(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0027642
(43) 공개일자 2022년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)
A61K 36/74 (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A23L 33/125 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2020-0108762
(22) 출원일자 2020년08월27일
심사청구일자 2020년08월27일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
한국한의약진흥원
경상북도 경산시 화랑로 94 (갑제동,한약진흥재단)
(72) 발명자
윤형문
경기도 파주시 가람로116번길 130, 710동 2001호 (와동동, 가람마을7단지한라비발디)
박경란
서울특별시 성북구 월곡로14길 26(하월곡동, 월곡래미안루나밸리)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

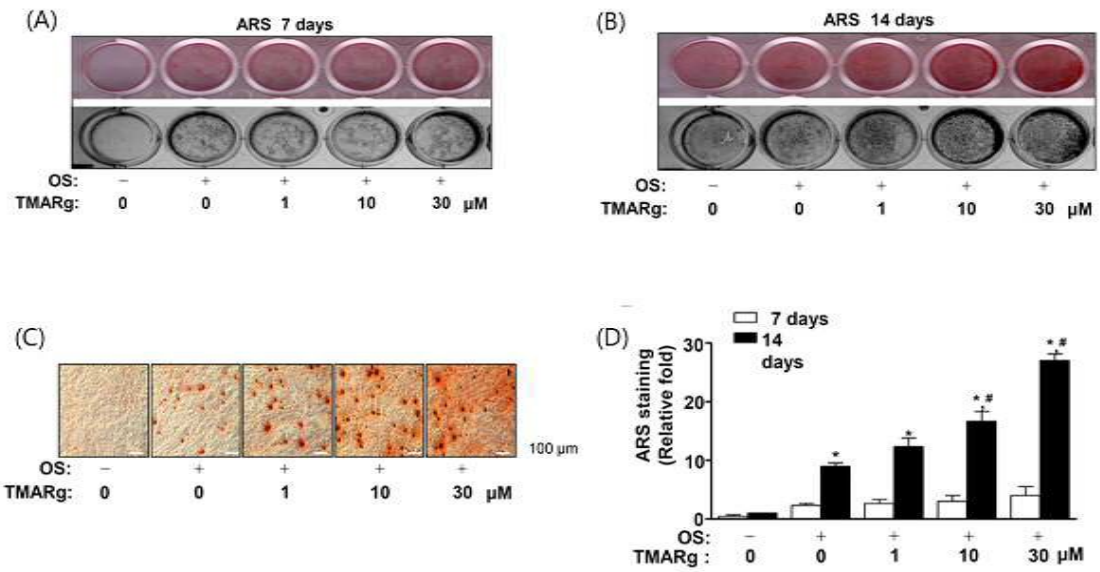
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **안트라퀴논을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 안트라퀴논 화합물을 포함하는 골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 36/74 (2013.01)
A61P 19/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
(72) 발명자
이준엽
대구광역시 남구 고산2길 74-9(봉덕동)

김보미
경상북도 청도군 화양읍 온천길 35-6

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345316256
과제번호	2018R1D1A1B07043282
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(통합)한국연구재단
연구사업명	[통합] 기본연구(1년~5년)
연구과제명	우울증 유발 5-hydroxytryptamine 시스템을 통한 종양 발생 네트워크 연구 및 신규 표적 탐색
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

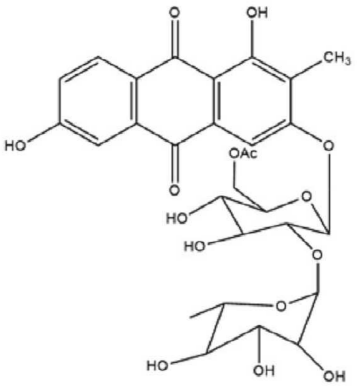
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 조골세포의 분화(differentiation)를 촉진시키는 것인, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

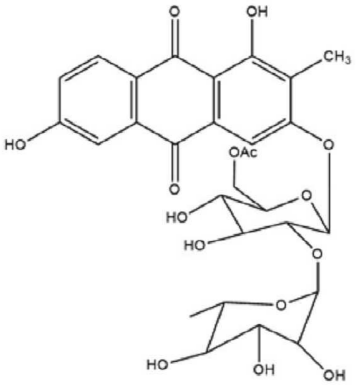
제1항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 치주 질환(periodontal disease), 골석화증(Osteopetrosis), 페이젯병(Paget's disease), 골감소증(osteopenia), 골 위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)인 것인, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물을 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 5

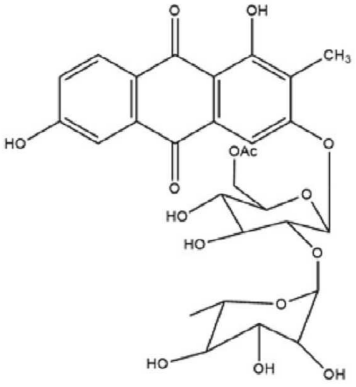
제4항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 치주 질환(periodontal disease), 골석화증(Osteopetrosis), 페이젯병(Paget's disease), 골감소증(osteopenia), 골 위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)인 것인, 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

천초근(*Rubia cordifolia Nakai*) 추출물로부터 하기 화학식 1의 안트라퀴논 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 조골세포의 분화 촉진용 조성물 제조방법.

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서,

상기 추출물은 물, C_1 내지 C_4의 무수 또는 저급 알코올, 상기 물과 저급 알코올의 혼합 용매, 아세톤, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸아세테이트, 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 용매로 추출하여 수득한 것인, 조골세포의 분화 촉진용 조성물 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 안트라퀴논 화합물을 포함하는 골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뼈는 일생동안 지속적으로 변화하는 활동적인 조직이다. 뼈는 육안으로 외부의 피질골(치밀골)과 내부의 소주골(해면골, 스폰지뼈)로 구분하는데, 피질골은 물리적인 강도가 강하여 신체를 보호하고 지지하는 역할을 하고, 소주골은 충격을 흡수하거나 칼슘의 변화를 일정하게 유지하는 역할을 한다.

[0003] 뼈의 성장이 중단된 후에도 오래된 뼈는 파괴되어 없어지고(골 흡수), 새로운 뼈가 없어진 곳을 메우는 고정(골형성)이 일생동안 반복되는, 이러한 현상을 뼈의 재형성(remodeling)이라 한다. 조골세포와 파골세포 사이의 상호작용이 균형을 이루어 골 흡수와 골 형성이 균형을 이루어야 뼈의 항상성이 유지되고 혈액 속의 칼슘 농도가 일정하게 유지되는데, 혈액에 칼슘이 부족하게 되면 이를 보충하기 위하여 골 흡수가 증가되어 뼈의 칼슘을 혈액으로 방출하게 되며, 골 흡수가 지속되면 뼈가 약해져 골다공증과 같은 질환이 발생한다.

[0004] 특히, 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증과, 노화가 되면서 조골세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있다. 이러한 골다공증으로 인한 골절은 심각한 활동 제한에 이르게 되고, 고관절 골절의 경우 약 15-35%의 높은 사망률과 관련되어 있기 때문에, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 진단과 치료가 중요하다.

[0005] 또한, 파제트병(Paget’s diseases)은 골대사이상으로 골흡수가 일어나고 골형성이 증가하는 질환으로 골의 크기는 증가하지만 형성된 골은 불규칙한 모자이크 형상의 층판뼈으며, 골조직은 구조적으로 가볍고 연하고 다공성이어서 병적 골절이 발생하고 합병증으로 침범된 골에서 다양한 종류의 종양과 종양성 병변이 발생한다. 특히 파제트병과 동반되어 발생하는 골육종(osteocarcoma)은 예후가 매우 불량하지만 파제트병을 치료할 수 있는 효과적인 약물은 개발되지 않았다.

[0006] 따라서 골질환의 근본적인 치료를 위해서는 소실된 골량에 대한 회복뿐만 아니라 골대사의 이상을 조절할 수 있는 저분자(small molecule) 골 조절 약물 개발이 절실하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제 10-2010-0081627호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물을 이용한 골 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

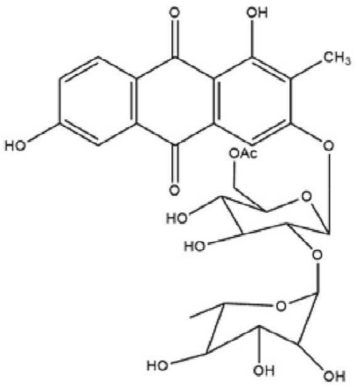
[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물을 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 천초근(*Rubia cordifolia Nakai*) 추출물로부터 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 조골세포 분화 촉진용 조성물 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 측면은 하기 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

화학식 1



[0013]

[0014] 본 발명에서, 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물은 1, 3, 6-트리하이드록시-2-메틸-9, 10-안트라퀴논-3-O-(6'-O-아세틸)-α-L-함노피라노실-(1→2)-β-D-글루코피라노사이드(이하, 'TMARg'라고 함)으로 명명될 수 있다.

[0015] 상기 TMARg는 천초근(*Rubia cordifolia Nakai*)의 뿌리에서 분리되는 화합물로서, 천초근 추출물은 항염증제, 신경 보호제, 항산화제, 간 보호제 및 항 당뇨병과 같은 강력한 약리학적 특성이 입증된 한약재이다. 그러나, 천초근 추출물로부터 분리된 TMARg의 조골세포에서의 생물학적 작용에 대한 약리적 효과에 관하여는 규명된 바 없다.

[0016] 조골세포의 이동 및 분화는 골 단백질의 합성 및 분비, 및 뼈 조직의 광물화에 중요하며, 조골세포 계통의 증식, 이동 및 분화의 기능에 이상이 생길 경우, 골다공증 및 치주염과 같은 골 질환이 발생하게 된다.

[0017] 이에, 본 발명자는 상기 TMARg이 조골세포의 기능 조절에 관여함을 처음으로 규명하였으며, TMARg를 포함하는 조성물을 이용하여 조골세포의 분화 유도를 통한 골 질환 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0018] 구체적으로, 상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 치주 질환(periodontal disease), 골석화증(Osteopetrosis), 페이젯병(Paget's disease), 골연화증(osteomalacia), 골감소증(osteopenia), 골 위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 페이젯병(Paget's disease), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서는 TMARg가 초기 및 후기 조골세포 분화 마커인 ALP 및 ARS 발현을 용량-의존적으로 증가시킴을 확인하였는 바(도 4 및 도 5), TMARg의 조골세포 분화 촉진 효과를 입증하였다.

[0020] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 TMARg가 β-카테닌을 안정화시키면서, BMP2 및 RUNX2의 발현을 증가시킴을 확인하였다(도 6 및 도 7).

[0021] 상기 BMP 단백질은 조골세포 분화를 유도하여 골 형성 및 뼈 형성을 자극하는 것으로 알려진 단백질이다. BMP2는 BMP 수용체 IA(BMPRIA) 또는 BMPRIB, 및 BMPRII와 상호작용 한다. BMP2-매개 BMPR 신호전달은 Smad1/5/8을 인산화시키고, 인산화된 Smad1/5/8은 Smad4 사이에 상호작용하여 복합체를 형성하고, 상기 복합체는 핵으로 이동하여 조골세포 분화에 관여하는 필수 전사인자 RUNX2와 같은 유전자의 발현을 조절하여, 조골세포 분화를 유도할 수 있다.

[0022] β카테닌 신호전달은 골 형성 및 뼈 형성에 주요 매커니즘으로, Wnt/β카테닌 경로의 활성화는 조골세포 분화 및 광물화를 촉진시킨다. 예컨대, Wnt3a는 Frizzled 및 LRP5/6 수용체에 결합하여 GSK3β는 억제하고, β카테닌은 세포질에 축적시킨다. 이때 상기 축적된 β카테닌은 핵으로 이동하여 조골세포 분화 관련 유전자의 전사를 조절할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 TMARg가 ERK1/2 및 p38를 인산화시키고, 세포 이동을 촉진시킬 수 있음을 확인하였다(도 9 및 도 10).

[0024] 상기와 같은 결과는 TMARg가 신호전달을 통해 조골세포 분화를 유도하는 세포의 이동을 증가시킴과 동시에, BMP2 및 β-카테닌을 통합하고 BMP2/Smad1/5/8 및 Wnt/β-카테닌 신호 전달 경로를 통해 조골 세포 분화 및 광물화를 유도할 수 있음을 시사하며, 이는 TMARg의 골 질환 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서의 가능성을 보여준다.

[0025] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여, 상기 본 발명의 TMARg외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 제형으로는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등일 수 있다. 비경구용 제형으로는 주사용, 도포용, 에어로졸 등의 스프레이 형일 수 있다.

[0027] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 TMARg에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘, 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0028] 상기 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드, 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0029] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 다른 측면은 TMARg를 포함하는 약학적 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 골 질환 치료방법에 관한 것이다. 구체적으로 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 치주 질환(periodontal disease), 골석화증(Osteopetrosis), 페이젯병(Paget's disease), 골감소증(osteopenia), 골 위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)일 수 있다.

[0031] 본 발명에서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성병, 연령, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0033] 본 발명의 용어 "개체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 골 질환을 가진 동물 또는 인간을 포함한다. 본 발명에 따른 치료용 조성물을 개체에게 투여함으로써, 골 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

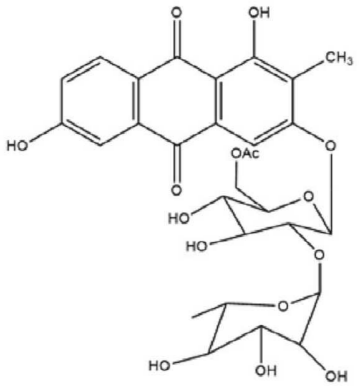
[0034] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물을 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용

식품 조성물에 관한 것이다.

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 상기 “TMARg” 및 “골 질환”과 관련된 설명은 전술한 바와 동일하다.

[0040] 본 발명의 TMARg를 첨가할 수 있는 식품은 육류, 빵, 소시지, 초콜릿류, 스넥류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조식품 등이 있다.

[0041] 상기 식품의 종류는 구체적으로 건강기능식품일 수 있다. 상기 건강기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0042] 상기 건강기능식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가가치를 부여한 식품이다. 이러한 건강기능 식품의 성분은 생체 방어와 신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다.

[0043] 상기 건강기능식품은 정제, 과립, 분말, 캅셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 정제 형태의 건강기능식품은 TMARg, 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축 성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 고미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.

[0044] 상기 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질캅셀제는 통상의 경질캅셀에 TMARg 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충진하여 제조할 수 있다. 연질캅셀제는 TMARg 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 솔비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0045] 상기 환 형태의 건강기능식품은 TMARg, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

[0046] 상기 과립 형태의 건강기능식품은 TMARg, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 고미제 등을 함유할 수 있다.

[0047] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 고미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 것으로 그 기능 등의 동일 내지 유사한 것들을 포함할 수 있다.

[0048] 또한, 상기 식품의 종류는 식품 첨가제일 수 있으며, 상기 식품 첨가제는 식품의 제조, 가공, 또는 보존을 위해 식품에 첨가, 혼합, 침윤 기타의 방법에 의해 사용되는 물질을 의미한다. 상기 식품 첨가제는 천연물과 합성품이 있으며, 기능과 용도에 따라 분류할 수 있다. 현재 한국에 식품첨가물로 허가되어 있는 품목은 화학적 합성

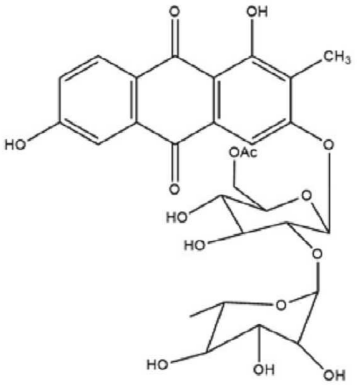
품 370여종, 천연첨가물 50여종이며, 주로 용도에 따라 보존료, 살균제, 산화방지제, 착색료, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 착향료, 팽창제, 강화제, 개량제, 유화제, 증점제(호료) 및 안정제, 피막제, 껌 기초제, 소포제, 용제, 이형제, 방충제, 품질개량제와 기타 식품제조용 첨가제 등으로 분류되어 쓰이고 있다.

[0049] 상기 식품첨가제의 형태는 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 액상 형태를 포함할 수 있으며 구체적으로는 캡슐의 형태일 수 있으나, 상기 형태에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 TMARg를 식품용 조성물로 사용할 경우, 상기 TMARg를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 TMARg의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0051] 본 발명의 또 다른 목적은 천초근(*Rubia cordifolia Nakai*) 추출물로부터 하기 화학식 1로 표시되는 안트라퀴논 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 조골세포 분화 촉진용 조성물 제조방법에 관한 것이다.

[0052] [화학식 1]



[0053]

[0054] 상기 “천초근” 및 “TMARg”는 전술한 바와 동일하다.

[0055] 상기 TMARg는 천초근 추출물의 종자로부터 분리된 것일 수 있다. 또한 상기 TMARg는 천초근 추출물의 단독 또는 혼합 용매로 추출하여 수득된 것일 수 있고, 당해 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다.

[0056] 구체적으로, 상기 천초근 추출물은 물, C_1 내지 C_4의 무수 또는 저급 알코올, 상기 물과 저급 알코올의 혼합 용매, 아세톤, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸아세테이트, 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 단독 또는 혼합 용매로 추출하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 또한, 상기 '추출물'은 상기 천초근 추출물뿐 아니라 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0058] 상기 천초근 추출물은 상기 천초근의 천연, 잡종 또는 변종 식물로부터 추출될 수 있고, 식물 조직의 배양물로부터도 추출이 가능하다.

[0059] 본 발명의 추출물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2 종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0060] 본 발명에서 열수 추출 또는 냉침 추출한 추출물은 부유하는 고체 입자를 제거하기 위해 여과, 예를 들어 나일론 등을 이용해 입자를 걸러내거나 냉동여과법 등을 이용해 여과한 후, 그대로 사용하거나 이를 동결건조, 열풍건조, 분무건조 등을 이용해 건조시켜 사용할 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 실시예에서 천초근의 메탄올 추출물로부터 TMARg를 수득하여, 조골세포의 이동 및 분화 관련된 기전을 살펴본 결과, 조골세포의 이동 및 분화를 촉진시킴으로써 조골세포 기능 조절을 통한 골 질환 예방, 개선 및 치료에 활용할 수 있음을 확인하였다.

발명의 효과

[0062] 본 발명의 TMARg를 포함하는 조성물은 조골세포의 이동 및 분화를 조절하여, 골 질환 치료 및 개선 효과를 향상시킬 수 있다. 또한 상기 TMARg는 천연 추출물로부터 분리된 화합물로서, 부작용을 최소화하면서도 골 질환 개선 효과를 향상시킬 수 있다.

[0063] 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 1, 3, 6-트리하이드록시-2-메틸-9, 10-안트라퀴논-3-O-(6'-O-아세틸)-α-L-함노피라노실-(1→2)-β-D-글루코피라노사이드(TMARg)의 구조 및 분리 모식도를 나타낸 것이다(A: TMARg 구조, B: TMARg 분리 모식도).

도 2는 TMARg 구조 확인을 위한 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 TMARg 1, 10, 30 및 100 μM 처리 후 조골 전구세포(pre-osteoblasts) 및 중간엽세포 전구체에서의 세포 독성을 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: MC3T3-E1세포, B: C2C12 세포).

도 4는 TMARg의 초기 조골세포 분화 촉진 효과를 나타낸 것이다(A: ALP 염색 수준의 디지털 카메라 및 비색 검출기 측정, B: 광학 현미경 관찰, C: ALP 효소 활성 측정).

도 5는 TMARg의 후기 조골세포 분화 촉진 효과를 나타낸 것이다(A, B: ARS 염색 수준의 디지털 카메라 및 비색 검출기 측정, C: 광학 현미경 관찰, D: ARS 효소 활성 측정).

도 6은 TMARg의 세포 내 BMP2 신호 전달 및 β-카테닌 활성화 효과를 나타낸 것이다(A, C: 중간엽 세포, B, D: 조골 전구세포).

도 7은 TMARg의 RUNX2의 발현 촉진 효과를 나타낸 것이다(A: 중간엽 세포, B: 조골 전구세포).

도 8은 TMARg 처리에 따른 조골세포 분화에 BMP2 및 β-카테닌 신호 전달의 억제가 미치는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 TMARg의 MAPKs 신호 전달에 미치는 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다(A: 중간엽 세포, B: 조골 전구세포).

도 10은 TMARg의 세포 이동률에 미치는 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다(A: 중간엽 세포, B: 조골 전구세포).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예에 관하여 상세히 서술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0066] **제조예 1. 1, 3, 6-트리하이드록시-2-메틸-9, 10-안트라퀴논-3-O-(6'-O-아세틸)-α-L-함노피라노실-(1→2)-β-D-글루코피라노사이드(이하, 'TMARg'라고 함)의 분리**

[0067] 천초근(*Rubia cordifolia Nakai*) 10 kg을 MeOH로 8시간씩 3회 환류추출한 후, 감압 농축하여 MeOH 추출물 약 1 kg을 얻었다. 상기 MeOH 추출물을 물 2.2 L에 녹이고 CH_2Cl_2를 가하고 진탕하여 CH_2Cl_2층과 수층으로 나누고, 수층에 에틸아세테이트(EtOAc)를 가하고 흔들어 EtOAc층과 수층으로 나누고 에틸아세테이트 추출물 214.2g을 얻었다. 에틸아세테이트 층을 플래시 컬럼 크로마토그래피(flash column chromatography)법으로 분리하였다. 칼럼에 실리카겔(silica gel)을 채우고 100 % 헥산으로 용리시켜 고정 단계(stationary phase)를 균일한 상태로 만든 후, 에틸아세테이트 층 214.2 g 중 121.3 g을 실리카겔(silica gel)에 흡착시켜 칼럼에 로딩하였다. 이후 100% CH_2Cl_2 용액을 시작하여 칼럼에 로딩하였다. 이후 100 % CH_2Cl_2 용액을 시작하여 CH_2Cl_2:MeOH = 25:1-6:1순으로 극성을 높이다가 100% MeOH 용리시켜 분획물RA-EA-A~RA-EA-BC를 얻었다. RA-EA-AH 분획 (1.3 g)은 RP C_{18} 칼럼 크로마토그래피(column chromatography)를 실시하였다. RP C_{18}을 칼럼에 채우고 MeOH:H_2O=1:4 혼합용액으로 용리시켜 균일한 상태로 만든 후 분획 약 1.3 g을 100% MeOH에 완전히 녹인 후 로딩하여 MeOH 비율을 5% 씩 높이면서 용리시켜 화합물1, 3, 6-트리하이드록시-2-메틸-9, 10-안트라퀴논-3-O-(6'-O-아세틸)-α-L-함노피라노실-(1→2)-β-D-글루코피라노사이드 3011.5 mg를 수득하였다(도 1 및 도 2).

[0068] 황색 분말; ESI-MS m/z = 621.2 $[M+H]^+$, 분자식 $C_{29}H_{32}O_{15}$; ^{1}H-NMR (500 MHz, 피리딘-d_5) δ 8.37 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-8), 8.05 (1H, s, H-5), 7.93 (1H, s, H-4), 7.46 (1H, dd, *J*=2.4, 8.4 Hz, H-7), 6.56 (1H, s, H-1'), 5.86 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1''), 2.58 (3H, s, $COCH_3$), 2.07 (3H, s, H-11), 1.73 (3H, s, H-6''); ^{13}C-NMR (125 MHz, Pyridine-d_5) δ 187.7 (C-9), 183.2 (C-10), 171.5 (-COCH3), 165.6 (C-6), 163.1 (C-1), 161.5 (C-3), 136.9 (C-10a), 133.3 (C-4a), 130.0 (C-8), 126.0 (C-8a), 122.5 (C-7), 122.4 (C-2), 114.3 (C-5), 112.1 (C-9a), 106.7 (C-4), 102.6 (C-1''), 99.6 (C-1'), 79.6 (C-3'), 78.1 (C-2'), 76.1 (C-5'), 74.6 (C-4''), 73.1 (C-2''), 73.0 (C-3''), 71.9 (C-4'), 70.6 (C-5''), 64.8 (C-6'), 21.2 (-COCH_3), 19.5 (C-6''), 9.9 (C-11).

[0069] **제조예 2. 조골 전구세포 MC3T3-E1 및 중간엽 전구체 C2C12 세포 배양 및 조골세포 분화**

[0070] American Type Culture Collection (ATCC) (VA, Manassas, VA)에서 구매한 조골 전구세포 MC3T3E-1 세포(#CRL-2593)는 바이오평가센터 (한국생명공학연구원)에서 제공하였다.

[0071] 상기 세포를 10% 소 태아 혈청(FBS), 페니실린(100 단위/mL) 및 스트렙토 마이신(10 g/mL)이 보충 된 L- 아스코르브산 (WELGEME, Inc., 대한민국)없이 α-최소필수배지(α-minimum essential medium)에서 37℃, 5% CO_2 및 95% 공기의 습한 대기에서 배양하였다.

[0072] 조골세포의 분화는 50 g/mL L-아스코르브산 및 10 mM b-글리세로포스페이트(Sigma-Aldrich, MO, St. Louis, MO)를 함유하는 골형성보충배지(osteogenic supplement medum, OS)를 변화시킴으로써 유도하였으며, 배양 기간 동안 배지를 2 일마다 교체하였다.

[0073] 중간엽 전구체 C2C12 세포(#CRL 1722, ATCC, Manassas, VA) 를 10% 소 태아 혈청(FBS), 페니실린(100 단위/mL) 및 스트렙토마이신(100 μg/mL)이 보충된 DMEM 에서 37℃, 5% CO_2 및 95% 공기의 습한 대기에서 배양하였다.

[0074] 조골세포의 분화는 100 ng/ml 재조합 BMP2(R&D Systems, Minneapolis, MN)을 함유하는 50 g/mL L-아스코르브산 및 10 mM b-글리세로포스페이트 (Sigma-Aldrich, MO, St. Louis, MO)를 포함하는 골형성보충배지(osteogenic supplement medum, OS)를 변화시킴으로써 유도하였다. 배양 기간 동안 배지를 2 일마다 교체하였다. TMARg를 100% DMSO에 용해시키고, 스톡 용액(stock solution)을 1: 1000으로 희석하였다. 0.1% DMSO의 최종 농도를 대조군으로 사용하였다.

[0075] **실험예 1. TMARg의 세포 독성 확인**

[0076] 조골 전구세포의 세포 독성을 시험하기 위해 TMARg (0.1, 1, 10, 30, 100 M)를 MC3T3-E1 세포 및 C2C12 세포에 24 시간동안 처리한 후 MTT 분석법을 이용하였다.

[0077] 세포 생존율은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) 분석법을 사용하여 NADH-의존적 탈수소효소(NADH-dependent dehydrogenase aictivity) 활성을 검출하였다.

[0078] 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 MTT 용액을 세포에 첨가한 다음, 2시간 동안 배양하여 MTT가 포르마잔(formazan)으로 대사되도록 하였다. 100% DMSO(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 를 사용하여 가용화 후, Thermo Scientific Multiskan GO Microplate Reader(Thermo Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0079] 그 결과, TMARg는 MC3T3E-1 및 C2C12 세포 독성에 영향을 미치지 않음을 확인하였으며, 100 μM 이하의 농도의 TMARg가 적당한 농도임을 확인하였다(도 3).

[0080] **실험예 2. TMARg의 조골세포 분화 촉진 효과 확인**

[0081] 2-1. TMARg의 초기 조골세포 분화 촉진 효과 확인

[0082] 조골세포의 분화에 대한 TMARg의 효과를 확인하기 위해 상기 제조예 2에서와 같이 조골세포 분화를 유도하였다.

[0083] 우선, 세포를 PBS로 세척한 다음, 실온에서 15분 동안 10% 포르말린(formalin)에 고정시켰다. 증류수로 세척한 후 제조업자의 프로토콜(Takara Bio Inc., Japan)에 따라 세포를 37℃에서 1시간 동안 ALP의 반응을 위해 기질 용액과 함께 배양하였다. ALP 염색은 디지털 카메라 및 비색 검출기(colorimetric detector) (ProteinSimple

Inc., Santa Clara, CA)로 측정하였다.

[0084] 알칼리성포스파타제 활성 비색 분석 키트(Biovision, Milpitas, CA)를 사용하여 세포 용해물을 수득하였다. Multiskan GO 마이크로플레이트 분광 광도계(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0085] 그 결과, TMARg의 처리는 ALP 효소 활성을 현저히 증가시킴을 확인하였다(도 4).

[0086] 2-2. TMARg의 광물화 결절 형성 효과 확인

[0087] 세포를 15분 동안 10% 포르말린에 고정시키고 증류수로 헹구었다. 세포를 부드럽게 교반하면서 20분 동안 2% ARS(pH 4.2)(Sigma-Aldrich) 로 염색하였다. ARS 염색의 수준은 스캐너 및 비색 검출기(ProteinSimple Inc., Santa Clara, CA)를 사용하여 관찰하였다. 염색된 웰을 스캔한 후 얼룩을 100% DMSO에 용해시키고 Multiskan GO 마이크로플레이트 분광 광도계(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0088] 그 결과, TMARg를 처리함으로써 ARS 염색이 증가되고, 14일에 광물화 결절이 시각적으로 형성됨을 확인하였다(도 5).

[0089] 초기 조골세포 분화에서는 ALP의 발현이 상향조절되어 특정 조골세포 유전자를 유도 및 조절하고, 후기 조골세포 분화에서는 세포외 뼈 기질은 칼슘침착에 의해 광물화되는 특성을 고려하여 볼 때, 상기 TMARg가 조골세포의 조기 및 후기의 분화를 유도할 수 있음을 시사한다.

[0090] **실험예 4. TMARg의 골 형성 단백질(BMP) 신호 전달 및 ß-카테닌에 미치는 효과 확인**

[0091] 골 형성에 대한 TMARg의 효과를 기본으로 하는 생물학적 매커니즘을 결정하기 위해 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP) 신호 전달에 관한 실험을 중간엽 전구체 및 조골 전구세포에서 수행하였다.

[0092] 먼저, 세포를 빙냉(ice-cold) PBS로 2 회 세척하고, 프로테아제 억제제 혼합물 (0.1 mM PMSF, 5 mg/mL 아프로티닌, 5 mg/mL 펩스타틴 A, 및 1 mg/ml 키에스타틴)을 함유하는 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4)에서 용해시켰다. 단백질 농도는 Bradford 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 측정하였다. 동량의 용해물 20 μg을 소듐도데실-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 (SDS-PAGE)으로 분해하고, 이어서 폴리비닐리덴플루오라이드(PVDF) 막 (Millipore, Bedford, MA)으로 옮겼다. 그 후, 막을 실온에서 1 시간 동안 0.05 % 트윈 20 (TBST) 및 5 % 탈지유 또는 2 % BSA를 함유하는 1 × TBS로 차단하였다.

[0093] 차단 후, 막을 각각의 1 차 항체와 함께 4 ℃에서 밤새 인큐베이션하고, 1 × TBST로 세척 한 다음, 희석된 HRP(horseradish peroxidase)-접합된 2차 항체 (1 : 10,000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)를 실온에서 1시간 동안 3회 세척한 후, 강화된 화학 발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 키트(Millipore, Bedford, MA)를 사용하여 결합된 항체를 검출하였다

[0094] 그 결과, TMARg는 BMP2의 발현을 향상시키고, BMP2의 하위 신호 전달 분자인 Smad1/5/8 단백질의 인산화를 증가시킬 뿐만 아니라, 조골세포 분화에 있어 GSK3ß의 인산화 및 ß-카테닌 수준을 증가시킴을 확인하였다(도 6). 또한, TMARg는 중간엽 전구체 및 조골 전구세포에서 RUNX2의 핵 내 발현을 증가시킴을 확인하였다(도 7).

[0095] 나아가, TMARg를 BMP2 길항제, 노긴(Noggin), 및 Wnt/ß-카테닌 신호 억제제인 Dickkopf-1 (Dkk-1)의 존재 또는 부재하에 처리한 결과, 노긴의 전처리가 TMARg-유도된 ALP 효소 활성 및 석회화 결절 형성을 유의하게 억제하며, Dkk-1의 전처리는 ALP 효소 활성 및 석회화 결절 형성을 부분적으로 억제하였는 바(도 8), 이는 조골세포 분화에 BMP2단백질이 관여함을 시사한다.

[0096] **실험예 5. TMARg의 MAPKs 신호전달 및 세포 이동(migration) 효과 확인**

[0097] ERK1/2, JNK 및 p38 캐스케이드를 포함하는 MAPK(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)는 세포사멸에 관여하며, 웨스턴 블롯을 이용하여 TMARg의 효과를 조사하였다. 웨스턴 블롯 방법은 상기 실험에 2의 방법과 동일하다.

[0098] 그 결과, TMARg는 조골 전구세포에서 ERK1/2의 인산화를 자극하며, 조골 전구세포 및 중간엽 전구체 세포에서 p38의 활성을 모두 증가시킴을 확인하였다(도 9).

[0099] 또한, TMARg가 MAPK로 인한 조골 전구세포의 세포 이동에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해 wound healing assay를 사용하여 세포 이동을 평가하였다. 200L 피펫 팁으로 감긴 세포를 37℃, 5% CO_2 및 95% 공기의 습한 대기에서 24시간 동안 TMARg의 부재 및 존재하에서 배양하였다. 광학 현미경을 이용하여 세포 이동을 관찰하였으

며, 세포 이동 속도를 정량화하였다.

[0100] 그 결과, TMARg는 중간엽 전구체 및 조골 전구세포에서 세포 이동 속도를 유의하게 향상시켰으며, 특히 조골 전구세포에서 현저한 세포 이동 증가가 나타남을 확인하였다(도 10).

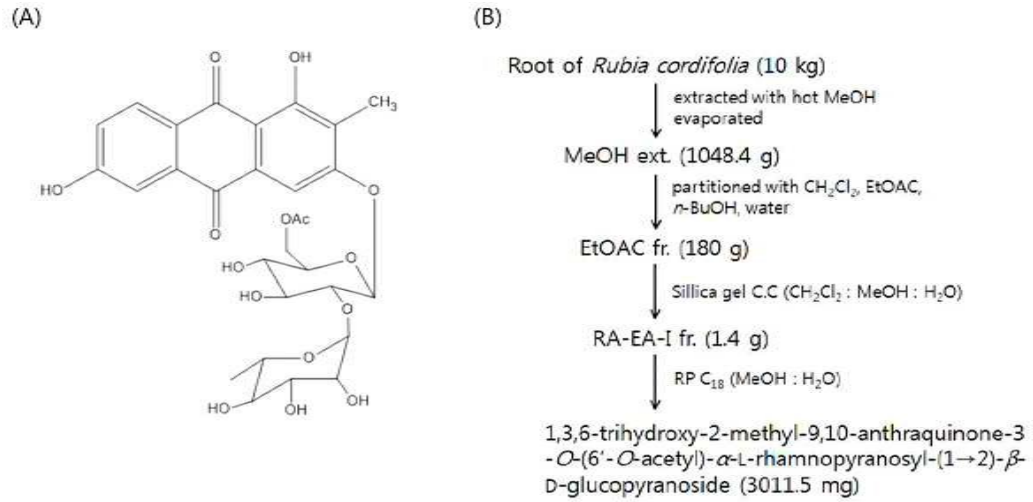
[0101] 상기 결과를 통해 TMARg는 ALP 및 ARS 활성, 결절 형성 및 BMP2 및 β-카테닌 신호 경로를 통한 세포 이동을 촉진하여, 조골세포 분화를 자극함으로써 골다공증 및 치주 질환과 같은 골 질환을 치료하는데 사용될수 있음을 시사한다.

[0102] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

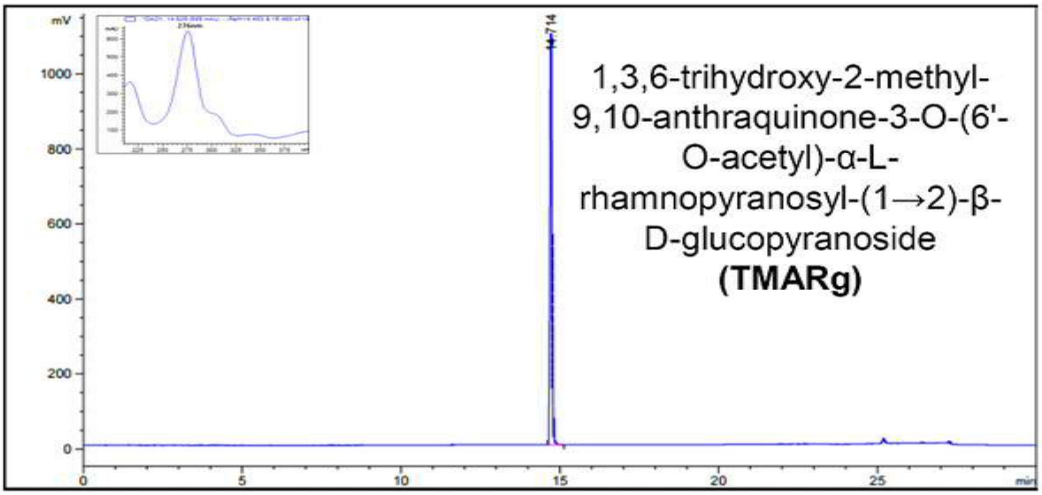
[0103] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

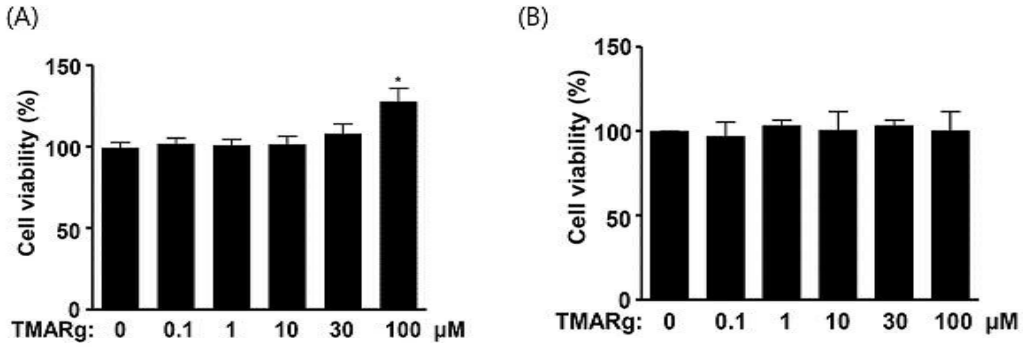
도면1



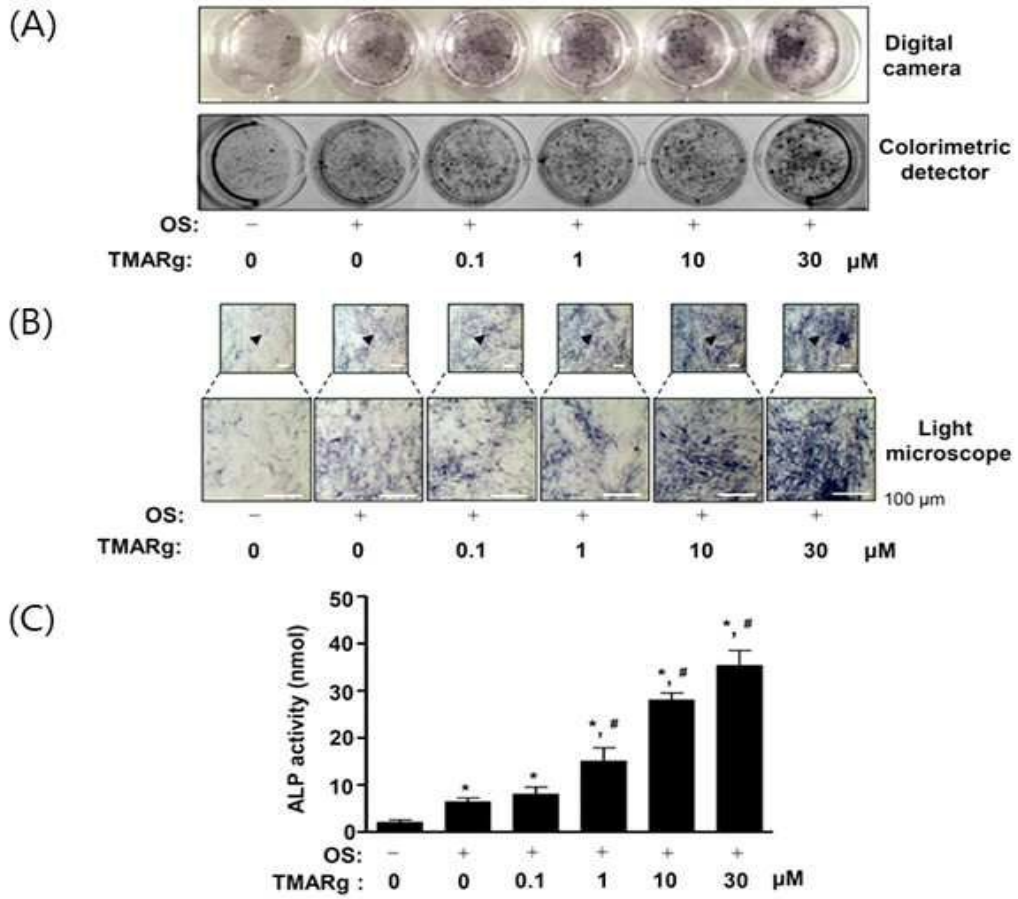
도면2



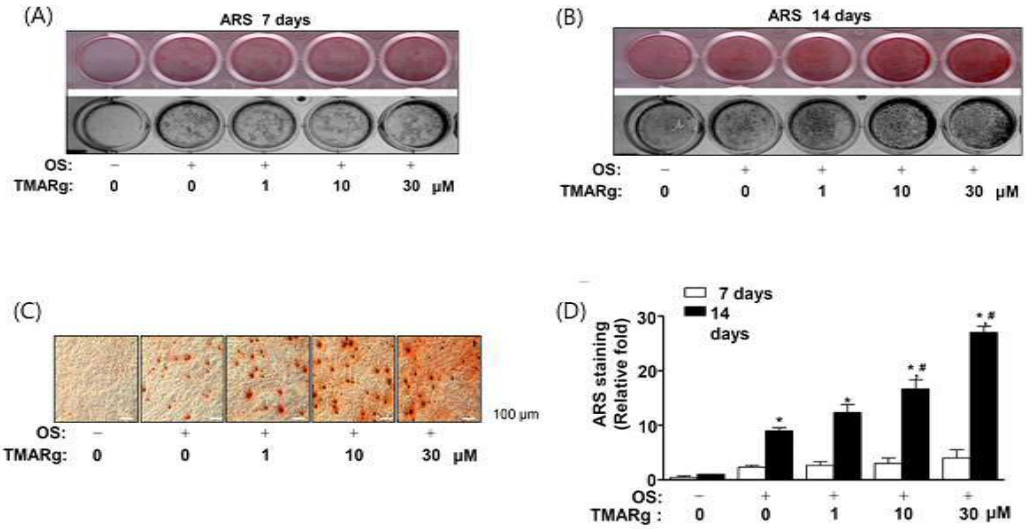
도면3


(A)
Cell viability (%)
150
100
50
0
TMARg: 0 0.1 1 10 30 100 μM
(B)
Cell viability (%)
150
100
50
0
TMARg: 0 0.1 1 10 30 100 μM

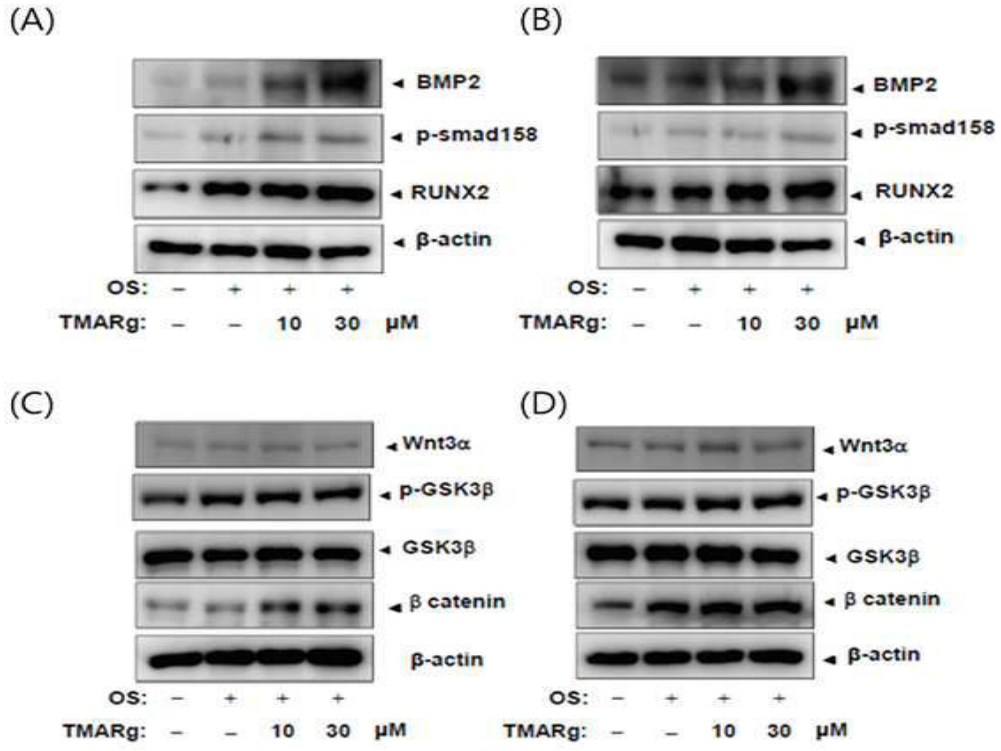
도면4


(A)
Digital camera
Colorimetric detector
OS: – + + + + +
TMARg: 0 0 0.1 1 10 30 μM
(B)
Light microscope
100 μm
OS: – + + + + +
TMARg: 0 0 0.1 1 10 30 μM
(C)
ALP activity (nmol)
50
40
30
20
10
0
OS: – + + + + +
TMARg : 0 0 0.1 1 10 30 μM

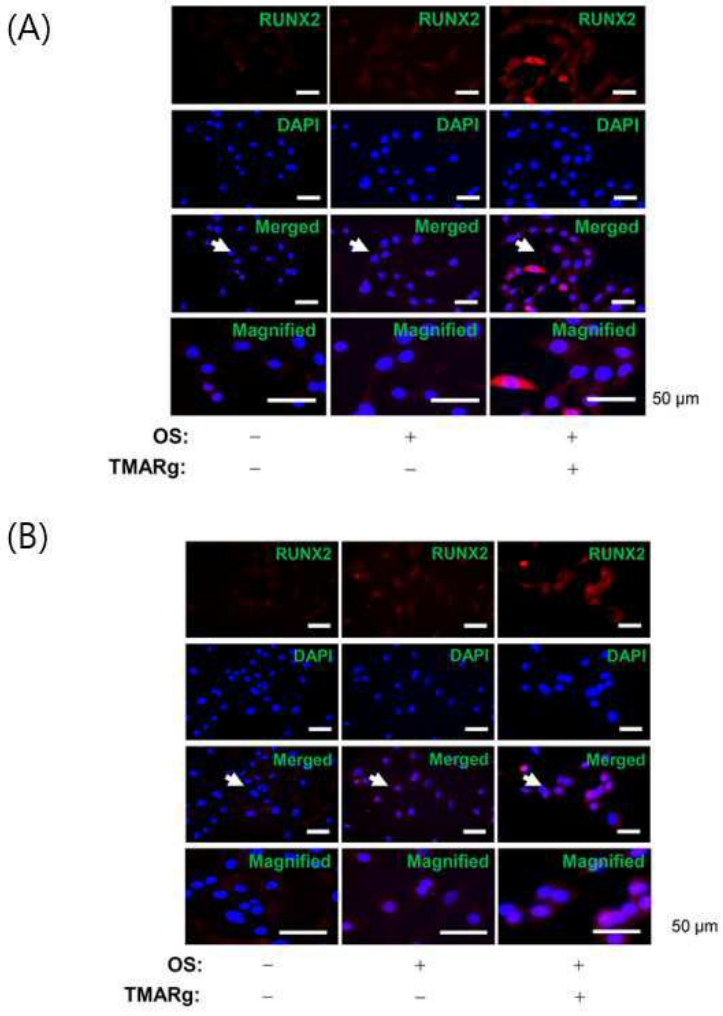
도면5


(A)
ARS 7 days
OS: – + + + +
TMARg: 0 0 1 10 30 μM
(B)
ARS 14 days
OS: – + + + +
TMARg: 0 0 1 10 30 μM
(C)
100 μm
OS: – + + + +
TMARg: 0 0 1 10 30 μM
(D)
7 days
14 days
ARS staining (Relative fold)
30
20
10
0
OS: – + + + +
TMARg : 0 0 1 10 30 μM

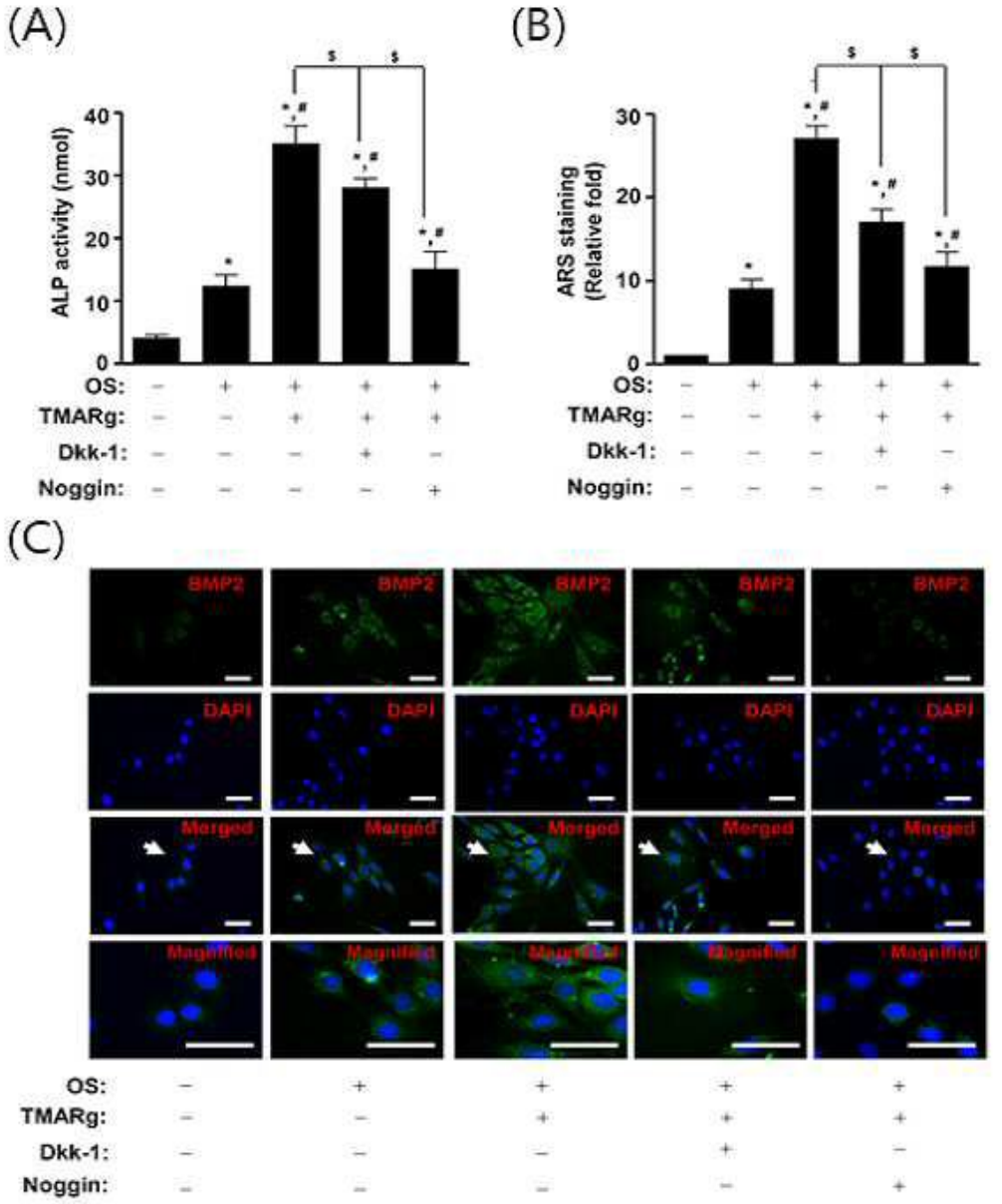
도면6


(A)
BMP2
p-smad158
RUNX2
β-actin
OS: – + + +
TMARg: – – 10 30 μM
(B)
BMP2
p-smad158
RUNX2
β-actin
OS: – + + +
TMARg: – – 10 30 μM
(C)
Wnt3α
p-GSK3β
GSK3β
β catenin
β-actin
OS: – + + +
TMARg: – – 10 30 μM
(D)
Wnt3α
p-GSK3β
GSK3β
β catenin
β-actin
OS: – + + +
TMARg: – – 10 30 μM

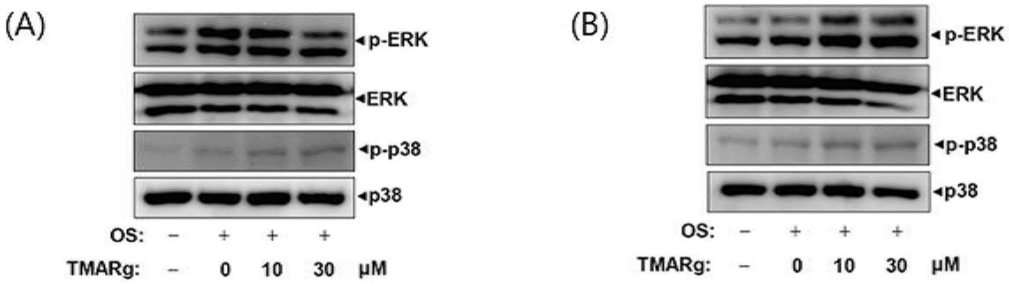
도면7


(A)
RUNX2
DAPI
Merged
Magnified
50 μm
OS: − + +
TMARg: − − +
(B)
RUNX2
DAPI
Merged
Magnified
50 μm
OS: − + +
TMARg: − − +

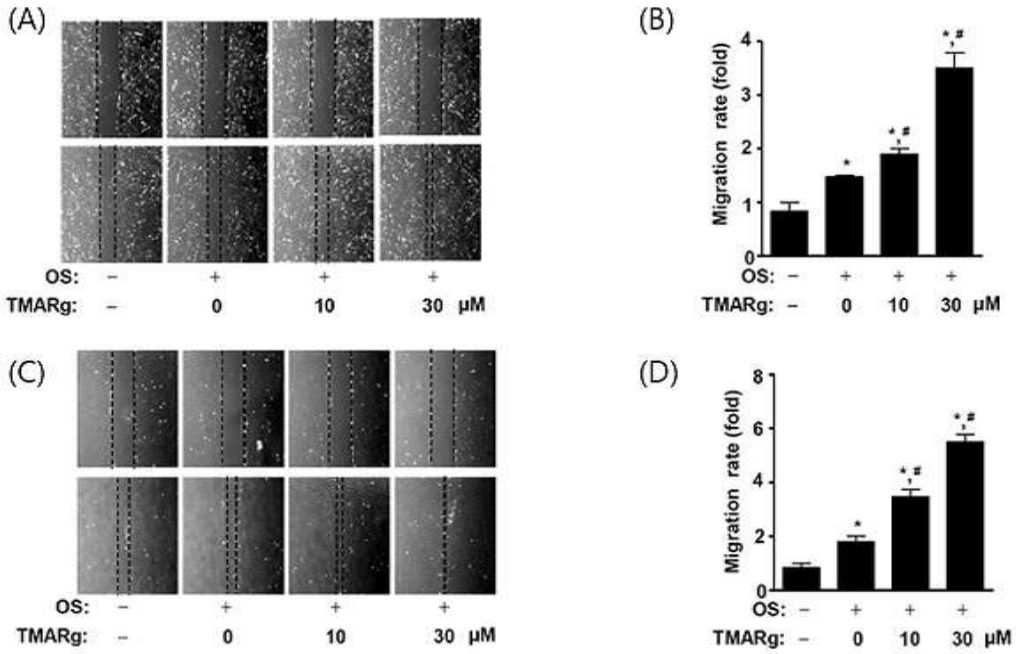
도면8


(A)
ALP activity (nmol)
40
30
20
10
0
OS: – + + + +
TMARg: – – + + +
Dkk-1: – – – + –
Noggin: – – – – +
(B)
ARS staining (Relative fold)
30
20
10
0
OS: – + + + +
TMARg: – – + + +
Dkk-1: – – – + –
Noggin: – – – – +
(C)
BMP2
DAPI
Merged
Magnified
OS: – + + + +
TMARg: – – + + +
Dkk-1: – – – + –
Noggin: – – – – +

도면9


(A)
p-ERK
ERK
p-p38
p38
OS: – + + +
TMARg: – 0 10 30 μM
(B)
p-ERK
ERK
p-p38
p38
OS: – + + +
TMARg: – 0 10 30 μM

도면10


(A)
OS: – + + +
TMARg: – 0 10 30 μM
(B)
Migration rate (fold)
0
1
2
3
4
OS: – + + +
TMARg: – 0 10 30 μM
(C)
OS: – + + +
TMARg: – 0 10 30 μM
(D)
Migration rate (fold)
0
2
4
6
8
OS: – + + +
TMARg: – 0 10 30 μM