



(51) МПК

*A61L 27/60* (2006.01)*A61K 35/36* (2006.01)*C12N 5/08* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006110711/15, 03.04.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
03.04.2006

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2007

(45) Опубликовано: 27.12.2008 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20040018149 A1, 29.01.2004. RU 2252787 C1, 27.05.2005. RU 2004131657 A, 20.09.2005. UA 68906 A, 15.08.2004. RU 2135191 C1, 27.08.1999. WO 97/41208 A, 03.11.1999. DAI N.T. et al. A co-cultured skin model based on cell support membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005, 329(3), p.905-8, PMID: 15752741, реф., [он-лайн], [найдено 29.10.2007], (см. прод.)

Адрес для переписки:

194021, Санкт-Петербург, ул. Политехническая,  
26, ООО "ЦКТ", генеральному директору В.В.  
Венгилевскому

(72) Автор(ы):

Калмыкова Наталья Владимировна (RU),  
Блинова Миральда Ивановна (RU),  
Юдинцева Наталия Михайловна (RU),  
Кухарева Любовь Васильевна (RU),  
Спичкина Ольга Георгиевна (RU),  
Пинаев Георгий Петрович (RU),  
Венгилевский Виталий Валерьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью  
"Центр клеточных технологий" (RU)

## (54) ЭКВИВАЛЕНТ КОЖИ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к средствам медицинского назначения, содержащим культуры клеток человека, и способы их получения. Сущность изобретения состоит в получении эквивалента кожи, который представляет собой матрицу из белков внеклеточного матрикса с клетками мезенхимы внутри нее и эпидермальными клетками на ее поверхности. В качестве матрицы используется коллагеновый или фибриновый гель. В качестве эпидермальных клеток используется

предварительно отселектированная популяция кератиноцитов с характеристиками стволовых клеток. Использование изобретения позволяет получить эквивалент кожи, содержащий клетки на стадии начального активного роста и обладающий длительным стимулирующим действием на миграцию и пролиферацию собственных клеток пациента. Эквивалент кожи предназначен для восстановления кожного покрова у пострадавших с обширными ожогами, трофическими язвами, пролежнями и другими видами ран. 2 н. 2 з.п. ф-лы.

(56) (продолжение):

найдено из базы данных PubMed. SAHOTA P.S. et al. Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis. Wound Repair Regen. 2003, 11(4), p.275-84, PMID: 12846915, реф., [он-лайн], [найдено 29.10.2007], найдено из базы данных PubMed.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 342 164** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

*A61L 27/60* (2006.01)

*A61K 35/36* (2006.01)

*C12N 5/08* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006110711/15, 03.04.2006**

(24) Effective date for property rights: **03.04.2006**

(43) Application published: **10.10.2007**

(45) Date of publication: **27.12.2008 Bull. 36**

Mail address:

**194021, Sankt-Peterburg, ul.  
Politekhnikeskaja, 26, OOO "TsKT",  
general'nomu direktoru V.V. Vengilevskomu**

(72) Inventor(s):

**Kalmykova Natal'ja Vladimirovna (RU),  
Blinova Miral'da Ivanovna (RU),  
Judintseva Natalija Mikhajlovna (RU),  
Kukhareva Ljubov' Vasil'evna (RU),  
Spichkina Ol'ga Georgievna (RU),  
Pinaev Georgij Petrovich (RU),  
Vengilevskij Vitalij Valer'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju  
"Tsentri kletochnykh tekhnologij" (RU)**

(54) **SKIN EQUIVALENT AND METHOD FOR ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: skin equivalent is produced that represents extracellular protein matrix, with mesenchymal cells within it and epidermal cells on its surface. As a matrix collagen or fibrin gel is used. As epidermal cells previously selected keratocyte population with stem cell character is used. Application of the invention

allows producing skin equivalent, containing cells in active initial growth stage. Skin equivalent is intended for cutaneous cover regeneration in patients with extensive burns, trophic ulcers, bedsores, and other kinds of wound.

EFFECT: prolonged stimulating effect on patient's cells migration and proliferation.

4 cl, 4 ex

RU 2 342 164 C2

RU 2 342 164 C2

Изобретение относится к медицине, в частности к средствам медицинского назначения, содержащим культуры клеток человека, и способы их получения.

Восстановление кожного покрова с использованием культивируемых клеток кожи имеет 30-летнюю историю. Начало заместительной кожной терапии было положено работами Рейнвальда и Грина по выделению и культивированию клеток эпидермиса человека - кератиноцитов (Rheinwald J.G. and Green H., 1975).

К настоящему времени разработаны различные виды эквивалентов кожи. Общим для них является принцип создания эквивалента по аналогии со структурой нормальной кожи: эквивалент состоит из дермального и эпидермального слоев. В основе дермального компонента - как правило, трехмерная коллагеновая матрица, содержащая мезенхимные клетки. Эпидермальный слой формируется на поверхности дермального за счет роста и дифференцировки кератиноцитов. Состав белков матрицы, клеточных элементов и способов формирования эпидермального слоя в разных моделях варьируют.

Одним из первых способов получения эквивалента кожи является способ, описанный Беллом (аналог 1) (Bell et al., 1983). В данном известном способе сначала формируется коллагеновый гель путем смешивания кислого раствора коллагена I типа, полной питательной среды и мезенхимных клеток - фибробластов. При физиологическом значении pH гель полимеризуется. Клетки, распластаваясь внутри геля, начинают его сокращать. Степень и скорость сокращения геля зависит от концентрации коллагена и клеток. Уменьшение размеров геля может происходить до 5 раз. Авторы полагали, что такое состояние геля, в котором коллагеновые фибриллы плотно расположены, а фибробласты находятся в состоянии покоя, т.е. не пролиферируют, соответствует нормальной дерме. На поверхность сформированного дермального эквивалента помещают кусочки кожи, из которых начинают мигрировать кератиноциты и формировать на поверхности геля слой эпидермальных клеток. Культивирование кератиноцитов осуществляется в двух режимах. Сначала клетки инкубируют в среде с низким содержанием кальция, способствующей пролиферации кератиноцитов, а затем при разрастании кератиноцитов по всей поверхности геля культивирование осуществляют на границе среда - воздух со сменой среды на высокое содержание кальция, т.к. именно в этих условиях более полно осуществляется дифференцировка кератиноцитов и формируется роговой слой. Весь процесс культивирования и формирования полного эквивалента кожи занимает около 3 недель. Именно в таком виде, максимально приближенном к структуре кожи *in vivo*, осуществляют пересадку эквивалента кожи. Однако недостатком данного решения является тот факт, что сокращение коллагенового геля приводит к тому, что клетки перестают делиться и уходят в апоптоз (Grirmell et al., 1999).

Известен способ формирования полного эквивалента кожи, в котором в качестве дермального компонента используют коллагеновую губку - коммерческий препарат, где коллагеновые фибриллы поперечно сшиты, что предотвращает сокращение губки фибробластами (аналог 2) (Eisenberg M., 2000). Сверху коллагеновую губку покрывают слоем непористого коллагена, который служит подложкой для роста кератиноцитов. Кератиноциты в данной модели предварительно выделяют из кожи ферментативным путем с использованием трипсина, культивируют *in vitro*, снимают с культуральных флаконов в виде суспензии и затем высевают на поверхность эквивалента в виде капель. Кератиноциты культивируют традиционным способом в двух режимах на границе среда - воздух в течение 14 дней до формирования многослойного пласта.

Формирование многослойного дифференцированного пласта кератиноцитов *in vitro* требует длительного культивирования и больших затрат средств. Авторы предыдущих аналогов полагали, что чем больше будет структурное сходство полученного эквивалента с интактной кожей, тем лучше произойдет его приживание. Однако данное условие является оправданным только в случае пересадки аутологичного материала, т.е. когда кожный эквивалент готовится из клеток самого пациента. В случае пересадки аллогенного материала истинного приживания эквивалента не происходит, т.к. пересаженный продукт со временем замещается клетками самого пациента (Zhao et al., 1992, Phillips T.J et

al., 2002). Ранозаживляющее действие эквивалента кожи основано на том, что фибробласты и кератиноциты оказывают стимулирующее воздействие на клетки кожи пациента, а коллагеновый матрикс служит готовой подложкой, по которой возможна миграция клеток. Распластываясь внутри геля, фибробласты начинают синтезировать ряд биологически активных факторов: фактор роста кератиноцитов (Rubin et al., 1995) и фактор роста гепатоцитов (Stoker et al., 1987), которые стимулируют пролиферацию и миграцию эпителиальных клеток. В свою очередь кератиноциты синтезируют интерлейкины, играющие важную роль в регуляции синтетической активности фибробластов. Роговой слой дифференцированных кератиноцитов выполняет функцию защиты и барьера от внешней среды. Дифференцированные кератиноциты прекращают синтезировать как белки внеклеточного матрикса, так и ростовые факторы, в них начинаются процессы образования роговой оболочки, соответственно они не обладают стимулирующим действием.

В другой модели кожного эквивалента кератиноциты наносят на поверхность коллагеновой матрицы в виде суспензии или на микроносителях (аналог 3) (Терских В.В. и др., 2005). Такой комплекс используют через несколько дней, в начале роста колоний кератиноцитов.

Популяция кератиноцитов состоит из клеток на различных стадиях дифференцировки, которые организованы в несколько слоев. Самый нижний, лежащий на базальной мембране, представляет собой клетки недифференцированные, которые, дифференцируясь, смещаются в вышележащие слои. Важно подчеркнуть, что популяция базальных клеток также гетерогенна: в ней различают стволовые клетки, которые составляют около 10% популяции, и клетки транзиторные (Potten and Morris, 1988). Обновление эпидермиса зависит от стволовых клеток, которые имеют максимальный пролиферативный потенциал, т.е. способны к самовоспроизведению на протяжении всей жизни индивидуума. Стволовые клетки дают начало транзиторным, которые через ряд делений уходят в дифференцировку. При ферментативном выделении получается общая популяция кератиноцитов, в которую входят клетки на разных стадиях дифференцировки. При посеве такой популяции к подложке прикрепляются не только клетки базального слоя, но и вышележащих слоев, которые имеют рецепторы к данному матриксу. Однако не все клетки начинают делиться, кератиноциты различаются по способности пролиферировать и образовывать колонии (Barrandon Y. and Green H., 1987). Различают голоклоны - колонии, которые формируются стволовыми клетками с высоким пролиферативным потенциалом, и параклоны - колонии, состоящие из клеток с низким пролиферативным потенциалом. После нескольких делений клетки таких параклонов переходят к терминальной дифференцировке. Таким образом, при посеве общей популяции кератиноцитов только небольшой процент клеток будет находиться в активном состоянии и оказывать стимулирующее действие на восстановление кожного покрова.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому изобретению является эквивалент кожи, при создании которого используют не всю популяцию кератиноцитов кожи, а только недифференцированные базальные стволовые клетки (Noll M. and Grave T., 2004). Данный эквивалент кожи выбран нами в качестве ближайшего аналога-прототипа.

Основу трехмерной модели кожи составляет коллагеновый гель с заключенными в него фибробластами. Коллагеновый гель готовят путем смешивания кислого раствора коллагена I типа с пятикратной концентрированной средой M 199, буфером HEPES, эмбриональной бычьей сывороткой и суспензией фибробластов. Также в коллагеновый гель добавляют протеогликан хондроитин-сульфат, являющийся компонентом внеклеточного матрикса кожи. Концентрация коллагена и клеток в конечном растворе составляют 3 мг/мл и  $1.5 \cdot 10^5$  соответственно. На поверхность коллагенового геля наносят раствор фибронектина. Фибронектин - это гликопротеин, который является адгезивным белком и опосредует взаимодействия клеток с матриксом. Готовый коллагеновый гель с фибробластами культивируют в течение 2-3 дней перед посевом стволовых кератиноцитов. Первые 1-3 дня культивирование эквивалента кожи

осуществляют в среде с низким 0,8 мМ содержанием кальция в присутствии 5% эмбриональной бычьей сыворотки, эпидермального фактора роста и экстракта из гипоталамуса быка. Полную дифференцировку кератиноцитов осуществляют в среде с высоким 1,8 мМ содержанием кальция на границе среда - воздух без ростовых добавок.

5 Авторы данного патента идентифицируют стволовые клетки кожи по окраске на кератин 19 и по наличию рецептора  $\beta 1$  интегрин. К недостаткам данного технического решения можно отнести выбор маркеров, по которым производится отбор стволовых клеток базального слоя. На сегодняшний день окончательно не определены маркеры, по которым достоверно  
10 можно идентифицировать стволовые клетки кожи. Показано, что базальные кератиноциты с высокой колонеобразующей способностью имеют повышенный уровень экспрессии  $\beta 1$  и  $\alpha 6$  субъединиц интегринов - рецепторов к белкам базальной мембраны (Jones et al., 1995). В качестве маркеров стволовых кератиноцитов также указывают наличие рецепторов к трансферрину и кератин 19 (Michel et al., 1996). Однако большинство из этих  
15 маркеров имеется также и у транзитных клеток. Наиболее достоверным критерием, по которому можно определить стволовые клетки кожи, является транскрипционный фактор р63 (Pelegrini et al., 2001). Другим недостатком данного технического решения является традиционное культивирование на границе среда - воздух, что стимулирует дифференцировку кератиноцитов и образование рогового слоя. Кроме того, этот способ  
20 формирования эквивалента является длительным и дорогостоящим, т.к. на образование многослойного пласта эпидермиса уходит более 2-х недель и требуется применение ростовых добавок и сред различного состава.

Известно, что покоящиеся кератиноциты и кератиноциты, активированные к пролиферации, имеют существенные различия, которые отражаются на составе рецепторов к белкам внеклеточного матрикса, способности к миграции и синтетической  
25 активности (Grinnell F., 1992). Основываясь на известном стимулирующем действии эквивалента кожи, предлагается пересадку продукта осуществлять не на стадии, которая характеризуется покоем фибробластов и полной дифференцировкой эпидермиса, а в стадии активного роста как кератиноцитов, так и фибробластов. Таким образом, основным отличием предлагаемого изобретения от известных аналогов является его применение не  
30 на стадии полной дифференцировки многослойного пласта кератиноцитов, а на стадии активного роста клеток кожи.

Решаемой задачей и техническим результатом предлагаемого изобретения является создание эквивалента кожи, содержащего клетки на стадии начального активного роста и обладающего длительным стимулирующим действием на миграцию и пролиферацию  
35 собственных клеток пациента, и способ получения такого эквивалента.

Целевой продукт в конкретных условиях представляет собой эквивалент кожи, в основе которого - матрица из белков внеклеточного матрикса с клетками мезенхимы внутри нее и эпидермальными клетками на ее поверхности. В качестве матрицы используется  
40 коллагеновый или фибриновый гель. В качестве эпидермальных клеток используется отселектированная популяция кератиноцитов, клетки которой обладают максимальным пролиферативным потенциалом и характеризуются наличием специфического маркера р63. Это достигается предварительной кратковременной адгезией общей суспензии кератиноцитов на коллаген IV типа. Было показано, что кератиноциты, прикрепляющиеся к коллагену IV типа за 15 мин, обладают характеристиками стволовых клеток - дают начало  
45 колониям и окрашиваются на р63 - маркер стволовых кератиноцитов. Транскрипционный фактор р63 выявляется при иммунофлюоресцентной окраске кератиноцитов коммерческими моноклональными антителами (clon 4A4, Sigma).

В частном конкретном случае способ получения эквивалента кожи осуществляется следующим образом. Сначала формируется трехмерная матрица, состоящая из белков  
50 внеклеточного матрикса и мезенхимных клеток. В качестве основного белкового компонента такой матрицы используется коллагеновый гель. Коллагеновый гель готовится путем смешивания кислого раствора коллагена I типа с десятикратной ростовой средой M199 и 0,34 М NaOH до получения нейтрального раствора и последующим введением в

него суспензии аллогенных фибробластов кожи человека. Используемые концентрация клеток (100 тыс./мл) и коллагена (1,5-2,5 мг/мл) не позволяет гелю сокращаться в течение недели, таким образом, клетки внутри геля остаются в активном состоянии.

5 Популяция стволовых кератиноцитов высевается на поверхность геля через сутки после его приготовления. Сначала из кожи человека ферментативным путем выделяется общая популяция кератиноцитов. Для этого кусочки кожи здоровых доноров, полученные в результате косметологических операций, помещают в раствор 0,5% диспазы и 0,2% коллагеназы на 12 часов при 4°C. После ферментативного расщепления базальной мембраны эпидермис механическим путем отделяется от дермы и подвергается действию 10 трипсина 0,125% концентрации (10 мин при 37°C). Затем полученная суспензия высевается на культуральную посуду, покрытую коллагеном IV типа. Раствор коллагена IV типа в концентрации 10 мкг/мл наносится на поверхность посуды на 1 час при комнатной температуре. Через 15 мин неприкрепившиеся клетки удаляются. Прикрепившиеся клетки снимаются версеном, суспендируются в ростовой среде и высеваются на поверхность 15 сформированного геля. Гель заливается ростовой средой, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Через 2-3 дня начинается активный рост кератиноцитов и формирование колоний. Весь технологический процесс приготовления эквивалента кожи занимает 3-4 дня, что, во-первых, существенно сокращает сроки подготовки продукта к использованию, и, во-вторых, снижает риск контаминации продукта микроорганизмами, 20 который может произойти в процессе его культивирования.

Такой эквивалент кожи пригоден для использования немедленно или в течение 2-3 дней при его хранении в условиях 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Хотя в частном конкретном случае приведен предпочтительный вариант осуществления изобретения, в пределах сущности и объема изобретения возможны различные варианты, 25 охватываемые приводимой формулой изобретения. Так, в качестве мезенхимных клеток могут использоваться эмбриональные или постнатальные фибробласты человека или мезенхимные стволовые клетки красного костного мозга (аутологичные или аллогенные). В качестве матрицы может использоваться фибриновый гель. Фибриновый гель готовится из фибриногена или плазмы крови при смешивании с тромбином. При этом может 30 использоваться как плазма крови самого пациента, так и донора. В качестве минорных компонентов в гель могут добавляться такие элементы внеклеточного матрикса, как фибронектин и ламинин. Известно, что фибронектин ингибирует начальную дифференцировку кератиноцитов, а ламинин является компонентом базальной мембраны и стимулирует прикрепление и миграцию кератиноцитов. Матриксные белки в 35 концентрациях 5-10 мкг/см<sup>2</sup> наносятся на поверхность сформированного геля (коллагенового или фибринового) перед посевом кератиноцитов,

Пример 1. Адгезивная селекция популяции базальных кератиноцитов с характеристиками стволовых клеток.

40 Кератиноциты выделяют из кожи взрослых доноров по модифицированному методу Рейнвальда (Rheinwald J., Green H., 1975). В качестве источника эпидермальных клеток используется кожа лица, полученная в результате косметологических операций. Кусочки кожи в течение ночи инкубируют в растворе диспазы II в концентрации 0.5% (Roche Diagnostics GmbH Mannheim) и коллагеназы гидробионтов в концентрации 0.2% (ОАО "Технология", С-Петербург) при температуре 4°C, после чего производится механическое 45 отделение эпидермиса от дермы. Для получения суспензии клеток эпидермис помещают в раствор трипсина в концентрации 0.125% (Биолот) и версена в концентрации 0.02% (Биолот), на 10 мин при 37°C. Действие фермента ингибируют добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone). Полученную суспензию клеток осаждают при 50 300 g в течение 5 минут, супернатант удаляется, а осадок клеток суспендируется в среде DMEM/F12 (3:1) (ICN).

Для селективной адгезии кератиноцитов поверхность культуральной посуды покрывается раствором коллагена IV типа (10 мкг/мл) на 1 час при комнатной температуре. Суспензия кератиноцитов высевается в концентрации  $1 \times 10^6 / \text{см}^2$  и

инкубируется при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 15 мин. После этого неприкрепившиеся клетки удаляются, а прикрепившиеся снимаются версеном, суспендируются в ростовой среде DMEM/F12(ICN), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), наносятся на поверхность заранее сформированного геля и культивируются 2-3 дня до формирования колоний кератиноцитов.

Пример 2. Приготовление эквивалента кожи на основе коллагенового геля.

Для приготовления коллагенового геля используется уксусный раствор коллагена I типа, полученный мягкой кислотной экстракцией сухожилий хвостов крыс, обеспечивающей сохранение нативной структуры молекул коллагена.

Раствор коллагена смешивается с десятикратной средой M199 (Sigma) и после подведения pH до физиологического значения добавлением 0.34 M NaOH, в раствор вводится суспензия мезенхимных клеток в ростовой среде. Конечная концентрация клеток в геле 70-100 тыс./мл и коллагена 1,5-2,5 мг/мл. Приготовление растворов осуществляется на льду во избежание преждевременной полимеризации геля.

Приготовленная смесь разливается по чашкам Петри (диаметром 3 или 5 см) и помещается в CO<sub>2</sub> инкубатор на 15-20 мин для полимеризации геля. После полимеризации на поверхность геля наносится предварительно отселектированная популяция стволовых кератиноцитов в ростовой среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотик гентамицин (0,8 мкг/мл). Эквивалент кожи культивируется 2-3 дня в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Пример 3. Приготовление эквивалента кожи на основе фибринового геля с использованием плазмы крови человека.

Для приготовления фибринового геля используется плазма крови, полученная в результате плазмофереза. Суспензия мезенхимных клеток в ростовой среде в концентрации  $2 \times 10^5$ /мл смешивается с плазмой крови в соотношении 1:1. Приготовленная смесь разливается по чашкам Петри необходимой площади (диаметром 3 или 5 см), к каждой аликвоте добавляется тромбин (70 ед./1 мл), смесь аккуратно пипетируется и помещается в CO<sub>2</sub> инкубатор на 15-20 мин для полимеризации геля. После полимеризации на поверхность геля наносится предварительно отселектированная популяция стволовых кератиноцитов в ростовой среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотик гентамицин (0,8 мкг/мл). Эквивалент кожи культивируется 2-3 дня в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Пример 4. Приготовление эквивалента кожи на основе фибринового геля с использованием препарата фибриногена.

Для приготовления фибринового геля используется коммерческий человеческий фибриноген. Фибриноген разводится в дистиллированной воде до концентрации 10 мг/мл и хранится при - 20°C. Мезенхимные клетки в ростовой среде смешиваются с раствором фибриногена при температуре 30°C до конечной концентрация фибриногена 2.5 мг/мл и клеток  $1 \times 10^5$  кл./мл. Приготовленная смесь разливается по чашкам Петри необходимой площади (диаметром 3 или 5 см), к каждой аликвоте добавляется тромбин (100 ед./1 мл), аккуратно пипетируется и помещается в CO<sub>2</sub> инкубатор на один час для полимеризации геля. После полимеризации на поверхность геля наносится предварительно отселектированная популяция стволовых кератиноцитов в ростовой среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотик гентамицин (0,8 мкг/мл). Эквивалент кожи культивируется 2-3 дня в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Источники информации

Терских В.В., Киселев И.В., Смирнов С.В., Роговая О.С., Васильев А.В. Биологический активный комплекс для органогенеза. Патент RU 2254146. 2005.06.20.

Barrandon Y. and Green H. Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 2302-2306.

Bell E., Sher S., Hull B., Merrill C., Rosen S. et al. The reconstitution of living skin. 1983. J. Invest. Dermatol. 81: 2s-10s.

Eisenberg M. Composite living skin equivalent. Патент US 6039760. 2000.03.21.

Grinnell F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. 1992. J. Cell Sci. 101: 1-5.

Grinnell F., Zhu M., Carlson M.A., Abrans J.M. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblast in a model of regressing granulation tissue.

5 1999. Exp. Cell Res. 248: 608-619.

Jones PR, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. 1995. Cell. 80: 83-93.

Noll M., Grave T. Three-dimensional skin model. Патент US 2004018149. 2004.01.29.

Michel M., Torok N., Godbout MJ., Lussier M., Gaudreau P., Royal A., Germain L.

10 Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites and their number varies with donor age and culture stage. 1996. J. Cell Sci. 109: 1017-1028.

Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O., Martinelli E., Fantozzi I., Bondanza S., Ponzin D., Mckeeon F., de Luca M. p63 identifies keratinocytes stem cells. 2001. Proc.

15 Natl. Acad. Sci. 98: 3156-3161.

Phillips T.J., Manzoor J., Rojas A., Isaacs C., Carson P., Sabolinski M., Young J., Falanga V. The longevity of bilayered skin substitute after application to venous ulcers. 2002. Arch.Dermatol. 138: 1079-1081.

Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. 1988. J.Cell Sci. 10 (suppl): 45-62.

20 Rheinwald J.G., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. 1975. Cell. 6: 331-344.

Rubin J.S., Bottaro D.P., Chetid M., Miki T., Ron D., Cheon G., Taylor WG., Fortney E., Sakata H., Finch P.W. Keratinocyte growth factor. 1995. Cell Biol. Int. 19 (5): 399-411.

25 Stoker M., Gherarti E., Rennyman M., Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell motility. 1987. Nature. 327: 239-242.

Zhao Y.B., Zhao X.F., Li A. Clinical observation and methods for identifying the existence of cultured epidermal allografts. 1992. Burns. 18: 4-8.

#### Формула изобретения

30 1. Эквивалент кожи, представляющий собой матрицу из белков внеклеточного матрикса с клетками мезенхимы внутри нее и эпидермальными клетками на ее поверхности, отличающийся тем, что эпидермальные клетки представлены популяцией базальных стволовых кератиноцитов, причем оба типа клеток находятся в стадии активного роста.

35 2. Способ формирования эпидермального слоя на поверхности белковой матрицы, содержащий базальные стволовые кератиноциты, отличающийся тем, что селекцию стволовых клеток кожи осуществляют путем кратковременной адгезии на коллаген IV типа, причем конечный продукт характеризуется наличием специфического маркера р63.

3. Способ формирования по п.2, отличающийся тем, что базальные стволовые кератиноциты являются аллогенными.

40 4. Способ формирования по п.2, отличающийся тем, что базальные стволовые кератиноциты являются аутологичными.

45

50