, las líneas celulares provienen de especies cinegéticas comunes tales como ciervos salvajes, aves gallináceas, aves acuáticas, liebres y similares. En ciertos aspectos, las líneas celulares son de especies acuáticas o semiacuáticas recogidas comercialmente de operaciones de pesca de captura o acuicultura o por deporte, que incluyen ciertos peces, crustáceos, moluscos, cefalópodos, cetáceos, cocodrilos, tortugas, ranas y similares. En ciertos aspectos, las líneas celulares son de especies animales exóticas, conservadas o extintas. En ciertos aspectos, las líneas celulares son de cualquier especie de metazoos demostrando la capacidad de especificación del tejido del músculo esquelético. En ciertos aspectos, las líneas celulares son para investigación o para fines terapéuticos, tales como humanas, de primates, roedores, incluidas ratas y ratones, y animales de compañía tales como perros, gatos, caballos y similares. En ciertos aspectos específicos, las líneas celulares de cualquier organismo son líneas de células madre autorrenovables. De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método in vitro para producir un producto de carne cultivada para consumo alimentario, comprendiendo el método: modificar una línea celular autorrenovable de ganado, aves de corral, caza o especies de animales acuáticos, con un factor de transcripción miogénico inducible para producir una línea celular modificada por factor de transcripción miogénico, en donde dicha línea celular autorrenovable es una línea de células madre embrionarias pluripotentes o una línea de células madre pluripotentes inducidas; mantener dicha línea celular modificada en un proceso de autorrenovación seguido de inducción de diferenciación miogénica de dicha línea celular modificada, por regulación exógena del factor de transcripción miogénico inducible, en donde la inducción de la diferenciación miogénica comprende además poner en contacto dicha línea celular modificada con un inhibidor de la metilación del ADN, y en donde la línea celular modificada diferenciada forma miocitos y miotubos multinucleados, que comprenden ambos mionúcleos; y el cultivo de los miocitos y miotubos multinucleados para generar fibras musculares esqueléticas, produciendo así un producto de carne cultivada para el consumo alimentario.

55 En ciertos aspectos, la línea celular autorrenovable puede ser una línea de células madre embrionarias pluripotentes. En ciertos aspectos, la línea celular se obtiene de especies destinadas al consumo alimentario. Ejemplos ilustrativos y no limitantes de factores de transcripción miogénicos incluyen, solos o en combinación III, MYODI, MYOG, MYF5, MYF6, PAX3, PAX7, parálogos, ortólogos, variantes genéticas de los mismos, o agonistas de activación transcripcional

de las respectivas secuencias de ADN de reconocimiento del promotor de los factores de transcripción miogénicos como se describe con más detalle en el presente documento.

5 En ciertos aspectos específicos, se puede usar la línea celular pluripotente inducida porcina O2K como la línea celular autorrenovable. En un aspecto específico, el método puede comprender modificar una línea de células madre O2K con un factor de transcripción inducible MyoD para producir una línea celular O2KM modificada por factor de transcripción miogénico, e inducir dicha línea celular O2KM mediante regulación exógena para dirigir procesos de autorrenovación o diferenciación. La etapa de modificación mencionada anteriormente puede comprender además modificar la línea celular con un vector cromosómicamente integrado que exprese constitutivamente una fusión inducible del factor de transcripción MYOD1 y un dominio de unión al ligando ESRI de una región promotora constitutivamente activa. Por ejemplo, la actividad inducible del transcrito de fusión traducido (p. ej., MyoDER), puede activarse condicionalmente en presencia del agonista de ESRI (p. ej., 17-β Estradiol (E2)).

10 En ciertos aspectos, la etapa de inducción puede comprender además la subetapa de autorrenovación y la subetapa de diferenciación reguladas por un mecanismo de doble interruptor. En la subetapa de autorrenovación, se conserva el estado fundamental indiferenciado de la línea celular modificada, tal como en presencia de doxiciclina (DOX), por lo que la línea celular se mantiene en un estado de autorrenovación de células madre por la expresión inducida de los transgenes de pluripotencia *POU5F1* y *KLF4*. En la subetapa de diferenciación, la línea celular modificada se trata, tal como con E2 en ausencia de DOX, mientras que la línea celular es especificada eficientemente a miocitos esqueléticos, es decir, el linaje miogénico, por el factor de transcripción inducible MyoD, lo que da como resultado células alargadas características con morfología en forma de huso. Cuando se cultivan más en medio de cultivo bajo en mitógenos, los miocitos derivados pueden fusionarse en miotubos multinucleados, precursores de las fibras de músculo esquelético. Después del cultivo extendido en medio bajo en mitógenos, los miotubos multinucleados maduran en fibras de músculo esquelético capaces de diferenciación terminal, como lo demuestra el aumento de la expresión de MYOG, DES, MYHC; fusión; y desarrollo de miofibrillas sarcómeras con potencial contráctil. La subetapa de diferenciación puede comprender además añadir ciertos reactivos en el medio de cultivo para activar la ruta de señalización WNT canónica para prevenir la muerte celular y facilitar la diferenciación miogénica, y añadir moduladores epigenéticos al medio de cultivo para alterar la estructura de la cromatina para una expresión de genes miogénicos mejorada.

15 Ciertos aspectos de la descripción emplean células genéticamente mejoradas para una capacidad de renovación ilimitada y una conversión eficiente al músculo esquelético, el linaje de tejido predominante que constituye los productos cárnicos que no son despojos, en medio de cultivo sin suero. Cuando se combina con un planteamiento de ingeniería de tejidos escalable, dichos métodos pueden revolucionar la forma en que la carne se produce y comercializa para los consumidores al permitir el cultivo de tejido animal en cantidades ilimitadas para la producción de carne cultivada independiente de animales. Las aplicaciones adicionales contempladas incluyen uso de xeno-trasplante in vivo y modelos *in vitro* para cribado de fármacos, fisiología del desarrollo y biología del desarrollo.

20 Otras características y ventajas de la descripción, así como la estructura y el funcionamiento de diversas realizaciones de la descripción, se describen en detalle a continuación con referencia a cualquiera de los dibujos que acompañan.

Breve descripción de los dibujos/figuras

Figura 1. La Figura 1 muestra una secuencia de ADN de MyoDER.

Figura 2. La Figura 2 es una ilustración esquemática de un método que comprende un mecanismo de regulación de doble interruptor para la expansión de la línea celular indiferenciada, o la especificación en el linaje del músculo esquelético.

Figura 3. La Figura 3 es una ilustración esquemática que muestra un mecanismo de doble interruptor aplicado a la línea celular O2KM modificada miogénica regulada por DOX o E2.

Figura 4A. La Figura 4A es una ilustración esquemática del casete de expresión del transgén MyoDER seleccionable. Las flechas y los cuadros indican respectivamente las secuencias de promotor y gen.

Figura 4B. La Figura 4B muestra la imagen de la transferencia Western de detección de la expresión del transgén MyoDER en O2K seleccionada con blastidicina mediante un anticuerpo anti-MYOD1. O2K modificada por el casete de expresión del transgén se designa como O2KM. TUBA (alfa-tubulina) se detecta como un control de carga interno.

Figura 5. La Figura 5 es una imagen que muestra células O2KM que presentan una morfología de colonias compacta y estable en condiciones de autorrenovación como la línea celular O2K parental.

Figura 6. La Figura 6 es un panel de imágenes que muestran O2KM cultivadas en placas recubiertas con Poli-D-Lisina + Laminina + MATRIGEL +/- 5-Aza-citidina 0.25 μM (5AC) para el medio de autorrenovación exento de fenol (SRM) en 5% de O₂ durante tres días seguido de inducción con o sin 17-β Estradiol (E2) de la proteína de fusión MyoDER en 20% de O₂ durante dos días en medio de inducción miogénica exento de rojo fenol (MIM) complementado con CHIR99021 3 μM. C. Imágenes de contraste de fase de O2KM en el día 2 de inducción con E2.

- Figura 7. La Figura 7 muestra el análisis de transferencia Western de MYOD1 (MyoD), MYF5 (Myf5) y MYOG (miogenina) en lisados de células O2KM diferenciadas recogidos siguiendo los regímenes de inducción con E2 de 2 días indicados. Migración MyoDER: ~75 kD. Migración endógena esperada de MYOD1: 45-50 kD.
- 5 Figura 8. La Figura 8 muestra imágenes de detección inmunofluorescente del marcador de superficie celular de miocitos NCAM (Alexa568) y núcleos (DAPI) en cultivos de O2KM expuestos a 5AC antes y después de un periodo de tiempo de inducción con E2 10 μ M de 2 días.
- Figura 9. La Figura 9 muestra un panel de imágenes de contraste de fase de i. colonias de O2K indiferenciadas en estado fundamental cultivadas en Poli-D Lisina + Gelatina + Laminina en 5% de O₂ en SRM, ii. - vi. colonias adherentes que se diferencian del estado fundamental, como se muestra en el panel i. durante dos días en medio de diferenciación (DM) en 20% de O₂ complementado con CHIR99021 ii. 0 μ M, iii. 1 μ M, iv. 3 μ M, v. 6 μ M o vi. 9 μ M. Las colonias no adherentes prevalecieron como cuerpos embrioides en cultivos expuestos a CHIR99021 6 μ M (vii.) o 9 μ M (viii.).
- 10 Figura 10. La Figura 10 muestra un gráfico de barras que ilustra el cambio de población de células O2K adherentes durante la diferenciación. Los porcentajes representan la proporción de células adherentes contadas en cultivos después de dos días en presencia de CHIR99021 en las concentraciones indicadas (mostradas en la figura 9, paneles ii.-vi.) en relación con las células adherentes contadas antes de la diferenciación del estado fundamental (mostrado en la figura 9, panel i.). n = 3 para cada condición de cultivo contado.
- Figura 11. La figura 11 muestra un gráfico de barras del análisis de citometría de flujo de las células marcadas con anexina V. Las colonias de O2K indiferenciadas se cultivaron en 20% de O₂ en medio de diferenciación, con la presencia de CHIR99021 0, 1, 3 o 6 μ M durante un día antes del análisis.
- 20 Figura 12. La Figura 12 muestra el análisis de transferencia Western de los niveles relativos de CTNNB1 (β -catenina) y la fosforilación (p-CTNNB1) en los sustratos por GSK3 β en la serina 33, 37 y treonina 41 en cultivos diferenciados del estado fundamental (como se muestra en la Figura 9) en presencia de CHIR99021 en las concentraciones indicadas. Los cultivos se expusieron a caliculina A 50 nM y MG-132 30 μ M durante 3 horas antes de la recolección para estabilizar los niveles detectables de p-CTNNB1 para el análisis comparativo.
- 25 Figura 13A. La Figura 13A muestra un gráfico que ilustra las relaciones densitométricas de las bandas de p-CTNNB1/CTNNB1 como se muestra en la Figura 12.
- Figura 13B. La Figura 13B muestra un gráfico que ilustra las relaciones densitométricas de las bandas de CTNNB1/TUBA como se muestra en la Figura 12.
- 30 Figura 14. La figura 14 muestra una imagen que ilustra el análisis de transferencia Western de la evolución temporal del marcador de diferenciación. Los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia, POU5F1 y KLF4, y el marcador de mesodermo paraxial premiógénico PAX3 en cultivos de O2K se diferenciaron del estado fundamental en presencia de CHIR99021.
- Figura 15. La Figura 15 muestra imágenes de diferenciación terminal de miocitos O2KM diferenciados en ausencia (panel izquierdo) o presencia (panel derecho) de 5-aza-citidina (5AC). Obsérvese los derivados de miocitos con morfología aplanada en el panel izquierdo (-5AC) en contraste con los miotubos multinucleados alargados en el panel izquierdo (+ 5AC).
- 35 Figura 16. La Figura 16 muestra el marcador de anexina V de las células apoptóticas antes y después de la transición de 24 h de los cultivos, como en la Figura 9, paneles i-ii.
- Figura 17A. La Figura 17A muestra la detección por transferencia Western de CPP32 de longitud completa (~32 kD procaspasa 3a) y el fragmento escindido grande (~17kD caspasa 3a escindida) en colonias en estado fundamental antes (0 h) y después de transición (12-48 h) en medio de diferenciación (12-48 h).
- 40 Figura 17B. La Figura 17B muestra la detección por transferencia Western de CPP32 de longitud completa y el fragmento escindido en colonias después de 42 h de transición al medio de diferenciación en presencia de los niveles de CHIR99021 indicados.
- 45 Figura 18. La Figura 18 muestra la morfología de excrecencias de cuerpos embrioides formados en un medio de diferenciación que contiene CHIR99021 6 μ M durante dos días y después de la transferencia a un sustrato recubierto con Poli-D Lisina + Laminina + MATRIGEL para uno (d3, *panel izquierdo*) o tres (d5, *panel derecho*) días adicionales.
- Figura 19A. La Figura 19A muestra la transferencia Western de lisados de piPSC no modificadas cultivadas en ausencia de 3i, DOX, hLIF y E2 en un medio de diferenciación que contiene KOSR.
- 50 Figura 19B. La Figura 19B muestra la transferencia Western de lisados de piPSC modificadas con MyoDER cultivadas en presencia de DOX, LIF y 3i. Las piPSC modificadas con MYODER se cultivaron 3 días en un medio de autorrenovación o expansión.
- Figura 20A. La Figura 20A es un esquema de los regímenes de expansión e inducción de O2KM, seguido del régimen

de diferenciación terminal.

Figura 20B. La Figura 20B muestra la morfología y conformación de miotubos. Después de la inducción (d2), las piPSC se desarrollaron como miotubos alargados, anisotrópicos y refractivos cuando se expusieron a 5AC durante los regímenes de expansión e inducción.

5 Figura 20C. La Figura 20C muestra la expresión uniforme de la cadena pesada de miosina por d6.

Figura 20D. La figura 20D muestra la multinucleación de miotubos. *Panel izquierdo*: Imagen ampliada de cultivos de diferenciación terminal d4. Las flechas entre corchetes indican múltiples núcleos dentro de un solo miotubo. *Panel derecho*: distribución de mionúcleos por ploidía de miotubos mediante marcado con yoduro de propidio y análisis de citometría de flujo. n = 3 con desviación estándar mostrada.

10 Figura 20E. Las transferencias Western de la Figura 20E muestran una expresión creciente de desmina (DES) y miogenina (MYOG) durante el transcurso de 8d.

Figura 20F. La Figura 20F muestra la retirada del ciclo celular concomitante con diferenciación terminal.

Figura 20G. La figura 20G muestra la microscopía electrónica de transmisión de miotubos el d6. Las unidades estructurales sarcómeras se alinearon en una sola (*paneles izquierdos*) y filas paralelas escalonadas (*panel derecho*).

15 Figura 21A. La Figura 21A muestra ciclos transitorios asincrónicos de una sola célula (*paneles de izquierda, medio y derecha*) que se observaron en la contratación espontánea de subpoblaciones de miotubos el d6.

Figura 21B. La Figura 21B muestra la activación y sincronización del FOV de los ciclos transitorios de calcio mediante estimulación de campo de 1,0 Hz en miotubos el d6.

Figura 21C. La Figura 21C muestra la activación transitoria por calcio del FOV de los miotubos el d6 por cafeína 10 mM.

20 Figura 21D. Figuras 21D: análisis de célula individual de activación transitoria por calcio en un miotubo el d7 por acetilcolina 100 nM.

Descripción detallada

25 En la medida necesaria para proporcionar apoyo descriptivo, la materia objeto y/o el texto de las reivindicaciones adjuntas se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Todos los lectores de esta descripción escrita entenderán que las realizaciones ilustrativas descritas y reivindicadas en el presente documento se pueden poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier característica, elemento o paso citado que se describa o no específicamente en el presente documento.

30 A lo largo de esta descripción, el término "un" o "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un polinucleótido" representa uno o más polinucleótidos. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

35 Además, "y/o" donde se usa en el presente documento se debe considerar como descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A y/o B" en el presente documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Del mismo modo, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Se entiende que siempre que se describan aspectos en la presente memoria con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a quien se dirige esta descripción. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta descripción.

45 Las unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de ácido nucleico se escriben de 5' a 3' y las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi. Los títulos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos de la descripción, que se pueden tener por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto.

50 Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento.

Ningún lenguaje o terminología en esta memoria descriptiva debe interpretarse como que indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial o crítico.

5 La mención de intervalos de valores en el presente documento tiene el único propósito de servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor por separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Cuando se proporciona un intervalo específico de valores, se entiende que cada valor intermedio pretende ser incluido en el mismo, y también se incluyen todos los subintervalos más pequeños.

10 Se proporcionan en el presente documento métodos nuevos y mejorados para generar músculo esquelético funcional, para cultivar carne tal como tejido modificado genéticamente u otro producto comestible, a partir de una fuente de células *in vitro*. Dichos métodos están contemplados, por ejemplo, para la producción de carne independiente del ganado, en donde la carne es cualquier tejido de metazoo o producto comestible derivado de células destinado para usar como alimento comestible o componente nutricional por seres humanos, animales de compañía, animales domésticos o cautivos cuyos cuerpos están destinadas al uso como comestibles, animales de servicio, especies
15 animales conservadas, animales utilizados con fines experimentales o cultivos celulares.

También se proporcionan tejidos animales producidos *in vitro*, tales como tejido muscular, hechos por cualquiera de los diversos aspectos descritos en el presente documento. En ciertos aspectos, la fuente de células es una fuente de células madre, por ejemplo, una línea de células madre autorrenovables. Ciertos aspectos de los métodos emplean una línea celular autorrenovable, modificada por transgén inducible, miogénica, derivada de una especie prevista. En
20 ciertos aspectos, las especies previstas pueden ser cualquier especie comestible, incluidas las especies de ganado y aves de corral. En ciertos aspectos, las especies previstas son especies de ganado tales como ganado doméstico, cerdos, ovejas, cabras, camellos, búfalos de agua, conejos y similares. En ciertos aspectos, las especies previstas son especies de aves de corral tales como pollos domésticos, pavos, patos, gansos, palomas y similares. En ciertos aspectos, las especies previstas son especies cinegéticas comunes tales como ciervos salvajes, aves gallináceas,
25 aves acuáticas, liebres y similares. En ciertos aspectos, las especies previstas son especies acuáticas o especies semiacuáticas recogidas comercialmente de operaciones de pesca de captura o acuicultura o de deporte, que incluyen ciertos peces, crustáceos, moluscos, cefalópodos, cetáceos, cocodrilos, tortugas, ranas y similares. En ciertos aspectos, las especies previstas son especies animales exóticas, conservadas o extintas. En ciertos aspectos, las especies previstas son cualquier especie de metazoo que demuestre la capacidad de especificación de tejido del músculo esquelético. En ciertos aspectos, las especies previstas son para investigación o para fines terapéuticos,
30 tales como seres humanos, primates, roedores, incluidas ratas y ratones, y animales de compañía tales como perros, gatos, caballos y similares.

En ciertos aspectos, la línea celular está regulada por un mecanismo de doble interruptor para mantener la línea celular en proceso de autorrenovación o de diferenciación miogénica directa.

35 Una línea de células parentales/hospedantes de los aspectos descritos en el presente documento tiene las propiedades de ser inmortal (autorrenovable) y tener el potencial de diferenciarse, reprogramarse, especificarse o convertirse de otro modo en linaje del músculo esquelético, tal como siguiendo regímenes que comprenden uno o más componentes que dirigen la conversión miogénica. Se pueden emplear tres clases de células madre como fuentes celulares para el cultivo escalable: (1) aislados de células madre progenitoras primarias de linaje restringido, (2) líneas
40 celulares inmortalizadas de linaje restringido y (3) líneas de células madre pluripotentes. Se ha determinado que cada uno de estos planteamientos tiene ventajas y desventajas al servir como fuente celular para la producción de carne cultivada.

Aislados de células madre progenitoras adultas primarias de linaje restringido. Estos incluyen células progenitoras adultas comprometidas con linajes que constituyen los productos de carne tales como el músculo esquelético. Las
45 células progenitoras del músculo esquelético incluyen, pero no se limitan a células satélite, mioblastos y miocitos. Sus ventajas incluyen: i) las células progenitoras adultas primarias están restringidas a linajes específicos y requieren poco o nada de especificación *in vitro* a los linajes deseados; y ii) las células progenitoras adultas primarias no requieren modificación genética para la especificación del linaje. Sus desventajas incluyen: i) se deben recoger de un cuerpo de animal recién sacrificado u obtener de una biopsia invasiva. Cualquiera de los métodos conduce a dependencia del ganado y compromete el beneficio de la producción independiente del ganado en la medida en que se usa ganado en el procedimiento; ii) el aislamiento de células primarias es un proceso altamente ineficiente. Las células deseadas comprenden una fracción del tejido fuente. Una subfracción de las células deseadas sobrevive al proceso de aislamiento. Los linajes celulares deseados deben aislarse de poblaciones mixtas de células supervivientes, lo que requiere etapas adicionales de purificación y expansión; iii) las células progenitoras adultas primarias están sujetas al
50 "límite de Hayflick", en donde las células pueden dividirse solo un número limitado de veces antes de perder su capacidad de proliferar. Además, las células progenitoras adultas primarias pierden su capacidad de diferenciarse terminalmente de manera concordante con pases extendidos. Por lo tanto, se deben obtener células adicionales a partir de aislados de células primarias, lo que limita la escalabilidad del cultivo a partir de un solo aislado; y iv) el cultivo de células primarias de linajes de tejidos aplicables a la producción de carne cultivada, tales como el músculo esquelético, son métodos limitantes dependientes del anclaje para la escalabilidad volumétrica de los cultivos. En
60 cultivo en suspensión, estas células pueden ser susceptibles a la muerte celular por anoikis.

Líneas celulares inmortalizadas de linaje restringido. Estas son células primarias comprometidas con el linaje que están genéticamente alteradas para autorrenovarse indefinidamente a la vez que conservan su capacidad de diferenciarse terminalmente o restringidas por el linaje. Sus ventajas incluyen: i) "se autorrenuevan perpetuamente" (es decir, no están sujetas al "límite de Hayflick") y puede expandirse indefinidamente para un cultivo escalable e independiente del ganado; ii) restringidas a linajes específicos y requieren poca o no requieren más especificación *in vitro*. Sus desventajas incluyen: i) las líneas celulares inmortalizadas, de linaje restringido, de ciertas especies con la capacidad de diferenciarse a lo largo de los linajes aplicables a la producción de carne cultivada (p. ej., músculo esquelético) pueden requerir desarrollo; ii) los cultivos de líneas celulares comprometidas con el linaje dependen del anclaje, lo que limita la escalabilidad. En el cultivo en suspensión, las líneas celulares comprometidas con el linaje pueden ser susceptibles a la muerte celular por anoikis; y iii) la o las transformaciones celulares que permiten la "inmortalización" requieren modificación genética. Las modificaciones genéticas necesarias que inmortalizan las poblaciones de células primarias aplicables sin interferir con su capacidad de diferenciación terminal no están bien caracterizadas.

Líneas de células madre pluripotentes: Las líneas de células madre pluripotentes incluyen células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que mantienen la capacidad de autorrenovarse en el estado indiferenciado, o alternativamente de diferenciarse a cualquier linaje de tejido. Sus ventajas incluyen: i) en general, las líneas de células madre pluripotentes proliferan a una velocidad mayor que las líneas celulares primarias o inmortalizadas de linaje restringido, reduciendo el tiempo requerido para la expansión de la biomasa en los procedimientos de producción; ii) las células madre pluripotentes pueden cultivarse como cuerpos embrioides en cultivo en suspensión, mejorando así la escalabilidad del cultivo por unidad de volumen de cultivo. Además, los cuerpos embrioides pueden cultivarse como "bio-tinta" compatible con métodos de ensamblaje de micromoldes y tejidos de bioimpresión; y iii) al igual que las líneas celulares inmortalizadas de linaje restringido, las células madre pluripotentes no están sujetas al "límite de Hayflick" y pueden expandirse indefinidamente para el cultivo escalable independiente del ganado. Sus desventajas incluyen: i) las líneas de células madre embrionarias auténticas derivadas de ciertas especies pueden requerir desarrollo; ii) los métodos para la reprogramación y la autorrenovación de iPSC pueden depender de transgenes. Por lo tanto, la pluripotencia de las iPSC puede requerir modificación genética para la inducción y la autorrenovación del estado indiferenciado. La diferenciación eficiente de iPSC requiere mecanismos para silenciar los transgenes utilizados para la reprogramación y el mantenimiento del estado indiferenciado mutuamente exclusivo con el estado diferenciado para evitar la activación conflictiva de la red de transcripción desventajosa para la especificación del linaje deseado; y iii) en relación con las células madre progenitoras adultas primarias de linaje restringido y las líneas celulares inmortalizadas, las células madre pluripotentes, en general, requieren etapas de especificación de linaje adicionales para desarrollar y enriquecer la especificación de linaje deseada.

Otras líneas de células parentales/hospedantes además de las tres clasificaciones de células madre proporcionadas anteriormente también están contempladas en el presente documento. Por ejemplo, las líneas celulares de trofoblastos inducidos (que representan células inmortalizadas no somáticas y no pluripotentes de tipo extraembrionario), cuyo potencial miogénico se estableció previamente mediante el ensayo de teratoma, también pueden ser adecuadas para la conversión miogénica. Por ejemplo, las líneas celulares somáticas reprogramadas parcialmente para la pluripotencia pueden poseer potencial miogénico pero no pueden formar teratomas que representan tres capas germinales embrionarias. Por ejemplo, aunque su existencia es controvertida, las líneas celulares STAP (adquisición de pluripotencia desencadenada por estímulo) pueden ser mio-potentes y autorrenovables.

Línea celular O2K. La línea celular O2K es una línea de células madre pluripotentes inducidas establecida a partir de la masa celular interna de un embrión porcino preimplantación. La línea celular O2K se ha estudiado y se descubrió que el estado de autorrenovación de O2K se puede mantener mediante la activación transcripcional de los transgenes *POU5F1* y *KLF4* por doxiciclina (es decir, DOX) utilizando un sistema de inducción "Tet-On".

Factor de transcripción MYOD1. MYOD1 (es decir, MyoD) es un regulador dominante del compromiso con el linaje del músculo esquelético. La construcción MyoDER se ha descrito previamente, consistiendo en una fusión del gen *MYOD1* murino y la secuencia que codifica el dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos α humano, mostrado en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). En la Figura 1, el MyoDER consiste en una fusión genética entre el gen MYOD1 murino en el sitio de digestión de endonucleasa de restricción *Nar I* con la secuencia que codifica el dominio de unión al ligando del *ESR1* (es decir, receptor de estrógenos humano α) nucleótidos 844-1781. También están presentes secuencias conectoras *Cla 1* y no especificadas. La actividad de especificación miogénica de la construcción de fusión MyoDER se induce postraduccionalmente mediante la adición del ligando del receptor de estrógenos α , el 17 β -estradiol (es decir, E2). En ausencia de 17 β -estradiol, MyoDER permanece en un estado inactivo. La construcción MyoDER se denomina en el presente documento "MyoD inducible".

Con referencia ahora a la Figura 2, un aspecto es la expansión de la cepa de células, es decir, la expansión de la línea celular en condiciones de autorrenovación necesarias para el mantenimiento de la cepa de células para un cultivo continuo y escalable. Otro aspecto es la especificación/diferenciación de linaje, es decir, inducir la diferenciación de linaje miogénico para un proceso de cultivo de tejido posterior. Por lo tanto, ciertos aspectos pueden resumirse como que comprenden dos etapas principales: i) modificar una línea celular autorrenovable seleccionada, con un factor de transcripción miogénico para producir una línea celular modificada por el factor de transcripción miogénico, y ii) inducir dicha línea celular modificada mediante regulación exógena para mantenerla en el proceso de autorrenovación o

avanzar al proceso de diferenciación. Como se usa en el presente documento, "modificar" una línea celular con un factor de transcripción miogénico se refiere a insertar un vector o construcción de ácido nucleico que codifica de manera operativa un factor de transcripción miogénico (tal como por transfección, transducción, transformación y similares) en la línea celular, en donde la línea celular modificada expresa el factor de transcripción miogénico. En ciertos aspectos, el factor de transcripción miogénico insertado se expresa de forma inducible para producir una línea celular modificada con células con factor de transcripción miogénico inducible. Como se usa en el presente documento, "de forma inducible", "inducible" y similares se refiere a cualquier planteamiento de modificación genética que se puede usar para regular de manera exógena las actividades de un producto génico tal como un factor de transcripción miogénico. Los planteamientos inducibles incluyen, pero no se limitan a la regulación de la actividad del factor de transcripción miogénico mediante tecnología de factor de transcripción inducible por ligando (p. ej., Tet-on, tet-off, RheoSwitch), tecnología de recombinación dirigida al sitio (p. ej., Cre-LoxP, flp-FRT), tecnología de transposones (p. ej., Sleeping Beauty, PiggyBac), tecnología de fusión de receptor de unión a ligando (p. ej., agonistas de ligandos estrógenos, progesterona, andrógenos, hormona tiroidea, hormona glucocorticoide, tamoxifeno) y transfección transitoria de vectores de expresión extracromosómicos que llevan un gen del factor de transcripción miogénico. En ciertos aspectos, la construcción o vector de ácido nucleico está cromosómicamente integrado en la línea celular modificada. Ejemplos representativos de líneas celulares autorrenovables incluyen las seleccionadas de un grupo que consiste en células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas y líneas celulares inmortales de linaje restringido. En ciertos aspectos, dichas líneas celulares de autorrenovación derivan de especies destinadas al consumo alimentario o para investigación o para fines terapéuticos. Los ejemplos representativos de factores de transcripción miogénicos incluyen, usados solos o en combinación, MYOD1, MYOG, MYF5, MYF6, PAX3, PAX7, parálogos, ortólogos, variantes genéticas de los mismos, o agonistas de activación transcripcional de las respectivas secuencias de ADN de reconocimiento del promotor de los factores de transcripción miogénicos descritos en el presente documento.

Ahora se hace referencia a la Figura 3, que incluye ilustraciones esquemáticas de ejemplo del mecanismo de doble interruptor de la línea celular O2KM modificada miogénica regulada por DOX o E2. Como se muestra en la Figura 3, durante el proceso de autorrenovación de células madre O2KM, se induce la expresión de los transgenes de pluripotencia *POU5F1* y *KLF4* en presencia de DOX en el medio de autorrenovación (SRM), mientras que dicha expresión se reprime cuando DOX está ausente. De manera similar, durante el proceso de diferenciación miogénica de O2KM, la diferenciación miogénica es activada por el transgén inducible MyoD en presencia de E2 en el medio de inducción miogénica (MIM), mientras que dicha diferenciación dirigida está inactiva cuando E2 está ausente.

Ciertos aspectos proporcionan métodos de diferenciación/especificación que comprenden reactivos adicionales distintos de E2 en el MIM para prevenir la muerte celular y modular el estado epigenético de la cromatina. Por ejemplo, se puede añadir un inhibidor de glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK3 β) al SRM y MIM para activar la ruta de señalización WNT canónica, a su vez, mejorar la diferenciación miogénica y reducir la muerte celular en el momento de la retirada de la DOX. Sin estar limitados por la teoría, en ciertos aspectos, la modulación epigenética altera la activación de la cromatina por factores de transcripción miogénicos y/o mejora la expresión de factores de transcripción miogénicos, tales como MYF5.

Se entiende que la inhibición de la GSK3 β incluye el direccionamiento con moléculas pequeñas. La edición de genes también es un planteamiento prometedor para mejorar la especificación del músculo esquelético por activación de la señalización WNT. Por ejemplo, la GSK3 β puede ser inhibida en la línea celular del hospedante/parental mediante la mutación de los alelos de GSK3 β mediante tecnología de inserción o eliminación de secuencia específica (es decir, nucleasa con dedos de zinc, TALEN, CRISPR). La mutación de la región promotora endógena puede usarse para reprimir la expresión de GSK3 β . Alternativamente, el marco de lectura abierto de GSK3 β se puede eliminar o mutar usando los mismos métodos para abolir la actividad de GSK3 β . Del mismo modo, el objetivo de fosforilación corriente abajo de la GSK3 β , la beta-catenina (CTNNB1), puede mutar en los codones que codifican restos fosforilados por GSK3 β , evitando así la fosforilación de la CTNNB1 por GSK3 β , dando como resultado una CTNNB1 estable, activa de forma constitutiva. Dichos métodos de "edición de genes" reducirían el coste de la inhibición de GSK3 β mediante el direccionamiento de moléculas pequeñas y potencialmente mejorarían el perfil de seguridad del producto de carne, ya que no se requerirían productos químicos adicionales para inhibir la GSK3 β durante el proceso. Está contemplado que un tercer planteamiento para la inhibición de la señalización de Wnt incluye el uso de inhibidores de ácido nucleico antiparalelo para GSK3 β u otros factores antagonistas para la ruta de WNT. Estos pueden incluir métodos de interferencia de ARN que usan shARN o miARN dirigidos a la secuencia.

Ciertos aspectos específicos permiten el uso de un inhibidor de GSK3 β para promover la supervivencia celular, por ejemplo, en el momento de la retirada de DOX. Un ejemplo ilustrativo de un inhibidor de GSK3 β es CHIR99021. Los inhibidores representativos adicionales de GSK3 β pueden incluir, sin limitación: cloruro de litio, BIO, SB216763, CHIR-98014, TWS119, Tideglusib, IM-12, 1-Azakenpulona, AR-A014418 y SB415286. Sin estar limitados por la teoría, se cree que concomitante con DOX, la autorrenovación de las células indiferenciadas se mantiene por una ruta de señalización WNT que implica la inhibición de GSK3 β .

Sin estar limitados por la teoría o limitados por ningún ejemplo representativo específico, se observó que la retirada simultánea tanto de DOX como del inhibidor de GSK3 β CHIR99021 del medio de cultivo complementado con sustitutos de suero N-2 y B-27, precipita la muerte celular masiva de la línea parental O2K en diferenciación en el plazo de 48 h horas. La retirada de DOX en presencia de CHIR99021 permitió la supervivencia de las O2K en diferenciación. La

muerte por células O2K en diferenciación en ausencia de un inhibidor de GSK3β y la supervivencia recíproca en presencia del mismo se confirmaron por morfología, ensayo de adhesión celular, acumulación de caspasa-3 escindida y marcaje con anexina V. En la línea celular O2K parental, la inhibición de GSK3β daba como resultado de forma concordante la estabilización y activación de su sustrato de fosforilación, CTNNB1, el efector positivo corriente abajo de la ruta de señalización WNT canónica. La señalización de WNT tiene funciones cruciales tanto en la especificación de mesodermo a partir de la pluripotencia del estado fundamental indiferenciado, el enriquecimiento pre-miogénico del mesodermo sin patrón y la diferenciación terminal de miocitos comprometidos tanto *in vivo* como *in vitro*. De acuerdo con esto, el cultivo extendido de la línea O2K en ausencia de DOX, y en presencia de un inhibidor de GSK3β, apoyaba la diferenciación hacia el mesodermo paraxial premiogénico, como lo demuestra la expresión de PAX3 y la pérdida concomitante de la expresión de POU5F1 y KLF4. Además, en combinación con 5AC, el inhibidor de GSK3β mejoró la expresión del factor de transcripción miogénico MYF5 en O2K en diferenciación. Además, un inhibidor de GSK3β, tal como CHIR99021, mejoraba la diferenciación terminal de la línea celular miogénica C2C12 murina en miotubos multinucleados, como se muestra en la Tabla 1.

La Tabla 1 da las influencias de los efectores de la matriz extracelular (es decir, Gelatina, Poli-D-Lisina, Laminina, MATRIGEL) y factores solubles (E2, CHIR99021) en la diferenciación terminal del mioblasto C2C12 murino mediante la evaluación del tamaño y la extensión de la formación de miotubos que prosiguen a un periodo de tiempo de diferenciación de 5 días. (Los cultivos se puntuaron desde [****], lo que indica la formación de miotubos consistente a [-] lo que indica la formación de miotubos no detectable)

Tabla 1. Influencia de los efectores de la matriz extracelular y los factores solubles en la diferenciación terminal.

| | Medio basal | +E2 5 μM | +CHIR 3 μM | +E2 5 μM, +CHIR 3 μM |
|-------------------------------------|-------------|----------|------------|----------------------|
| Gelatina | *** | ** | *** | ** |
| Gelatina + Poli-D Lisina | *** | * | * | - |
| Laminina + MATRIGEL + Poli-D Lisina | *** | * | ** | ** |
| Laminina + MATRIGEL | *** | * | **** | ** |
| Laminina | *** | * | *** | * |
| MATRIGEL | *** | ** | ***** | *** |

En ciertos aspectos debido a su multifunción: (1) supresión de la muerte celular después de la retirada de DOX, (2) mantenimiento de la diferenciación hacia el estado premiogénico, (3) mejora de la especificación miogénica y (4) mejora de la diferenciación terminal, un inhibidor de GSK3β cuando se retiene en el medio de cultivo durante la diferenciación (en ausencia de DOX), se considera compatible con la especificación de linaje dirigida por factor de transcripción miogénico inducible y las condiciones de diferenciación terminal subsiguientes por miocitos derivados. Por ejemplo, CHIR99021 era retenido en los cultivos de O2KM después de la retirada de DOX durante los posteriores procesos de especificación de linaje inducida por E2 y diferenciación terminal.

Sin embargo, aunque el régimen de cultivo complementado con el inhibidor de GSK3β mencionado anteriormente mantenía la supervivencia celular y la especificación de linaje miogénico por O2KM a células diferenciadas con una morfología distintiva de huso similar a los miocitos, las células derivadas no lograron diferenciarse terminalmente en miotubos alargados refractivos. Por lo tanto, se usó un modulador epigenético para mejorar la expresión de genes miogénicos en células que de otro modo no serían permisivas para la miogénesis y mejorar la diferenciación terminal de miocitos comprometidos con el linaje a miofibras maduras. Para permitir la diferenciación terminal de O2KM, las células se cultivaron en presencia de 5-aza-citidina (5AC) durante 72 horas previamente a la retirada de DOX, durante 48 horas durante la inducción por E2, seguido de un período de diferenciación terminal de hasta 6 días adicionales. En los miocitos derivados de O2KM cultivados en presencia de 5AC, se mejoró la expresión de MYF5 y las células presentaron una morfología refractiva de miofibrillas, mientras que los miocitos derivados en ausencia de 5AC expresaron MYF5 reducido y presentaron una morfología aplanada atípica para miofibrillas maduras. Esta distinción puede explicarse por la expresión mejorada del factor de transcripción miogénico MYF5 observado solo en las O2KM expuestas a 5AC antes y después de 48 horas de la retirada de DOX

Junto con el enriquecimiento de la isoforma de miogenina no fosforilada de menor peso molecular, que se sabe que es el transactivador activo, la distinción morfológica entre estos cultivos puede explicarse por la expresión de MYF5 potenciada por la exposición a 5AC. Se entiende que la modulación epigenética implica la alteración de la estructura de la cromatina que influye en la unión del factor de transcripción y la activación transcripcional dirigida al alterar los patrones de metilación del ADN y la modificación postraduccional de las histonas asociadas a nucleosomas. Se entiende que la modulación epigenética puede implicar moléculas pequeñas agonistas o antagonistas dirigidas a rutas epigenéticas o proteínas expresadas que comprenden maquinaria epigenética. Un ejemplo ilustrativo de una molécula pequeña modulador epigenético es la 5-aza-citidina (5AC). Ejemplos representativos adicionales de moléculas pequeñas moduladores epigenéticos incluyen 5-Aza-2'-desoxicitidina, RG108, Scriptaid, butirato de sodio, tricostatina A, ácido hidroxámico suberoilánilida, MS-275, CI-994, BML-210, M344, MGCD0103, PXD101, LBH-589, Tubastatina A, NSC3825, NCH-51, NSC-3852, HNHA, BML-281, CBHA, Salermida, difenilamida pimelica, ITF-2357, PCI-24781,

- 5 APHA Compuesto 8, Droxinostat y SB-939. Los ejemplos representativos de proteínas implicadas en la modulación epigenética incluyen parálogos de histona desacetilasa, parálogos de histona acetiltransferasa, parálogos de tetrametilcitosina dioxigenasa, parálogos de histona desmetilasa, parálogos de histona metiltransferasa y parálogos de ADN metiltransferasa, histonas y subunidades de complejos de remodelación de cromatina que incluyen Mi-2/NuRD (y sus componentes tales como la proteína 3 con dominio de unión a metil-CpG (MBD2)) y SWI/SNF (y sus componentes tales como BAF60 y BAF60C). Se entiende además que pueden influir en las respectivas actividades de los moduladores epigenéticos de proteínas modalidades representativas tales como el direccionamiento por factores moléculas pequeñas, la sobreexpresión de un transcrito exógeno respectivo, degradación del respectivo transcrito dirigido por ARN antiparalelo, ARNi y mutación dirigida en el locus genético.
- 10 Las siguientes realizaciones descritas son meramente representativas. Por lo tanto, los detalles estructurales, funcionales y de procedimiento específicos descritos en los siguientes ejemplos no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Métodos

- 15 Línea celular O2KM. La línea celular O2KM se derivó de la línea celular O2K parental mediante la inserción lentiviral de un casete transgénico seleccionable por blastidicina que contiene la secuencia del marco de lectura abierto (ORF) de MyoDER. Como se menciona en esta sección de ejemplos, células/línea celular O2K y células piPSC se usan indistintamente. El vector lentiviral, ilustrado en la Figura 4A, se preparó clonando el ORF de MyoDER (Addgene nº 13494) en la dirección 5' del promotor de CMV del vector de destino pLentiCMVBlast (Addgene nº 17451) entre los sitios de recombinación attR1 y attR2 de un clon del vector de entrada pENTR/D-TOPO (Life Technologies nº K2435-20) que contiene el ORF de MyoDER amplificado por PCR. Para preparar el líquido sobrenadante lentiviral, se cotransfectaron células 293FT con el plásmido pLentiCMVBlast [MyoDER] preparado, el plásmido de envoltura pMD2.G (Addgene nº 12259) y el plásmido de empaquetamiento psPAX2 (Addgene nº 12260) usando el reactivo de transfección PolyJet (Signagen nº SL100688). Las O2K se transdujeron con pseudovirus concentrado del líquido sobrenadante de 293FT. Las O2K transducidas se cultivaron en medio de cultivo exento de rojo fenol y se seleccionaron cuatro días con 10 µg/ml de blastidicina seguido de dos días adicionales con 15 µg/ml de blastidicina. Las células seleccionadas se designaron como O2KM. La expresión de MyoDER en la cepa de O2KM se verificó por transferencia Western, Figura 4B
- 20
- 25
- 30 Expansión de la cepa de células madre O2KM en presencia de DOX. El medio de renovación de células madre O2KM se llevó a cabo para la línea O2K parental, con la siguiente excepción: las formulaciones exentas de rojo fenol de DMEM/F-12 y el medio neurobasal se sustituyeron por las formulaciones que contienen rojo fenol para evitar los efectos agonistas pleotrópicos en MyoDER (es decir, activación). El medio de autorrenovación de la cepa de células O2KM (SRM) consistía en los siguientes componentes: medio neurobasal exento de rojo fenol (Life Technologies nº 12348-017), DMEM-F12 exento de rojo fenol (Life Technologies nº 11039-021), 1X aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich nº M7145), 0.5X Glutamax (Life Technologies nº 35050061), β-mercaptoetanol al 0.000007%, 0.5X complemento de N2 (Life Technologies nº 17502048), 0.5X complemento B27 menos Vitamina A (Life Technologies nº 12587010), albúmina de suero bovino 0.1 mg/ml, hclato de doxaciiclina 2 µg/ml (es decir, DOX), factor inhibidor de la leucemia humana 10 ng/ml (hLIF, Millipore nº LIF1050), CHIR99021 3 µM, PD032591 0.8 µM y PD173074 0.1 µM. En lo sucesivo, los tres inhibidores CHIR99021, PD032591 y PD173074 se consideran colectivamente como "3i".
- 35
- 40 Alternativamente, los sustitutos de suero N-2 y B-27 se sustituyeron usando sustituto de suero KnockOut al 15% (KOSR; Life Technologies nº A15870). Las O2KM se mantuvieron por disociación enzimática de colonias y pases de células sobre placas de cultivo recubiertas con poli-D lisina y laminina murina en SRM exento de fenol en 5% de O₂ cada 3d. En estas condiciones de autorrenovación, O2KM mantuvo una morfología compacta, similar a las células madre, como la línea O2K parental, como se muestra en la Figura 5.
- 45
- 50 Inhibición por CHIR99021 de la muerte celular. La diferenciación de la línea O2K parental en ausencia de componentes del medio de cultivo SRM que mantienen la autorrenovación hLIF, DOX, CHIR99021, PD032591 y PD173074, y KOSR dio como resultado la muerte celular masiva según lo determinado por (1) microscopía de contraste de fase como se muestra en la Figura 9, paneles i. - ii., (2) escisión de CPP32, como se muestra en la Figura 17A, y (3) marcaje con anexina V que se muestra en la Figura 16. Sin embargo, una formulación de medio de cultivo que incluye CHIR99021, cuando se retiene en el medio basal SRM en ausencia de hLIF, DOX, PD032591 y PD173074, mantuvo la supervivencia celular durante la diferenciación según lo determinado por (1) microscopía de contraste de fase, como se muestra en la Figura 9, paneles iii. - viii., (2) ensayo de adhesión celular, como se muestra en la Figura 10, (3) inhibición de la escisión de CPP32 como se muestra en la Figura 17B, y (4) marcaje con Anexina V, como se muestra en la Figura 11. Además, la exposición a CHIR99021 durante la diferenciación primordial estabiliza y modula el estado de fosforilación del sustrato de la GSK3β, CTNNB1, como se muestra en la Figura 12, 13A y 13B, el efector corriente abajo fosforegulado de la ruta de señalización WNT canónica se sabe que dirige la diferenciación mesodérmica durante la especificación del linaje embrionario, el enriquecimiento miogénico de los progenitores mesodérmicos y la diferenciación terminal de miocitos esqueléticos. Congruente con estos hallazgos, el medio basal complementado con CHIR99021 mantenía la especificación del linaje del mesodermo paraxial premiogénico de O2K en diferenciación, como se muestra en la Figura 14 y cuando se incluye en cultivos de baja diferenciación de mitógenos (suero de caballo al 2%/DMEM) de la línea celular miogénica murina C2C12, mejoraba la diferenciación terminal en miotubos
- 55
- 60

esqueléticos, dados en la Tabla. 1. Puesto que CHIR99021 reprimía la muerte celular, mantenía la diferenciación hacia el mesodermo paraxial por la línea celular O2K en diferenciación y mejoraba la diferenciación terminal por la línea celular C2C12, se estableció un precedente para retener el compuesto en todas las etapas de cultivo. Por lo tanto, el CHIR99021 3 μM se retuvo en el medio de cultivo durante las etapas de expansión, inducción y diferenciación terminal (Figura 20A) a menos que se indique lo contrario.

Inducción miogénica de O2KM. Se sembraron células O2KM en placas de cultivo recubiertas con poli-D lisina, laminina murina y MATRIGEL a una densidad de $4,1 \times 10^3$ células/cm² y se cultivaron en 5% de O₂ en medio de autorrenovación durante 3d. Para facilitar la diferenciación, los cultivos se transfirieron a un medio de diferenciación basal con 20% de O₂, designado por retirada de PD032591, PD173074, DOX, hLIF y β -mercaptoetanol. Para inducir condicionalmente la proteína MyoDER expresada, se añadió E2 10 μM al medio. La especificación del linaje miogénico dirigida por E2 después del cultivo de inducción de 2d se confirmó mediante (1) la adopción de la morfología similar al huso característica de los miocitos esqueléticos en cultivos tratados, como se muestra en la Figura 6, (2) expresión del factor de transcripción del músculo esquelético MYOG endógeno, como se muestra en la Figura 7, y (3) expresión uniforme del marcador de la superficie celular de miocitos esqueléticos, NCAM, como se muestra en la Figura 8.

Efectos de 5AC. Se introdujo la exposición a 5CA antes, durante y después de la inducción mediada por E2 de "MyoDER" para permitir la diferenciación terminal de O2KM de miocitos en miotubos filamentosos refractivos. La línea celular murina C2C12 se usó como control positivo para seleccionar condiciones óptimas para la diferenciación terminal por O2KM. Estas condiciones incluían: una matriz extracelular de MATRIGEL y la complementación de CHIR99021 en ausencia de E2, como se da en la Tabla 1. Sin embargo, los miocitos derivados de O2KM pasados sobre placas de cultivo recubiertas con MATRIGEL en medio de diferenciación sin E2 (las condiciones determinadas óptimas para la diferenciación terminal de C2C12) no pudieron establecer miotubos refractivos, como se muestra en la Figura 15 y la Figura 20B. Por lo tanto, el programa de expresión génica en los miocitos derivados de O2KM no era suficiente para permitir la diferenciación terminal según las condiciones establecidas. Se determinó previamente que 5AC, una molécula pequeña modulador epigenético, permitía la transcripción del músculo esquelético en líneas celulares no permisivas para la miogénesis. Además, se determinó adicionalmente que la exposición a 5AC mejoraba la diferenciación terminal por la línea celular C2C12. Por lo tanto, se incluyó 5AC 250 nM, la dosis más alta tolerada por O2KM indiferenciadas, durante los regímenes de expansión e inducción de O2KM en proliferación, como se muestra en la Figura 20A.

Diferenciación terminal. Después de la inducción por E2 durante 2d, los cultivos se diferenciaron terminalmente en el sitio, o se pasaron a cultivo en placa recubierta con MATRIGEL en medio de diferenciación terminal (TDM) con $1,56 \times 10^5$ células/cm² para la diferenciación terminal. El TDM se formuló a partir de los mismos componentes que el MIM, excepto por las siguientes modificaciones: retirada de E2, adición de A 83-01 4 μM , y IGF-1 100 nM. Los suplementos N-2 y B-27 se usaron exclusivamente como sustitutos de suero. Los cultivos se diferenciaron durante hasta 6d después en 20% de O₂ siguiendo los regímenes de inducción (Figura 20A). Los cultivos expuestos a 5AC durante los regímenes de expansión e inducción formaron miotubos anisotrópicos refractivos durante el régimen de diferenciación terminal, que se muestra en la Figura 20B. La Figura 20C muestra la expresión uniforme de la cadena pesada de la miosina el d6, y la Figura 20E muestra la expresión creciente de desmina (DES) y miogenina (MYOG) durante el transcurso de 8d. Se observó poliploidía de miotubos durante la diferenciación terminal, como se muestra en la Figura 20D, panel izquierdo. La distribución relativa de mionúcleos en los miotubos del d8 según la ploidía se muestra en la Figura 20D, panel derecho. La prevalencia relativa de núcleos de la fase S en el medio de renovación (colonias de d3), medio de expansión (cultivos de d0, Figura 20A) y medio de diferenciación terminal (cultivos de d8, Figura 20A), como se muestra en la Figura 20F, indicaba la retirada del ciclo celular después de la diferenciación terminal. El potencial contráctil de los miotubos del músculo esquelético en diferenciación terminal fue validado por (1) desarrollo estructural de sarcómeros bien organizados, como se muestra en la Figura 20G; (2) contracción espontánea asíncrona, como se muestra en la Figura 21A; (3) estimulación contráctil y sincronización por estimulación de campo, como se muestra en la Figura 21B; (4) contracción estimulada por cafeína, como se muestra en la Figura 21C; y (5) contracción estimulada por acetilcolina, como se muestra en la Figura 21D.

Resultados

CHIR99021 modula un eje de apoptosis y diferenciación. La Figura 9 muestra imágenes de contraste de fase de colonias de piPSC en estado fundamental cultivadas en 5% de O₂ en el medio de autorrenovación (i.) y después de 48 h en 20% de O₂ en ausencia de DOX, LIF y 3i, (ii.). La Figura 16 muestra el marcaje con anexina V de células apoptóticas antes y después de 24 h de transición de cultivos. La Figura 17A muestra la detección por transferencia Western de CPP32 de longitud completa (~32 kD procaspasa 3a) y el fragmento escindido grande (~17kD caspasa 3a escindida) en colonias en estado fundamental antes (0 h) y después (12-48 h) de transición del medio de diferenciación (12-48 h). La Figura 9 muestra imágenes de contraste de fase de cultivos adherentes (iii, iv, vi y vi) y cultivos de cuerpos embrioides no adherentes (vii y viii) después de cultivo de 48 h en medio de diferenciación complementado con CHIR99021 como se indica. La Figura 10 muestra el porcentaje de células adherentes de los cultivos en medio de diferenciación complementados con el CHIR99021 como se indica, durante 48 h en relación con los cultivos en estado fundamental (es decir, 0 h), normalizados al 100%. *Células no adherentes viables como cuerpos embrioides. $n = 3$ para cada condición de cultivo. La Figura 11 muestra el marcaje con anexina V de células apoptóticas después de 24 h de transición de cultivos a medio de diferenciación complementado con CHIR99021 como se indica. La Figura 17B muestra la detección por transferencia Western de CPP32 de longitud completa y el fragmento escindido

en colonias después de 42 h de transición al medio de diferenciación en presencia de los niveles de CHIR99021 indicados. TUBA se detecta como un control interno de carga de proteínas.

CHIR99021 estabiliza CTNNB1 y mantiene la diferenciación desde el estado fundamental. La Figura 12 muestra la detección por transferencia Western de CTNNB1 y p-CTNNB1 (total y β -catenina fosfo-S33,37,T41, respectivamente) después de transición del medio de diferenciación de 24 h en presencia de CHIR99021, como se indica. TUBA se detectaba como un control interno de carga de proteínas. La Figura 13A indica las relaciones de las bandas de p-CTNNB1/CTNNB1. La Figura 13B indica las relaciones de las bandas de CTNNB1/TUBA. Las Figuras 13A y 13B representan la cuantificación densitométrica de las transferencias Western como se muestra en la Figura 12; $n = 3$. La Figura 18 muestra la morfología de excrescencias de cuerpos embrioides formados en un medio de diferenciación que contiene CHIR99021 6 μ M durante dos días y después de transferencia a un sustrato recubierto con Poli-D Lisina + Laminina + MATRIGEL durante uno (d3, *panel izquierdo*) o tres (d5, *panel derecho*) días adicionales. La Figura 14 muestra el análisis de transferencia Western de la expresión de PAX3, POU5F1 y KLF4 en cultivos en medio de estado fundamental (d0) y medio de diferenciación (d1 - d5) de acuerdo con un aspecto del régimen descrito en otra parte del presente documento. La detección de TUBA se muestra como un control interno de carga de proteínas.

Activación por 5-aza-citidina y MyoDER de MRF endógenos. Modificación de piPSC con un casete de expresión de MyoDER integrado. La Figura 4A muestra un casete de expresión de MyoDER seleccionable por blastocidina (BLAST). Las flechas y los cuadros indican secuencias de promotor y gen, respectivamente. La Figura 4B muestra la detección por transferencia Western de MyoDER en la línea piPSC no modificada (O2K) y modificada con casete de expresión de MyoDER (O2KM). MyoDER se detectó con un anticuerpo generado contra un péptido MyoD. La Figura 7 muestra la detección por transferencia Western de MyoDER (~75 kD), MYF5 y MYOG después de inducción de 2d de piPSC. No se detectó MYOD1 endógeno (~45 kD, esperado). Se sembraron O2KM en placas de cultivo recubiertas con poli-D lisina + Matrigel + laminina murina y se cultivaron con hLIF, 3i y DOX durante tres días en presencia (es decir, expansión, Figura 20A) o ausencia de 5AC, seguido de la transición respectiva a un medio de diferenciación +/-5AC complementado con E2 (es decir, 17 β estradiol) y CHIR99021 3 μ M durante dos días. *Doble flecha*: Isoformas de MYOG parcialmente resueltas. Figura 19A y 19B. Determinantes de la activación de MYF5: análisis de transferencia Western. Figura 19A, después de tres días de cultivo en poli-d-lisina + laminina + MATRIGEL, se cultivaron piPSC sin modificar 2d en ausencia de 3i, DOX, hLIF y E2 en un medio de diferenciación complementado con 5AC (como en la Figura 7) y CHIR99021 como se indica. En ausencia de CHIR99021, no se observó la isoforma de caspasa escindida de 17 kD en el medio de diferenciación complementado con KOSR, en contraste con las observaciones en el medio de diferenciación complementado con N-2 y B-27 (Figura 17A, Figura 19A). La activación mejorada con 5AC de la expresión de MYF5 endógeno dependía de la exposición simultánea a CHIR99021, como se muestra en la FIG. 19A. La Figura 19B muestra la activación de MYF5 en presencia de DOX, LIF y 3i. Las piPSC modificadas con MYODER se cultivaron 3 días en un medio de autorrenovación o expansión. En presencia de DOX y CHIR99021, la exposición a 5AC mantenía niveles de expresión de MYF5 detectables, como se muestra en la Figura 19B, después de 3 días de cultivo de expansión. En contraste, MYF5 no se detectó después de 3 días de cultivo de renovación (-5AC), como se muestra en la Figura 19B. TUBA se detecta como un control interno de carga de proteínas. La Figura 6 muestra la morfología de cultivos de piPSC seleccionados siguiendo los regímenes de cultivo de inducción de especificación de linaje (Figura 20A) descritos en otra parte del presente documento. La Figura 8 muestra la detección inmunocitofluorescente de núcleos (DAPI) y NCAM en cultivos de piPSC-MyoDER antes de (d0, *panel izquierdo*) y después (d2, *panel derecho*) de exposición a E2 10 μ M, en presencia de 5AC.

Miogénesis terminal de piPSC especificada por linaje. Antes de la diferenciación terminal, los cultivos se expandieron durante 3 días en presencia de 5AC, se indujeron durante 2 días en presencia de E2 y 5AC, y se diferenciaron terminalmente en ausencia de 5AC y E2 como se muestra en la Figura 20A. La Figura 20B muestra la morfología y conformación de miotubos. Después de la inducción (d2), las piPSC se desarrollaron como miotubos alargados, anisotrópicos y refractivos. Cuando no se incluía 5AC en las etapas de expansión e inducción, las células presentaban una morfología aplanada, no refractiva. La Figura 20C y la Figura 20E muestran la expresión de proteínas de la miogénesis terminal. En los cultivos de D0 y D6 se tiñeron las isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC) con un anticuerpo monoclonal pan-MyHC, clon MF20. La figura 20D muestra la multinucleación de miotubos. *Panel izquierdo*: Imagen aumentada de cultivos de diferenciación terminal de d4. Las flechas entre corchetes indican múltiples núcleos dentro de un solo miotubo. *Panel derecho*: distribución de mionucleos por ploidía de miotubos mediante marcado con yoduro de propidio y análisis de citometría de flujo. $n = 3$ con desviación estándar mostrada. La Figura 20E muestra análisis de transferencia Western. Expresión de MyoD (MYOD1), miogenina (MYOG) y desmina (DES), d0 -d8. TUBA se detecta como un control interno de carga de proteínas. La Figura 20F muestra la retirada del ciclo celular que coincide con la diferenciación terminal. Los cultivos de expansión, renovación de piPSC modificadas en d3 y los cultivos de diferenciación terminal en d8 se marcaron con EdU, y se determinó la fracción de fase S por citometría de flujo. $n = 3$ con desviación estándar mostrada. Figura 20G: Microscopía electrónica de transmisión, miotubos en d6. Las unidades estructurales sarcómeras se alinearon en una sola (*paneles izquierdos*) y en filas paralelas, escalonadas (*panel derecho*). Actividad transitoria de calcio espontánea e inducida por estímulos en miotubos derivados de piPSC. Para cuantificar los ciclos de contracción, los cultivos de miotubos se tiñeron con el colorante para el calcio Fluo-4 AM, se lavaron y las secuencias de imágenes se capturaron por microscopía confocal. Se buscaron los sucesos de señalización dinámica de un campo de visión completo (FOV) o células individuales y se representaron gráficamente frente al tiempo de generación de la imagen. [s] = segundos. La Figura 21A muestra ciclos transitorios asincrónicos representativos de una sola célula (*paneles izquierda, medio y derecha*) que se observaron

en la contratación espontánea de subpoblaciones de miotubos en d6. La Figura 21B muestra la activación y sincronización del FOV de los ciclos transitorios de calcio por estimulación de campo de 1.0 Hz en miotubos en d6. La Figura 21C muestra la activación transitoria por calcio del FOV de los miotubos en d6 por cafeína 10 mM. Figuras 21D: análisis de células individuales de la activación transitoria por calcio representativa en miotubos en d7 por acetilcolina 100 nM.

Discusión

En resumen, se ha descubierto que ciertos aspectos de las realizaciones de ejemplo descritas en esta descripción demuestran una o más de las siguientes ventajas inesperadas para aplicaciones de carne cultivada:

- (i) Tasa de proliferación celular rápida;
- 10 (ii) Diferenciación rápida: con tan solo 48 horas de activación de MyoDER inducida por 17β-estradiol y retirada de doxiciclina, la línea celular O2KM se diferencia en linaje miogénico, in vitro. No se requieren largos procedimientos de diferenciación;
- (iii) Diferenciación eficiente: la especificación de linaje dirigida por CHIR99021/5AC/MyoDER asegura una extensa conversión de alta fidelidad a miocitos esqueléticos funcionales. No se requiere clasificación celular;
- 15 (iv) Autorrenovación infinita: la autorrenovación de las O2KM indiferenciadas se mantiene muy reforzada en el medio de autorrenovación;
- (v) Autorrenovación y diferenciación terminal en medio exento de suero: tanto la autorrenovación como la diferenciación miogénica terminal de la línea O2KM fueron validadas en medio exento de suero;
- 20 (vi) Compatible con los sistemas de cultivo en suspensión como cuerpos embrioides: en estado pluripotente, la O2K parental y O2KM modificada son resistentes a la anoikis y pueden cultivarse en cuerpos embrioides a partir de células individuales en cultivo en suspensión. Los cuerpos embrioides derivados de O2KM pueden ser compatibles con tecnologías de ensamblaje de esferoides multicelulares tales como la bioimpresión y los micromoldes para la producción de carne cultivada; y
- 25 (vii) Contracción autóloga: O2KM diferenciada terminalmente como músculo esquelético presenta maduración sarcómera y contracción autóloga. Por lo tanto, la estimulación externa (p. ej., tensión mecánica, activación del receptor de acetilcolina, estimulación eléctrica) puede no ser necesaria para promover la maduración de miofibras.

Si bien la invención se ha descrito en relación con realizaciones de ejemplo de la misma, se entenderá que el método de la invención puede tener modificaciones adicionales. Esta solicitud de patente está destinada a cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo dichas desviaciones de la presente descripción que se encuentran dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y como se puede aplicar a las características esenciales expuestas en lo que antecede y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

- <110> The Curators of the University of Missouri
- 35 Personas para el Trato Ético de los Animales
- <120> Método para la especificación y el cultivo del linaje del músculo esquelético escalable
- <130> 52553-136621
- <150> 61/962,068
- <151> 30-10-2013
- 40 <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1905
- <212> ADN
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Fusión sintética
- <400> 1

ES 2 782 380 T3

atggagcttc tatcgccgcc actccgggac atagacttga caggccccga cggctctctc 60
 tgctcctttg agacagcaga cgacttctat gatgaccctg gtttcgactc accagacctg 120
 cgcttttttg aggacctgga cccgcgcctg gtgcacatgg gagccctcct gaaaccggag 180
 gagcacgcac acttccctac tgcgggtgcac ccaggcccag gcgctcgtga ggatgagcat 240
 gtgcgcgcgc ccagcgggca ccaccaggcg ggtcgtgct tgctgtgggc ctgcaaggcg 300
 tgcaagcgca agaccaccaa cgctgatcgc cgcaaggccg ccaccatgcg cgagcgccgc 360
 cgcctgagca aagtgaatga ggccttcgag acgctcaagc gctgcacgtc cagcaaccgc 420
 aaccagcggc tacccaaggt ggagatcctg cgcaacgcca tccgctacat cgaaggtctg 480
 caggctctgc tgcgcgacca ggacgcgcgc ccccctggcg attctgctgg agacatgaga 540
 gctgccaacc tttggccaag cccgctcatg atcaaacgct ctaagaagaa cagcctggcc 600
 ttgtccctga cggccgacca gatggtcagt gccttgttgg atgctgagcc ccccatactc 660
 tattccgagt atgatoctac cagacccttc agtgaagctt cgatgatggg cttactgacc 720
 aacctggcag acagggagct ggttcacatg atcaactggg cgaagagggg gccaggcttt 780
 gtggatttga ccctccatga tcaggtccac cttctagaat gtgcctggct agagatcctg 840
 atgattggtc tcgtctggcg ctccatggag caccagggga agctactgtt tgctcctaac 900
 ttgctcttgg acaggaacca gggaaaatgt gtagagggca tggaggagat cttcgacatg 960
 ctgctggcta catcatctcg gttccgcatg atgaatctgc agggagagga gtttgtgtgc 1020
 ctcaaacta ttattttgct taattctgga gtgtacacat ttctgtccag caccctgaag 1080
 tctctggaag agaaggacca tatccaccga gtccctggaca agatcacaga cactttgatc 1140
 cacctgatgg ccaaggcagc cctgaccctg cagcagcagc accagcggct ggcccagctc 1200
 ctccatcc tctcccacat caggcacatg agtaacaaag gcatggagca tctgtacagc 1260
 atgaagtgca agaacgtggt gccctctat gacctgctgc tggagatgct ggacgcccac 1320
 cgcctacatg cggccactag ccgtggaggg gcatccgtgg aggagacgga ccaaagccac 1380
 ttggccactg cgggctctac ttcacgcgat tccttgcaaa agtattacat cacgggggag 1440
 gcagaggggt tccttgccac agctatcgcc gctgccttct acgcacctgg accgctgccc 1500
 ccagggcgtg gcagcgagca ctacagtggc gactcagatg catccagccc gcgctccaac 1560
 tgctctgatg gcatgatgga ttacagcggc cccccaagcg gccccggcg gcagaatggc 1620
 tacgacaccg cctactacag tgagggcgcg cgcgagtcca ggccaggga gagtgcggct 1680
 gtgtcgagcc tcgactgcct gtccagcata gtggagcgca tctccacaga cagccccgct 1740
 gcgctgcgc tgcttttggc agatgcacca ccagagtcgc ctccgggtcc gccagagggg 1800
 gcatccctaa gcgacacaga acagggaaacc cagaccctgt ctcccgacgc cggccctcag 1860
 tgtcctgcag gctcaaacc caatgcgatt tatcaggtgc tttga 1905

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para producir un producto de carne cultivada para el consumo alimentario, comprendiendo el método:
 - 5 modificar una línea celular de autorrenovación de ganado, aves de corral, caza o especies de animales acuáticos con un factor de transcripción miogénico inducible para producir una línea celular modificada por un factor de transcripción miogénico, en donde dicha línea celular de autorrenovación es una línea de células madre embrionarias pluripotentes o una línea de células madre pluripotentes inducidas;
 - 10 mantener dicha línea celular modificada en un proceso de autorrenovación seguido de inducción de diferenciación miogénica de dicha línea celular modificada, por regulación exógena del factor de transcripción miogénico inducible, en donde la inducción de la diferenciación miogénica comprende además poner en contacto dicha línea celular modificada con un inhibidor de la metilación del ADN, y en donde la línea celular modificada diferenciada forma miocitos y miotubos multinucleados, que comprenden ambos mionucleos; y
 - 15 cultivar los miocitos y los miotubos multinucleados para generar fibras musculares esqueléticas, produciendo así un producto de carne cultivada para el consumo alimentario.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la especie de ganado es porcina o bovina.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha línea celular autorrenovable es una línea de células madre embrionarias pluripotentes.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho factor de transcripción miogénico se selecciona del grupo que consiste en MYOD1, MYOG, MYF5, MYF6, PAX3 y PAX7.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, que comprende mantener dicha línea celular en dicho proceso de autorrenovación manteniendo dicha línea celular modificada en un primer medio de cultivo para la expansión de la cepa de células indiferenciadas, comprendiendo dicho primer medio de cultivo doxiciclina para la expansión de la cepa de células.
6. El método de la reivindicación 5 que además comprende: transferir la línea celular modificada a un segundo medio de cultivo para diferenciación miogénica, comprendiendo dicho segundo medio de cultivo E2.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en donde dicho segundo medio de cultivo comprende además un reactivo para activar la ruta de señalización WNT canónica, un reactivo para modulación epigenética, o una combinación de los mismos.
8. El método de la reivindicación 7, en donde dicho reactivo para activar la ruta de señalización WNT canónica comprende un inhibidor de GSK3 β seleccionado del grupo que consiste en CHIR99021, cloruro de litio, BIO, SB216763, CHIR-98014, TWS119, Tideglusib, IM-12, 1-Azakenpulona, AR-A014418 y SB415286.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en donde dicho segundo medio de cultivo comprende además un reactivo para la modulación epigenética seleccionado de uno o más miembros del grupo que consiste en RG108, Scriptaid, butirato de sodio, tricostatina A, ácido hidroxámico suberoilánilida, MS-275, CI-994, BML-210, M344, MGCD0103, PDX101, LBH-589, Tubastatina A, NSC3825, NCH-51, NSC-3852, HNHA, BML-281, CBHA, Salermida, Difenilamida pimélica, ITF-2357, PCI-24781, APHA Compuesto 8, Droxinostat y SB-939, histona desacetilasa, histona acetiltransferasa, tetmetilcitosina dioxigenasa, histona desmetilasa, histona metiltransferasa y ADN metiltransferasa, histonas y subunidades de complejos de remodelación de cromatina, que incluyen Mi-2/NuRD y SWI/SNF.
- 35 10. El método de la reivindicación 7, en donde la ruta de señalización WNT canónica se activa mediante la inhibición de edición de genes de GSK3 β o su sustrato CTNNB1.
- 40 11. El método de la reivindicación 1, en donde dicha línea celular de autorrenovación es una línea de células madre pluripotentes inducidas.
12. El método de la reivindicación 1, en donde dicho inhibidor de la metilación del ADN es 5-aza-citidina.

MvDERM
 atggagcttctatgpcgcccactccggggaacatagacttgaacagggcccgaagggtctctctgctcccttga
 agacatcagadacttctatgataaccccttttttggactcaacagactgggttttttggadacctgga
 cccgacctggttdeacatgggagccctcctgaaaccgggagagccacacttccctactgaggtgac
 caggcccaaggctctgttggatgagcaatgtgcagcgcacagggggcacaaccaggggaggtctgtgt
 tgcctgtgggcttgaaggcctgaaagccaggaaccacacagctgatgagcgaagggccgacacatgca
 agagccgcctctgagcaaatgcaatgagcccttgagagcctcagagcctcagcgtgcacgtccagcaacc
 aaccagcagtaaccaggtggagatcctggaacggccatcgctacatcagaggtctggaggtctctg
 tggggaaaccaggaagcggggcccccggggattctgctggagacatgagagctgccaacccttggcccaag
 cccctcatgatcaaacctctaaagaagaacagcctggccttgtccctgagggccagatgdtcagc
 gccctgttggatgctgagccccctactctattccgagctatgatcctaccagaaccttccagtgagcctt
 cgatgatgggcttactgaccaaactggcagacagggagctggttcacatgatcaactgggccaagggc
 gccaggctttgtggatttgacctccatgatcaggtccacctctagatgtgctggctagagatccctc
 atgatggctcctctggcctccatggagcaccagggaagctactgtttgctcctaaacttgccttgg
 acaggaaccagggaaatgttagagggcatggtggagatccttcgacatgctgtgctacatcactctc
 gttccgcatgatgaatcggcagggagagggttgtgtgcccacaaatctatttttggctzaatctctgga
 ggtacacatttctgtccagcaccctgaagctctctggaagagaaggaacaatccacccagctcctggaca
 agatcacagacacttctgatccacctgtagtggccaaggcctgaccctgacagcagcaaccagctgct
 ggcccagctcctcctcactcctcccacatcaggccaatgagtaacaaggcatggagcatctgtacagc
 atgaagtgaagaacgtggtgcccctctatgacctgtgctggagatgctggagcccaccgctacata
 cggccactagcctggaggggcattcctgtggaggagaaggaacaaggccacttggccaatggggctctfac
 ttcactgcattccttgcaaaagtattacatcacgggggagcagaggggttccctgcccacgggtatcgcc
 gctgctcttagcaactggacagctgcccacaggccctggagggagcaatcaagtgaggactcagatg
 catccagcccggtctccaaactgctgatggcatgattttattatagcgggcccccaaggggcccccgcc
 acagatggctacgacacccctactacatggagcchcgcagaggtccaggccagggaaagatgctggct
 gttgcagcctcagctgctctccagcatagtggagcctatctccacagacagcctgctgctgctgccc
 tggtttggcagatgacacacagatggctccgggtccgagaggggcatccttaagcgaacacaga
 acagggaaaccagaccgctctccggagggccctcagttctgtcaggtcaatcccacatggat
 taccagttcattcag

FIG. 1

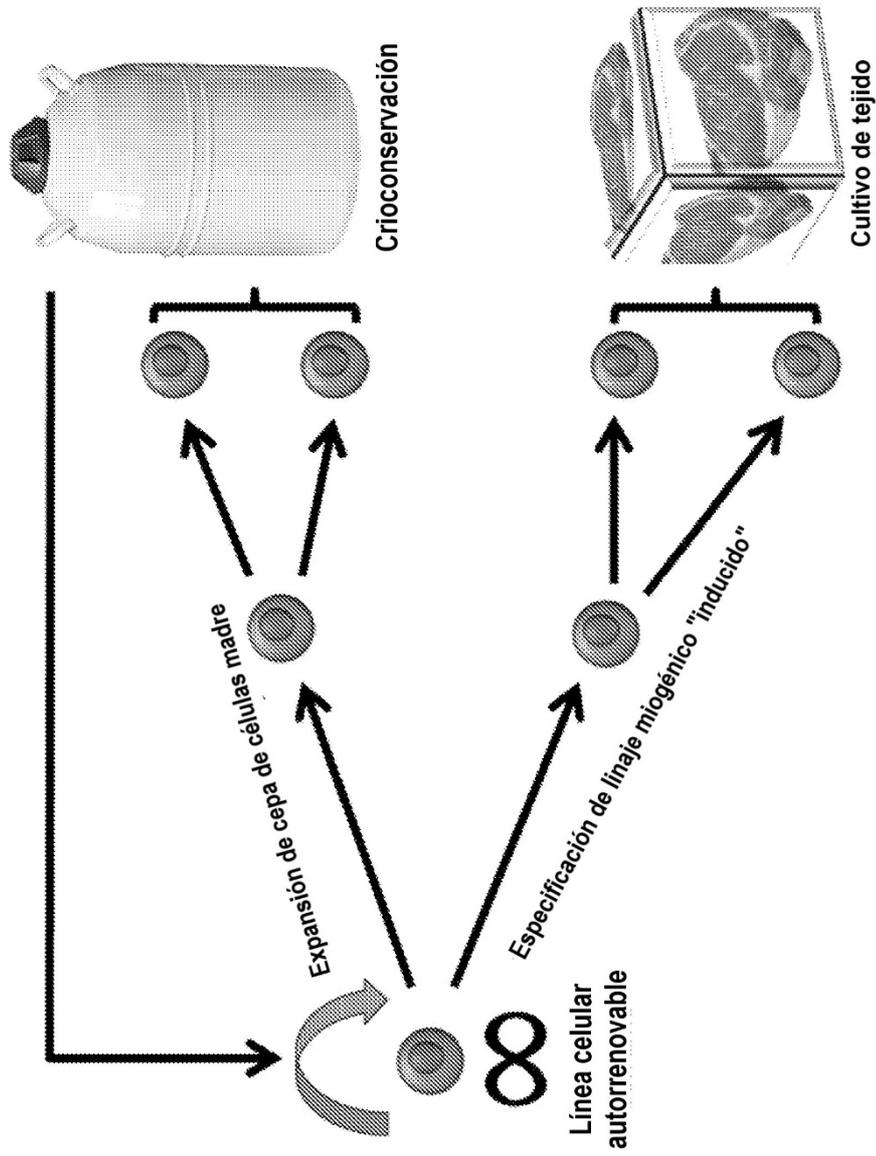
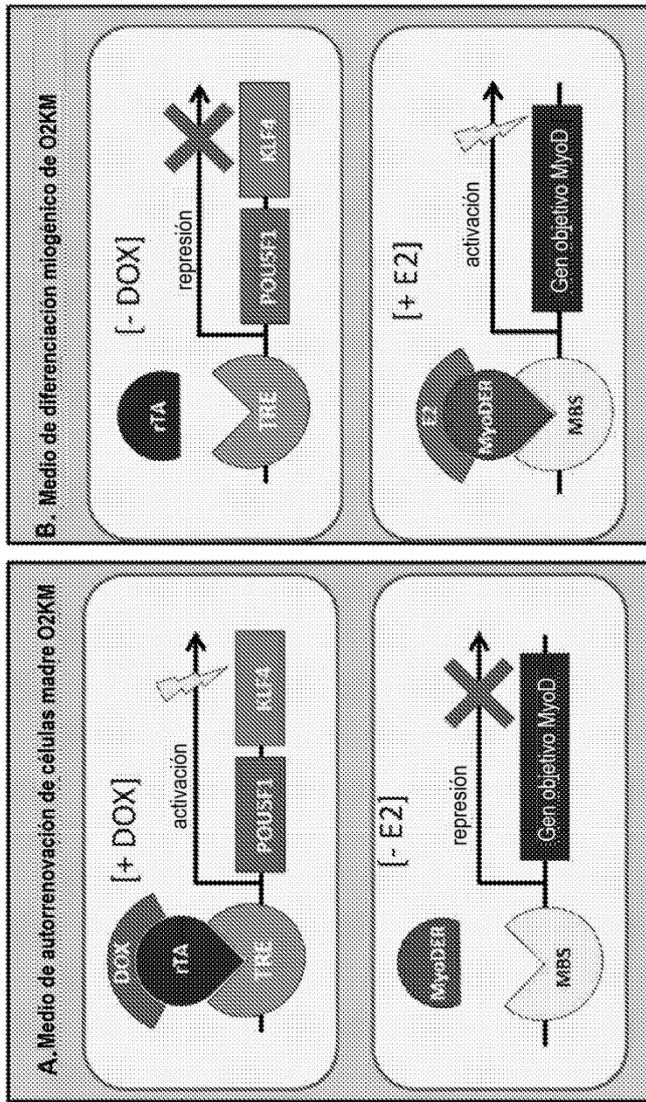


FIG. 2



DOX = Doxiciclina; E2 = 17 β -Estradiol; TRE = Elemento sensible a tetraciclina;
 rTA = transactivador de tetraciclina; MBS = sitio de unión a MyoD

FIG. 3

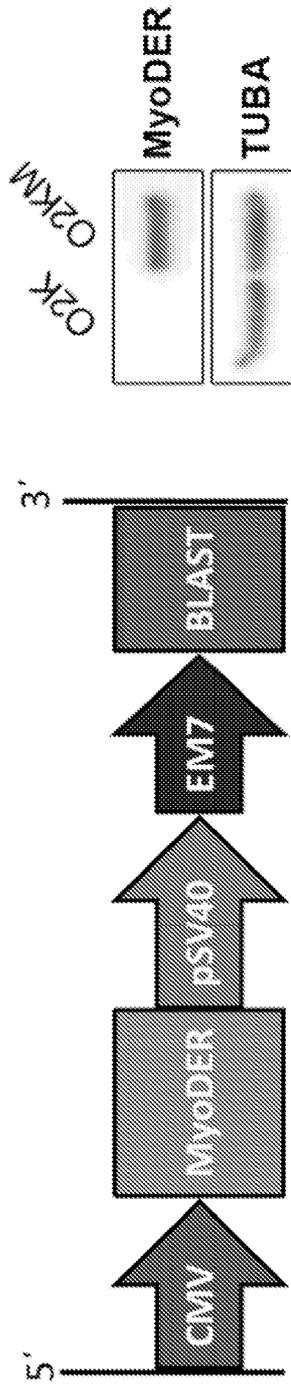


FIG. 4B

FIG. 4A

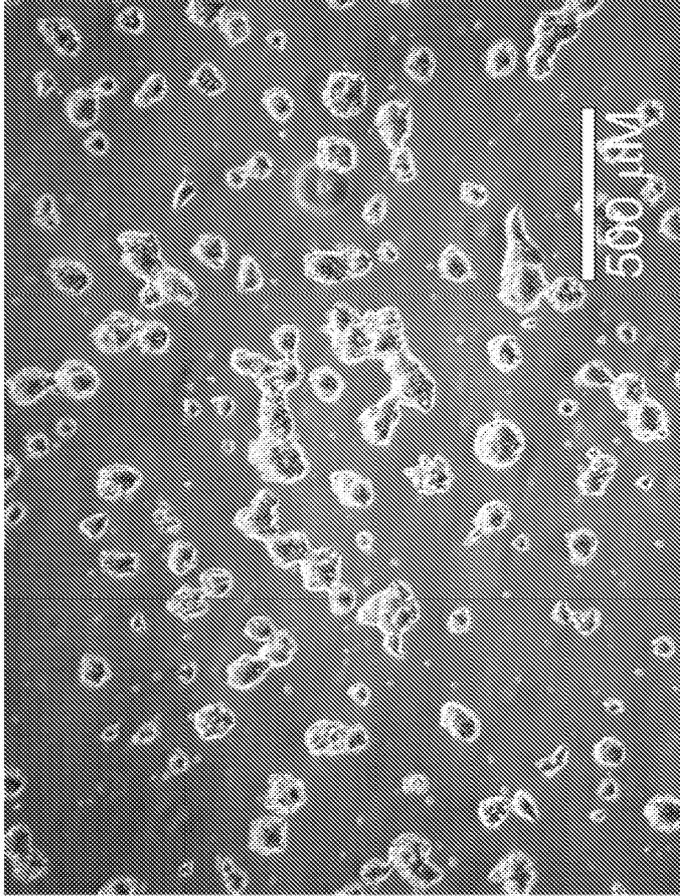


FIG. 5

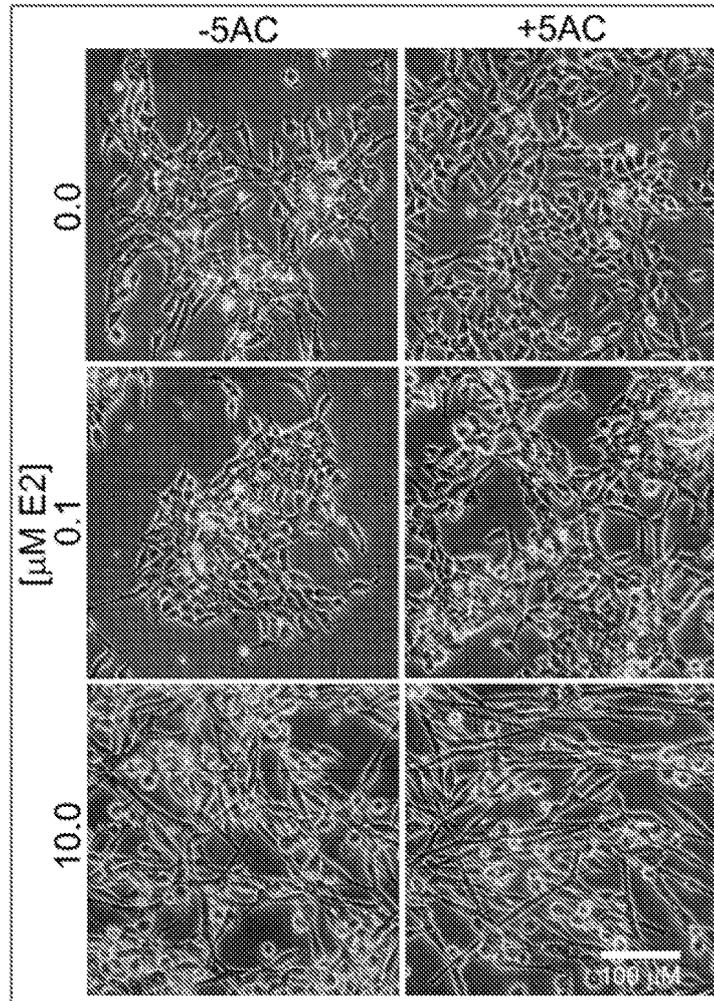


FIG. 6

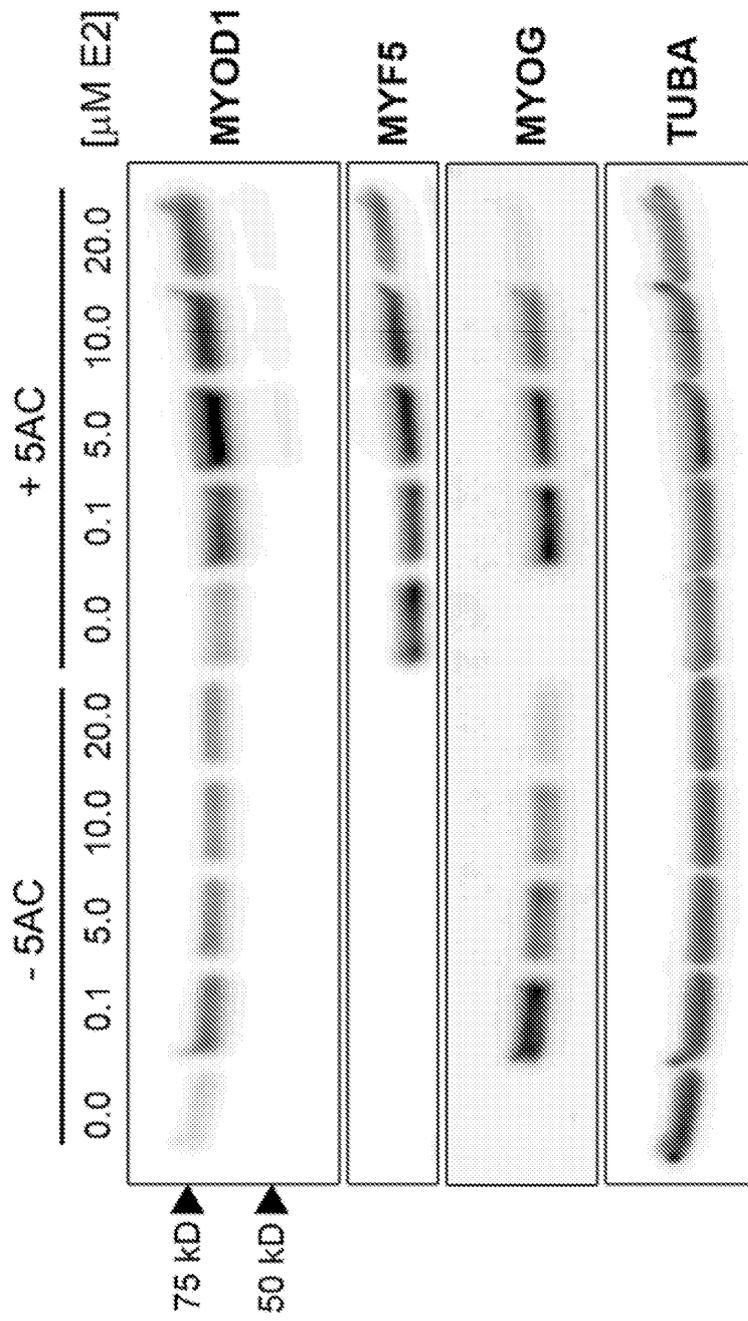


FIG. 7

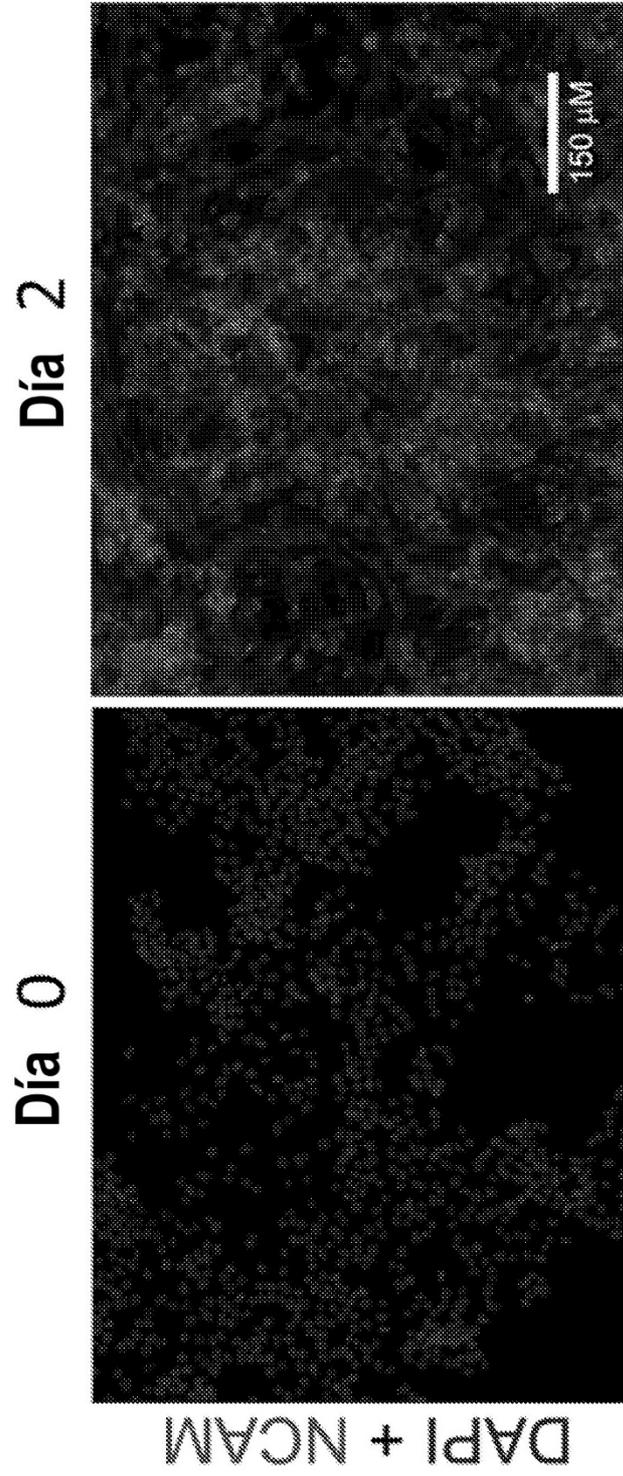


FIG. 8

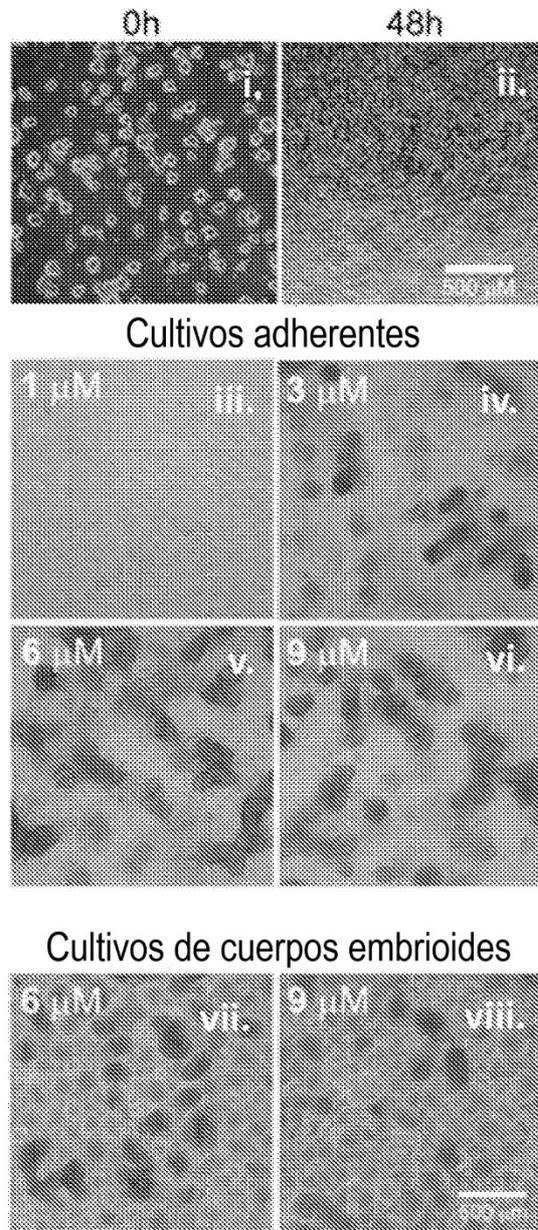


FIG. 9

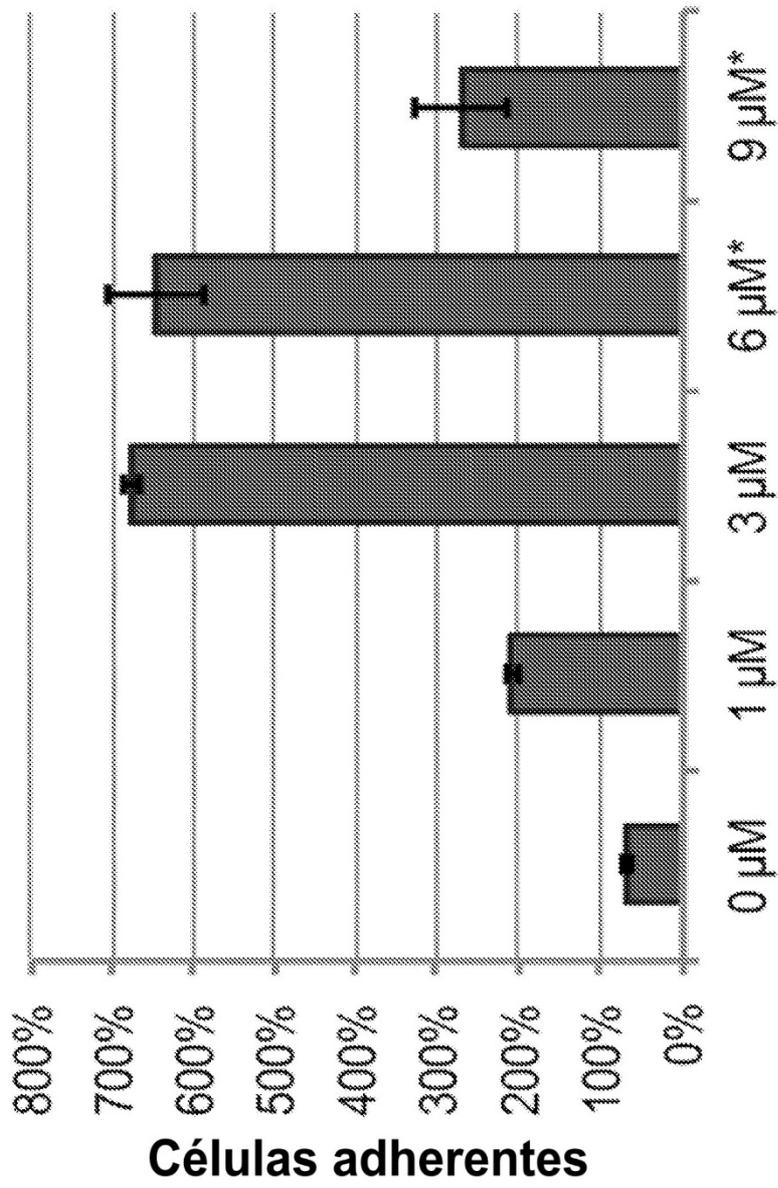


FIG. 10

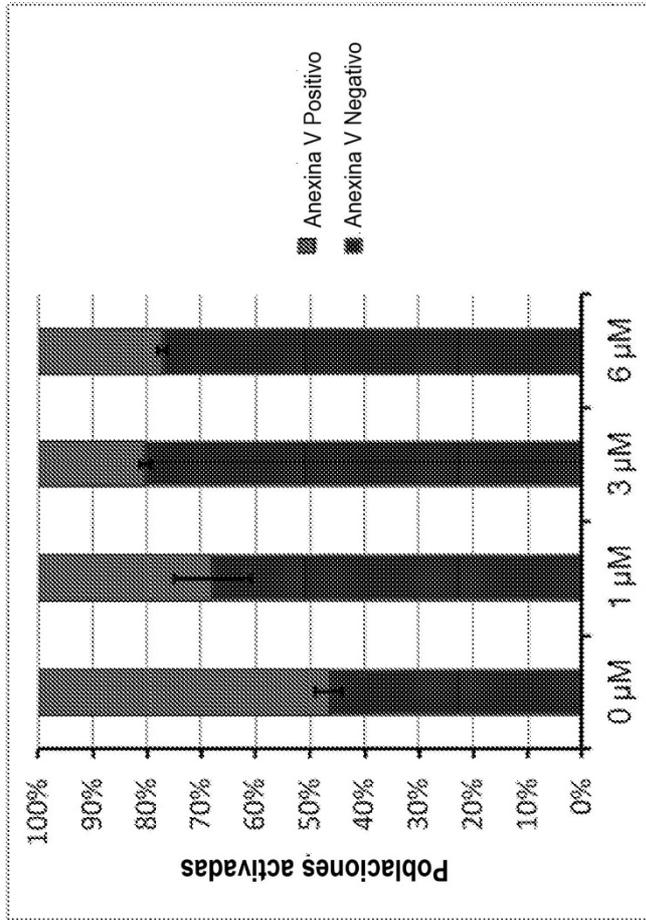


FIG. 11

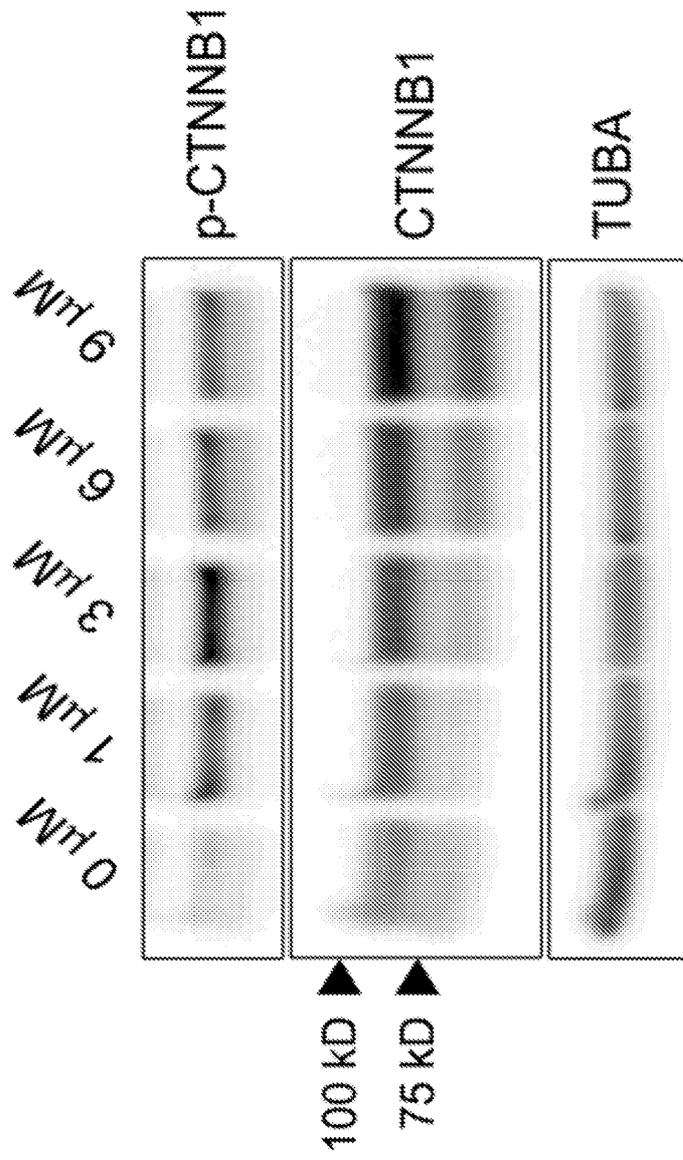


FIG. 12

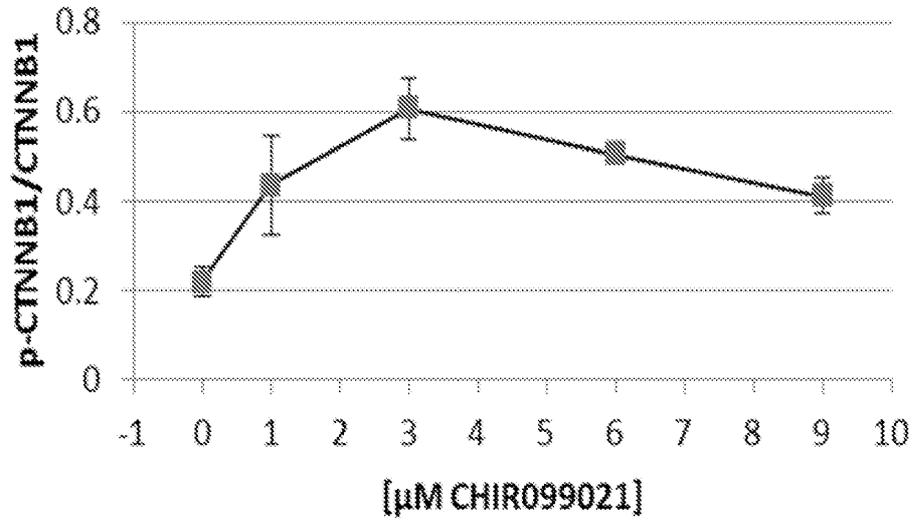


FIG. 13A

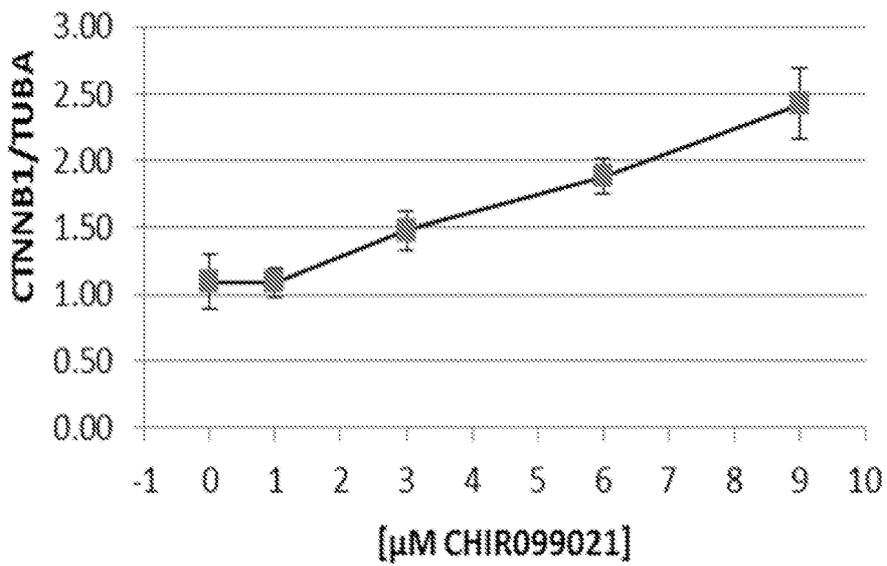


FIG. 13B

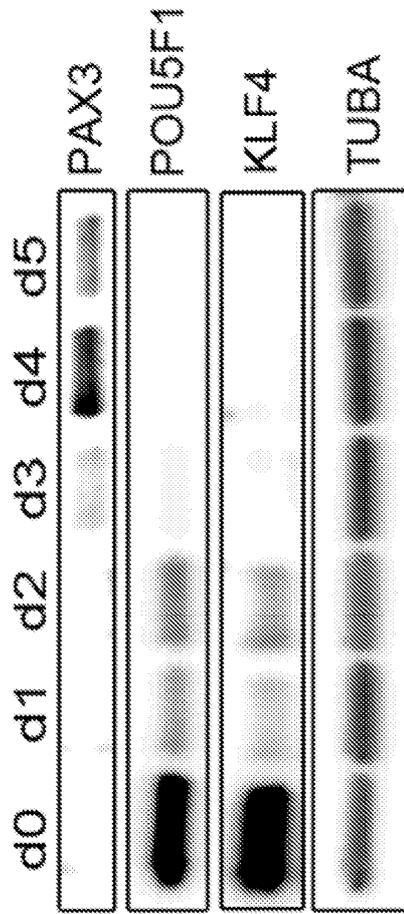


FIG. 14

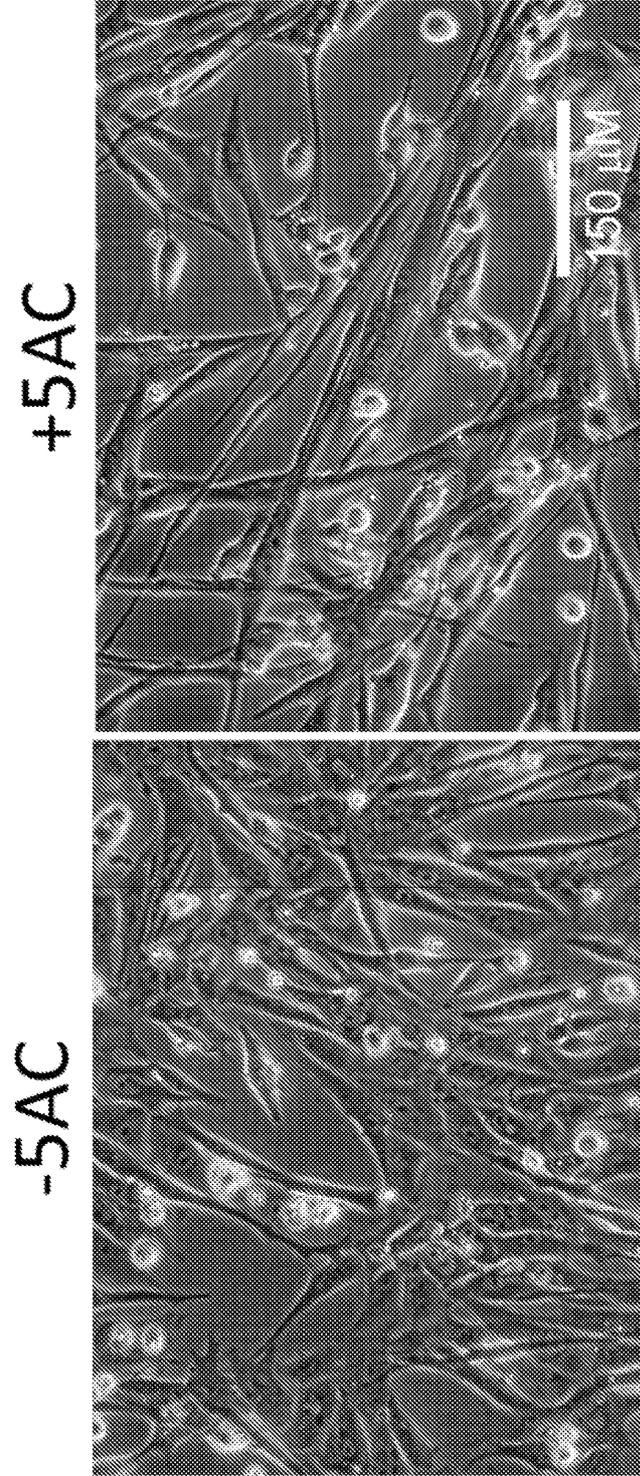


FIG. 15

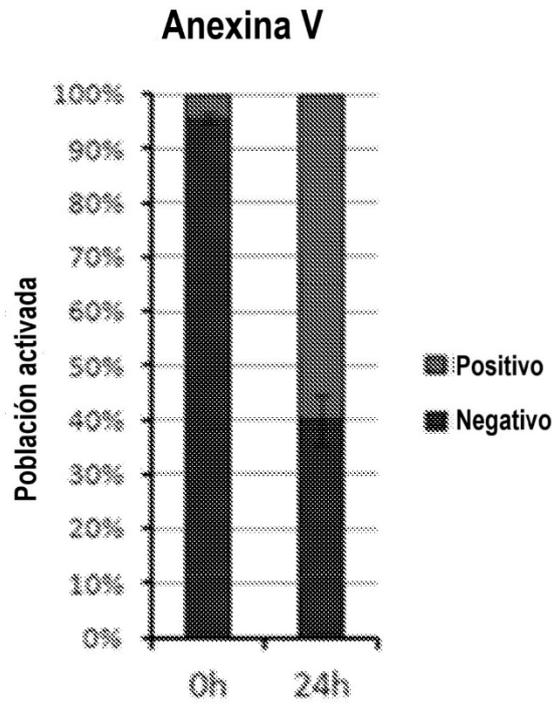


FIG. 16

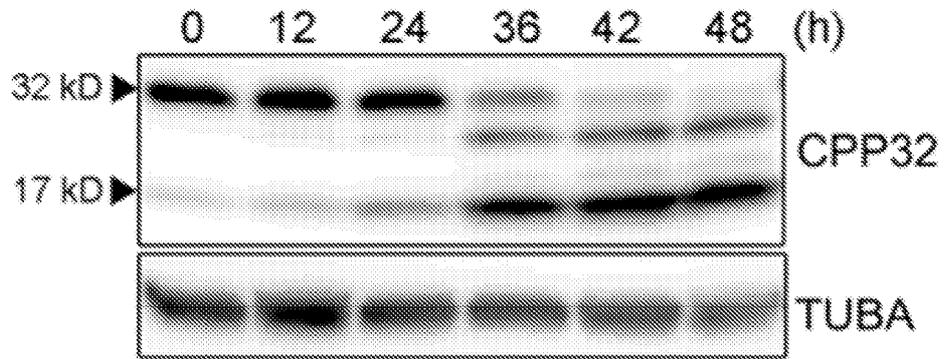


FIG. 17A

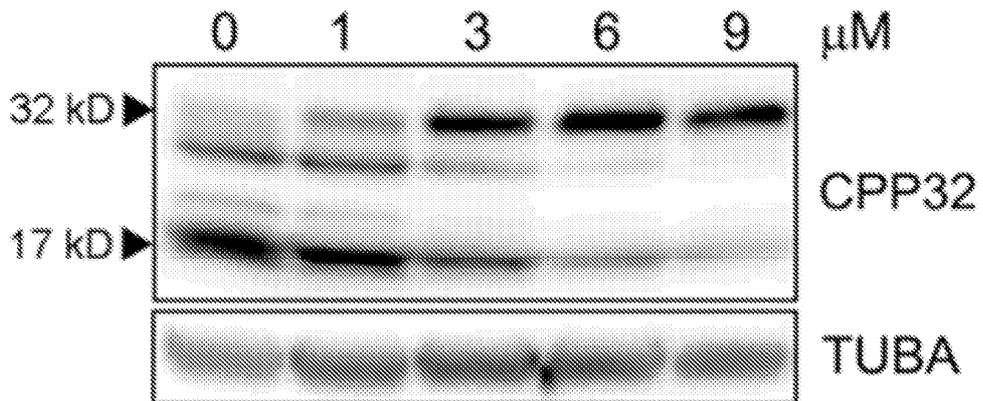


FIG. 17B

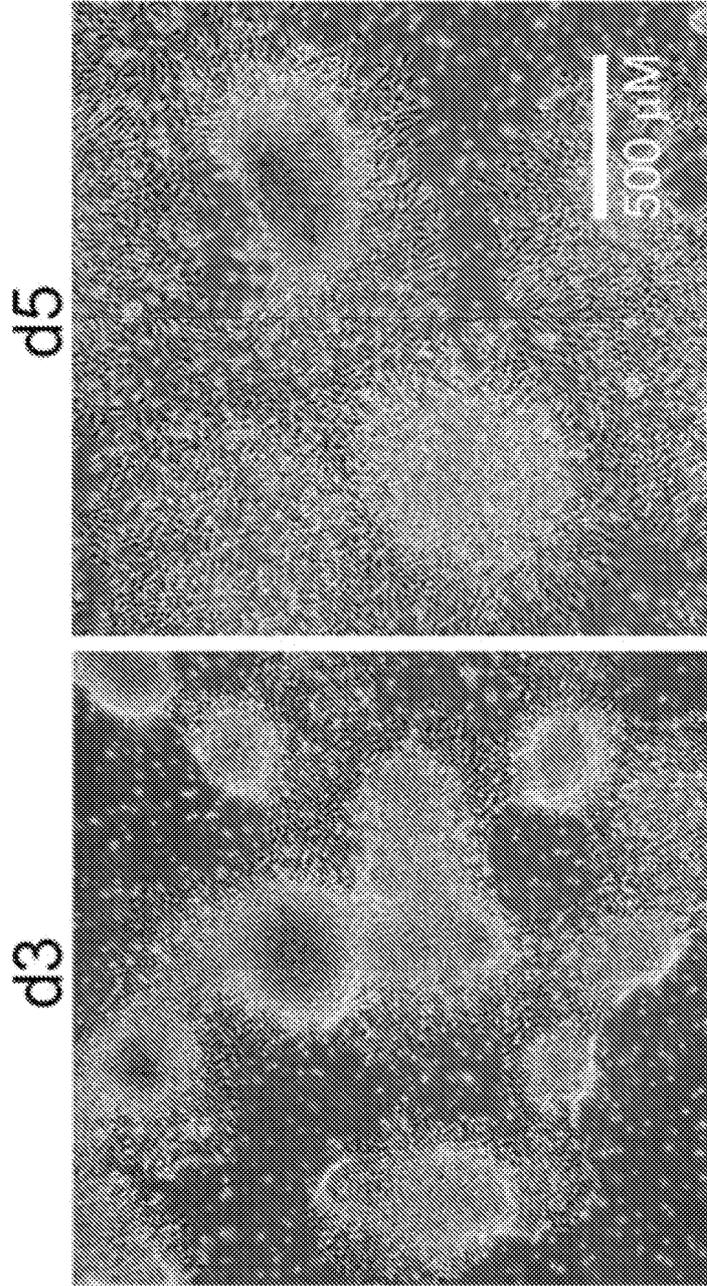


FIG. 18

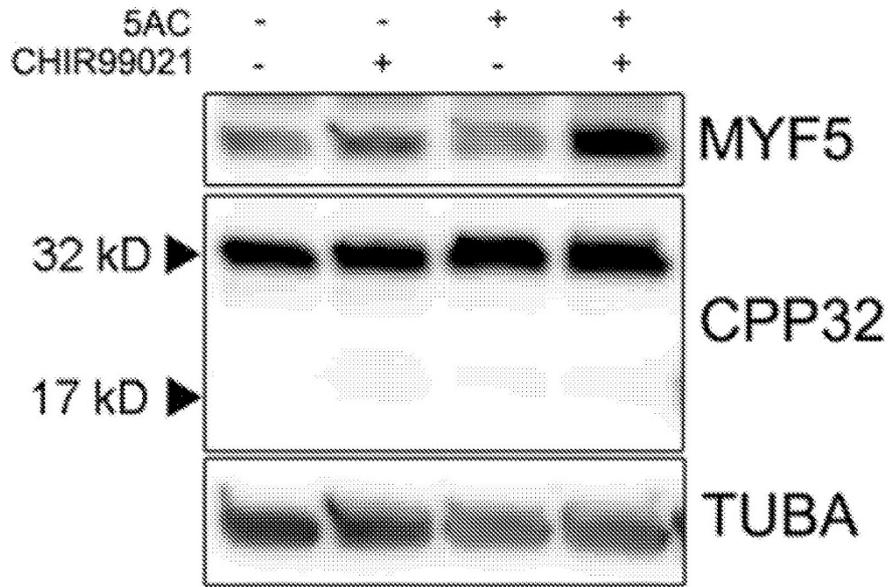


FIG. 19A

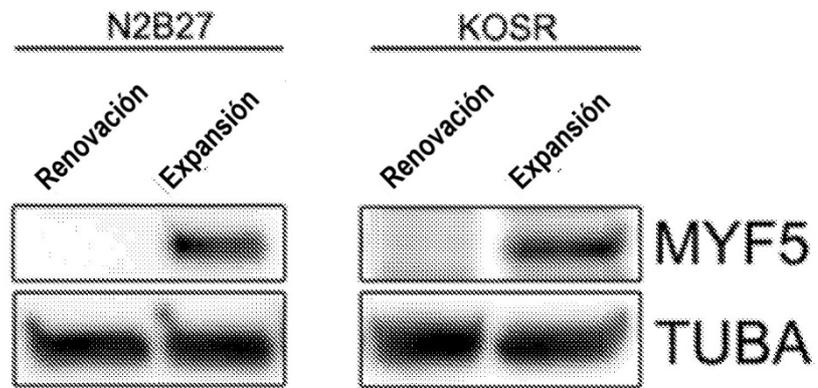


FIG. 19B

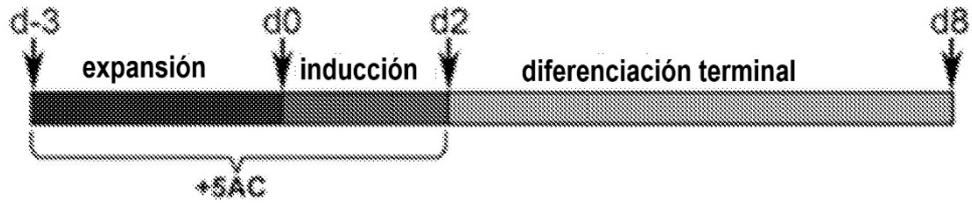


FIG. 20A

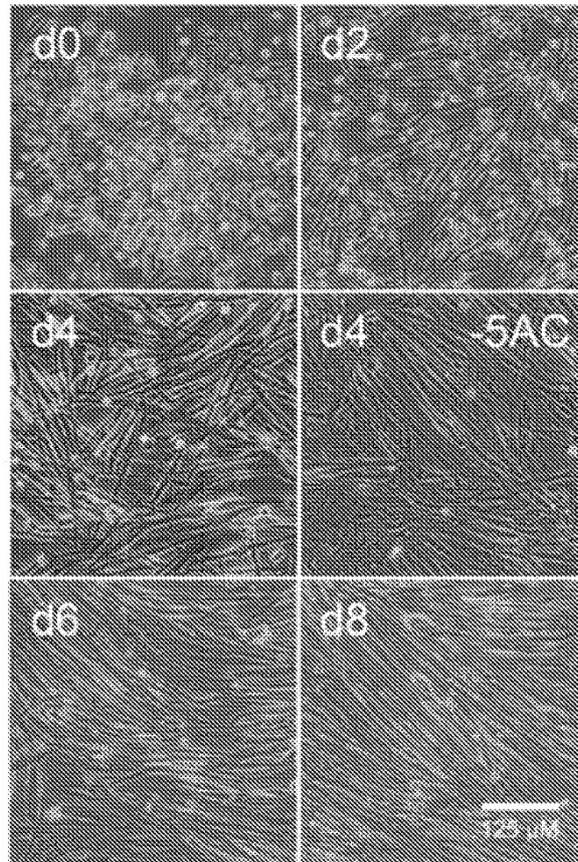


FIG. 20B

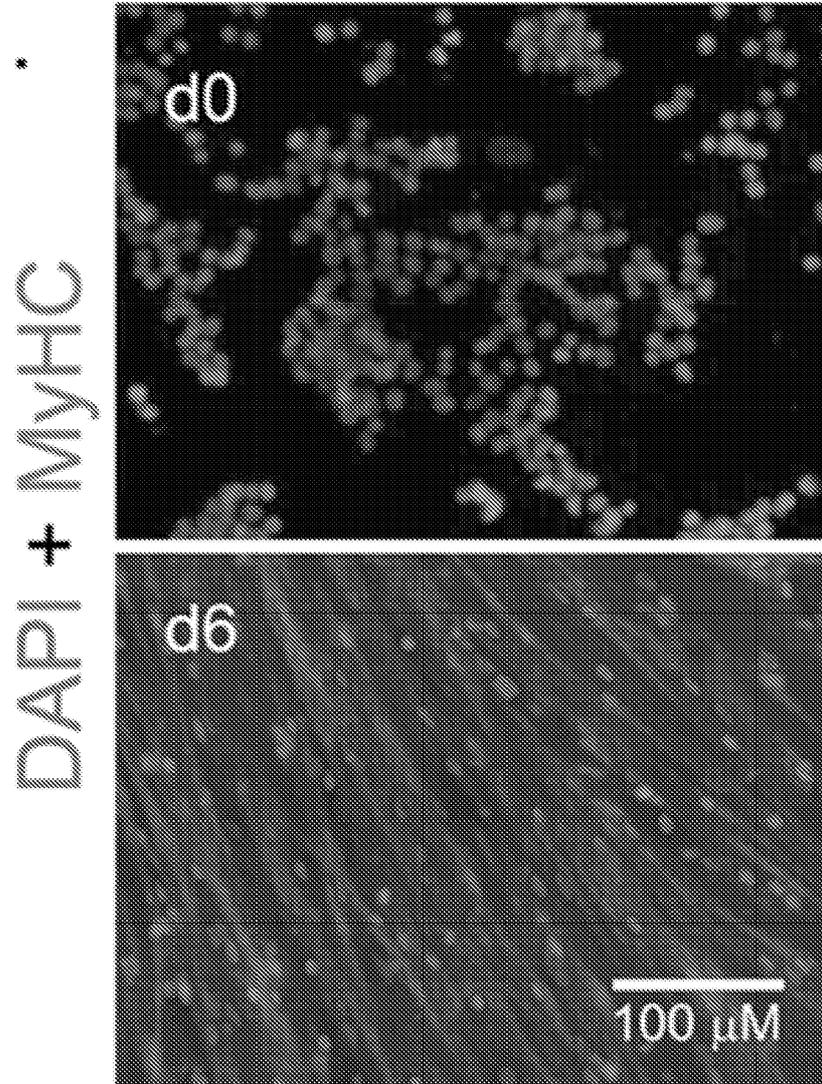


FIG. 20C

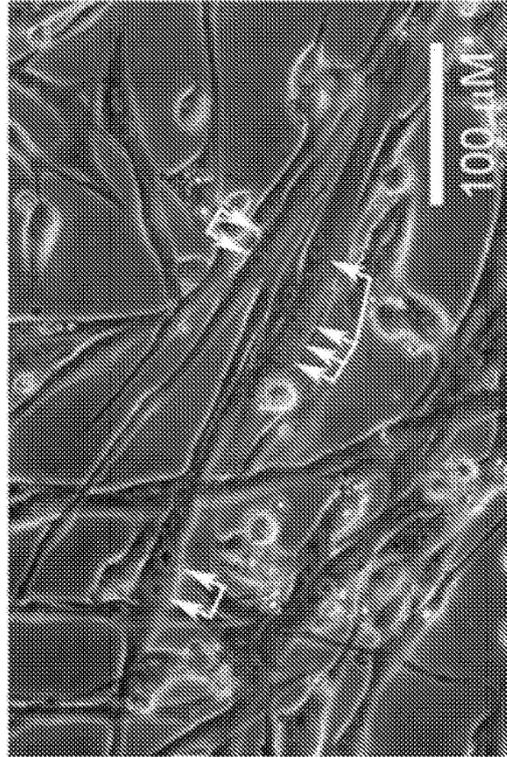
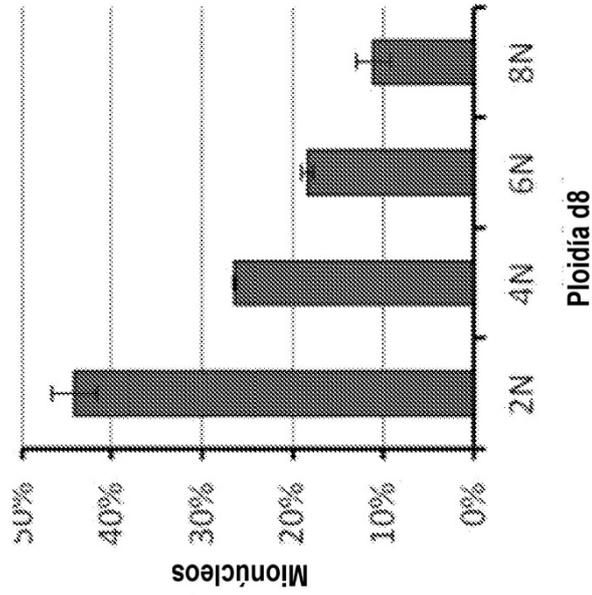


FIG. 20D

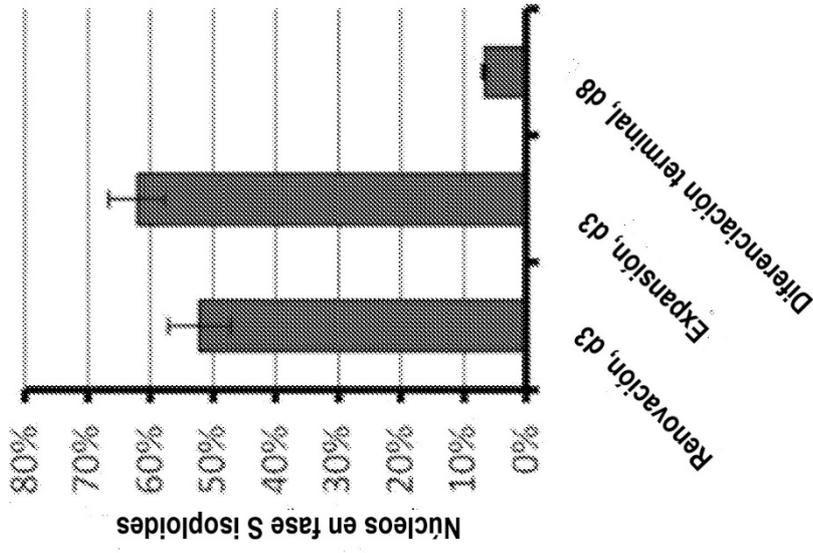


FIG. 20F

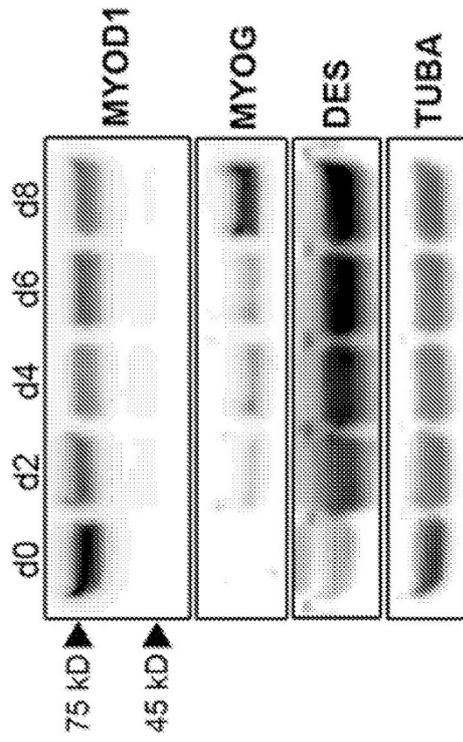


FIG. 20E

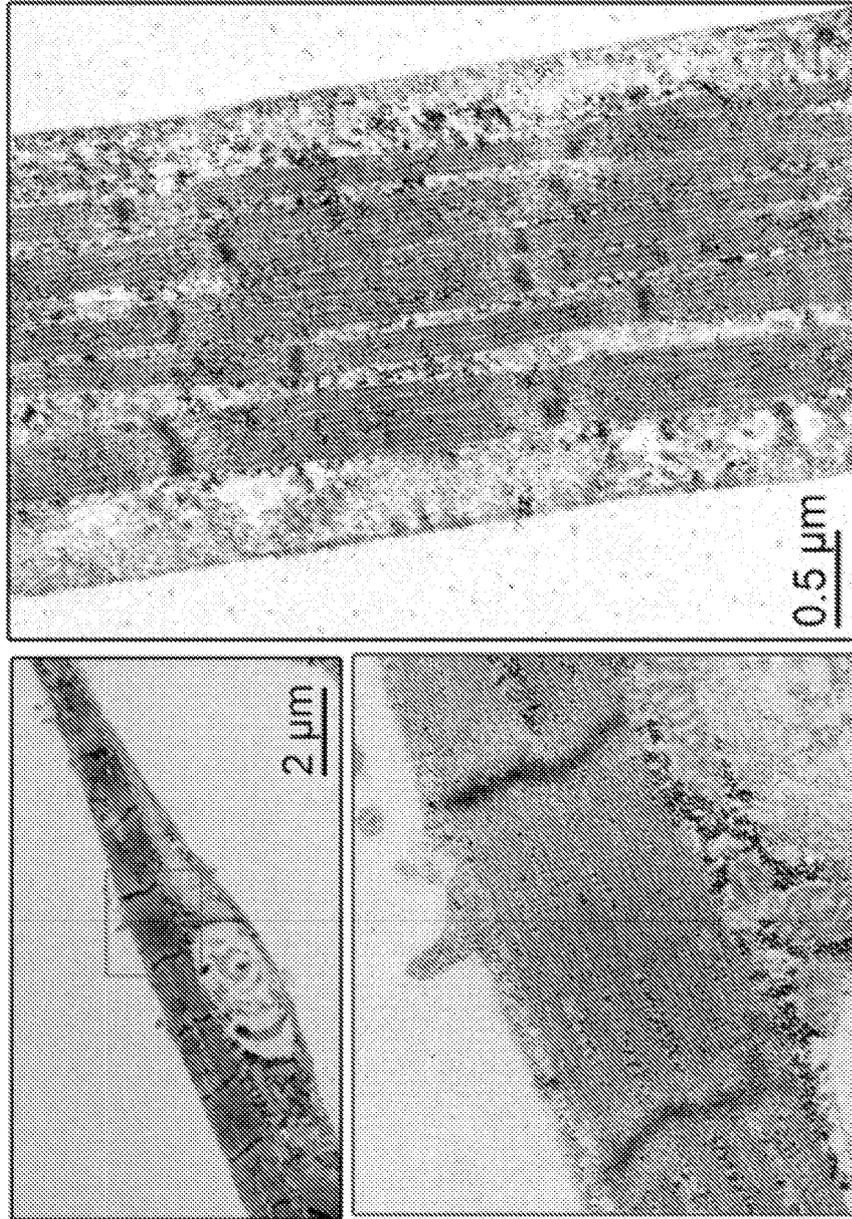


FIG. 20G

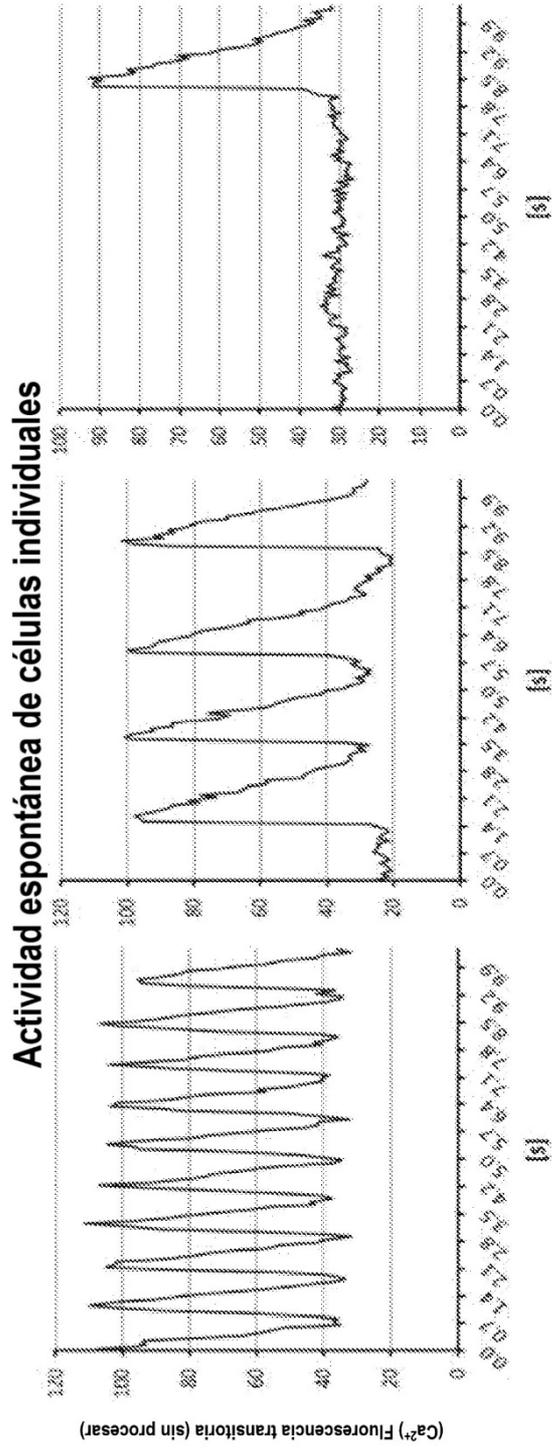


FIG. 21A

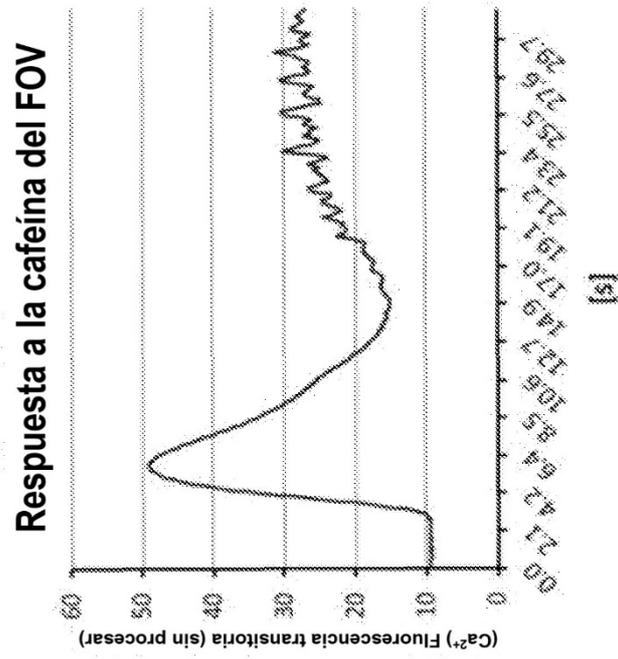


FIG. 21C

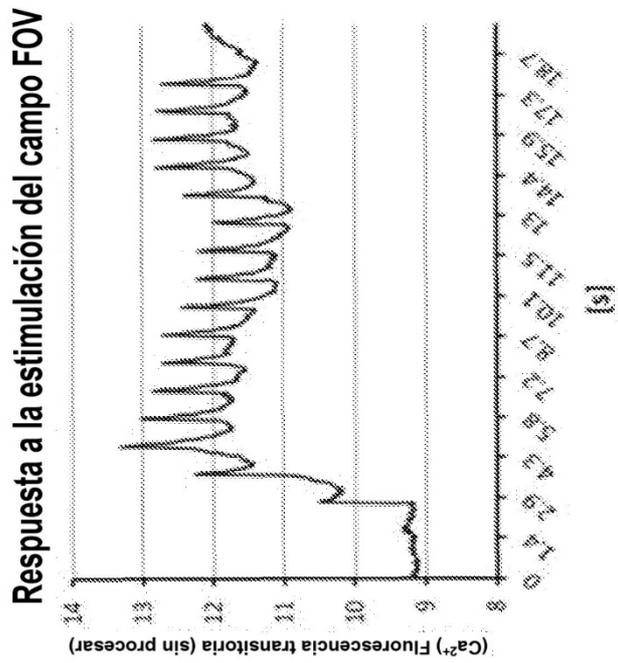


FIG. 21B

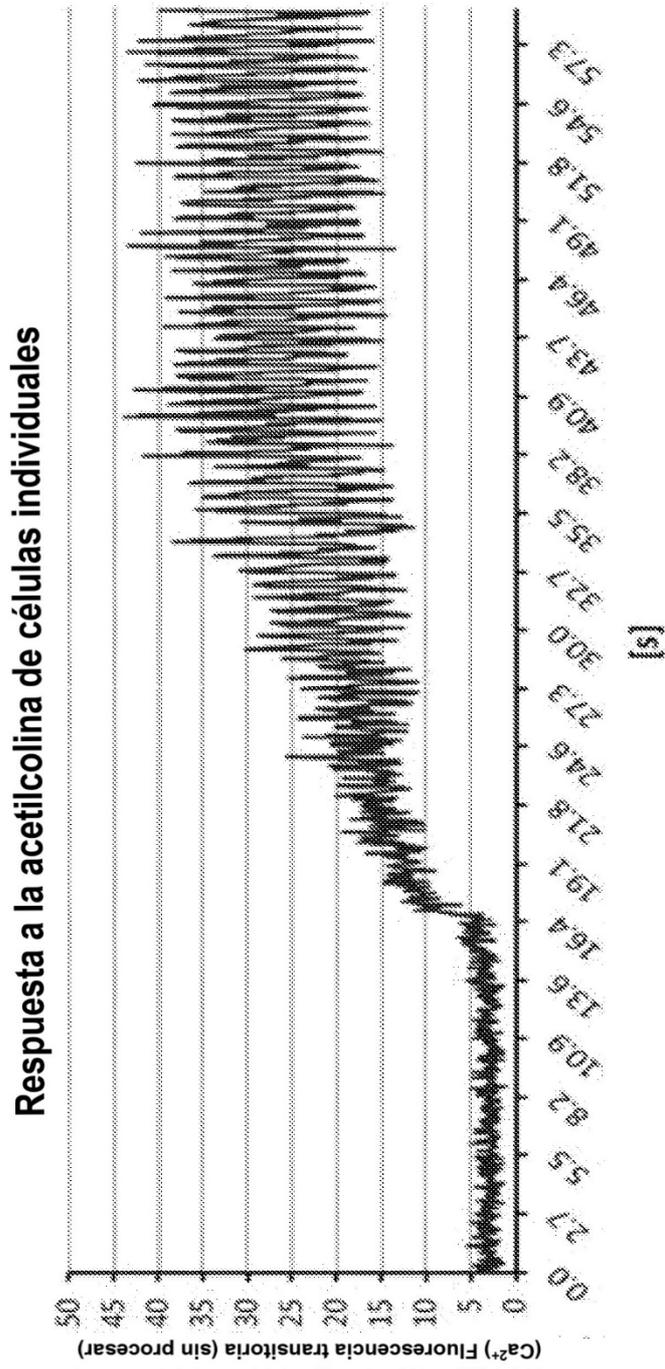


FIG. 21D