

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 832**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2020** **E 20216646 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022** **EP 3848454**

54 Título: **Constructos de células vivas para la producción de un producto de leche cultivada y métodos que los utilizan**

30 Prioridad:

08.01.2020 US 202062958407 P

10.12.2020 US 202063199164 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.05.2022

73 Titular/es:

BIOMILQ, INC. (100.0%)
5 Laboratory Drive, Suite 2250
Durham, NC 27709, US

72 Inventor/es:

STRICKLAND, LEILA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 909 832 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

Constructos de células vivas para la producción de un producto de leche cultivada y métodos que los utilizan

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método para producir un producto de leche cultivada aislado a partir de células mamarias usando un constructo de células vivas en un biorreactor.

Antecedentes de la invención

La leche es un alimento básico en la dieta humana, tanto durante la infancia como durante toda la vida. La Academia Estadounidense de Pediatría y la Organización Mundial de la Salud recomiendan que los bebés sean amamantados exclusivamente durante los primeros 6 meses de vida, y el consumo de productos lácteos después de la infancia es un pilar de la nutrición humana y representa una industria de 700 mil millones de dólares en todo el mundo. Sin embargo, la lactancia es un proceso fisiológicamente exigente y metabólicamente intensivo que puede presentar desafíos biológicos y prácticos para las madres que amamantan, y la producción de leche está asociada con impactos ambientales, sociales y de bienestar animal en contextos agrícolas.

La posibilidad de utilizar el cultivo de células de mamíferos para producir alimentos ha ganado un interés creciente en los últimos años, con el desarrollo de varios prototipos exitosos de productos cárnicos y marinos a partir de células musculares y grasas cultivadas. Stephens et al., 2018 Trends Food Sci Technol. 78: 155-166). Además, se están realizando esfuerzos para comercializar la producción de proteínas de huevo y leche utilizando sistemas de expresión microbiana. Sin embargo, este proceso basado en la fermentación se basa en la expresión y purificación genéticamente modificada de componentes individuales y no puede reproducir el perfil molecular completo de la leche o los productos lácteos.

La presente invención supera las deficiencias en la técnica al proporcionar constructos de células vivas y métodos que los utilizan para la producción *in vitro* y/o *ex-vivo* de productos lácteos cultivados a partir de células mamarias cultivadas.

Sumario de la invención

En consecuencia, la invención proporciona un método para producir un producto lácteo aislado cultivado a partir de células mamarias como se establece en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 de este documento. En el presente documento se divulgan constructos de células vivas, que comprenden: (a) una estructura tridimensional que tiene una superficie exterior, una superficie interior que define una cavidad interior/cámara basal y una pluralidad de poros que se extienden desde la superficie interior hasta la superficie exterior; (b) un material de matriz dispuesto sobre la superficie exterior de la estructura tridimensional; (c) un medio de cultivo dispuesto dentro de la cavidad interior/cámara basal y en contacto fluido con la superficie interna; y (d) una monocapa al menos 70% confluyente de células mamarias polarizadas dispuestas sobre el material de matriz, en la que las células mamarias se seleccionan del grupo que consiste en: células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias vivas, células progenitoras mamarias vivas, células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas, células mioepiteliales mamarias inmortalizadas vivas y células progenitoras mamarias inmortalizadas vivas. Las células mamarias polarizadas comprenden una superficie apical y una superficie basal. La superficie basal de las células mamarias está en contacto fluido con el medio de cultivo. Al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99% o el 100% de las células mamarias pueden estar polarizadas en la misma orientación. La monocapa de células mamarias polarizadas puede tener al menos un 80% de confluencia, al menos un 90% de confluencia, al menos un 95% de confluencia, al menos un 99% de confluencia o un 100% de confluencia. Las células mamarias pueden comprender una proteína receptora de prolactina constitutivamente activa. El medio de cultivo puede comprender una fuente de carbono, un sistema de tamponamiento químico, uno o más aminoácidos esenciales, una o más vitaminas y/o cofactores y una o más sales inorgánicas. El medio de cultivo puede comprender además prolactina. El material de matriz puede comprender una o más proteínas de matriz extracelular. La estructura tridimensional puede comprender un polímero natural, un polímero sintético biocompatible, un péptido sintético, un compuesto derivado de cualquiera de los anteriores o cualquier combinación del mismo. El polímero natural puede ser colágeno, quitosano, celulosa, agarosa, alginato, gelatina, elastina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de queratano y/o ácido hialurónico. El polímero sintético biocompatible puede ser polisulfona, fluoruro de polivinilideno, acetato de polietileno covinílico, alcohol polivinílico, poliácido de sodio, un polímero de acrilato y/o polietilenglicol.

De acuerdo con el método de la invención, se produce un producto de leche cultivada aislado a partir de células mamarias, comprendiendo el método: (a) cultivar un constructo de células vivas en un biorreactor en condiciones que produzcan el producto de leche cultivada, comprendiendo dicho constructo de células vivas: (i) una monocapa al menos 70% confluyente de células mamarias polarizadas, en la que las células mamarias se seleccionan del grupo que consta de: células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias vivas, células progenitoras mamarias vivas, células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas, células mioepiteliales mamarias inmortalizadas vivas y células progenitoras mamarias inmortalizadas vivas, y en el que las células mamarias polarizadas comprenden una superficie apical a partir de la cual se secreta el producto de leche cultivada y una superficie basal; (ii) una estructura tridimensional que tiene una superficie exterior, una superficie interior que define una cavidad

interior/cámara basal y una pluralidad de poros que se extienden desde la superficie interior hasta la superficie exterior; (iii) un material de matriz dispuesto sobre la superficie exterior de la estructura tridimensional, en el que la capa al menos 70% confluyente de células polarizadas está dispuesta sobre el material de matriz; (iv) un medio de cultivo dispuesto dentro de la cavidad interior/cámara basal y en contacto fluido con la superficie interna de la estructura tridimensional y la superficie basal de las células mamarias polarizadas, en el que el medio de cultivo sustancialmente no entra en contacto con el producto de leche cultivada; y comprendiendo dicho biorreactor un compartimento apical que está en contacto fluido con la superficie apical de las células mamarias y está sustancialmente aislado de la cavidad interna/cámara basal del constructo de células vivas y el medio de cultivo celular dispuesto dentro de la cavidad interior; y (b) aislar el producto de leche cultivada. En algunas realizaciones, el biorreactor es un biorreactor cerrado. En algunas realizaciones, la densidad celular total de las células mamarias dentro del biorreactor es de al menos 10^{11} . En algunas realizaciones, el área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor es de al menos 1.5 m^2 . En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende una fuente de carbono, un sistema de tamponamiento químico, uno o más aminoácidos esenciales, una o más vitaminas y/o cofactores y una o más sales inorgánicas. En algunas realizaciones, el material de matriz comprende una o más proteínas de matriz extracelular. En algunas realizaciones, la estructura comprende un polímero natural, un polímero sintético biocompatible, un péptido sintético, un compuesto derivado de cualquiera de los anteriores o cualquier combinación del mismo. En algunas realizaciones, el polímero natural es colágeno, quitosano, celulosa, agarosa, alginato, gelatina, elastina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de queratano y/o ácido hialurónico. En algunas realizaciones, el polímero sintético biocompatible es polisulfona, fluoruro de polivinilideno, acetato de polietileno covinílico, alcohol polivinílico, poliácido de sodio, un polímero de acrilato y/o polietilenglicol. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 27°C a aproximadamente 39°C . En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 37°C . En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una concentración atmosférica de CO_2 de aproximadamente 4% a aproximadamente 6%. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una concentración atmosférica de CO_2 de aproximadamente 5%. De acuerdo con la invención, la monocapa de células mamarias polarizadas dispuestas sobre el material de matriz puede ser una monocapa confluyente.

En el presente documento se divulgan biorreactores, que comprenden: (a) un compartimento apical que comprende un producto de leche cultivada; y (b) al menos un constructo de células vivas que comprende: (i) una estructura tridimensional que tiene una superficie exterior, una superficie interior que define una cavidad interior/cámara basal y una pluralidad de poros que se extienden desde la superficie interior hasta la superficie exterior; (ii) un material de matriz dispuesto sobre la superficie exterior de la estructura tridimensional; (iii) un medio de cultivo dispuesto dentro de la cavidad interior/cámara basal y en contacto fluido con la superficie interna; y (iv) una monocapa al menos 70% confluyente de células mamarias polarizadas dispuestas sobre el material de matriz, en el que las células mamarias se seleccionan del grupo que consiste en: células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias vivas, células progenitoras mamarias vivas, células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas, células mioepiteliales mamarias inmortalizadas vivas y células progenitoras mamarias inmortalizadas vivas; en el que la superficie apical de las células mamarias está en contacto fluido con el compartimento apical. La densidad celular total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos 10^{11} . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos 1.5 m^2 .

En el presente documento se divulgan constructos de células vivas que comprenden células mamarias que compartimentan la alimentación de las células y la secreción del producto de leche cultivada.

En el presente documento se divulgan constructos de células vivas que comprenden una estructura que tiene una superficie superior y una superficie inferior; y una monocapa continua de (a) células epiteliales mamarias primarias vivas, (b) una población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o (c) células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas en la superficie superior de la estructura, la monocapa continua de (a) células epiteliales mamarias primarias vivas, (b) población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o (c) células epiteliales mamarias inmortalizadas que tienen una superficie apical y una superficie basal (por ejemplo, las células forman una monocapa de células polarizadas y confluentes), en el que el constructo comprende un compartimento apical por encima y adyacente a la superficie apical de la monocapa continua de las (a) células epiteliales mamarias primarias vivas, la (b) población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o las (c) células epiteliales mamarias inmortalizadas y un compartimiento basal debajo y adyacente a la superficie inferior de la estructura.

En el presente documento se divulgan métodos para producir leche en cultivo, comprendiendo el método cultivar los constructos de células vivas como se describe en el presente documento, produciendo así leche en cultivo.

En el presente documento se divulgan métodos para elaborar un constructo de células vivas para producir leche en cultivo, comprendiendo el método (a) aislar células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias a partir de explantes mamarios de tejido mamario (por ejemplo, tejido de mama, ubre, pezón), muestra de biopsia o leche materna cruda, para producir células epiteliales mamarias aisladas, células mioepiteliales y células progenitoras mamarias; (b) cultivar las células epiteliales mamarias primarias aisladas, células mioepiteliales y células progenitoras mamarias para producir una población mixta de células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias; (c) cultivar la población mixta de (b) en una estructura,

teniendo la estructura una superficie superior y una superficie inferior, para producir una monocapa polarizada, continua (es decir, confluyente) de células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales y células progenitoras mamarias de la población mixta en la superficie superior de la estructura, en el que la monocapa polarizada continua comprende una superficie apical y una superficie basal, produciendo así un constructo de células vivas para producir leche en cultivo.

En el presente documento se divulgan métodos para elaborar un constructo de células vivas para producir leche en cultivo, comprendiendo el método: a) aislar células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias de explantes mamarios de tejido mamario (por ejemplo, tejido de mama, ubre, pezón), muestra de biopsia o leche materna cruda, para producir células epiteliales mamarias aisladas, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias; (b) cultivar las células epiteliales mamarias primarias aisladas, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias para producir una población mixta de células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias; (c) clasificar la población mixta de células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias para producir una población de células epiteliales mamarias primarias; y (d) cultivar la población de células epiteliales mamarias primarias en una estructura, teniendo la estructura una superficie superior y una superficie inferior, para producir una monocapa polarizada, continua (es decir, confluyente) de células epiteliales mamarias primarias en la superficie superior de la estructura, en el que la monocapa polarizada continua comprende una superficie apical y una superficie basal, produciendo así un constructo de células vivas para producir leche en cultivo.

En el presente documento se divulgan métodos para elaborar un constructo de células vivas para producir leche en cultivo, comprendiendo el método (a) cultivar células epiteliales mamarias inmortalizadas para producir un mayor número de células epiteliales mamarias inmortalizadas; (b) cultivar las células epiteliales mamarias inmortalizadas de (a) en una estructura, teniendo la estructura una superficie superior y una superficie inferior, para producir una monocapa polarizada, continua (es decir, confluyente) de células epiteliales mamarias inmortalizadas en la superficie superior de la estructura, en el que la monocapa polarizada continua comprende una superficie apical y una superficie basal, produciendo así un constructo de células vivas para producir leche en cultivo.

En el presente documento se divulgan métodos para producir leche en cultivo que comprenden cultivar un constructo de células vivas que comprende (a) una estructura que comprende una superficie superior y una superficie inferior y una monocapa polarizada continua (es decir, confluyente) de células epiteliales mamarias primarias vivas, una monocapa continua polarizada de una población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o una monocapa polarizada continua de células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas que tiene una superficie apical y una superficie basal, en la que la monocapa polarizada continua de células epiteliales mamarias primarias vivas, la monocapa polarizada continua de la población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, las células mioepiteliales mamarias y las células progenitoras mamarias y/o la monocapa polarizada continua de células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas se encuentran en la superficie superior de la estructura, (b) un compartimento basal y un compartimento apical, en el que la superficie inferior de la estructura es adyacente al compartimento basal y la superficie apical de la monocapa de células epiteliales mamarias primarias vivas, la monocapa de la población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o la monocapa de células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas es adyacente al compartimento apical, en el que la monocapa de células mamarias epiteliales primarias vivas, las células mamarias epiteliales primarias vivas de la monocapa de la población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, o la monocapa de células epiteliales mamarias inmortalizadas, secreta leche a través de su superficie apical hacia el compartimento apical, produciendo así leche en cultivo.

En el presente documento se divulgan métodos para producir una célula epitelial mamaria primaria modificada o una célula epitelial mamaria inmortalizada, en los que el método comprende introducir en la célula: (a) un polinucleótido que codifica un receptor de prolactina que comprende un dominio de señalización intracelular modificado, opcionalmente en el que el receptor de prolactina comprende un truncamiento en el que la posición 154 del exón 10 se ha empalmado con la secuencia 3' del exón 11; (b) un polinucleótido que codifica un receptor de prolactina quimérico que se une a un ligando, que es capaz de activar la síntesis de leche en ausencia de prolactina; (c) un polinucleótido que codifica una proteína receptora de prolactina constitutiva o condicionalmente activa, opcionalmente en el que el polinucleótido codifica una proteína receptora de prolactina humana constitutivamente activa que comprende una eliminación de los aminoácidos 9 a 187; (d) un polinucleótido que codifica un efector modificado (recombinante) de una proteína prolactina que comprende (i) un dominio de tirosina quinasa JAK2 fusionado con un dominio de tirosina quinasa STAT5; y/o (ii) un dominio intracelular del receptor de prolactina fusionado con un dominio de tirosina quinasa JAK2; (e) una mutación de pérdida de función en un gen relacionado con el ritmo circadiano *PER2* (homólogo 2 de la proteína del período circadiano); y/o (f) un polinucleótido que codifica uno o más genes transportadores de glucosa GLUT1 y/o GLUT12, aumentando así la tasa de absorción de nutrientes en la superficie basal de una monocapa de células de la célula epitelial mamaria primaria modificada o célula epitelial mamaria inmortalizada.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un ejemplo de la recogida de leche para uso nutricional a partir de células epiteliales mamarias cultivadas como una monocapa confluyente en un aparato de cultivo compartimentado en el que se proporciona medio

fresco o reciclado al compartimento basal y la leche se recoge del compartimento apical. TEER, resistencia eléctrica transepitelial.

La FIG. 2 muestra un ejemplo de absorción polarizada de nutrientes y secreción de leche a través de una monocapa confluyente de células epiteliales mamarias ancladas a una estructura en la superficie basal.

5 La FIG. 3 muestra un ejemplo de una estructura micromodelada que proporciona una mayor área superficial para la absorción compartimentada de nutrientes y la secreción de leche por una monocapa confluyente de células epiteliales mamarias.

10 La FIG. 4 muestra tres ejemplos de un biorreactor de fibra hueca representado como un haz de tubos capilares (arriba), que puede soportar células epiteliales mamarias que recubren la superficie externa (arriba y abajo a la izquierda) o interna (abajo a la derecha) de los capilares, proporcionando absorción direccional y compartimentada de nutrientes y secreción de leche.

15 La FIG. 5 ejemplifica una sección transversal de un constructo tridimensional de células vivas. El constructo se compone de una estructura que tiene una superficie interior que define una cavidad interior/cámara basal y una superficie exterior. La cavidad interior/cámara basal comprende medios de cultivo celular. Un material de matriz se asienta sobre la superficie exterior de la estructura. Los poros atraviesan la estructura desde la superficie interior hasta la superficie exterior, permitiendo que los medios celulares entren en contacto con la superficie basal de las células de la monocapa celular dispuesta sobre el material de matriz.

20 La FIG. 6 ejemplifica un biorreactor para producir un producto de leche cultivada. El biorreactor se compone de un constructo de células vivas y una cámara apical. El constructo celular está compuesto por una estructura que tiene una superficie interior que define una cavidad interior/cámara basal y una superficie exterior. La cavidad comprende medios de cultivo celular. Un material de matriz se asienta sobre la superficie exterior de la estructura. Los poros atraviesan la estructura desde la superficie interior hasta la superficie exterior, permitiendo que los medios celulares entren en contacto con la superficie basal de las células de la monocapa celular dispuesta sobre el material de matriz. La superficie apical de las células de la monocapa celular secreta la leche/producto de leche cultivada en la cámara apical. La cámara apical y la cavidad interior/cámara basal están separadas por la monocapa celular.

25 La FIG. 7 ejemplifica un constructo de células vivas. El constructo se compone de una estructura que tiene una superficie interior que define una cavidad interior/cámara basal y una superficie exterior. La cavidad interior/cámara basal comprende medios de cultivo celular. Un material de matriz se asienta sobre la superficie exterior de la estructura. Los poros atraviesan la estructura desde la superficie interior hasta la superficie exterior, permitiendo que los medios celulares entren en contacto con la superficie basal de las células de la monocapa celular dispuesta sobre el material de matriz.

Descripción detallada de la invención

35 La leche es un alimento líquido rico en nutrientes producido en las glándulas mamarias de los mamíferos. Es una fuente primaria de nutrición para los mamíferos bebés (incluidos los humanos que son amamantados) antes de que puedan digerir otros tipos de alimentos. La leche humana no es meramente nutrición. Más bien, la leche humana contiene una variedad de factores con cualidades bioactivas que tienen un papel importante en la supervivencia y la salud de los bebés. La leche natural contiene muchos otros macronutrientes, incluyendo proteínas, lípidos, polisacáridos y lactosa. El consumo de leche se produce en dos tipos generales distintos: una fuente natural de nutrición para todos los mamíferos lactantes y un producto alimenticio.

40 En casi todos los mamíferos, la leche se suministra a los bebés a través de la lactancia, ya sea directamente o extrayéndose la leche para almacenarla y consumirla más tarde. La leche temprana de los mamíferos contiene anticuerpos que brindan protección al bebé recién nacido, así como nutrientes y factores de crecimiento. La leche materna no es un producto uniforme, invariable, constante, elaborado en una fábrica; más bien, es un producto biológico producido por mujeres con genotipos, fenotipos y dietas marcadamente diferentes. Para agregar a la complejidad, la composición de la leche materna está influenciada por una miríada de factores maternos, infantiles y ambientales. La leche humana contiene una gran variedad de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, minerales y vitaminas, pero la mayor parte de su potencial para combatir enfermedades proviene de una plétora de anticuerpos, leucocitos, hormonas, péptidos antimicrobianos, citocinas, quimiocinas y otros factores bioactivos.

50 Se ha demostrado previamente que las células epiteliales mamarias (MEC) en cultivo muestran una organización y un comportamiento similares a los observados *in vivo* (Arévalo et al., 2016 Am J Physiol Cell Physiol. 310(5): C348-356; Chen et al., 2019 Curr Protoc Cell Biol. 82(1): e65). En Arévalo et al., se detectaron biomarcadores específicos de poblaciones de MEC en células epiteliales mamarias bovinas inmortalizadas (BME-UV1) y células alveolares mamarias bovinas inmortalizadas (MAC-T) cultivadas en placas 2-D adherentes, microplacas tridimensional de superficie de unión ultrabaja y Placas tridimensional recubiertas con Matrigel. Además, en Chen et al., se detallan los protocolos para el aislamiento y cultivo de células madre epiteliales mamarias primarias humanas/progenitoras a partir de tejido mamario humano y la generación posterior de mamoesferas mediante cultivo de organoides tridimensional en esponjas de gelatina y matrices de Matrigel. Sin embargo, ni Arévalo ni Chen intentaron estimular la producción de leche a partir de estos cultivos de MEC.

60 En particular, cuando se cultivan en una matriz extracelular apropiada y se estimulan con prolactina, las células epiteliales mamarias bovinas cultivadas se polarizan y organizan en estructuras capaces de secretar ciertos componentes de la leche. (Blatchford et al. 1999 Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects 10:141-145). En Blatchford et al, las MEC bovinas se polarizaron y formaron mamoesferas. Se aislaron caseína y butirofilina de los

cultivos. Sin embargo, las células no se polarizaron en una dirección uniforme. Blatchford, et al., señaló que las proteínas de la leche se distribuyeron entre las células y se dispersaron a través de las mamoesferas. Debido a la falta de una orientación de polarización uniforme, Blatchford tuvo que aislar las proteínas secretadas del medio de cultivo.

- 5 Además, los modelos bidimensionales *in vitro*, tales como los utilizados en Blatchford et al., proporcionan una relación baja de área superficial a volumen (formato de baja densidad). El área superficial disponible para la unión celular limita el número de células que se pueden cultivar.

10 El único intento conocido de cultivar células epiteliales mamarias de ratón en un formato de alta densidad, tal como el biorreactor de fibra hueca, no logró la compartimentación necesaria para la producción y extracción de un producto de leche cultivada. (Sharfstein et al. 1992 *Biotechnology and Bioengineering* 40: 672-680). En Sharfstein et al., se examinó el crecimiento, la expresión a largo plazo de la diferenciación funcional y el metabolismo de COMMA-ID (una línea celular epitelial mamaria de ratón inmortalizada) en dos sistemas diferentes: cultivo por lotes extendido y cultivo en reactor de fibra hueca. Usando COMMA-ID sembrado en insertos de cultivo celular de membrana de policarbonato, Costar Transwell®, Sharfstein et al., crearon una monocapa confluyente capaz de formar una barrera y metabolismo polarizado entre el lado apical y basal que mantuvo gradientes de glucosa y lactato. Sin embargo, utilizando un cultivo de biorreactor de fibra hueca, Sharfstein et al., no pudieron lograr la separación de los compartimentos basal y apical.

15 Además, no se determinó si la absorción de nutrientes estaba polarizada en un cultivo de fibra hueca (Sharfstein et al. 1992). Es importante destacar que ningún trabajo anterior ha sido capaz de cultivar células epiteliales mamarias de humanos u otras especies nutricionalmente relevantes en un formato compartimentado tridimensional de alta densidad.

- 20 En el presente documento se divulgan constructos de células vivas, métodos para elaborar las mismas y métodos para usar las mismas para producción *in vitro* y/o *ex-vivo* de productos lácteos cultivados a partir de células mamarias cultivadas.

Definiciones

- 25 Tal como se utilizan en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en el presente documento, "y/o" se refiere y abarca todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

- 30 Además, se puede excluir u omitir cualquier característica o combinación de características establecidas en este documento.

El término "aproximadamente", como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de un compuesto o agente, la dosis, el tiempo, la temperatura y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$ o incluso $\pm 0.1\%$ de la cantidad especificada.

- 35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia.

40 Las secuencias de nucleótidos se presentan en el presente documento como una sola cadena, en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha, a menos que se indique específicamente lo contrario. Los nucleótidos y los aminoácidos se representan en este documento de la manera recomendada por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-1UB, o (para los aminoácidos) mediante el código de una letra o el código de tres letras, ambos de acuerdo con 37 C.F.R. párrafo 1.822 y uso establecido.

- 45 Salvo que se indique lo contrario, se pueden usar métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica para la producción de polipéptidos recombinantes y sintéticos, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno del mismo, manipulación de secuencias de ácido nucleico, producción de células transformadas, construcción de constructos de vectores virales, y células de empaquetamiento transfectadas de manera transitoria y estable. Tales técnicas son conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª ed. (Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989); F.M. Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology* (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

- 50 Como se usa en el presente documento, la frase de transición "que consiste esencialmente en" debe interpretarse como que abarca los materiales o etapas enumerados y aquellos que no afectan materialmente la característica o características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Por lo tanto, el término "que consiste esencialmente en" como se usa en este documento no debe interpretarse como equivalente a "que comprende".

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" abarca tanto péptidos como proteínas, y no requiere ninguna longitud de aminoácido particular o estructura terciaria a menos que se indique lo contrario.

- El término "polarizado", como se usa en el presente documento en referencia a células y/o monocapas de células, se refiere a un estado espacial de la célula en el que hay dos superficies distintas de la célula, por ejemplo, una superficie apical y una superficie basal, que pueden ser diferentes. Las distintas superficies de una célula polarizada pueden comprender diferentes receptores de superficie y/o transmembrana y/u otras estructuras. Las células polarizadas individuales en una monocapa continua pueden tener superficies apicales y superficies basales orientadas de manera similar. Las células polarizadas individuales en una monocapa continua pueden tener estructuras de comunicación entre células individuales (por ejemplo, uniones estrechas) para permitir la comunicación cruzada entre células individuales y crear una separación (por ejemplo, compartimentación) del compartimento apical y el compartimento basal.
- Como se usa en el presente documento, "superficie apical" significa la superficie de una célula que mira hacia un entorno externo o hacia una cavidad o cámara, por ejemplo, la cavidad de un órgano interno. Con respecto a las células epiteliales mamarias, la superficie apical es la superficie a partir de la cual se secreta el producto de leche cultivada.
- Como se usa en el presente documento, "superficie basal" significa la superficie de una célula que está en contacto con una superficie, por ejemplo, la matriz de un biorreactor.
- Como se usa en este documento, "biorreactor" significa un dispositivo o sistema que soporta un entorno biológicamente activo que permite la producción de un producto lácteo de cultivo descrito en este documento a partir de células mamarias descritas en este documento.
- El término "lactogénico" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de estimular la producción y/o secreción de leche. Un gen o proteína (por ejemplo, prolactina) puede ser lactogénico, al igual que cualquier otro producto natural y/o sintético. Un medio de cultivo lactogénico puede comprender prolactina, estimulando así la producción de leche por parte de las células en contacto con el medio de cultivo.
- Como se usa en este documento, el término "grado alimenticio" se refiere a materiales considerados no tóxicos y seguros para el consumo (por ejemplo, consumo humano y/o por otro animal), por ejemplo, de acuerdo con lo regulado por los estándares establecidos por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE. UU.
- Como se describe en este documento, la leche producida por las células epiteliales mamarias primarias (por ejemplo, células epiteliales mamarias primarias de las células epiteliales mamarias primarias vivas aisladas y/o las células epiteliales mamarias primarias de la población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y/o células progenitoras mamarias) o las células epiteliales mamarias inmortalizadas se secreta a través de la superficie apical de las células al compartimento apical. Un compartimento basal puede comprender un medio de cultivo y el medio de cultivo está en contacto con la superficie basal de las células epiteliales mamarias primarias vivas, la población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o las células epiteliales mamarias inmortalizadas.
- Constructos de células vivas
- En el presente documento se divulgan constructos de células vivas para producir leche en cultivo, comprendiendo los constructos de células vivas una monocapa continua de células mamarias vivas seleccionadas del grupo que consiste en: (a) células epiteliales mamarias primarias vivas, (b) células mioepiteliales mamarias vivas, (c) células progenitoras mamarias vivas y/o (d) células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas.
- Las células mamarias pueden comprender células epiteliales mamarias productoras de leche, células mioepiteliales contráctiles y/o células progenitoras que pueden dar lugar tanto al epitelio mamario como a células mioepiteliales contráctiles mamarias. Las células epiteliales mamarias son las únicas células que producen leche. Las células mamarias pueden comprender células epiteliales mamarias, células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias.
- Las células mamarias pueden ser de tejido mamario, tejido de ubre y/o tejido de pezón de un mamífero. Las células mamarias pueden ser de cualquier mamífero, por ejemplo, un primate (por ejemplo, chimpancé, orangután, gorila, mono (por ejemplo, del Viejo Mundo, del Nuevo Mundo), lémur, humano), un perro, un gato, un conejo, un ratón, una rata, un caballo, una vaca, una cabra, una oveja, un buey (por ejemplo, *bos* spp.), un cerdo, un ciervo, un ciervo almizclero, un bóvido, una ballena, un delfín, un hipopótamo, un elefante, un rinoceronte, una jirafa, una cebra, un león, un guepardo, un tigre, un panda, un panda rojo y una nutria. Las células mamarias pueden ser de una especie en peligro de extinción, por ejemplo, un mamífero en peligro de extinción. Las células mamarias pueden ser de un ser humano. Las células mamarias pueden ser de un bóvido (por ejemplo, una vaca).
- La monocapa continua de células mamarias vivas puede derivarse de células madre derivadas de la leche materna o de células madre mamarias que se originan a partir de una biopsia de tejido de la glándula mamaria. El componente epitelial de la leche materna incluye no solo células epiteliales maduras, sino también sus precursores y células madre en cultivo. Una subpoblación de células madre derivadas de la leche materna muestra un potencial multilíneaje muy alto, parecido al típico de las células madre embrionarias humanas (hESC). Las células madre mamarias también pueden originarse a partir de una biopsia de tejido de la glándula mamaria e incluyen MEC diferenciadas

terminalmente. Tanto las células madre derivadas de la leche materna como las células madre mamarias que se originan a partir de una biopsia de tejido de la glándula mamaria son células multipotentes que pueden dar lugar a MEC o células mioepiteliales.

5 Al menos el 50% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 55% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 60% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 65% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 70% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 75% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 80% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 85% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 90% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 95% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Al menos el 100% de las células mamarias del cultivo de células vivas pueden estar polarizadas. Sustancialmente todas las células mamarias del constructo de células vivas pueden estar polarizadas (es decir, tener una superficie apical y una superficie basal). Sustancialmente todas las células mamarias del constructo de células vivas pueden polarizarse y sustancialmente todas las células polarizadas pueden orientarse en la misma dirección. Por ejemplo, sustancialmente todas las células mamarias tienen una superficie apical y una superficie basal, en la que la superficie apical de sustancialmente todas las células está orientada en la misma dirección y la superficie basal de sustancialmente todas las células está orientada en la misma dirección. .

20 La monocapa de células mamarias epiteliales puede tener al menos un 70% de confluencia sobre la estructura. La monocapa de células epiteliales mamarias puede tener al menos aproximadamente un 75% de confluencia sobre la estructura. La monocapa de células mamarias epiteliales puede tener al menos aproximadamente un 80% de confluencia sobre la estructura. La monocapa de células mamarias epiteliales puede tener al menos aproximadamente un 85% de confluencia sobre la estructura. La monocapa de células mamarias epiteliales puede tener al menos aproximadamente un 90% de confluencia sobre la estructura. La monocapa de células mamarias epiteliales puede tener al menos aproximadamente un 95% de confluencia sobre la estructura. La monocapa de células mamarias epiteliales puede tener al menos aproximadamente un 99% de confluencia sobre la estructura. La monocapa de células mamarias epiteliales puede tener un 100% de confluencia sobre la estructura.

Modificaciones genéticas a las células mamarias

30 Las células mamarias pueden comprender una proteína receptora de prolactina constitutivamente activa. Las células mamarias pueden comprender una proteína receptora de prolactina humana constitutivamente activa. Cuando la célula epitelial mamaria primaria o las células epiteliales mamarias inmortalizadas comprenden un receptor de prolactina constitutivamente activo, el medio de cultivo no contiene prolactina.

35 La proteína receptora de prolactina humana constitutivamente activa puede comprender una eliminación de los aminoácidos 9 a 187, en la que la numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de referencia de un receptor de prolactina humana identificado como la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1: Receptor de prolactina humana (número de acceso del GenBank AAD32032.1)

MKENVASATVFTLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGTDG
GLPTNYSLTYHREGETLMHECPDYITGGPNSCHFQYTSMWRTYIMMVNATNQMG
SFSDELYVDVITYIVQDPPELEAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIR
LKPEKAAEWEIHFAGQQTFFKILSLHPGQKYLQVRCKPDHGYWSAWSPATFIQIPSD
TMNDTTVWISVAVLSAVICLIIVWAVALKGYSMVTCIFPPVPGPKIKGFDAHLEK GKSE
ELLSALGCQDFPPTSDYEDLLVEYLEVDDSEDQHLMSVHSKEHPSQGMKPTYLDPD
TDS GRGSCDSPSLLEKCEEPQANPSTFYDPEVIEKPENPETHTWDPQCISMEGKIPYFHAGG
SKCSTWPLPQPSQHNPRSSYHNITDVCELAVGPAGAPATLLNEAGKDALKSSQTIKSREE
GKATQQREVESFHSETDQDTPWLLPQEKTPFGSAKPLDYVEIHKVNKDGA
LSLLPKQRE NSGKPKKPGTPENNKEYAKVSGVMDNNILVLPDPHAKNVACFEESAKEAPPSLEQ
NQ AEKALANFTATSSKCRLLQLGGLDYLDPACTHSHF

La proteína receptora de prolactina humana constitutivamente activa puede comprender una eliminación de los siguientes aminoácidos:

VFTLLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGTDGGLPTNYSLTYHREG
 TLMHECPDYITGGPNSCHFVKQYTSMWRTYIMMVNATNQMGSSFSDEL YVDVTYIVQP
 DPPELAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIRLKPEKAA.

- 5 Las células mamarias pueden comprender una mutación de pérdida de función introducida en un gen relacionado con el ritmo circadiano *PER2*. La mutación de pérdida de función introducida en un gen relacionado con el ritmo circadiano *PER2* puede promover una mayor síntesis de los componentes de la leche cultivada. La mutación de pérdida de función en el gen *PER2* puede comprender una eliminación de 87 aminoácidos de la posición 348 a la 434 en *PER2*, en la que la numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de referencia de un *PER2* humano identificado como la SEQ ID NO:2.

SEQ ID NO: 2: Homólogo 2 de la proteína humana del período circadiano (número de acceso del GenBank NM 022817)

10 MNGYAEFPSPSNPTKEPVEPQPSQVPLQEDVDMSSGSSGHETNENCSTGRDSQG
 SDCDDSGKJELGMLVEPPDARQSPDTFSLMMAKSEHNPSTSGCSDQSSKVDTHKELIK
 TLKELKVHLPADKKAKGKASTLATLKYALRSVKQVKANEEYYQLMSSEGHPCGADV
 PSYTVEEMESVTSEHIVKNADMFAVAVSLVSGKILYISDQVASIFHCKRDAFSDAKFVEF
 LAPHDVGVFHSFTSPYKLPWMSMSGADSFTQECMEEKSFFCRVSVRKSHENEIRYHPF
 RMTPLYLVKVRDQQAESQLCCLLLAERVHSGYEAPRIPPEKRIFTTTTHTPNCLFQDQD
ERAVPLLGYLPQDLIETPVLVQLHPSDRPLMLAIHKKILQSGGQPFDYSPIRFRARN
GEYITLDTSWSSFINPWSRKISFIIGRHKVRVGPLNEDVFAAHPCTEEKALHPSIQELT
 EQIHRLLLQVPVPHSGSSGYGSLGNSGHEHLSQTSSSDSNGHEDSRRRRRAEICKNGNKT
 KNRSHYSHESGEQKKKSVTEMQTNPPAEKKA VPA MEKDSLGVSFPEELACKNQPTCSY
 QQISCLDSVIRYLESCNEAATLKRKCEFPANVPALRSSDKRKATVSPGPHAGEAEPPSRV
 NSRTGVGTHLTSLALPGKAESVASLTSQCSYSSTIVHVGDKKPQPELEMVEDAASGPESL
 DCLAGPALACGLSKEPFKKLGLTKEVLAHTQKEEQSFLQKFKEIRKLSIFQSHCHYY
 LQERSKGQPSERTAPGLRNTSGIDSPWKKTGKNRKLKSKRVKPRDSSESTGSGGPVSAR
 PPLVGLNATAWSPSDTSQSSCPAVFPAPVPAAYSLPVFPAPGTVAAPPAPPHASFTVPA
 VPVDLQHQFAVQPPFPAPLAPVMAFMLPSYSFPGTPNLPQAFFPSQPQFSPHPTLTSEM
 ASASQPEFPEGGTGAMGTTGATETA AVGADCKPGTSRDQPKAPLTRDEPSDTQNSDA
 LSTSSGLLNLLNEDLCSASGSAASESLGSGSLGCDASPSGAGSSDTSHTSKYFGSIDSSE
 NNHKAKMNTGMEESEHFIKCVLQDPIWLLMADADSSVMMTYQLPSRNLEAVLKEDRE
 KLKLLQKLQPRFTESQKQELREVHQWMQTGGLPAAIDVAECVYCENKEKGNICIPYEE
 DIPSLGLSEVSDTKEDENGSPLNHRIEEQT

La mutación de pérdida de función introducida en *PER2* puede comprender una eliminación de los siguientes aminoácidos:

CLFQDQDRAVPLLGYLPQDLIETPVLVQLHPSDRPLMLAIHKKILQSGGQPFDYSPIRFR
 ARNGEYITLDTSWSSFINPWSRKISFIIGRHKV.

- 15 Las células mamarias pueden comprender un polinucleótido que codifica un receptor de prolactina que comprende un dominio de señalización intracelular modificado. La mutación de pérdida de función introducida en un gen relacionado con el ritmo circadiano *PER2* puede promover una mayor síntesis de los componentes individuales de la leche cultivada. El receptor de prolactina puede comprender un truncamiento en el que la posición 154 del exón 10 se ha empalmado con la secuencia 3' del exón 11. El receptor de prolactina puede comprender una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 3.
- 20

SEQ ID NO: 3: Isoforma humana 4 del receptor de prolactina (número de acceso del GenBank AF416619; Trott et al., 2003 J. Mol. Endocrinol 3Q(l): 31-47)

MKENVASATVFTLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGTDG
 GLPTNYSLTYHREGETLMHECPDYITGGPNSCHFGKQYTSMWRTYIMMVNATNQMGs
 SFSDELYVDVITYIVQDPPELEAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIR
 LKPEKAAEWEIHFAQQTEFKILSLHPGQKYLQVRCKPDHGYWSAWSPATFIQIPSDf
 TMNDTTVWISVAVLSAVICLIIVWAVALKGYSMVTCIFPPVPGPKIKGFD AHLLEKKGKSE
 ELLSALGCQDFPPTSDYEDLLVEYLEVDDSEDQHLMSVHSKEHPSQGDPLMLGASHYK
 NLKSYRPRKISSQGRLAVFTKATLTTVQ

Las células mamarias pueden comprender un polinucleótido que codifica un efector modificado (por ejemplo, recombinante) de una proteína prolactina. El efector modificado de la proteína prolactina puede comprender un dominio de tirosina quinasa Janus quinasa 2 (JAK2). El efector modificado puede comprender un dominio tirosina quinasa JAK2 fusionado con un transductor de señal y activador del dominio tirosina quinasa de la transcripción 5 (STAT5) (por ejemplo, un polinucleótido que codifica un dominio tirosina quinasa JAK2 unido al extremo 3' de un polinucleótido que codifica el dominio tirosina quinasa STAT5). El efector modificado de la proteína prolactina puede promover una mayor síntesis de los componentes individuales de la leche cultivada. El efector modificado puede tener una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 4. Los aminoácidos en negrita corresponden al dominio quinasa JAK2 de las posiciones de aminoácidos 757 a 1129 de una secuencia de aminoácidos JAK2 humana de referencia.

SEQ ID NO: 4. STAT5A Transductor de señales humano y activador de la transcripción 5A fusionado en el extremo 3' a los aminoácidos 757-1129 de la proteína tirosina quinasa humana JAK2

MAGWIAQQL QGDALRQMQV LYGQHFPIEV RHYLAQWIES QPWAIDLNDN
 PQDRAQATQL LEGLVQELQK KAEHQVGEDG FLLKIKLGHY ATQLQKTYDR
 CPLELVRCIR HILYNEQRLV REANNCSSPA GILVDAMSQK HLQINQTFEE
 LRLVTQDTEN ELKKLQQTQE YFIIQYQESL RIQAQFAQLA QLSPQERLSR
 ETALQKQKVS LEAWLQREAA TLQQYRVELA EKHQKTLQLL RKQQTILDD
 ELIQWKRRQQ LAGNGGPPEG SLDVLQSWCE KLAELIHWQNR QQIRRAEHLK
 QQLPIPGPVE EMLAEVNA TI DIISALVTS TFIIEKQPPQ VLKTQTKFAA TVRLLVGGKL
 NVHNMPPQVK ATIIEQQAK SLLKNENTRN ECSGEILNNC CVMEYHQATG
 TLSAHRNMS LKRIKRADRR GAESVTEEFK TVLFESQFSV GSNELVFQVK
 TSLPWVIV HGSQDHNATA TVLWDNAFAE PGRVPFAVPD KVLWPQLCEA
 LNMKFKAQVQ SNRGLTKENL VFLAQKLFNN SSSHLEDYSG LSVSWSQFNR
 ENLPGWNYTF WQWFDGVMEV LKKHHKPHWN DGAILGFVNK QQAHDLLINK
 PDGTFLLRFS DSEIGGITIA WKFDSPERNL WNLKPFTTRD FSIRSLADRL GDLSYLIYVF
 PDRPKDEVFS KYYTPVLAKA VDGYYKPKQK QWPEFVNAS ADAGGSSATY
 MDQAPSPAVC PQAPYNMYPQ NPDHVLDQDG EFDLDETMDV ARHVEELLRR
 PMDSLDSRLS PPAGLFTSAR GSLSLDSQ RKLQFYEDRH QLPAPKWAEL
 ANLINNCMDY EPDFRPSFRA IIRDLNSLFT PDYELLTEND MLPNMRIGAL
 GFSGAFEDRD PTQFEERHLK FLQQLGKGNF GSVEMCRYDP LQDNTGEWA
 VKKLQHSTEE HLRDFEREIE ILKSLQHDNI VKYKGVCSA GRRNLKLIME
 YLPYGSLRDY LQKHKERIDH IKLLQYTSQI CKGMEYLGTK RYIHRDLATR
 NILVENENRV KIGDFGLTKV LPQDKEYYKV KEPGESPIFW YAPESLTESK
 FSVASDVWSF GWLYELFTY IEKSKSPPAE FMRMIGNDKQ GQMIVFHLE
 LLKNNGRLPR PDGCPDEIYM IMTECWNNNV NQRPSFRDLA LRVDQIRDN.

Las células mamarias pueden immortalizarse. Las células mamarias pueden comprender uno o más ácidos nucleicos que codifican la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) o el virus de simio 40 (SV40). Las células mamarias pueden comprender un ARN pequeño de horquilla (ARNph) para p16 (inhibidor de la quinasa 4 dependiente de ciclina) (p16 (INK4)) y regulador maestro de la entrada del ciclo celular y el metabolismo proliferativo (c-MYC).

Como se describe en este documento, el método puede comprender introducir en la célula: (a) un polinucleótido que codifica un receptor de prolactina que comprende un dominio de señalización intracelular modificado, opcionalmente en el que el receptor de prolactina comprende un truncamiento en el que la posición 154 del exón 10 se ha empalmado con la secuencia 3' del exón 11; (b) un polinucleótido que codifica un receptor de prolactina quimérico que se une a un ligando, que es capaz de activar la síntesis de leche en ausencia de prolactina; (c) un polinucleótido que codifica una proteína receptora de prolactina constitutiva o condicionalmente activa, opcionalmente en el que el polinucleótido codifica una proteína receptora de prolactina humana constitutivamente activa que comprende una eliminación de los aminoácidos 9 a 187 (por ejemplo, una eliminación de los aminoácidos 9 a 187, en la que la numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de referencia de un receptor de prolactina humano identificado como la SEQ ID NO: 1); (d) un polinucleótido que codifica un efector modificado (por ejemplo, recombinante) de una proteína prolactina que comprende (i) un dominio de tirosina quinasa Janus quinasa 2 (JAK2), opcionalmente en el que el dominio de tirosina quinasa JAK2 está fusionado con un transductor de señal y activador de dominio tirosina quinasa de transcripción 5 (STAT5) (por ejemplo, un polinucleótido que codifica un dominio tirosina quinasa JAK2 unido al extremo 3' de un polinucleótido que codifica el dominio tirosina quinasa STAT5); y/o (ii) un dominio intracelular del receptor de prolactina fusionado con un dominio de tirosina quinasa JAK2; (e) una mutación de pérdida de función en un gen relacionado con el ritmo circadiano *PER2* (homólogo 2 de la proteína del período circadiano); y/o (f) un polinucleótido que codifica uno o más genes transportadores de glucosa GLUT1 y/o GLUT12, aumentando así la tasa de absorción de nutrientes en la superficie basal de la monocapa.

Estructuras

Como se describe en el presente documento, un constructo de células vivas comprende una estructura que tiene una superficie superior/superficie exterior y una superficie inferior/superficie interior. La estructura puede ser una superficie bidimensional o una superficie tridimensional (por ejemplo, una superficie micromodelada tridimensional y/o una estructura cilíndrica que se ensambla en haces). Un ejemplo no limitante de una estructura de superficie bidimensional es un filtro Transwell®. Un ejemplo no limitante de una superficie micromodelada tridimensional incluye un biorreactor microestructurado, un tejido descelularizado (por ejemplo, una glándula mamaria descelularizada o un tejido vegetal descelularizado), estructuras micromodeladas fabricadas mediante fundición o impresión tridimensional con materiales biológicos o biocompatibles, superficie texturada. La estructura se puede producir por electrohilado de nanofibras de celulosa y/o una estructura cilíndrica que se puede ensamblar en haces (por ejemplo, un biorreactor de fibra hueca). La estructura puede ser porosa. La estructura puede ser una estructura tridimensional. La estructura tridimensional puede ser cualquier estructura que tenga una cavidad interior/central hueca cerrada. La estructura tridimensional puede unirse con una o más superficies para formar una cámara interior/compartimento basal cerrado. Por ejemplo, la estructura puede unirse con una o más paredes de un biorreactor para formar la cámara interior/compartimento basal. La estructura puede ser un biorreactor de fibra hueca. La estructura tridimensional puede ser un tubo en el que la cavidad central está definida por la superficie interior de la estructura. La estructura tridimensional puede ser una esfera hueca en la que la cavidad central está definida por la superficie interior de la estructura.

Para los métodos de cultivo *in vitro* para estudios de absorción intestinal, se ha venido utilizado como estándar durante mucho tiempo una estructura de superficie bidimensional como Transwell®, ya que proporciona tanto espacios apicales como basolaterales para simular la barrera sanguínea intestinal y permitir el transporte activo y pasivo de fármacos y nutrientes. Sin embargo, las células sembradas en soportes planos exhiben fenotipos marcadamente diferentes a las células *in vivo*, en parte debido a la mala representación de los microambientes extracelulares tridimensionales.

Una estructura tridimensional permite que las células mamarias (por ejemplo, MEC) crezcan o interactúen con su entorno en las tres dimensiones. A diferencia de los entornos bidimensionales, un cultivo celular tridimensional permite que las células crezcan *in vitro* en todas las direcciones, aproximándose al entorno mamario *in vivo*. Además, la estructura tridimensional permite un área superficial más grande para el cultivo de células y para el intercambio de metabolitos y gases, además permite la compartimentación necesaria, lo que permite que el producto de leche cultivada se segregue en un compartimento, mientras que el medio de cultivo celular se pone en contacto con las células mamarias en otro compartimento. Hasta la fecha, no se ha logrado una monocapa confluyente con separación polarizada de las superficies celulares basales y apicales usando células epiteliales mamarias en una superficie tridimensional (Sharfstein et al., 1992).

La estructura es porosa y, por lo tanto, es permeable al medio celular, lo que permite que el medio celular entre en contacto con las células de la monocapa celular.

La superficie superior/superficie exterior de la estructura está recubierta con un material de matriz. La matriz puede estar formada por una o más proteínas de matriz extracelular. Los ejemplos no limitativos de proteínas de la matriz extracelular incluyen colágeno, laminina, entactina, tenascina y/o fibronectina. La estructura puede comprender un polímero natural, un polímero sintético biocompatible, un péptido sintético y/o un compuesto derivado de cualquier combinación del mismo. Un polímero natural útil con esta invención incluye, pero no se limita a, colágeno, quitosano, celulosa, agarosa, alginato, gelatina, elastina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de queratano y/o ácido hialurónico. Un polímero sintético biocompatible útil con esta invención incluye, pero no se limita a, celulosa, polisulfona, fluoruro de polivinilideno, acetato de polietileno covinílico, alcohol polivinílico, poliacrilato de sodio, un polímero de acrilato y/o polietilenglicol. La parte superior de la estructura se puede recubrir con laminina y colágeno.

El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 0.1 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 0.2 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 0.3 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 0.4 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 0.5 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 0.6 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 0.7 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 0.8 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 0.9 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 1.0 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 1.1 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 1.2 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 1.3 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 1.4 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 1.5 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz es de al menos aproximadamente 1.6 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 1.7 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 1.8 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 1.9 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.0 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.1 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.2 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.3 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.4 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.5 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.6 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.7 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.8 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 2.9 μm . El tamaño de poro del material de la estructura y/o matriz puede ser de al menos aproximadamente 3.0 μm .

El constructo de células vivas puede comprender una estructura que tiene una superficie superior/superficie exterior y una superficie inferior/superficie interior; y una monocapa continua de (a) células epiteliales mamarias primarias vivas, (b) una población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o (c) células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas en la superficie superior de la estructura, la monocapa continua de (a) células epiteliales mamarias primarias vivas, (b) población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o (c) células epiteliales mamarias inmortalizadas que tienen una superficie apical y una superficie basal (por ejemplo, las células forman una monocapa celular polarizada y confluyente), en la que el constructo comprende un compartimento apical por encima y adyacente a la superficie apical de la monocapa continua de las (a) células epiteliales mamarias primarias vivas, la (b) población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o las (c) células epiteliales mamarias inmortalizadas y un compartimento basal por debajo y adyacente a la superficie inferior de la estructura.

Biorreactor

En el presente documento se divulgan biorreactores que comprenden: (a) un compartimento apical que comprende un producto de leche cultivada; y (b) al menos un constructo de células vivas que comprende: (i) una estructura tridimensional que tiene una superficie exterior, una superficie interior que define una cavidad interior/cámara basal y una pluralidad de poros que se extienden desde la superficie interior hasta la superficie exterior; (ii) un material de matriz dispuesto sobre la superficie exterior de la estructura tridimensional; (iii) un medio de cultivo dispuesto dentro de la cavidad interior/cámara basal y en contacto fluido con la superficie interna; y (iv) una monocapa al menos 70% confluyente de células mamarias polarizadas dispuestas sobre el material de matriz, en la que las células mamarias se seleccionan del grupo que consiste en: células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias vivas, células progenitoras mamarias vivas, células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas, células mioepiteliales mamarias inmortalizadas vivas y células progenitoras mamarias inmortalizadas vivas; en el que la superficie apical de las células mamarias está en contacto fluido con el compartimento apical.

El biorreactor puede ser un biorreactor cerrado. La cámara apical puede estar sustancialmente aislada de la cavidad interior/compartimento basal.

Un biorreactor de fibra hueca es un ejemplo de biorreactor para uso con los métodos divulgados en el presente documento. El biorreactor de fibra hueca es un sistema de cultivo de perfusión continua de alta densidad que se aproxima mucho al entorno en el que crecen las células *in vivo*. Consiste en miles de estructuras tridimensionales semipermeables (es decir, fibras huecas) en una matriz paralela dentro de una carcasa de cartucho equipada con puertos de entrada y salida. Estos haces de fibras están encapsulados o sellados en cada extremo de modo que

cualquier líquido que entre por los extremos del cartucho necesariamente fluirá a través del interior de las fibras. Las células generalmente se siembran fuera de las fibras dentro del cartucho en el espacio extra capilar (ECS).

Tres características fundamentales diferencian el cultivo de células de fibra hueca de otros métodos: (1) las células están unidas a una matriz porosa tanto como lo están *in vivo*, no es una placa de plástico, un microportador u otro soporte impermeable, (2) el corte de peso molecular de la matriz de soporte puede controlarse, y (3) una relación de área superficial a volumen extremadamente alta (150 cm² o más por ml) que proporciona una gran área para el intercambio de metabolitos y gases para el crecimiento eficiente de las células huésped.

La estructura del biorreactor proporciona una matriz de fibra que permite la penetración de nutrientes, gases y otros componentes básicos de los medios, así como productos de desecho celular, pero no células, en la que las células pueden amplificarse. La tecnología de biorreactores de fibra hueca se ha utilizado para obtener una amplificación celular de alta densidad utilizando fibras huecas para crear una barrera semipermeable entre la cámara de crecimiento celular y el flujo del medio. Dado que el área superficial proporcionada por este diseño es grande, el uso de esta fibra como sustrato de cultivo permite la producción de un gran número de células. Las células que crecen en el entorno tridimensional dentro del biorreactor se bañan en medio fresco a medida que se perfunde a través de las fibras huecas.

Para replicar la topografía del intestino, Costello et al., desarrollaron un biorreactor tridimensional impreso que puede contener estructuras de vellosidades porosas a través de micromoldeado (Costello et al., 2017 Scientific Reports 7 (12515): 1-10). Esta estructura moldeada geométricamente compleja proporcionó la separación de los espacios apical y basolateral de una manera en la que el flujo de fluido expone las células epiteliales intestinales a tensiones de cizallamiento fisiológicamente relevantes (Costello et al., 2017). De manera similar, Morada et al., crearon un cultivo *in vitro* a largo plazo en un ambiente simulado similar al intestino usando un biorreactor de fibra hueca que permitió dos ambientes separados controlados (bifásicos) para proporcionar a las células huésped oxígeno y nutrientes de la capa basal, mientras permitía que se desarrollara un ambiente rico en nutrientes con bajo contenido de oxígeno en la superficie apical (Morada et al. 2016 International Journal for Parasitology 26: 21-29).

Al configurar el biorreactor de fibra hueca, existen consideraciones de diseño y parámetros que pueden variar según los objetivos asociados con la expansión de las células. Una consideración de diseño de este tipo es el tamaño de los poros en la pared de la fibra. Esto generalmente está diseñado para permitir el paso de nutrientes a las células, eliminar los desechos, proporcionar los productos deseados a las células (tales como factores de crecimiento), eliminar los productos deseados de las células y excluir ciertos factores que pueden estar presentes para que no lleguen a las células. En consecuencia, el tamaño de los poros de las paredes de fibra se puede variar para modificar qué componentes pasarán a través de las paredes. Por ejemplo, el tamaño de los poros puede permitir el paso de moléculas proteicas grandes, incluidos los factores de crecimiento, incluidos, pero sin limitarse a, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas. El experto en la materia entenderá cómo variar el tamaño de los poros dependiendo de los componentes que se desea que pasen a través de las paredes de la fibra para llegar a las células o para transportar material desde las células.

El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 0.1 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 0.2 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 0.3 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 0.4 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 0.5 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 0.6 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 0.7 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 0.8 µm. El tamaño de los poros puede ser de aproximadamente 0.9 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 1.0 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 1.1 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 1.2 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 1.3 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 1.4 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 1.5 µm. El tamaño de los poros puede ser de aproximadamente 1.6 µm. El tamaño de los poros puede ser de aproximadamente 1.7 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 1.8 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 1.9 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 2.0 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 2.1 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 2.2 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 2.3 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 2.4 µm. El tamaño de los poros puede ser de aproximadamente 2.5 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 2.6 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 2.7 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 2.8 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 2.9 µm. El tamaño de poro puede ser de aproximadamente 3.0 µm.

Métodos para elaborar constructos de células vivas

En el presente documento se divulgan métodos para elaborar un constructo de células vivas para producir un producto de leche cultivada. El método puede comprender (a) aislar células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias de explantes mamarios de tejido mamario (por ejemplo, tejido de mama, ubre, pezón), muestra de biopsia o leche materna cruda, para producir células epiteliales mamarias aisladas, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias; (b) cultivar las células epiteliales mamarias primarias aisladas, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias para producir una población mixta de células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias; (c) cultivar la población mixta de (b) en una estructura que tiene una superficie superior y una superficie inferior, para producir una monocapa polarizada de células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales y células progenitoras

mamarias de la población mixta en la superficie superior de la estructura, en la que la monocapa polarizada comprende una superficie apical y una superficie basal, produciendo así un constructo de células vivas para producir el producto de leche cultivada.

El método puede comprender: a) aislar células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias de explantes mamarios de tejido mamario (por ejemplo, tejido de mama, ubre, pezón), muestra de biopsia o leche materna cruda, para producir células mamarias aisladas células epiteliales, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias; (b) cultivar las células epiteliales mamarias primarias aisladas, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias para producir una población mixta de células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias; (c) clasificar la población mixta de células epiteliales mamarias primarias, células mioepiteliales y/o células progenitoras mamarias (por ejemplo, seleccionar las células epiteliales mamarias primarias) para producir una población de células epiteliales mamarias primarias; y (d) cultivar la población de células epiteliales mamarias primarias en una estructura que tiene una superficie superior y una superficie inferior, para producir una monocapa polarizada de células epiteliales mamarias primarias en la superficie superior de la estructura, en la que la monocapa polarizada comprende una superficie apical y una superficie basal, produciendo así un constructo de células vivas para producir el producto de leche cultivada.

El método puede comprender (a) cultivar células epiteliales mamarias inmortalizadas para producir un mayor número de células epiteliales mamarias inmortalizadas; (b) cultivar las células epiteliales mamarias inmortalizadas de (a) en una estructura, teniendo la estructura una superficie superior y una superficie inferior, para producir una monocapa polarizada de células epiteliales mamarias inmortalizadas en la superficie superior de la estructura, en la que la monocapa polarizada comprende una superficie apical y una superficie basal, produciendo así un constructo de células vivas para producir el producto de leche cultivada.

El cultivo de las células mamarias para el constructo de células vivas puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 39 °C (por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 35 °C, 35.5 °C, 36 °C, 36.5 °C, 37 °C, 37.5 °C, 38 °C, 38.5 °C o aproximadamente 39 °C, o cualquier valor o intervalo del mismo, por ejemplo, aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C, aproximadamente 36 °C a aproximadamente 39 °C, aproximadamente 36.5 °C a aproximadamente 39 °C, aproximadamente 36.5 °C a aproximadamente 37.5 °C, o aproximadamente 36.5 °C a aproximadamente 38 °C). El cultivo puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

El cultivo de las células mamarias para el constructo de células vivas puede llevarse a cabo a una concentración atmosférica de CO₂ de aproximadamente 4% a aproximadamente 6%, por ejemplo, una concentración atmosférica de CO₂ de aproximadamente 4 %, 4.25 %, 4.5 %, 4.75 %, 5 %, 5.25 %, 5.5 %, 5.75 % o 6 % o cualquier valor o intervalo del mismo, por ejemplo, aproximadamente 4% a aproximadamente 5.5%, aproximadamente 4.5% a aproximadamente 6%, aproximadamente 4.5% a aproximadamente 5.5%, o aproximadamente 5% a aproximadamente 6%). El cultivo se realiza a una concentración atmosférica de CO₂ de aproximadamente 5%.

El cultivo de las células mamarias para el constructo de células vivas puede comprender el cultivo en un medio de cultivo que se cambia aproximadamente cada día hasta aproximadamente cada 10 días (por ejemplo, cada día, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada 7 días, cada 8 días, cada 9 días, cada 10 días, o cualquier valor o intervalo del mismo, por ejemplo, aproximadamente cada día a cada 3 días, aproximadamente cada 3 días a cada 10 días, aproximadamente cada 2 días a cada 5 días). El cultivo puede comprender además cultivar en un medio de cultivo que se intercambia aproximadamente cada día hasta aproximadamente cada pocas horas hasta aproximadamente cada 10 días, por ejemplo, aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas hasta aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días o cualquier valor o intervalo del mismo. Por ejemplo, el cultivo comprende además cultivar en un medio de cultivo que se cambia cada 12 horas hasta cada 10 días, cada 10 horas hasta cada 5 días, o cada 5 horas hasta cada 3 días.

El constructo de células vivas se puede almacenar en un congelador o en nitrógeno líquido. La temperatura de almacenamiento depende del tiempo de almacenamiento deseado. Por ejemplo, la temperatura del congelador (por ejemplo, almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -80 °C o menos, por ejemplo, aproximadamente 0 °C, -10 °C, -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -100 °C o cualquier valor o intervalo del mismo) puede usarse si las células se van a utilizar dentro de 6 meses (por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses). Por ejemplo, se puede usar nitrógeno líquido (por ejemplo, almacenamiento a una temperatura de -100 °C o menos (por ejemplo, aproximadamente -100 °C, -110 °C, -120 °C, -130, -140, -150, -160, -170, -180, -190 °C, -200 °C o menos) para almacenamiento a largo plazo (por ejemplo, almacenamiento de 6 meses o más, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses, o 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más años).

Las células mamarias pueden aislarse y clasificarse mediante clasificación celular activada por fluorescencia, clasificación celular activada magnéticamente y/o clasificación celular microfluida.

Medios de cultivo basal y medios lactogénicos

El medio de cultivo puede comprender una fuente de carbono, un sistema de tamponamiento químico, uno o más aminoácidos esenciales, una o más vitaminas y/o cofactores y una o más sales inorgánicas. La fuente de carbono, el

sistema de tamponamiento químico, uno o más aminoácidos esenciales, una o más vitaminas y/o cofactores y/o una o más sales inorgánicas pueden ser de calidad alimentaria.

El medio de cultivo puede ser medio de cultivo lactogénico. El medio de cultivo puede comprender además prolactina (por ejemplo, prolactina de mamífero, por ejemplo, prolactina humana), ácido linoleico y alfa-linoleico, estrógeno y/o progesterona. Por ejemplo, el medio de cultivo comprende prolactina (o se agrega prolactina) en una cantidad de aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 ng/ml o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender prolactina (o se agrega prolactina) en una cantidad de aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 195 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 175 ng/ml, aproximadamente 45 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml, o aproximadamente 75 ng/ml a aproximadamente 190 ng/ml de medio de cultivo. El medio de cultivo puede comprender además otros factores para mejorar la eficiencia, incluidos, pero sin limitarse a, insulina, un factor de crecimiento epidérmico y/o una hidrocortisona.

El medio de cultivo puede comprender una fuente de carbono en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 15 g/l de medio de cultivo (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo), o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 g/l a aproximadamente 7, 8, 9 o 10, 11, 12, 13, 14 o 15 g/l del medio de cultivo. Los ejemplos no limitantes de una fuente de carbono incluyen glucosa y/o piruvato. Por ejemplo, el medio de cultivo comprende glucosa en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 12 g/l de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender glucosa en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 6 g/l, aproximadamente 4 g/l a aproximadamente 12 g/l, aproximadamente 2.5 g/l a aproximadamente 10.5 g/l, aproximadamente 1.5 g/l a aproximadamente 11.5 g/l, o aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 10 g/l de medio de cultivo. El medio de cultivo puede comprender glucosa en una cantidad de aproximadamente 1, 2, 3 o 4 g/l a aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 g/l o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 g/l hasta aproximadamente 7, 8, 9, 10, 11 o 12 g/l. El medio de cultivo puede comprender piruvato en una cantidad de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 15 g/l de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender piruvato en una cantidad de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 14.5 g/l, aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 15 g/l, aproximadamente 7.5 g/l a aproximadamente 10.5 g/l, aproximadamente 5.5 g/l a aproximadamente 14.5 g/l, o aproximadamente 8 g/l a aproximadamente 10 g/l de medio de cultivo. El medio de cultivo puede comprender piruvato en una cantidad de aproximadamente 5, 6, 7 u 8 g/l a aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 g/l o aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9 o 10 g/l hasta aproximadamente 11, 12, 13, 14 o 15 g/l.

El medio de cultivo puede comprender un sistema de tamponamiento químico en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l (por ejemplo, aproximadamente 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 o 4 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo) de medio de cultivo o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM (por ejemplo, aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 mM o cualquier valor o intervalo del mismo). El sistema de tamponamiento químico puede incluir, pero sin limitarse a, bicarbonato de sodio y/o ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etanosulfónico (HEPES). Por ejemplo, el medio de cultivo comprende bicarbonato de sodio en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 o 4 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender bicarbonato de sodio en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 3.75 g/l, aproximadamente 1.25 g/l a aproximadamente 4 g/l, aproximadamente 2.5 g/l a aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 1.5 g/l a aproximadamente 4 g/l, o aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 3.5 g/l de medio de cultivo. El medio de cultivo puede comprender HEPES en una cantidad de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo aproximadamente 10 mM o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender HEPES en una cantidad de aproximadamente 11 mM a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 12.5 mM a aproximadamente 22.5 mM, aproximadamente 15 mM a aproximadamente 20.75 mM, o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM.

El medio de cultivo puede comprender uno o más aminoácidos esenciales en una cantidad de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 5 mM (por ejemplo, aproximadamente 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 mM o cualquier valor o intervalo del mismo) o de aproximadamente 0.5, 1, 1.5, 2 mM a aproximadamente 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 mM. El uno o más aminoácidos esenciales pueden ser histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina y/o arginina. El medio de cultivo puede comprender arginina en una cantidad de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 5 mM, por ejemplo, aproximadamente 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 mM o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo comprende aminoácidos esenciales en una cantidad de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 4.75 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3.5 mM, aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 3.5 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, o aproximadamente 3.5 mM a aproximadamente 5 mM.

El medio de cultivo puede comprender una o más vitaminas y/o cofactores en una cantidad de aproximadamente 0.01 μ M a aproximadamente 50 μ M (por ejemplo, aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075 o 50 μ M o cualquier valor o intervalo

del mismo) o aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 o 0.9 μM a aproximadamente 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6 μM o aproximadamente 0.02, 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 μM hasta aproximadamente 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075, o 50 μM . Una o más vitaminas y/o cofactores pueden incluir, pero sin limitarse a, tiamina y/o riboflavina. Por ejemplo, el medio de cultivo comprende tiamina en una cantidad de aproximadamente 0.025 μM a aproximadamente 50 μM , por ejemplo., aproximadamente 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075 o 50 μM o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender tiamina en una cantidad de aproximadamente 0.025 μM a aproximadamente 45.075 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 40 μM , de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 35.075 μM , de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 0.05 μM a aproximadamente 45.5 μM . El medio de cultivo comprende riboflavina en una cantidad de aproximadamente 0.01 μM a aproximadamente 3 μM , por ejemplo aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, o 3 mM o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender riboflavina en una cantidad de aproximadamente 0.01 μM a aproximadamente 2.05 μM , aproximadamente 1 μM a aproximadamente 2.95 μM , aproximadamente 0.05 μM a aproximadamente 3 μM , aproximadamente 0.08 μM a aproximadamente 1.55 μM , o aproximadamente 0.05 μM a aproximadamente 2.9 μM .

El medio de cultivo puede comprender una o más sales inorgánicas en una cantidad de aproximadamente 100 mg/l a aproximadamente 150 mg/l de medio de cultivo (por ejemplo, aproximadamente 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 mg/l o cualquier valor o intervalo del mismo) o aproximadamente 100 mg/l a aproximadamente 150 mg/l de medio de cultivo (por ejemplo, aproximadamente 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 mg/l o cualquier valor o intervalo del mismo). Una o más sales inorgánicas pueden incluir, entre otras, calcio y/o magnesio. El medio de cultivo puede comprender calcio en una cantidad de aproximadamente 100 mg/l a aproximadamente 150 mg/l de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 mg/l o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender arginina en una cantidad de aproximadamente 100 mg/l a aproximadamente 125 mg/l, aproximadamente 105 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, aproximadamente 120 mg/l a aproximadamente 130 mg/l, o aproximadamente 100 mg/l hasta aproximadamente 145 mg/l de medio de cultivo. El medio de cultivo puede comprender magnesio en una cantidad de aproximadamente 0.01 mM a aproximadamente 1 mM, por ej., aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 0.91, 0.92, 0.93, 0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, 0.99 o 1 mM o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender magnesio en una cantidad de aproximadamente 0.05 mM a aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.01 mM a aproximadamente 0.78 mM, aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.03 mM a aproximadamente 0.75 mM, o aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 0.95 mM.

El medio de cultivo puede comprender una fuente de carbono en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 15 g/l de medio de cultivo (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo), o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 g/l a aproximadamente 7, 8, 9 o 10, 11, 12, 13, 14 o 15 g/l del medio de cultivo. La fuente de carbono puede incluir, pero sin limitarse a, glucosa y/o piruvato. El medio de cultivo puede comprender glucosa en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 12 g/l de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender glucosa en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 6 g/l, aproximadamente 4 g/l a aproximadamente 12 g/l, aproximadamente 2.5 g/l a aproximadamente 10.5 g/l, aproximadamente 1.5 g/l a aproximadamente 11.5 g/l, o aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 10 g/l de medio de cultivo. El medio de cultivo puede comprender piruvato en una cantidad de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 15 g/l de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender piruvato en una cantidad de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 14.5 g/l, aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 15 g/l, aproximadamente 7.5 g/l a aproximadamente 10.5 g/l, aproximadamente 5.5 g/l a aproximadamente 14.5 g/l, o aproximadamente 8 g/l a aproximadamente 10 g/l de medio de cultivo.

El medio de cultivo puede comprender un sistema de tamponamiento químico en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l (por ejemplo, aproximadamente 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 o 4 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo) de medio de cultivo o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM (por ejemplo, aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 mM o cualquier valor o intervalo del mismo). El sistema de tamponamiento químico puede incluir, pero sin limitarse a, bicarbonato de sodio y/o HEPES. Por ejemplo, el medio de cultivo comprende bicarbonato de sodio en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 o 4 g/l o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender bicarbonato de sodio en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 3.75 g/l, aproximadamente 1.25 g/l a aproximadamente 4 g/l, aproximadamente 2.5 g/l a aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 1.5 g/l a aproximadamente 4 g/l, o aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 3.5 g/l de medio de cultivo. El medio de cultivo puede comprender HEPES en una cantidad de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo, aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 mM o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender HEPES en una cantidad de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 25 mM, de

aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 12.5 mM a aproximadamente 22.5 mM, de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 20.75 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM. .

El medio de cultivo puede comprender uno o más aminoácidos esenciales en una cantidad de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 5 mM (por ejemplo, aproximadamente 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 mM o cualquier valor o intervalo del mismo) o de aproximadamente 0.5, 1, 1.5, 2 mM a aproximadamente 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 mM. Uno o más aminoácidos esenciales pueden ser arginina y/o cisteína. Por ejemplo, el medio de cultivo comprende arginina en una cantidad de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 5 mM, por ejemplo, aproximadamente 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 mM o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender arginina en una cantidad de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 4.75 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3.5 mM, aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 3.5 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, o aproximadamente 3.5 mM a aproximadamente 5 mM. Por ejemplo, el medio de cultivo comprende cisteína en una cantidad de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 5 mM, por ejemplo, aproximadamente 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 mM o cualquier valor o intervalo del mismo. . El medio de cultivo puede comprender cisteína en una cantidad de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 4.75 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3.5 mM, de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 3.5 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 3.5 mM a aproximadamente 5 mM.

El medio de cultivo puede comprender una o más vitaminas y/o cofactores en una cantidad de aproximadamente 0.01 μ M a aproximadamente 50 μ M (por ejemplo, aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075 o 50 μ M o cualquier valor o intervalo del mismo) o aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 o 0.9 μ M a aproximadamente 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6 μ M o aproximadamente 0.02, 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 μ M a aproximadamente 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075, o 50 μ M. Una o más vitaminas y/o cofactores incluyen, pero sin limitarse a, tiamina y/o riboflavina. Por ejemplo, el medio de cultivo comprende tiamina en una cantidad de aproximadamente 0.025 μ M a aproximadamente 50 μ M, por ejemplo, 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 49.025, 49.05, 49.075 o 50 μ M o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender tiamina en una cantidad de aproximadamente 0.025 μ M a aproximadamente 45.075 μ M, de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 40 μ M, de aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 35.075 μ M, de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 50 μ M, o de aproximadamente 0.05 μ M a aproximadamente 45.5 μ M. El medio de cultivo puede comprender riboflavina en una cantidad de aproximadamente 0.01 μ M a aproximadamente 3 μ M, por ejemplo, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, o 3 μ M o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender riboflavina en una cantidad de aproximadamente 0.01 μ M a aproximadamente 2.05 μ M, aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 2.95 μ M, aproximadamente 0.05 μ M a aproximadamente 3 μ M, aproximadamente 0.08 μ M a aproximadamente 1.55 μ M, o aproximadamente 0.05 μ M a aproximadamente 2.9 μ M.

El medio de cultivo puede comprender una o más sales inorgánicas en una cantidad de aproximadamente 100 mg/l a aproximadamente 150 mg/l de medio de cultivo (por ejemplo, aproximadamente 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 mg/l o cualquier valor o intervalo del mismo) o aproximadamente 100 mg/l a aproximadamente 150 mg/l de medio de cultivo (por ejemplo, aproximadamente 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 mg/l o cualquier valor o intervalo del mismo). Los ejemplos de una o más sales inorgánicas son calcio y/o magnesio. Por ejemplo, el medio de cultivo comprende calcio en una cantidad de aproximadamente 100 mg/l a aproximadamente 150 mg/l de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 mg/l o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender arginina en una cantidad de aproximadamente 100 mg/l a aproximadamente 125 mg/l, aproximadamente 105 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, aproximadamente 120 mg/l a aproximadamente 130 mg/l, o aproximadamente 100 mg /L hasta aproximadamente 145 mg/l de medio de cultivo. El medio de cultivo puede comprender magnesio en una cantidad de aproximadamente 0.01 mM a aproximadamente 1 mM, por ej., aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 0.91, 0.92, 0.93, 0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, 0.99 o 1 mM o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender magnesio en una cantidad de aproximadamente 0.05 mM a aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.01 mM a aproximadamente 0.78 mM, aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.03 mM a aproximadamente 0.75 mM, o aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 0.95 mM. .

La fuente de carbono, el sistema de amortiguamiento químico, uno o más aminoácidos esenciales, una o más vitaminas y/o cofactores y/o una o más sales inorgánicas pueden ser de calidad alimentaria.

El medio de cultivo puede ser un medio de cultivo lactogénico, por ejemplo, el medio de cultivo comprende además prolactina (por ejemplo, prolactina de mamífero, por ejemplo, prolactina humana). Por ejemplo, el medio de cultivo comprende prolactina (o se agrega prolactina) en una cantidad de aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 200 ng/l de medio de cultivo, por ejemplo, aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 ng/ml o cualquier valor o intervalo del mismo. El medio de cultivo puede comprender

prolactina (o se agrega prolactina) en una cantidad de aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 195 ng/ml, de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml, de aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 175 ng/ml, aproximadamente 45 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml, o aproximadamente 75 ng/ml a aproximadamente 190 ng/ml de medio de cultivo. Los métodos pueden comprender además la adición de prolactina al medio de cultivo, proporcionando así un medio de cultivo lactogénico. La prolactina puede ser producida por una célula microbiana y/o una célula humana que expresa una prolactina recombinante (por ejemplo, una prolactina que comprende una sustitución de un residuo de serina en la posición 179 del gen de la prolactina con aspartato (S179D), por ejemplo, S179D-prolactina). La adición de prolactina al medio de cultivo puede comprender el acondicionamiento del medio de cultivo mediante el cultivo de células que expresan y secretan prolactina, y la aplicación del medio de cultivo acondicionado que comprende prolactina a la superficie basal de la monocapa de células epiteliales mamarias primarias, la superficie basal de la monocapa de la población mixta, o la superficie basal de la monocapa de células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas.

El medio de cultivo puede comprender además otros factores para mejorar la eficiencia, incluidos, pero sin limitarse a, insulina, un factor de crecimiento epidérmico y/o una hidrocortisona. Se pueden añadir otros factores (por ejemplo, insulina, un factor de crecimiento epidérmico y/o una hidrocortisona) al medio de cultivo, por ejemplo, para mejorar la eficacia.

Métodos para producir productos lácteos cultivados

En el presente documento se divulgan métodos para preparar un producto de leche cultivada. El método comprende cultivar un constructo de células vivas divulgado en este documento en un biorreactor que comprende un compartimento basal y un compartimento apical, en el que el compartimento basal comprende un medio de cultivo y las células mamarias secretan el producto de leche cultivada en el compartimento apical.

El constructo de células vivas puede comprender una estructura que comprende una superficie superior y una superficie inferior y una monocapa polarizada de células epiteliales mamarias primarias vivas, una monocapa polarizada continua de una población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o una monocapa polarizada continua de células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas que tiene una superficie apical y una superficie basal, en la que la monocapa polarizada continua de células epiteliales mamarias primarias vivas, la monocapa polarizada continua de la población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, las células mioepiteliales y las células progenitoras mamarias y/o la monocapa polarizada continua de células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas están ubicadas en la superficie superior de la estructura.

La superficie inferior de la estructura puede estar adyacente al compartimento basal. La superficie apical de la monocapa polarizada continua de células epiteliales mamarias primarias vivas, la monocapa polarizada continua de la población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, y/o la monocapa polarizada continua de células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas pueden estar adyacentes al compartimento apical. La monocapa polarizada continua de células mamarias epiteliales primarias vivas, las células mamarias epiteliales primarias vivas de la monocapa polarizada continua de la población mixta de células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias y células progenitoras mamarias, o la monocapa polarizada continua de células epiteliales mamarias inmortalizadas pueden secretar leche a través de su superficie apical hacia el compartimento apical, produciendo así leche en el cultivo.

La monocapa polarizada de células mamarias epiteliales puede formar una barrera que divide el compartimento apical y el compartimento basal, en la que la superficie basal de las células mamarias se une a la estructura y la superficie apical se orienta hacia el compartimento apical.

El compartimento basal puede estar adyacente a la superficie inferior de la estructura. El compartimento basal puede comprender un medio de cultivo en contacto fluido con la superficie basal de la monocapa polarizada de células epiteliales mamarias (por ejemplo, la monocapa polarizada de células epiteliales mamarias primarias, la monocapa polarizada de la población mixta o la monocapa polarizada de células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas).

El medio de cultivo puede comprender una fuente de carbono, un sistema de tamponamiento químico, uno o más aminoácidos esenciales, una o más vitaminas y/o cofactores y una o más sales inorgánicas.

El biorreactor puede comprender un compartimento apical que es adyacente a la superficie apical de la monocapa. El compartimento apical puede estar adyacente a la superficie superior de la estructura.

La densidad celular total de células mamarias en el biorreactor puede ser de al menos 10^{11} células mamarias. La densidad celular total de células mamarias en el biorreactor puede ser de al menos 10^{12} células mamarias. La densidad celular total de células mamarias en el biorreactor puede ser de al menos 10^{13} células mamarias.

La densidad celular total de las células mamarias en el biorreactor puede ser de aproximadamente 20 a 55 células por $100 \mu\text{m}^2$. La densidad celular total de las células mamarias en el biorreactor puede ser de aproximadamente 20 células por $100 \mu\text{m}^2$. La densidad celular total de las células mamarias en el biorreactor puede ser de 25 células por $100 \mu\text{m}^2$. La densidad celular total de las células mamarias en el biorreactor puede ser de aproximadamente 30 células por 100

μm^2 . La densidad celular total de las células mamarias en el biorreactor puede ser de aproximadamente 35 células por $100 \mu\text{m}^2$. La densidad celular total de las células mamarias en el biorreactor puede ser de aproximadamente 40 células por $100 \mu\text{m}^2$. La densidad celular total de las células mamarias en el biorreactor puede ser de aproximadamente 45 células por $100 \mu\text{m}^2$. La densidad celular total de las células mamarias en el biorreactor puede ser de aproximadamente 50 células por $100 \mu\text{m}^2$. La densidad celular total de las células mamarias en el biorreactor puede ser de aproximadamente 55 células por $100 \mu\text{m}^2$.

El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 1.5 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 2 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 2.5 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 3 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 4 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 5 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 10 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 15 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 20 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 25 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 50 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 100 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 250 m^2 . El área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor puede ser de al menos aproximadamente 500 m^2 .

El biorreactor puede mantener una temperatura de aproximadamente 27°C a aproximadamente 39°C (por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 27°C , 28°C , 29°C , 30°C , 31°C , 32°C , 33°C , 34°C , 35°C , 35.5°C , 36°C , 36.5°C , 37°C , 37.5°C , 38°C , 38.5°C o aproximadamente 39°C , o cualquier valor o intervalo del mismo, por ejemplo, de aproximadamente 27°C a aproximadamente 38°C , de aproximadamente 36°C a aproximadamente 39°C , de aproximadamente 36.5°C a aproximadamente 39°C , de aproximadamente 36.5°C a aproximadamente 37.5°C , o de aproximadamente 36.5°C a unos 38°C). El biorreactor puede mantener una temperatura de aproximadamente 37°C .

El biorreactor puede tener una concentración atmosférica de CO_2 de aproximadamente 4% a aproximadamente 6%, por ejemplo, una concentración atmosférica de CO_2 de aproximadamente 4%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5%, 5.25%, 5.5%, 5.75% o 6% o cualquier valor o intervalo del mismo, por ejemplo, aproximadamente 4% a aproximadamente 5.5%, aproximadamente 4.5% a aproximadamente 6%, aproximadamente 4.5% a aproximadamente 5.5%, o aproximadamente 5% a aproximadamente 6%). El biorreactor puede tener una concentración atmosférica de CO_2 de aproximadamente 5%.

El biorreactor puede tener una concentración atmosférica de CO_2 de aproximadamente 4% a aproximadamente 6%, por ejemplo, una concentración atmosférica de CO_2 de aproximadamente 4%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5%, 5.25%, 5.5%, 5.75% o 6% o cualquier valor o intervalo del mismo, por ejemplo, aproximadamente 4% a aproximadamente 5.5%, aproximadamente 4.5% a aproximadamente 6%, aproximadamente 4.5% a aproximadamente 5.5%, o aproximadamente 5% a aproximadamente 6%). El biorreactor puede tener una concentración atmosférica de CO_2 de aproximadamente 5%.

Un método de acuerdo con la invención puede comprender monitorear la concentración de O_2 y CO_2 disueltos. La concentración de O_2 disuelto puede mantenerse entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25% o cualquier valor o intervalo del mismo (por ejemplo, aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25%). Por ejemplo, la concentración de O_2 disuelto se puede mantener entre aproximadamente 12% a aproximadamente 25%, aproximadamente 15% a aproximadamente 22%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20% o aproximadamente 22%. La concentración de CO_2 puede mantenerse entre aproximadamente 4% a aproximadamente 6%, por ejemplo, una concentración de CO_2 de aproximadamente 4%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5%, 5.25%, 5.5%, 5.75% o 6% o cualquier valor o intervalo del mismo, por ejemplo, aproximadamente 4% a aproximadamente 5.5%, aproximadamente 4.5% a aproximadamente 6%, aproximadamente 4.5% a aproximadamente 5.5%, o aproximadamente 5% a aproximadamente 6%). La concentración de CO_2 puede mantenerse en aproximadamente 5%.

El medio de cultivo se puede cambiar aproximadamente cada día hasta aproximadamente cada 10 días (por ejemplo, cada 1 día, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada 7 días, cada 8 días, cada 9 días, cada 10 días, o cualquier valor o intervalo del mismo, por ejemplo, aproximadamente cada día a cada 3 días, aproximadamente cada 3 días a cada 10 días, aproximadamente cada 2 días a cada 5 días). El medio de cultivo se puede cambiar aproximadamente cada día, hasta aproximadamente cada pocas horas hasta aproximadamente cada 10 días, por ejemplo, aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas hasta aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días o cualquier valor o intervalo del mismo. Por ejemplo, el medio de cultivo se cambia aproximadamente cada 12 horas hasta aproximadamente cada 10 días, aproximadamente cada 10 horas hasta aproximadamente cada 5 días, o aproximadamente cada 5 horas hasta aproximadamente cada 3 días.

Un método de la invención puede comprender monitorear la concentración de glucosa y/o la tasa de consumo de glucosa en el medio de cultivo y/o en el medio de cultivo lactogénico. La prolactina se puede añadir cuando la tasa de consumo de glucosa en el medio de cultivo es constante.

Un método de la invención puede comprender además aplicar resistencia eléctrica transepitelial (TEER) para medir el mantenimiento de la monocapa de células epiteliales. TEER mide una diferencia de voltaje entre los fluidos (por ejemplo, medios) en dos compartimentos (por ejemplo, entre los compartimentos apical y basal), en los que si la barrera entre los compartimentos pierde integridad, los fluidos en los dos compartimentos pueden mezclarse. Cuando hay mezcla de fluidos, la diferencia de voltaje se reducirá o eliminará; una diferencia de voltaje indica que la barrera está intacta. Tras la detección de una pérdida de voltaje por TEER, una estructura (por ejemplo, un filtro Transwell®, un biorreactor microestructurado, un tejido descelularizado, un biorreactor de fibra hueca, etc.) se inocula nuevamente con células adicionales y se deja tiempo para restablecer una barrera (por ejemplo, una monocapa) antes de reanudar la producción del producto de leche cultivada (por ejemplo, producción de leche).

Un método de la invención puede comprender además recoger el producto de leche cultivada del compartimento apical para producir el producto de leche cultivada recolectado. La recolección puede ser a través de un puerto, por gravedad y/o por vacío. Se puede unir un sistema de vacío a un puerto.

Un método de la invención puede comprender además congelar el producto de leche cultivada recogido para producir un producto de leche cultivada congelado y/o liofilizar el producto de leche cultivada recogido para producir un producto de leche cultivada liofilizado.

Un método de la invención puede comprender además envasar el producto de leche cultivada recogido, el producto de leche cultivada congelado y/o el producto de leche cultivada liofilizado en un recipiente.

Un método de la invención puede comprender además extraer uno o más componentes del producto de leche cultivada recogido. Los ejemplos no limitativos de componentes del producto de leche cultivada recogido incluyen contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y/o minerales de la leche. Los componentes del producto de leche cultivada recogido pueden liofilizarse y/o concentrarse para producir un producto componente de producto de leche cultivada liofilizado o concentrado. Los componentes del producto de leche cultivada recogido pueden concentrarse, por ejemplo, mediante filtración por membrana y/u ósmosis inversa. El producto componente del producto de leche cultivada liofilizado o concentrado se puede envasar en un recipiente, opcionalmente en el que el recipiente es estéril y/o un recipiente de calidad alimentaria. El recipiente puede sellarse al vacío. El recipiente puede ser un bote, un frasco, una botella, un saco, una caja o una bolsa.

Productos lácteos cultivados

En el presente documento se divulgan productos lácteos cultivados. El producto de leche cultivada puede ser un producto de leche cultivada estéril y estandarizado. El producto de leche cultivada puede ser para uso nutricional.

El producto de leche cultivada se puede producir mediante cualquier método divulgado en el presente documento.

La leche materna contiene concentraciones bajas pero medibles de contaminantes ambientales, productos químicos nocivos para la salud de la industria y productos de fabricación que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Los contaminantes ambientales se secretan en parte en la leche materna. Los niveles de contaminantes en la leche materna reflejan los del cuerpo de la madre y, por lo tanto, son ideales para monitorear los niveles de exposición. Los contaminantes ambientales tóxicos pueden transferirse de madre a hijo a través de la lactancia. Los contaminantes orgánicos persistentes (POP) son una familia de sustancias químicas lipofílicas estables que se bioacumulan en el tejido adiposo y crean una carga corporal tóxica duradera. La lactancia materna proporciona una fuente importante de exposición a los POP en las primeras etapas de la vida humana, cuyos efectos se desconocen.

El producto de leche cultivada descrito en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de uno o más contaminantes ambientales. El producto de leche cultivada descrito en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de contaminantes orgánicos persistentes (POP). El producto de leche cultivada descrito en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF), bifenilos policlorados (PCB) y pesticidas tales como DDT.

Los metales pesados tales como el mercurio, el plomo, el arsénico, el cadmio, el níquel, el cromo, el cobalto, el zinc y otros metales potencialmente tóxicos que se encuentran dispersos en el medio ambiente también tienen características bioacumulativas que se sabe que se acumulan en la leche humana y, por lo tanto, son motivo de preocupación para el lactante. El metal en la leche materna se origina a partir de fuentes exógenas, es decir, la absorción a través del aire contaminado, los alimentos y el agua potable, y la liberación endógena junto con oligoelementos esenciales. Por ejemplo, el plomo y el mercurio están igualmente dispersos en la cadena alimentaria humana, y su impacto en el desarrollo fetal está fuertemente determinado por la dieta y el estado nutricional de la madre. Las exposiciones a metales tóxicos tienen implicaciones significativas para la salud pública, incluso en concentraciones pequeñas y exposiciones agudas, estos metales siguen siendo tóxicos para los humanos. Un lactante puede estar expuesto a metales tóxicos en un período de mayor susceptibilidad. Los lactantes pueden estar expuestos

a metales pesados a través de la leche materna en exceso de lo que deberían, y la exposición puede tener consecuencias para la salud de los lactantes. Para los bebés en particular, estas exposiciones pueden tener un efecto adverso en el sistema nervioso central en desarrollo, dejando un defecto de por vida en sus capacidades cognitivas.

El producto de leche cultivada descrito en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de uno o más metales pesados, tales como arsénico, plomo, cadmio, níquel, mercurio, cromo, cobalto y zinc. El producto de leche cultivada como se describe en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de arsénico. El producto de leche cultivada como se describe en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de plomo. El producto de leche cultivada como se describe en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de cadmio. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de níquel. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de mercurio. El producto de leche cultivada como se describe en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de cromo. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de cobalto. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de zinc. El producto de leche cultivada como se describe en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de arsénico, plomo, cadmio, níquel, mercurio, cromo, cobalto y zinc.

Las proteínas alergénicas extrañas pueden ser difíciles de distinguir de las proteínas endógenas de la leche humana. Las proteínas alimentarias con potencial alergénico que se han detectado en la leche humana incluyen proteínas de huevo de gallina y maní. Hay ocho alérgenos alimentarios principales, conocidos como los 8 grandes, que son responsables de la mayoría de las reacciones alérgicas alimentarias graves en los Estados Unidos. La lista de 8 grandes está compuesta de los alérgenos de leche, huevos, pescado, mariscos crustáceos, frutos secos, cacahuetes, trigo y soja. Las proteínas que se sabe que causan alergia al huevo incluyen la ovomucoide, la ovoalbúmina y la conalbúmina. Las proteínas de cacahuate incluyen araquina 6, araquina 3, conaraquina, el alérgeno principal Arah1 y araquina Arah2. Como ejemplo del transporte de proteínas de la dieta materna a la leche, se ha demostrado que el consumo de un huevo por día conduce a concentraciones más altas del alérgeno de huevo de gallina ovoalbúmina (OVA) en la leche humana en comparación con las madres que evitan los huevos.

El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de uno o más alérgenos alimentarios. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de alérgenos de huevo, pescado, mariscos crustáceos, frutos secos, cacahuetes, trigo y soja. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de alérgenos de huevo. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de alérgenos de pescado. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de alérgenos de crustáceos. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de alérgenos de frutos secos. El producto de leche cultivada como se describe en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de alérgenos de cacahuate. El producto de leche cultivada como se describe en este documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de alérgenos de trigo. El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de alérgenos de soja.

El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de araquina 6, araquina 3, conaraquina, Arah1 y Arah2.

El producto de leche cultivada como se describe en el presente documento puede no comprender o puede estar sustancialmente libre de ovoalbúmina (OVA).

Habiendo descrito la presente invención, la misma se explicará con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Un sistema de cultivo celular diseñado para la recolección de leche debe apoyar la secreción compartimentada del producto de modo que la leche no esté expuesta al medio que proporciona nutrientes a las células. En el cuerpo, las células epiteliales productoras de leche recubren la superficie interior de la glándula mamaria como una monocapa continua. La monocapa está orientada de manera que la superficie basal se une a una membrana basal subyacente, mientras que la leche se secreta desde la superficie apical y se almacena en el compartimento luminal de la glándula, o alvéolo, hasta que se extrae durante el ordeño o la alimentación. Las uniones estrechas a lo largo de las superficies laterales de las células aseguran una barrera entre los tejidos subyacentes y la leche ubicada en el compartimento alveolar. Por lo tanto, *in vivo*, el tejido de la glándula mamaria está dispuesto de manera que la secreción de leche se compartimenta, y las propias células epiteliales mamarias establecen la interfaz y mantienen la absorción direccional de nutrientes y la secreción de leche.

La presente divulgación describe un aparato de cultivo celular que recapitula la capacidad de compartimentación de la glándula mamaria que se usa para recolectar leche de células epiteliales mamarias cultivadas fuera del cuerpo. Tal aparato puede incluir una estructura para soportar la proliferación de células mamarias en la interfaz entre dos compartimentos, de modo que la monocapa epitelial proporcione un límite físico entre el medio nutritivo y la leche secretada. Además de proporcionar una superficie para el crecimiento, la estructura brinda señales espaciales que guían la polarización de las células y asegura la direccionalidad de la absorción y la secreción. En el presente documento se describe la preparación, el cultivo y la estimulación de células epiteliales mamarias en un aparato de cultivo celular compartimentado para la producción y recolección de leche para uso nutricional (vease por ejemplo, la FIG. 1).

Preparación de células epiteliales mamarias. Las células epiteliales mamarias se obtienen de explantes quirúrgicos de tejido mamario diseccionado (por ejemplo, mama, ubre, pezón), muestra de biopsia o leche materna cruda. Generalmente, después de la disección quirúrgica del tejido mamario, cualquier tejido adiposo o estromal se elimina manualmente en condiciones asépticas, y el tejido restante de la glándula mamaria se digiere enzimáticamente con colagenasa y/o hialuronidasa preparada en un medio nutritivo químicamente definido, que debe estar compuesto de ingredientes que son "generalmente reconocidos como seguros" (GRAS). La muestra se mantiene a 37 °C con agitación suave. Después de la digestión, se recolecta una suspensión de células individuales u organoides, ya sea por centrifugación o vertiendo la muestra a través de un colador de células de nailon estéril. A continuación, la suspensión celular se transfiere a una placa de cultivo de tejidos recubierta con componentes de matriz extracelular apropiados (por ejemplo, colágeno, laminina, fibronectina).

Como alternativa, las muestras de explantes se pueden procesar en trozos pequeños, por ejemplo, trozándolas con un bisturí estéril. Los trozos de tejido se siembran en placa sobre una superficie adecuada, tal como una esponja de gelatina o una placa de cultivo de tejido de plástico recubierta con una matriz extracelular apropiada.

Las células sembradas en placa se mantienen a 37 °C en una incubadora humidificada con una atmósfera de 5% de CO₂. Durante la incubación, el medio se cambia aproximadamente cada 1 a 3 días y las células se subcultivan hasta que se logra un número suficiente de células viables para el procesamiento posterior, que incluye la preparación para el almacenamiento en nitrógeno líquido; desarrollo de líneas celulares inmortalizadas a través de la transfección estable de genes tales como SV40, TERT u otros genes asociados con la senescencia; aislamiento de tipos de células epiteliales mamarias, mioepiteliales y madre/progenitoras mediante, por ejemplo, clasificación celular activada por fluorescencia; y/o introducción en un aparato de cultivo de tejidos compartimentado para la producción y recolección de leche para consumo humano.

Cultivo de células epiteliales mamarias para la producción de leche. La leche para uso nutricional es producida por células epiteliales mamarias aisladas como se describió anteriormente y cultivadas en un formato que soporta la secreción compartimentada de manera que se mantiene la separación entre el medio nutritivo y el producto. El sistema se basa en la capacidad de las células epiteliales mamarias para establecer una monocapa continua con la polaridad apical-basal adecuada cuando se siembran en una estructura adecuada situada en la interfaz entre el compartimento apical, en el que se secreta la leche, y el compartimento basal, a través del cual se alimenta los medios nutrientes (véase, por ejemplo, la FIG. 2). Los filtros Transwell® colocados en placas de cultivo de tejidos, así como biorreactores basados en fibra hueca o estructuras microestructuradas, por ejemplo, se utilizan para soportar estas características.

Tras el aislamiento y la expansión de las células epiteliales mamarias, las células se suspenden en un medio nutritivo químicamente definido compuesto por componentes aptos para uso alimentario y se inoculan en un aparato de cultivo que ha sido recubierto previamente con una mezcla de proteínas de matriz extracelular, tales como colágeno, laminina y/o fibronectina. El aparato de cultivo celular es cualquier diseño que permita la absorción compartimentada de nutrientes y la secreción de producto de una monocapa epitelial confluyente polarizada. Los ejemplos incluyen fibra hueca y biorreactores de estructuras microestructuradas (véase, p.ej., las FIGURAS. 3 y 4, respectivamente). Las alternativas incluyen otros métodos de cultivo de tejido tridimensional, tales como la preparación de glándula mamaria descelsularizada como estructura, repoblada con células madre para producir un órgano funcional *in vitro*, o recolección de leche del lumen de organoides de células epiteliales mamarias o "mamoesferas" cultivadas en una matriz de hidrogel o en suspensión.

El aparato incluye una carcasa sellada que mantiene una temperatura de aproximadamente 37 °C en una atmósfera humidificada con aproximadamente un 5% de CO₂. Se controla la absorción de glucosa para evaluar el crecimiento del cultivo a medida que las células proliferan dentro del biorreactor. La estabilización del consumo de glucosa indica que las células han alcanzado un estado confluyente de contacto inhibido. La integridad de la monocapa se asegura mediante resistencia eléctrica transepitelial. Los sensores monitorean las concentraciones de O₂ y CO₂ disueltos en los medios en múltiples lugares. Una bomba computarizada hace circular los medios a través del biorreactor a una velocidad que equilibra el suministro de nutrientes con la eliminación de desechos metabólicos tales como el amoníaco y el lactato. Los medios se pueden reciclar a través del sistema después de eliminar los desechos utilizando la tecnología de suplementación y adaptación de lactato (Freund et al. 2018, Int. J. Mol. Sci. 19(2)) o pasando a través de una cámara de zeolita empaquetada.

Estimulación de la producción de leche. *In vivo* y en células epiteliales mamarias cultivadas, la prolactina estimula la producción y secreción de leche. En cultivo, la prolactina se puede suministrar de forma exógena en el medio nutritivo

- en concentraciones que se aproximan a las observadas en el cuerpo durante la lactancia, por ejemplo, de aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml. La prolactina purificada se puede obtener comercialmente; sin embargo, se emplean métodos alternativos para proporcionar prolactina o estimular la lactancia, incluida la expresión y purificación de la proteína recombinante a partir de cultivos de células microbianas o de mamíferos.
- 5 Alternativamente, los medios acondicionados preparados mediante el cultivo de células que expresan y secretan prolactina se pueden aplicar a cultivos de células epiteliales mamarias para estimular la lactancia. Los biorreactores se pueden configurar en serie de modo que los medios que pasan a través de un cultivo de células que expresan prolactina u otros suplementos de medios clave se acondicionen antes de la exposición a células mamarias cultivadas en un aparato de cultivo compartimentado como se describe.
- 10 Otros enfoques para aumentar la producción de leche y/o evitar el uso de prolactina exógena incluyen la manipulación molecular de las vías de señalización que están reguladas por la unión de la prolactina a su receptor en la superficie de las células epiteliales mamarias, tales como los siguientes: (a) expresión de constructos dirigidos a la modificación postraduccional de prolactina; (b) expresión de isotipos alternativos del receptor de prolactina; (c) expresión de un receptor de prolactina quimérico en el que el dominio extracelular se intercambia con el sitio de unión de un ligando
- 15 diferente; (d) introducción de un gen que codifica un receptor de prolactina constitutiva o condicionalmente activo o versiones modificadas de sus efectores secuencia abajo tales como STAT5 o Akt; (e) eliminación o modificación del gen circadiano PER2; y/o (f) enfoques moleculares destinados a aumentar la tasa de absorción de nutrientes en la superficie basal de la monocapa epitelial mamaria.
- 20 **Recolección de leche.** La leche secretada se recoge continuamente o en intervalos a través de, por ejemplo, un puerto instalado en el compartimento apical del aparato de cultivo. Se aplica vacío al puerto para facilitar la recolección y también contribuye a estimular la producción adicional. La leche recolectada se envasa en recipientes estériles y se sella para su distribución, se congela o liofiliza para su almacenamiento o se procesa para la extracción de componentes específicos.
- 25 En el presente documento se divulgan cultivos de células epiteliales mamarias para la producción de leche para uso nutricional. Además de la leche materna humana, estos cultivos celulares pueden usarse para producir leche de otras especies de mamíferos, por ejemplo, para consumo humano o uso veterinario. Debido a que anteriormente no ha sido posible producir leche fuera del cuerpo, esta tecnología puede generar nuevas oportunidades comerciales, además de proporcionar un modo alternativo de producción para los productos existentes. Los efectos sociales y económicos del desarrollo comercial de esta tecnología son amplios y de largo alcance. La producción de leche materna humana
- 30 a partir de células cultivadas puede proporcionar un medio para abordar la desnutrición infantil en comunidades con escasez de alimentos, brindar nutrientes esenciales a los bebés prematuros que no pueden amamantar y ofrecer a las madres una nueva opción para alimentar a sus bebés que proporciona una nutrición óptima con la conveniencia de la fórmula infantil. La producción de leche de vaca o cabra brinda la oportunidad de reducir los efectos ambientales, sociales y de bienestar animal de la agricultura animal. El proceso descrito en el presente documento aborda una brecha importante en el campo emergente de la agricultura celular e introduce una oportunidad para actualizar
- 35 drásticamente el suministro de alimentos humanos sin comprometer nuestro apego biológico y cultural a la más fundamental de nuestras fuentes de nutrición.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un producto de leche cultivada aislado a partir de células mamarias, comprendiendo el método:
 - (a) cultivar un constructo de células vivas en un biorreactor en condiciones que produzcan el producto de leche cultivada, comprendiendo dicho constructo de células vivas:
 - (i) una monocapa al menos 70% confluyente de células mamarias polarizadas, en la que las células mamarias se seleccionan del grupo que consta de: células epiteliales mamarias primarias vivas, células mioepiteliales mamarias vivas, células progenitoras mamarias vivas, células epiteliales mamarias inmortalizadas vivas, células mioepiteliales mamarias inmortalizadas vivas y células progenitoras mamarias inmortalizadas vivas, y en la que las células mamarias polarizadas comprenden una superficie apical a partir de la cual se secreta el producto de leche cultivada y una superficie basal;
 - (ii) una estructura tridimensional que tiene una superficie exterior, una superficie interior que define una cavidad interior/cámara basal y una pluralidad de poros que se extienden desde la superficie interior hasta la superficie exterior;
 - (iii) un material de matriz dispuesto sobre la superficie exterior de la estructura tridimensional, en el que la monocapa al menos 70% confluyente de células polarizadas está dispuesta sobre el material de matriz; y
 - (iv) un medio de cultivo dispuesto dentro de la cavidad interior/cámara basal y en contacto fluido con la superficie interna de la estructura tridimensional y la superficie basal de las células mamarias polarizadas, en el que el medio de cultivo sustancialmente no entra en contacto con el producto de leche cultivada; y
 - comprendiendo dicho biorreactor un compartimento apical que está en contacto fluido con la superficie apical de las células mamarias y está sustancialmente aislado de la cavidad interna del constructo de células vivas y el medio de cultivo celular dispuesto dentro de la cavidad interior; y
 - (b) aislar el producto de leche cultivada secretado en el compartimento apical de la superficie apical de las células mamarias.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la densidad celular total de las células mamarias dentro del biorreactor es de al menos 10^{11} .
3. El método de la reivindicación 1, en el que el área superficial total de las células mamarias dentro del biorreactor es de al menos 1.5m^2 .
4. El método de la reivindicación 1, en el que el material de matriz comprende una o más proteínas de la matriz extracelular.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ a aproximadamente $39\text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo se lleva a cabo a una concentración atmosférica de CO_2 de aproximadamente 4% a aproximadamente 6%.

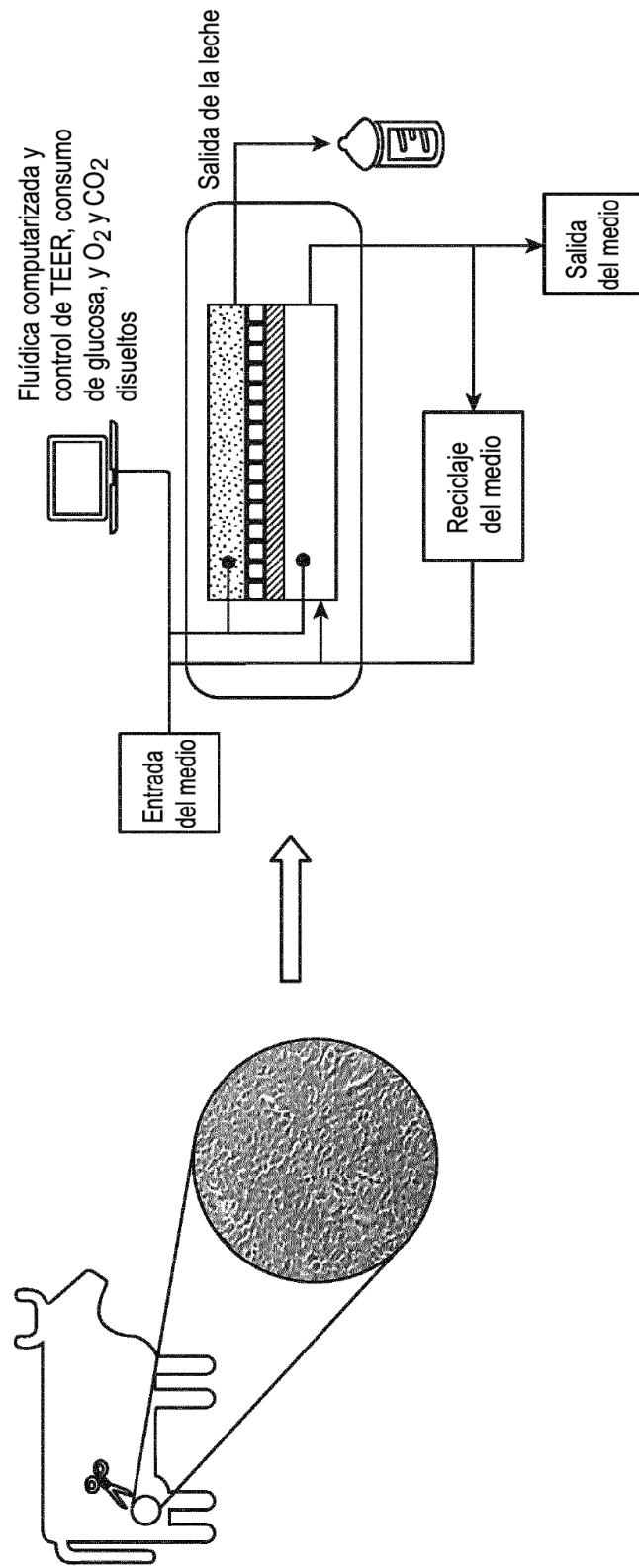


FIG. 1

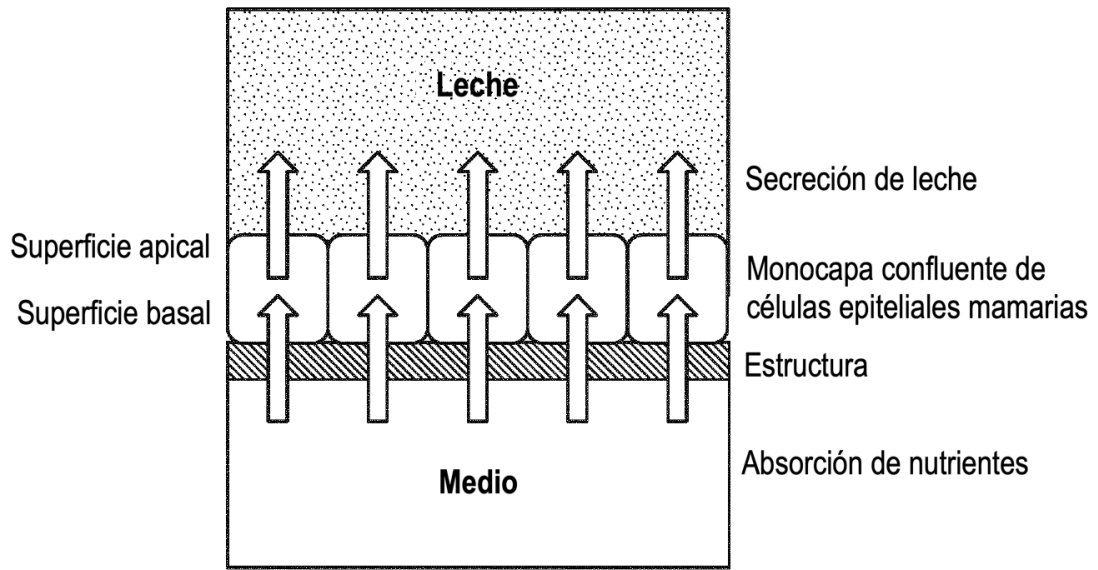


FIG. 2

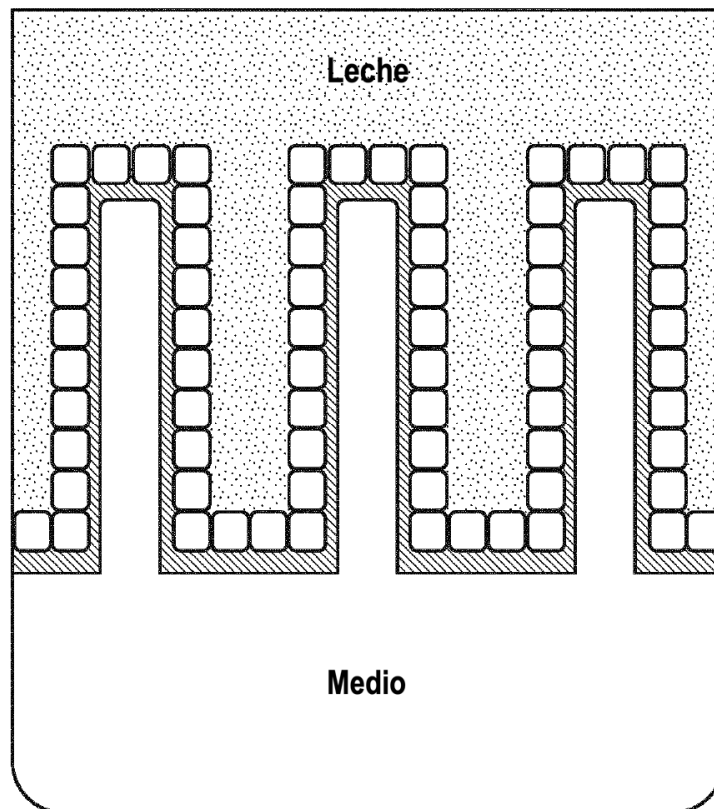


FIG. 3

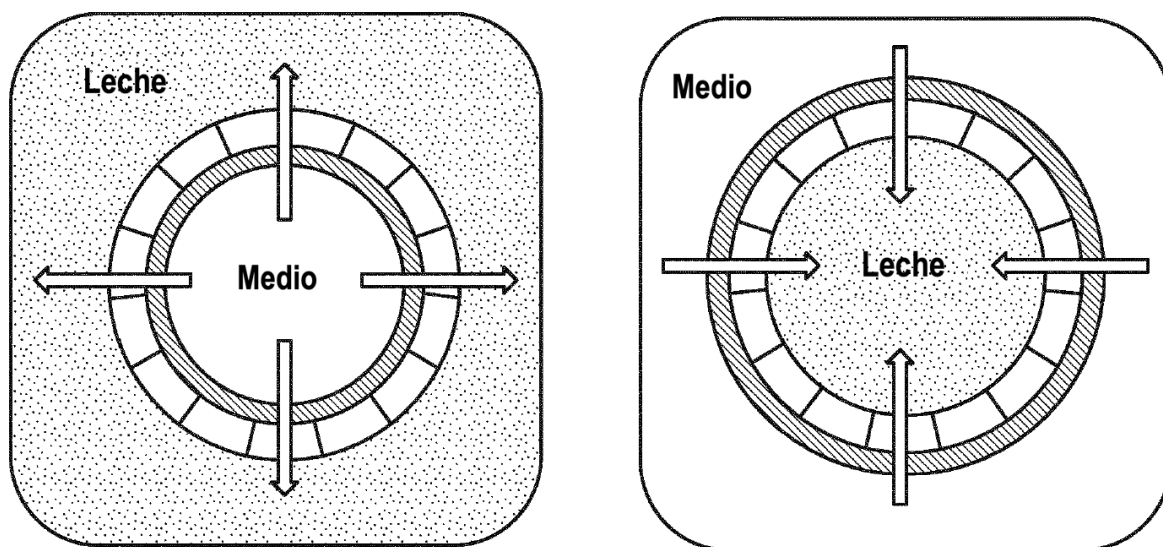
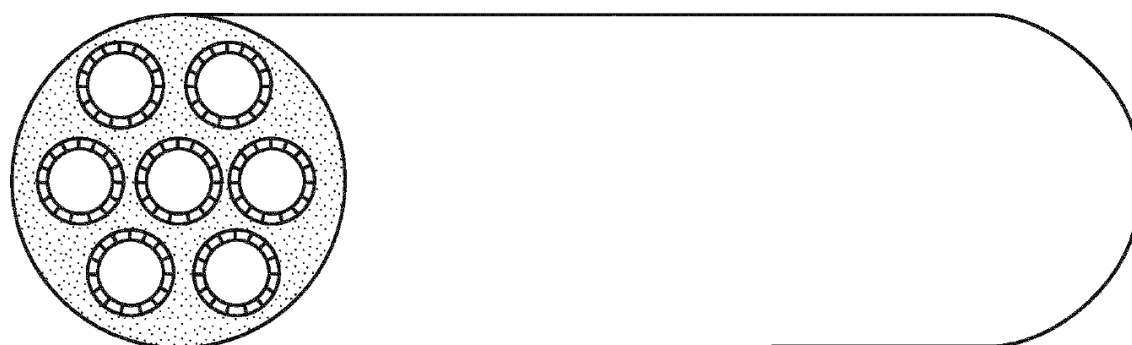


FIG. 4

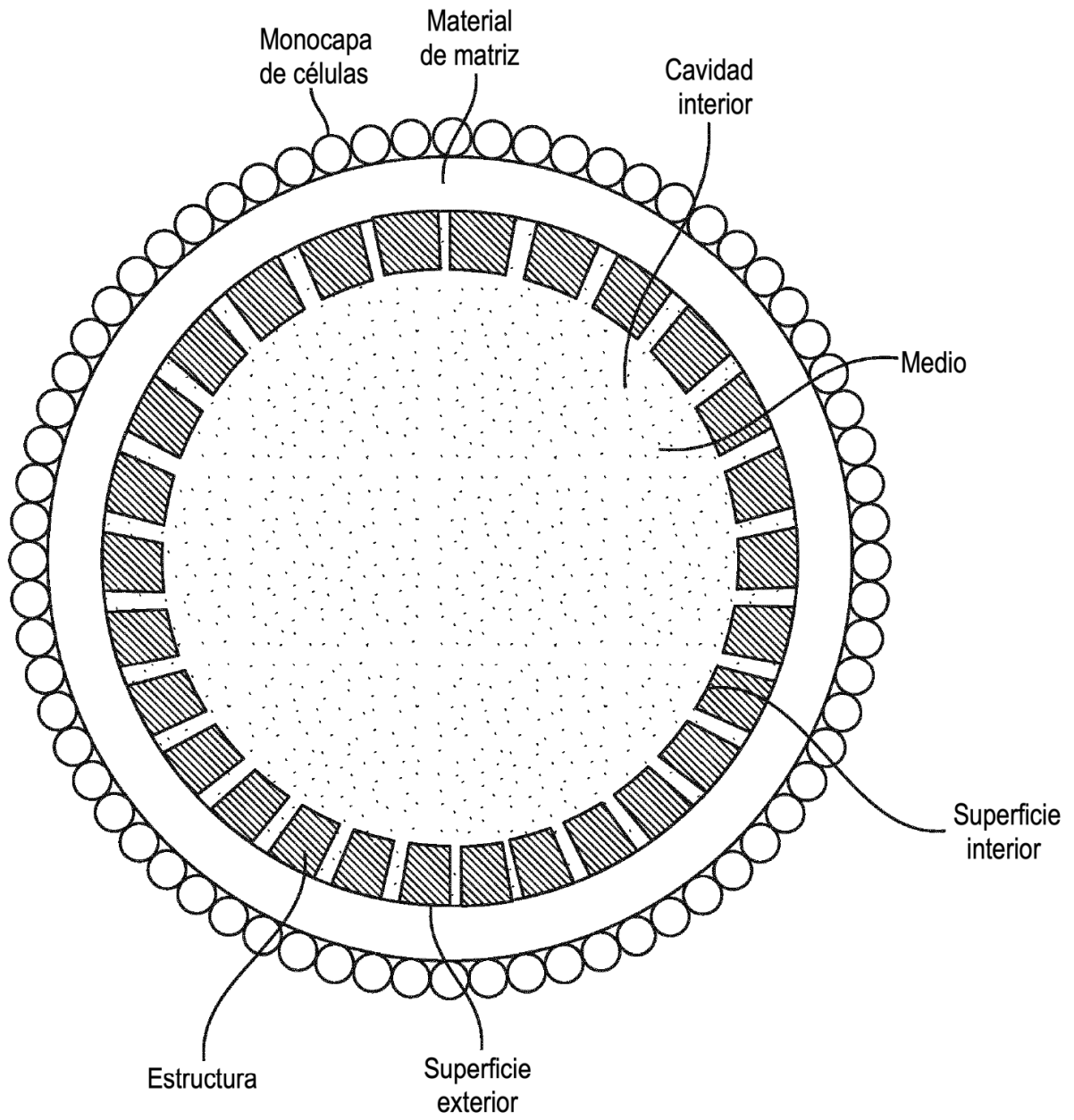


FIG. 5

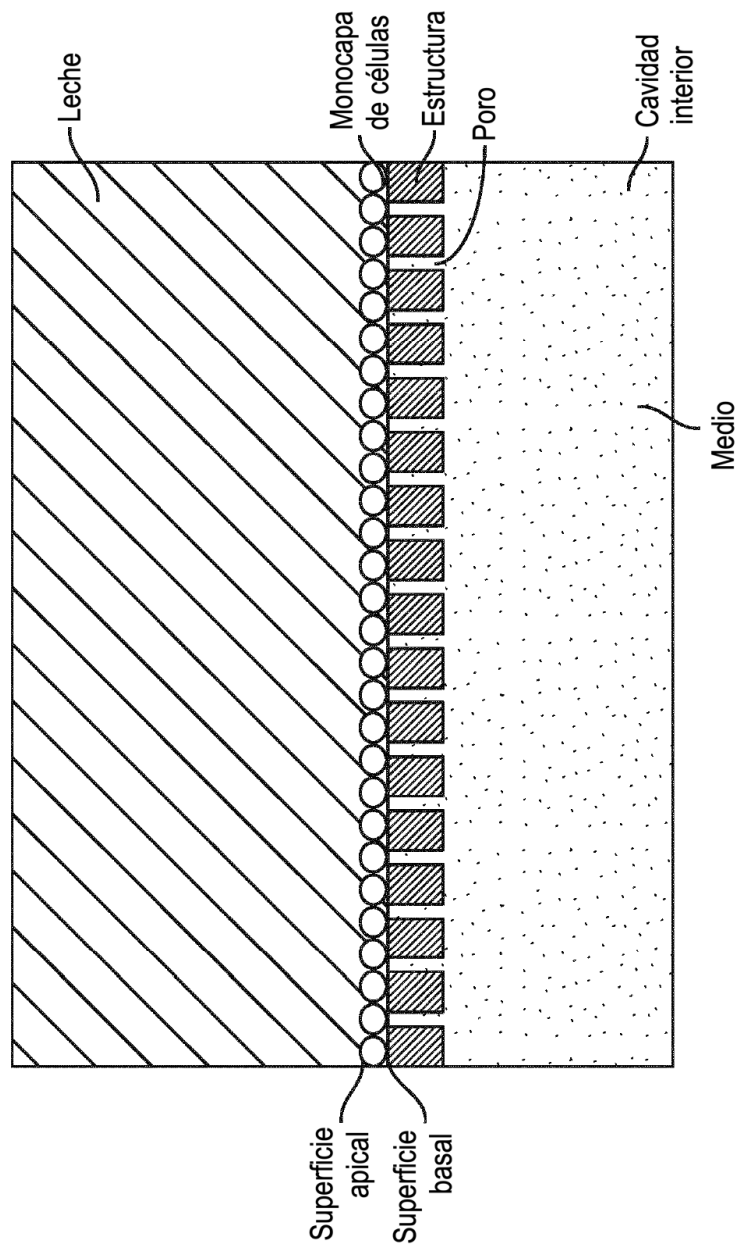


FIG. 6

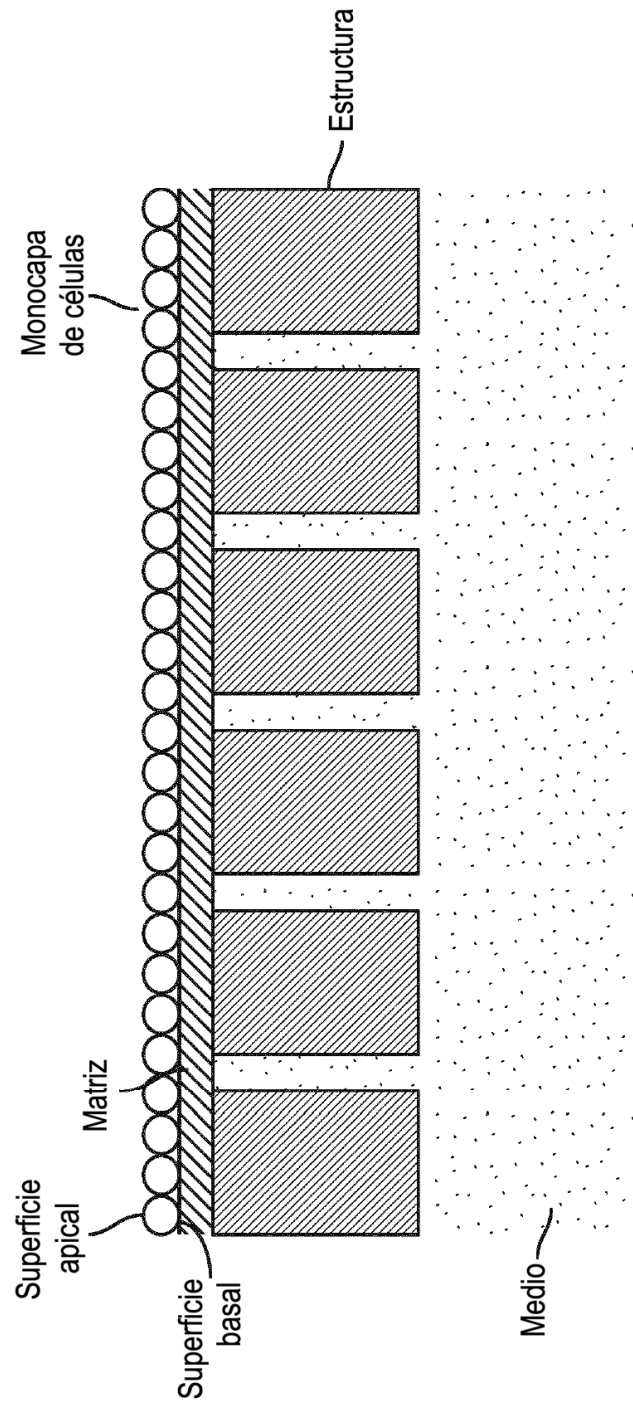


FIG. 7