UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 329

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/43	(2006.01)
A61K 31/505	(2006.01)
A61P 19/00	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-37683**

(22) Přihlášeno: **18.06.2020**

(47) Zapsáno: **27.08.2020**

(73) Majitel:
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč, CZ
Nemocnice na Bulovce, Praha 8, Libeň, CZ
Krajská zdravotní, a.s., Ústí nad Labem, Severní Terasa, CZ

(72) Původce:
Mgr. Jarmila Knitlová, Praha 7, Bubeneč, CZ
Mgr. Martina Doubková, Brno, Brno-město, CZ
Mgr. Adam Eckhardt, Ph.D., Praha 5, Stodůlky, CZ
MUDr. Tomáš Novotný, Ph.D., Ústí nad Labem, Brná, CZ
doc. Lucie Bačáková, Ph.D., Praha 4, Braník, CZ
doc. MUDr. Martin Ošťádal, Ph.D., Praha 9, Prosek, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitného vzoru:

Směs pro léčbu pes equinovarus a farmaceutický přípravek ji obsahující

CZ 34329 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Směs pro léčbu *pes equinovarus* a farmaceutický přípravek ji obsahující

Oblast techniky

Předkládané řešení se týká směsi látek efektivně rozkládající kolagen a farmaceutického přípravku, obsahujícího tuto směs. Farmaceutický přípravek je vhodný k využití při léčbě fibroproliferativních komplikací různých chorob. Působí vysoce účinně při aplikacích vyžadujících snížení množství kolagenu ve tkáni a následně uvolnění této tkáně z kontrahovaného stavu. Směs nebo přípravek mohou být aplikovány při léčbě ortopedické deformity *pes equinovarus*, například injekční aplikací do postižené (kontrahované) části nohy pacientů s těžkým relapsem onemocnění *pes equinovarus* s cílem zefektivnit standardní léčbu recidivy (relapsu) tohoto onemocnění.

Dosavadní stav techniky

V současnosti neexistuje žádné léčivo, které by umožnilo (či jen usnadnilo) léčbu pacientů, trpících recidivující ortopedickou deformitou *pes equinovarus (*vrozená deformita nohy vyskytující se s incidencí 1/1000 novorozenců*)*. Na trhu není žádná látka, která by působila takovým způsobem, který by vedl k lokálnímu snížení nahromaděného kolagenu v patologické tkáni. V současnosti není biochemickou aplikací standardně řešena žádná diagnóza spojená s kontrahovanou fibroproliferativní tkání *pes equinovarus*. Standardní léčba *pes equinovarus* používá převážně tzv. Ponsetiho metodu, spočívající v postupné korekci deformity pomocí sádrových obvazů, případně s tenotomií Achillovy šlachy a v následném dlouhodobém nošení tzv. abdukční dlahy pro udržení dosažené korekce. Zhruba v 50 % případů dochází k recidivě deformity, kdy je znovu zahájena léčba dle Ponsetiho. Asi u 40 % těchto pacientů s recidivujícím onemocněním je léčba neúspěšná a to zejména u dětí nad 3 roky, kdy je již v patologické tkáni vytvořena tuhá fibrotická tkáň obsahující nadbytečné množství kolagenu. U těchto pacientů jsou indikována operativní řešení, která však mají řadu vedlejších nežádoucích účinků. Indikovaná operativní řešení jsou náročná a pro pacienty velmi zatěžující.

Podstata technického řešení

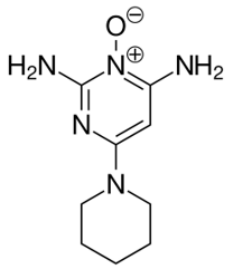
Předkládané technické řešení se týká směsi minoxidilu a matrixové metaloproteinázy MMP-2. Minoxidil efektivně snižuje aktivitu enzymu lysyl hydroxylázy, který je zodpovědný za zvýšenou tvorbu určitého typů kroslinků mezi molekulami v nově tvořených kolagenních vláknech. Snížení množství tohoto typu kroslinků vede ke vzniku fibrilárního kolagenu typu I, který je snáze degradovatelný enzymy. Enzym matrixová metaloproteináza MMP-2 je schopen rozkládat již vytvořený fibrilární kolagen typu I. Tato směs inhibuje buněčnou proliferaci u buněk produkujících kolagen, snižuje tak produkci nového kolagenu a zároveň snižuje v daném čase nadbytek kolagenu ve tkáni pozvolným enzymatickým štěpením jeho přebytků. Výsledkem je snižování objemu již deponovaného kolagenu i snížení nové depozice kolagenu. Celkové rozvolnění tuhé fibrotické tkáně tak podpoří standardní léčbu bez nutnosti chirurgických zásahů.

Předmětem předkládaného technického řešení je směs pro léčbu *pes equinovarus,* která sestává z minoxidilu a matrixové metaloproteinázy MMP-2 (tj. enzymu ze skupiny želatináz)., přičemž matrixová metaloproteináza MMP-2 má sekvenci I: MYNFFPRKPK WDKNQITYRI IGYTPDLDPE TVDDAFARAF QVWSDVTPLR FSRIHDGEAD IMINFGRWEH GDGYPFDGKD GLLAHAFAPG TGVGGDSHFD DDELWTLGEG QVVRVKYGNA DGEYCKFPFL FNGKEYNSCT DTGRSDGFLW CSTTYNFEKD GKYGFCPHEA LFTMGGNAEG QPCKFPFRFQ GTSYDSCTTE GRTDGYRWCG TTEDYDRDKK YGFCPETAMS TVGGNSEGAP CVFPFTFLGN KYESCTSAGR SDGKMWCATT ANYDDDRKWG FCPDQGYSLF LVAAHEFGHA MGLEHSQDPG ALMAPIYTYT KNFRLSQDDI KGIQELYGAS PDIDLGTGPT PTLGPVTPEI CKQDIVFDGI AQIRGEIFFF

KDRFIWRTVT PRDKPMGPLL VATFWPELPE KIDAVYEAPQ EEKAVFFAGN EYWIYSASTL ERGYPKPLTS LGLPPDVQRV DAAFNWSKNK KTYIFAGDKF WRYNEVKKKM DPGFPKLIAD AWNAIPDNLD AVVDLQGGGH SYFFKGAYYL KLENQSLKSV KFGSIKSDWL GC,

a přičemž hmotnostní poměr minoxidilu ku MMP-2 je v rozmezí od 800 do 4200, s výhodou od 1000 do 3200.

Minoxidil je 6-(1-piperidinyl)pyrimidin-2,4-diamin 3-oxid (CAS 38304-91-5), který má vzorec I.



(I)

V jednom provedení má enzym ve směsi katalytickou aktivitu alespoň 25 U/g, s výhodou od 30 do 50 U/g.

V jednom provedení obsahuje směs podle předkládaného technického řešení dále rozpouštědlo, výsledná směs je tedy roztok. Rozpouštědlem je typicky voda nebo fyziologický roztok (0,9% (w/w) vodný roztok chloridu sodného). Optimální koncentrace minoxidilu v tomto roztoku je od 0,25 do 0,75 mM. Enzym má optimálně koncentraci 50 ng/ml.

Směs podle předkládaného technického řešení inhibuje buněčnou proliferaci v médiu přímo úměrně zvyšující se koncentraci směsi v médiu. Směs nepůsobí primárně cytotoxicky a její účinek je reverzibilní. Zásadním aspektem je zpomalení proliferace buněk a produkce extracelulární matrix za současného zachování buněčné viability. Z našich výsledků při použití *in vitro* na buňkách izolovaných z tkáně postižené *pes equinovarus* vyplývá, že směs o koncentraci minoxidilu 0,25 až 0,75 mM lze považovat z hlediska tohoto aspektu za efektivní a zároveň bezpečnou. Podávání vyšších koncentrací vyvolává téměř úplné zastavení buněčného růstu. Signifikantní změny v množství a strukturálním složení kolagenu typu I v extracelulární matrix produkované buňkami je možné pozorovat již při použití koncentrace 0,5 mM látky, a to jak při krátkodobé, tak při dlouhodobé kultivaci buněk.

Předmětem předkládaného technického řešení je dále farmaceutický přípravek, který obsahuje směs pro léčbu *pes equinovarus* podle předkládaného technického řešení a dále farmaceuticky přijatelnou přísadu. Farmaceuticky přijatelnou přísadou mohou být nosiče, plniva, rozpouštědla, látky zvyšující integritu, stabilizátory, konzervanty, antioxidanty, látky zvyšující rozpustnost.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Zpomalení proliferace buněk kultivovaných dle Příkladu 1. Stav buněk v kultuře po 3 dnech kultivace v médiu obsahující minoxidil (MXD) a směs obsahující 0,5 mM minoxidil a enzym MMP-2 (50 ng/ml) podle předkládaného technického řešení (horní řada) a po dalších 3 dnech kultivace bez přítomnosti směsi podle předkládaného technického řešení (spodní řada). Měřítko: 50 μm.

Obr. 2: Zpomalení metabolické aktivity buněk kultivovaných dle Příkladu 1. Grafy zobrazují efekt koncentrace minoxidilu (2A) a směsi obsahující minoxidil a MMP-2 (2B) na viabilitu a proliferaci buněk, stanovovaný podle míry metabolické aktivity buněk po 4 dnech kultivace.

Obr. 3: Inhibice depozice kolagenu po 8 dnech a 21 dnech kultivace s přídavkem minoxidilu a směsi obsahující minoxidil a MMP-2 prostřednictvím dat z obrazové analýzy fluorescenčních mikroskofotografií a hydroxyprolinové eseje dle Příkladu 2.

Obr. 4: Vizualizace změn v množství kolagenu typu I prostřednictvím fluorescenční mikroskopie po 8 dnech kultivace dle Příkladu 2. Množství kolagenu typu I (zelený signál, horní řada) se postupně snižuje se zvyšující koncentrací přidaného minoxidilu (4A). Při přidání směsi obsahující minoxidil a MMP-2 podle předkládaného technického řešení je tento efekt posílen (4B). Dokladem nízké toxicity směsi je neproporcionální poměr kolagenu typu I (zelený signál) vůči počtu buněk (modrý signál, spodní řada, obrázky sloučeny s horní řadou). Měřítko: 200 µm.

Příklady uskutečnění technického řešení

Materiály a metody

Lidská matrixová metaloproteináza MMP-2 o sekvenci I MYNFFPRKPK WDKNQITYRI IGYTPDLDPE TVDDAFARAF QVWSDVTPLR FSRIHDGEAD IMINFGRWEH GDGYPFDGKD GLLAHAFAPG TGVGGDSHFD DDELWTLGEG QVVRVKYGNA DGEYCKFPFL FNGKEYNSCT DTGRSDGFLW CSTTYNFEKD GKYGFCPHEA LFTMGGNAEG QPCKFPFRFQ GTSYDSCTTE GRTDGYRWCG TTEDYDRDKK YGFCPETAMS TVGGNSEGAP CVFPFTFLGN KYESCTSAGR SDGKMWCATT ANYDDDRKWG FCPDQGYSLF LVAAHEFGHA MGLEHSQDPG ALMAPIYTYT KNFRLSQDDI KGIQELYGAS PDIDLGTGPT PTLGPVTPEI CKQDIVFDGI AQIRGEIFFF KDRFIWRTVT PRDKPMGPLL VATFWPELPE KIDAVYEAPQ EEKAVFFAGN EYWIYSASTL ERGYPKPLTS LGLPPDVQRV DAAFNWSKNK KTYIFAGDKF WRYNEVKKKM DPGFPKLIAD AWNAIPDNLD AVVDLQGGGH SYFFKGAYYL KLENQSLKSV KFGSIKSDWL GC byla získána postupem rekombinantní produkce exprimací v *E. coli*. Lidskou matrixovou metaloproteinázu MMP-2 se stejnými účinky je možné získat v čistotě ≥ 98% od komerčního producenta jako standardizovaný produkt Merck – Sigma Aldrich č. SRP3118. Minoxidil byl získán v čistotě ≥ 99 % od komerčního producenta jako standardizovaný produkt Merck – Sigma Aldrich č. M4145.

Příklad 1: *Zpomalení proliferace buněk produkujících kolagen*

Buňky (fibroblasty) produkující kolagen, odebrané z tkáně *pes equinovarus*, byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s přídavkem 10% fetálního bovinního séra a směsí podle předkládaného technického řešení ve 4 různých testech o 5 různých koncentracích minoxidilu, a to 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM a 2 mM (dodavatel činidel firma Sigma), a koncentraci enzymu MMP-2 20 až 50 ng/ml.

Zvyšující se koncentrace minoxidilu a směsi obsahující minoxidil a MMP-2 v médiu způsobují zpomalení proliferace buněk i jejich metabolické aktivity, přičemž při použití nejvyšších koncentrací minoxidilu dochází téměř až k zastavení buněčné proliferace, viz Obr. 1 a Obr. 2. Tento efekt je však reverzibilní, viz Obr. 1 (spodní řada). Pro analýzu dat hodnocení metabolické aktivity bylo pracováno s průměrem naměřených hodnot a standardní chybou průměru (SEM). Statistická signifikance v porovnání ke kontrole kultivované bez přídavku minoxidilu či směsi minoxidilu a enzymu podle předkládaného technického řešení (vehikulární kontrola): *** $p<0,001$, ** $p<0,01$.

Příklad 2: *Inhibice depozice kolagenu*

Buňky pěstované podle Příkladu 1. Množství kolagenu typu I vytvořeného buňkami po krátkodobé kultivaci s přídavky minoxidilu a směsi obsahující minoxidil a MMP-2 podle předkládaného technického řešení (8 dní kultivace při teplotě 37 °C, s vlhkostí atmosféry cca 95% a s 5% koncentrací oxidu uhličitého) bylo stanoveno pomocí imunofluorescenční mikroskopie (značení kolagenu typu I) jako procento plochy fluorescenčního signálu na mikrofotografiích, normalizovaného na počet buněk na příslušných mikrofotografiích. Účinky při dlouhodobé kultivaci (21 dní) byly stanovovány pomocí hydroxyprolinové eseje (standardizovaný produkt Merck, č. MAK008-1KT), která je běžně používána pro přímou kvantifikaci nativního kolagenu ve vzorku, a ověřeny pomocí konfokální mikroskopie (generování signálu druhé harmonické – SHG). Bylo zjištěno, že změny v množství a strukturálním složení kolagenu typu I v extracelulární matrix produkované buňkami je možné pozorovat již při použití koncentrace minoxidilu ve směsi od 0,25 mM, a to jak při krátkodobé, tak při dlouhodobé kultivaci buněk. Pro analýzu dat bylo pracováno s mediánem hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil), minimem a maximem. Statistická signifikance v porovnání ke kontrole kultivované bez přídavku minoxidilu a směsi obsahující minoxidil a MMP-2 podle předkládaného technického řešení (kontrola): *** $p<0,001$. Depozice kolagenu po 8 dnech (krátkodobá) a 21 dnech (dlouhodobá) je znázorněna na Obr. 3.

Množství kolagenu typu I vizualizovaného na mikrofotografiích z fluorescenčního mikroskopu (zelený signál, horní řada) se postupně snižuje se zvyšující koncentrací přidaného minoxidilu (Obr. 4A). Při přidání směsi obsahující minoxidil a enzym podle předkládaného technického řešení je tento efekt posílen (Obr. 4B). Dokladem nízké toxicity směsi je neproporcionální poměr kolagenu typu I (zelený signál) vůči počtu buněk (modrý signál, spodní řada, sloučené obrázky).

Příklad 3: *Rozvolnění tkáně odpovídající tkáni pes equinovarus*

Zvolení optimální koncentrace degradačního enzymu MMP-2 a zároveň jeho schopnost pronikat do tkáně je zcela zásadní z hlediska bezpečnosti budoucí aplikace této látky pro lékařské účely. Pro test rozvolnění tkáně pomocí MMP-2 byla na základě předchozích výsledků vybrána koncentrace 50 ng/ml (250 µl enzymu na 100 mg tkáně). Rozvolnění tkáně bylo hodnoceno pomocí stanovení množství kolagenu uvolněného do media, průnik enzymu do tkáně pak pomocí SHG signálu kolagenních vláken v různé hloubce tkáně.

Test probíhal simultánně ve dvou režimech, ve statickém a dynamickém systému, přičemž dynamický systém více odpovídá reálné situaci v tkáni *pes equinovarus*, která je mechanicky zatěžována. Z důvodu nutnosti homogenity vzorku byla pro tento pokus použita lidská tkáň kloubního pouzdra z kyčle. Tkáň byla uchycena v přístroji Strex Cell Stretching system (firma STREX, Japonsko) pomocí speciálního držáku podle vlastního návrhu a chirurgických nití, a kultivována po dobu 24 h v mediu DMEM s přídavkem MMP-2 (50 ng/ml DMEM, dodavatel činidel firma Sigma). V dynamickém systému byla tkáň mechanicky zatížena natahováním o 6,7 % délky při frekvenci 0,5 Hz. Pro porovnání mechanického vlivu na průnik enzymu do tkáně byly vzorky simultánně inkubovány staticky.

Po 24 hodinách byly tkáně zmrazeny, nakrájeny na tenké řezy v hloubce 60, 240, 300, 420, 480, 900 µm a v jednotlivých rovinách byl nasnímán SHG signál. Obrazová analýza SHG signálu je uvedena v Tabulce 1.

Tabulka 1

Obrazová analýza SHG signálu		
Hloubka [um]	**Statický stav**	**Mechanická stimulace**
60	0,9892 ± 0,0080	0,6297 ± 0,1814
240	0,9845 ± 0,0063	0,8412 ± 0,1095
300	0,9863 ± 0,0000	0,9160 ± 0,0568
420	0,9665 ± 0,0114	0,9591 ± 0,0360
480	0,9650 ± 0,0311	0,9629 ± 0,0071
900	0,9899 ± 0,0043	0,9486 ± 0,0329

Pomocí obrazové analýzy byla stanovena velikost plochy zaujímané kolagenními vlákny na celkovou plochu mikrofotografie. Zároveň bylo pomocí hydroxyprolinové eseje stanoveno množství kolagenu uvolněného z tkáně do media během kultivace (Tabulka 2). Pro analýzu dat obrazové analýzy SHG signálu i pro stanovení hydroxyprolinu bylo pracováno s průměrem naměřených hodnot a směrodatnou odchylkou (SD).

Tabulka 2

Množství uvolněného kolagenu (hydroxyprolinová esej)		
	Statický stav	**Mechanická stimulace**
Hydroxyprolin (ug/ml)	2,2432 ± 0,2432	3,9166 ± 0,1209

Při zvolené koncentraci MMP-2 nedošlo k nežádoucímu rozpadu tkáně při statické ani dynamické kultivaci. Větší průnik do tkáně i vyšší množství uvolněného kolagenu byly naměřeny v případě dynamického zatěžování tkáně.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Směs pro léčbu *pes equinovarus,* **vyznačená tím**, že sestává z minoxidilu a enzymu matrixové metaloproteinázy MMP-2,

přičemž tato matrixová metaloproteináza MMP-2 má sekvenci I: MYNFFPRKPK WDKNQITYRI IGYTPDLDPE TVDDAFARAF QVWSDVTPLR FSRIHDGEAD IMINFGRWEH GDGYPFDGKD GLLAHAFAPG TGVGGDSHFD DDELWTLGEG QVVRVKYGNA DGEYCKFPFL FNGKEYNSCT DTGRSDGFLW CSTTYNFEKD GKYGFCPHEA LFTMGGNAEG QPCKFPFRFQ GTSYDSCTTE GRTDGYRWCG TTEDYDRDKK YGFCPETAMS TVGGNSEGAP CVFPFTFLGN KYESCTSAGR SDGKMWCATT ANYDDDRKWG FCPDQGYSLF LVAAHEFGHA MGLEHSQDPG ALMAPIYTYT KNFRLSQDDI KGIQELYGAS PDIDLGTGPT PTLGPVTPEI CKQDIVFDGI AQIRGEIFFF KDRFIWRTVT PRDKPMGPLL VATFWPELPE KIDAVYEAPQ EEKAVFFAGN EYWIYSASTL ERGYPKPLTS LGLPPDVQRV DAAFNWSKNK KTYIFAGDKF WRYNEVKKKM DPGFPKLIAD AWNAIPDNLD AVVDLQGGGH SYFFKGAYYL KLENQSLKSV KFGSIKSDWL GC,

a přičemž hmotnostní poměr minoxidilu ku MMP-2 je v rozmezí od 800 do 4200, s výhodou od 1000 do 3200.

2. Směs podle nároku 1, **vyznačená tím**, že enzym má katalytickou aktivitu alespoň 25 U/g.

3. Směs podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 nebo 2, **vyznačená tím**, že dále obsahuje rozpouštědlo, vybrané ze skupiny zahrnující vodu a fyziologický roztok, přičemž koncentrace minoxidilu je v rozmezí od 0,25 do 0,75 mM.

4. Směs podle nároku 3, **vyznačená tím**, že enzym má koncentraci 50 ng/ml.

5. Farmaceutický přípravek pro léčbu *pes equinovarus*, **vyznačený tím**, že obsahuje směs podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 4 a dále farmaceuticky přijatelnou přísadu.

3 strany sekvencí
+
3 výkresy

SEQUENCE LISTING

<110> Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.
Nemocnice na Bulovce, Ortopedická klinika
Masarykova nemocnice, o.z., Krajská zdravotní, a.s.

<120> Směs pro léčbu pes equinovarus a farmaceutický přípravek ji obsahující

<130> UM1309CZ00

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 553
<212> PRT
<213> E. coli

<400> 1

Ile Met Tyr Asn Phe Phe Pro Arg Lys Pro Lys Trp Asp Lys Asn Gln
1 5 10 15

Ile Thr Tyr Arg Ile Ile Gly Tyr Thr Pro Asp Leu Asp Pro Glu Thr
20 25 30

Val Asp Asp Ala Phe Ala Arg Ala Phe Gln Val Trp Ser Asp Val Thr
35 40 45

Pro Leu Arg Phe Ser Arg Ile His Asp Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile
50 55 60

Asn Phe Gly Arg Trp Glu His Gly Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Lys
65 70 75 80

Asp Gly Leu Leu Ala His Ala Phe Ala Pro Gly Thr Gly Val Gly Gly
85 90 95

Asp Ser His Phe Asp Asp Asp Glu Leu Trp Thr Leu Gly Glu Gly Gln
100 105 110

Val Val Arg Val Lys Tyr Gly Asn Ala Asp Gly Glu Tyr Cys Lys Phe
115 120 125

Pro Phe Leu Phe Asn Gly Lys Glu Tyr Asn Ser Cys Thr Asp Thr Gly
130 135 140

Arg Ser Asp Gly Phe Leu Trp Cys Ser Thr Thr Tyr Asn Phe Glu Lys

165 170 175

Gly Asn Ala Glu Gly Gln Pro Cys Lys Phe Pro Phe Arg Phe Gln Gly
180 185 190

Thr Ser Tyr Asp Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Thr Asp Gly Tyr Arg
195 200 205

Trp Cys Gly Thr Thr Glu Asp Tyr Asp Arg Asp Lys Lys Tyr Gly Phe
210 215 220

Cys Pro Glu Thr Ala Met Ser Thr Val Gly Gly Asn Ser Glu Gly Ala
225 230 235 240

Pro Cys Val Phe Pro Phe Thr Phe Leu Gly Asn Lys Tyr Glu Ser Cys
245 250 255

Thr Ser Ala Gly Arg Ser Asp Gly Lys Met Trp Cys Ala Thr Thr Ala
260 265 270

Asn Tyr Asp Asp Asp Arg Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Gln Gly Tyr
275 280 285

Ser Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Phe Gly His Ala Met Gly Leu
290 295 300

Glu His Ser Gln Asp Pro Gly Ala Leu Met Ala Pro Ile Tyr Thr Tyr
305 310 315 320

Thr Lys Asn Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Glu
325 330 335

Leu Tyr Gly Ala Ser Pro Asp Ile Asp Leu Gly Thr Gly Pro Thr Pro
340 345 350

Thr Leu Gly Pro Val Thr Pro Glu Ile Cys Lys Gln Asp Ile Val Phe
355 360 365

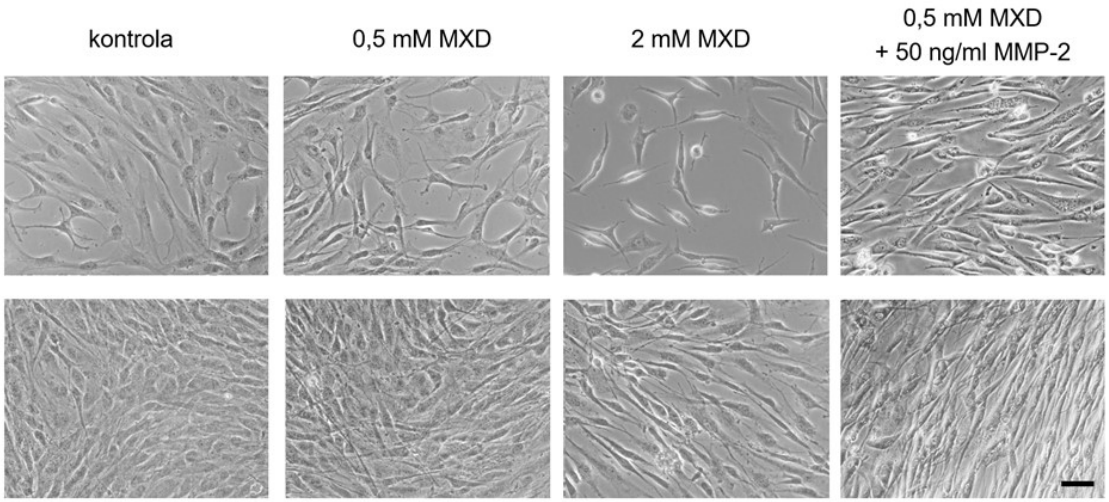
Asp Gly Ile Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg
370 375 380

Phe Ile Trp Arg Thr Val Thr Pro Arg Asp Lys Pro Met Gly Pro Leu
385 390 395 400

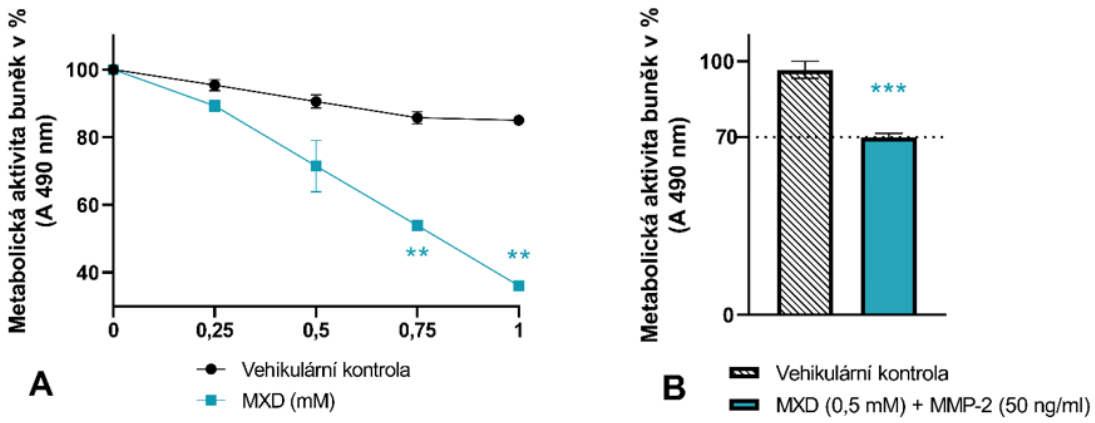
Leu Val Ala Thr Phe Trp Pro Glu Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val
405 410 415

Tyr Glu Ala Pro Gln Glu Glu Lys Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu

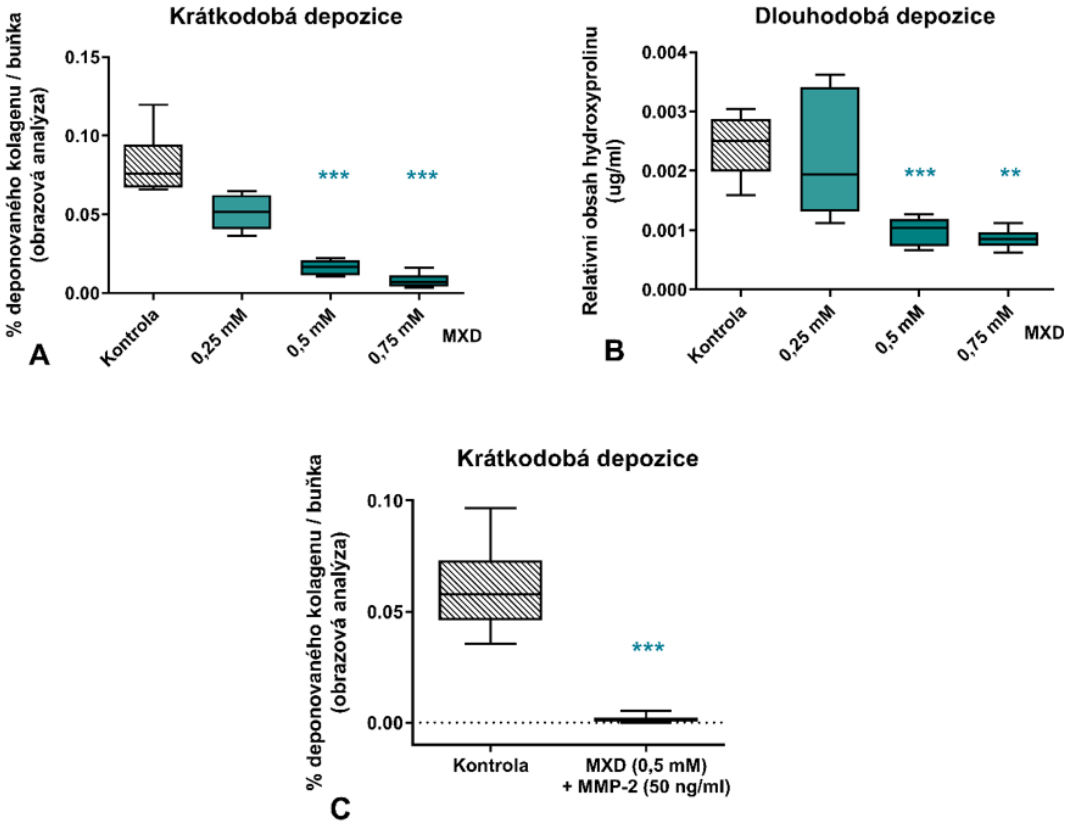
```
            420                 425                 430

Tyr Trp Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Glu Arg Gly Tyr Pro Lys Pro
        435                 440                 445

Leu Thr Ser Leu Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val Asp Ala Ala
    450                 455                 460

Phe Asn Trp Ser Lys Asn Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ala Gly Asp Lys
465                 470                 475                 480

Phe Trp Arg Tyr Asn Glu Val Lys Lys Lys Met Asp Pro Gly Phe Pro
                485                 490                 495

Lys Leu Ile Ala Asp Ala Trp Asn Ala Ile Pro Asp Asn Leu Asp Ala
            500                 505                 510

Val Val Asp Leu Gln Gly Gly Gly His Ser Tyr Phe Phe Lys Gly Ala
        515                 520                 525

Tyr Tyr Leu Lys Leu Glu Asn Gln Ser Leu Lys Ser Val Lys Phe Gly
    530                 535                 540

Ser Ile Lys Ser Asp Trp Leu Gly Cys
545                 550
```


kontrola
0,5 mM MXD
2 mM MXD
0,5 mM MXD
+ 50 ng/ml MMP-2

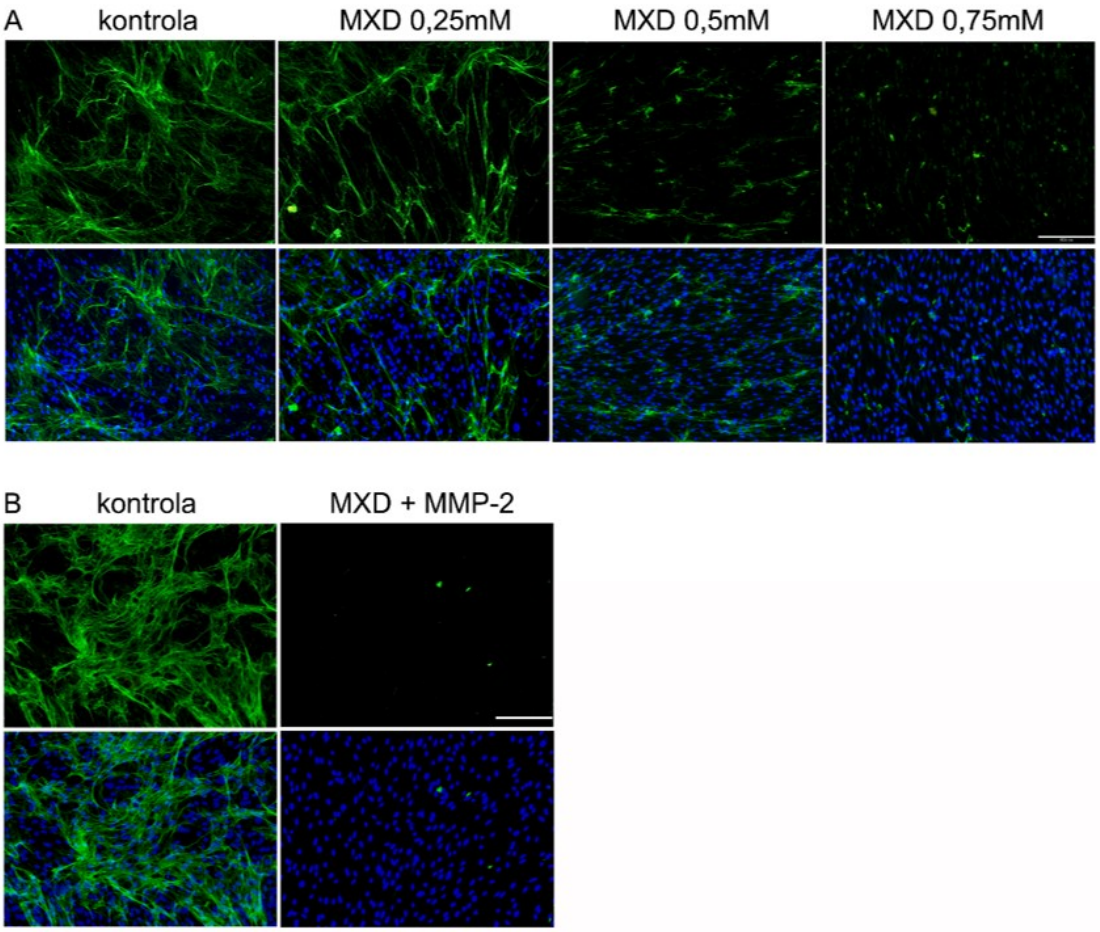
Obr. 1


Metabolická aktivita buněk v %
(A 490 nm)
100
80
60
40
0
0,25
0,5
0,75
1
**
**
A
Vehikulární kontrola
MXD (mM)
Metabolická aktivita buněk v %
(A 490 nm)
100
70
0
***
B
Vehikulární kontrola
MXD (0,5 mM) + MMP-2 (50 ng/ml)

Obr. 2


Krátkodobá depozice
% deponovaného kolagenu / buňka (obrazová analýza)
0.15
0.10
0.05
0.00
***
***
Kontrola
0,25 mM
0,5 mM
0,75 mM
MXD
A
Dlouhodobá depozice
Relativní obsah hydroxyprolinu (ug/ml)
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
***
**
Kontrola
0,25 mM
0,5 mM
0,75 mM
MXD
B
Krátkodobá depozice
% deponovaného kolagenu / buňka (obrazová analýza)
0.10
0.05
0.00
***
Kontrola
MXD (0,5 mM) + MMP-2 (50 ng/ml)
C

Obr. 3



Obr. 4