

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



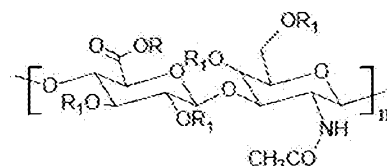
ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2015-166
(22) Přihlášeno: 09.03.2015
(40) Zveřejněno: 21.09.2016
(Věstník č. 38/2016)
(47) Uděleno: 29.06.2022
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 10.08.2022
(Věstník č. 32/2022)

C08B 37/08 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
C08J 5/18 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 2004/087234 A; WO 95/07085 A; WO 97/28828 A; WO 2005/028632 A.

(73) Majitel patentu:
Contipro a.s., 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., Lípa, CZ
Ing. Josef Chmelař, Vsetín, CZ
Ing. Romana Šuláková, Ph.D., Ústí nad Orlicí, CZ
Ing. Sergej Karel, Ústí nad Orlicí, CZ
doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc., Žamberk, CZ
(74) Zástupce:
KANIA*SEDLÁK*SMOLA
Patentová a známková kancelář, Mgr. Martina
Dvořáková, Mendlovo nám. 1a, 603 00 Brno



(54) Název 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 9 až 21 a y je celé číslo v rozmezí 19 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 250 až 1000; způsobu jeho přípravy a použití.

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

5 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.

10

Dosavadní stav techniky

15 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*-acethyl-glukosaminem.

Jedná se o látku, která se přirozeně nachází v organismu, kde je součástí extracelulární matrix, plní
20 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
25 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 povětšinou ve směsi vody a organického rozpouštědla (dle stupně substituce hydrofobním řetězcem v kombinaci s molekulovou hmotností).

30 Mezinárodní patentová přihláška WO 2014082609 (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.

35

Jednou se zajímavých aplikačních forem hydrofobizovaného hyaluronanu je příprava tenkých filmů pro externí či interní využití. Filmy, které jsou použitelné v medicínských aplikacích, jsou
40 známy, např. Seprafilm byl použit k prevenci srůstu při opakování laparotomie. Seprafilm je průhledná adhezni bariéra složená ze dvou anionických polysacharidů, HA a karboxymethylcelulózy, 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
45 zesítěného hyaluronanu, příp. hyaluronanu ve směsi s dalším polymerem (Becker, Dayton et al. 1996, Beck 2008). Vrstva hyaluronanu byla použita i v patentovém dokumentu CN 202822230, kde se však nejedná o samonosný film a navíc je uveden pouze nativní hyaluronan. Nativní hyaluronan spolu s lecitinem přidáním ke zvýšení hydrofobicity byl popsán v článku (Białopiotrowicz et al., 2006). Dalším filmem, použitým pro přípravu mimo jiné i antiadhezni
50 bariéry, je film epoxidového derivátu hyaluronanu, který je připraven srážením v organickém rozpouštědle (EP 2644623).

Filmy dle US přihlášky vynálezu 20100092545 jsou připraveny z ve vodě rozpustných, či
55 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 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 zabraňují. 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 US 20100092545 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. Preferenci autorů, vzhledem k aplikaci je, aby se filmy ve vodném prostředí rozpustily.

Patentový dokument JP 06025306 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 – v 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 biomedicinských 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 US 20120088832 je popisována příprava porézního filmu na bázi hyaluronanu a alginátu, přičemž film by měl být využit v medicíně zejména jako antiadhezni přípravek. Jedná se o zesítenou interpenetrující síť porézního charakteru. V příkladech tohoto dokumentu není zmíněno nic o bobtnavosti, biodegradaci, rozpustnosti filmu a není uvedeno stanovení zbytkových rozpouštědel.

K přípravě filmů v patentovém dokumentu EP 0216453 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 dimethylsulfoxidu (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 US 20040192643 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 až 100 % všech karboxylových skupin HA. Postup přípravy filmu v podstatě odpovídá již zmiňovanému postupu uvedenému v EP 216453 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 EP 0216453 ani v US 20040192643 není zde zmínka o mechanických, fyzikálních ani biologických vlastnostech filmů.

Patentový dokument WO 2010137374 popisuje samonosnou polymerní permeabilní membránu

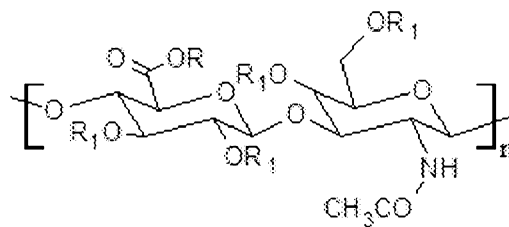
zahrnující blokový kopolymer, ve kterém jsou vzájemně kovalentně spojeny hydrofilní polymerní a hydrofobní polymerní složky, přičemž hydrofilní polymerní složka vytváří kolmo orientované válcovité struktury a hydrofobní polymerní složka je zesíťovatelná. Membrána je tedy tvořena kovalentně zesíťovaným 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 fotozesíťování hydrofobní polymerní složky blokového kopolymeru a následně je třeba „sacrificing layer“ ze vzniklé membrány odstranit rozpouštěním 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, bobtnavost a biodegradabilitu filmu, což je při aplikaci ve zdravotnických prostředcích žádoucí. Vzhled filmu a jeho mechanické vlastnosti mohou být ovlivněny opakovaným stykem s rozpouštědlem v případě postupu dle patentu EP 0216453 či US 20040192643 (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 C_{10} – C_{22} -acylovaný derivát kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I)



(I),

kde R je H^+ nebo Na^+ , a kde R^1 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 19 až 43 a C_xH_y je lineární nebo rozvětvený, nasycený nebo nenasyčený řetězec C_9 – C_{21} , přičemž alespoň v jedné opakující se jednotce jeden nebo více R^1 je tvořen $-C(=O)C_xH_y$ 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 řešení 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 řešení, tedy v podstatě fyzikálně sitěný 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 zesíťené formy, která je po nabobtnání 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 řešení 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 řešení 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 alifatická 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 řešení 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 řešení 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 až 5000 MPa.

V případě suchých, nehydratovaných filmů dle tohoto řešení 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 řešení 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 řešení 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 bobtnavost 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 sušicího 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 řešení 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 řešení velmi jednoduchý a spočívá v rozpuštění hydrofobizovaného hyaluronanu (jakékoliv popsané molekulové hmotnosti a jakémkoliv popsaném 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 řešení je tedy velmi levný a jednoduchý. Důležité také je, že povrch filmu podle řešení je na ploše, kterou přiléhá 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 řešení týká způsobu přípravy filmu, který spočívá v tom, že se připraví roztok obsahující C₁₀-C₂₂-acylovaný derivát kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I) výše ve směsi vody a C₁-C₆ 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 řešení je v roztoku množství C₁₀-C₂₂-acylovaného derivátu kyseliny hyaluronové v rozsahu 0,5 až 3 hmotn. %, obsah C₁-C₆ 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 řešení se roztok míchá po dobu 20 až 72 hodin, s výhodou 20 až 48 hodin.

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

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

- 5 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.
- 10 Podle ještě dalšího výhodného provedení způsobu podle řešení je podložkou polymer vybraný ze skupiny obsahující polyvinylalkohol, polypropylen, polyethylen, polyoxymethylen nebo polystyren. Dále pak je podložkou 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°.
- 15 Výhodou výše popsaného způsobu podle řešení 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.
- 20 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.
- 25 Dobrá smáčivost povrchu podložky roztokem polymeru je prvním stádiem adheze. Adhezi sušícího se a suchého filmu podle řešení 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 smrštěn. S výhodou se jako podložky použijí hydrofobizovaná skla.
- 30
- 35 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.
- 40
- 45 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 nadávkovaného 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 řešení je to, že je ve vodném prostředí nerozpustný a je tvořen jen samotným modifikovaným hyaluronanem bez nutnosti přidavku síťovacích činidel a dalšího zpracování.
- 50
- 55 Film podle řešení se může 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 fólie z nich připravená jsou degradovatelné *in vitro*.

Bobtnavost filmu, příp. jeho rozpustnost je řízena také použitou molekulovou hmotností derivátu a stupněm substituce hyaluronového řetězce C₁₀-C₂₂ alkylem.

Důležité je, že oproti derivátům popsaným v patentových spisech dle stávajícího stavu techniky, film podle řešení obsahuje pouze C₁₀-C₂₂ – acylovaný derivát kyseliny hyaluronové, který má zachovány veškeré karboxylové skupiny kyseliny glukuronové, což jsou skupiny odpovědné za biologické vlastnosti hyaluronanu.

Dalším aspektem řešení 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 smršťení.

Podle ještě dalšího provedení se film podle řešení, jak je definovaný výše, použije v medicínských aplikacích, biotechnologických aplikacích nebo jako podklad pro depozici aktivních komponent ke konstrukci zdravotnického prostředku, jako jsou například antiadhezni 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 C₁₀-C₂₂ acylů připojených na 100 dimerů hyaluronanu. Např. stupeň substituce 2 % znamená, že 2 z každých 100 dimerů hyaluronanu je substituováno C₁₀-C₂₂ acily. Při substituci je atom vodíku z primární hydroxylové skupiny *N*-acetyl-glukosaminu nebo ze sekundárních OH skupin kyseliny glukuronové nahrazen C₁₀-C₂₂ acylem.

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

Termín „plocha filmu“ znamená obsah filmu vypočtený z jeho rozměrů (v m²).

Termín „zdravotnický prostředek“ znamená pomůcku použitou samostatně nebo v kombinaci s jakýmkoliv příslušenstvím ke specifickému použití pro diagnostické nebo léčebné účely, například antiadhezni 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 (nádorová linie lidských monocytů) kondiciované médium, což je standardní RPMI médium (Roswell Park Memorial Institute 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.

Objasnění výkresů

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,

- 5 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 ($t_R = 8,9$ min), HA6 ($t_R = 14,6$ min),

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

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

- 20 obr. 7: viabilita suspenzních buněk THP-1 po 24 a 72 hod inkubace 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,

25

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,

30

obr. 11: buněčné antiadhezni 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

35

Příklady uskutečnění vynálezu

- 40 **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 ve 20 ml 55% roztoku isopropylalkoholu a nechána míchat min. 72 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na hydrofobizované sklo o hodnotě smáčivosti demi vodou $61^\circ (+/- 2^\circ)$ 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 fólie 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 %.

45

- 50 **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 ve 20 ml 55% roztoku isopropylalkoholu a nechána 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 6 hodin. Po usušení byla fólie zhodnocena,

55

sejmuta z hydrofobizovaného skla a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 µm.

Příklad 3 *Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného*

5

Navážka 100 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 55 % a molekulové hmotnosti $6,0 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna ve 20 ml 50% roztoku ethylakoholu a nechána míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na polyethylenovou podložku o hodnotě smáčivosti demi vodou 79° (+/- 4°) 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 µm.

10

Příklad 4 *Příprava filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného*

15

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

20

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

25

Navážka 100 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 35 % a molekulové hmotnosti $0,83 \times 10^5$ g/mol bylo rozpuštěno ve 20 ml 25 % roztoku ethylalkoholu a necháno míchat min. 20 hodin. Roztok byl po rozmíchání nadávkován na polystyrenovou podložku o hodnotě smáčivosti demi vodou 102° (+/- 4°) 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 µm.

30

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

35

Navážka 100 mg erukoyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 160 % a molekulové hmotnosti $2,04 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna ve 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° (+/- 2°) a usušen v uzavřeném prostoru odpařením rozpouštědla při teplotě 50 °C 3 hodin. Po usušení byla fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 µm.

40

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

45

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° (+/- 2°) 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně 15 µm.

50

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

55

Navážka 100 mg lauroyl derivátu hyaluronanu o stupni substituce 90 % a molekulové hmotnosti $1,88 \times 10^5$ g/mol byla rozpuštěna ve 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $15\text{ }\mu\text{m}$.

5

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

Navážka 100 mg oleyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 20 % a molekulové hmotnosti $2,8 \times 10^5\text{ g/mol}$ byla rozpuštěna ve 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $15\text{ }\mu\text{m}$.

15

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

Navážka 300 mg oleyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 17 % a molekulové hmotnosti $0,83 \times 10^5\text{ g/mol}$ byla rozpuštěna ve 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka fólie se pohybovala okolo $40\text{ }\mu\text{m}$.

25

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

Navážka 300 mg oleyl derivátu hyaluronanu sodného o stupni substituce 17 % a molekulové hmotnosti $0,83 \times 10^5\text{ g/mol}$ byla rozpuštěna ve 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka fólie se pohybovala okolo $40\text{ }\mu\text{m}$.

35

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 $2,50 \times 10^5\text{ g/mol}$ byla rozpuštěna v 20 ml 50% ethylalkoholu 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu se pohybovala okolo $15\text{ }\mu\text{m}$, sušina pak byla stanovena na hodnotu okolo 92 %. Bobtnavost takového filmu byla stanovena na více než 100 % (měřena změna plochy filmu) v rovnovážném stavu.

45

Příklad 13 *Příprava filmu na bázi behenoyl derivátu hyaluronanu sodného*

Navážka 100 mg behenoyl hyaluronanu o stupni substituce 7 % a molekulové hmotnosti $6,4 \times 10^5\text{ g/mol}$ byla rozpuštěna ve 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° ($\pm 2^{\circ}$) 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 fólie zhodnocena a sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka filmu byla stanovena na $15\text{ }\mu\text{m}$.

55

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 ve 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° ($\pm 2^\circ$) a usušen v uzavřeném prostoru, v teplotním gradientu při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C po dobu 7 hodin. Po usušení byla fólie zhodnocena a sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka filmu byla stanovena na $15\ \mu\text{m}$.

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 ve 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° ($\pm 2^\circ$) 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka fólie se pohybovala okolo $15\ \mu\text{m}$.

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 ve 20 ml 50% roztoku ethylalkoholu 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 fólie zhodnocena, sejmuta z podložky a charakterizována. Tloušťka takto připraveného filmu byla stanovena na přibližně $15\ \mu\text{m}$.

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 ve 20 ml 50% roztoku ethylalkoholu 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 fólie 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 ve 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 fólie 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 ve 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 fólie 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*

5 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 smáčivosti skel jsou uvedeny
 10 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°

15 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 až 5%	<80°

20 KÚ znamená kontaktní úhel

Příklad 21 *Stanovení rezidia hydrofobizačního činidla ve filmu připraveného dle příkladu 1*

25 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 až 15,0 µg/ml, s
5 přidávkem *n*-butanolu jako vnitřního standardu. V žádném z analyzovaných vzorků fólie 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
15 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
25 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.
35 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 cm². 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
45 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 cm² a celkovém počtu čtverců 35. Na každém čtverci byla změřena tloušťka fólie pomocí mechanického tloušťkoměru Mytutoyo VL-50. Měření bylo provedeno ve stabilním prostředí o vlhkosti 50% a teplotě 25 °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 μm, směrodatná odchylka – 1,17 μm, 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 bobtnavosti 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 fólií, 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 (%)
Film připravený dle příkladu 16	69
Film připravený dle příkladu 17	32
Film připravený dle příkladu 2	15

Příklad 28 Degradace fólií připravených z palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného v kondiciovaném 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 kondiciovaného 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. Kondiciované médium 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 kondiciovaném 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

5

Příklad 29 *Degradace filmu na bázi palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného*

Vzorky filmu připraveného dle příkladu 2 byly degradovány v 0,01M octanovém pufru s
přidavkem 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 hydrolýzy byla provedena i hydrolýza v přítomnosti BSA (40 mg na 5 mg fólie).
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 fólie 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 přidavkem 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 fólie). 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.

40

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 fólií 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
 5 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 krusta. 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 přídavkem 10% fetálního bovinního séra. Po dosažení dostatečné hustoty a viability (změřené automatickým počítadlem buněk CASY TT,
 20 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
 25 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 přídavkem 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
 35 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
 40 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%
 50 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
 55 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.

- 5 Makrofotografie (obr. 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 fólii prorůstat. Nebylo též pozorováno poškození ani změny v morfologii buněk na hranici testované fólie. Lze tedy předpokládat, že materiál nevykazuje kontaktní inhibici růstu buněk.

10 **Příklad 37** *Buněčné antiadhezní vlastnosti filmu*

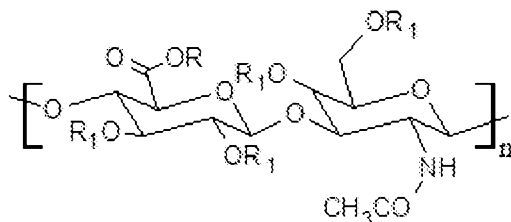
- Filmy připravené dle příkladů 2 a 17 (deriváty se dvěma různými stupni substituce) byly sterilně nastříhány na části o rozměrech 1 cm². Tyto části byly umístěny do 6jamkového kultivačního panelu lícem či rubem nahoru. Následně byly zatíženy sterilními silikonovými kroužky a na takto
 15 připravené vzorky bylo pipetováno kultivační médium (2 ml) 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
 20 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
 25 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.

30 **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
 35 stupni substituce 57% a molekulové hmotnosti 2,67x 10⁵ 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 fólie 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



(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 19 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 250 až 1000.

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 z předcházejících 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 z předcházejících 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 z předcházejících nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že povrchová hrubost vyjádřená ve formě střední kvadratické hodnoty 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 z předcházejících 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 C₁₀-C₂₂ acylovaný derivát kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce I ve směsi vody a C₁-C₆ alkoholu, s výhodou propan-2-olu, který se míchá, načež se nanese na podložku a suší se v uzavřeném prostoru, načež se sejme z podložky.

9. Způsob přípravy filmu podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že poměr směsi C₁-C₆ alkoholu, s výhodou propan-2-olu, a vody je v rozsahu 25 až 55 % obj. ku 45 až 75 % obj., přičemž množství C₁₀-C₂₂ acylovaného derivátu kyseliny hyaluronové v roztoku je v rozsahu 0,5 až 3 % hmotn.

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 spodní plocha filmu spočívající na podložce se 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 film v teplotním gradientu suší po dobu 6 až 12 hodin, s výhodou 6 hodin.

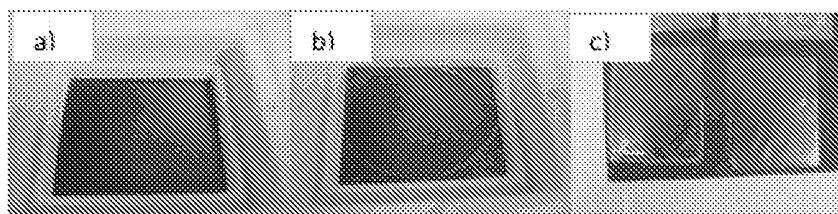
15. Způsob přípravy filmu podle kteréhokoliv z nároků 8 až 14, **vyznačující se tím**, že se do roztoku vmíchá biologicky aktivní látka vybraná ze skupiny zahrnující farmaceuticky a kosmeticky aktivní látky, s výhodou vitamíny, léčiva jako cytostatika, steroidy, dále fytoextrakty, fytokomplexy nebo fytoaktivní látky.

16. Způsob přípravy filmu podle kteréhokoliv z nároků 8 až 15, **vyznačující se tím**, že podložkou je polymer vybraný ze skupiny obsahující polyvinylalkohol, polypropylen, polyethylen, polyoxymetylen nebo polystyren, nebo hydrofobizované sklo, přičemž kontaktní úhel smáčení povrchu podložky demi vodou je v rozsahu 30° až 120°, s výhodou 50° až 70°.

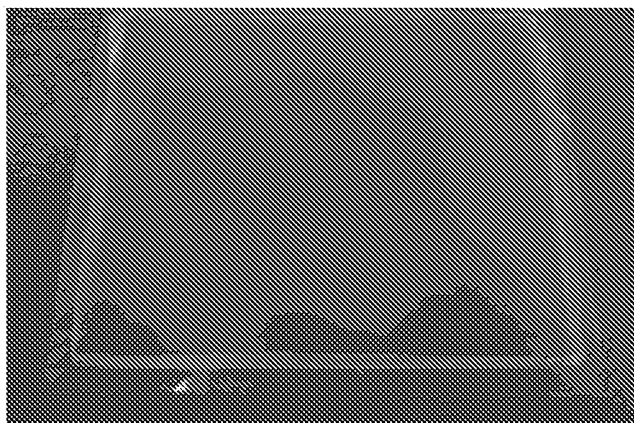
17. Použití filmu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, pro výrobu medicínských nebo biotechnologických výrobků.

18. Použití filmu podle nároku 17, pro výrobu zdravotnického prostředku, s výhodou antiadhezní bariéry.

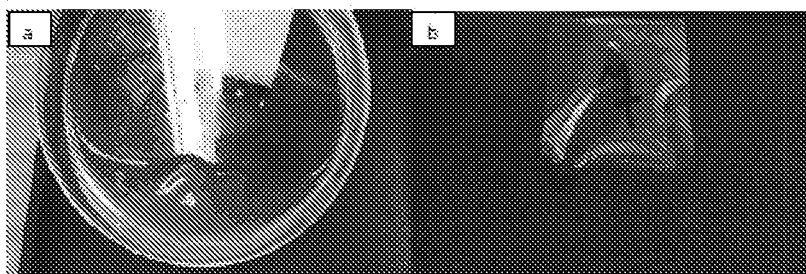
5 výkresů



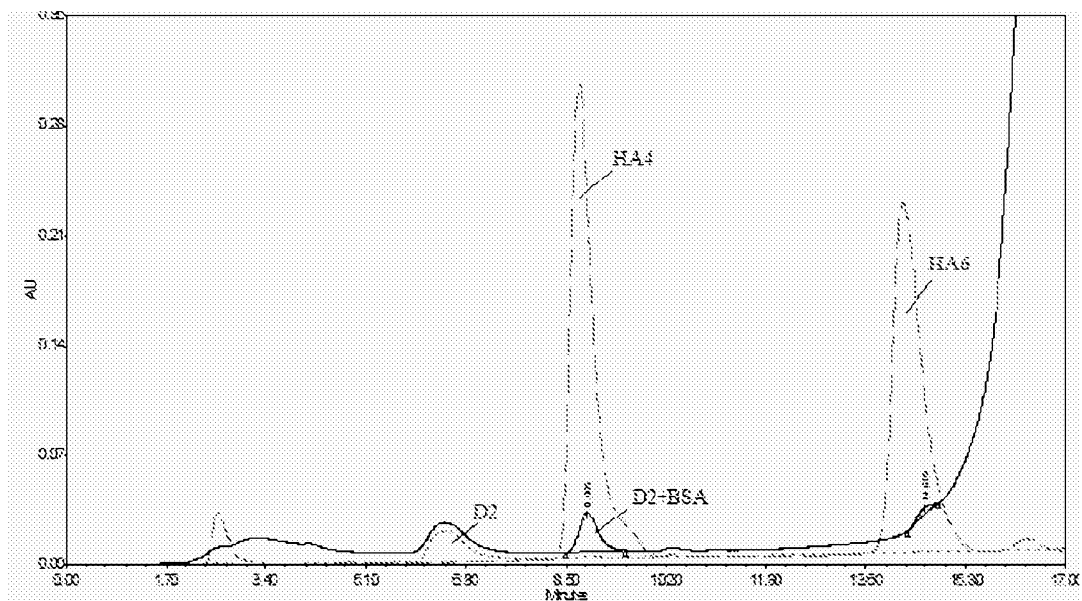
Obr. 1



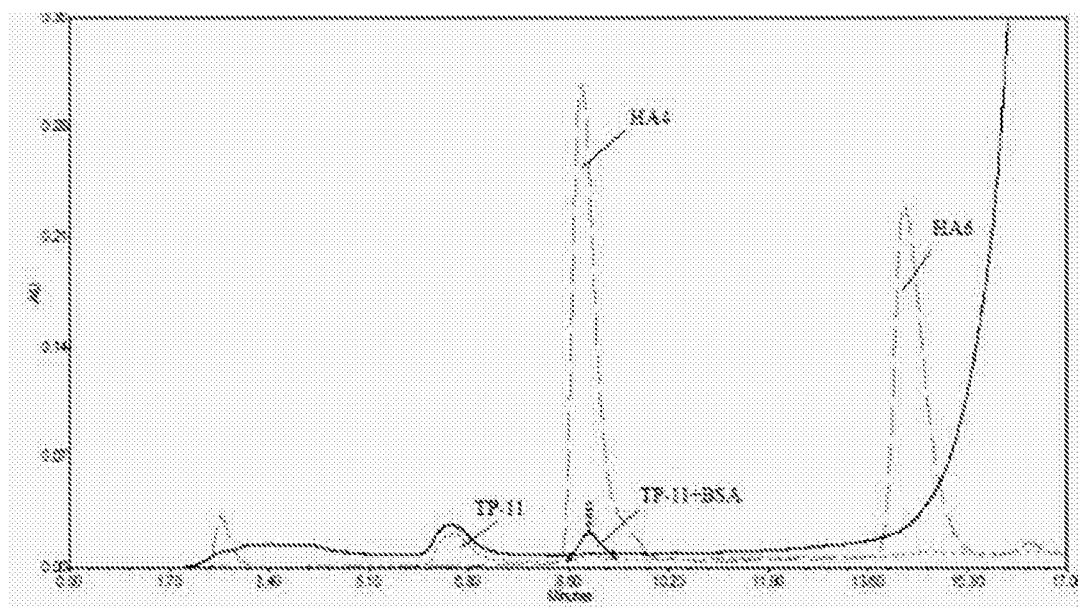
Obr. 2



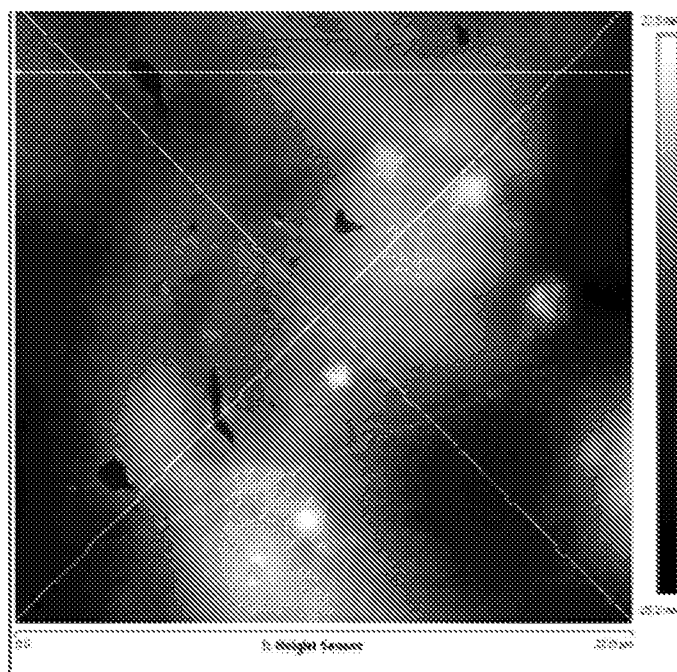
Obr. 3



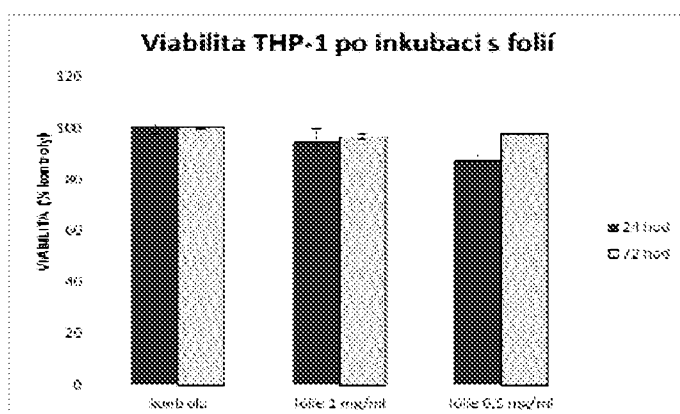
Obr. 4



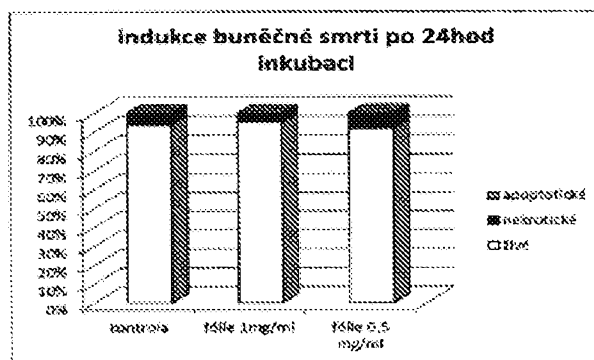
Obr. 5



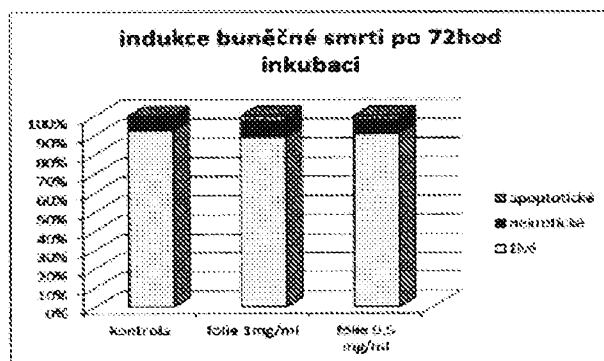
Obr. 6



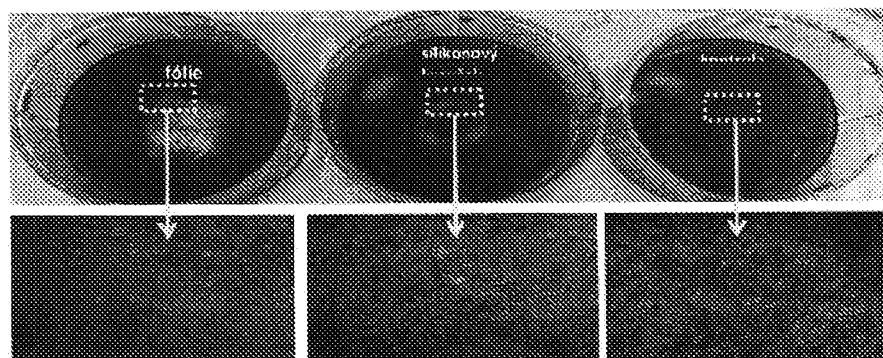
Obr. 7



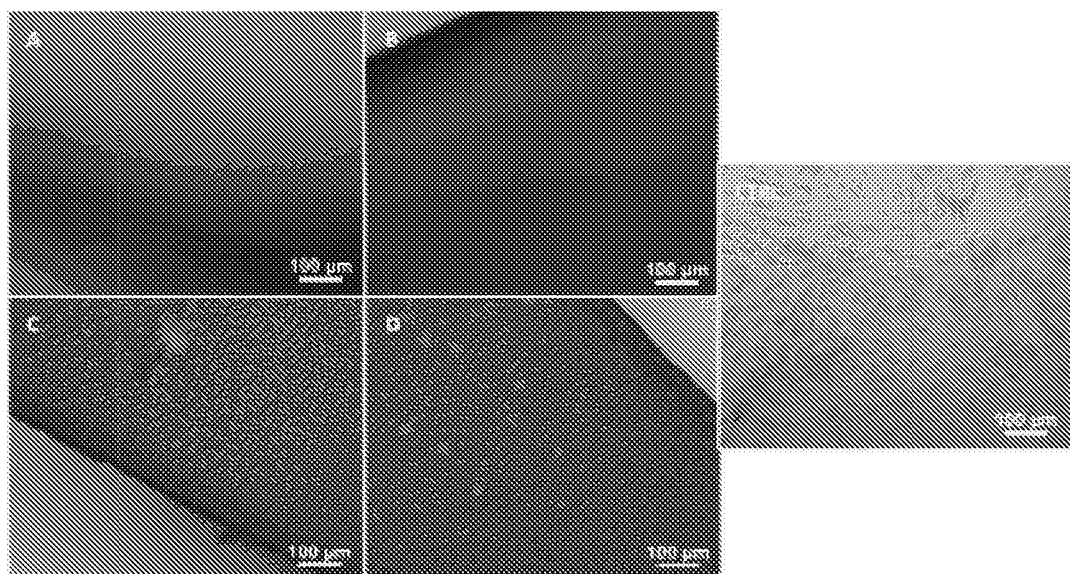
Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10



Obr. 11