

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 706**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A23J 3/18 (2006.01)

A23J 3/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2021** **E 21156945 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025** **EP 4043551**

54 Título: **Medios nutritivos para cultivo celular que contiene hidrolizados de proteínas vegetales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2025

73 Titular/es:
BÜHLER AG (100.00%)
Gupfenstrasse 5
9240 Uzwil, CH

72 Inventor/es:
CORDESMEYER, FRANK;
O'NIEN, JAY y
CONDE-PETIT, BEATRICE

74 Agente/Representante:
DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 014 706 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

Medios nutritivos para cultivo celular que contiene hidrolizados de proteínas vegetales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a componentes nutricionales adecuados para el cultivo celular de células eucariotas. Estos componentes nutricionales se pueden preparar a partir de hidrolizados de proteínas de origen vegetal. La invención se refiere además a medios nutritivos que comprenden estos componentes nutricionales. Los medios nutritivos de la invención se pueden preparar reemplazando los componentes del suero, que son comunes en dichos medios, al menos parcialmente, por los componentes nutricionales de la invención. Los componentes nutricionales y los medios nutritivos de la invención son particularmente adecuados para su uso en la industria alimentaria, tal como en la producción de carne cultivada.

15 Antecedentes de la invención

Se han realizado intentos anteriores para usar material de origen vegetal como componentes para medios de cultivo celular.

El documento WO 98/15614 A1 describe formulaciones de medios de cultivo celular para el cultivo *in vitro* de células animales. Estas formulaciones de medios comprenden al menos un péptido derivado de plantas y/o al menos un lípido derivado de plantas y/o al menos un ácido graso derivado de plantas. El arroz, la soja, la patata y el maíz se denominan fuentes adecuadas de proteínas, péptidos, lípidos y/o ácidos grasos. El trigo se excluye específicamente como fuente de proteínas de origen vegetal. Los péptidos vegetales que se van a usar en las formulaciones del documento WO 98/15614 A1 se pueden preparar digiriendo extractos de plantas con enzimas tales como tripsina o quimotripsina. Los péptidos vegetales deben añadirse al medio basal en concentraciones de aproximadamente 10 a 1000 mg/litro.

El documento WO 03/045995 A2 describe la producción rentable de glicoproteínas recombinantes tales como la eritropoyetina humana utilizando un medio de cultivo exento de suero. El medio de cultivo comprende una peptona de origen vegetal. Los ejemplos del documento WO 03/045995 A2 muestran un medio de adaptación sin suero y un medio de producción sin suero. Cada uno de estos dos medios contiene un 0,25 % de peptona de soja.

El documento US 9.714.411 B2 describe medios de cultivo celular exentos de proteínas animales que comprenden poliaminas y un hidrolizado derivado de plantas y/o levaduras. La concentración total del hidrolizado proteico derivado de plantas y/o levaduras en el medio de cultivo celular es de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 5 % (p/v). El hidrolizado de proteínas de origen vegetal puede seleccionarse entre un hidrolizado de cereal y/o un hidrolizado de soja. El documento US 9.714.411 B2 define el término "hidrolizado" en relación con toda digestión enzimática de un extracto vegetal o de levadura.

El documento JP2013-247927 A describe que un extracto de salvado de arroz tiene una acción promotora del crecimiento celular, cuando se usa en un medio de cultivo celular. El extracto de salvado de arroz comprende preferiblemente el 50 % en masa o más de proteína. El extracto de salvado de arroz puede ser un producto fraccionado de peso molecular, preferiblemente en el intervalo entre 3 kDa y 10 kDa. En los ejemplos del documento JP2013-247927 A, se demostró que un extracto de salvado de arroz con un contenido de proteína del 55 % mejoraba la proliferación de las células CHO cuando se usaba en concentraciones de 0,1 o 0,3 g/L, mientras que se observaba citotoxicidad a una concentración de 1 g/L.

Jarunrattanasri y sus colaboradores estudiaron los componentes aromáticos presentes en la proteína de salvado de arroz, especialmente los componentes aromáticos presentes en la proteína vegetal parcialmente hidrolizada con ácido producida por hidrólisis parcial de la proteína de salvado de arroz (A. Jarunrattanasri et al. "Aroma Components of Acid-Hydrolyzed Vegetable Protein Made by Partial Hydrolysis of Rice Bran Protein" J. Agric. Food Chem. 2007, 55(8):3044-3050).

Hansawasdi y sus colaboradores examinaron los posibles efectos prebióticos de las mezclas de oligosacáridos procedentes de la hidrólisis ácida del salvado de arroz y la pulpa de yuca (C. Hansawasdi et al. "Potential Prebiotic Oligosaccharide Mixtures from Acidic Hydrolysis of Rice Bran and Cassava Pulp" Plants Food Hum. Nut. 2017, 72(4):396-403).

Terada y sus colegas describen un suplemento de cultivo extraído del salvado de arroz para el cultivo sin suero de células de mamíferos (S. Terada et al. "Culture supplement extracted from rice bran for better serum-free culture" BMC Proceedings 2013, 7(Suppl 6):P104). El salvado de arroz se extrajo en una solución alcalina y después se precipitó con ácido.

Los inventores del documento WO 2011/111920 A1 describen una valoración de los hidrolizados de arroz como suplementos de cultivo celular. Los hidrolizados de arroz se prepararon mediante hidrólisis enzimática.

La solicitud de patente US 2006/286668 A1 se refiere a un medio de cultivo celular desprovisto de proteínas animales y que comprende al menos un péptido de origen no animal o vegetal. La solicitud se refiere además a un medio de cultivo celular desprovisto de proteínas animales y que comprende al menos un lípido o ácido graso de origen no animal o vegetal.

Problemas técnicos subyacentes a la presente invención

En la actualidad, los medios nutritivos para el cultivo celular son una mezcla de aproximadamente 20 a 60 ingredientes puros y de alta calidad. El elevado número y la alta pureza de los ingredientes hacen que dichos medios nutritivos sean muy caros.

Cuando se utilizan medios nutritivos en la industria alimentaria, especialmente cuando se produce carne cultivada, es deseable utilizar ingredientes menos costosos. Por motivos éticos y de seguridad, también es conveniente evitar los ingredientes de origen animal.

En el estado de la técnica, los hidrolizados de origen vegetal se usaban como aditivos para los medios de cultivo celular. Sin embargo, en el estado de la técnica, solo se usaban pequeñas cantidades de extractos de origen vegetal para complementar los medios de cultivo celular; p. ej., solo hasta 1000 mg/L (= 1 g/L) en el documento WO 98/15614 A1; aproximadamente un 0,25 % de peptona de soja (= 2,5 g/L) en el documento WO 03/045995 A2; en el documento JP2013-247927 se usaron entre 0,1 y 0,3 g/L de un extracto de salvado de arroz rico en proteínas. Además, los extractos de origen vegetal utilizados en el estado de la técnica se obtuvieron a partir de proteínas vegetales aisladas o de material vegetal rico en proteínas, que se pueden agrupar como material de corriente alimentaria primaria.

Los presentes inventores han demostrado ahora por primera vez que los componentes de los medios nutritivos se pueden preparar usando hidrolizados de proteínas de origen vegetal que se produjeron a partir de material de la corriente alimentaria secundaria, es decir, material que tiene un valor económico más bajo que el material de la corriente alimentaria primaria.

La nueva composición que contiene hidrolizados de origen vegetal preparados a partir de una corriente alimentaria secundaria es mucho más barata que los ingredientes medios del estado de la técnica. Estas nuevas composiciones pueden usarse como componentes del medio y apoyan el crecimiento de células eucariotas, e incluso pueden usarse en la producción de carne cultivada. Además, los componentes y composiciones de la presente invención pueden usarse para el cultivo celular a escala industrial.

Este resumen no describe necesariamente todas las ventajas logradas y todos los problemas resueltos por la presente invención.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de un hidrolizado de origen vegetal adecuado para el cultivo celular de células eucariotas, obteniéndose dicho hidrolizado de proteínas de origen vegetal a partir de material de corriente alimentaria secundaria, que comprende las etapas:

(a) proporcionar un material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria, donde el material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria se obtiene del salvado de arroz, donde dicho material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria tiene un contenido de proteínas que varía del 5 % al 25 % (p/p de materia seca) y tiene un contenido de fibra que varía del 1 % al 30 % (p/p de materia seca);

(b) añadir una solución concentrada de HCl al material de origen vegetal, donde la concentración de HCl esté en el intervalo de 0,2 M a 1 M, preparando así una mezcla de ácido y material;

(c) incubar la mezcla de la etapa (b) a una temperatura en el intervalo entre 70 °C y 90 °C durante un período de tiempo de entre 15 horas y 36 horas, preparando así un hidrolizado de ácido;

(d) añadir una solución alcalina al hidrolizado de ácido de la etapa (c) en una cantidad suficiente para neutralizar el hidrolizado de ácido;

(e) centrifugar el hidrolizado de ácido neutralizado de la etapa (d) para precipitar el material insoluble;

(f) recuperar el sobrenadante de la centrifugación de la etapa (e); y

(g) filtrar el sobrenadante recuperado en la etapa (f) a través de un filtro estéril o una combinación de filtros estériles, obteniendo de este modo el hidrolizado de origen vegetal adecuado para el cultivo celular de células eucariotas.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un hidrolizado de origen vegetal que se puede obtener mediante el método del primer aspecto.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición adecuada para su uso como componente medio que apoya el crecimiento de células eucariotas, comprendiendo la composición:

- (i) un primer hidrolizado de origen vegetal que se puede obtener mediante el método del primer aspecto; y
- (ii) una premezcla de calidad alimentaria que comprende uno o más minerales, una o más vitaminas, uno o más aminoácidos y/o una o más sales;

donde dicha composición está desprovista de proteínas animales.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para cultivar células, que comprende las etapas.

- (a) disolver la composición según el tercer aspecto en un disolvente acuoso estéril, preparando así una solución de un hidrolizado vegetal;
- (b) añadir sales, tampones, fuentes de energía (por ejemplo, glucosa), oligoelementos, aminoácidos esenciales y/o factores de crecimiento a la solución de la etapa (a), preparando así un medio de cultivo;
- (c) inocular el medio de cultivo de la etapa (b) con células apropiadas, donde las células apropiadas se seleccionan del grupo que consiste en células miosatélite, células estromales mesenquimales, células fibroblásticas, células musculares, células madre y células madre pluripotentes inducidas (iPSC); y
- (d) cultivar el medio de cultivo inoculado de la etapa (c) a una temperatura apropiada durante un período de tiempo apropiado, cultivando así las células.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de la composición del tercer aspecto, que comprende la(s) etapa(s):

- mezclar un hidrolizado de origen vegetal que se puede obtener mediante el método del primer aspecto con una premezcla de calidad alimentaria y, opcionalmente, con un hidrolizado de origen vegetal preparado a partir de material de corriente alimentaria primaria mediante hidrólisis ácida.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Antes de describir la presente invención en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. Salvo que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la materia.

Como se usa en el presente documento, la expresión material de “corriente alimentaria primaria” se refiere a material vegetal que es adecuado para el consumo humano. Este material se caracteriza por un alto contenido de proteínas (al menos un 30 % (p/p de materia seca) pero normalmente al menos un 50 % (p/p de materia seca)) y un bajo contenido de fibra (un 5 % o menos (p/p de materia seca), pero normalmente un 1 % o menos (p/p de materia seca)). Los ejemplos de material de corriente alimentaria primaria incluyen, sin limitación, material rico en proteínas derivado de semillas de soja, habas, trigo (por ejemplo, gluten de trigo), arroz, guisantes, patatas o semillas de algodón.

Como se usa en el presente documento, la expresión material de “corriente alimentaria secundaria” se refiere al material vegetal que generalmente no se usa para el consumo humano. El material de corriente alimentaria secundaria se usa principalmente como alimento para animales, como fertilizante o simplemente se quema. En comparación con el material de corriente alimentaria primaria, el material de corriente alimentaria secundaria tiene un contenido de proteínas más bajo (del 4 % al 35 % y, por lo general, del 10 % al 30 % (p/p de materia seca)) y un mayor contenido de fibra (del 1 % al 50 % y, por lo general, del 10 % al 20 % (p/p de materia seca)). Los ejemplos de material de corriente alimentaria secundaria incluyen, sin limitación, salvado de arroz, salvado de arroz desgrasado, salvado de trigo, salvado de centeno, salvado de maíz, salvado de espelta o grano usado de cerveza.

En el contexto de la presente invención, un “factor de crecimiento” se refiere a una proteína o un péptido que promueve la proliferación de células eucariotas en el cultivo celular. Los ejemplos de factores de crecimiento utilizables en la presente invención incluyen, sin limitación, la insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF).

Como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a valores numéricos que oscilan entre el 5 % por debajo del valor numérico indicado y el 5 % por encima del valor numérico indicado. Por ejemplo, un contenido de proteína de “aproximadamente el 10 % (p/p de materia seca)” abarca un contenido de proteína que varía del 9,5 % (p/p de materia seca) a aproximadamente el 10,5 % (p/p de materia seca). Como ejemplo adicional, una temperatura de “aproximadamente 80 °C” se refiere a un intervalo de temperatura entre 76 °C y 84 °C.

Realizaciones de la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle. En los siguientes pasajes se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- (i) un primer hidrolizado de origen vegetal que se puede obtener mediante el método del primer aspecto; y
- (ii) una premezcla de calidad alimentaria que comprende uno o más minerales, una o más vitaminas, uno o más aminoácidos y/o una o más sales;

donde dicha composición está desprovista de proteínas animales.

En una realización preferida del tercer aspecto, el material de corriente alimentaria secundaria tiene un contenido de proteína que varía del 6 % al 25 %, preferiblemente del 7 % al 25 %, preferiblemente del 8 % al 25 %, preferiblemente del 9 % al 25 %, preferiblemente del 10 % al 25 %, preferiblemente del 11 % al 25 %, preferiblemente del 12 % al 25 %, preferiblemente del 13 % al 25 %, preferiblemente del 14 % al 25 % y, con máxima preferencia, del 15 % al 25 % (p/p de materia seca).

En una realización preferida del tercer aspecto, el material de corriente alimentaria secundaria tiene un contenido de fibra que varía del 2 % al 30 %, preferiblemente del 3 % al 30 %, preferiblemente del 4 % al 30 %, preferiblemente del 5 % al 30 % y, con máxima preferencia, del 6 % al 25 % (p/p de materia seca).

En todas las realizaciones del tercer aspecto, el material de corriente alimentaria secundaria es o se prepara a partir de salvado de arroz.

En el presente documento también se describen, pero no se reivindican, composiciones en las que el material de corriente alimentaria secundaria es o se prepara a partir de salvado de trigo, salvado de centeno, salvado de maíz, salvado de espelta o grano usado de cerveza.

En una realización preferida del tercer aspecto, el material de corriente alimentaria secundaria es o se prepara a partir de

- salvado de arroz con un contenido de proteínas comprendido entre el 5 % y el 20 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra comprendido entre el 2 % y el 30 % (p/p de materia seca).

En el presente documento se describen además, pero no se reivindican, composiciones en las que el material de corriente alimentaria secundaria es o se prepara a partir de

- salvado de trigo con un contenido de proteína en el intervalo de aproximadamente el 12 % a aproximadamente el 24 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 % (p/p de materia seca); o

- salvado de centeno con un contenido de proteína en el intervalo de aproximadamente el 12 % a aproximadamente el 20 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 30 % (p/p de materia seca); o

- salvado de maíz con un contenido de proteína en el intervalo de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 25 % (p/p de materia seca); o

- salvado de espelta con un contenido de proteína en el intervalo de aproximadamente el 12 % a aproximadamente el 24 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 16 % (p/p de materia seca); o

- cereales usados de cerveza con un contenido de proteínas en el intervalo de aproximadamente el 16 % a aproximadamente el 35 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 25 % (p/p de materia seca).

- 5 En una realización preferida del tercer aspecto, el primer hidrolizado de origen vegetal está presente en la composición en una concentración en el intervalo del 0,1 % al 50 % (p/p).

En una realización preferida del tercer aspecto,

- 10 - los uno o más minerales en la premezcla de calidad alimentaria se seleccionan del grupo que consiste en Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} ;

- las una o más vitaminas en la premezcla de calidad alimentaria se seleccionan del grupo que consiste en ácido ascórbico, biotina, colina, pantotenato D-cálcico, ácido fólico, niacinamida, piridoxina, piridoxal, riboflavina, tiamina, vitamina B12 e i-inositol;

- 15 - los uno o más aminoácidos en la premezcla de calidad alimentaria se seleccionan del grupo que consiste en glicina, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspartico, L-cisteína, L-cistina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina; y/o

- 20 - las una o más sales en la premezcla de calidad alimentaria se seleccionan del grupo que consiste en NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 y $NaHCO_3$.

- 25 En una realización preferida del tercer aspecto, la premezcla de calidad alimentaria está presente en la composición en una concentración en el intervalo del 10 % al 99,9 % (p/p).

En una realización preferida del tercer aspecto, la composición comprende además:

- 30 (iii) un segundo hidrolizado de origen vegetal preparado a partir del material de la corriente alimentaria primaria mediante hidrólisis ácida, en el que dicho material de la corriente alimentaria primaria tiene un contenido de proteína de al menos el 30 % (p/p de materia seca) de proteína y un contenido de fibra del 5 % (p/p de materia seca) o menos.

- 35 En una realización preferida del tercer aspecto, el material de corriente alimentaria primaria tiene un contenido de proteínas de al menos el 32 %, preferiblemente al menos el 34 %, preferiblemente al menos el 36 %, preferiblemente al menos el 38 %, preferiblemente al menos el 40 %, preferiblemente al menos el 42 %, preferiblemente al menos el 44 %, preferiblemente al menos el 46 %, preferiblemente al menos el 48 y, con máxima preferencia, al menos el 50 % (p/p de materia seca).

- 40 En una realización preferida del tercer aspecto, el material de corriente alimentaria primaria tiene un contenido de fibra del 4 % (p/p de materia seca) o menos, preferiblemente del 3 % (p/p de materia seca) o menos, preferiblemente del 2 % (p/p de materia seca) o menos, y, con máxima preferencia, del 1 % (p/p de materia seca) o menos.

- 45 En una realización preferida del tercer aspecto, el segundo hidrolizado de origen vegetal preparado a partir de material de corriente alimentaria primaria se ha preparado a partir de semillas de soja, habas, trigo, arroz, guisantes, patatas o algodón.

- 50 En una realización preferida del tercer aspecto, el segundo hidrolizado de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria primaria está presente en una concentración en el intervalo del 0,1 % al 50 % (p/p).

- 55 En una realización preferida del tercer aspecto, el segundo hidrolizado de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria primaria se preparó aplicando el método del primer aspecto. Esto significa que se proporciona un material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria primaria, tal como se definió anteriormente, y que luego se llevan a cabo las etapas (b) a (g) del método del primer aspecto.

- 60 En algunas realizaciones de la invención, la composición según el tercer aspecto se usa como sustituto del medio de cultivo celular. Se puede preparar una solución acuosa de la composición según el tercer aspecto, obteniendo de este modo un medio de origen vegetal. Este medio de origen vegetal se puede usar para reemplazar parcialmente un medio de cultivo celular estándar. Por ejemplo, de aproximadamente 100 mL a aproximadamente 500 mL (preferiblemente de aproximadamente 150 mL a aproximadamente 450 mL, preferiblemente de aproximadamente 200 mL a aproximadamente 400 mL, más preferiblemente de aproximadamente 250 mL a aproximadamente 350 mL, incluso más preferiblemente de aproximadamente 300 mL) se retiran de 1 L de un medio de cultivo celular estándar y el mismo volumen del medio de origen vegetal que el volumen que se retiró se añade al volumen restante del medio de cultivo celular estándar como reemplazo. Por ejemplo, se retiran 300 mL de 1 L de un medio de cultivo celular estándar y se
- 65 añaden 300 mL del medio de origen vegetal a los 700 mL restantes como reemplazo.

En otras realizaciones de la invención, la composición según el tercer aspecto se usa como material de partida para la preparación de un medio de cultivo celular. A continuación, se pueden añadir otros componentes (sales, tampón, fuentes de energía (por ejemplo, glucosa), oligoelementos, aminoácidos esenciales, factores de crecimiento). La osmolalidad y el pH se pueden ajustar. Un experto en la materia sabrá bien qué componentes adicionales, qué pH y qué osmolalidad serán adecuados para promover el crecimiento de las células eucariotas.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para cultivar células, que comprende las etapas:

(a) disolver la composición según el tercer aspecto en un disolvente acuoso estéril, preparando así una solución de un hidrolizado vegetal;

(b) añadir sales, tampones, fuentes de energía (por ejemplo, glucosa), oligoelementos, aminoácidos esenciales y/o factores de crecimiento a la solución de la etapa (a), preparando así un medio de cultivo;

(c) inocular el medio de cultivo de la etapa (b) con células apropiadas, donde las células apropiadas se seleccionan del grupo que consiste en células miosatélite, células estromales mesenquimales, células fibroblásticas, células musculares, células madre y células madre pluripotentes inducidas (iPSC); y

(d) cultivar el medio de cultivo inoculado de la etapa (c) a una temperatura apropiada durante un período de tiempo apropiado, cultivando así las células.

En una realización preferida del cuarto aspecto, el disolvente acuoso estéril se selecciona del grupo que consiste en agua, tampón de fosfato y una solución de cloruro de sodio.

En una realización preferida del cuarto aspecto, las células apropiadas son células bovinas, células porcinas o células de pollo.

En algunas realizaciones en las que las células madre son células madre embrionarias humanas, es obligatorio que estas células madre embrionarias humanas se preparen mediante un proceso que no requiera la destrucción del embrión humano.

Un experto en la técnica de producir carne cultivada sabrá muy bien qué intervalos de temperatura y qué períodos de tiempo son necesarios para obtener carne cultivada, teniendo en cuenta el tipo de células y la cantidad de células utilizadas para la inoculación.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de un hidrolizado de origen vegetal adecuado para el cultivo celular de células eucariotas, obteniéndose dicho hidrolizado de proteínas de origen vegetal a partir de una corriente alimentaria secundaria, que comprende las etapas:

(a) proporcionar un material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria, donde el material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria se obtiene del salvado de arroz, donde dicho material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria tiene un contenido de proteínas que varía del 5 % al 25 % (p/p de materia seca) y tiene un contenido de fibra que varía del 1 % al 30 % (p/p de materia seca);

(b) añadir una solución concentrada de HCl al material de origen vegetal, donde la concentración de HCl esté en el intervalo de 0,2 M a 1 M, preparando así una mezcla de ácido y material;

(c) incubar la mezcla de la etapa (b) a una temperatura en el intervalo entre 70 °C y 90 °C durante un período de tiempo de entre 15 horas y 36 horas, preparando así un hidrolizado de ácido;

(d) añadir una solución alcalina al hidrolizado de ácido de la etapa (c) en una cantidad suficiente para neutralizar el hidrolizado de ácido;

(e) centrifugar el hidrolizado de ácido neutralizado de la etapa (d) para precipitar el material insoluble;

(f) recuperar el sobrenadante de la centrifugación de la etapa (e); y

(g) filtrar el sobrenadante recuperado en la etapa (f) a través de un filtro estéril o una combinación de filtros estériles, obteniendo de este modo el hidrolizado de origen vegetal adecuado para el cultivo celular de células eucariotas.

En una realización preferida del primer aspecto, el material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria tiene un contenido de proteínas que varía del 6 % al 25 %, preferiblemente del 7 % al 25 %, preferiblemente del 8 % al 25 %, preferiblemente del 9 % al 25 %, preferiblemente del 10 % al 25 %, preferiblemente del 11 % al 25 %, preferiblemente del 12 % al 25 %, preferiblemente del 13 % al 25 %, preferiblemente del 14 % al 25 % y, con máxima preferencia, del 15 % al 25 % (p/p de materia seca).

- 5 En una realización preferida del primer aspecto, el material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria tiene un contenido de fibra que oscila entre el 2 % y el 30 %, preferiblemente entre el 3 % y el 30 %, preferiblemente entre el 4 % y el 30 %, preferiblemente entre el 5 % y el 30 % y, con máxima preferencia, entre el 6 % y el 25 % (p/p de materia seca).
- 10 En todas las realizaciones del primer aspecto, el material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria es o se obtiene de salvado de arroz.
- 10 En el presente documento se describen además, pero no se reivindican, métodos en los que el material de corriente alimentaria secundaria es o se prepara a partir de salvado de trigo, salvado de centeno, salvado de maíz, salvado de espelta o grano usado de cerveza.
- 15 En una realización preferida del primer aspecto, el material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria es o se prepara a partir de
- salvado de arroz con un contenido de proteínas comprendido entre el 5 % y el 20 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra comprendido entre el 2 % y el 30 % (p/p de materia seca).
- 20 En el presente documento se describen además, pero no se reivindican, métodos en los que el material de la corriente alimentaria secundaria es o se prepara a partir de
- salvado de trigo con un contenido de proteína en el intervalo de aproximadamente el 12 % a aproximadamente el 24 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 % (p/p de materia seca); o
 - salvado de centeno con un contenido de proteína en el intervalo de aproximadamente el 12 % a aproximadamente el 20 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 30 % (p/p de materia seca); o
 - salvado de maíz con un contenido de proteína en el intervalo de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 25 % (p/p de materia seca); o
 - salvado de espelta con un contenido de proteína en el intervalo de aproximadamente el 12 % a aproximadamente el 24 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 16 % (p/p de materia seca); o
 - cereales usados de cerveza con un contenido de proteínas en el intervalo de aproximadamente el 16 % a aproximadamente el 35 % (p/p de materia seca) y un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 25 % (p/p de materia seca).
- 45 En una realización preferida del primer aspecto, la concentración de HCl está en el intervalo de 0,3 M a 1 M, más preferiblemente en el intervalo de 0,4 M a aproximadamente 0,75 M, y, con máxima preferencia, a aproximadamente 0,5 M.
- 50 En una realización preferida del primer aspecto, la incubación de la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo entre 71 °C y 89 °C, preferiblemente a una temperatura en el intervalo entre 72 °C y 88 °C, preferiblemente a una temperatura en el intervalo entre 73 °C y 87 °C, preferiblemente a una temperatura en el intervalo entre 74 °C y 86 °C, preferiblemente a una temperatura en el intervalo entre 75 °C y 85 °C, preferiblemente a una temperatura en el intervalo entre 76 °C y 84 °C, preferiblemente a una temperatura en el intervalo entre 77 °C y 83 °C, preferiblemente a una temperatura en el intervalo entre 78 °C y 82 °C, preferiblemente a una temperatura en el intervalo entre 79 °C y 81 °C, y, con máxima preferencia, a aproximadamente 80 °C.
- 55 En una realización preferida del primer aspecto, la etapa (c) se lleva a cabo durante un período de tiempo entre 18 horas y 30 horas, y, con máxima preferencia, durante aproximadamente 24 horas.
- 60 En una realización preferida del primer aspecto, la etapa (e) se lleva a cabo durante aproximadamente de 5 min a aproximadamente 20 min a aproximadamente de 4000 a 6000 x g, preferiblemente durante aproximadamente 10 min a 15 min a aproximadamente de 4500 a aproximadamente 5500 x g; con máxima preferencia durante aproximadamente 10 min a aproximadamente 5250 x g.
- 65 En una realización preferida del primer aspecto, el filtro estéril es un filtro con un tamaño de poro de 50 µm o menos, preferiblemente de 20 µm o menos, más preferiblemente de 10 µm o menos, e incluso más preferiblemente, de 0,2 µm o menos.

En las realizaciones preferidas del primer aspecto, se usan varias etapas de filtración con tamaños de poro cada vez más pequeños; por ejemplo, una primera etapa de filtración con un filtro que tiene un tamaño de poro de 50 µm o menos, una segunda etapa de filtración con un filtro que tiene un tamaño de poro de 20 µm o menos, una tercera etapa de filtración con un filtro que tiene un tamaño de poro de 10 µm o menos, y una cuarta etapa de filtración con un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,2 µm o menos.

Como se ha indicado anteriormente, el método del primer aspecto y sus realizaciones preferidas también son adecuados para producir un hidrolizado de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria primaria cuando se usa un material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria primaria como material de partida.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un hidrolizado de origen vegetal que se puede obtener mediante el método del primer aspecto.

En una realización preferida del segundo aspecto, el hidrolizado de origen vegetal se ha obtenido mediante el método del primer aspecto.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de la composición del tercer aspecto, que comprende la(s) etapa(s):

- mezclar un hidrolizado de origen vegetal que se puede obtener mediante el método del primer aspecto con una premezcla de calidad alimentaria y, opcionalmente, con un hidrolizado de origen vegetal preparado a partir de material de corriente alimentaria primaria mediante hidrólisis ácida.

En una realización preferida del quinto aspecto, el hidrolizado de origen vegetal preparado a partir de una corriente alimentaria secundaria se obtuvo mediante el método del primer aspecto.

En las realizaciones preferidas del quinto aspecto, el material de la corriente alimentaria secundaria es como se define en las realizaciones del tercer aspecto.

En una realización preferida del quinto aspecto, la premezcla de calidad alimentaria se define como en las realizaciones del tercer aspecto de la invención.

En las realizaciones preferidas del quinto aspecto, el material de corriente alimentaria primaria es como se define en las realizaciones del tercer aspecto.

Las siguientes figuras y ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la invención tal como se indica en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un experimento de cultivo celular con células CHO. Las células CHO se cultivaron en un medio de referencia o en un medio en el que los componentes del medio de referencia se reemplazaron por un hidrolizado de salvado de arroz desgrasado (RBD) (contenido de proteína del 20 %). Se probaron dos lotes diferentes de hidrolizado de RBD. En cada día de cultivo, se registraron la densidad de células viables (en 10⁶ células/mL) y la viabilidad de las células para cada experimento.

Ejemplos

1. Hidrólisis ácida de material vegetal

El material vegetal (ya fuera de la corriente alimentaria primaria o de la corriente alimentaria secundaria) se hidrolizó usando el siguiente protocolo:

- Se añadieron 5 g de material vegetal a un matraz vacío de 100 ml.
- Se añadieron 50 ml de HCl 0,5 M al material vegetal.
- La mezcla de material vegetal y HCl se mezcló y se incubó a 80 °C durante aproximadamente 24 horas.
- Se añadieron diferentes soluciones de NaOH lenta y consecutivamente hasta alcanzar un pH de 7,0: En primer lugar, se añadió una solución de NaOH 5 M hasta que se alcanzó un pH de aproximadamente 5; después se añadió una solución de NaOH 1 M hasta que se alcanzó un pH de aproximadamente 6; finalmente, se añadió una solución de NaOH 0,1 M hasta alcanzar un pH de 7,0.
- La mezcla neutralizada se transfirió a un nuevo matraz de 100 ml.

- Se añadió agua destilada hasta un volumen total de 100 mL.

- El matraz se cerró con una tapa y se agitó. La temperatura se ajustó a 20 °C.

5 • La mezcla se transfirió a tubos de centrifugación (2 tubos con un tamaño de 50 mL cada uno). Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min en una centrífuga Allegra X-15R (Beckman Coulter); correspondiente a 5250 x g.

10 • El sobrenadante se recolectó y se filtró a través de un filtro de teflón de 10 µm, obteniendo de este modo una solución estéril de hidrolizado vegetal.

Los hidrolizados vegetales se prepararon a partir de los siguientes materiales de partida (el contenido de proteína se indica entre paréntesis): salvado de centeno (17,1 %), salvado de trigo (14,3 %), habas (66 %), salvado de espelta (19,7 %), legía (21,2 %), salvado de arroz estabilizado (15,1 %) y salvado de arroz desgrasado (19,0 %).

15 El protocolo descrito anteriormente también se llevó a cabo a mayor escala, en la que todos los materiales se usaron en una cantidad de 50 veces:

20 • Se añadieron 250 g de material vegetal a un matraz vacío de 5 L.

- Se añadieron 2,5 L de HCl 0,5 M al material vegetal.

- La mezcla de material vegetal y HCl se mezcló y se incubó a 80 °C durante aproximadamente 24 horas.

25 • Se añadieron diferentes soluciones de NaOH lenta y consecutivamente hasta alcanzar un pH de 7,0: En primer lugar, se añadió una solución de NaOH 5 M hasta que se alcanzó un pH de aproximadamente 5; después se añadió una solución de NaOH 1 M hasta que se alcanzó un pH de aproximadamente 6; finalmente, se añadió una solución de NaOH 0,1 M hasta alcanzar un pH de 7,0.

30 • La mezcla neutralizada se transfirió a un nuevo matraz de 5 L.

- Se añadió agua destilada hasta un volumen total de 5 L.

35 • El matraz se cerró con una tapa y se agitó. La temperatura se ajustó a 20 °C.

- La mezcla se transfirió a tubos de centrifugación (8 tubos con un tamaño de 750 mL cada uno). Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 5250 x g.

40 • El sobrenadante se recolectó y se filtró a través de un filtro de teflón de 10 µm, obteniendo de este modo una solución estéril de hidrolizado vegetal.

2. Experimentos de cultivo celular

Materiales:

45 Células CHO-K1 Línea celular de ovario de hámster chino, subclón K1

Medio de referencia Medio SBF líquido, comercializado por Xell AG (Bielefeld, Alemania) bajo solicitud bajo el número de producto 2052-0001

50 Xell AG llevó a cabo experimentos de cultivo celular en sus fermentadores de Bielefeld como trabajo por contrato. Las células CHO-K1 se cultivaron en un medio de referencia o en un medio que contenía un sustituto con un hidrolizado de salvado de arroz desgrasado (RBD) (contenido de proteína del 20 %). Los hidrolizados de salvado de arroz desgrasado se habían preparado de acuerdo con el protocolo de hidrólisis ácida descrito en el ejemplo 1 anterior. Se probaron dos lotes diferentes de hidrolizado de RBD.

55 Las curvas de crecimiento para el medio de referencia 1:3 y para los dos experimentos con dos lotes separados de hidrolizado de RBD se muestran en la Figura 1. Medio de referencia 1:3 significa que 300 mL por 1 L de medio de referencia se reemplazaron por agua destilada. Tanto el RBD como el RBD1 se refieren a una composición de medio, en la que se añadieron 300 mL de medio de salvado de arroz desgrasado a 700 mL de medio de referencia. La concentración de glucosa en todas las variantes del medio se ajustó a 4,5 g/L (para RBD y RBD1) o 6,2 g/L (para la referencia 1:3), dependiendo de la concentración de glucosa de los materiales de calidad alimentaria utilizados. Se añadió glutamina hasta una concentración final de 6 mM. Las células se cultivaron en matraces de agitación simple de 125 mL con un volumen de trabajo de 50 mL (en curvas de crecimiento) en una incubadora a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 %.

Como puede verse en las curvas de crecimiento, los medios que contienen un sustituto del hidrolizado de RBD permiten el crecimiento de las células CHO. No se observó ningún efecto inhibidor ni citotoxicidad.

- 5 Sin embargo, la densidad celular máxima fue menor cuando se usó un medio que contenía un sustituto de hidrolizado de salvado de arroz (aproximadamente 4×10^6 células/mL para el primer lote; aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células/mL para el segundo lote) en comparación con el medio de referencia (5×10^6 células/mL). Además, la densidad celular máxima se alcanzó solo después de tiempos de cultivo más prolongados (el día 7 para el primer lote; el día 8 para el segundo lote) en comparación con el medio de referencia (el día 6).
- 10 En resumen, los resultados anteriores proporcionan una prueba de principio de que un hidrolizado a partir de salvado de arroz (es decir, de un material de corriente alimentaria secundaria) puede usarse como suplemento en los medios de cultivo celular y favorece el crecimiento de células eucariotas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de un hidrolizado de proteínas de origen vegetal adecuado para el cultivo celular de células eucariotas, obteniéndose dicho hidrolizado de proteínas de origen vegetal a partir de una corriente alimentaria secundaria, comprendiendo el método las etapas:
 - (a)proporcionar un material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria, donde el material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria se obtiene de salvado de arroz, donde dicho material de origen vegetal obtenido de la corriente alimentaria secundaria tiene un contenido de proteínas que varía del 5 % al 25 % (p/p de materia seca) y tiene un contenido de fibra que varía del 1 % al 30 % (p/p de materia seca);
 - (b)añadir una solución concentrada de HCl al material de origen vegetal, donde la concentración de HCl está en el intervalo de 0,2 M a 1 M, preparando de este modo una mezcla de ácido y material;
 - (c)incubar la mezcla de la etapa (b) a una temperatura en el intervalo entre 70 °C y 90 °C durante un período de tiempo de entre 15 horas y 36 horas, preparando de este modo un hidrolizado de ácido;
 - (d)añadir una solución alcalina al hidrolizado de ácido de la etapa (c) en una cantidad suficiente para neutralizar el hidrolizado de ácido;
 - (e)centrifugar el hidrolizado de ácido neutralizado de la etapa (d) para precipitar el material insoluble;
 - (f)recuperar el sobrenadante de la centrifugación de la etapa (e); y
 - (g)filtrar el sobrenadante recuperado en la etapa (f) a través de un filtro estéril o una combinación de filtros estériles, obteniendo de este modo el hidrolizado de proteínas de origen vegetal adecuado para el cultivo celular de células eucariotas.
2. El método según la reivindicación 1, donde la concentración de HCl está en el intervalo de 0,3 M a 0,75 M.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la etapa (c) se lleva a cabo
 - a una temperatura entre 75 °C y 85 °C, preferiblemente a 80 °C; y/o
 - durante un período de tiempo entre 18 horas y 30 horas, preferiblemente durante 24 horas.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la etapa (e) se lleva a cabo durante 5 a 20 minutos a 4000 a 6000 x g.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el filtro estéril es un filtro con un tamaño de poro de 50 µm o menos.
6. Un hidrolizado de proteínas de origen vegetal (obtenido mediante el uso de fuentes alimentarias secundarias), que se puede obtener mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una composición adecuada para su uso como componente de medio que contribuye al crecimiento de células eucariotas, comprendiendo la composición:
 - (i)un primer hidrolizado de proteínas de origen vegetal que se puede obtener mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y
 - (ii)una premezcla de calidad alimentaria que comprende uno o más minerales, una o más vitaminas, uno o más aminoácidos y/o una o más sales;donde dicha composición está desprovista de proteínas animales.
8. La composición según la reivindicación 7, donde el primer hidrolizado de proteínas de origen vegetal está presente en la composición en una concentración en el intervalo del 0,1 % al 50 % (p/p).
9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, donde
 - los uno o más minerales en la premezcla de calidad alimentaria se seleccionan del grupo que consiste en Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ y Mn²⁺;
 - las una o más vitaminas en la premezcla de calidad alimentaria se seleccionan del grupo que consiste en ácido ascórbico, biotina, colina, D-pantotenato cálcico, ácido fólico, niacinamida, piridoxina, piridoxal, riboflavina, tiamina, vitamina B12 e i-inositol;
 - los uno o más aminoácidos en la premezcla de calidad alimentaria se seleccionan del grupo que consiste en glicina, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspartico, L-cisteína, L-cistina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina; y/o

-las una o más sales en la premezcla de calidad alimentaria se seleccionan del grupo que consiste en NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ y NaHCO₃.

- 5 10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde la premezcla de calidad alimentaria está presente en la composición en una concentración en el intervalo del 10 % al 99,9 % (p/p).
11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende, además:
 - 10 (iii)un segundo hidrolizado de proteínas de origen vegetal preparado a partir del material de la corriente alimentaria primaria mediante hidrólisis ácida, donde dicho material de la corriente alimentaria primaria tiene un contenido de proteínas de al menos el 30 % (p/p de materia seca) de proteína y un contenido de fibra del 5 % (p/p de materia seca) o menos, donde preferiblemente el material de la corriente alimentaria primaria se ha preparado a partir de semilla de soja, haba, trigo, arroz, guisante, patata o algodón.
- 15 12. La composición según la reivindicación 11, donde el segundo hidrolizado de proteínas de origen vegetal obtenido a partir del material de la corriente alimentaria primaria está presente en una concentración en el intervalo del 0,1 % al 50 % (p/p).
- 20 13. Un método para cultivar células, que comprende las etapas de:
 - 25 (a)disolver la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 en un disolvente acuoso estéril, preparando de este modo una solución de un hidrolizado vegetal;
 - (b)añadir sales, tampón, fuentes de energía (por ejemplo, glucosa), oligoelementos, aminoácidos esenciales y/o factores de crecimiento a la solución de la etapa (a), preparando de este modo un medio de cultivo;
 - 30 (c)inocular el medio de cultivo de la etapa (b) con células apropiadas, donde las células apropiadas se seleccionan del grupo que consiste en células miosatélite, células estromales mesenquimales, células fibroblásticas, células musculares, células madre y células madre pluripotentes inducidas (iPSC); y
 - (d)cultivar el medio de cultivo inoculado de la etapa (c) a una temperatura apropiada durante un período de tiempo apropiado, cultivando de este modo las células.
- 35 14. Un método para la producción de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, que comprende la(s) etapa(s):
 - 40 -mezclar un hidrolizado de proteínas de origen vegetal que se puede obtener mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con una premezcla de calidad alimentaria y, opcionalmente, con un hidrolizado de proteínas de origen vegetal preparado a partir de material de corriente alimentaria primaria mediante hidrólisis ácida.

Figura 1

