



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0120548  
(43) 공개일자 2020년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/50 (2006.01) A61K 35/44 (2015.01)  
A61K 9/00 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)  
C12N 5/071 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 9/5036 (2013.01)  
A61K 35/44 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-0044120  
(22) 출원일자 2020년04월10일  
심사청구일자 2020년04월10일  
(30) 우선권주장  
1020190042505 2019년04월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
윤영섭  
서울특별시 서대문구 수색로 100, 210-902  
조승우  
서울특별시 서초구 서초대로65길 13-10 서초래미안아파트 106동 2304호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인인벤싱크

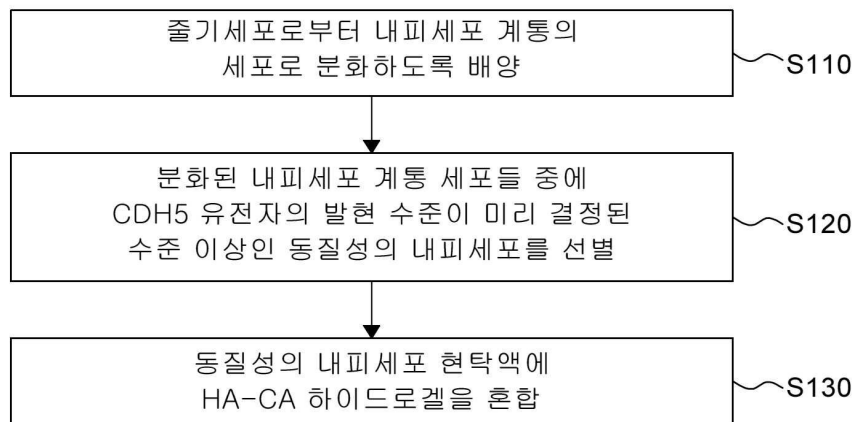
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 혈관 신생 촉진용 조성물 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 명세서에서는 줄기세포로부터 분화된 내피세포와 HA-CA 하이드로겔을 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물과 이의 제조 방법이 제공된다. 또한, 본 명세서에서는 본 발명이 제공하는 혈관 신생 촉진용 조성물을 포함한, 심혈관계 질환에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 세포 치료제 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

**A61K 9/0019** (2013.01)

**A61P 9/00** (2018.01)

**C12N 5/069** (2013.01)

**C12N 2506/02** (2013.01)

(72) 발명자

**박미선**

서울특별시 서대문구 통일로 319, 106동 805호

**이신정**

서울특별시 동작구 여의대방로62길 8 대방동신일해  
피트리 101동 604호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465026423
과제번호	HI16C2211010018
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	첨단의료기술개발(R&D)
연구과제명	인간유도만능줄기세포유래 내피세포의 생산 및 치료효과 결정
기 여 율	7/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI15C2782
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	첨단의료기술개발/줄기세포, 재생의료분야 기반구축 국제협력
연구과제명	나노입자를 이용한 혈관내피세포로의 직접세포전환법 개발
기 여 율	2/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2015.12.01 ~ 2019.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1D1A1B07046955
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	나노바이오물질에 캡슐화시킨 인간유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포의 허혈성 심
장질환 치료효과	
기 여 율	1/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

줄기세포로부터 분화된 내피세포 및 HA-CA (catechol-modified hyaluronic acid) 하이드로겔 (hydrogel)을 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

산화제 및 pH 조절제를 더 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 산화제는,

과요오드산나트륨 (sodium periodate), 과산화수소 (hydrogen peroxide), 겨자무과산화효소 (horseradish peroxidase), 및 타이로시나아제 (tyrosinase)으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물.

#### 청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 pH 조절제는,

수산화나트륨 (sodium hydroxide), 수산화리튬 (lithium hydroxide), 수산화칼륨 (potassium hydroxide), 수산화루비듐 (rubidium hydroxide), 수산화세슘 (cesium hydroxide), 수산화마그네슘 (magnesium hydroxide), 수산화칼슘 (calcium hydroxide), 수산화스트론튬 (strontium hydroxide) 및 수산화바륨 (barium hydroxide)으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 HA-CA는,

HA (hyaluronic acid)의 카르복실기(carboxy group)가 도파민 (dopamine)의 아민기(amine group)와 아마이드 결합으로 결합되어 형성된, 혈관 신생 촉진용 조성물.

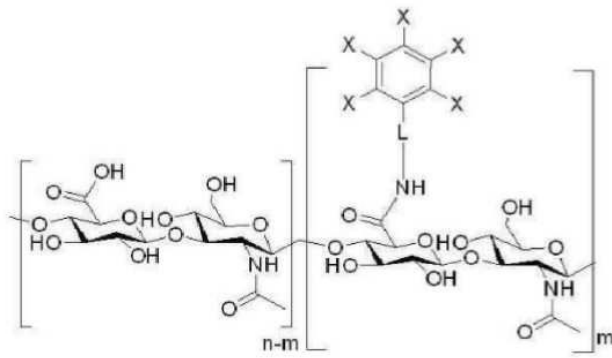
#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 HA-CA는,

하기 화학식 1로 표시되는 화합물인, 혈관 신생 촉진용 조성물.

[화학식 1]



상기 식에서, L은  $-(CH_2)_K-$  이고, K는 1 내지 10의 정수이며, X는 각각 독립적으로 H 또는 OH이고, N은 2 내지 700의 정수이고, m은 n보다 작으며 1 내지 300의 정수이다.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 줄기세포는,

인간 만능줄기세포 또는 인간 유도만능줄기세포인, 혈관 신생 촉진용 조성물.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 내피세포는,

CDH5를 발현하는 내피세포를 98 % 이상 함유하는, 혈관 신생 촉진용 조성물.

#### 청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 내피세포의 CDH5 mRNA의 발현 수준은,

미분화된 줄기세포 또는 중배엽적으로 분화된 줄기세포 (mesodermally-differentiated stem cell) 보다 10배 높은, 혈관 신생 촉진용 조성물.

#### 청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 내피세포는,

상기 HA-CA 하이드로겔에 의해 캡슐화되고 (encapsulated),

상기 내피세포의 생체 내 (in vivo) 생존률은,

상기 HA-CA 하이드로겔에 의해 캡슐화되지 않은 내피세포보다 10배 내지 15배 높은, 혈관 신생 촉진용 조성물.

#### 청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 내피세포의 함량은,

상기 조성물의 총 부피에 대하여 75 부피 % 내지 90 부피 %인, 혈관 신생 촉진용 조성물.

## 청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 내피세포의 농도는,

$1 \times 10^5$  CFU/ml 내지  $6 \times 10^6$  CFU/ml인, 혈관 신생 촉진용 조성물.

## 청구항 13

제 1항에 있어서,

상기 HA-CA 하이드로겔의 함량은,

상기 조성물의 총 부피에 대하여, 1 부피 % 내지 5 부피 %인, 혈관 신생 촉진용 조성물.

## 청구항 14

제 1항에 있어서,

상기 조성물은,

근육 내 주사, 정맥 주사, 피하 주사, 피내 주사, 기관 내 및 피부 국소 도포 중 적어도 하나의 방법으로 투여되는 형태인, 혈관 신생 촉진용 조성물.

## 청구항 15

줄기세포로부터 내피세포 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계;

분화된 상기 내피세포 계통 세포들 중에 CDH5 유전자의 발현 수준이 미리 결정된 수준 이상인 동질성의 내피세포를 선별(sorting)하는 단계;

상기 동질성의 내피세포 현탁액에 HA-CA 하이드로겔을 혼합하는 단계를 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법.

## 청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 배양하는 단계는,

상기 줄기세포를 중배엽 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계, 및

상기 중배엽 계통 세포를 내피세포 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법.

## 청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 내피세포 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계는,

DLL4를 처리한 배지에서 상기 중배엽 계통 세포를 배양함으로써, 상기 내피세포 계통 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법.

## 청구항 18

제 15항에 있어서,

상기 HA-CA 하이드로겔을 처리하는 단계는,

2 내지 7일 중 하나의 기간 동안 수행되는, 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법.

## 청구항 19

제 15항에 있어서,

상기 HA-CA 하이드로겔을 혼합하는 단계 이후에, 산화제 및 pH 조절제를 혼합하는 단계를 더 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법.

## 청구항 20

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 기재된 혈관 신생 촉진용 조성물을 포함하는, 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 세포 치료제 조성물.

## 청구항 21

제 20항에 있어서,

상기 심혈관계 질환은,

혈전증, 말초동맥질환, 허혈성 심장질환, 협심증, 뇌혈관질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 부정맥 고혈압, 및 당뇨병성 혈관 질환으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 세포 치료제 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 혈관 신생 촉진용 새로운 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 혈관 신생 (neovascularization)은 혈관 전구세포(angioblasts)로부터 새로운 혈관이 직접 생성되는 과정 (vasculogenesis), 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정(angiogenesis) 및 혈관근 세포가 더해져 새로운 혈관을 형성하는 과정(arteriogenesis)을 포함할 수 있다. 이러한, 혈관 형성은 상처 수복, 배아 발생, 종양 형성, 만성염증, 비만 등 여러 가지 생리적 및 병리적 현상에 관여할 수 있다.

[0003] 혈관 신생은 특히 상처 치유나 조직 재생에 필수적인 현상일 수 있다. 예를 들어 체내에서 혈관 신생의 결핍이 있을 경우, 괴사, 궤양 및 허혈이 일어남에 따라, 조직 또는 기관의 기능 이상을 유발할 수 있다. 나아가, 혈액 공급이 원활하지 못함에 따라, 허혈성 심장질환, 동맥경화증, 심근경색증 및 협심증과 같은 심혈관계 질환 또한 야기될 수 있다. 이에 따라, 혈관 신생의 결핍으로 인한 조직 손상을 감소시키고, 이로 유발되는 심혈관계 질환을 치료하기 위한, 혈관 신생을 유도하거나 촉진시키는 치료법의 개발이 요구되었다.

[0004] 한편, 혈관 신생의 유도과 이의 결핍과 연관된 심혈관계 질환에 있어서, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF, vascular endothelial growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (FGF, fibroblast growth factor), 표피 성장인자 (EGF, epidermal growth factor) 및 혈소판-유도 내피 성장인자 (PDGF, platelet-derived endothelial growth factor) 를 이용한 요법들이 연구되고 있다. 그러나 이상의 인자들은, 이를 분리하거나 정제하기 어렵다는 문제점을 갖고 있고, 혈관 신생의 결핍으로 인한 심혈관계 질환에 대한 치료 효과가 미미함에 따라, 임상 적용에 있어 한계를 갖고 있다.

[0005] 이러한 이유로, 혈관 신생을 유도할 수 있고, 나아가 혈관 신생의 결핍에 따른 혈관계 질환, 특히 심혈관계 질환에 대한 근본적인 치료 효과를 제공할 수 있는, 혈관 형성 촉진 방법에 대한 개발이 지속적으로 요구된다.

[0006] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 한편, 배아로부터 분리한 인간 배아 줄기세포 (hESC, human embryonic stem cell) 와 체세포로부터 만들어진 인간 유도 만능줄기세포 (hiPSC, human induced pluripotent stem cell)는, 혈관 형성에 있어 중요한 역할을 하

는 내피세포 (endothelial cell) 로 분화할 수 있어, 혈관 재생 치료에 이용될 수 있다. 이에 따라, 손상된 혈관을 재생하고, 나아가 혈관의 형성을 유도하는 새로운 전략으로, 인간 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포를 이용한 혈관 재생 치료법이 제시되었다.

- [0008] 보다 구체적으로, 줄기세포로부터 분화된 내피세포를 이용한 혈관 재생 치료법은 전술한 혈관 신생의 과정 즉, 혈관 전구세포(angioblasts)로부터 새로운 혈관이 직접 생성되는 과정(vasculogenesis), 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정(angiogenesis) 및 평활근 세포가 더해져 새로운 혈관을 형성하는 과정(arteriogenesis)을 모두 관여하여 혈관을 형성하기 때문에 매우 유용한 치료법일 수 있다.
- [0009] 한편, 본 발명의 발명자들은 혈관 재생 치료의 효과에 있어서, 유도 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포의 생체 내 생존률과 유지율의 중요성에 대하여 인지하였다.
- [0010] 이에, 본 발명의 발명자들은, 인간 유도 만능줄기세포로부터 분화된 다양한 세포주 (cell line)로부터 혈관 형성능의 내피세포의 세포 내 생존률을 증진시킴으로써 혈관 형성능을 유지하고, 치료 효과 증진에 기여하는 새로운 혈관 신생 촉진용 조성물에 대하여 연구하였다.
- [0011] 본 발명의 발명자들은, 다양한 생체 적합성을 갖는 재료 중, 생체 내에서 세포 독성과 염증 반응을 일으키지 않고 다양한 형태의 물질의 표면에 부착하기에 충분한 접착력을 가지고 있는, 카테콜기가 접합된 히알루론산인 HA-CA (catechol modified hyaluronic acid) 하이드로겔에 대하여 주목하였다.
- [0012] 본 발명의 발명자들은 HA-CA 하이드로겔의 특성에 주목하였고, 인간 유도만능줄기세포 유래 내피세포를 HA-CA에 캡슐화시켜 허혈성 심근조직 또는 하지허혈 부위 등에 직접 주사 (주입) 함으로써, 기존의 세포치료제 보다 더욱 효율적으로 세포를 전달하고 치료효과를 기대할 수 있음을 처음으로 착안하기에 이르렀다.
- [0013] 특히, 본 발명의 발명자들은, HA-CA 하이드로겔이 목적하는 세포를 조직내에 전달한 이후에는, 조직내에 존재하는 효소 (hyaluronidase)에 의해 HA-CA가 분해되는 생체내 시간별-생 분해역학 (biodegradation kinetics) 관계를 처음 발견할 수 있었고, 이에, HA-CA 하이드로겔이 허혈성 조직에 직접 주사 가능한 정도의 생체 적합성을 갖고 있음을 인지할 수 있었다. 또한, 본 발명의 발명자들은, HA-CA 하이드로겔 및 인간 유도 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포를 허혈성 조직에 직접 주사하여 이들의 장기적인 치료 효과를 기대할 수 있었다.
- [0014] 결과적으로, 본 발명의 발명자들은, HA-CA 하이드로겔이 인간 유도 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포와 함께 적용될 경우 생체내 도입한 내피세포의 높은 생존률과 유지율을 유지할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0015] 특히, 본 발명의 발명자들은, 인간 유도 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포를 HA-CA 하이드로겔에 의해 캡슐화하여 조직내로 주입하였을 경우, 기존에 알려져 사용되던 생체활성 물질과 함께 투여된 경우보다, 조직내 부착율, 조직내로 투여한 세포의 생존율 및 혈관신생 촉진효과가 보다 뛰어남을 확인할 수 있었다.
- [0016] 한편, 본 발명의 발명자들은, 겔 형태의 HA-CA가 허혈 부위에 직접 주사됨에 따라, 이의 농도가 혈관 신생에 영향을 미칠 수 있음에 더욱 주목하였다.
- [0017] 나아가, 본 발명의 발명자들은 분화된 내피세포에서 다양한 내피세포 마커 (marker) 들중 중 CDH5의 mRNA 및 단백질 발현 수준이 현저하게 높은 것을 발견하였고, 이에 CDH5를 순수분리를 위한 마커로 사용하여 분화된 내피세포를 높은 순도로 분리할 수 있었다.
- [0018] 이때, 본 발명의 발명자들은, 혈관 신생 촉진용 조성물을 허혈 조직에 이식하였을 때, 혈관 신생 촉진뿐만 아니라, 혈관 재생력이 뛰어난 것을 발견하였다. 이에 본 발명의 발명자들은, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물이 심혈관계 질환의 예방 또는 치료에 임상적으로 적용될 수 있음을 인식하였다.
- [0019] 이에 해결하고자 하는 과제는, 인간 유도만능줄기세포로부터 분화된 고순도의 내피세포와 HA-CA를 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물, 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물을 포함하는, 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용의 세포 치료제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

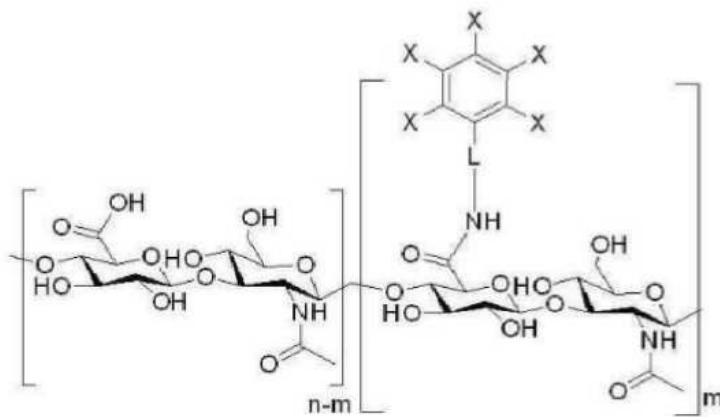
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 줄기세포로부터 분화된 내피세포 및 HA-CA (catechol-modified hyaluronic

acid) 하이드로겔 (hydrogel)을 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물이 제공된다.

[0023] 이때, 본 발명의 특징에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 산화제 및 pH 조절제를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 산화제는, 과요오드산나트륨 (sodium periodate), 과산화수소 (hydrogen peroxide), 겨자무과산화효소 (horseradish peroxidase), 및 타이로시나아제 (tyrosinase)으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, pH 조절제는, 수산화나트륨 (sodium hydroxide), 수산화리튬 (lithium hydroxide), 수산화칼륨 (potassium hydroxide), 수산화루비듐 (rubidium hydroxide), 수산화세슘 (cesium hydroxide), 수산화마그네슘 (magnesium hydroxide), 수산화칼슘 (calcium hydroxide), 수산화스트론튬 (strontium hydroxide) 및 수산화바륨 (barium hydroxide)으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 HA-CA는 HA (hyaluronic acid)의 카르복실기(carboxy group)가 도파민 (dopamine)의 아민기(amine group)와 아마이드 결합으로 결합되어 형성될 수 있다. 이때, HA-CA의 화학식 1은 아래에 표기와 같으며, 화학식에서의 L은  $-(CH_2)-K$ 이고, K는 1 내지 10의 정수이며, X는 각각 독립적으로 H 또는 OH이고, N은 2 내지 700의 정수이고, m은 n보다 작으며 1 내지 300의 정수를 의미할 수 있다.

[0025] [화학식 1]



[0026]

[0027] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 줄기세포는 인간 만능 줄기세포 또는 인간 유도 만능줄기세포일 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 내피세포는, CDH5를 발현하는 내피세포를 98 % 이상 함유하고, 이때의 CDH5 mRNA의 발현 수준은, 미분화된 줄기세포 또는 중배엽적으로 분화된 줄기세포 (mesodermally-differentiated stem cell) 보다 10배 높을 수 있다. 나아가, 전술한 내피세포는, HA-CA 하이드로겔에 의해 캡슐화되고 (encapsulated), 내피세포의 생체 내 (in vivo) 생존률은, HA-CA 하이드로겔에 의해 캡슐화되지 않은 내피세포보다 10배 내지 15배 높을 수 있다. 이러한, 내피세포는 혈관 신생 촉진용 조성물의 총 부피에 대하여 75 부피 % 내지 90 부피 %의 함량일 수 있으며, 이때의 농도는  $1 \times 10^5$  CFU/ml 내지  $6 \times 10^6$  CFU/ml일 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 HA-CA 하이드로겔의 함량은, 혈관 신생 촉진용 조성물의 총 부피에 대하여, 1 부피 % 내지 5 부피 %일 수 있다.

[0030] 이러한, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 근육 내 주사, 정맥 주사, 피하 주사, 피내 주사, 기관 내 및 피부 국소 도포 중 적어도 하나의 방법으로 투여되는 형태일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 줄기세포로부터 내피세포 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계, 분화된 내피세포 계통 세포들 중에 CDH5 유전자의 발현 수준이 미리 결정된 수준 이상인 동질성의 내피세포를 선별 (sorting)하는 단계 및 동질성의 내피세포 현탁액에 HA-CA 하이드로겔을 혼합하는 단계를 포함하는 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0032] 이때, 본 발명의 특징에 따르면, 전술한 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법에서의 배양하는 단계는, 줄기세포를 중배엽 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계 및 중배엽 계통 세포를 내피세



포 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 나아가, 전술한 내피세포 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계는, DLL4를 처리한 배지에서 중배엽 계통 세포를 배양함으로써, 상기 내피세포 계통 세포로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법에서의 HA-CA 하이드로겔을 처리하는 단계는, 2 내지 7일 중 하나의 기간 동안 수행될 수 있다. 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법은 HA-CA 하이드로겔을 혼합하는 단계 이후에, 산화제 및 pH 조절제를 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 전술한 혈관 신생 촉진용 조성물을 포함하는 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 세포 치료제 조성물이 제공된다.

[0035] 이때, 심혈관계 질환은, 혈전증, 말초동맥질환, 허혈성 심장질환, 협심증, 뇌혈관질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 부정맥, 고혈압 및 당뇨병성 혈관 질환 등으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

### 발명의 효과

[0037] 본 발명은 동물 유래 혈청 또는 피더 세포의 이용에 따라 발생하는 면역반응을 유발하지 않는 고순도의 내피세포와, 생체 적합성이 높은 재료인 HA-CA 하이드로겔을 함유하는 혈관 신생 촉진용 조성물 및 이의 제조 방법을 제공함으로써, 안정적으로 임상에 적용할 수 있는 효과가 있다.

[0038] 구체적으로, 본 발명은 CDH5의 높은 발현 수준을 갖는 내피세포를 정제함으로써 고순도의 내피세포 및 이의 생체 내 생존률을 증가시키고 주변 조직으로의 이동을 원활하게 해주는 HA-CA 하이드로겔을 포함하는, 혈관 신생 촉진용 조성물 및 이의 제조 방법을 제공할 수 있다.

[0039] 나아가, 본 발명은 혈관 신생을 촉진하고, 혈관 재생력이 뛰어난 혈관 신생 촉진용 조성물과 이의 제조 방법을 제공함으로써, 심혈관계 질환에 대한 예방 또는 치료에 효과적인 세포 치료제로서 활용될 수 있는 효과가 있다.

[0040] 또한, 본 발명은, 허혈성 조직에 직접 주사되어 세포 내 생존률을 증가시키고, 효과적인 혈관 신생 및 혈관 재생을 위한, 조성물 내에서의 내피세포와 HA-CA 하이드로겔의 유효함량을 제공할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0042] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법의 절차를 도시한 것이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법에서의 각 단계를 예시적으로 도시한 것이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법에 따라 분화된 내피세포의 CDH5 발현에 대한 유세포 분석결과를 도시한 것이다.

도 2b 내지 2c는 CDH5 발현에 기초하여 선별된 내피세포의 특이적 마커 발현에 대한 유세포 분석결과를 도시한 것이다.

도 3은 CDH5 발현에 기초하여 선별된 내피세포의 산화 질소 검출 결과 및 내피세포의 관 형성능에 대한 결과를 도시한 것이다.

도 4는 HA-CA의 합성 구조식을 도시한 것이다.

도 5a 내지 5b는 HA-CA 하이드로겔에 의하여 캡슐화된 내피세포의 이미지를 도시한 것이다.

도 6a 내지 6b는 HA-CA 하이드로겔에 의한 내피세포의 생존력을 관찰한 이미지를 도시한 것이다.

도 7a 내지 7b는 본 발명의 혈관 신생 촉진용 조성물에 이용되는 HA-CA 하이드로겔의 생체 내(in vivo) 분해성

관찰 결과를 도시한 것이다.

도 8a 내지 8c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에 대한 하지 허혈 마우스 모델에서의 혈류 회복 관찰 결과를 도시한 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에 대한 하지 허혈 마우스 모델에서의 혈류 회복 해부학 이미지를 도시한 것이다.

도 10a 내지 11c, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관신생 촉진용 조성물을 근육 주사한 하지 허혈 마우스 모델로부터 분리한 조직에 대한 면역조직화학적 분석 결과를 도시한 것이다.

도 12a 내지 12c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물이 주입된 심근 경색증(Myocardial Infarction, MI)이 유도된 심장에 대한 면역조직화학적분석 결과를 도시한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0044] 본 명세서 사용되는 용어, "줄기세포"는 다양한 신체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 만능줄기세포(Pluripotent stem cells)를 의미할 수 있다. 한편, 만능줄기세포는 혈관 재생 치료를 포함하는 다양한 세포 재생 치료에 이용될 수 있다. 혈관 재생 치료의 이용에 있어서, 만능줄기세포는 인간 배아줄기세포 또는 인간 유도만능줄기세포가 바람직할 수 있다. 이에, 본 명세서 내에서 사용되는 줄기세포는 "인간 유도만능줄기세포"와 상호 교환적으로 이용될 수 있다.
- [0045] 나아가, 혈관 재생 치료에 있어서 인간 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포는, 생체 내에 이식되어 손상된 혈관을 재생하고 혈관의 형성 또는 혈관의 신생을 유도할 수 있다.
- [0046] 본 명세서 사용되는 용어, "혈관 형성" 또는 "혈관 신생"은 새로운혈관을 형성하는 모든 현상을 의미할 수 있고, 이에 따라 "혈관 형성" 또는 "혈관 신생"은 상호 교환적으로 이용될 수 있다.
- [0047] 본 명세서 사용되는 용어, "내피세포"는 혈관과 림프관의 내벽을 덮고 있는 층을 구성하는 편평 세포를 의미할 수 있다. 이에, 내피세포는 "혈관 내피세포(vascular endothelial cell)"와 동일한 의미로 사용될 수 있다. 나아가, 본 명세서의 다양한 실시예에서 사용되는 "내피세포"는 "인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포"를 의미할 수 있다.
- [0048] 본 명세서 사용되는 용어, "심혈관계 질환"은 심혈관계 질환은 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환을 의미할 수 있다. 이의 원인으로는 혈관 형성의 결핍으로 인한 원활하지 못한 혈액 공급이 있을 수 있다. 본 개시에서 심혈관계 질환은 혈전증, 말초동맥질환, 허혈성 심장질환, 협심증, 뇌혈관질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 부정맥 및 고혈압을 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물 또는 본 발명의 다른 실시예에 따른 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 세포 치료제 조성물은 다양한 심혈관계 질환 중, 허혈성 심혈관계 질환에 특히 효과적일 수 있다. 그러나, 이들 조성물들의 효과는 허혈성 심혈관계 질환에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 명세서 사용되는 용어, "세포 치료제"는 세포와 조직의 기능을 복원하기 위하여 살아 있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogeneic) 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등 일련의 행위를 통하여 치료, 진단, 예방 목적으로 사용되는 모든 의약품을 의미할 수 있다. 본원 명세서에서 세포 치료제는 손상 조직의 회복을 위해 이식될 수 있는 세포 그 자체를 의미할 수 있다. 예를 들어, 세포 치료제는 허혈 부위에 이식되어 혈관 형성에 기여하는, 인간 유도만능줄기세포로부터 분화된 내피세포일 수 있다. 이때, 세포 치료제는 HA-CA에 의해 캡슐화된 형태의 분화된 내피세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 분화(differentiation) "는 세포가 특별한 기능을 갖는 특정한 세포나 조직의 복합체 또는 개체의 수준으로 발달하는 것을 의미한다.
- [0051] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 증식(proliferation) "은 세포 수의 증가를 의미하는 것으로 성장(growth)과

동일한 의미로 사용된다.

- [0052] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 재생능(renewal ability) "은 세포가 자신과 똑같은 복사본을 만들어낼 수 있는 능력을 의미할 수 있으며, 재생능이 개선되는 경우 세포의 증식능이 우수할 수 있다.
- [0053] 이하에서는 도 1a 내지 7b를 참조하여, 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조방법에 대해서 구체적으로 설명한다.
- [0054] 도 1a은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법의 절차를 도시한 것이다. 이하에서는, 설명의 편의를 위해서 도 1b 내지 7b를 참조하여 설명한다.
- [0055] 도 1a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법은 크게 줄기세포로부터 내피세포 계통의 세포로 분화하도록 배양하는 단계 (S110), 분화된 내피세포 계통의 세포들 중에 CDH5 유전자의 발현 수준이 미리 결정된 수준 이상인 동질성의 내피세포를 선별하는 단계 (S120) 및 동질성의 내피세포 현탁액에 HA-CA 하이드로젤을 혼합하는 단계 (S130)를 포함할 수 있으며, 전술한 단계의 순서로 혈관 신생 촉진용 조성물이 제조될 수 있다.
- [0056] 보다 구체적으로, 도 1b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법에서의 각 단계를 예시적으로 도시한 것이다.
- [0057] 먼저, 줄기세포로부터 내피세포를 분화하는 단계(S110)는 줄기세포를 중배엽 계통 세포로 분화하도록 배양하도록 배양하는 단계(S111) 및 중배엽 계통 세포를 내피세포 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계(S112)를 포함할 수 있다. 이때, 줄기세포는 인간 유도만능줄기세포(human induced pluripotent stem cell, hiPSC)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 나아가, 배양 환경 조건의 온도는 36 ℃내지 38 ℃바람직하게는 36.5 ℃ 내지 37.5 ℃이며, 공급 산소(O<sub>2</sub>)는 1 % 내지 25 %이며, 공급 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)는 1 % 내지 15 %일 수 있다.
- [0058] 먼저, 줄기세포를 중배엽 계통 세포로 분화하도록 배양하도록 배양하는 단계(S111)에서는, 미분화 상태의 인간 유도 만능 줄기세포를 플레이트상에 접종(seeding)시키고, 성장인자인 3 내지 5 ng/ml의 FGF2, GSK3β 저해제인 2 내지 4 μM의 CHIR99021 및 10 내지 30 % 혈청 대체제(serum replacement)를 포함하는 배지에서 3일간 매일 배지를 교체하며 배양함으로써, 줄기세포에서 중배엽 계통 세포로 분화를 유도할 수 있다.
- [0059] 이에, 구형으로 부유되어 있던 줄기세포가 플레이트상에 부착되어 있는 중배엽 계통 세포로 분화된 것으로 나타난다.
- [0060] 이때, FGF2(Fibroblast growth factor)는 세포증식, 세포분화 등을 비롯해 분열 촉진, 혈관 생성, 뼈 형성 및 신경 성장 등의 다양한 생물학적 과정에 관련되어 있는 성장 인자이다.
- [0061] 또한, CHIR99021은 GSK(Glycogen synthase kinase)의 활성을 억제하는 물질이다. 보다 구체적으로, GSK가 억제됨에 따라 세포 증식에 관여하는 신호전달체계의 β-catenin이 GSK에 의해 분해되지 않아 세포 증식에 관여하는 유전자 발현량이 증가되어, 세포의 생존 및 증식이 향상될 수 있다.
- [0062] 나아가, 플레이트는 세포 배양이 이루어질 수 있는 것이라면 한정되지 않고, 플라스크, 조직 배양용 플라스크, 디쉬, 페트리디쉬, 마이크로 플레이트, 마이크로 웰 플레이트, 마이크로 슬라이드, 램버 슬라이드, 살레, 튜브, 트레이 및 배양 백 등 다양한 모양의 플레이트가 이용될 수 있으며, 상부표면의 세포부착층 코팅막을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 플레이트의 코팅막은, 콜라겐, 피브로넥틴, 라미딘, 라미딘 프래그먼트, 비트로넥틴, 기저막 매트릭스, 젤라틴, 히알루론산, 폴리리신 및 비트로넥틴 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 1 mg/ml 이하, 바람직하게는 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함할 수 있다. 이에, 0.1mg/ml의 콜라겐 코팅막을 포함하는 플레이트에 배양됨에 따라 세포의 접촉 및 신전이 촉진되어, 중배엽 계통 세포의 분화 효율이 증가될 수 있다.
- [0063] 그 다음, 중배엽 계통 세포를 내피세포 계통 세포로 분화하도록 배양하는 단계(S112)에서는, 분화된 중배엽 계통 세포를 성장인자인 3 내지 5 ng/ml의 FGF2, 3 내지 7 ng/ml의 EGF, 5 내지 15 ng/ml의 VEGF-A, 노치 신호 전달 리간드인 20 내지 30 ng/ml의 DLL4 및 10 내지 30 % 혈청 대체제(serum replacement)를 포함하는 배지에서 5 내지 9일 중 하나의 기간 동안 매일 배지를 교체하며 배양함으로써, 내피세포 계통 세포로 분화시킬 수 있다. 나아가, 선택적으로 3 내지 7 unit/ml의 헤파린(heparin)을 이용함으로써, 내피세포 계통으로의 분화 효율이 증가될 수 있다.
- [0064] 이때, EGF(epidermal growth factor)는 이의 수용체와 결합하여 세포의 증식, 성장 및 분화를 촉진할 수 있는 성장 인자이며, 내피세포의 증식을 촉진하는 활성을 가질 수 있다.
- [0065] 또한, VEGF-A(vascular endothelial growth factor)는 VEGF 신호전달을 활성화하여 배아 순환계 형성 및 혈관

형성에 관여하는 신호전달 물질이며, 내피세포의 세포 분열 및 세포 이동을 자극할 수 있다.

- [0066] 또한, DLL4(delta-like ligand 4)는 내피세포의 성장, 이동, 동/정맥 분화의 결정, 팁/스톡 세포 결정 및 팁 세포 형성을 감소시켜 과도한 혈관신생을 억제하는 역할을 하는 노치(Notch) 수용체에 작용하여 혈관신생성 발아를 적절하게 조절하는 신호전달물질이다. 특히, DLL4의 추가로 인하여, 세포의 특성을 구별하고 유지하는데 작용하는 노치신호가 조절되어, 내피세포의 특성 즉, 내피세포의 마커인 CDH5, KDR, PECAM1, TEK 및 VWF의 발현 수준이 증가될 수 있다.
- [0067] 이상의 줄기세포로부터 내피세포를 분화하도록 배양하는 단계(S110)를 통하여, 8 내지 12일차에 인간 유도 만능 줄기세포 유래의 내피세포 계통 세포가 획득될 수 있다.
- [0068] 그 다음, 분화된 내피세포 계통 세포들 중에 CDH5 유전자의 발현 수준이 미리 결정된 수준 이상인 동질성의 내피세포를 선별하는 단계(S120)에서는 줄기세포로부터 분화된 다양한 세포주들로부터 내피세포의 특이적 표면 마커를 이용하여 내피세포를 선별(sorting)함으로써, 고순도의 내피세포를 획득할 수 있다. 예를 들어, 분화된 내피세포에서의 CDH5 유전자의 발현 수준은, 미분화된 줄기세포 또는 중배엽적으로 분화된 줄기세포보다 현저하게 높을 수 있다.
- [0069] 보다 구체적으로, 도 2a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 제조 방법에 따라 분화된 내피세포의 CDH5 발현에 대한 유세포 분석결과가 도시된다. 이때, 항체의 비특이적 결합(non-specific binding)을 보기위한 음성 대조군(negative control)으로 동형-APC(isotype- Allophycocyanin, APC)가 사용되었다.
- [0070] 인간 유도만능줄기세포로부터 분화된 내피세포 중 98.5 %의 세포가 CDH5 발현 양성인 세포로 나타난다. 이에, 내피세포를 선별하는 단계(S120)에서는, CDH5를 내피세포 마커로 이용하고, 이의 세포 내 발현 수준을 기초로, 분화된 다양한 세포주들 사이에서 내피세포를 높은 순도로 분리할 수 있다.
- [0071] 이에, 도 2b를 참조하면, CDH5 발현에 기초하여 선별된 내피세포의 특이적 마커 발현에 대한 유세포 분석결과가 도시된다. 이때, 항체의 비특이적 결합(non-specific binding)을 보기위한 음성 대조군(negative control)으로 동형-APC(isotype-Allophycocyanin, APC), 동형-PE(isotype-Phycoerythrin) 및 동형-FITC(isotype-Fluorescein)가 사용되었다.
- [0072] CDH5 발현(CDH5+)에 기초하여 선별된 내피세포에서 내피세포 특이적 마커인 CDH5, KDR, PECAM1, TEK 및 VWF를 발현하는 세포는 각각 94.1 %, 44.9 %, 28.5 %, 12.9 % 및 88.0 %인 것으로 나타난다.
- [0073] 이러한, 마커들의 발현 수준은 CDH5 발현 음성(CDH5-)의 내피세포, 또는 선별되지 않은 내피세포(유도 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포 계통 세포 자체)보다 현저하게 높은 것으로 나타난다.
- [0074] 보다 구체적으로, 도 2c를 참조하면, CDH5 발현에 기초한 선별 유무에 따른 내피세포의 특이적 마커 발현에 대한 유세포 분석 결과를 비교한 그래프가 도시된다.
- [0075] 먼저, CDH5 발현 양성(CDH5+)의 내피세포는 선별되지 않은 내피세포보다 CDH5 발현이 3.3 배 높은 것으로 나타난다.
- [0076] 그 다음, CDH5 발현 양성(CDH5+)의 내피세포는 CDH5 발현 음성(CDH5-)세포 및 선별되지 않은 내피세포보다 KDR 발현이 3.3 배 높은 것으로 나타난다.
- [0077] 그 다음, CDH5 발현 양성(CDH5+)의 내피세포는 CDH5 발현 음성(CDH5-)세포보다 PECAM1 발현이 2.25 배 높은 것으로 나타나며, 선별되지 않은 내피세포보다 PECAM1 발현이 15 배 높은 것으로 나타난다.
- [0078] 그 다음, CDH5 발현 양성(CDH5+)의 내피세포는 CDH5 발현 음성(CDH5-)세포보다 VWF 발현이 낮은 것으로 나타나, 선별되지 않은 내피세포보다는 VWF 발현이 1.6 배 높은 것으로 나타난다.
- [0079] 그 다음, CDH5 발현 양성(CDH5+)의 내피세포는 CDH5 발현 음성(CDH5-)세포보다 TEK 발현이 2 배 높은 것으로 나타나며, 선별되지 않은 내피세포보다 TEK 발현이 3 배 높은 것으로 나타난다.
- [0080] 그 다음, CDH5 발현 양성(CDH5+)의 내피세포는 CDH5 발현 음성(CDH5-)세포보다 NOS3 발현이 1.5 배 높은 것으로 나타나며, 선별되지 않은 내피세포보다 NOS3 발현이 2.15 배 높은 것으로 나타난다.
- [0081] 즉, CDH5 발현에 기초한 선별을 통하여, 고순도의 내피세포 즉, 동질성의 내피세포만을 획득할 수 있다. 이때, 본 명세서에서 사용되는 용어 " 동질성(homogenous) "은 현미경 상에 관찰되는 형태학적 모양 및 마커의 발현



양상이 동일한 동종의 세포 유형을 의미할 수 있다. 나아가, 마커(marker)는 표적 세포와 주변의 다른 세포를 구별할 수 있도록 하는 모든 물질로서, 단백질, 당 지질, 핵산 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 혈관 내피세포에 대한 마커는 혈관 내피세포에서 특이적으로 발현되는 물질일 수 있으며, CDH5, KDR, PECAM1, VWF, TEK 및 NOS3을 포함할 수 있다.

[0082] 이러한, 고순도의 내피세포를 이용하는 것은, 혈관 형성 또는 혈관 재생 효과와 연관될 수 있다. 예를 들어, 미분화된 줄기세포 또는 중배엽 계통의 줄기세포를 포함하는 낮은 순도의 내피세포를 허혈 조직에 이식할 경우, 혈관 형성 또는 혈관 재생의 효과는, 높은 순도의 내피세포를 이식했을 때 보다 낮을 수 있다. 이에 따라, 고순도의 내피세포를 분리하는 것이 매우 중요할 수 있다.

[0083] 한편, 내피세포의 특징은 세포 내 산화 질소(nitric oxide, NO)을 통하여 확인할 수 있다. 산화 질소는 혈관 항상성 유지 인자로, 내피세포 즉, 혈관내피세포 내의 eNOS(endothelial nitric oxide synthase)라고 하는 단백질에 의해 생산된다. 이에, 산화 질소를 통하여 내피세포의 기능적 특징을 확인할 수 있다.

[0084] 보다 구체적으로, 도 3의 (a)을 참조하면, CDH5 발현에 기초하여 선별된 내피세포의 산화 질소 검출 결과가 도시된다. 이때, 산화 질소는 DAF-FM 시약을 이용하여 관찰되었으며, 대조군(control)으로 인간 탯줄 정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)가 이용되었다. CDH5 발현에 기초하여 선별된 내피세포(hiPSC-EC)는 인간 탯줄 정맥 내피세포(HUVEC)와 유사한 수준의 산화 질소를 배출하는 것으로 나타난다. 즉, CDH5 발현 양성 세포는, 산화 질소를 합성하는 내피세포일 수 있다.

[0085] 나아가, 도 3의 (b)를 참조하면, CDH5 발현에 기초하여 선별된 내피세포의 매트릭셀(matrigel)상의 관찰 이미지가 도시된다. CDH5 발현에 기초하여 선별된 내피세포(hiPSC-EC)는 관(tube)의 형성 즉, 인간 탯줄 정맥 내피세포(HUVEC)와 유사한 망상 구조 형태를 갖는 것으로 나타난다.

[0086] 이에, CDH5 발현에 기초하여 선별된 내피세포는 인간 탯줄 정맥 내피세포 즉, 체내 혈관 내피세포와 유사한 기능적 및 형태학적 특징을 갖는 것으로 나타난다.

[0087] 이상의 분화된 내피세포 계통 세포들 중에 CDH5 유전자의 발현 수준이 미리 결정된 수준 이상인 동질성의 내피세포를 선별하는 단계(S120)를 통하여, 고순도의 내피세포를 획득할 수 있다. 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은, 고순도의 내피세포를 제공함에 따라 혈관 신생 촉진능이 선별과정을 거치지 않은 인간 유도 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포보다 우수할 수 있다.

[0088] 다시, 도 1b를 참조하면, 선별된 동질성의 내피세포 현탁액에 HA-CA 하이드로겔을 혼합하는 단계(S130)에서는 CDH5를 기초로 선별된 내피세포에 대하여, 조직내 세포 잔류성과 생존율을 증가시켜 줌으로써 혈관 신생능을 높일 수 있는 HA-CA 하이드로겔이 처리될 수 있다.

[0089] 처리된 HA-CA 하이드로겔의 함량은 전체 조성물의 총 부피에 대하여 1 부피 % 내지 5 부피 %일 수 있으나, 바람직하게는 1.2 부피 % 내지 3.2 부피 %일 수 있다. 그러나, 이의 함량에 제한되는 것은 아니며, 목적 부위의 종류 및 이의 상태, 목적하는 효과에 따라 다양하게 설정될 수 있다. 나아가, 내피세포의 함량은 전체 조성물의 총 부피에 대하여 75 부피 % 내지 90 부피 %일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게, 최종 내피세포의 농도는  $1 \times 10^5$  cells/ml 내지  $6 \times 10^6$  cells/ml일 수 있다. 그러나, 이의 농도는 이에 제한되는 것은 아니며, 목적 부위의 종류 및 이의 상태, 목적하는 효과에 따라 다양하게 설정될 수 있다.

[0090] 이때, 본 명세서 사용되는 용어, "HA-CA (catechol-modified hyaluronic acid)"는 히알루론산(hyaluronic acid, HA)의 백본 (backbone)에 도파민(dopamine) 이 접합된 형태를 의미할 수 있다.

[0091] 보다 구체적으로, 도 4를 참조하면, HA-CA의 합성 구조식이 도시된다. HA-CA는 히알루론산의 카르복실기(carboxy group, -COOH)과 도파민의 아민기(amine group, -NH<sub>2</sub>)가 아마이드 결합으로 접합된 형태이다. 이러한, HA-CA는 EDC 및 NHS를 히알루론산과 동일한 물비로 첨가하여 pH 5를 갖는 환경에서 30분간 교반시켜주고, 30분뒤 히알루론산과 동일한 물비의 도파민을 첨가하여 18시간 이상 교반시켜 카르보디이미드 커플링 반응(carbodiimide coupling reaction)을 유도하여 획득될 수 있다.

[0092] 나아가, HA-CA는 하이드로겔의 형태를 가질 수 있다. 이때, 본 명세서에서 사용된 용어 " 하이드로겔(hydrogel) "은 충분한 양의 수분을 보유하고 있는 친수성 고분자의 3차원적 구조를 의미할 수 있으며, 가교 반응에 의하여 형성된 하이드로겔 구조는 보다 향상된 결합력을 가질 수 있다. 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물 및 이의 제조 방법에 사용된 HA-CA는 높은 산화력을 지닌 카테콜을 통하여 가교제의 첨가 없이도 자체 산화력만으로 형성된 하이드로겔 형태를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0093] 한편, 선별된 동질성의 내피세포 현탁액에 HA-CA 하이드로겔을 혼합하는 단계(S130)이후에, 내피세포 현탁액 및 HA-CA 하이드로겔이 혼합된 용액에 산화제 및 pH 조절제를 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 산화제를 첨가함으로써, HA-CA 하이드로겔은 히알루론산 유도체에서의 카테콜 그룹 간의 가교 결합이 더 향상될 수 있다. 나아가, pH 조절제를 첨가함으로써, HA-CA 하이드로겔은 히알루론산 유도체에서의 벤조퀴논(benzoquinone) 그룹 간의 가교 결합이 더 향상될 수 있다. 이에, 산화제 및 pH 조절제 첨가로 인하여, 히알루론산 유도체간의 상호 결합력이 더 향상되어, HA-CA 하이드로겔은 보다 향상된 접착력을 가질 수 있다. 나아가, 접착력이 향상된 하이드로겔은 하이드로겔 내의 내피세포를 더욱 견고하게 캡슐화할 수 있으며, 나아가, 체내에 주입되었을 경우, 조직 내 부착율이 증가될 수 있다.
- [0094] 이때, 산화제의 농도는 3 내지 5 mg/ml일 수 있으며, 3 내지 5 mg/ml의 산화제를 내피세포 현탁액 및 HA-CA 하이드로겔이 혼합된 용액과 1 : 3의 용량 비율로 섞어 사용될 수 있다. 나아가, 산화제는 과요오드산나트륨(sodium periodate), 과산화수소(hydrogen peroxide), 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase), 및 타이로시나아제(tyrosinase)으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 바람직하게는, 과요오드산나트륨일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 또한, pH 조절제의 농도는 0.4 M일 수 있으며, pH 조절제를 통하여 pH 8의 약알칼리성 환경을 유도하여 겔화(gelation)을 더욱 유도할 수 있다. 나아가, pH 조절제는 수산화나트륨(sodium hydroxide), 수산화리튬(lithium hydroxide), 수산화칼륨(potassium hydroxide), 수산화루비듐(rubidium hydroxide), 수산화세슘(cesium hydroxide), 수산화마그네슘(magnesium hydroxide), 수산화칼슘(calcium hydroxide), 수산화스트론튬(strontium hydroxide) 및 수산화바륨(barium hydroxide)으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 바람직하게는, 수산화 나트륨일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0096] 나아가, HA-CA 하이드로겔에 의한 내피세포의 캡슐화 방법을 증진시키는 방법은 전술한 산화제 및 pH 조절제에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 히알루론산 유도체간의 가교 결합 증진 방법은, 화학적 가교, 물리적 가교 및 생물학적 가교 방법 등을 포함할 수 있다. 화학적 가교는 광가교(photo-crosslinking) 및 반응성 가교제(reactive crosslinker)를 이용한 가교를 포함할 수 있으며, 생물학적 가교는 헤파린과 성장인자의 결합력을 활용한 가교 및 DNA 등의 상보적인 결합을 이용한 가교를 포함할 수 있으며, 물리적 가교는 수소결합에 의한 가교, 소수성 상호작용에 의한 가교 및 정전기적 상호작용에 의한 가교를 포함할 수 있다.
- [0097] 이에, 접착력이 향상된 HA-CA 하이드로겔은 내피세포를 안정적으로 캡슐화(encapsulation)할 수 있다. 보다 구체적으로, 도 5a를 참조하면, HA-CA 하이드로겔에 의하여 캡슐화된 인간 태줄 정맥 내피세포의 이미지가 도시된다. 이때, 인간 태줄 정맥 내피세포는 캡슐화를 위하여 HA-CA 하이드로겔과 함께 24시간 배양되었다. 배양 24시간 이후, 인간 태줄 정맥 내피세포 군집이 HA-CA 하이드로겔로 감싸져 있는 것으로 나타난다. 즉, 인간 태줄 정맥 내피세포가 HA-CA 하이드로겔에 의해 캡슐화된 것으로 나타난다.
- [0098] 나아가, 도 5b를 참조하면, HA-CA 하이드로겔에 의하여 캡슐화된 줄기세포로부터 유래된 내피세포의 이미지가 도시된다. 이때, 대조군으로 양친매성 펩타이드 생체 재료인 PA-RGDS 및 PA-YIGS가 이용되었다. 줄기세포로부터 유래된 내피세포(hiPSC-EC)의 캡슐화는 HA-CA 하이드로겔이 가장 균일한 것으로 나타난다. 즉, 줄기세포로부터 유래된 내피세포의 캡슐화에는 종래의 생체 재료들보다 HA-CA 하이드로겔이 더 적합한 것을 의미할 수 있다.
- [0099] 이상의 선별된 동질성의 내피세포 현탁액에 HA-CA 하이드로겔을 혼합하는 단계(S130)를 통하여, 내피세포는 캡슐화되어 미세 환경으로부터 내피세포를 보호하여 생존률 및 분화율이 증가될 수 있다.
- [0100] 보다 구체적으로, 도 6a를 참조하면, HA-CA 하이드로겔에 의한 내피세포의 생존력을 관찰한 이미지가 도시된다. 이때, 인간 유도 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포는 HA-CA 하이드로겔과 함께 7일간 배양되었으며, 살아있는 세포를 확인하기 위하여 calcein AM을 이용하였으며, 사멸된 세포를 확인하기 위하여 ethidium homodimer-1을 이용하였다.
- [0101] 배양 7일 후 HA-CA 하이드로겔이 처리된 내피세포는 HA-CA 하이드로겔이 처리되지 않은 대조군보다 사멸된 세포 수가 적은 것으로 나타난다. 즉, HA-CA 처리로 인하여 내피세포는 보다 높은 생존률을 갖는 것으로 나타난다.
- [0102] 나아가, 도 6b를 참조하면, 산화 스트레스 환경 조건에서의 HA-CA 하이드로겔에 의한 내피세포의 생존력을 관찰

한 이미지가 도시된다. 이때, 산화 스트레스 환경 조건은  $H_2O_2$  처리를 통하여 조성하였다. HA-CA 하이드로겔이 처리된 내피세포는 산화 스트레스 조건에서도 무처리 대조군과 유사한 수준으로 내피세포가 생존하는 것으로 나타난다. 이와 대조적으로, HA-CA 하이드로겔을 처리하지 않은 내피세포는 생존 세포가 거의 없는 것으로 나타난다.

[0103] 즉, 이러한 결과는 HA-CA 하이드로겔은 특히 인간 유도 만능줄기세포로부터 분화된 내피세포에 대하여 세포 독성을 갖지 않고, 해로운 미세환경으로부터 내피세포를 보호할 수 있음을 의미할 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은, HA-CA 하이드로겔과 함께 높은 순도의 내피세포를 제공함에 따라, 생체 내에서 높은 세포 생존률을 제공하여 보다 긴 기간동안 혈관 신생에 기여할 수 있다.

[0104] 더 나아가, 도 7a를 참조하면, 본 발명의 혈관 신생 촉진용 조성물에 이용되는 HA-CA 하이드로겔의 생체 내(in vivo) 분해성 관찰 이미지가 도시된다. 이때, FITC(Fluorescein isothiocyanate)로 라벨링된 HA-CA 하이드로겔은 마우스 뒷다리 근육조직에 이식되어 관찰되었다.

[0105] HA-CA 하이드로겔은 마우스 뒷다리 근육 조직에 주사된 후 시간 경과에 따라 소실 즉, 생체 내 분해되는 것으로 나타나며, 17 일(day 17) 이후에는 거의 관찰되지 않는 것으로 나타난다.

[0106] 보다 구체적으로, 도 7b를 참조하면, 도 7a를 그래프로 나타난 결과가 도시된다. HA-CA 하이드로겔은 마우스 뒷다리 근육 조직에 주사된 첫날(0 week)부터 빠르게 분해되어, 1주(1 week)째에는 25 %의 잔존물을 보이며, 2주(2 weeks)째부터는 18 %의 잔존물을 보이는 것으로 나타난다. 즉, 생체 내에 주입된 HA-CA는 약 14 내지 17 일까지 (2 weeks) 빠르게 분해되는 것으로 나타난다.

[0107] 또한, 이러한 생체 내 분해성은 뒷다리 허혈 마우스 모델에 있어서도 유사한 결과를 갖는 것으로 나타난다.

[0108] 따라서, 허혈 조직에서 HA-CA 하이드로겔에 의해 캡슐화된 내피세포가 주입될 경우, 내피세포는 지속적으로 허혈 조직 내에서 혈관 신생을 유도하고 HA-CA 하이드로겔은 생체 내 분해되는 것을 의미할 수 있다. 이때, HA-CA 하이드로겔은 허혈 조직 상에서 생체 내 분해되지만, 세포 내에서 내피세포에 대하여 충분히 높은 생존율을 제공할 수 있다.

[0109] 이상의 제조 방법에 따라 제조된 혈관 신생 촉진용 조성물은, 고순도의 내피세포 및 이를 안정적으로 보호하여 효율을 증진시킬 수 있는 HA-CA 하이드로겔을 포함함에 따라, 보다 향상된 혈관 형성 및 혈관 재생을 가질 수 있다.

#### [0110] 실시예 1: 본 발명의 혈관 신생 촉진용 조성물의 혈관 신생 촉진능

[0111] 이하에서는, 도 8a 내지 11c를 참조하여, 본 발명의 다양한 조성물에 대한 혈관 형성 효과에 대하여 설명한다. 이하의 실험에서는 하지 허혈 (Hind Limb Ischemia, HLI) 마우스 모델을 사용하였다.

[0112] 도 8a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에 대한 하지 허혈 마우스 모델에서의 혈류 회복 관찰 이미지가 도시된다. 이때, 대조군은 PBS, 실시예는 HA-CA 하이드로겔로 캡슐화된 내피세포, 비교예 1은 HA-CA 하이드로겔 및 비교예 2는 내피세포가 사용되었으며, 각각 조성물은 하지 허혈 마우스 모델에 근육 주사되어 사용되었다. 나아가, 혈류 회복 관찰 이미지는 레이저 도플러 관류 이미저 (laser Doppler perfusion imager, LDPI)를 이용하여 측정하였다.

[0113] 각 조성물을 주입 4주 후, 실시예가 가장 빠르게 족부의 혈류가 회복되는 것으로 나타난다. 이와 대조적으로, 대조군, 비교예 1 및 2는 족부의 혈류가 완전히 회복되지 못하여, 족부 손실이 발생하는 것으로 나타난다.

[0114] 보다 구체적으로, 8b를 참조하면, 도 8a의 실험 동물에 대한 결과 그래프이다. 이때, 도 8c의 (a)를 참조하면, 그래프의 빨간색은 하지 회복(limb salvage)을 의미하며, 보라색은 하지 근육의 위축(limb muscle atrophy)을 의미하며, 하늘색은 족부 상실 및 괴사(foot loss and necrosis)를 의미하며, 파랑색은 하지 손실(limb loss)을 의미하며, 각각에 대한 결과는 실험 동물수에서 차지하는 비율로 나타내었다.

[0115] 도 8c의 (b)를 참조하면, 실시예에서는 88 %의 실험 동물이 하지를 회복한 것으로 나타나며, 대조군, 비교예 1 및 2에서는 각각 29 %, 43 % 및 33 %의 실험 동물이 하지를 회복한 것으로 나타난다. 즉, HA-CA 하이드로겔 및 내피세포를 포함하는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물이 허혈 부위의 혈관 신생을 가장 효과적으로 촉진시키는 것으로 나타난다.

[0116] 나아가, 8c를 참조하면, 도 8a에 대한 관류 비율이 도시된다. 이때, 관류 비율(perfusion ratio)는 비허혈성

죽부에서의 허혈성 죽부의 비율을 의미한다.

- [0117] 관류 비율을 2주차(2 wk)까지는 비교예 2가 높은 것으로 나타나나, 3주차(3 wk)부터는 실시예가 가장 높은 것으로 나타난다. 즉, HA-CA 하이드로겔 및 내피세포를 포함하는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물이 혈관 신생 효과를 가장 지속적으로 유지할 수 있는 것으로 나타난다. 이는, HA-CA 하이드로겔에 의하여 캡슐화된 내피세포가 생존력이 향상됨에 따라, 생체 내에서의 혈관 재생 효과가 장시간 지속된 것을 의미할 수 있다.
- [0118] 이에, 도 9를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에 대한 하지 허혈 마우스 모델에서의 혈류 회복 해부학 이미지가 도시된다. 이때, 혈관 신생 촉진용 조성물을 하지 허혈 부위에 근육 주사하고, 8개월 후, 근육 주사된 부위를 해부하여 정상 조직과 비교하였다.
- [0119] 8개월 후 관찰된 하지 허혈 부위는 하지 허혈이 회복되어 정상 조직과 유사한 것으로 나타나며, 사지 또는 죽부의 손실 및 괴사가 발생하지 않은 것으로 나타난다.
- [0120] 나아가, 도 10a 내지 11c를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관신생 촉진용 조성물을 근육 주사한 하지 허혈 마우스 모델로부터 분리한 조직에 대한 면역조직화학적 분석 결과가 도시된다. 이하에서, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 내피세포는 CM-Dil에 의해 라벨링되어 붉은 빛으로 나타나며, 혈류가 흐를 수 있는 기능을 가진 혈관은 FITC가 염색된 ILB4 (isolectin B4) 용액을 혈관 내로 관류함으로써, 녹색 빛으로 나타난다. 더 나아가, DAPI 염색을 이용하여 핵과 염색질(chromatin)을 대조적으로 확인하였다. 이때, 대조군은 내피세포만으로 구성된 조성물이 주입된 군을 의미하며, 실시예는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물이 주입된 군을 의미한다.
- [0121] 먼저, 도 10a를 참조하면, 각각의 조성물을 근육 주사한 뒤 3 내지 4주 후, 실시예는 대조군 보다 붉은 빛의 내피세포가 더 많은 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물이 내피세포로만 이루어진 대조군 보다 생체 내 잔류 및 생존력이 높다는 것을 의미할 수 있다.
- [0122] 이에, 도 10b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 내피세포는 생체 내에 주사된 뒤 12개월까지 생존하는 것으로 나타난다. 즉, HA-CA 하이드로겔에 의하여 내피세포의 생존력 및 정착 능력이 증가하여, 내피세포가 12개월까지도 생체 내에서 지속될 수 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0123] 나아가, 도 11a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 내피세포는 생체 내에 주사된 뒤 8주 차에 붉은 색의 내피세포가 선형으로 나열(노란 점선 참조)되는 것으로 나타난다. 이는, 내피세포가 선형의 혈관 신생에 대한 가이드 역할을 하는 것을 의미할 수 있다.
- [0124] 이에, 도 11b를 참조하면, 선형으로 나열된 붉은 빛의 내피세포를 따라, 녹색 빛의 혈관이 신생되는 것으로 나타난다.
- [0125] 나아가, 도 11c를 참조하면, 붉은 빛의 내피세포가 녹색 빛의 혈관 내에 포함되어 있는 것으로 나타난다.
- [0126] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 허혈 조직 내에서 혈관 신생의 가이드 역할을 하며 자체적인 혈관 신생을 유도할 수 있으며, 나아가, 기존에 존재하는 혈관 내에서 손상된 혈관의 회복 즉, 재생을 유도할 수 있다. 결과적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 내피세포로부터 새로운 혈관을 직접 생성하는 과정(vasculogenesis) 및 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정(angiogenesis)을 동시에 유도할 수 있다.
- [0127] 이상의 실시예 1의 결과로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 HA-CA 하이드로겔을 통하여 부착력 및 내피세포의 생존력이 증진되어, 허혈 조직에서 오랜 기간 동안 내피세포가 적용되어 혈관 신생을 보다 장시간 효과적으로 유도할 수 있다.
- [0128] **실시예 2: 본 발명의 혈관 신생 촉진용 조성물의 심혈관 질환에서의 치료 및 예방 효과**
- [0129] 이하에서는, 도 12a 내지 12c를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물의 심혈관 질환에 대한 치료 및 예방 효과에 대하여 설명한다.
- [0130] 도 12a 내지 12c를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물이 주입된 심근 경색증(Myocardial Infarction, MI)이 유도된 심장에 대한 면역조직화학적분석 결과가 도시된다,
- [0131] 먼저, 도 12a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물이 주입된 심근 경색증



(Myocardial Infarction, MI)이 유도된 심장에 대한 4주차의 면역조직화학적분석 이미지가 도시된다. 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 내피세포는 심근 경색이 유도된 심장에 주사된 뒤 4주차까지 생존하는 것으로 나타난다. 보다 구체적으로, 붉은 빛의 내피세포가 4주차까지 생존하여, 심장 조직에 존재하는 것으로 나타나며, 녹색 빛의 혈관 내외에 걸쳐서 존재하는 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은, 내피세포로부터 새로운 혈관이 직접 생성되는 과정(vasculogenesis) 및 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정(angiogenesis) 뿐만 아니라, 심장과 같이 근육 세포가 존재하는 조직 내에서 혈관근 세포가 더해져 새로운 혈관을 형성하는 과정(arteriogenesis)을 유도할 수 있다.

[0132] 이에, 도 12b를 참조하면, 12a에서 심근 경색이 일어난 부위의 확대 이미지가 도시된다. 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 내피세포(EC/HA-CA)는 선형으로 나열되어 있으며, 이를 따라 선형의 혈관(FITC-IB4)이 신생되는 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 심근 경색이 일어난 심장 조직에서도 혈관 신생의 가이드 역할을 하며, 혈관 신생(vasculogenesis)을 유도할 수 있다는 것을 의미할 수 있다.

[0133] 나아가, 도 12c를 참조하면, 심장 조직에서의 기존에 존재하는 혈관 내에 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물에서의 내피세포가 포함되어 존재하는 것으로 나타난다. 즉, 내피세포가 기존에 존재하는 손상된 혈관에 부착되어 회복(angiogenesis)시키는 것을 의미할 수 있다.

[0134] 이상의 실시예 2의 결과로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 사지 뿐만 아니라, 혈관이 존재하는 다양한 조직의 심혈관계 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 세포 치료제로서, 손상된 혈관을 회복시키거나, 새로운 혈관의 신생을 유도하여 혈관의 부재 및 장애로 인한 질환을 치료 및 예방할 수 있다.

[0135] 이상의 실시예 1 내지 2의 결과로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물 및 본 발명의 다른 실시예에 따른 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 세포 치료제 조성물에 이용되는 내피세포 및 HA-CA 하이드로겔에 대한, 허혈성 조직의 회복 및 기능성 혈관 형성의 효과를 확인할 수 있었다.

[0136] 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 고순도의 동질성 내피세포를 포함함에 따라, 재생 치료 효과를 증진시킬 수 있다. 더욱이, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 신생 촉진용 조성물은 HA-CA 하이드로겔을 포함함에 따라, 전술한 고순도의 내피세포를 미세 환경으로부터 보호하여 생존률을 증가시키고, 생체 내 부착성을 장기간 증가시켜, 재생 치료 효과를 더욱 향상될 수 있다.

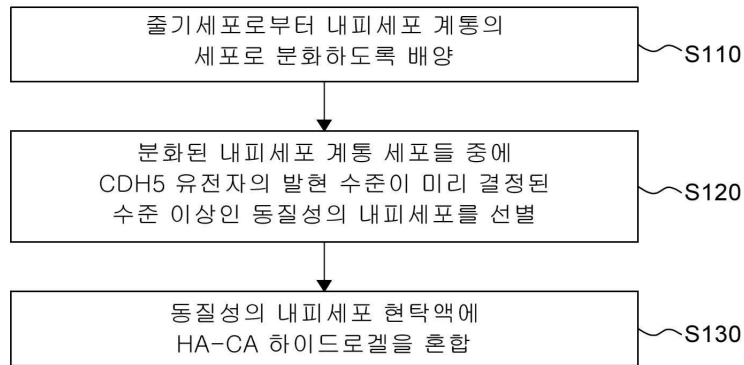
[0137] 이에, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 조성물들은 심혈관계 질환의 치료에 있어서, 높은 이식률을 갖는 세포 치료제로서 이용될 수 있다.

[0138] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.

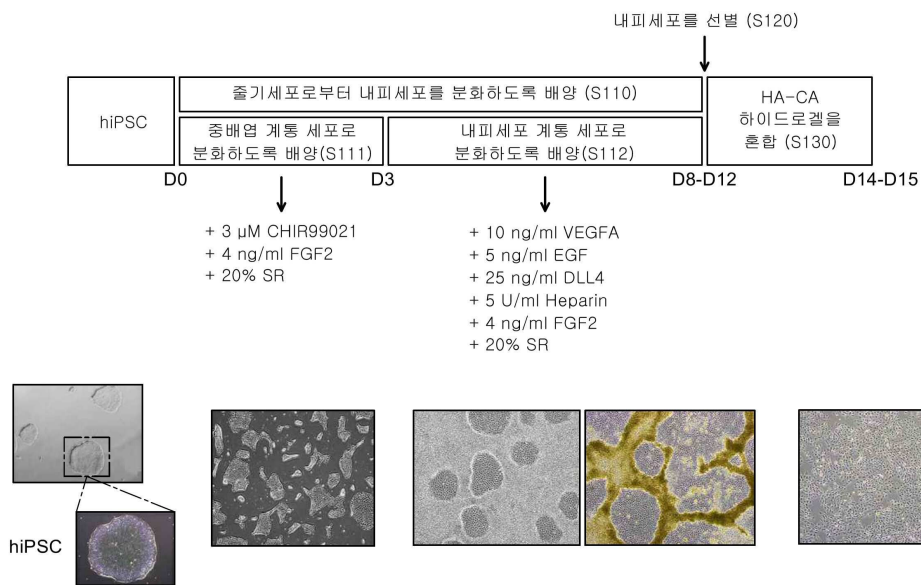
[0139] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

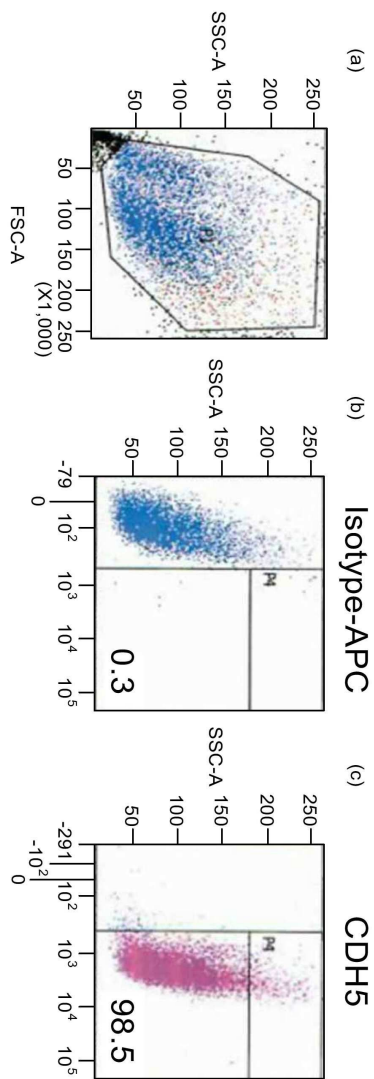
### 도면1a



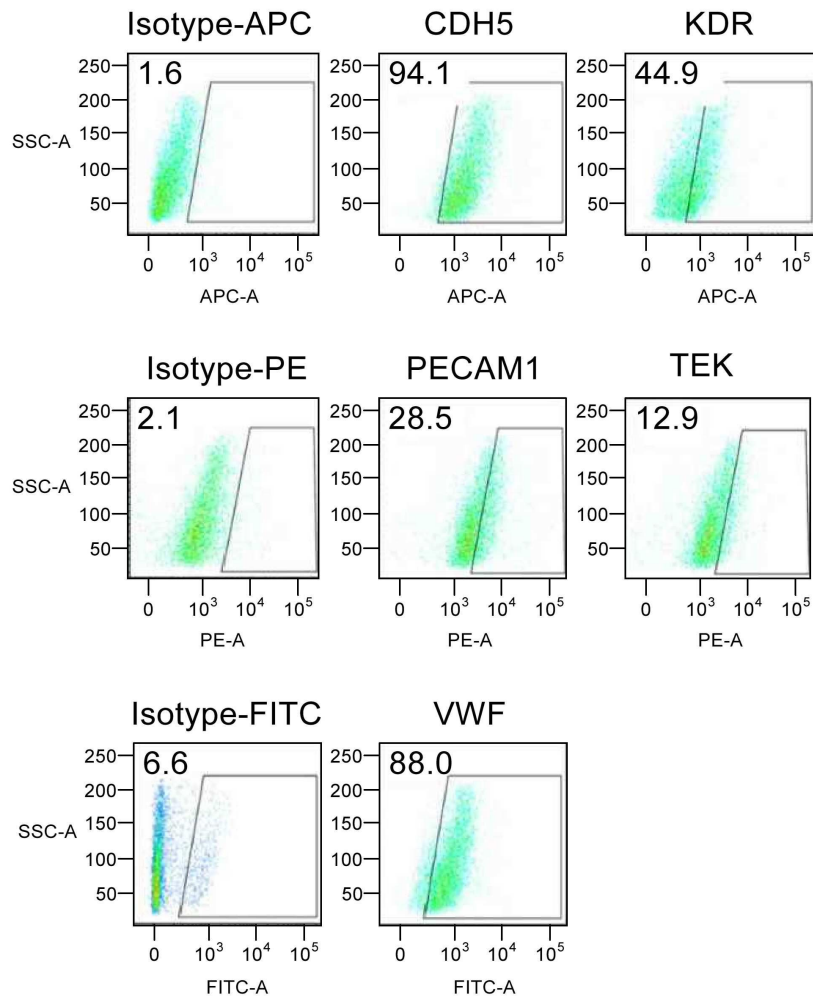
### 도면1b



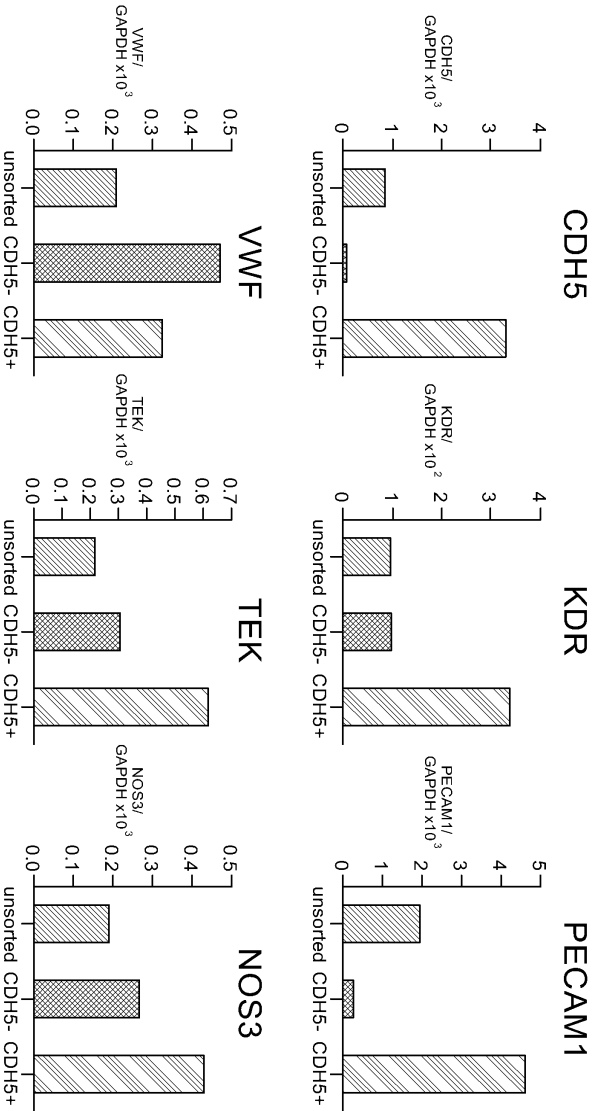
도면2a



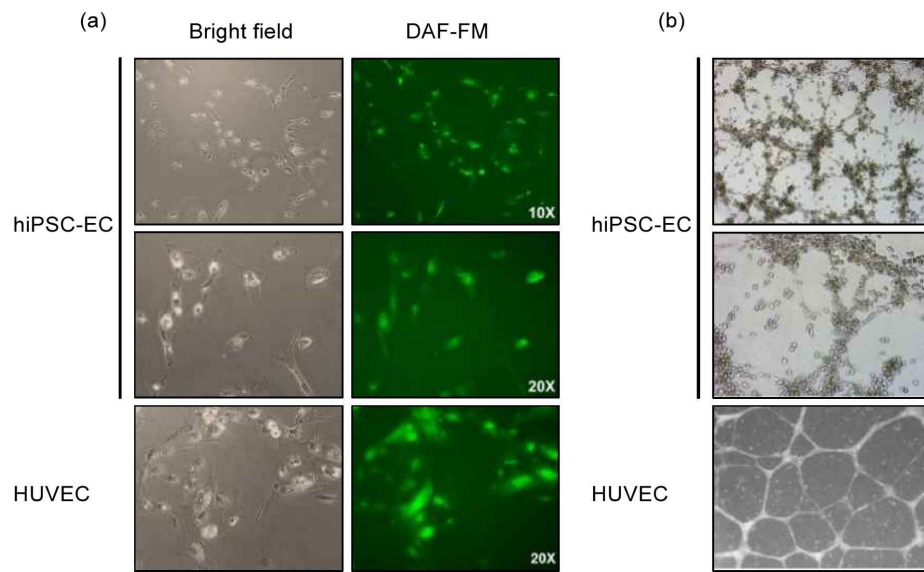
도면2b



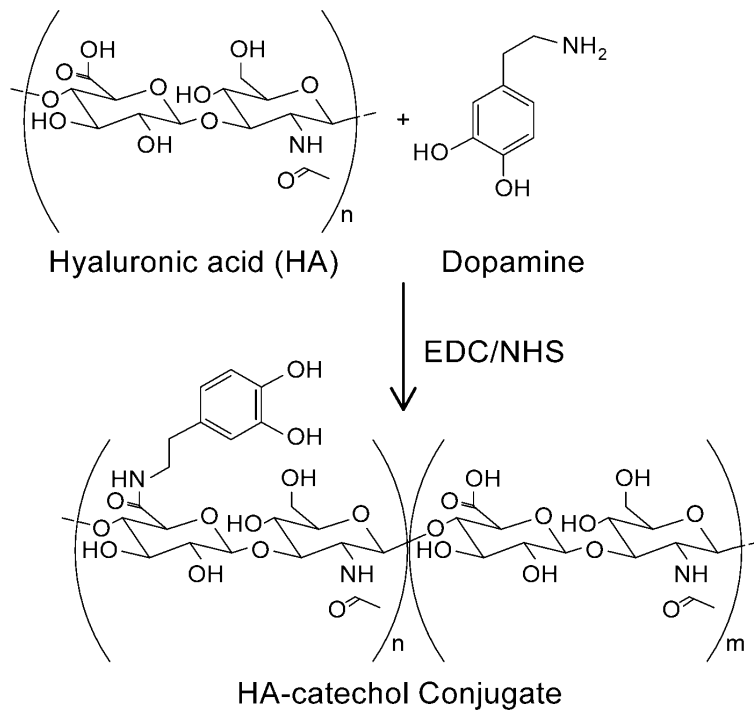
도면2c



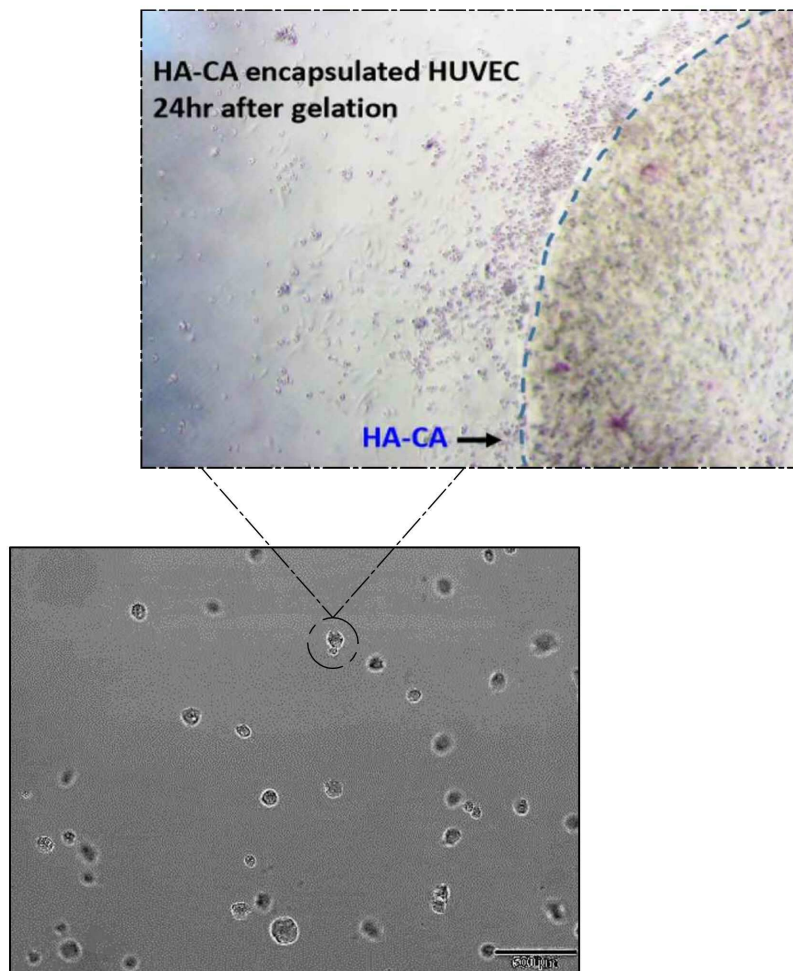
도면3



도면4

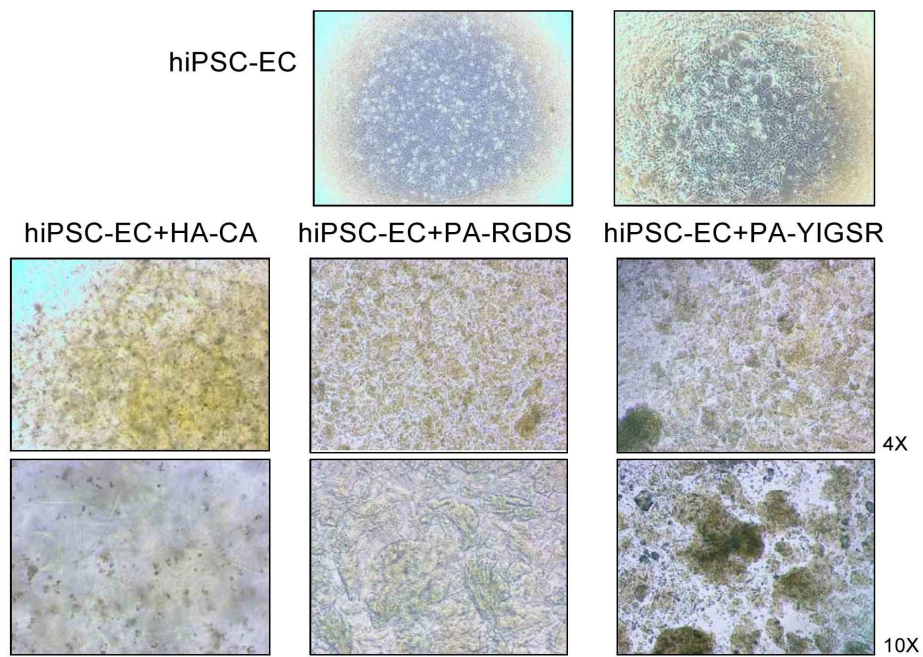


도면5a

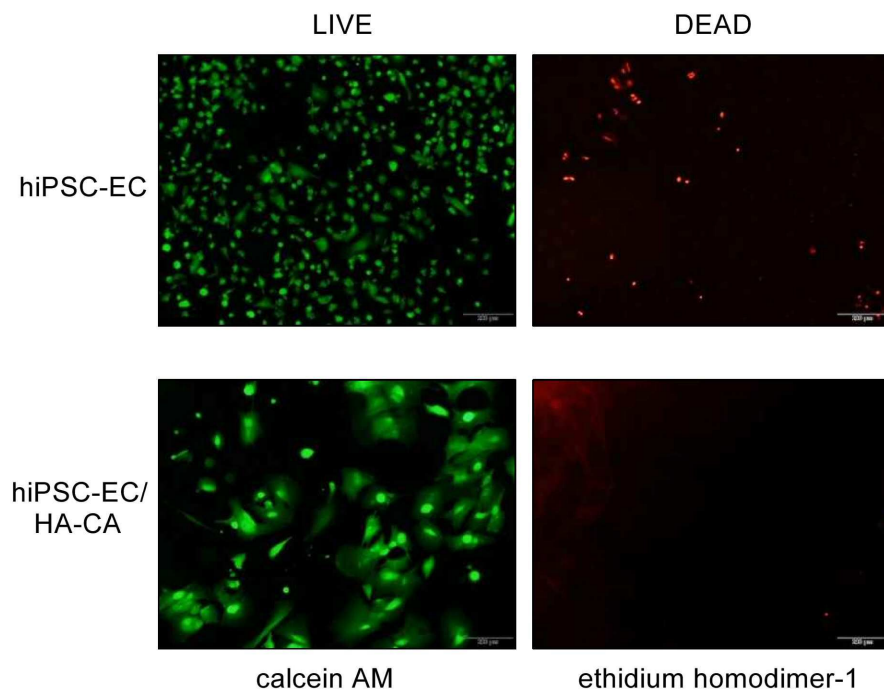




도면5b

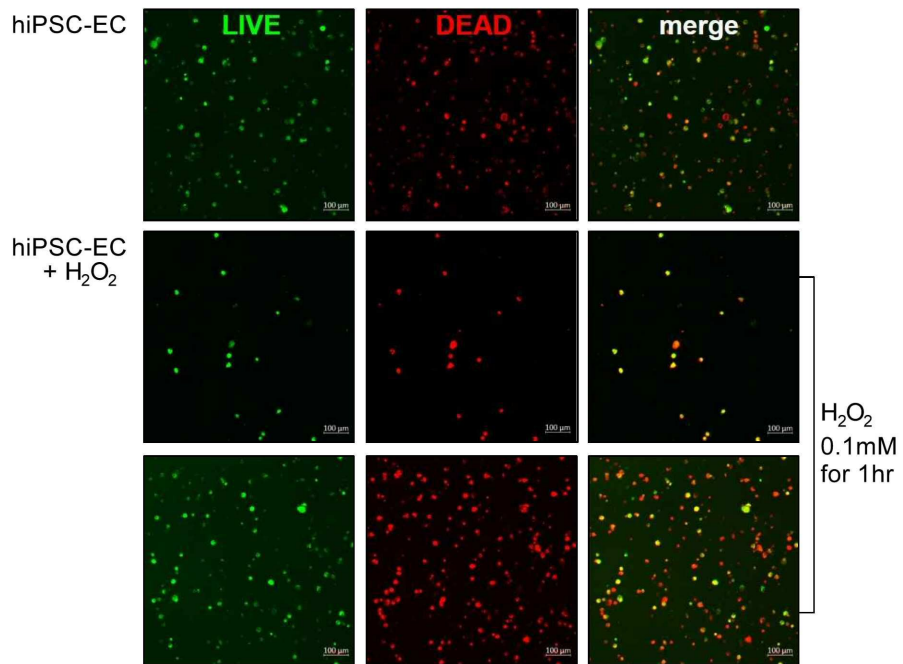


도면6a

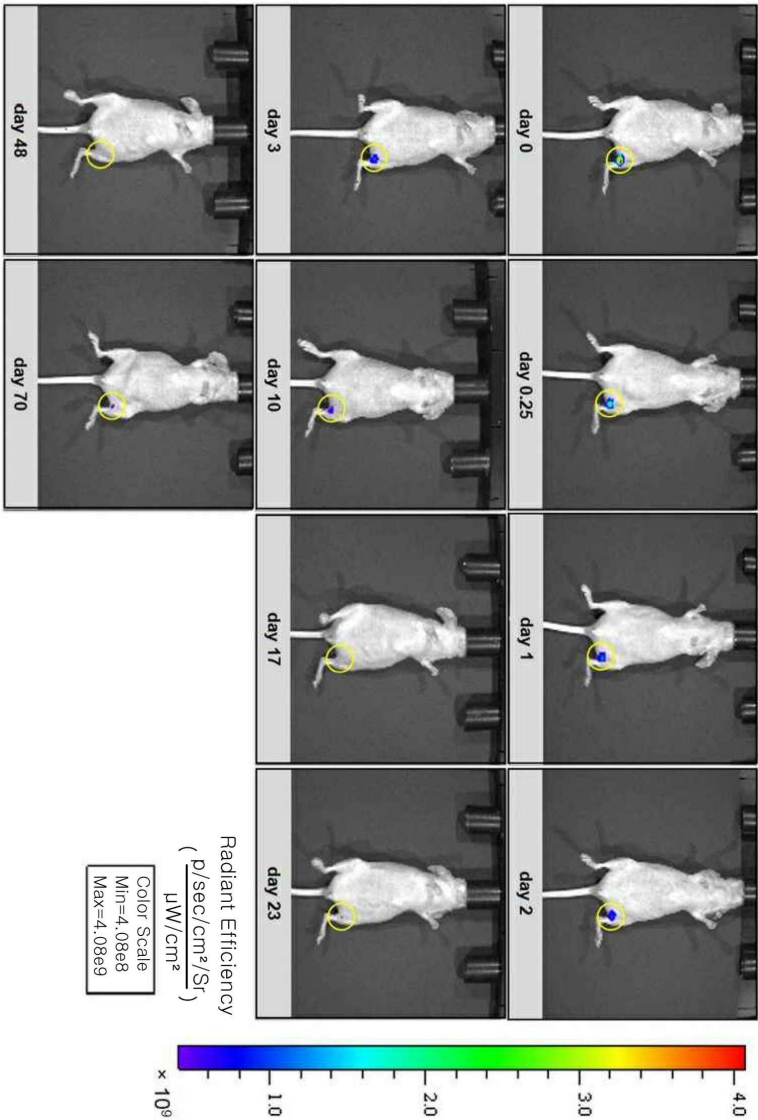




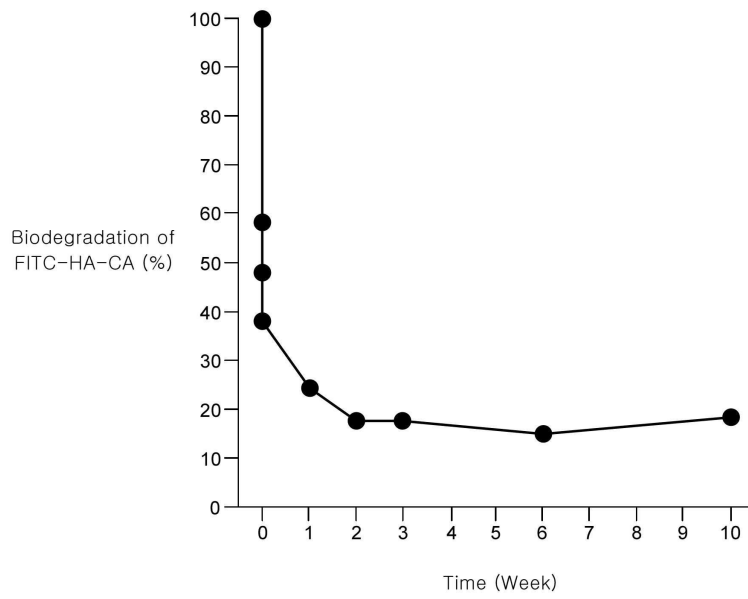
도면6b



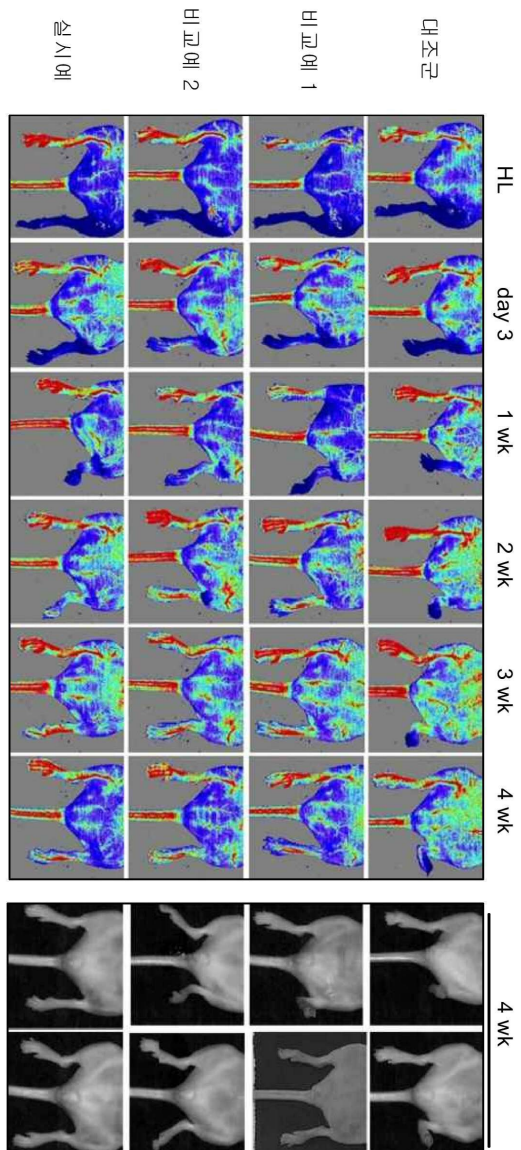
도면7a



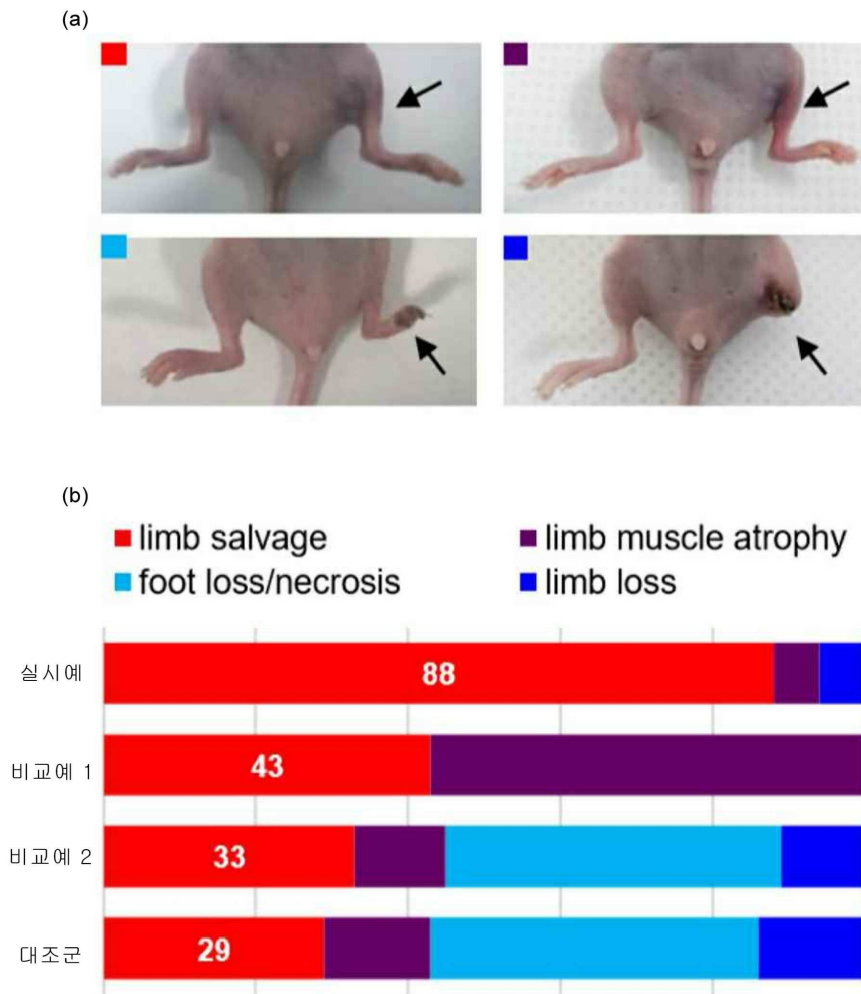
도면7b



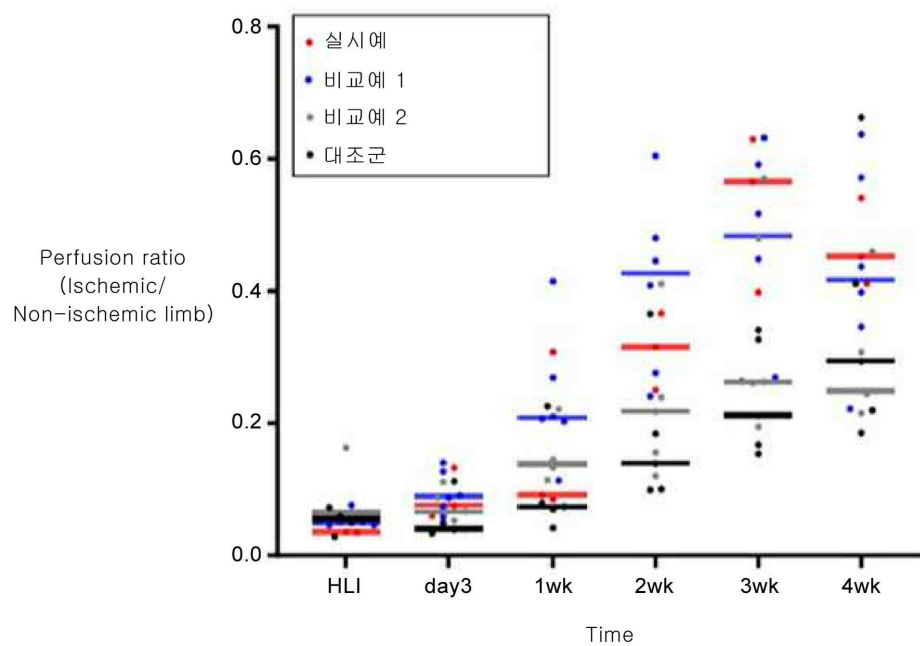
도면8a



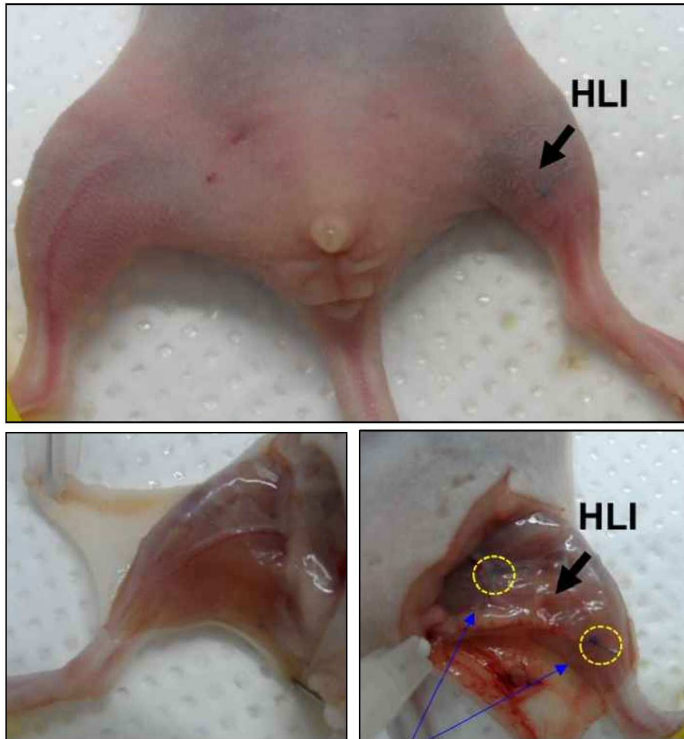
도면8b



도면8c



도면9

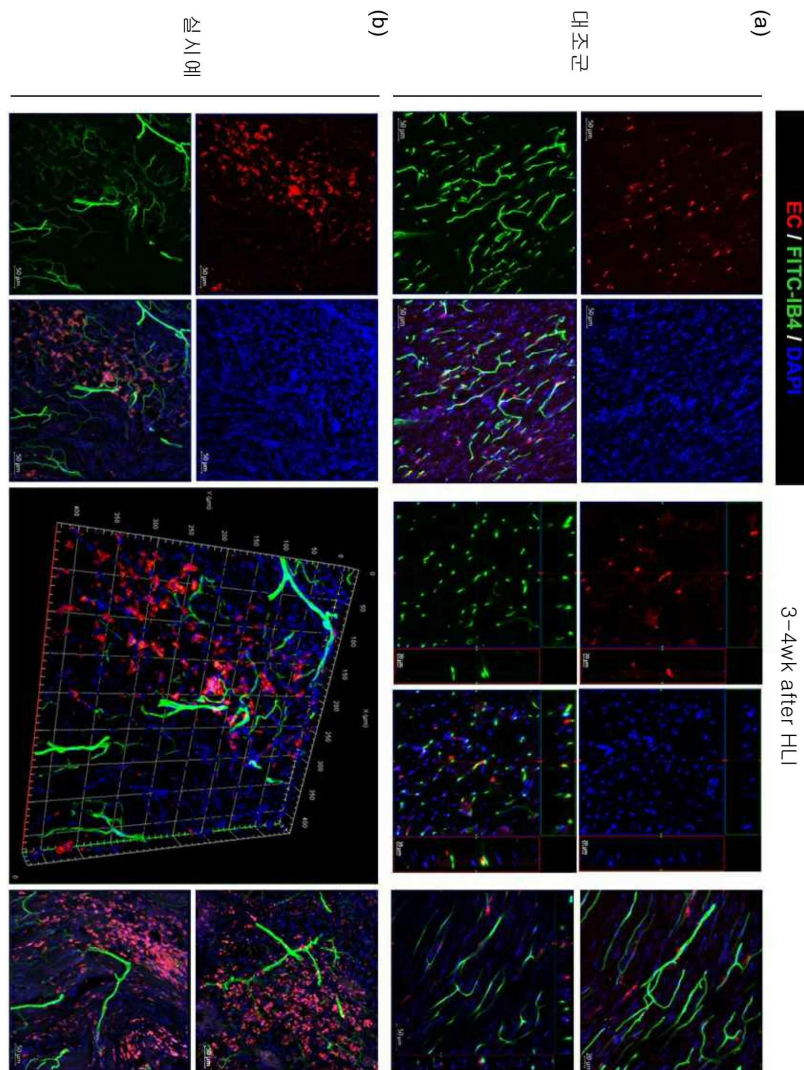


hiPSC-EC/HA-CA를  
하지허혈 부위에  
근육주사 후,  
8개월 후의 사진

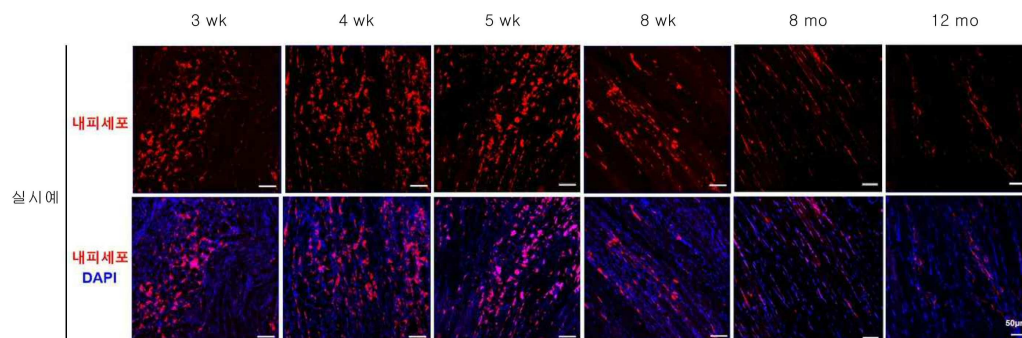
정상-오른발

허혈수술-왼발

도면10a

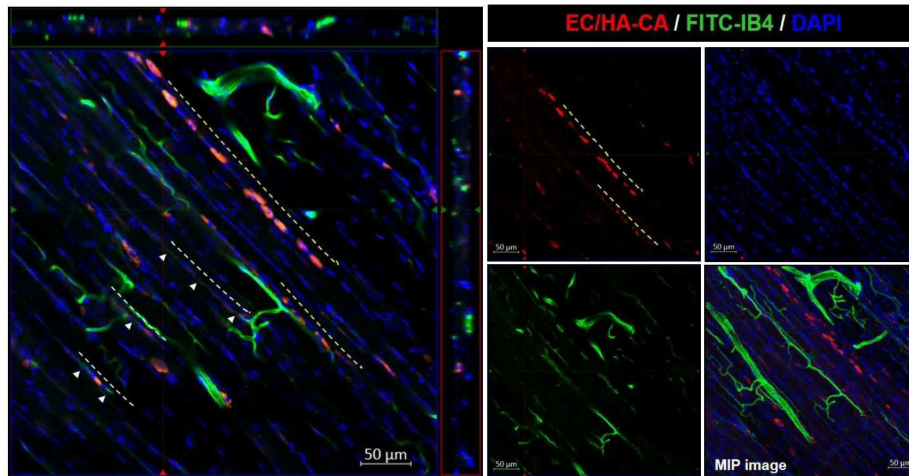


도면10b



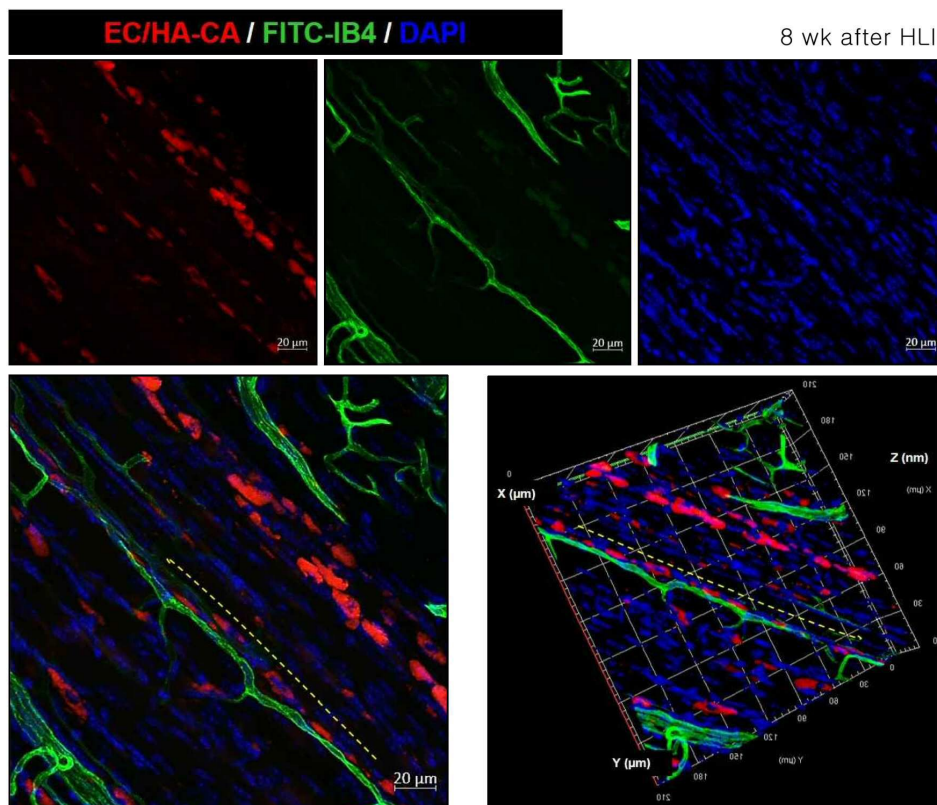


도면11a



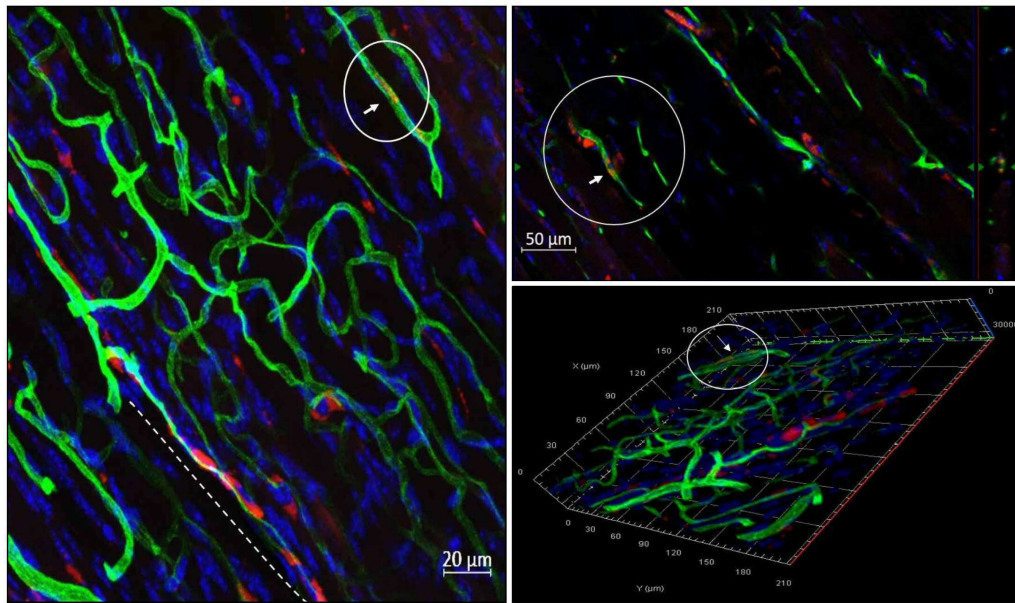
8 wk after HLI

도면11b

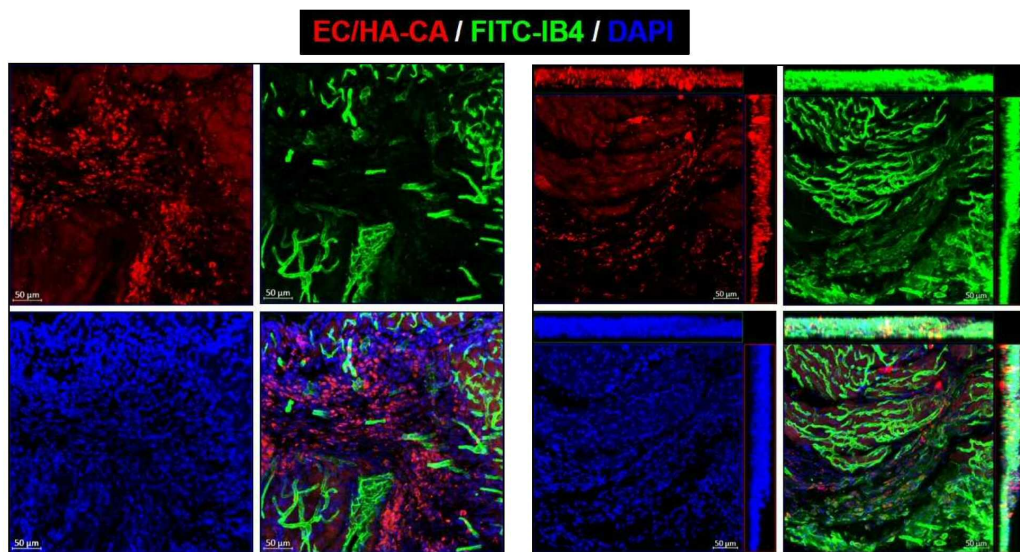




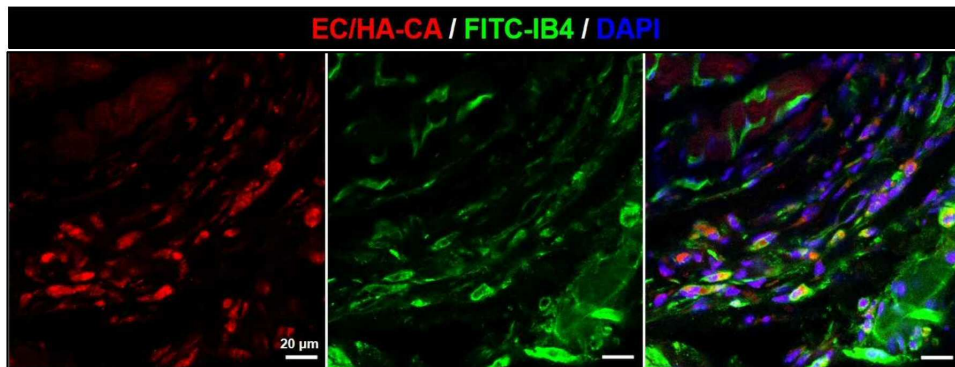
도면11c



도면12a



도면12b



도면12c

