



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월19일

(11) 등록번호 10-2769957

(24) 등록일자 2025년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) *C12M 1/12* (2006.01)
C12N 5/0797 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12M 29/00 (2013.01)
C12M 25/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0011843

(22) 출원일자 2022년01월26일

심사청구일자 2022년01월26일

(65) 공개번호 10-2023-0115164

(43) 공개일자 2023년08월02일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160137039 A*

KR1020170047118 A*

KR1020180032235 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(72) 발명자

임성갑

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

이은정

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

조영학

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(74) 대리인

공병욱

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 권혁성

(54) 발명의 명칭 신경 줄기세포능 증진을 위한 성장인자 고정화 방법 및 이를 이용한 배양 기관 제작

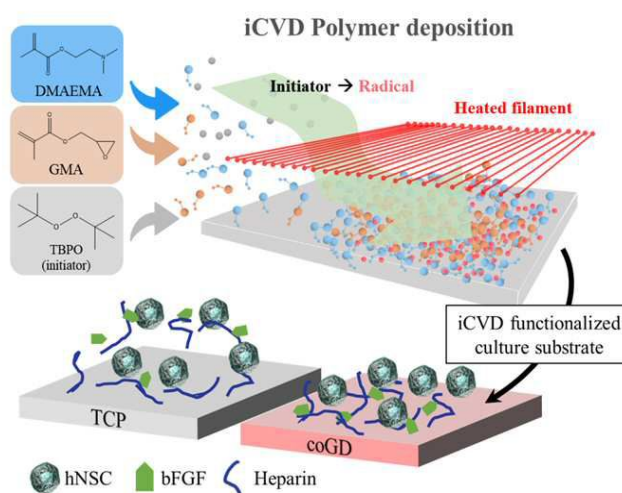
(57) 요약

본 발명은 신경 줄기세포능 증진을 위한, 성장인자를 고정시킨 신경 줄기세포 배양 기관에 관한 것이다.

본 발명은 화학 기상 증착법(iCVD)을 이용한 양이온성 고분자를 이용하여 흡착된 헤파린에 의해 성장인자를 배양 플레이트 표면에 고정화 시키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 고정화 방법에 의해 성장인자가 고정화된, 신경 줄기세포 배양 플레이트를 제공한다.

따라서, 본 발명의 신경 줄기세포 배양용 기관을 이용하여 인간 신경 줄기세포의 줄기세포능 및 신경세포 분화능을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0623 (2013.01)

C12N 2501/115 (2013.01)

C12N 2501/91 (2013.01)

C12N 2533/30 (2024.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132180
과제번호	2021R1A2B5B03001416
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	이온성/극성 고분자 박막 기반 고성능 소재 개발 및 응용
기 여 율	60/100
과제수행기관명	한국과학기술원
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345320133
과제번호	2020R1I1A1A01066621
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	표면 흡착 단백질 특성 제어를 통한 암모델 제작 플랫폼 기술 개발
기 여 율	40/100
과제수행기관명	한국과학기술원
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.05.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

배양 표면이 양이온성 고분자 박막으로 코팅된, 신경 줄기세포 배양 플레이트에 있어서,

상기 양이온성 고분자 박막은 글리시딜 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate; GMA) 및 N,N-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트(N,N(dimethylamino)ethyl methacrylate; DMAEMA)에 의하여 형성된 공중합체[copolymer, (p(GMA-co-DMAEMA))]이고,

상기 GMA 및 DMAEMA는 1:1.5 내지 2.5의 유량비(flow rate ratio)로 혼합된 것이며,

상기 공중합체 내 상기 DMAEMA는 30 내지 60 중량 %이고,

상기 양이온성 고분자 박막 표면은 세포 배양시 첨가하는 헤파린이 고정되는 것이며, 및

상기 헤파린에는 세포 배양시 첨가하는 성장인자가 고정되는 것인, 신경 줄기세포 배양 플레이트.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)에 의해 코팅된 것인, 신경 줄기세포 배양 플레이트.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 성장인자는 섬유아세포 성장인자(Fibroblast Growth Factor, FGF), 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF), 인슐린-유사 성장인자(Insulin-like growth factor, IGF), 혈관 내피 성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF), 전환 성장인자 $\beta 2$ (Transforming growth factor- $\beta 2$, TGF- $\beta 2$), 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium, ITS), 및 혈소판-유래 성장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 신경 줄기세포 배양 플레이트.

청구항 9

신경 줄기세포를 제 1항의 배양 플레이트 상에서 헤파린 및 성장인자와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 신경

줄기세포 배양방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 방법은 신경 줄기세포의 줄기세포능을 향상시키는 것인, 신경 줄기세포 배양방법.

청구항 13

제 9항에 있어서, 상기 방법은 신경 줄기세포의 신경세포 분화능을 향상시키는 것인, 신경 줄기세포 배양방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경 줄기세포능 증진을 위한 성장인자 고정화 방법 및 이를 이용하여 제작된 신경 줄기세포 배양 플레이트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 2017년 기준 알츠하이머나 파킨슨병, 루게릭병을 포함한 퇴행성 신경계 질환으로 인한 우리 사회의 경제적 비용은 간접비용을 포함하면 3조4000억~7조3000억 원에 달했다. 이러한 신경계 질환 치료가 어려운 이유는 신경계통의 조직은 손상을 받으면 인체 내에서의 자가 복원력으로는 재생이 일어나지 않기 때문이다. 따라서 줄기세포 치료기술의 도입을 통해 손상된 세포의 기능을 회복시키고자 하는 시도가 활발히 이루어져 왔다.

[0004] 인간 신경 줄기 세포는 지난 20년 동안 신경 퇴행성 질병 치료를 위한 유망한 세포 공급원으로 등장했지만(Nat. Neurosci., 2000, 3, 537-544, Lancet, 2000, 356, 1975-1979), 인간 신경 줄기세포의 *in vitro* 배양 기간 동안 생존, 자가 재생 및 분화 등의 주요 줄기세포의 특성을 잃기 때문에 여전히 도전인 상황이다.

[0005] 이러한 문제를 극복하기 위해, 통제된 방식으로 인슐린 유사 성장인자(IGF), 표피 성장인자(EGF) 및 섬유아세포 성장인자(FGF)와 같은 성장인자의 공급을 달성하기 위한 연구가 진행되어 왔다. 예를 들어, 이러한 성장인자는 안정화제와 결합된 하이드로겔 마이크로비드에 캡슐화되거나(PLoS One, 2013, 8, e56289), 생체 적합성 중합체에 공유적으로 연결되거나(Cell. Physiol., 2009, 221, 306-317), CVD 기술을 사용하여 공유 결합 시키는(ACS Appl. Mater. Interfaces, 2018, 10, 31882-31891, Adv. Mater. Interfaces, 2017, 4, 1700243) 등의 연구가 진행되어 왔다. 하지만 이러한 경우 면역원성 및 분해 산물로 인한 세포독성으로 인해 신경 줄기세포의 배양, 특히 임상 적용에 적합하지 않을 수 있다(Eur. J. Immunol., 2015, 45, 3222-3236, Mater. Sci. Eng., C, 2019, 104, 109927).

[0006] 따라서, 상기 성장인자를 신경 줄기세포로 전달하여 실질적으로 신경 줄기세포의 성장을 촉진함으로써, 신경 줄기세포의 자가 재생 특성과 분화 효율을 향상시킬 수 있는 새로운 방법이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 등록특허 제101733658호 (등록일자 2017년 04월 28일)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 신경 줄기세포의 줄기세포능 증대를 효과적으로 유도하기 위한 세포 배양 플레이트를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 양이온성 고분자를 통해 헤파린이 고정된 세포 배양플레이트에서 성장인자의 안정화 방법을 확립하였고, 이에 따른 신경 줄기세포 배양 플레이트를 제공하여 신경 줄기세포의 줄기세포능 향상을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 배양 표면이 양이온성 고분자 박막으로 코팅된, 신경 줄기세포 배양 플레이트를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 신경 줄기세포 배양 플레이트 상에서 헤파린 및 성장인자를 함께 배양하는 단계를 포함하는, 신경 줄기세포 배양방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명에서는 신경 줄기세포의 줄기세포능 증대를 효과적으로 유도하기 위한 세포 배양 플레이트를 개발하고자 하였다. 그 결과, 화학 기상 증착법(iCVD)을 이용한 양이온성 고분자를 매개로 정전기적 상호작용을 통해 헤파린이 고정된 세포 배양 플레이트 활용하여 성장인자의 안정화 방법을 확립함으로써 신경 줄기세포의 줄기세포능 향상을 규명하였다.
- [0014] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 배양 표면이 양이온성 고분자 박막으로 코팅된, 신경 줄기세포 배양 플레이트를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 양이온성 고분자는 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD, initiated chemical vapor deposition)에 의해 코팅된 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 "화학적 기상 증착법(Chemical Vapor Deposition, CVD)"은 목적하는 재료를 기판 및/또는 플레이트 상에 증착시키는 방법인 박막 증착(thin film deposition) 공정 중 하나를 의미한다. 상기 CVD 공정들은 모두 반응기 내에서 매우 복잡한 과정을 통해 진행되고, 반응기 내 유체 흐름, 물질 전달 등이 복합적으로 작용하여 증착되는 박막의 특성을 결정한다. 따라서 공급되는 물질의 화학적 반응 특성 및 반응기의 구조가 박막 형성에 중요한 변수로 작용할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 "개시제를 이용한 화학 기상 증착법(initiated chemical Vapor Deposition, iCVD)"은 기화된 개시제와 단량체가 기상 반응기에 주입된 후, 에너지원에 의해 라디칼화되어 고분자 중합반응을 통해 고분자 박막을 형성하는 공정을 의미한다.
- [0020] 본 발명은 개시제를 이용한 화학적 기상 증착법(iCVD) 공정을 사용하고, 적절한 단량체의 종류 및 조건을 결정함으로써, 접착시키고자 하는 기판 및/또는 플레이트의 각각의 표면에 결합 물질과 결합되기에 적합한 특정 작용기를 지닌 고분자로 이루어진 유기 고분자 박막을 형성한다.
- [0021] 상기 화학적 기상 증착법 공정은 진공 상태를 유지하는 가운데 다양한 단량체들을 동시에 기상으로 주입함으로써, 공중합체 혹은 연결된 적층 구조들을 효과적으로 형성하여 배양액 또는 수용액에 대한 내구성을 가지는 박막을 제작할 수 있도록 한다. 또한, 상기 공정에 의한 고분자 박막의 형성은 용매나 첨가제를 전혀 사용하지 않기 때문에 고순도의 박막을 얻을 수 있고, 이는 제조과정에서 발생할 수 있는 독성물질의 노출을 차단함으로써 외부 환경에 민감한 세포(예컨대, 신경세포)를 배양하는데 유용하다. 더불어, 플레이트 표면의 온도가 45℃ 이하로 낮게 유지되는 저온, 저진공 공정이며, 기상으로 증착되기 때문에, 다양한 세포 배양 플레이트(예컨대, 플라스틱)에 별도로 전처리 과정 없이 세포 배양용 박막의 코팅을 가능케 한다.
- [0022] 본 발명에서 "개시제(initiator)"는 본 발명의 공정에서 단량체들이 고분자를 형성할 수 있도록 첫 반응의 활성화를 유도하는 물질을 의미한다. 상기 개시제는 단량체가 열분해되는 온도보다 낮은 온도에서 열분해되어 유리 라디칼(free radical)을 형성할 수 있는 물질이 바람직하다. 개시제가 반응기에서 열의 공급에 의해 분해되어 유리 라디칼이 형성되면 유리 라디칼이 단량체를 활성화시켜 이후 주변 단량체들의 중합을 유도하게 되고, 이 반응이 계속되어 유기 고분자 박막을 형성하게 된다.
- [0023] 본 발명에서 개시제는 열에 의해 분해되어 라디칼을 형성하는 테르트-부틸 퍼옥사이드(tert-butyl peroxide; TBPO) 및 t-부틸 퍼옥시벤조에이트(t-butyl peroxybenzoate; TBPOB)와 같은 퍼옥사이드(peroxide) 계열

화합물, 또는 UV와 같은 빛에 의해서도 분해되어 라디칼을 형성하는 벤조페논(benzophenone) 등일 수 있으며, 바람직하게 TBPO일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0024] 본 발명의 실시예에서 사용된 TBPO는 약 110℃의 끓는 점을 갖는 휘발성 물질로서 150℃ 전후에서 열분해를 하는 물질이다. 한편 개시제 부가량은 통상의 중합반응에 필요한 양으로 당업계에 공지되어 있는 양을 첨가할 수 있으며, 예를 들어 0.5 내지 5 mol%로 첨가될 수 있으나, 상기 범위에 제한되지 않고 상기 범위보다 많거나 적을 수 있다.
- [0025] 본 발명의 "단량체"는 고분자 박막 형성을 위해 사용될 수 있는 단위체를 의미하고, 화학 기상 증착법(iCVD)에서 휘발성을 가지며, 개시제에 의해 활성화될 수 있는 물질이다. 상기 단량체는 감압 및 승온 상태에서 기화될 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 "양이온성 고분자"는 상기 단량체의 중합에 의해 형성되는 고분자로, 제1 단량체에 의해 형성된 단일 중합체(homopolymer) 또는 제1 단량체 및 제2 단량체에 의해 형성된 공중합체(copolymer)를 의미한다.
- [0028] 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 본 발명의 양이온성 고분자는 상기 단량체가 이중결합을 통해 중합된 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 단량체는 아크릴레이트계 또는 메타크릴레이트계 화합물 단량체로써, 상이한 작용기를 함유하는 2 종류의 아크릴레이트계 또는 메타크릴레이트계 화합물 단량체일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 제1 단량체는 에폭시(epoxy), 아세토아세틸(acetoacetyl), 아즈락톤(azlactone), 아이소시아네이트(isocyanate), 및 아실 할라이드(acyl halide)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 작용기를 함유하는 단량체로부터 선택될 수 있고, 바람직하게 에폭시(epoxy) 작용기를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 구체적으로, 글리시딜 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate; GMA), 펜타플루오로페닐 메타크릴레이트(pentafluorophenyl methacrylate; PFM), 푸르푸릴 메타크릴레이트(furfuryl methacrylate; FMA), 퍼플루오로데실 아크릴레이트(perfluorodecyl acrylate; PFA), 및 말레인 무수물-alt-스티렌(maleic anhydride-alt-styrene; MA-alt-St)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있고, 바람직하게, 글리시딜 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA)일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 제2 단량체는 아민(amine), 아마이드(amide), 피리딘(pyridine), 및 피롤리돈(pyrrolidone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 작용기를 함유하는 단량체로부터 선택될 수 있고, 바람직하게 아민(amine) 작용기를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 구체적으로, N,N-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate; DMAEMA), 2-비닐피리딘(2-vinylpyridine), 4-비닐피리딘(4-vinylpyridine), N-비닐피롤리돈(N-vinylpyrrolidone), 1-비닐이미다졸(1-vinylimidazole), 아크릴아마이드(acrylamide), 메타크릴아마이드(methacrylamide), 비닐-N-메틸피리디늄 클로라이드(vinyl-N-methylpyridinium chloride), 디에틸아미노에틸아크릴레이트(2-Diethylaminoethylamine; DEAEA), 디메틸아미노에틸아크릴레이트(Dimethylaminoethyl acrylate; DMAEA) 및 디에틸아미노에틸메타크릴레이트(Diethylaminoethyl Methacrylate; DEAMA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있고, 바람직하게 N,N-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate; DMAEMA)일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 구체예에 있어서, 본 발명의 양이온성 고분자 합성을 위한 메타크릴레이트계 화합물 단량체는 글리시딜 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate; GMA), N,N-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트(N,N-(dimethylamino)ethyl methacrylate; DMAEMA), tert-부틸아미노 에틸메타크릴레이트(tert-butylamino ethylmethacrylate; TBAEMA) 및 디에틸아미노 에틸메타크릴레이트(diethylamino ethylmethacrylate; DEAEA)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 본 발명의 양이온성 고분자는 상기 제1 단량체 및 제2 단량체가 1:0.1 내지 10의 비율로 혼합되어 형성된 공중합체일 수 있다.
- [0036] 바람직하게, 상기 공중합체 내 제2단량체의 비율은 30% 내지 90% 범위일 수 있고, 예를 들어 30 내지 80%, 30 내지 70%, 30 내지 60%, 30 내지 50%, 40 내지 90%, 40 내지 80%, 40 내지 70%, 40 내지 60%, 50 내지 90%, 50 내지 80%, 50 내지 70%, 60 내지 90%, 60 내지 80%, 또는 70 내지 90%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

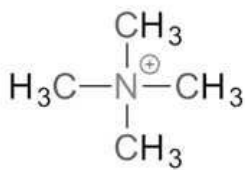
[0037] 구체적으로, 상기 공중합체 내 제2 단량체의 비율은 배양하고자 하는 세포의 종류 및 세포의 양에 따라 달라질 수 있다.

[0038] 본 발명에서 상기 양이온성 고분자는 제1 단량체의 작용기 및 제2 단량체의 작용기 사이의 가교 결합(cross-link)을 통해 신경 줄기세포 배양 플레이트에 고정화되는 것을 특징으로 한다.

[0039] 구체적으로, 상기 가교 결합은 제1 단량체에 포함된 에폭시 작용기(epoxy group) 및 제2 단량체에 포함된 아민 작용기(amine group)의 아민-에폭시 반응에 의한 결합을 의미한다. 이는 상기 양이온성 합성 고분자를 신경 줄기세포 배양 플레이트에 고정화 시킬 뿐만 아니라, 상기 결합을 통해 4차 암모늄기(quaternary ammonium group)를 생성함으로써, 양이온성 고분자 박막이 코팅된 플레이트 상에 음이온을 띠는 헤파린이 정전기적으로 흡착되도록 한다.

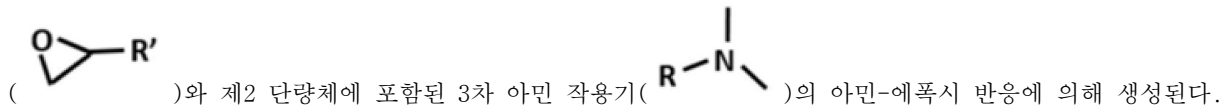
[0040] 따라서, 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 본 발명의 양이온성 고분자는 제1 단량체 및 제2 단량체 간의 결합으로 인해, 하기 화학식 1로 표시되는 화학구조를 포함할 수 있다:

[0041] [화학식 1]



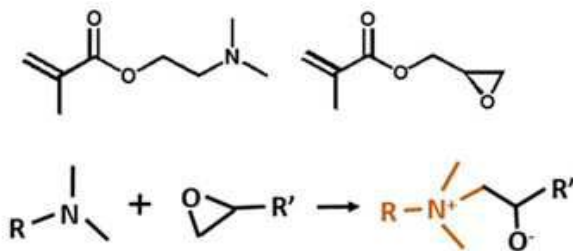
[0042]

[0043] 본 발명에서 상기 화학식 1로 표시되는 화학구조(4차 암모늄기)는 제1 단량체에 포함된 에폭시 작용기



[0044] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서 사용된 단량체 간의 결합에 따르면, 상기 4차 암모늄기의 생성은 하기 식 1의 반응으로 이루어질 수 있다:

[0045] [식 1]



[0046]

[0047] 여기에서 R 및 R' 그룹은 각각의 단량체에 포함된 아크릴레이트 또는 메타크릴레이트 구조가 되며, 본 실시예에서 사용된 DMAEMA 및 GMA가 아닌 다른 단량체를 사용할 경우, R 및 R' 그룹에 포함된 알킬 사슬(alkyl chain)의 길이가 달라질 수 있다.

[0048] 따라서, 본 발명의 배양 플레이트에 코팅된 양이온성 고분자 박막은 상기 화학식 1로 표시되는 화학구조를 포함함으로써, 하기에서 설명될 헤파린을 고정할 수 있고, 고정시킨 헤파린에 의해 성장인자를 고정화 시킬 뿐 아니라, 신경 줄기세포의 성장을 돕는 부가적인 역할도 할 수 있다.

[0049] 따라서, 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 상기 플레이트는 양이온성 고분자 박막 표면에 헤파린을 고정시킨 것일 수 있다.

[0050] 본 발명에서 헤파린은 L-이두론산(L-iduronic acid), N-아세틸화 D-글루코사민(N-acetylated D-glucosamine) 및 D-글루쿠론산(D-glucuronic acid)로 구성된 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan, GAGs)의 한 종류로, 다양한 성장인자, ECM 단백질 및 세포와 특이적인 친화성이 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 성장인자와 복합체를 형성하여 성장인자 수용체를 활성화시키고 성장인자 신호 조절에서 양성 조절(positive regulation)을 할 수 있

다고 알려져 있다. 특히, 세포 표면에서 용해성의 헤파린은 bFGF 및 FGF 수용체(FGFR)의 상호작용을 가속화시킬 수 있다.

- [0051] 상술한 본 발명의 기관에 코팅된 양이온 고분자 박막은 헤파린의 고정화를 유도함으로써 성장인자와의 상호작용을 통해 신경 줄기세포의 배양에 있어서 종래 기관과 비교하여 우수한 특성을 갖도록 하였다.
- [0052] 따라서, 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 상기 플레이트는 상기 헤파린이 흡착된 플레이트에 성장인자를 고정시킨 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 성장인자는 섬유아세포 성장인자(Fibroblast Growth Factor, FGF), 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF), 인슐린-유사 성장인자(Insulin-like growth factor, IGF), 혈관 내피 성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF), 전환 성장인자 $\beta 2$ (Transforming growth factor- $\beta 2$, TGF- $\beta 2$) 및 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium, ITS), 혈소판-유래 성장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF) 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 궁극적으로, 본 발명에서 성장인자는 신경 줄기세포 배양 플레이트에 고정된 헤파린과의 안정된 복합체를 형성하여 다양한 세포의 성장인자의 접근을 향상시켜 신경 줄기세포의 배양을 용이하게 유도할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 "기관 및/또는 플레이트"는 세포를 배양할 수 있는 배양용기를 의미한다.
- [0056] 상기 기관 및/또는 플레이트는 세포를 배양하거나 스크리닝 등에 사용할 수 있는 다양한 형태의 용기를 포함한다. 예를 들어, 세포 배양용 기관 및/또는 플레이트는 배양 접시, 마이크로타이터 플레이트(6웰, 12웰, 24웰, 48웰, 96웰, 384웰 또는 9600웰 등), 마이크로칩, 챔버 슬라이드, 튜브, 셀팩토리, 롤러 보틀, 스피너 플라스크, 중공 섬유(hollow fibers), 마이크로 캐리어, 비즈 등의 형상을 가질 수 있다.
- [0057] 또한, 상기 세포 배양용 기관 및/또는 플레이트는 유리, 금속, 금속 산화물, 섬유, 종이 및 플라스틱 재질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본래의 세포, 조직 또는 기관 등에 유의한 염증 반응, 면역원성 또는 세포 독성을 유도하지 않는 기능을 가지는 당업계에 공지된 어떠한 물질도 사용 가능하다.
- [0058] 상기 플라스틱은 폴리에틸렌(polyethylene, PE), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리아미드(polyamides, PA), 폴리에스터(polyester, PES), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리우레탄(polyurethanes, PU), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리염화비닐리덴(polyvinylidene chloride, PVDC), 폴리테트라플루오르에틸렌(polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리에트르에테르케톤(polyetheretherketone, PEEK) 및 폴리에테르이미드(polyetherimide, PEI)로 이루어진 군에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 세포 배양용 폴리스티렌(tissue culture polystyrene; TCP)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명은 양이온성 고분자를 플레이트에 직접 코팅하는 방법을 포함하고, 상기 양이온성 고분자가 코팅된 플레이트의 제작은 일반적인 세포 배양용 기관 및/또는 플레이트뿐만 아니라, 다양한 3차원 구조체(예컨대, membrane 및 paper 등)에도 적용 가능하다.
- [0060] 본 발명의 구체예에 있어서, 본 발명의 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(iCVD)으로 상기 배양 플레이트에 고분자 박막을 증착 코팅할 수 있다.
- [0061] 상기 고분자 박막은 poly GMA-co-DMAEMA(pGD)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명에서 "신경 줄기세포"는 뉴런 및 신경아교세포를 생성할 수 있는 분화능(potency)을 유지하는 세포를 의미한다.
- [0064] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 신경 줄기세포를 상술한 본 발명의 신경 줄기세포 배양 플레이트 상에서 헤파린 및 성장인자와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 신경 줄기세포 배양방법을 제공한다.
- [0065] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 헤파린은 상기 배양 플레이트의 양이온성 고분자 박막 표면에 고정될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 상기 성장인자는 상기 배양 플레이트의 양이온성 고분자 박막 표면에 고정된 헤파린에 고정될 수 있다.
- [0067] 본 발명에서 "신경 줄기세포 배양방법"은 양이온성 고분자 박막으로 코팅된 세포 배양 플레이트 상에 배양액을 첨가한 후, 헤파린 및 성장인자를 추가로 첨가하여 세포 배양을 수행하는 방법을 의미한다.

- [0068] 본 발명에서 "배양액"은 줄기세포를 배양할 수 있는 용액을 의미하며, 이는 당업자라면 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법을 적용하는 것임을 쉽게 이해할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 실시예에서 상기 신경 줄기세포 배양방법을 이용하여 인간 신경 줄기세포(hNSC)의 배양을 수행하였고, 그 결과, 상기 방법은 신경 줄기세포의 줄기세포능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 방법은 신경 줄기세포의 신경세포 분화능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0070] 상기 신경 줄기세포의 줄기세포능 및 분화능을 확인함에 있어서, 다음의 신경세포 마커의 발현을 통해 수행할 수 있다: ABCG2, ASCL1/Mash1, beta-Catenin, BMI-1, Brg1, N-Cadherin, Calcitonin R, CD15/Lewis X, CD133, CDCP1, COUP-TF I/NR2F1, CXCR4, FABP7/BFABP, FABP8/M-FABP, FGF R2, FGF R4, FoxD3, Frizzled-9, GATA-2, GCNF/NR6A1, GFAP, Glut1, HOXB1, ID2, Meteorin, MSX1, Musashi-1, Musashi-2, Nestin, NeuroD1, Noggin, Notch-1, Notch-2, Nrf2, Nucleostemin, Numb, Otx2, Pax3, Pax6, PDGF R alpha, PKC zeta, Prominin 2, ROR2, RUNX1/CBFA2, RXR alpha/NR2B1, sFRP2, SLAIN1, SOX1, SOX2, SOX9, SOX11, SOX21, SSEA-1, SSEA-4, TRAF-4, Vimentin, ZIC1, Nestin, FoxG1, Nkx2.1, Gli3, Vimentin, Tuj1, Emx1, Olig2, Ascl1. 여기에서, 상기 신경세포 마커는 Nestin, Sox2, Sox1, Musashi-1, FoxG1, Nkx2.1, Pax6, Gli3, Vimentin, Tuj1, Emx1, Olig2 및 Ascl1 중 적어도 하나를 발현하는 것일 수 있고, 바람직하게는 Nestin, Sox2, Sox1, Musashi-1, FoxG1, Nkx2.1, Pax6, Gli3, Vimentin, Tuj1, Emx1, Olig2 및 Ascl1 전부를 발현하는 것일 수 있다.
- [0071] 본 발명의 신경 줄기세포 배양방법은 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 신경 줄기세포 배양 플레이트를 이용하여, 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복되는 내용을 원용하며, 그 기재를 생략한다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 신경 줄기세포 배양 플레이트의 제조방법을 제공한다:
- [0074] 양이온성 고분자 박막을 코팅하는 단계.
- [0075] 본 발명의 구체예에 있어서, 상기 방법은 다음의 단계를 더 포함하는 것일 수 있다:
- [0076] 헤파린을 고정하는 단계; 및
- [0077] 성장인자를 고정하는 단계.
- [0078] 상기 헤파린 및/또는 성장인자는 상기 양이온성 고분자 박막이 코팅된 신경 줄기세포 배양 플레이트 상에 일정 시간 동안 놓아둠으로써 고정될 수 있다. 본 발명의 신경 줄기세포 배양 플레이트의 제조방법은 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 신경 줄기세포 배양 플레이트를 제조하는 방법에 관한 것이므로, 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복되는 내용을 원용하며, 그 기재를 생략한다

발명의 효과

- [0080] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0081] (a) 본 발명은 화학 기상 증착법(iCVD)을 이용한 양이온성 고분자를 이용하여 흡착된 헤파린에 의해 성장인자를 배양 플레이트 표면에 고정화 시키는 방법을 제공한다.
- [0082] (b) 본 발명은 상기 고정화 방법에 의해 성장인자가 고정화된, 신경 줄기세포 배양 플레이트를 제공한다.
- [0083] (c) 본 발명의 배양 플레이트를 이용하는 경우, 인간 신경 줄기세포의 줄기세포능 및 신경세포 분화능을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0085] 도 1은 iCVD 공정에 의해 양이온성 고분자 박막이 형성된 표면에 헤파린-bFGF 복합체가 고정화된 세포 배양용 기판을 제조하는 방법에 대한 모식도이다.
- 도 2는 pGMA-co-DMAEMA 공중합체 고분자가 아세틸콜린과 동일한 혹은 유사한 화학구조를 포함하는 합성 고분자임을 나타내고, 및 상기 고분자에서 인간 신경줄기세포를 배양한 결과로써, neurosphere 형성하는 모습을 나타낸다.
- 도 3a는 단량체 비율별로 제작된 pGMA-co-DMAEMA의 FT-IR 스펙트럼을 통해 성공적인 공중합체 합성이 이루어졌음을 나타낸다.

도 3b는 단량체 비율별로 제작된 pGMA-co-DMAEMA의 XPS 스캔을 통해 두 단량체의 가교가 성공적으로 일어났음을 나타낸다.

도 3c는 단량체 비율별로 제작된 pGMA-co-DMAEMA의 제타 포텐셜 분석을 통해 합성된 고분자의 이온성을 나타낸다.

도 4a는 플루오레세인이 접합된 헤파린 분자가 고분자(pGMA-co-DMAEMA) 박막이 증착된 기판에 선택적으로 흡착된 것을 나타내며, 단량체 비율별 pGD 증착 기판에서의 흡착된 헤파린의 정량분석 결과를 나타낸다.

도 4b는 bFGF 분자가 고분자 박막에 헤파린이 사전 부착된 기판 표면에 흡착된 것을 나타내며, 단량체 비율별 pGD 증착 기판에서의 흡착된 bFGF의 정량분석 결과를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 방법으로 제작된 세포 배양용 기판(pG1D2) 및 대조군의 배양 기판(TCP)에서 배양된 인간 신경 줄기세포 간의 비교를 나타낸다: 배양된 인간 신경 줄기세포의 neurosphere 형성(5a); 도 5a에 대한 정량적 분석(5b); 배양된 인간 신경 줄기세포에서의 stemness marker인 nestin 및 SOX-2 유전자의 발현 정도(5c); 배양된 인간 신경 줄기세포의 nestin 단백질의 발현 정도(5d); 배양된 인간 신경 줄기세포의 신경 세포 및 성상 세포로의 분화 정도(5e).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

제조예: 양이온성 고분자 박막이 형성된 신경 줄기세포 배양용 기판의 제조

단량체인 글리시딜 메타아크릴레이트(glycidyl methacrylate; GMA) (Sigma-Aldrich, 97%) 및 N,N-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트(N,N-(dimethylamino)ethyl methacrylate; DMAEMA) (Tokyo Chemical Industry, 98.5%)를 각각 45℃, 40℃로 가열하여 기화시켰다. 기화된 단량체 및 개시제인 tert-부틸 퍼옥사이드(tert-butyl peroxide)(98%, Aldrich)를 하기 표 1에 나타난 비율로 iCVD(initiated chemical vapor deposition) 챔버(Daeki Hi-Tech Co. Ltd.)에 도입하였다. 배양 기판 TCP(tissue culture polystyrene)을 iCVD 반응기에 넣고, 기판 온도는 28℃, 필라멘트 온도는 140℃로 유지하였다. 챔버의 압력을 250 mTorr로 유지하면서 고분자 증착 공정을 진행하였다. 상기 과정을 통해, pGD(poly GMA-co-DMAEMA) 고분자 박막을 배양 기판 표면에 증착 코팅하였다.

표 1

	Feed ratio (sccm)	Deposition rate (nm/min)
	GMA : DMAEMA : TBPO	
pG1D1(실시예 1)	1 : 1 : 1	14.3
pG1D2(실시예 2)	1 : 2 : 1	12.5
pG1D3(실시예 3)	1 : 3 : 1	12.5
pG1D4(실시예 4)	1 : 4 : 1	12.5

그 결과, 300 nm 두께의 공중합체(p(GMA-co-DMAEMA))가 증착된 신경 줄기세포 배양용 기판을 얻을 수 있었고, 상기과 같은 증착 과정은 도 1에 간략하게 나타내었다.

실험예 1: 신경 줄기세포 배양용 기판의 표면 특성 평가

상기 제조예의 방법에 의해 제조된 신경 줄기세포 배양용 기판의 표면에 코팅된 고분자 박막의 특성을 평가하였다.

먼저, ALPHA FT-IR(Bruker Optics)를 이용하여, 기판 표면에서 푸리에 변환 적외선 분광광도계(FT-IR)의 흡광도 모드를 확인함으로써 pGD 고분자 박막의 화학적 구성(chemical composition)을 분석하였다.

도 3a에 나타난 바와 같이, FT-IR 스펙트럼 상에서 주입한 단량체들이 올바르게 증착되었음을 확인하였다. 즉,

DMAEMA의 주입 비율이 증가할수록 박막 표면의 양전하에 영향을 미치는 DMAEMA의 3차 아민 작용기(teritary amine group)를 나타내는 2767 cm^{-1} 및 2819 cm^{-1} 에서의 피크(peak)의 강도가 증가한 반면, 단량체 GMA의 스펙트럼에 있었던 에폭시 고리(epoxy ring)의 피크(759 cm^{-1} , 847 cm^{-1} 및 907 cm^{-1})는 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 공정 중 라디칼 중합반응이 성공적으로 이루어짐으로써, GMA 및 DMAEMA의 모든 비율에서 성공적인 공중합체 합성이 이루어진 것을 확인할 수 있었다.

[0100] 다음으로, Sigma Probe Multipurpose XPS(Thermo VG Scientific Inc.)를 이용하여 XPS(X-ray Photoelectron Spectroscopy)분석을 수행하였다. pGD 고분자 박막에서의 중성 3차 아민기(neutral teritary amine group, N) 및 전하를 띤 4차 암모늄기(charged quaternary ammonium group, N^+)를 측정함으로써, 기판 표면의 계면 화학(surface chemistry)을 분석하였다.

[0101] 도 3b에 나타난 바와 같이, 4차 암모늄(quaternary ammonium groupe)의 이온 함량(atomic content)를 평가하여, 두 단량체의 가교가 성공적으로 일어났음을 확인하였다.

[0103] 끝으로, 제타 포텐셜 분석을 통해, 4차 암모늄기에 의한 기판 표면의 이온성 여부를 확인하였다.

[0104] 도 3c에 나타난 바와 같이, 두 단량체의 분율에 따라 기판 표면의 이온성 정도가 크게 달라질 수 있음을 확인하였다. 특히, 실시예 2(pGD2)에서 가장 높은 값을 나타내었다.

[0106] 실험예 2: 신경 줄기세포 배양용 기판에 대한 헤파린 및 성장인자 흡착 확인

[0107] 상기 제조예에서 제조된 신경 줄기세포 배양용 기판에 대하여, 헤파린 분자 및 성장인자의 흡착을 확인하였다.

[0109] 2.1. 신경 줄기세포 배양용 기판에 대한 헤파린 흡착 확인

[0110] 고분자 박막이 증착된 기판에 형광물질인 플루오레세인이 접합된 헤파린(Fluorescein conjugated heparin)($10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$, Thermo)이 상기 기판의 표면에 흡착되도록 기판에 1시간 동안 놓아두었다. 흡착되지 않은 헤파린을 제거하기 위해 Dulbecco의 인산염 완충 식염수(DPBS, Welgene)로 3회 세척하였다. 그런 다음, 상기 기판을 형광 현미경(Nikon)으로 이미지화하여, 기판 표면에 흡착된 헤파린에 대한 정량분석은 ELISA를 통해 확인되었다. 이때, 비교를 위하여 고분자 박막이 증착되지 않은 TCP 기판을 대조군으로 사용하였다.

[0111] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, 헤파린이 본 발명의 고분자(p(GMA-co-DMAEMA)) 박막이 증착된 기판(pGD2)에만 선택적으로 흡착되고 TCP 기판에는 흡착되지 않는 것을 확인하였다. 특히, 실시예 2의 pGD2로 코팅된 기판 표면에서 헤파린의 흡착이 가장 강하게 나타나는 것을 확인하였다.

[0113] 2.2. 신경 줄기세포 배양용 기판에 대한 성장인자(bFGF) 흡착 확인

[0114] 고분자 박막에 헤파린이 부착된 기판에 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF, R&D)를 30분 동안 놓아두었다. 흡착되지 않은 bFGF는 DPBS로 3회 세척하여 제거한 후, 상기 기판의 표면을 형광 현미경으로 이미지화 하였고, ELISA를 통해 정량분석이 수행되었다. 마찬가지로, 비교를 위하여 고분자 박막이 증착되지 않은 TCP 기판을 대조군으로 사용하였다.

[0115] 그 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이, bFGF 분자가 본 발명의 고분자(p(GMA-co-DMAEMA)) 박막이 증착된 기판(pGD2)에만 선택적으로 흡착되고 TCP 기판에는 흡착되지 않는 것을 확인하였다. 특히, 실시예 2의 pGD2로 코팅된 기판 표면에서 bFGF의 흡착이 가장 강하게 나타나는 것을 확인하였다.

[0117] 실험예 3: 인간 신경 줄기세포(hNSC)의 neurosphere 형성 확인

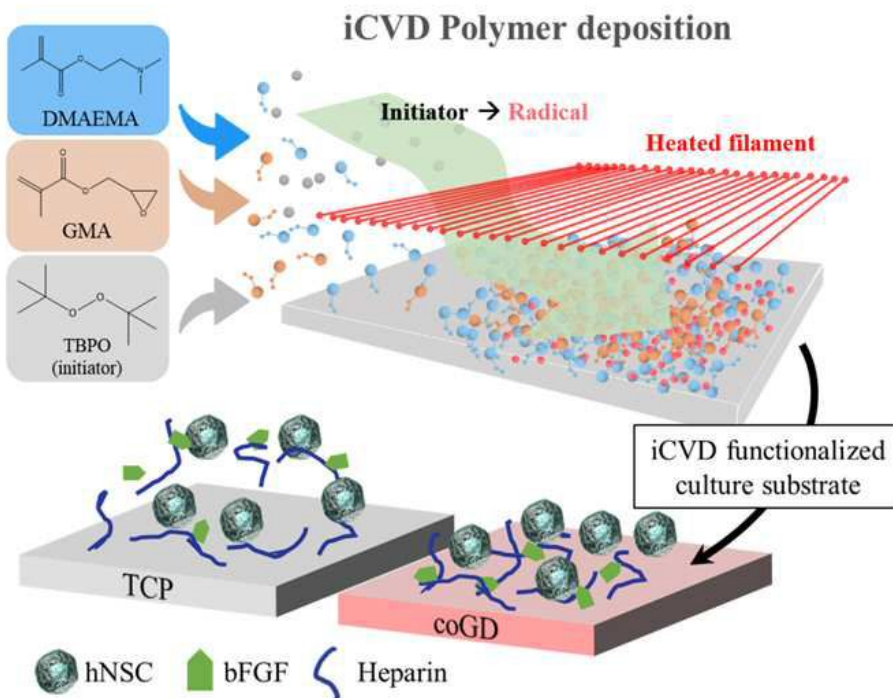
[0118] 상기 제조예에 의해 제조된 신경 줄기세포 배양용 기판에 대하여, 인간 신경 줄기세포(hNSC)의 neurosphere 형성 여부를 확인하였다. 본 실험은 가장 강한 헤파린 및 성장인자의 흡착을 나타낸, 실시예 2(pGD2)의 기판을 사용하여 수행되었다.

[0119] 구체적으로, 인간 신경 줄기세포를 N2 supplement 1x(Gibco)가 포함된 Dulbecco's modified Eaglemedium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) 배양액(Gibco, HEPES)에서 배양하되, 상기 배양액에 헤파린(10 KU , 8 mg ml^{-1} , Sigma- Aldrich) 및 섬유아세포 성장 인자(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF, 20 ng ml^{-1} ; R&D)를 추가로 첨가하였다. 추가로 첨가한 헤파린 및 섬유아세포 성장 인자가 기판 표면에 완전히 고정화되도록 pGD2 기판에 상기 배양액을 30분 동안 놓아둔 후, 인간 신경 줄기세포를 배양하였다. 음성 대조군으로써, 배양 기판 TCP에서의 인간 신경 줄기세포의 배양도 상기 방식으로 수행하였다.

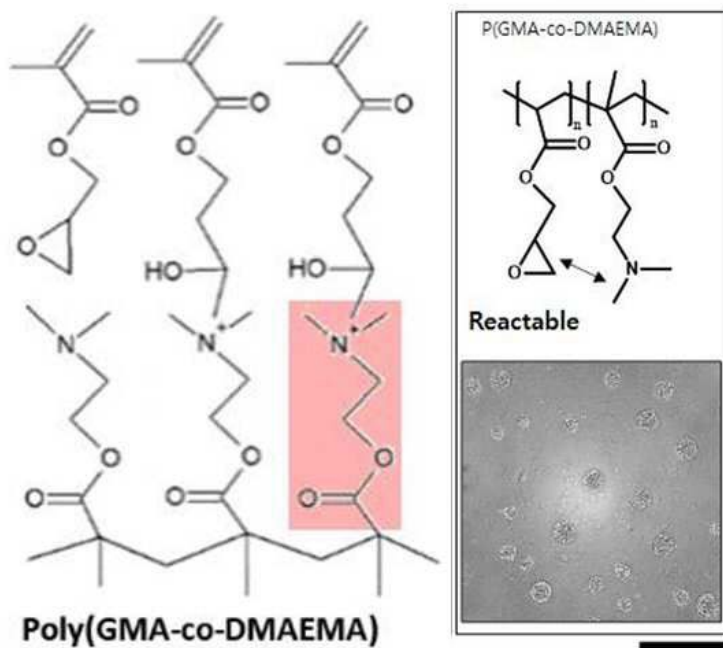
- [0120] 37℃의 5%의 CO₂가 함유된 습한 공기 조건에서 8일 동안 배양하여 인간 신경 줄기세포의 neurosphere의 배양 정도를 확인하였다.
- [0121] 그 결과, 도 5a 및 5b에 나타낸 바와 같이, 배양 기관 TCP에서의 배양과 비교하여, 본 발명의 양이온성 고분자 박막이 코팅된 기관에서 배양된 인간 신경 줄기세포의 neurosphere가 모든 배양 기간 동안 더 큰 사이즈로 빠르게 형성되는 것을 관찰하였다.
- [0123] **실험예 4: 인간 신경 줄기세포(hNSC)의 줄기세포능 확인**
- [0124] 본 발명의 세포 배양용 기관에서 배양된 인간 신경 줄기세포의 자가-재생 특성(self-renewal property)을 평가하고자, 줄기세포능 마커(stemness marker)인 NESTIN 및 SOX-2의 발현을 확인하였다.
- [0125] 상기 실험예 3과 동일한 방식으로 pG1D2 기관에서 인간 신경 줄기세포를 배양하였고, 상기 마커 유전자의 RNA 수준 및 단백질 수준에서의 발현을 확인하였다.
- [0126] 그 결과, 도 5c 및 도 5d에서 나타낸 바와 같이, 줄기세포능 마커(stemness marker)인 NESTIN 및 SOX-2 유전자의 발현이, 상기 pG1D2 기관에서 배양된 인간 신경 줄기세포에서 배양 기관 TCP와 비교하여 각각 약 11배 및 약 3배 증가한 것을 확인하였다(도 5a). 이는 NESTIN 단백질의 발현이 크게 증가한 것을 통해서도 확인할 수 있었다(도 5d).
- [0128] **실험예 5: 인간 신경 줄기세포(hNSC)의 분화능 확인**
- [0129] 본 발명의 세포 배양용 기관에서 배양된 인간 신경 줄기세포의 분화 능력을 평가하고자, tubulin beta 3(Tuj1) 및 galial fibrillary acidic protein(GFAP)에 대한 면역염색법(immunostaining)을 수행하였다.
- [0130] 구체적으로, 실험예 3에 기재된 바와 같이 인간 신경 줄기세포를 pG1D2 기관 및 TCP 배양기관에서 4일간 배양한 후, 헤파린 및 섬유아세포 성장 인자가 포함되지 않은 배양액으로 교체하였다. 7일간 추가적으로 배양한 후, 상기 인간 신경 줄기세포에 대하여 면역염색을 수행하였다.
- [0131] 결과적으로, 도 5e에서 나타낸 바와 같이, Tuj1-양성 세포의 생성은 배양 기관 TCP보다 pG1D2 기관에서 더 우세하여, pG1D2 기관이 인간 신경 줄기세포의 신경 세포 및 성상 세포로의 분화 촉진에 효과적임을 확인하였다.

도면

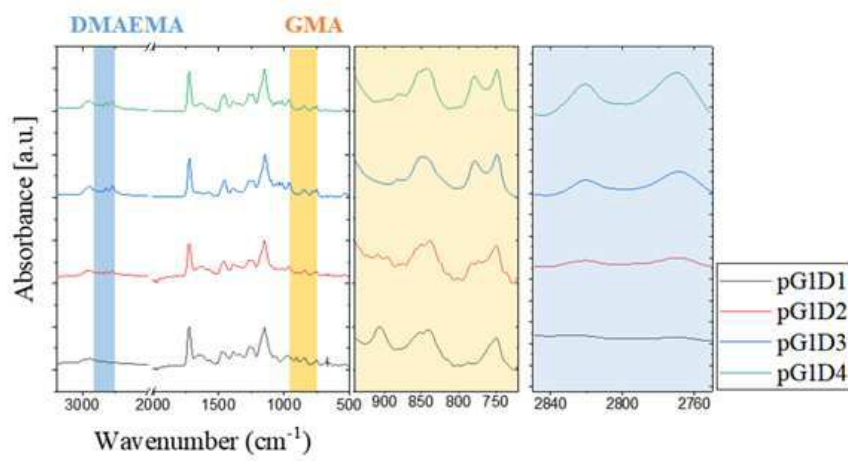
도면1



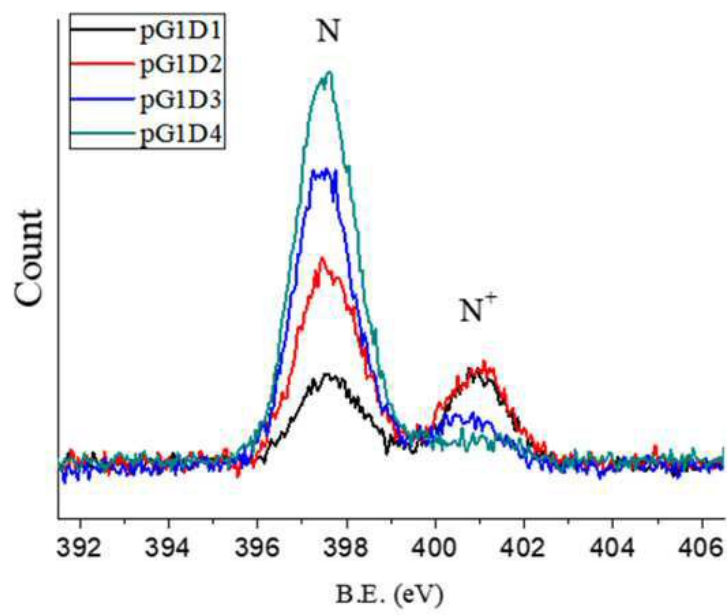
도면2



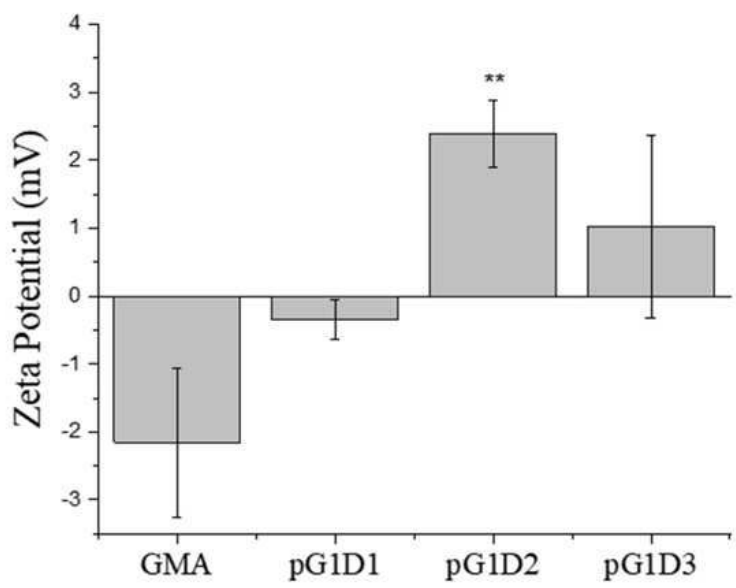
도면3a



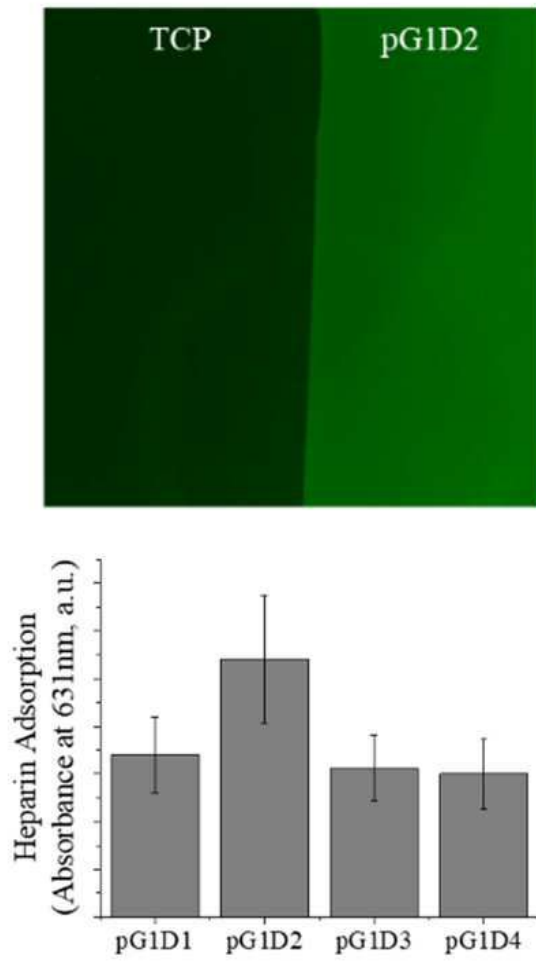
도면3b



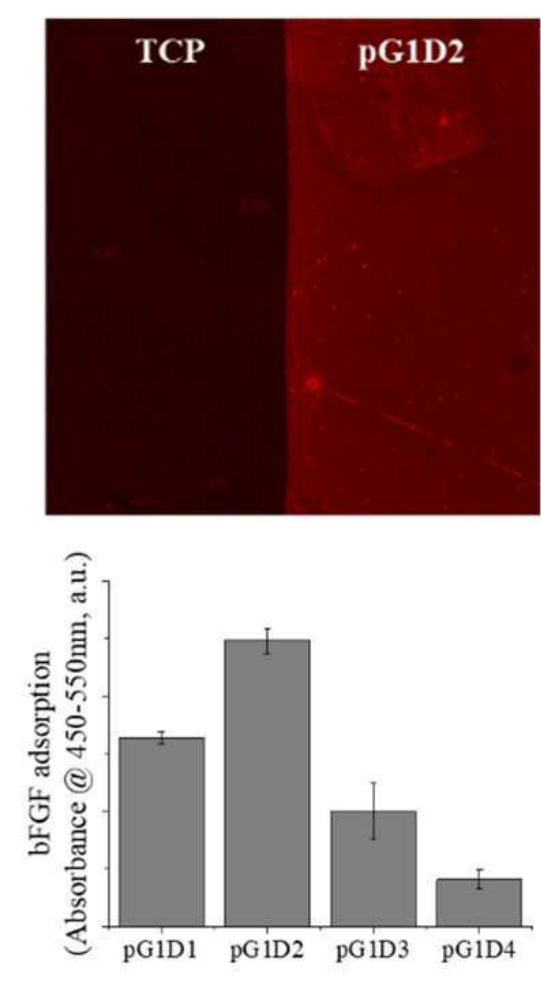
도면3c



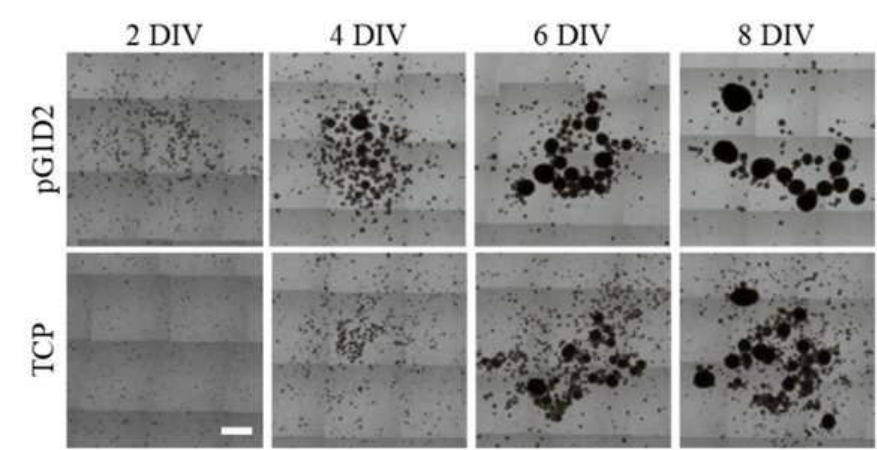
도면4a



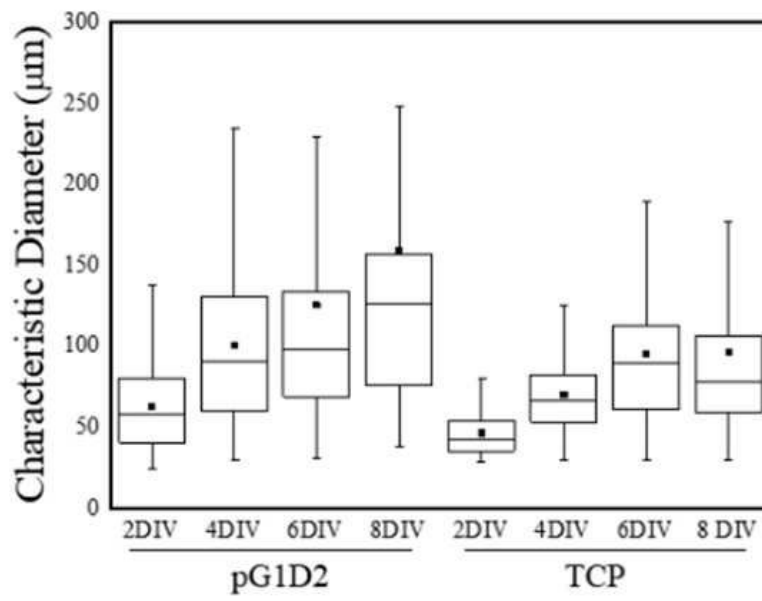
도면4b



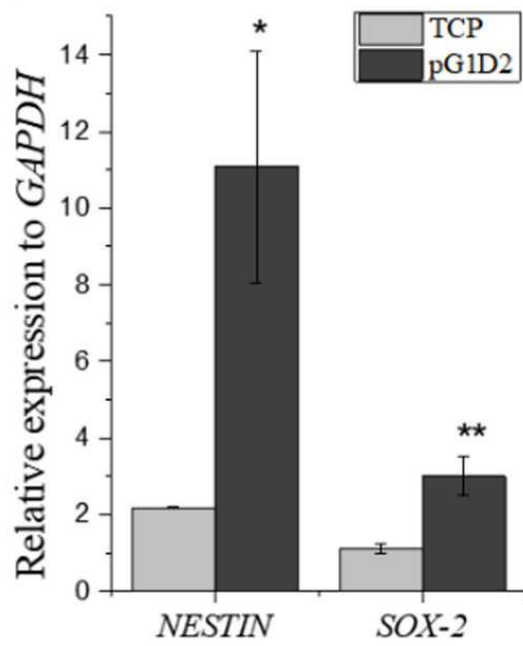
도면5a



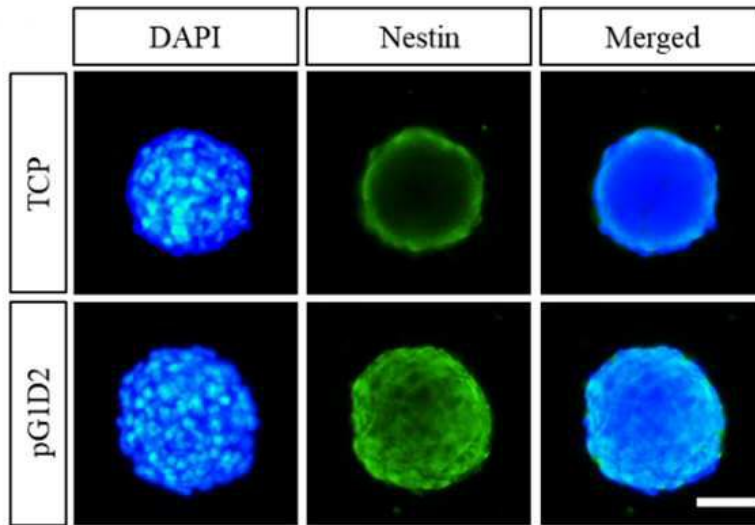
도면5b



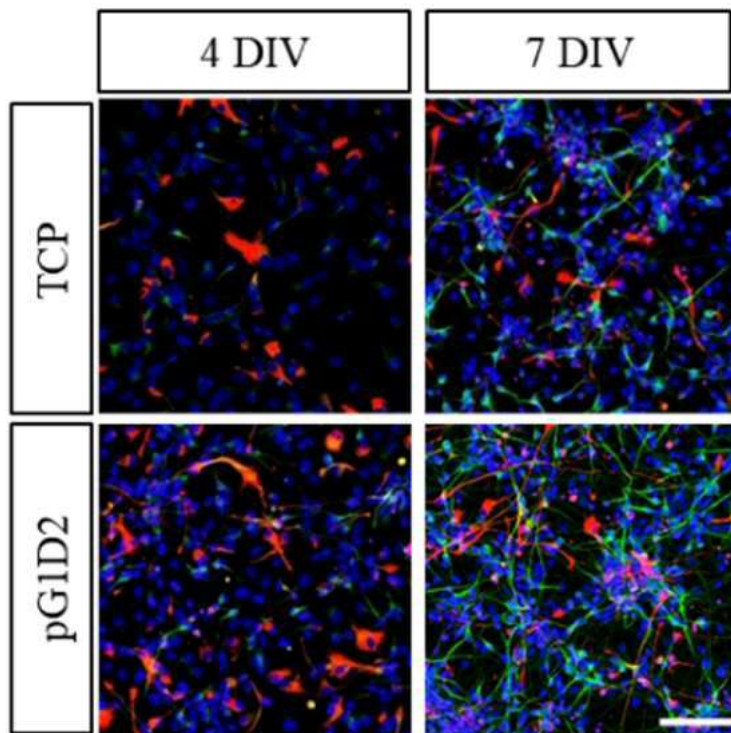
도면5c



도면5d



도면5e



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 8

【변경전】

제 3항에 있어서, 상기 성장인자는 섬유아세포 성장인자(Fibroblast Growth Factor, FGF), 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF), 인슐린-유사 성장인자(Insulin-like growth factor, IGF), 혈관 내피 성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF), 전환 성장인자 $\beta 2$ (Transforming growth factor- $\beta 2$, TGF-

$\beta 2$), 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium, ITS), 및 혈소판-유래 성장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF) 로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 신경 줄기세포 배양 플레이트.

【변경후】

제 1항에 있어서, 상기 성장인자는 섬유아세포 성장인자(Fibroblast Growth Factor, FGF), 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF), 인슐린-유사 성장인자(Insulin-like growth factor, IGF), 혈관 내피 성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF), 전환 성장인자 $\beta 2$ (Transforming growth factor- $\beta 2$, TGF- $\beta 2$), 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium, ITS), 및 혈소판-유래 성장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF) 로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 신경 줄기세포 배양 플레이트.