

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-166

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.03.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **21.09.2016**
(Věstník č. 38/2016)

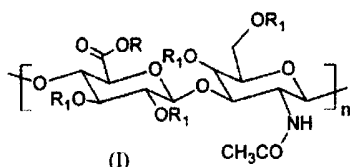
(71) Přihlašovatel:
Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:
Mgr. Marcela Foglarová, Machov, CZ
Dr. Gloria Huerta-Angeles, Česká Třebová, CZ
Mgr. Kristina Nešporová, Ústí nad Orlicí, CZ
Ing. Klára Šlesingrová, Nekoř, CZ
Ing. Antonín Minařík, Ph.D., Lipa, CZ
Ing. Josef Chmelař, Vsetín, CZ
Ing. Romana Šuláková, Ph.D., Ústí nad Orlicí, CZ
Ing. Karel Sergej, Ústí nad Orlicí, CZ
doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc., Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
KANIA*SEDLÁK*SMOLA, Mgr. Martina
Dvořáková, Mendlovo náměstí 1a, 603 00 Brno

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Samonosný, biodegradabilní film na bázi
hydrofobizované kyseliny hyaluronové,
způsob jeho přípravy a použití**

(57) Anotace:
Řešení se týká samonosného, biodegradabilního filmu obsahujícího C₁₀-C₂₂-acylovaný derivát kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I), kde R je H⁺ nebo Na⁺, a kde R¹ je H nebo -C(=O)C_xH_y, kde x je celé číslo v rozmezí 5 až 21 a y je celé číslo v rozmezí 11 až 43 a C_xH_y je lineární nebo rozvětvený, nasycený nebo nenasycený řetězec C₉-C₂₁, přičemž alespoň v jedné opakující se jednotce jeden nebo více R¹ je tvořen C(=O)C_xH_y a kde n je v rozmezí 12 až 4000. Dále se řízení týká způsobu jeho přípravy a použití.



Samonosný, biodegradabilní film na bázi hydrofobizované kyseliny hyaluronové, způsob jeho přípravy a použití

Oblast techniky

Vynález se týká samonosného biodegradabilního filmu na bázi hydrofobizované kyseliny hyaluronové, způsobu jeho přípravy a použití zejména v medicínských aplikacích díky své řízené rozpustnosti, biodegradovatelnosti, povrchové morfologii, mechanickým a dalším vlastnostem.

Dosavadní stav techniky

Kyselina hyaluronová nebo její sůl (HA) je lineární polysacharid, který je složen z opakujících se disacharidických jednotek tvořených kyselinou glukuronovou, která je β -1,3 glykosidickou vazbou spojena s N-acetyl-glukosaminem.

Jedná se o látku, která se přirozeně nachází v organismu, kde je součástí extracelulární matrix, plní lubrikační funkci v kloubech, očích apod. Interaguje rovněž s receptory buněk, čímž dokáže buňky také regulovat. Díky svým vlastnostem je HA předurčena k využití v řadě medicínských aplikací (Necas, Bartosikova et al. 2008). Protože je HA velmi rychle rozpustná v prostředí vody či tělních tekutin, je nutné ji pro řadu aplikací modifikovat. Typů modifikací je celá řada, za všechny lze uvést např. přípravu rozpustné formy HA derivatizované tyraminem, která po přidání síťovacích činidel vytvoří nerozpustnou hydrogelovou síť (Calabro, Darr et al. 2004, Wolfova, Pravda et al. 2013). Rozpustnost HA řetězce lze také snížit navázáním hydrofobních skupin (Valle and Romeo 1987, Smejkalova, Huerta-Angeles et al. 2014, Ščudlová, Běťák et al. 2014). Takový derivát je pak nerozpustný ve vodném prostředí a rozpustný převážně ve směsi vody a organického rozpouštědla (dle stupně substituce hydrofobním řetězcem v kombinaci s molekulovou hmotností).

Mezinárodní patentová přihláška (Smejkalova, Huerta-Angeles et al. 2014) se vztahuje k přípravě hydrofobizované kyseliny hyaluronové jako nosiči biologicky aktivních hydrofobních látek. Hydrofobizace hyaluronanu je provedena esterifikační reakcí hyaluronanu s karboxylovou kyselinou disponující dlouhým řetězcem, přičemž aktivace je provedena pomocí 2,4,6-trichlorbenzoové kyseliny (TCBA) nebo jiným organickým chloridem.

Jednou se zajímavých aplikačních forem hydrofobizovaného hyaluronanu je příprava tenkých filmů pro externí či interní využití. Filmy, které jsou použitelné v medicínských aplikacích, jsou známy, např. Seprafilm byl použit k prevenci srůstu při opakovaní laparotomie. Seprafilm je průhledná adhezivní bariéra složená ze dvou anionických polysacharidů, HA a karboxymethylcelulozy, které byly dohromady zesítěny 1-(3-

dimethylaminopropyl)-3- ethylcarbodiimide hydrochloridem (EDC) (Altuntas, Kement et al. 2008, Beck 2008).

Na bázi experimentální pak bylo připraveno několik filmů obsahujících HA např. Luo, Y. et al. (2000). Rovněž některé patentové dokumenty popisují přípravu filmu z nerozpustného nebo zesítěného hyaluronanu, příp. hyaluronanu ve směsi s dalším polymerem (Becker, Dayton et al. 1996, Beck 2008) Vrstva hyaluronanu byla použita i v patentovém dokumentu CN202822230, kde se však nejedná o samonosný film a navíc je uveden pouze nativní hyaluronan. Nativní hyaluronan spolu s lecitinem přidaným ke zvýšení hydrofobicity byl popsán v článku (Białopiotrowicz et al., 2006). Dalším filmem, použitým pro přípravu mimo jiné i antiadhezní bariéry je film epoxidového derivátu hyaluronanu, který je připraven srážením v organickém rozpouštědle (EP2644623).

Filmy dle US přihlášky vynálezu 20100092545 jsou připraveny z ve vodě rozpustných, či nerozpustných polymerů, s výhodou polyethylenoxidu, jejich předpokládaným použitím je alternativa orálních lékových forem. Z toho důvodu je velmi důležité, aby distribuce léčiva byla homogenní (rozdíl mezi vzorky do 10%) a během přípravy filmu nedocházelo k agregaci a redistribuci léčiva. Toho je dosaženo především tím, že je polymer je dávkován ve vysoké viskozitě (ta může být dále zvýšena přidávkem dalších látek jako alginátu, karagenanu, guarové gumy a dalších) a přidány mohou být i stabilizátory, které právě agregaci a migraci léčiva zabráňují. Dále část rozpouštědla musí být odstraněna během prvních 10 minut, aby z polymerního roztoku vznikl viskoelastický film, ve kterém již migrace a agregace léčiv dle autorů probíhat nemůže. Toho je dosaženo aplikací vysoké teploty, která však u hyaluronanu a jeho derivátů nemůže být použita, protože by vedla k degradaci filmu. V US20100092545 není řešen výsledný vzhled filmu, který je ovlivněn adhezí filmu k podložce během sušení a po vysušení. Hrubost povrchu filmu není také stanovována a ovlivňována. Takto modulovatelné vlastnosti filmu jako je bobtnavost a rychlost degradace se v tomto dokumentu nepopisují. Preferencí autorů, vzhledem k aplikaci je, aby se filmy ve vodném prostředí rozpustily.

Patentový dokument JP06025306 popisuje syntézu vysokosubstituovaných acylovaných derivátů hyaluronanu a jejich použití pro přípravu vláken a filmů. Syntéza zahrnuje přípravu suspenze polysacharidu v organické kyselině. Jelikož se jedná o suspenzi, je polysacharid v systému rozpuštěn nedokonale a tím dochází k nehomogenním reakcím a ztrátě kompatibility polysacharidu v systému. Autoři uvádí, že reakce je katalyzována superkyselinou - tomto případě superelektrofilním anhydridem kyseliny trifluoroctové, který

bouřlivě reaguje s vodou. Riziko v případě industriálních procesů je tedy značné. Rezidua kyseliny trifluoroctové, která vzniká hydrolýzou anhydridu při kontaktu se vzdušnou vlhkostí mohou být v produktech zachyceny a představují vysoké nebezpečí při použití derivátů v biomedicínských aplikacích (Maeda N. et al., 2014). Navíc se při syntéze derivátu používají chlorovaná rozpouštědla, jejichž použití FDA ve zdravotnických prostředcích nedoporučuje z důvodu vysokého rizika přenosu jejich reziduí do vláken a filmů. Patentový dokument zmiňuje přípravu vláken a filmů jen velmi obecně a nezabývá se stanovením jejich vlastností.

Dle další US přihlášky vynálezu US20120088832 je popisována příprava porézního filmu na bázi hyaluronanu a alginátu, přičemž film by měl být využit v medicíně zejména jako antiadhezní přípravek. Jedná se o zesíťnou interpenetrující síť porézního charakteru. V příkladech tohoto dokumentu není zmíněno nic o botnavosti, biodegradaci, rozpustnosti filmu a není uvedeno stanovení zbytkových rozpouštědel.

K přípravě filmů v patentovém dokumentu EP0216453 byl použit hydrofobizovaný hyaluronan s esterifikovanými karboxylovými skupinami kyseliny glukuronové, které jsou tímto blokovány a tudíž nedostupné pro vazbu na receptor CD44. K esterifikaci byly použity nízkomolekulární nebo aromatické alkoholy. Postup přípravy samonosného filmu zahrnuje rozpuštění esteru HA v dimetylsulfoxidu (DMSO), po rozpuštění je nanesen na sklo, sklo je ponořeno do etanolu, který extrahuje DMSO (v etanolu není film rozpustný) a film je posléze sloupnut ze skleněné podložky, promyt etanolem, vodou a opět etanolem. Výsledný film je sušen po dobu 48 hodin při 30° C v kompresním zatížení.

Rovněž v patentovém dokumentu US20040192643 jsou uvedeny filmy z hydrofobizovaného hyaluronanu, výhodně benzoyl derivátu HA. Opět je provedena substituce na karboxylu, kdy je za účelem dosažení nerozpustnosti hyaluronanu zablokováno až 80 - 100 % všech karboxylových skupin HA. Postup přípravy filmu v podstatě odpovídá již zmiňovanému postupu uvedenému v EP216453 výše. Nicméně sušení filmu probíhá při 63°C po dobu 30 minut ve vakuu.

Extrakcí DMSO do jiného rozpouštědla mohou vznikat nekontrolovatelné povrchové defekty, které v některých aplikacích mohou být nepřijatelné. Navíc, při nutnosti použití extrakčního rozpouštědla nelze zaručit nízkou koncentraci zbytkových rozpouštědel v konečném produktu. V již zmíněném patentovém dokumentu EP0216453 ani v US20040192643 není zde zmínka o mechanických, fyzikálních ani biologických vlastnostech filmů.

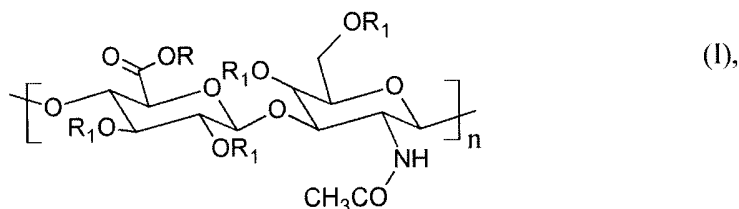
Patentový dokument WO2010137374 popisuje samonosnou polymerní permeabilní membránu zahrnující blokový kopolymer, ve kterém jsou vzájemně kovalentně spojeny

hydrofilní polymerní a hydrofobní polymerní složky, přičemž hydrofilní polymerní složka vytváří kolmo orientované válcovité struktury a hydrofobní polymerní složka je zesítovatelná. Membrána je tedy tvořena kovalentně zesítovaným blokovým polymerem. Není zde žádná zmínka o kyselině hyaluronové. Pokud jde o postup tvorby takovéto membrány, nutná je přítomnost tzv. „sacrificing layer“ na podložku, na který se nanese roztok blokového polymeru, přičemž po odpaření rozpouštědla se provede fotozesítení hydrofobní polymerní složky blokového kopolymeru a následně je třeba „sacrificing layer“ ze vzniklé membrány odstranit rozpuštěním nejlépe v rozpouštědle, ve kterém není vlastní membrána rozpustná.

Jak již bylo uvedeno výše, mezi nevýhody dosud známých filmů na bázi kyseliny hyaluronové patří zejména jejich vícestupňová komplikovaná příprava nebo proces přípravy, který nelze využít pro hyaluronan a jeho deriváty. Autoři některých patentů či přihlášek neuvádějí možnost ovlivnit rozpustnost, botnavost a biodegradabilitu filmu, což je při aplikaci ve zdravotnických prostředích žádoucí. Vzhled filmu a jeho mechanické vlastnosti mohou být ovlivněny opakovaným stykem s rozpouštědlem v případě postupu dle patentu EP0216453 či US20040192643 (etanol, kterým je DMSO extrahován, je srážedlem hyaluronanu). Dále pak je používáno např. DMSO, které nelze v přijatelné době odstranit sušením. Další nevýhodou je používání velkého množství rozpouštědel a dále pak možnost výskytu zbytkových rozpouštědel v produktu. Některé postupy kromě hyaluronanu používají další polymery, aby se zvýšila nerozpustnost výsledného materiálu či aby ovlivnily vlastnosti výchozího roztoku polymeru.

Podstata vynálezu

Výše uvedené nevýhody dosavadních řešení překonává samonosný film na bázi esteru kyseliny hyaluronové podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje C₁₀-C₂₂-acylovaný derivát kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I)



kde R je H⁺ nebo Na⁺, a kde R¹ je H nebo -C(=O)C_xH_y, kde x je celé číslo v rozmezí 9 až 21 a y je celé číslo v rozmezí 11 až 43 a C_xH_y je lineární nebo rozvětvený, nasycený nebo

nenasycený řetězec C_9-C_{21} , přičemž alespoň v jedné opakující se jednotce jeden nebo více R^1 je tvořen $-C(=O)C_nH_y$ a kde n je v rozmezí 250 až 1000. S výhodou film podle vynálezu obsahuje palmitoyl hyaluronan, neboť kyselina palmitová je v těle odbourávána β -oxidací mastných kyselin.

Film podle vynálezu obsahuje $C_{10}-C_{22}$ acylovaný derivát hydrofobizovaného hyaluronanu, přičemž jedna či více vazeb v $C_{10} - C_{22}$ acylech může být nenasyčených a kde $C_{10} - C_{22}$ acyl je s výhodou vázán pouze na primárním alkoholu v pozici 6 N-acetyl glukosaminu. Nejsou tedy modifikovány karboxylové skupiny, jejichž zachování je nezbytné k ovlivnění interakce hyaluronanu s receptorem CD44, který zprostředkovává interakci, adhezi a migraci buněk a také se podílí na interakci buňky s hyaluronanem. Bylo prokázáno, že čím vyšší stupeň substituce karboxylu hyaluronanu, tím hůře probíhá interakce buněk s hyaluronanem (Qiu, Li et al. 2014). Z tohoto pohledu je výhodné modifikaci karboxylu neprovádět a zaměřit se na další reakční místa, což jsou alkoholové primární a/nebo sekundární skupiny, a to zejména při požadavku vyšších stupňů substituce, které jsou pro většinu aplikací nezbytné.

Film podle vynálezu, tedy v podstatě fyzikálně síťný hydrogel, připravený z $C_{10}-C_{22}$ -acylovaného derivátu kyseliny hyaluronové podle vzorce I výše, je necytotoxický vůči buňkám, je biokompatibilní a biodegradabilní i v případě použití vysoce substituovaného derivátu (až okolo 100% stupně substituce acylem). Pro aplikace v medicíně, kde je předpokladem, že film bude mechanicky zatěžován (antiadheze, tkáňové inženýrství aj.) je výhodnější použít namísto kovalentně zesítěné formy, která je po nabotnutí často křehká, formu nerozpustnou ve vodném prostředí, tedy film podle vynálezu. Ten po hydrataci vytvoří odolnou pružnou membránu, kterou lze do určité míry mechanicky namáhat (protažením, ohybem, kompresí).

Vůči buňkám jsou filmy netoxické (testování *in vitro*).

Podle výhodného provedení vynálezu film obsahuje hydrofobizované deriváty kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1×10^5 až 1×10^6 g/mol, s výhodou 1×10^5 až 5×10^5 g/mol, výhodněji 2×10^5 až 3×10^5 g/mol.

Podle dalšího výhodného provedení vynálezu film obsahuje hydrofobizované deriváty kyseliny hyaluronové mající stupeň substituce v rozsahu 15 až 160%, s výhodou 50 až 100%, výhodněji 80 až 100%.

Stupeň substituce 100% znamená, že každá primární alkolicí skupina ($-C6$) dimeru hyaluronanu je substituována jedním alifatickým řetězcem. Stupeň substituce nad 100%

znamená, že kromě každé primární alkoholické skupiny (-C6) dimeru je náhodně substituován také sekundární alkohol (-C4 na N-acetylglukosaminu) či (-C2 nebo -C3 kyseliny glukuronové).

S překvapením bylo zjištěno, že film podle vynálezu je biodegradabilní i v případě použití derivátu s vysokým stupněm substituce, který se pohybuje v rozsahu 80 až 100% a dokonce až 160%.

Podle ještě dalšího výhodného provedení vynálezu film má tloušťku v rozsahu 2 až 100 μm , s výhodou v rozsahu 5 až 25 μm a Youngův modul pevnosti v rozsahu 1 až 5000 MPa v suchém stavu, s výhodou v rozsahu 500 - 5000 MPa.

V případě suchých, nehydratovaných filmů dle tohoto vynálezu je Youngův modul pevnosti nezávislý na stupni substituce, substituentu a molekulové hmotnosti HA. V hydratovaném stavu je z technických důvodů velmi obtížné Youngův modul pevnosti kvantifikovat, avšak pomocí vizuálních testů lze vyhodnotit, že se snižující se molekulovou hmotností klesá houževnatost filmu, film se stává křehčím. Rovněž se zvyšujícím se stupněm substituce se zvyšuje Youngův modul pevnosti v hydratovaném stavu.

Podle ještě dalšího výhodného provedení vynálezu povrchová hrubost RMS (střední kvadratická hodnota) alespoň jedné z ploch filmu je v rozsahu 0,5 až 100 nm, s výhodou v rozsahu 0,5 až 2 nm.

Roztok může být s výhodou různě upravován, mohou být do něho vmíchány biologicky aktivní látky, léčiva a další komponenty, přičemž biologicky aktivní látka je vybrána ze skupiny zahrnující farmaceuticky a kosmeticky aktivní látky, s výhodou vitamíny, léčiva s výhodou cytostatika, steroidy, dále fytoextrakty, fytokomplexy nebo fytoaktivní látky apod..

Jedinečné rysy filmu podle tohoto vynálezu jsou: 1) film je složen pouze z hydrofobizovaného hyaluronanu, 2) nejsou využity syntetické polymery, 3) neobsahuje žádná toxická rozpouštědla, 4) případná zbytková rozpouštědla jsou netoxická a jsou pod limity pro medicínské použití, 5) modifikací stupně substituce hyaluronanu lze řídit botnavost a rozpustnost filmu, 6) modifikací stupně substituce hyaluronanu lze řídit rychlost degradace filmu, 7) film není povrchově deformován a je homogenní, co se tloušťky týče (okraje filmu 0,5 cm z každé strany jsou vždy odstraněny, z důvodu přilnavosti ke stěně sušícího zařízení jsou tlustší, hodnocen je pak zbytek filmu), 8) lze řídit povrchový vzhled filmu, 9) lze řídit mechanické vlastnosti filmu, zejména pak v hydratovaném stavu 10) hrubost RMS může být pod 2 nm, 11) lze řídit tloušťku filmu, 12) film je neadherentní pro buňky, 13) film neobsahuje tzv. "skin surface". "Skin surface" je povrchová krusta, díky které by se film deformoval, kroutil a pod níž by se mohly formovat bubliny. Vzniká při sušení polymerního

roztoku na vzduchu, kdy v blízkosti povrchu se často objevuje vrstva vysoce koncentrovaného polymeru. Tato vrstva má velmi odlišné reologické vlastnosti od zbytku filmu. Sušení filmu dle tohoto vynálezu probíhá tak, že film není otevřen svému okolí, tedy suší se pomaleji, existuje vyšší tenze par rozpouštědla nad roztokem. Toto uspořádání napomáhá tomu, aby povrchová krusta nevznikla. S překvapením bylo zjištěno že i když byla míra vlhkosti v uzavřeném prostoru při sušení filmu nízká, k tvorbě povrchové krusty nedocházelo.

Ve filmech podle vynálezu nebyla nalezena rezidua hydrofobizačních činidel, která by mohla pocházet z podložky, na které je film připravován.

Oproti postupům dle stavu techniky je způsob přípravy filmu podle vynálezu velmi jednoduchý a spočívá v rozpuštění hydrofobizovaného hyaluronanu (jakékoliv popsané molekulové hmotnosti a jakémkoliv popsáném stupni substituce) v příslušném rozpouštědle, nadávkování na definovanou podložku a odpaření rozpouštědla v uspořádání, kdy je vyšší tenze par rozpouštědla nad sušeným roztokem v uzavřeném prostoru a lze získat film o definovaném vzhledu. Odpaření rozpouštědla je provedeno buď volným odpařením rozpouštědla nebo zahříváním spodní plochy filmu spočívající na podložce za současného zahřívání nebo chlazení horní plochy filmu (sušení v teplotním gradientu a uzavřeném systému). Způsob přípravy filmu podle vynálezu je tedy velmi levný a jednoduchý. Důležité také je, že povrch filmu podle vynálezu je na ploše, kterou přiléhal k podložce (tj. spodní plocha filmu) velmi hladký (RMS do 2 nm), na protilehlé straně filmu (tj. horní plocha filmu) je pak hrubší dle podmínek sušení a typu derivátu.

Podle dalšího aspektu se dále vynález týká způsobu přípravy filmu podle vynálezu, který spočívá v tom, že se připraví roztok obsahující C_{10} - C_{22} -acylovaný derivát kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I) výše ve směsi vody a C_1 - C_6 alkoholu, s výhodou propan-2-olu, který se míchá, načež se nanese na podložku a suší se v uzavřeném prostoru.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu je v roztoku množství C_{10} - C_{22} -acylovaného derivátu kyseliny hyaluronové v rozsahu 0,5 až 3 hmotn.%, obsah C_1 - C_6 alkoholu, s výhodou propan-2-olu, je v rozsahu 25 až 55 obj.% a obsah vody v roztoku je v rozmezí 45 až 75 obj.%. Připravovaný roztok má poměrně nízkou viskozitu, čímž se zamezí vzniku bublin při míchání a dávkování roztoku.

Podle ještě dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu se roztok míchá po dobu 20 až 72 hodin, s výhodou 20 až 48 hodin.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu je, že sušení filmu probíhá v uzavřeném prostoru při teplotě 20°C až 50°C, s výhodou 30°C až 40°C; po dobu 3 až 6 hodin, s výhodou 4 až 5 hodin.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu platí, že se sušení v teplotním gradientu provede zahříváním spodní plochy filmu spočívající na podložce na teplotu, která je alespoň o 1°C vyšší, než je teplota, na kterou se zahřívá nebo chladí protilehlá horní plocha filmu. S výhodou se spodní plocha filmu spočívající na podložce zahřívá na teplotu v rozsahu 20°C až 60°C a protilehlá horní plocha filmu se zahřívá nebo chladí v rozsahu 10°C až 59°C. Ještě výhodněji se spodní plocha filmu spočívající na podložce zahřívá na teplotu 50°C a protilehlá horní plocha filmu se chladí na teplotu 20°C. Při aplikaci teplotního gradientu se film suší v uzavřeném prostoru.

Podle ještě dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu se roztok v teplotním gradientu suší po dobu 6 až 12 hodin, s výhodou 6 hodin.

Výhodou přípravy filmu dle tohoto vynálezu je to, že je ve vodném prostředí nerozpustný a je tvořen jen samotným acylovaným hyaluronanem podle obecného vzorce I, definovaném výše, bez nutnosti přídavku síťovacích činidel a dalšího zpracování.

Roztok může být s výhodou různě upravován, mohou být do něho vmíchány biologicky aktivní látky, léčiva a další komponenty, přičemž biologicky aktivní látka je vybrána ze skupiny zahrnující farmaceuticky a kosmeticky aktivní látky, s výhodou vitamíny, léčiva s výhodou cytostatika, steroidy, dále fytoextrakty, fytokomplexy nebo fytoaktivní látky apod..

Podle ještě dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu je podložkou polymer vybraný ze skupiny obsahující polyvinylalkohol, polypropylen, polyethylen, polyoxymetylen nebo polystyren. Dále pak je podložkou sklo nebo hydrofobizované sklo. Ve výhodném provedení je použito hydrofobizované sklo. Kontaktní úhel smáčení povrchu podložky demi vodou je v rozsahu 30° až 120°, s výhodou 50° až 70°.

Výhodou výše popsaného způsobu podle vynálezu je kromě jednoduchosti také možnost připravit ze strany podložky (tj. spodní plochy filmu) velmi hladký povrch filmu díky výběru podložky, který je sám o sobě hladký.

Jako velmi užitečná se jeví možnost ovlivnit deformaci a celkový vzhled filmu tím, že je ovlivňována adheze (interakce) polymeru, sušícího se a suchého filmu k podložce, na kterou je roztok dávkován a na které probíhá sušení. Ideální je, pokud je polymerní film na

podložku zcela naadherován, nedochází k samovolnému sloupnutí filmu a přitom ho lze z podložky sejmut jen s použitím minimální síly.

Dobrá smáčivost povrchu podložky roztokem polymeru je prvním stádiem adheze. Adhezi sušícího se a suchého filmu podle vynálezu k podložce a tím i vzhled filmu lze ovlivnit výběrem podložky s různou smáčivostí povrchu vyjádřenou kontaktním úhlem. Pro každý typ derivátu (různá modifikace, různá molekulová hmotnost a různý stupeň substituce) lze pak s výhodou využít podložky se zcela konkrétní hodnotou smáčivosti. V případě dobře naadherovaných filmů je po sloupnutí jejich povrch rovný, v případě méně naadherovaných či neadherujících filmů je pak jejich povrch více či méně zdeformován či smršťen. S výhodou se jako podložky použijí hydrofobizovaná skla.

Film je připraven odpařením směsi organického rozpouštědla (typicky alkoholu) s vodou. Povrch takto připraveného filmu má povrchový vzhled a hrubost RMS řízenou dle výběru optimálních rozpouštědel, derivátu, podmínek sušení a podložky a může být připraven jako transparentní. Tloušťka filmu se pohybuje od 2 až 100 μm , s výhodou pak mezi 5 až 25 μm . Díky způsobu přípravy filmu na podložce s modulovatelnou smáčivostí lze ovlivnit adhezi filmu k podložce a tím i morfologii povrchu filmu.

Příprava filmu probíhá tak, že roztok acylovaného derivátu hyaluronanu o poměrně nízké viskozitě je po dostatečném rozmíchání nadávkován na vhodnou podložku a usušen. Nízkou viskozitou roztoku nadávkování na podložku je zamezeno vzniku bublin při míchání a dávkování roztoku. Posléze je film z podložky sejmut. Doba sušení filmu se pohybuje dle objemu a koncentrace roztoku a dále dle nastavených teplot a použitého rozpouštědla od 5 do 12 hodin. Film obsahuje méně než 0,02% rozpouštědla, např. isopropanolu, čímž bezpečně naplňuje požadavky na množství zbytkových rozpouštědel pro lékařské použití. Takový materiál lze použít ke konstrukci zdravotnického prostředku. Výhodou způsobu přípravy takového filmu podle vynálezu je to, že je ve vodném prostředí nerozpustný a je tvořen jen samotným modifikovaným hyaluronanem bez nutnosti přidavku síťovacích činidel a dalšího zpracování.

Film podle vynálezu se může podle vynálezu použít například pro výrobu antiadhezních bariér a k dalším aplikacím v humánní i veterinární medicíně. Degradace filmu v lidském těle je modulovatelná dle použité molekulové hmotnosti derivátu a stupni substituce hyaluronanu alkylem a pohybuje se od několika hodin po několik měsíců. Acylované deriváty HA i folie z nich připravené jsou degradovatelné *in vitro*.

Botnavost filmu, příp. jeho rozpustnost je řízena také použitou molekulovou hmotností derivátu a stupněm substituce hyaluronového řetězce C_{10} - C_{22} alkylem.

Důležité je, že oproti derivátům popsáným v patentových spisech dle stávajícího stavu techniky, že film podle vynálezu obsahuje pouze C_{10} - C_{22} – acylovaný derivát kyseliny hyaluronové, který má zachovány veškeré karboxylové skupiny kyseliny glukuronové, což jsou skupiny odpovědné za biologické vlastnosti hyaluronanu.

Dalším aspektem vynálezu je ovlivnění povrchového vzhledu filmu tím, že je ovlivněna adheze vysušeného polymeru k podložce, na které je film připravován. Výsledkem může být velmi rovný film bez vrásnění a smrštění.

Podle ještě dalšího provedení se film podle vynálezu, jak je definovaný výše, použije v medicínských aplikacích, biotechnologických aplikacích nebo jako podklad pro depozici aktivních komponent. ke konstrukci zdravotnického prostředku, jako jsou například antiadhezní bariéry, neboť na ně neadherují buňky. Dále mezi výhodné medicínské aplikace, ve kterých lze film podle vynálezu použít, patří například medicínské farmaceutické aplikace, jako například léčba chronických a akutních ran; dále např. dentální aplikace..

Definice pojmů

Termínem „stupeň substituce“ se rozumí počet C_{10} - C_{22} acylů připojených na 100 dimerů hyaluronanu. Např. stupeň substituce 2% znamená, že 2 z každých 100 dimerů hyaluronanu je substituováno C_{10} - C_{22} acyly. Při substituci je atom vodíku z primární hydroxylové skupiny N-acetyl-glukosaminu nebo ze sekundárních OH skupin kyseliny glukuronové nahrazen C_{10} - C_{22} acylem.

Termín „film“ znamená samonosnou tenkou polymerní folii, plošný útvar.

Termín „plocha filmu“ znamená obsah filmu vypočtený z jeho rozměrů (v m^2).

Termín „zdravotnický prostředek“ znamená pomůcku použitou samostatně nebo v kombinaci s jakýmkoliv příslušenstvím ke specifickému použití pro diagnostické nebo léčebné účely, například antiadhezní bariéra.

Termín „uzavřený prostor“ znamená prostor, ve kterém probíhá sušení filmu za určité teploty nebo v teplotním gradientu a který je uzavřený bez volného přístupu okolního vzduchu .

Termín "kondiciované médium" znamená THP-1 kondiciované médium, což je standardní RPMI médium obohacené o 10% fetální bovinní sérum, ve kterém byly kontinuálně kultivovány buňky lidské linie THP-1 po dobu 7 dní. Buňky THP-1 jsou používány jako model lidských monocytů a produkují kromě řady růstových faktorů a cytokinů i enzymy způsobující degradaci složek extracelulární matrix, především matrix metaloproteinázy,

hyaluronidázy či esterázy. Před použitím či zamražením bylo médium centrifugováno a filtrováno přes 0,22 μm filtr, pro zajištění čistoty a sterility.

Přehled obrázků na výkresech:

Obr. 1: vliv adheze filmu (a,b) na bázi oleyl derivátu hyaluronanu sodného na jeho povrchový vzhled (c)

Obr. 2: vliv adheze filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného na jeho povrchový vzhled

Obr. 3: porovnání filmů připravených dle Příkladů 2 (b) a 18 (a) po třech týdnech degradace v kondiciovaném médiu

Obr. 4: potvrzení přítomnosti oligosacharidů na bázi HA pomocí HPLC. Plná černá čára = film dle příkladu 2 (D2) degradovaný v přítomnosti BSA, šedá tečkovaná čára = film dle příkladu 2 (D2) degradovaný bez přídavku BSA; šedá přerušovaná čára = standard HA4 ($t_R = 8,9 \text{ min}$), HA6 ($t_R = 14,6 \text{ min}$).

Obr. 5: potvrzení přítomnosti oligosacharidů na bázi HA pomocí HPLC. Plná černá čára = derivát o stupni substituce 100% a MW $2,04 \times 10^5 \text{ g/mol}$ (TP 11) degradovaný v přítomnosti BSA, šedá tečkovaná čára = derivát o stupni substituce 100% a MW $2,04 \times 10^5 \text{ g/mol}$ (TP 11) degradovaný bez přídavku BSA; šedá přerušovaná čára = standard HA4 ($t_R = 8,9 \text{ min}$), HA6 ($t_R = 14,6 \text{ min}$).

Obr. 6: morfologie filmu připraveného dle příkladu 16 ze strany podložky

Obr. 7: viabilita suspenzních buněk THP-1 po 24 a 72hod inkubaci s filmem připraveným dle Příkladu 1 na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Obr. 8: indukce buněčné smrti po 24 hod inkubace s filmem připraveným dle Příkladu 1 na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Obr. 9: indukce buněčné smrti po 72 hod inkubace s filmem připraveným dle Příkladu 1 na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Obr. 10: indukce buněčné smrti po 72 hod inkubace s filmem připraveným dle Příkladu 1 na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Obr. 11: : buněčné antiadhezní vlastnosti filmu, A- film připravený dle Příkladu 17, líc, B- film připravený dle Příkladu 17, rub, C - film připravený dle příkladu 2, líc, D - film připravený dle příkladu 2, rub, CTRL - kontrola

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1. *Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 100 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 100% a molekulové hmotnosti $2,8 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 55% roztoku isopropylalkoholu a nechána míchat min. 72 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 61° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 40°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z hydrofobizovaného skla a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $15\mu\text{m}$. Sušina byla stanovena na hodnotu okolo 92%.

Příklad 2. Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Navážka 100 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 100% a molekulové hmotnosti $2,12 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 55% roztoku isopropylalkoholu a nechána míchat min. 48 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované o hodnotě smáčivosti demi vodou 61° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 6 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z hydrofobizovaného skla a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $15\mu\text{m}$.

Příklad 3. Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Navážka 100 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 55% a molekulové hmotnosti $6,0 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 50% roztoku etylalkoholu a nechána míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na polyethylenovou podložku o hodnotě smáčivosti demi vodou 79° ($\pm 4^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 30°C a teplotě horní desky 29°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $15\mu\text{m}$.

Příklad 4. Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

50 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 31% a molekulové hmotnosti $9,9 \times 10^5$ g/mol bylo rozpuštěno v 20 ml 45 % roztoku etylalkoholu a necháno míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 61° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru odpařením rozpouštědla při teplotě 30°C po dobu 4 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $8\mu\text{m}$.

Příklad 5. *Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 100 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 35% a molekulové hmotnosti $0,83 \times 10^5$ g/mol bylo rozpuštěna v 20 ml 25 % roztoku etylalkoholu a necháno míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na polystyrenovou podložku o hodnotě smáčivosti demi vodou 102° ($\pm 4^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 μm .

Příklad 6. *Příprava filmu na bázi erukoyl derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 100 mg erukoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 160 % a molekulové hmotnosti $2,04 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 60% roztoku isopropylalkoholu a nechána míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na polypropylenovou podložku o hodnotě smáčivosti demi vodou 105° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru odpařením rozpouštědla při teplotě 50°C 3 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 μm .

Příklad 7. *Příprava filmu na bázi erukoyl derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 100 mg erukoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 8% a molekulové hmotnosti $6,4 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna ve 20 ml 30% roztoku isopropylalkoholu a nechána míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 61° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 μm .

Příklad 8. *Příprava filmu na bázi lauroyl derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 100 mg lauroyl derivátu hyaluronanu o stupni substituce 90% a molekulové hmotnosti $1,88 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 50% isopropylalkoholu a ponechána míchat po dobu min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 61° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru odpařením rozpouštědla při teplotě 20°C po dobu 6 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 μm .

Příklad 9. *Příprava filmu na bázi oleyl derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 100 mg oleyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 20% a molekulové hmotnosti $2,8 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 50% isopropylalkoholu a ponechána míchat po dobu min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na polyvinylchloridovou podložku o hodnotě smáčivosti demi voda 95° ($\pm 5^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 6 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 μm .

Příklad 10. *Příprava filmu na bázi oleyl derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 300 mg oleyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 17% a molekulové hmotnosti $0,83 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 30% isopropylalkoholu a ponechána míchat po dobu min. 48 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 57° ($\pm 3^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka folie se pohybovala okolo 40 μm .

Příklad 11. *Příprava filmu na bázi oleyl derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 300 mg oleyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 17% a molekulové hmotnosti $0,83 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 30% isopropylalkoholu a ponechána míchat po dobu min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 107° ($\pm 1^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka folie se pohybovala okolo 40 μm .

Příklad 12. *Příprava filmu na bázi kaprilyl (C10) derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 100 mg kaprilyl (C10) derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 87% a molekulové hmotnosti $2,50 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 50% etylalkoholu a ponechána míchat po dobu min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 61° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 60°C a teplotě horní desky 40°C po dobu 10 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu se pohybovala okolo 15 μm , sušina pak byla stanovena na

hodnotu okolo 92%. Botnavost takového filmu byla stanovena na více než 100% (měřena změna plochy filmu) v rovnovážném stavu.

Příklad 13. Příprava filmu na bázi behenoyl derivátu hyaluronanu sodného

Navážka 100 mg behenoyl hyaluronanu o stupni substituce 7% a molekulové hmotnosti $6,4 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 50% roztoku isopropylalkoholu a nechána míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na polypropylenovou podložku o hodnotě smáčivosti demi vodou $105^\circ (+/- 2^\circ)$ a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 6 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena a sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka filmu byla stanovena na 15 μm .

Příklad 14. Příprava filmu na bázi behenoyl derivátu hyaluronanu sodného

Navážka 100 mg behenoyl hyaluronanu o stupni substituce 11% a molekulové hmotnosti $1,15 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 50% roztoku isopropylalkoholu a nechána míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou $61^\circ (+/- 2^\circ)$ a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 7 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena a sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka filmu byla stanovena na 15 μm .

Příklad 15. Příprava filmu na bázi oleyl derivátu hyaluronanu sodného

Navážka 100 mg oleyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 15% a molekulové hmotnosti $2,8 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 50% isopropylalkoholu a ponechána míchat po dobu min. 48 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou $61^\circ (+/- 2^\circ)$ a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka folie se pohybovala okolo 15 μm .

Příklad 16. Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Navážka 100 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 34% a molekulové hmotnosti $2,67 \times 10^5$ g/mol bylo rozpuštěna v 20 ml 50 % roztoku etylalkoholu a necháno míchat min. 48 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou $61^\circ (+/- 2^\circ)$ a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 μm .

Příklad 17. Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Navážka 100 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 60% a molekulové hmotnosti $2,8 \times 10^5$ g/mol bylo rozpuštěna v 20 ml 50 % roztoku etylalkoholu a necháno míchat min. 48 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 61° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $15\ \mu\text{m}$.

Příklad 18. Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Navážka 100 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 31 % a molekulové hmotnosti $2,7 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 50 % roztoku isopropylalkoholu a necháno míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 61° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $15\ \mu\text{m}$.

Příklad 19. Příprava filmu na bázi lauroyl derivátu hyaluronanu sodného

Navážka 100 mg lauroyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 58 % a molekulové hmotnosti $1,88 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna v 20 ml 50 % roztoku isopropylalkoholu a necháno míchat min. 48 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou 61° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 20°C a teplotě horní desky 10°C po dobu 12 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $15\ \mu\text{m}$.

Příklad 20. Porovnání smáčivosti podložky s využitím různých hydrofobizačních činidel

Sklo určené k hydrofobizaci bylo nejprve důkladně očištěno tak, aby výsledná smáčivost demi vodou nepřesáhla hodnotu 10° . Následně byla provedena hydrofobizace skel. Pro hydrofobizaci skel byly použity tyto hydrofobizační činidla: chlortrimethylsilan (CTMS), (3-aminopropyl)trimetoxysilan (APTMS) a oktadecyltrichlorsilan (OTS). Výsledné hodnoty smáčivosti skel (při koncentraci činidla 1%) jsou uvedeny v Tabulce 1. Pro CTMS byly

vyzkoušeny různé koncentrace činidla v hexanu. Výsledné hodnoty naměřených smáčivostí skel jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 1: smáčivost skel vyjádřená kontaktním úhlem při hydrofobizaci činidlem v koncentraci 1%

Činidlo (1%)	Rozpouštědlo	KÚ
CTMS	hexan	cca 70°
APTMS	hexan	cca 90°
	aceton	cca 70°
	dichlormetan	cca 90°
OTS	etanol (96%)	cca 66°
	toluen	cca 105°
	isopropanol	cca 103°

KÚ znamená kontaktní úhel

Tabulka 2: smáčivost skel vyjádřená kontaktním úhlem při hydrofobizaci různými koncentracemi CTMS rozpuštěném v hexanu

Koncentrace CTMS	KÚ
0,10%	cca 50°
0,50%	cca 60°
1%	cca 70°
3-5%	<80°

KÚ znamená kontaktní úhel

Příklad 21. Stanovení rezidua hydrofobizačního činidla ve filmu připraveného dle příkladu 1

Trimethylsilanol byl analyzován jako reziduum trimethylsilylchloridu po jeho reakci s –OH skupinami derivátu HA. Analýza byla provedena na plynovém chromatografu vybaveném headspace samplerem a hmotnostně spektrometrickým detektorem ve formě jednoduchého

kvadrupólu. Vzorek filmu připraveného dle příkladu 1 byl rozpuštěn na koncentraci 6 mg/ml do 50 % (obj./obj.) isopropanolu a po rozpuštění bylo do vialky pipetováno 4,75 ml vzorku a 0,25 ml n-butanolu (1 mg/ml), který plnil funkci vnitřního standardu. Do 50 % isopropanolu byl také připraven zásobní roztok trimethylsilylchloridu (1 mg/ml), který okamžitě zreagoval na trimethylsilanol. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada v rozmezí 0,5 – 15,0 µg/ml, s přidavkem n-butanolu jako vnitřního standardu. V žádném z analyzovaných vzorků folie nebyla potvrzena přítomnost trimethylsilanolu ve vyšší koncentraci než měl první kalibrační bod, tzn., že obsah trimethylsilanolu, ve vzorcích fólií byl nižší než 0,008 % (hmotn./hmotn.).

Příklad 22. *Vliv adheze filmu na bázi oleyl derivátu hyaluronanu sodného na jeho povrchový vzhled*

Filmy připravené dle příkladu 10 a 11 byly připraveny na dvou sklech o odlišné smáčivosti, a to 57° (+/- 3°) a 107° (+/- 1°). Po usušení byl zhodnocen povrchový vzhled filmu a korelován s adhezí. V případě dobré přilnavosti filmu k podložce je povrch filmu rovný bez povrchových deformací. Film byl zcela adherován na podložce o nižším kontaktním úhlu, na podložce s vyšším kontaktním úhlem byl částečně sloupnutý a deformovaný. Výsledek je dokumentován na Obr. 1a, 1b, 1c. Z obrázku vyplývá, že pokud je film zcela naadherován na povrchu, je po sloupnutí rovný bez povrchových deformací. Naopak v případě nedokonalé adheze je film více či méně deformován.

Příklad 23. *Vliv adheze filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného na jeho povrchový vzhled*

Byl zhodnocen film na palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného připraveného dle příkladu 2 na skle se smáčivostí 61 (+/- 2°). Po usušení byl zhodnocena adheze a vzhled filmu. Film byl dobře naadherován a povrch byl zcela rovný bez deformací. Výsledek adheze je dokumentován na Obr. 2.

Příklad 24. *Stanovení zbytkového isopropylalkoholu ve filmech*

Ve filmech připravených dle Příkladů 1, 8 a 12 byla stanovena zbytková koncentrace organického rozpouštědla - isopropylalkoholu technikou plynové chromatografie. Podstatou stanovení rozpouštědla je jeho převedení do plynné fáze za zvýšené teploty, jeho separace na plynovém chromatografu a následná detekce plamenově ionizačním detektorem. Koncentrace isopropanolu ve filmu byla prováděna vždy stanovením na dvou vzorcích a byla odečítána z

kalibrační křivky. Navážka vzorků byla vždy 50 mg. Po provedení analýzy byla koncentrace zbytkového isopropanolu u všech filmů stanovena nižší než nejnižší bod kalibrační křivky a vyjádřena jako $< 0,02 \%$ (hmotn./hmotn.). Tato hodnota bezpečně naplňuje požadavky na množství zbytkových rozpouštědel třídy 3 dle EU lékopisu.

Příklad 25. Stanovení hmotnosti - homogenita v ploše

Film připravený dle Příkladu 1 byl rozstříhán na 55 čtverců o ploše 1 cm^2 . Před měřením byly jednotlivé vzorky ponechány v pokojové vlhkosti a teplotě po dobu 5 hodin. Dále pak byly jednotlivé čtverce zváženy na analytických vahách. Výsledky hmotnosti jednotlivých čtverců jsou uvedeny v Tabulce 3. Ze všech hodnot v tabulce byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient. Vypočítané hodnoty: průměr - 2,35 mg, směrodatná odchylka - 0,18 mg, variační koeficient - 7,51%.

Tabulka 3: stanovení hmotnostní homogenity filmu

2,6	2,3	2,4	2,6	2,4	2,2	2,1	2,6	2,1	2,1	2,5
2,5	2,3	2,7	2,6	2,5	2,6	2,0	2,6	2,1	2,5	2,4
2,5	2,2	2,3	2,4	2,3	2,2	2,3	2,6	2,2	2,2	2,3
2,3	2,4	2,2	2,2	2,5	2,7	2,5	2,3	2,3	2,5	2,3
2,1	2,1	2,1	2,3	2,3	2,3	2,4	2,2	2,2	2,3	2,4

Příklad 26. Stanovení tloušťky - homogenita v ploše

Na filmu připraveném dle příkladu 15 byl nakreslen čtverečkový rastr o ploše jednoho čtverce 1 cm^2 a celkovém počtu čtverců 35. Na každém čtverci byla změřena tloušťka folie pomocí mechanického tloušťkoměru Mytutoyo VL-50. Měření bylo provedeno ve stabilním prostředí o vlhkosti 50% a teplotě $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Změřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 4. Ze všech hodnot v tabulce byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient. Vypočítané hodnoty: průměr - $14,61 \text{ }\mu\text{m}$, směrodatná odchylka - $1,17 \text{ }\mu\text{m}$, variační koeficient - 8,02%.

Tabulka 4: stanovení homogenity tloušťky

16,24	16,65	16,15	15,15	13,83	13,82	14,7
13,93	13,91	13,85	13,73	13,4	13,22	14,25
14,77	13,93	14,11	13,26	12,79	13,53	14,61
16,93	16,15	16,63	15,72	15,6	15,01	16,2
14,68	14,9	15	14,7	13,72	12,47	13,76

Příklad 27. Srovnání bobtnavostí filmů připravených z palmitoyl hyaluronanu sodného s různým stupněm substituce v 0,1M fosf. pufru, pH 7,4

Filmy připravené dle Příkladů 2, 16 a 17 byly po přípravě nastříhány na přesně definované čtverce, zváženy, změřeny a vloženy do 0,1M PBS, pH 7,4. Při 37°C byla sledována bobtnavost folií, každý pokus byl dělán v trojím opakování. Vyhodnocována byla změna hmotnosti a rozměrů filmu - výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5. Z této Tabulky je patrné, že film bobtná tím více, čím nižší je stupeň substituce, v případě vysokých stupňů substituce lze dosáhnout malé změny plochy filmu, což může být v řadě aplikací velmi důležité.

Tabulka 5: bobtnavost filmů z palmitoyl derivátů s různým stupněm substituce

	změna plochy po 5 dnech v 0,1M PBS, pH 7,4 o (%)
<i>Film připravený dle příkladu 16</i>	69
<i>Film připravený dle příkladu 17</i>	32
<i>Film připravený dle příkladu 2</i>	15

Příklad 28. Degradace folií připravených z palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného v kondicionovaném médiu - porovnání dvou stupňů substituce

Filmy připravené dle příkladů 2 a 18 byly po přípravě nastříhány na přesně definované čtverce, zváženy, změřeny a vloženy do kondicionovaného média. Veškerá příprava probíhala v laminárním boxu, aby nedošlo ke kontaminaci a nežádoucím reakcím média. Při 37°C byla po stanovených intervalech kontrolována změna plochy filmu a jeho vizuální vzhled, což jsou vlastnosti, které lze spojit s degradací. Kondicionované medium bylo v pravidelných intervalech obměňováno, experiment byl dělán v trojím provedení. Film připravený dle Příkladu 2 se začal degradovat výrazněji později než film připravený dle Příkladu 18. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 3 a,b, kde je znázorněn vzhled filmu po 3 týdnech degradace v kondicionovaném médiu. V

Tabulce 6 je dokumentována změna plochy po jednom týdnu degradace pro film dle Příkladu 2 i 18 a po třech týdnech pro film z Příkladu 2 (film dle příkladu 18 byl po třech týdnech degradován na kusy až rozpuštěn). Z výsledku je patrné, že rychlost degradace je velmi závislá na stupni substituce hyaluronanu sodného acylovým řetězcem. V případě vysoce substituovaného filmu připraveného dle Příkladu 2 probíhala degradace v řádu několika měsíců.

Tabulka 6: změna plochy filmu po 1 týdnu v kondiciovaném médiu - porovnání dvou stupňů substituce

	změna plochy filmu po 1 týdnu v kondiciovaném médiu o (%)
<i>Film připravený dle příkladu 2</i>	13
<i>Film připravený dle příkladu 18</i>	125

Příklad 29. Degradace filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Vzorky filmu připraveného dle příkladu 2 byly degradovány v 0,01M octanovém pufru s přídavkem 0,03M NaCl s pH = 5,3 pomocí enzymu bovinní testikulární hyaluronidáza (Finepharm). Na degradaci bylo použito 300 IU enzymu na 1 mg filmu. Kromě standardní enzymatické hydrolyzy byla provedena i hydrolyza v přítomnosti BSA (40 mg na 5 mg folie). Degradace probíhala při 37°C a vzorky byly odebírané na analýzu po 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodinách. Analýza vzorků byla prováděna na HPLC systému Alliance (Waters) dle vnitřního standardního operačního postupu. Z výsledků vyplynulo, že folie nedegraduje bez přítomnosti BSA vůbec. I po 144 hodinách nebylo možné detekovat žádné oligosacharidy hyaluronanu. V přítomnosti BSA degradace probíhá, avšak velmi pomalu. V odběrech po 24, 48 a 72 hodinách je možné ještě stále pozorovat nezdegradované kousky filmu. V delších časových intervalech se film v roztoku rozpustil. Výsledky degradace filmu po 72 hodinách jsou uvedeny na Obr. 4.

Příklad 30. Degradace erukoyl derivátu hyaluronanu sodného

Vzorky derivátu HA s navázaným erukoylem o stupni substituce 100% a molekulové hmotnosti 204 kDa byly degradovány v 0,01M octanovém pufru s přídavkem 0,03M NaCl s pH = 5,3 pomocí enzymu bovinní testikulární hyaluronidáza (Finepharm). Na degradaci bylo

použito 300 IU enzymu na 1 mg derivátu. Kromě standardní enzymatické hydrolýzy byla provedena i hydrolýza v přítomnosti BSA (40 mg na 5 mg folie). Degradace probíhala při 37°C a vzorky byly odebírané na analýzu po 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodinách. Analýza vzorků byla prováděna na HPLC systému Alliance (Waters) dle vnitřního standardního operačního postupu. Z výsledků vyplynulo, že derivát nedegraduje bez přítomnosti BSA vůbec. I po 144 hodinách nebylo možné detekovat žádné oligosacharidy hyaluronanu. V přítomnosti BSA degradace probíhá, avšak velmi pomalu. Výsledky degradace derivátu po 72 hodinách jsou uvedeny na Obr. 5.

Příklad 31. Charakterizace filmů pomocí Youngova modulu pevnosti

U filmů připravených dle příkladů 10, 15, 16 a 19 byl stanoven Youngův modul pevnosti v suchém stavu. Filmy byly testovány na mechanické vlastnosti pomocí jednostupňového trhacího stroje INSTRON3343 se 100N hlavou. Youngův modul byl vypočítán z průměrné hodnoty alespoň 9 platných měření. Z Tabulky 7 lze vidět, že Youngův modul suchých, nehydratovaných filmů nezávisí na molekulové hmotnosti, substituentu nebo stupni substituce.

Tabulka 7: Youngův modul pevnosti filmů

	Youngův modul (MPa)
<i>Film připravený dle Příkladu 10</i>	2772 (+/- cca 10%)
<i>Film připravený dle Příkladu 15</i>	2409 (+/- cca 10%)
<i>Film připravený dle Příkladu 16</i>	1800 (+/- cca 10%)
<i>Film připravený dle Příkladu 19</i>	2636 (+/- cca 10%)

Příklad 32. Charakterizace morfologie povrchu folií a stanovení RMS pomocí AFM

Film připravený dle Příkladu 16 byl charakterizován pomocí metody Atomic force microscopy (AFM), přičemž byl sledován především vzhled a charakter povrchu. Byla stanovována především hrubost RMS - root mean square roughness. Bylo zjištěno, že ze strany podložky lze získat velmi hladký povrch, RMS do 2 nm - Obr. 6. Strana filmu, která byla při sušení vystavena vzduchu je vždy hrubší - RMS se pohybuje okolo 54 i více nm.

Příklad 33. Srovnání filmů sušených v teplotním gradientu a v uzavřeném prostoru

Filmy připravené dle příkladů 8 a 19 byly po usušení vizuálně srovnány. Povrch obou filmů nebyl deformován, ani na jednom z nich se nevytvořila povrchová křusta. Kvalitativně byly oba filmy stejné (vizuální srovnání).

Příklad 34. Viabilita suspenzních buněk THP-1 po 24 a 72hod inkubaci s filmem připraveným dle příkladu 1 na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Buněčná linie THP-1 byla kultivována v médiu s přidavkem 10% fetálního bovinního séra. Po dosažení dostatečné hustoty a viability (změřené automatickým počítadlem buněk CASY TT, Roche) byly buňky nasazeny do šesti jamkového panelu do 2 ml 10% média. K buňkám byl přidán testovaný film v množství 1 a 0,5 mg/ ml. Po 24 a 72 hod inkubaci byly buňky promyty a byla detekována jejich viabilita a výskyt buněčné smrti pomocí detekčního kitu ApoFlowEx® FITC Kit (Exbio) na průtokovém cytometru MACSQuant® (Miltenyi Biotec). Buňky byly vyhodnoceny jako viabilní v případě, že nebyla detekována fluorescence propidium jodidu. Na obrázku 7 lze pozorovat zanedbatelné snížení viability po 24 hod inkubaci, které již nebylo pozorováno po 72 hod. Testovaný film je tedy hodnocen v těchto koncentracích jako necytotoxický.

Příklad 35. Viabilita suspenzních buněk THP-1 po 24 a 72hod inkubaci s filmem připraveným dle příkladu 1 na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného

Buněčná linie THP-1 byla kultivována v médiu s přidavkem 10% fetálního bovinního séra. Po dosažení dostatečné hustoty a viability (změřené automatickým počítadlem buněk CASY TT, Roche) byly buňky nasazeny do 6jamkového panelu do 2 ml 10% média. K buňkám byl přidán testovaný film v množství 1 a 0,5 mg/ ml. Po 24 a 72 hod inkubaci byly buňky promyty a byla detekována jejich viabilita a výskyt buněčné smrti pomocí detekčního kitu ApoFlowEx® FITC Kit (Exbio) na průtokovém cytometru MACSQuant® (Miltenyi Biotec). Hodnocení přítomnosti buněčné smrti (apoptózy a nekrózy) byly provedeno dle doporučení výrobce kitu. Ve stručnosti: populace jednotlivých buněk byla rozdělena na základě intenzity fluorescence propidium jodidu a Annexin V-FITC do 3 skupin: negativní v obou kanálech (buňky živé), pozitivní pouze v kanálu pro Annexin V-FITC (buňky apoptotické) a buňky pozitivní pro kanál propidium jodid +/- Annexin V-FITC (buňky nekrotické).

Z obrázku 8 a 9 vyplývá, že po 24 i 72 hod nedochází k většímu vzrůstu podílu apoptotických či nekrotických buněk v kultuře a testovaný materiál lze tedy hodnotit jako nevyvolávající buněčnou smrt.

Příklad 36. Kontaktní inhibice růstu myších 3T3 Swiss fibroblastů

Myší fibroblastová linie 3T3 Swiss byla kultivována v médiu s přídavkem 10% fetálního bovinního séra. V exponenciální fázi růstu byly buňky nasazeny do šestijamkového panelu do 2 ml 10% média. Po dosažení konfluencie byla přidána testovaná fólie o ploše 1 cm², která byla zatížena silikonovým sterilním kroužkem, aby nedošlo k výraznému pohybu fólie na monokultuře. Současně byly inkubovány kontrolní buňky bez ovlivnění a pouze se silikonovým kroužkem. Po 72 hod inkubaci byly odstraněny vzorky fólie i silikonové kroužky, buňky byly promyty PBS a fixovány 4% formaldehydem (10 min/pokojová teplota). Po promytí deionizovanou vodou byly buňky obarveny krystalovou violetí (0,1% ve vodě, 30 min/pokojová teplota) a po odmytí barvy byla plocha buněk vyfocena a pozorována pod světelným mikroskopem. Hodnocena byla plocha buněk pod testovaným materiálem, rozsah poškození buněk a velikost poškozené zóny.

Makrofotografie (Obrázek 10) jasně ukazují, že zóna poškození monovrstvy je ohraničená a došlo pouze k poškození buněk přímo pod fólií, s největší pravděpodobností mírným třením, na detailech ze světelného mikroskopu lze též pozorovat, že buňky měly tendenci znovu pod fólií prorůstat. Nebylo též pozorováno poškození ani změny v morfologii buněk na hranici testované fólie. Lze tedy předpokládat, že materiál nevykazuje kontaktní inhibici růstu buněk.

Příklad 37. Buněčné antiadhezní vlastnosti filmu

Filmy připravené dle Příkladů 2 a 17 (deriváty se dvěma různými stupni substituce) byly sterilně nastříhány na části o rozměrech 1cm². Tyto části byly umístěny do 6jamkového kultivačního panelu lícem či rubem nahoru. Následně byly zatíženy sterilními silikonovými kroužky a na takto připravené vzorky bylo pipetováno kultivační médium (2ml) pro primární lidské fibroblasty (NHDF) s obsahem 10% fetálního bovinního séra. Mezitím byla připravena suspenze NHDF a ta byla pipetována do středu silikonového kroužku na povrch filmu v množství 100 000 buněk/vzorek. Vzorky s buňkami byly inkubovány 72 hod a kontrolovány v 24hodinových intervalech pod světelným mikroskopem. Jako pozitivní kontrola byl použit polystyren upravený pro buněčné kultury s dobrými adhezními vlastnostmi. Po ukončení inkubace byly vyjmuty silikonové kroužky, filmy i s buňkami zafixovány 4% formaldehydem po dobu 10 minut a následně obarveny 1% krystalovou violetí ve vodě (10 min). Po důkladném odmytí nenavázané krystalové violeti (2x 5min oplach destilovanou vodou) byly vzorky vyfotografovány s použitím invertovaného mikroskopu Nikon se zvětšením 100x. Na obrázku CTRL lze vidět téměř konfluentní vrstvu buněk. Na snímcích filmů (A-D) je patrná

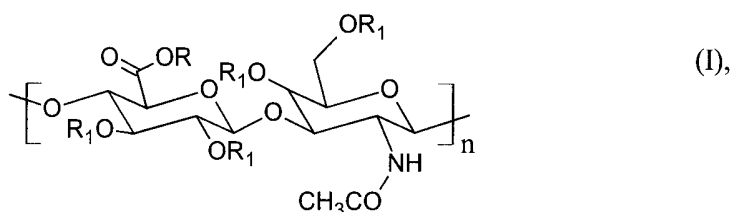
určitá struktura, pravděpodobně vzniklá dlouhou inkubací v médiu a zviditelněná krystalovou violetí. Na filmech ale nejsou přítomné žádné buňky. Lze tedy konstatovat, že filmy jsou v tomto systému zcela neadherentní a adhezi nepodpořila ani přítomnost proteinů v kultivačním médiu.

Příklad 38. Příprava filmu s octenidin dihydrochloridem

Ve 20 ml 50% isopropylalkoholu bylo rozmícháno 4,36 μl octenidin dihydrochloridu (dávkováno ze zásobního roztoku 10% octenidin dihydrochloridu v etanolu, před použitím protřepáno). Po důkladném rozmíchání byla k roztoku přidána navážka 100 mg derivátu palmitoyl hyaluronanu o stupni substituce 57% a molekulové hmotnosti $2,67 \times 10^5$ g/mol. Roztok byl ponechán míchat po dobu 72 hodin a po rozmíchání byl nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti 65 (+/- 3°) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 6 hodin. Po usušení byla folie zhodnocena a sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka filmu byla stanovena na 15 μm .

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Samonosný film na bázi esteru kyseliny hyaluronové, **vyznačující se tím, že** obsahuje C₁₀-C₂₂-acylovaný derivát kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I)



kde R je H⁺ nebo Na⁺, a kde R¹ je H nebo -C(=O)C_xH_y, kde x je celé číslo v rozmezí 5 až 21 a y je celé číslo v rozmezí 11 až 43 a C_xH_y je lineární nebo rozvětvený, nasycený nebo nenasycený řetězec C₉-C₂₁, přičemž alespoň v jedné opakující se jednotce jeden nebo více R¹ je tvořen -C(=O)C_xH_y a kde n je v rozmezí 12 až 4000.

2. Film podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** obsahuje palmitoyl hyaluronan.

3. Film podle nároku 1 anebo nároku 2, **vyznačující se tím, že** C₁₀-C₂₂-acylovaný derivát kyseliny hyaluronové má molekulovou hmotnost 1 x 10⁵ až 1 x 10⁶ g/mol, s výhodou 1 x 10⁵ až 5x10⁵ g/mol, výhodněji 2 x 10⁵ až 3 x 10⁵ g/mol.

4. Film podle kteréhokoliv předcházejících z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím, že** C₁₀-C₂₂-acylovaný derivát kyseliny hyaluronové má stupeň substituce v rozsahu 15 až 160%, s výhodou 50 až 100%, výhodněji 80 až 100%.

5. Film podle kteréhokoliv předcházejících z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím, že** má tloušťku v rozsahu 2 až 100 μm, s výhodou v rozsahu 5 až 25 μm.

6. Film podle kteréhokoliv předcházejících z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím, že** povrchová hrubost RMS alespoň jedné z ploch filmu je v rozsahu 0,5 až 100 nm, s výhodou v rozsahu 0,5 až 2 nm.

7. Film podle kteréhokoliv předcházejících z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím, že** dále

obsahuje biologicky aktivní látku vybranou ze skupiny zahrnující farmaceuticky aktivní látky a kosmeticky aktivní látky, s výhodou vitamíny, léčiva, s výhodou cytostatika, dále steroidy, fytoextrakty, fytokomplexy nebo fytoaktivní látky.

8. Způsob přípravy filmu podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 7, **vyznačující se tím, že** se připraví roztok obsahující C_{10} - C_{22} acylovaný derivát kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I) ve směsi vody a C_1 - C_6 alkoholu, s výhodou propan-2-olu, který se míchá, načež se nanese na podložku a suší se v uzavřeném prostoru.

9. Způsob přípravy filmu podle nároku 8, **vyznačující se tím, že** množství C_{10} - C_{22} acylovaného derivátu kyseliny hyaluronové v roztoku je v rozsahu 0,5 až 3 hmotn.%, obsah C_1 - C_6 alkoholu, s výhodou propan-2-olu, je v rozsahu 25 až 55 obj.% a obsah vody v roztoku je v rozmezí 45 až 75 obj.%.

10. Způsob přípravy filmu podle nároku 8 nebo nároku 9, **vyznačující se tím, že** se míchá po dobu 20 až 72 hodin, s výhodou 20 až 48 hodin.

11. Způsob přípravy filmu podle kteréhokoliv z nároků 8 až 10, **vyznačující se tím, že** se suší při teplotě v rozsahu 20 °C až 50 °C, s výhodou 30 °C až 40 °C; po dobu 3 až 6 hodin, s výhodou 4 až 5 hodin.

12. Způsob přípravy filmu podle kteréhokoliv z nároků 8 až 10, **vyznačující se tím, že** se suší v teplotním gradientu, kde se spodní plocha filmu spočívající na podložce zahřívá na teplotu, která je alespoň o 1 °C vyšší, než je teplota, na kterou se zahřívá nebo chladí protilehlá, horní plocha filmu.

13. Způsob přípravy filmu podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** se teplota spodní plochy filmu spočívající na podložce zahřívá na teplotu v rozsahu 20°C až 60°C a protilehlá horní plocha filmu se zahřívá nebo chladí na teplotu v rozsahu 10°C až 59°C.

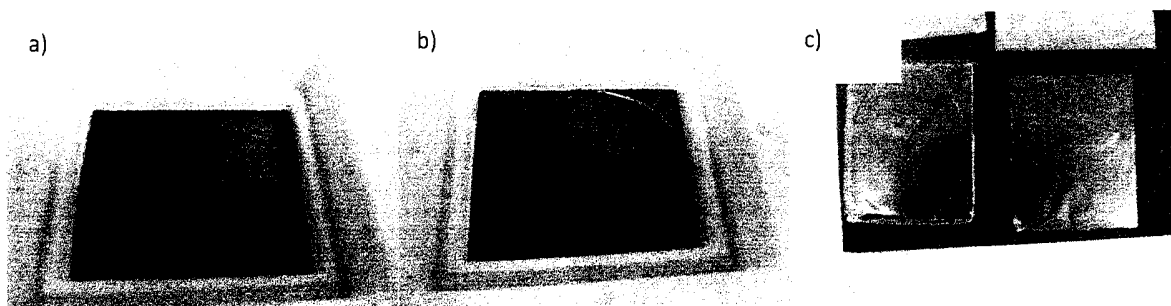
14. Způsob přípravy filmu podle nároku 12 nebo nároku 13, **vyznačující se tím, že** se roztok v teplotním gradientu suší po dobu 6 až 12 hodin, s výhodou 6 hodin.

15. Způsob přípravy filmu podle kteréhokoliv z nároků 8 až 14, **vyznačující se tím**, že se do roztoku vmíchá biologicky aktivní látka vybraná ze skupiny zahrnující farmaceuticky a kosmeticky aktivní látky, s výhodou vitamíny, léčiva jako cytostatika, steroidy, dále fytoextrakty, fytokomplexy nebo fytoaktivní látky.
16. Způsob přípravy filmu podle kteréhokoliv z nároků 8 až 15, **vyznačující se tím**, že podložkou je polymer vybraný ze skupiny obsahující polymery vybrané ze skupiny obsahující polyvinylalkohol, polypropylen, polyethylen, polyoxymetylen nebo polystyren, sklo nebo hydrofobizované sklo, přičemž kontaktní úhel smáčení povrchu podložky demi vodou je v rozsahu 30° až 120° , s výhodou 50° až 70° .
17. Film podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 pro použití v medicínských aplikacích nebo biotechnologických aplikacích.
18. Film podle kteréhokoliv z nároků 17 pro použití ke konstrukci zdravotnického prostředku, s výhodou antiadhezní bariéry.

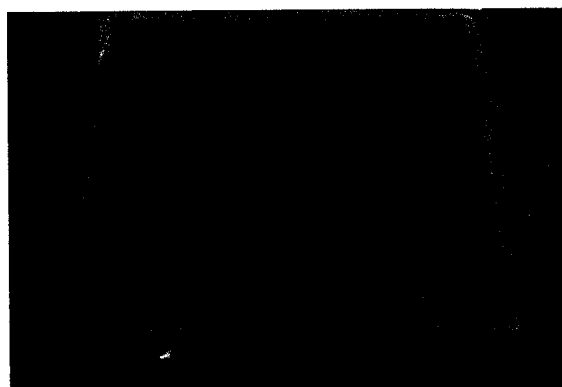
7V.515-166

EMMA OP

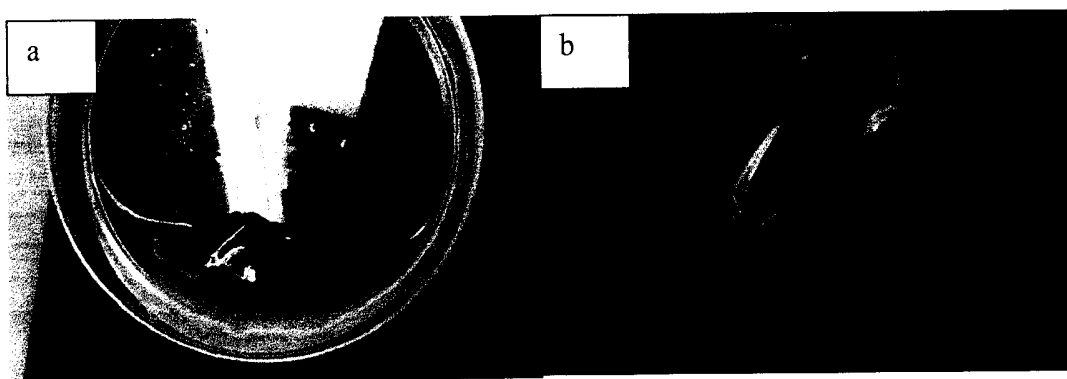
1/3



Obr. 1

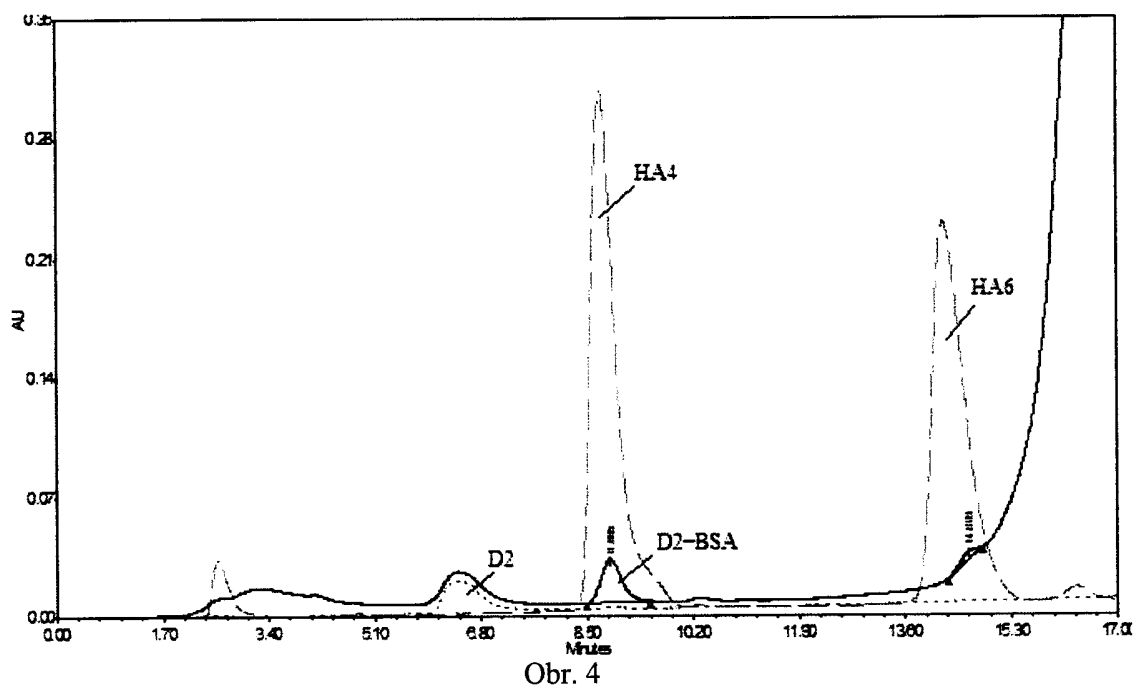


Obr. 2

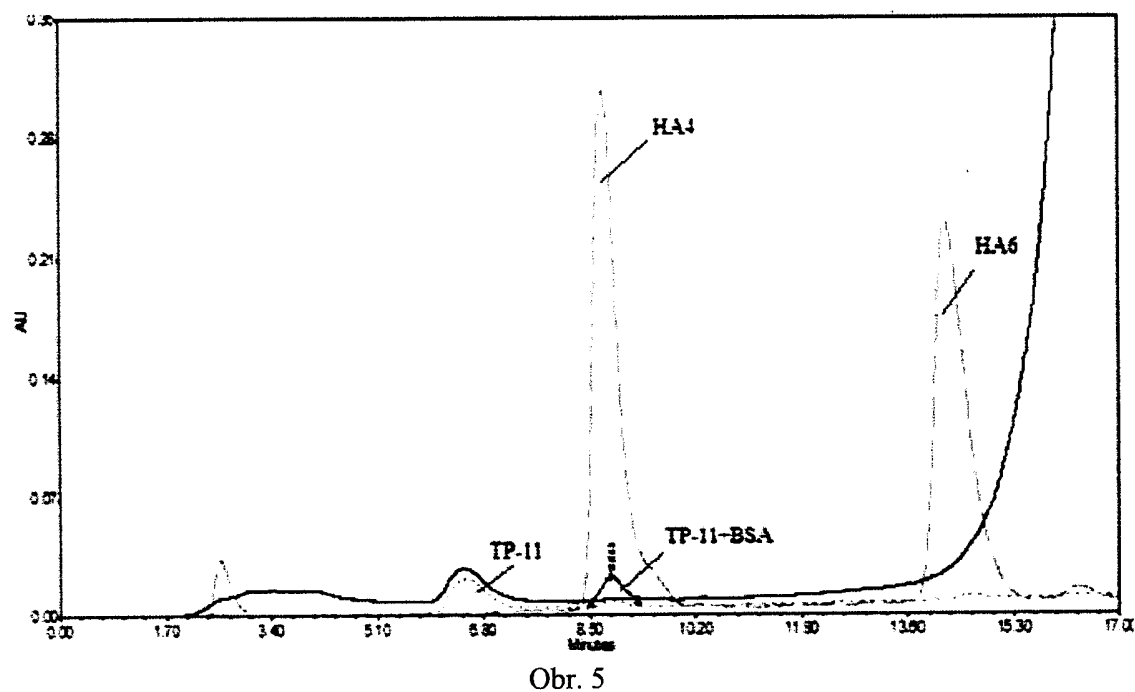


Obr. 3

215



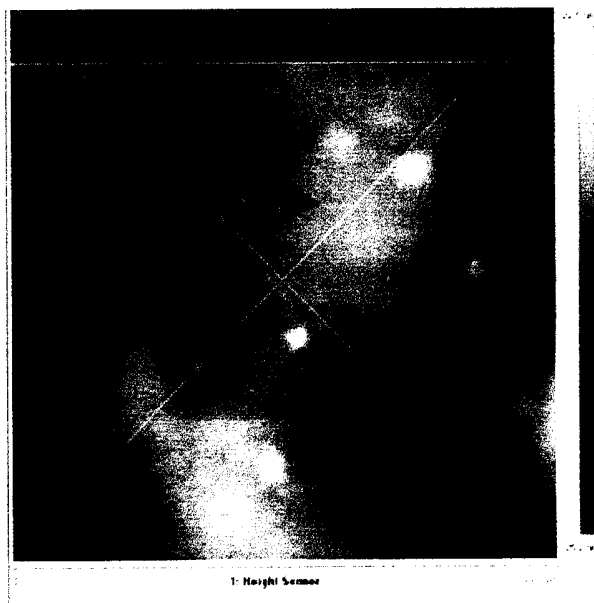
Obr. 4



Obr. 5

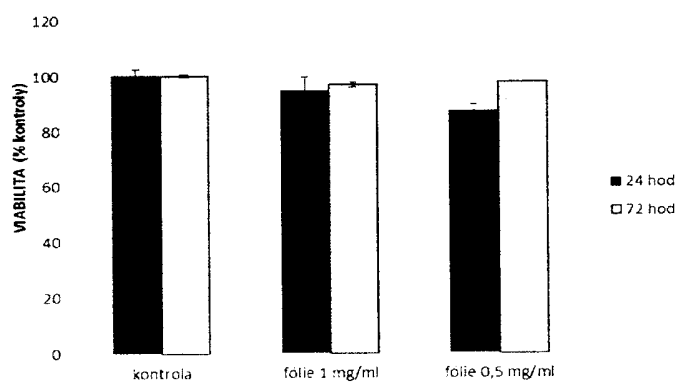
1/5

E 119108



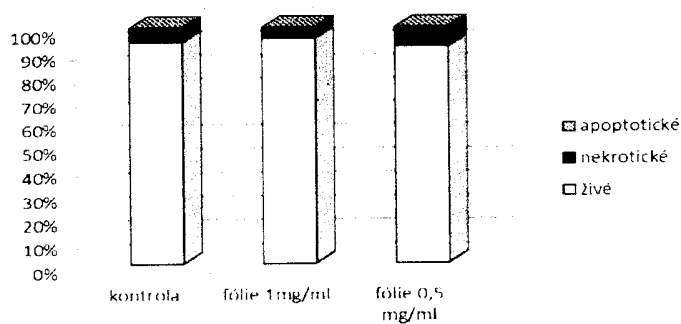
Obr. 6

Viabilita THP-1 po inkubaci s folií



Obr. 7

indukce buněčné smrti po 24hod inkubaci

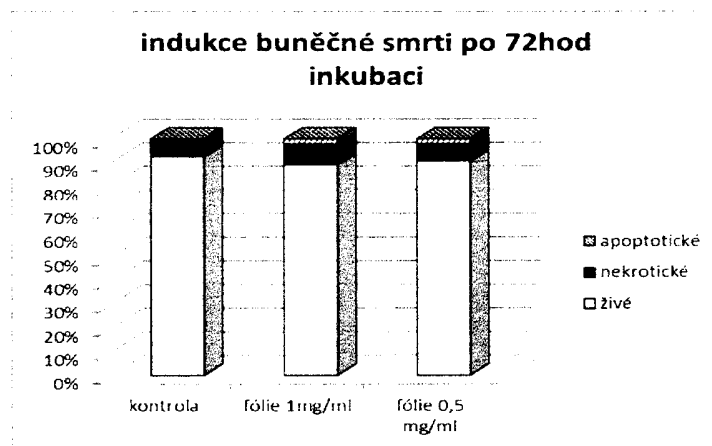


Obr. 8

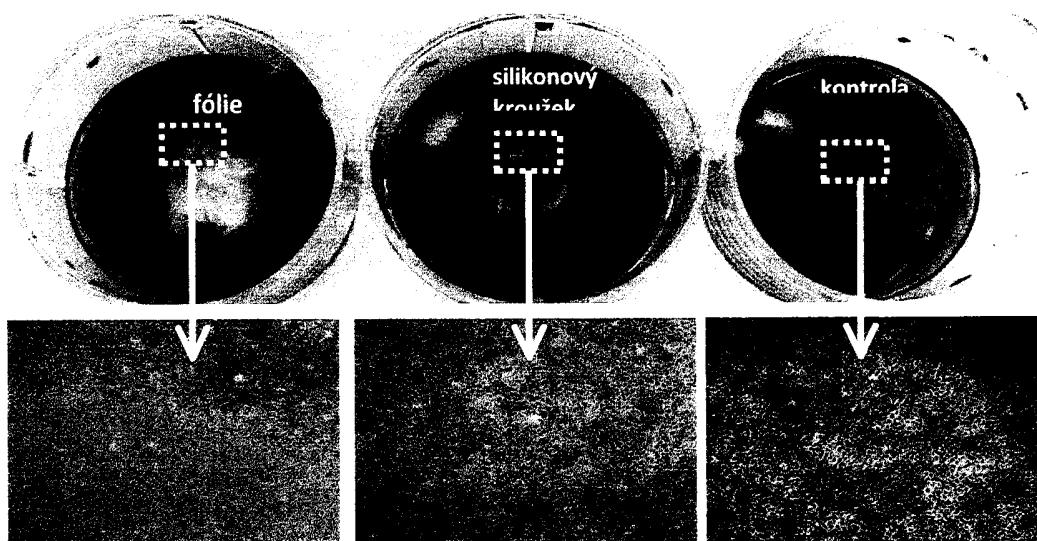
7. 2015 - 152

EX19108

4/5



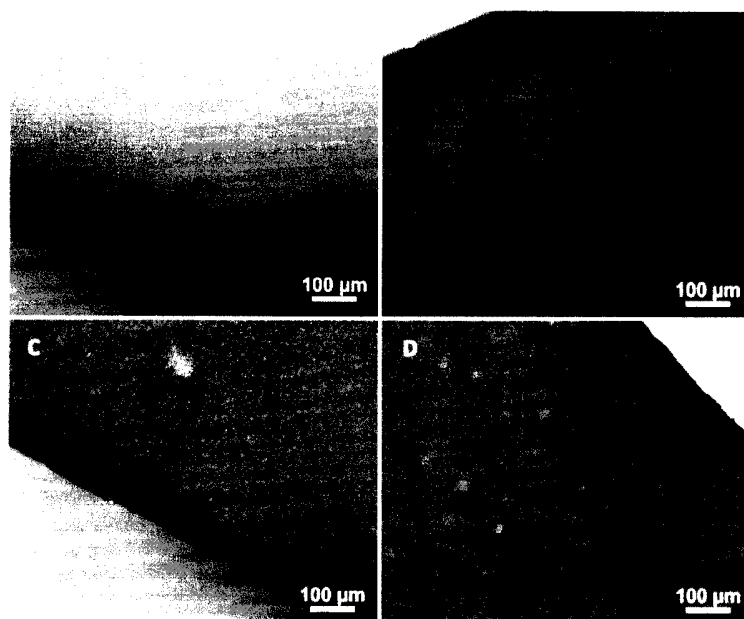
Obr. 9



Obr. 10

575

2.104108



Obr. 11