



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년02월26일
 (11) 등록번호 10-0885509
 (24) 등록일자 2009년02월18일

(51) Int. Cl.

A61L 27/02 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01) A61L 27/58 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0059657

(22) 출원일자 2007년06월18일

심사청구일자 2007년06월18일

(65) 공개번호 10-2008-0111357

(43) 공개일자 2008년12월23일

(56) 선행기술조사문헌

US 4,394,370 (1983. 7. 19).*

KR1020000050294 A

논문 1 : Cell and Tissue Banking지

논문 2 : University of Oulu 학술논문

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국원자력연구원

대전 유성구 덕진동 150-1

(72) 발명자

변명우

전북 정읍시 상동 대우드림채아파트 102동 1307호

이주원

전북 정읍시 상동 수목토아파트 102동 1503호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

황이남

전체 청구항 수 : 총 10 항

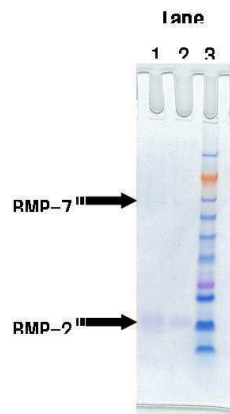
심사관 : 안규정

(54) 방사선 조사에 의한 골형성 단백질의 방출능이 향상된탈회골의 생산방법 및 골형성 단백질의 분리방법

(57) 요약

본 발명은 탈회골에 방사선을 조사함으로써 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법, 상기 방법에 의해 생산된 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골, 상기 탈회골을 이용한 골형성 단백질의 분리방법 및 상기 방법에 의해 분리된 골형성 단백질에 관한 것으로, 본 발명의 방법에 의해 생산된 탈회골 및 상기 탈회골을 이용하여 분리한 골형성 단백질은 뼈 수복용 이식재, 골성장 촉진용 조성물 및 건강 보조식품 등으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최종일

서울 영등포구 신길7동 삼환아파트 108동 1504호

김재훈

전북 정읍시 수성동 부영아파트 205동 405호

송범석

서울 중랑구 신내동 시영아파트 601동 807호

성낙윤

충남 연기군 금남면 신촌리 109

이희섭

충남 홍성군 갈산면 가곡리 294-2

특허청구의 범위

청구항 1

탈회골에 방사선을 조사하여 탈회골을 구성하고 있는 골형성 단백질의 방출을 증가시키는 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 방사선이 감마선, 전자선 및 X-선으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 방사선의 흡수선량이 2.5 내지 100 kGy인 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 방사선의 조사는 탈회골의 고체상의 입자에 직접 방사선을 조사하거나, 탈회골에 골 수복재 전달체를 혼합한 상태에서 방사선을 조사하는 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 골 수복재 전달체가 카르복시메틸셀룰로오스, 키토산, 피브린 및 소장점막으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 탈회골에 골 수복재 전달체를 2 : 8 내지 4 : 6으로 혼합하는 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 골형성 단백질이 BMP-2 또는 BMP-7인 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항 내지 제 7항중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된, 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골에, 콜라게나제 및 염을 첨가하여 탈회골을 구성하는 콜라겐을 분해하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골을 이용한 골형성 단백질의 분리방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 염이 MgCl₂, CaCl₂, NaCl, N-에틸말레이미드, 페닐메틸술폰플루오라이드 및 벤즈아미딘-염산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골을 이용한 골형성 단백질의 분리방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 콜라겐을 분해반응시킨 후, 상기 분해반응 용액을 투석하여 상기 용액에 함유된 염을 제거하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골을 이용한 골형성 단백질의 분리방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <2> 본 발명은 방사선 조사에 의한 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법 및 골형성 단백질의 분리방법에 관한 것으로, 좀더 상세하게는 탈회골에 방사선을 조사함으로써 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법, 상기 방법에 의해 생산된 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골, 상기 탈회골을 이용한 골형성 단백질의 분리방법 및 상기 방법에 의해 분리된 골형성 단백질에 관한 것이다.
- <3> 골형성 단백질(bone morphogenetic protein ; BMP)은 TGFb -슈퍼패밀리(TGFb-superfamily)에 속하는 단백질이다. 탈회된 뼈의 골기질을 쥐의 근육에 삽입한 결과, 골기질이 삽입된 부위에서 이소형 골 형성(ectopic bone formation)이 이루어짐을 관찰할 수 있었고, 이러한 실험으로부터 골이 성장하기 위해서는 골의 기질에 골을 형성하는 세포군의 미분화세포가 분화되어 나올 수 있게 유도하는 물질을 함유하고 있어야 함이 입증되었으며, 골기질에 존재하는 이러한 단백질 성분을 골형성 단백질이라 명명하였다(Urist, MR, Strates, BS, bone morphogenetic protein. J. Dental Res. 50:1392-1406, 1971).
- <4> 골형성 단백질은 분화인자이며 뼈 형성을 유도하는 능력에 기초하여 분리되었다(Wozney, JM, Science 242:1528-1534, 1988). 그것들은 TGFb -슈퍼패밀리에 속하는 30개 이상의 구성원을 가지고 BMP 패밀리를 만든다. 이 BMP 패밀리는 BMP-2 및 BMP-4와 같은 BMP들, OP-1 또는 BMP-7, OP-2 또는 BMP-8, BMP-5, BMP-6 또는 Vgr-1와 같은 골형성 단백질(osteogenetic protein, OPs), CDMp-1 또는 BMP-14 또는 GDF-5와 같은 연골유래 형태형성 단백질(cartilage-derived morphogenetic proteins, CDMps), GDF-1, GDF-3, GDF-8, GDF-11 또는 GDF-12 및 GDF-14와 같은 성장/분화인자(growth/differentiation factors, GDFs) 및 BMP-3 또는 오스테오제닌 (osteogenin), BMP-9 또는 GDF-2, 및 BMP-10과 같은 다른 서브패밀리를 포함하는 서브패밀리들로 분류된다.
- <5> 자연 발생의 골은 유기물과 무기물 두 가지로 이루어져 있는데, 유기물은 성장인자, 연골조직, 콜라겐 및 다른 단백질을 포함한다. 골의 무기 성분은 Ca/P 비율이 1.45-1.75인 비화학양론적 불완전 결정 아파타이트(poorly crystalline apatitic: PCA) 칼슘 포스페이트를 포함한다(Besic et al., J. Dental Res. 48(1):131, 1969). 상기 무기골의 미네랄은 생체내에서 과골세포와 골모세포에 의해 계속적으로 재흡수되고 재생된다.
- <6> 골 이식물은 골에 결함이나 상처가 있을 때 자연적인 재생과정을 증대시키기 위하여 종종 이용되는데, 상기 골 이식물은 생체 적합성이 있어야 한다. 또한, 이상적인 골 이식물은 골형성적, 즉 골전도적임과 동시에 골유도적이어야 하며, 이식에 앞서 외과의사에 의해 쉽게 조각될 수 있어야 하고, 이식 후에 강도와 성질이 생체내에서 그대로 유지될 수 있어야 한다.
- <7> 유기 골유도성 물질이야말로 이러한 성분의 바람직한 요소라 할 수 있다. 일반적으로 널리 이용되는 골유도성 물질은 탈회골(demineralized bone matrix ; DBM)과 재조합된 인간 골형성 단백질들(rh-BMPs)을 포함한다(rh-BMPs; 참조, 미국 특허 제6,030,635호; 유럽 특허출원 제0 419 275호; PCT/US00/03024; PCT/US99/01677; 및 PCT/US98/04904). 이러한 유기 골유도성 물질들은 전형적으로 액체 또는 젤라틴 캐리어와 함께 이식 부위로 운반된다(참조, 미국 특허 제 6,030,635호; 미국 특허 제5,290,558호; 미국 특허 제5,073,373호; 및 PCT/US98/04904). 이상적인 골 이식물은 재생능력을 최대화하기 위하여 풍부한 양의 골유도성 물질들을 포함한다.
- <8> 따라서, 효과적인 골이식제의 개발을 위해서는 골형성 단백질을 효과적으로 방출할 수 있는 탈회골의 개발이 절실히 요구되고 있다. 그러나, 지금까지는 탈회골로부터 골형성 단백질을 효과적으로 방출할 수 있는 기술의

개발이 미흡했다.

- <9> 한편, 방사선 조사는 전통적으로 식품 및 공중보건제품의 위생화 및 장기 저장법으로 품온의 상승 없이 경제적이면서 안전한 방법으로 알려져 있다. 감마선 조사는 고분자 분해에 유용한 기술이며, 이는 분자 중합체를 이루는 결합에 자유 라디칼을 형성하여 결합을 끊어주는 역할을 하기 때문인데, 여기에는 물분자가 촉매로 작용하는 것으로 알려져 있다.
- <10> 따라서, 최근에는 키토산, 알긴산염, 카라기난, 셀룰로오스, 펙틴 등과 같은 탄수화물을 재구성 및 재활용하여 사용할 목적으로 방사선 조사 기술이 적용되고 있으며, 특히 환경오염을 줄이는데 유용한 기술로 보고되고 있다. 다만, 방사선 조사시의 선량, 온도, 공기와의 접촉, 저장조건 등이 방사선 조사 식품의 영양소 함량에 영향을 미칠 수 있다는 결과도 보고된 바 있다.
- <11> 비타민은 1 kGy 이상 처리할 때, 특별히 높은 온도에서 처리하거나 산소 존재하에 처리하면 손실이 약간 있으나, 비타민마다 손실의 정도가 다르고, 일반적으로 낮은 온도, 무산소 조건에서는 비타민 손실을 막을 수 있다. 무기질은 방사선 조사에 의해서도 영향이 없으며, 탄수화물, 지방 및 단백질은 10 kGy 이상의 선량에서도 영향을 받지 않으며, 50 kGy를 조사하여도 그 영향이 미미하다고 보고되어 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <12> 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 하나의 목적은 탈회골에 방사선을 조사함으로써 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법을 제공하는 것이다.
- <13> 본 발명의 다른 목적은 상기의 방법에 의해 생산된 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골을 제공하는 것이다.
- <14> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골을 이용하여 골형성 단백질을 효율적으로 분리할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.
- <15> 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 방법에 의해 분리된 골형성 단백질을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <16> 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양상은, 탈회골에 방사선을 조사하여 탈회골을 구성하고 있는 골형성 단백질의 방출을 증가시키는 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 생산방법을 제공하는 것이다.
- <17> 본 발명에 의한 골형성 단백질의 분리방법에 사용되는 탈회골은 포유동물 유래의 탈회골을 공지된 임의의 방법이나 기술을 사용해 제조될 수 있다(Russell et al., Orthopedics 22(5)524-531, 1999).
- <18> 본 발명에 사용되는 상기 방사선은 감마선, 전자선 및 X-선으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 사용될 수 있으나, 골형성 단백질의 방출능 향상을 증가시킨다는 점에서 전자선을 사용하는 것이 바람직하다.
- <19> 상기 방사선의 흡수선량은 2.5 ~ 100 kGy, 바람직하게는 20 ~ 50 kGy로 조사하는데, 상기 흡수선량이 2.5 kGy 미만인 경우에는 방사선을 조사하는 소기의 목적을 달성할 수 없고, 반면에 100 kGy를 초과하는 경우에는 고 선량의 방사선 조사에 의한 물질분해 등의 문제가 발생할 수 있다.
- <20> 상기 방사선의 조사는 탈회골의 고체상의 입자에 직접 방사선을 조사하거나, 탈회골에 골 수복제 전달체를 혼합한 상태에서 방사선을 조사할 수 있다.
- <21> 상기 골 수복제 전달체로는 카르복시메틸셀룰로오스 (carboxymethylcellulose), 키토산(chitosan), 피브린 (fibrins) 및 소장점막(small intestinal submucosa) 등에서 선택된 1종 이상이 사용될 수 있으나, 동종이식 (allograft) 시술시에 골형성을 위한 활성을 증가시킨다는 점에서 카르복시메틸셀룰로오스를 사용하는 것이 바람직하다.
- <22> 탈회골에 골 수복제 전달체를 혼합한 상태에서 방사선을 조사하는 경우에는 탈회골과 골 수복제 전달체를 8 : 2 내지 6 : 4로 혼합하는 것이 바람직한데, 탈회골이 골재생 촉진 생체재료로 사용되기 위해서는 시술의 용이성을 위하여 카복시메틸셀룰로오스와 같은 고분자젤 형태의 골 수복제 전달체와의 혼합형태로 사용될 필요가 있기 때문이다.
- <23> 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 양상은, 상기의 방법에 의해 생산된 골형성 단백질의 방출능이 향

상된 탈회골을 제공하는 것이다.

- <24> 상기 탈회골은 골재생 능력이 뛰어나 뼈 수복용 이식재, 골성장 촉진용 조성물 및 건강 보조식품 등으로 유용하게 사용될 수 있다.
- <25> 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 양상은, 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골에 콜라게나제 및 염을 첨가하여 탈회골을 구성하는 콜라겐을 분해하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골을 이용한 골형성 단백질의 분리방법을 제공하는 것이다.
- <26> 본 발명에 의한 상기 골형성 단백질의 분리방법은 골형성 단백질의 방출능이 향상된 상기 탈회골에 콜라게나제 및 염을 첨가하여 콜라겐을 분해반응시킨 후, 상기 분해반응 용액을 투석하여 상기 용액에 함유된 염을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- <27> 상기 염으로는 $MgCl_2$, $CaCl_2$, $NaCl$, N-에틸말레이미드(N-ethylmaleimide ; NEM), 페닐메틸술폰닐플루오라이드(phenylmethylsulphonyl fluoride ; PMSF), 벤즈아미딘-염산(benzamidinium-HCl) 등이 사용될 수 있으나, 단백질 분해효소 억제제 기능을 갖는 염이라면 제한없이 사용될 수 있다.
- <28> 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 양상은, 상기의 방법에 의해 분리된 골형성 단백질을 제공하는 것이다.
- <29> 본 발명의 방법에 의해 분리되는 상기 골형성 단백질은 뼈 형성을 유도하는 능력을 갖는 것이라면 특별히 제한되지 아니하나, BMP-2 또는 BMP-7이 바람직하다.
- <30> 상기 BMP-2(Bone Morphogenetic Protein-2)는 *in vivo*에서 동종 조직성(autologous) 및 이종 조직성(heterologous) 골형성을 강력하게 유도할 뿐 만 아니라, *in vitro*에서도 조골모세포(preosteoblast) 혹은 미분화된 줄기세포(stem cell)를 골모세포(osteoblast)로 분화시키는 강력한 골 형성 유도제로 알려져 있다. 또한 *in vivo*에서 BMP-2를 근육에 주사하면 이소성 골 형성(ectopic bone formation)이 일어나는 것과 같이, 마우스 조근모 세포주(mouse premyoblastic cell line)인 C2C12 세포에 BMP-2를 처리하면 이들 세포가 근육세포로의 분화를 멈추고 골모세포의 마커 유전자를 발현한다는 사실이 밝혀졌다.
- <31> BMP-7(Bone Morphogenetic Protein-7)은 골형성에 관여하는 물질로 알려져 있으며, 발생시 치아와 안구의 형성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 성인의 경우에는 만들어지지 않는 것으로 보고되었다 (Dev. Biol. 207(1):176-188, 1999).
- <32> 본 발명에 의해 분리된 상기 골형성 단백질은 뼈 수복용 이식재, 골성장 촉진용 조성물 및 건강 보조식품 등으로 유용하게 사용될 수 있다.
- <33> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.
- <34> 실시예 1 : 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골의 제조
- <35> 본 발명에서는 소에서 유래한 탈회골을 사용하였다. 사용된 탈회골의 제작 과정은 보고된 문헌을 사용하였다 (Russell et al., Orthopedics 22(5)524-531, 1999). 또한 골 수복제 전달체인 카르복시메틸셀룰로오스와 혼합된 탈회골을 제작하기 위해서 카르복시메틸셀룰로오스와 탈회골을 7:3의 비율로 혼합하여 사용하였다.
- <36> 탈회골과 골 수복제 전달체와 혼합된 탈회골의 전자선 조사는 한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소 내의 선형전자선가속기(linear electron accelerator)를 이용하여 방사선 조사하였는데, 상기 선형전자선가속기는 NIEFA에서 제작한 UELV-10-10S 모델(model)을 사용하였으며, 전자빔에너지는 10 MeV, 전류는 1 mA, 조사창은 200 mm 거리의 8X20 mm의 규격을 가졌다.
- <37> 전자선 흡수선량은 전류값과 선량값으로 확인하였는데, 사용된 방사선 선량은 30 kGy이었다.
- <38> 실시예 2 : 탈회골로부터 골형성 단백질의 분리
- <39> 1 g의 방사선 조사된 탈회골 또는 방사선이 조사되지 않은 대조군 탈회골에 0.2 M 트리스-염산 버퍼용액(tris-HCl buffer solution) (pH 7.2) 6.5 ml를 첨가하여 37°C 온도의 웨이킹 워터 베스(shaking water bath)를 이용하여 2시간 동안 반응시켰다.
- <40> 그 후, 탈회골을 이루고 있는 콜라겐(collagen)을 제거하기 위하여, 콜라게나제(collagenase) (최종농도 : 100

CDU/ml), 3mM MgCl₂, 3mM CaCl₂, 20mM NaCl, 3mM N-에틸말레이미드(N-ethylmaleimide ; NEM), 0.1mM 페닐메틸 술폰닐플루오라이드(phenylmethylsulphonyl fluoride; PMSF), 0.1mM 벤즈아미딘-염산(benzamidine-HCl) 을 첨가하여 37℃ 온도의 셰이킹 워터 배스에서 16시간 이상 반응시켰다.

- <41> 상기 반응 후, 20분 동안 4000 rpm에서 원심분리 한 다음, 상층액을 새 튜브로 옮겨 반응용액에 사용된 염들을 제거하기 위하여 4℃에서 16시간 이상 투석을 실시하였다.
- <42> 상기 투석을 실시한 후 얻어진 용액을 동결건조하여 얻어진 단백질을 0.1M 트리스-염산(pH7.4) 10ml에 용해시켜 -20℃의 냉동상태로 보관하였다.
- <43> 실시예 3 : 골형성 단백질의 정량
- <44> 탈회골로부터 분리된 골형성 단백질을 정량화하기 위하여, BCA 단백질 검정방법(bicinchoninic acid protein assays)과 SDS-PAGE를 사용하여 BMP-2와 BMP-7 단백질의 강도(intensity)를 비교하였으며, 또한 탈회골을 직접 C2C12 셀(cell)을 이용한 ALP 검정방법(ALP assays)을 이용하여 골형성 단백질에 의한 골형성 유도능(osteogenicity)을 정량화하였다.
- <45> BCA 정량의 상세한 방법은 시그마(Sigma)사의 BCA 단백질 검정 키트(BCA protein assay kit)의 지시를 따랐다.
- <46> 단백질 시료는 정제된 BSA(bovine serum albumin) 를 1X PBS(phosphate buffered saline) 에 각각 2,000, 1,500, 1,000, 750, 500, 250, 125 및 25 mg/ml이 되도록 희석하여 사용하였으며, 25 ml의 단백질 시료를 200 ml의 BCA 작용용액(BCA working solution)과 섞은 후 37 °C에서 30분간 반응시켜 발색되도록 하였다. 이때 흡광도 측정은 ANTHOS에서 제작한 GENYTH3100을 사용하였으며, A595에서 측정하였다.
- <47> 단백질의 SDS-PAGE 전기 영동 방법은 다음과 같다.
- <48> 전기영동 키트의 고유한 방법에 따라 유리판을 캐스팅한 다음, 스택킹 겔(stack gel)과 런닝 겔(running gel) 용액을 준비하였다. 겔 준비를 위해서는 미니-겔(mini-gel)(10x8cm, 0.75mm thick)의 경우 런닝 겔 4 ml 과 스택킹 겔 0.6 ml이 소요되었다.
- <49> 런닝 겔 용액에 암모늄염 퍼설페이트(ammonium persulfate)와 TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine; N,N,N',N'-Di-(dimethylamino)ethane; N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminomethane)를 첨가한 후 거품이 나지 않을 정도로 신속하게 혼합하고, 피펫을 사용하여 조심스럽게 유리판 사이의 공간에 부었다.
- <50> 스택킹 겔의 높이를 고려하여 런닝 겔 용액을 부어준 후, 그 위에 증류수 또는 알코올을 조심스럽게 가하고, 겔이 굳을 때까지 방치하였다. 겔이 굳으면 상층에 가한 에탄올과 아크릴아미드(acrylamide) 사이에 뚜렷한 경계가 보이는데, 이때 에탄올을 제거하고 증류수로 수 차례 씻어주었다.
- <51> 미리 준비해 놓은 스택킹 겔 용액에 암모늄염 퍼설페이트와 TEMED를 첨가한 후, 신속하게 혼합하고 피펫을 사용하여 조심스럽게 유리판 사이의 공간에 붓고 코움(comb)을 끼웠다.
- <52> 겔이 다 굳으면 조심스럽게 코움을 빼낸 후 형성된 웰(well)을 증류수로 여러 차례 세척하였다. 캐스팅한 겔을 전기영동 장치에 장착하고 전기영동용 완충용액을 위와 아래의 완충용액 탱크에 부은 다음, 상기 웰에 조심스럽게 시료를 가하였다.
- <53> 전기영동 기구를 전원에 연결시킨 후, 정전압 또는 정전류에서 전기영동을 하였다. 이동지표인 브로모페놀 블루우(bromophenol blue)가 겔의 끝부분에 도달하면 전원을 내리고 전기영동 장치로부터 유리판을 분리하였다.
- <54> 전기영동이 끝난 후 겔을 조심스럽게 겔판(gel plate)으로부터 분리한 후, 플라스틱 또는 유리용기에 옮기고 염색시약(staining solution)을 부어 셰이커(shaker)에 올려놓은 후 30분-1시간 동안 염색하였다. 그런 다음, 수돗물로 가볍게 세척해 주고 탈염색시약을 부어준 후, 셰이커에 올려 놓은 다음, 탈염색시약을 수차례 교환하면서 겔의 염색시약이 모두 빠지도록 하였다.
- <55> 또한 탈회골을 직접 C2C12 셀을 이용한 ALP 검정방법을 이용하여 골형성 단백질에 의한 골형성 유도능을 정량화하였는데, C2C12 세포를 이용한 ALP 검정 방법은 다음과 같다.
- <56> C2C12 세포를 5×10⁴ 세포/웰 농도로 24 웰플레이트(well plate)에 넣었다.
- <57> 상기와 같이 세포를 웰플레이트에 넣은지 4시간 이상 지난 후 배지를 교환(1% FBS media) 한 다음, 트랜스웰(transwell)을 24 웰플레이트에 넣고 탈회골을 100 mg 처리하였는데, 이때 배지는 1 ml 을 주입하였다.

<58> 48시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 차가운 PBS(phosphate buffered saline) 로 2번 정도 세척한 후, 0.5% 트리톤-100/PBS(Triton-100/PBS)를 500 μ l ~ 1 ml 정도 웰에 넣고 실온에서 1-2분 기다린 다음, 스크래퍼로 긁어 세포를 떨어트린 후, 냉동/해동(frozen/thawed) 과정을 3번 반복하여 세포막을 파괴시켰다.

<59> 시료를 시리드로 희석(sereies dilution)한 후, 50 μ l씩 플레이트에 넣고 블랭크(blank)로는 효소 버퍼(enzyme buffer)만 주입한 다음, 50 μ l pNPP(para-nitrophenyl phosphate) 기질용액을 넣고 실온에서 10-20 분간 배양하였다.

<60> 그런 다음, 50 μ l 스탑용액(stop solution)을 넣고 빨리 섞어 준 후, 405nm에서 흡광도를 측정하였는데, 스탠다드(검정 버퍼 ; assay buffer)는 시리드로 희석하여 405nm에서 함께 측정하였다.

<61> 실험에서 얻어진 값들은 SPSS 소프트웨어를 이용하여 분산분석하고, 유의성이 있는 경우 최소자승 평균값(least square means)을 Duncan의 다중검정 (multiple range test)을 통하여 평균간의 유의성차를 확인하였다 (p<0.05).

<62> 실험예 1 : 방사선 조사된 탈회골의 골형성 단백질의 방출능 비교

<63> 상기 실시예 1에서 제조된 방사선 조사된 탈회골에서 골형성 단백질의 방출능을 방사선 조사가 안된 탈회골을 대조군으로 하여 비교하였다.

<64> 그 결과를 하기 표 1에 나타내었는데, 표 1에서 보는 바와 같이 BCA 단백질 검정방법에서 방사선 조사에 따라 총 단백질의 양이 방사선 조사를 하지 않은 대조군 보다 10% 증가하였다.

<65> [표 1] 방사선 조사에 의한 골형성 단백질의 총 농도 비교

<66>

시료	O.D(562nm)	단백질(μ g/ml)	%
골기질 단백질 (0 kGy)	0.262	158.27	100
골기질 단백질 (30 kGy)	0.28	174.64	110.3

<67> 또한, 도 1과 같이 SDS-PAGE 겔상에서도 골형성 단백질 BMP-2, BMP-7을 나타내는 단백질의 강도가 증가된 것을 확인되었는데, 상기 도 1에서 라인 1은 방사선 조사된 탈회골에서 분리된 BMP-2, BMP-7 단백질, 라인 2는 방사선 조사되지 않은 탈회골에서 분리된 BMP-2, BMP-7 단백질을 나타내는 것이고, 라인 3은 단백질 사이즈마커를 나타낸 것이다.

<68> 한편, 하기 표 2와 같이 탈회골로부터 C2C12 세포를 이용한 ALP 검정 결과도 방사선 조사에 의하여 역가가 증가된 것이 확인되었다.

<69> [표 2] 방사선 조사에 의한 탈회골의 ALP 활성 비교

<70>

	1X ALP 농도(pmoles) %
DBM 0kGy	100
DBM 30kGy	106.42

<71> 실험예 2 : 전달체 카복시메틸셀룰로오스와 혼합된 탈회골에서의 방사선 조사에 의한 골형성 단백질의 방출능 비교

<72> 전달체 카복시메틸셀룰로오스와 탈회골을 7:3의 비율로 섞은 후, 방사선 조사에 따른 탈회골에서의 골형성 단백질의 방출능을 C2C12 세포를 이용한 ALP 검정방법에 따라 비교하였다.

<73> 하기 표 3에서와 같이, 전달체 카복시메틸셀룰로오스와 혼합된 탈회골에서도 ALP 검정 결과가 증가한 것으로 확인되었다.

<74> [표 3] 방사선 조사에 의한 전달체 카복시메틸셀룰로오스와 혼합된 탈회골의 ALP 활성 비교

<75>

	1X ALP 농도(pmoles) %
DBM 0kGy	100
DBM 30kGy	118.5

발명의 효과

<76> 상기한 바와 같이, 본 발명에 의한 방법에 의하면 탈회골에 방사선을 조사함으로써 골형성 단백질의 방출능이 향상된 탈회골을 수득할 수 있으며, 상기 탈회골을 이용하여 골형성 단백질을 고효율로 분리할 수 있다.

<77> 본 발명의 방법에 의해 생산된 탈회골 및 상기 탈회골을 이용하여 분리한 골형성 단백질은 뼈 수복용 이식재, 골성장 촉진용 조성물 및 건강 보조식품 등으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 방사선 조사된 탈회골과 대조군으로 방사선 조사되지 않은 탈회골에서 분리된 골형성 단백질 BMP-2와 BMP-7의 양을 비교하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도면

도면1

