

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238765**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430355**

(22) Data zgłoszenia: **24.06.2019**

(51) Int.Cl.

A61F 2/02 (2006.01)

B29C 49/00 (2006.01)

A61L 27/00 (2006.01)

(54)

Sposób wytwarzania protez naczyniowych małych średnic

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

28.12.2020 BUP 27/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

04.10.2021 WUP 27/21

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**TOMASZ CIACH, Warszawa, PL
BEATA BUTRUK-RASZEJA, Warszawa, PL
ALEKSANDRA KUŹMIŃSKA, Warszawa, PL
MICHAŁ WOJASIŃSKI, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Mirosława Ważyńska

PL 238765 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania wysoce biozgodnych, cylindrycznych protez naczyniowych o strukturze włóknistej i małej średnicy, w szczególności z celowo modyfikowaną powierzchnią wewnętrzną. Protezy są przeznaczone do stosowania w zabiegach pomostowania aortalno-wieńcowego, stosowanych w trakcie leczenia pacjentów cierpiących na chorobę niedokrwienną serca (ChNS).

Według WHO, ChNS jest główną przyczyną zgonów na świecie, powodując 15 milionów zgonów w 2015 r. Obecnie protezy naczyniowe są rzadko stosowane w leczeniu ChNS z powodu swojej niezadowalającej biostabilności i hemozgodności. Dostępność protez o małych (< 6 mm) średnicach wewnętrznych jest niska. Większość stosowanych obecnie protez ma średnicę wewnętrzną > 6 mm. Brak produktów o małej średnicy i zadowalającej biostabilności skutkuje niskim odsetkiem zabiegów pomostowania aortalno-wieńcowego z użyciem protez naczyniowych.

Niski udział protez naczyniowych małych średnic w ogólnym rynku protez wynika z trudności w wytwarzaniu takich protez, które charakteryzowałyby się równie dobrymi właściwościami, co powszechnie stosowane duże protezy naczyniowe, czyli odpowiednią porowatością, elastycznością, wytrzymałością, a przede wszystkim biostabilnością. Właściwości protez naczyniowych zależą przede wszystkim od rodzaju wykorzystanego materiału (zarówno syntetycznego, jak i biologicznego) oraz procesu produkcyjnego. Najczęściej stosowanymi materiałami, z których obecnie produkuje się protezy naczyniowe, są poliester oraz ePTFE. Wykazano jednak, że tworzywa stosowane do produkcji dużych protez naczyniowych nie sprawdzają się w przypadku protez o małej średnicy wewnętrznej, ponieważ wywołują niepożądane reakcje organizmu – krzepnięcie krwi oraz odczyn zapalny i brak integracji z otaczającymi tkankami. W związku z tym, konieczny jest rozwój technologii modyfikacji lub stosowania materiałów zastępczych.

Na rynku pojawiają się protezy, w których standardowo stosowany materiał (PET lub ePTFE) jest modyfikowany pokryciami zwiększającymi biozgodność lub antykoagulantami. W zdecydowanej większości są to rozwiązania oparte na tworzeniu powierzchni biopasywnych – ograniczających procesy adsorpcji białek i adhezji elementów krwi. Modyfikacje oparte są na wprowadzeniu na powierzchnię protezy heparyny [1–4], tlenku azotu [5], żelatyny [6], kolagenu [7], węgla [8] lub zastąpieniu materiału polimerowego szkieletem białkowym [9]. Nie są to rozwiązania idealne – wprowadzenie na powierzchnię protezy białek wiąże się z ryzykiem odpowiedzi immunologicznej, natomiast zastosowanie heparyny zaburza proces hemostazy i może zwiększyć ryzyko krwotoku [10,11].

Istotną cechą protez wpływającą na ich biozgodność jest obok struktury chemicznej powierzchni, ich morfologia. Należy zapewnić odpowiednie właściwości mechaniczne protezy (elastyczność przy jednoczesnej wytrzymałości) oraz porowatość umożliwiającą kolonizację komórkami. Struktura taka powinna być zróżnicowana – powierzchnia wewnętrzna powinna pozwolić na uzyskanie mono warstwy komórek, jednocześnie powierzchnia zewnętrzna powinna pozwolić na wnikanie komórek i ich rozwój wewnątrz warstwy zewnętrznej struktury protezy.

Aktualnie, najczęściej stosowaną metodą, pozwalającą na uzyskanie włóknistych protez jest metoda elektroprzędzenia (ang. *electrospinning*, ES). Znana jest proteza otrzymana z zastosowaniem techniki ES z polikaprolaktonu [12], mieszanki polikaprolaktonu i kolagenu [13]. Jest to proteza o zróżnicowanej porowatości warstw zewnętrznej i wewnętrznej, ale jej powierzchnia nie jest selektywna względem określonego typu komórek, a ponadto wprowadzenie białek stwarza ryzyko odpowiedzi immunologicznej. Podobne niedogodności wiążą się z protezą otrzymaną z zastosowaniem techniki ES z polikaprolaktonu, kolagenu i elastyny [7] oraz protezą otrzymaną z zastosowaniem techniki ES oraz techniki inwersji faz z poliuretanu [14].

Znana jest również technika rozdmuchu roztworu polimeru (ang. *solution blow spinning*, SBS) wykorzystywana do wytwarzania włókien o średnicach od kilku nanometrów do kilku mikrometrów. W technice tej wykorzystuje się siły lepkościowe, pochodzące od rozprężającego się i przyspieszającego gazu, rozciągające kroplę roztworu polimeru. Proces realizowany jest z wykorzystaniem układu koncentrycznych dysz. Do wewnętrznej dyszy podawany jest roztwór polimeru, a do zewnętrznej sprężony gaz. W wyniku rozprężenia się gazu na wylocie z układu dysz rośnie jego prędkość, co powoduje dynamiczne wydłużenie kropli roztworu polimeru do formy stożka. Gdy siły lepkościowe działające na stożek w wyniku przepływu powietrza wokół stożka pokonają siły napięcia powierzchniowego roztworu polimeru dochodzi do wytworzenia tzw. jetu roztworu polimeru wychodzącego z wierzchołka stożka. Jet

jest wyciągany do utworzenia włókna i porywany wraz z gazem. Dochodzi do odparowania rozpuszczalnika i wytworzone włókna zbierane są na powierzchni kolektora [15,16]. Odległość między układem dysz a kolektorem jest określana mianem odległości roboczej.

Celem wynalazku było opracowanie protezy naczyniowej o małej średnicy, charakteryzującej się strukturą warstwową o zróżnicowanej porowatości, wysoką biogodnością oraz selektywnością względem komórek śródbłonna i mięśni gładkich.

Sposób wytwarzania cylindrycznej protezy naczyniowej posiadającej co najmniej jedną warstwę porowatego polimeru przeznaczonego do wytwarzania protez naczyniowych, z wykorzystaniem metody rozdmuchu roztworu polimeru według wynalazku charakteryzuje się tym, że procesowi rozdmuchu poddaje się roztwór polimeru w rozpuszczalniku, o stężeniu w zakresie 2–8% w/w, przy czym rozdmuch polimeru prowadzi się z zastosowaniem kolektora cylindrycznego o średnicy niższej niż 6 mm, o szybkości obrotowej w zakresie od około 100 do około 15000 obr/min korzystnie około 10 000 obr/min. Odległość między układem dysz a kolektorem (odległość robocza) jest wartością z zakresu od 5 cm do 100 cm, przy czym:

- w przypadku, gdy pierwsza warstwa protezy jest warstwą o porowatości poniżej 30% stosuje się stałą wartość odległości roboczej z zakresu 5–14 cm,
- w przypadku, gdy pierwsza warstwa protezy jest warstwą porowatą o stałej porowatości o wartości co najmniej 30%, stosuje się stałą wartość odległości roboczej z zakresu 15–100 cm,
- w przypadku, gdy pierwsza warstwa protezy jest warstwą porowatą o zmiennej porowatości, o wartości co najmniej 30%, stosuje się zmienną odległość roboczą z zakresu 15–100 cm
- w przypadku, gdy proteza zawiera dwie lub więcej warstw porowate różniące się średnim rozmiarem włókien, drugą i kolejne warstwy wytwarza się z roztworu polimeru o stężeniu innym, niż warstwę pierwszą.

Korzystnie, w przypadku stosowania zmiennej odległości roboczej odległość tę zmienia się co 5 cm, w stałych odstępach czasu.

Proces według wynalazku prowadzi się przy stałym ciśnieniu gazu roboczego w trakcie wytwarzania włókien. Ogólnie, stosowane są ciśnienia gazu roboczego na wlocie do układu koncentrycznych dysz wynoszące od $0,1 \times 10^5$ do 3×10^5 Pa. Korzystnie proces otrzymywania struktur polimerowych do zastosowania jako protezy naczyń krwionośnych prowadzi się przy ciśnieniu gazu roboczego w zakresie od $0,5 \times 10^5$ do 2×10^5 Pa, a bardziej korzystnie w zakresie od 1×10^5 do 2×10^5 Pa.

Gazem roboczym w sposobie według wynalazku może być powietrze, azot, argon, dwutlenek węgla, a korzystnie powietrze.

Jako rozpuszczalnik stosuje się lotny rozpuszczalnik organiczny zdolny do rozpuszczenia polimeru i wyprostowania jego łańcuchów, co pozwala na uzyskanie odpowiednich właściwości reologicznych do procesów włóknotwórczych. Taki rozpuszczalnik jest również określany dobrym rozpuszczalnikiem dla danego polimeru. Rozpuszczalniki dobre dla danego polimeru zostały opisane przykładowo w publikacji [17]. Specjalista w dziedzinie wynalazku bez trudu dobierze odpowiedni rozpuszczalnik dla danego polimeru.

Rozpuszczalnik polimeru jest zależny od rodzaju polimeru. Korzystnie stosuje się: aceton, chloroform, tetrahydrofuran, toluen, dimetyloformamid, dimetyloacetamid, cykloheksan, dimetylosulfotlenek, 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-ol, 2,2,2-trifluoroetanol, alkohole, wodę, kwas mrówkowy, kwas octowy lub ich mieszaniny. W przypadku polimerów syntetycznych bardziej korzystnie stosuje się aceton, chloroform, tetrahydrofuran, 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-ol, 2,2,2-trifluoroetanol lub ich mieszaniny. W przypadku polimerów rozpuszczalnych w wodzie, korzystnie stosuje się wodę jako dobry rozpuszczalnik dla polimeru.

Proces według wynalazku prowadzi się przy stałym natężeniu przepływu roztworu polimeru w trakcie wytwarzania włókien. Ogólnie, stosowane są natężenia przepływu na wlocie do układu koncentrycznych dysz wynoszące od 0,1 do 100 ml/h. Korzystnie proces prowadzi się przy natężeniu przepływu roztworu polimeru w zakresie od 1 do 50 ml/h, a bardziej korzystnie w zakresie od 10 do 50 ml/h.

Korzystnie jako polimer stosuje się: poliuretan (PU), poli(kwas glikolowy) (PGA), poli(kwas mlekowy) (PLA), kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA), poli(kaprolakton) (PCL), kopolimer PLA i PCL (PLCL), poli(tlenek etylenu) (PEO), poli(alkohol winylowy) (PVA), poli(tereftalan etylenu) (PET), kolagen, elastyna, chitozan oraz ich mieszaniny i kopolimery.

Korzystnie, procesowi rozdmuchu poddaje się roztwór poliuretanu zawierającego wiązania węglanowe -OCOO- (PCU) w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP), w stężeniu w zakresie 2–8% w/w.

Średnia średnica włókien jest uzależniona od stężenia polimeru, przy czym konkretne zależności są związane z rodzajem polimeru. Przykładowo, w przypadku poliuretanu węglanowego ChronoFlex C dla stężenia z zakresu 2–3% w/w otrzymuje się włókna o średniej średnicy około 250 nm, dla stężenia polimeru z zakresu 4–5% w/w otrzymuje się włókno o średniej średnicy od 500 do 600 nm, a dla stężenia polimeru z zakresu 5–5.5% w/w otrzymuje się włókno o średniej średnicy od 800 do 1000 nm. Dla innych polimerów zależności te mogą się nieco różnić i powinny być wyznaczone doświadczalnie.

Porowatość ogólna włókniny tworzącej protezę według wynalazku jest zależna od stopnia upakowania włókien. Siły upakowujące włókna są wyższe dla niskich odległości roboczych. Stosowanie bardzo niskich odległości roboczych – poniżej 15 cm – skutkuje niecałkowitym odparowaniem rozpuszczalnika w procesie rozdmuchu roztworu polimeru. Dzięki temu na powierzchni kolektora powstaje warstwa folii o porowatości poniżej 30%. Taką warstwę można traktować jak podstawową warstwę dla protez dwu- i wielowarstwowych.

Otrzymanie gradientu porowatości w strukturze włóknistej jest możliwe dzięki zmianom odległości roboczej w układzie rozdmuchu roztworu polimeru. Niskie odległości robocze skutkują niską porowatością, a zwiększanie odległości roboczej powoduje wzrost porowatości otrzymywanych materiałów nawet do 95–98%. Stąd możliwe jest uzyskanie gradientów porowatości dla struktur cylindrycznych jedno-, dwu- i wielowarstwowych.

Stosowana zgodnie z wynalazkiem szybkość obrotowa kolektora urządzenia do SBS pozwala na otrzymanie włókien o uporządkowanej strukturze. Stosowanie ukierunkowanych włókien pozytywnie wpływa na adhezję, wzrost i proliferację komórek mięśniowych na strukturach włóknistych. Tak otrzymane włókna budują głównie zewnętrzną warstwę protezy cylindrycznej.

Protezy jednowarstwowe, zawierające jedną warstwę porowatą o zmiennej porowatości, otrzymywane są poprzez wykorzystanie zmian odległości roboczej w procesie rozdmuchu roztworu polimeru w zakresie od 15 cm do 100 cm, co skutkuje zmianą porowatości otrzymywanych struktur od około 60% przy powierzchni wewnętrznej do około 90% przy powierzchni zewnętrznej. Struktura taka zbudowana jest z włókien o jednej średniej średnicy oraz średnim rozmiarze porów, a zmianie ulega tylko porowatość takiej struktury.

Protezy dwuwarstwowe zawierające warstwę nieporowatą oraz warstwę porowatą o zmiennej porowatości otrzymywane są również z jednego roztworu polimeru, co skutkuje stałą średnią średnicą włókien oraz stałym średnim rozmiarem porów. Natomiast zmiany odległości roboczej w układzie do rozdmuchu roztworu polimeru zaczynają się od 5–10 cm, dzięki czemu w pierwszym etapie procesu tworzy się warstwa folii. Następnie, odległość robocza jest zwiększana analogicznie do procesu otrzymywania struktury jednowarstwowej.

Protezy wielowarstwowe zawierające warstwę nieporowatą oraz warstwy porowate różniące się średnią średnicą włókien cechują się strukturą podobną do protez dwuwarstwowych z tą różnicą, że na powierzchni folii umieszczana jest warstwa włókien o średniej średnicy około 250 nm i niskim rozmiarze porów, a następnie na takiej strukturze nabudowywane są włókna o średniej średnicy 500 do 600 nm lub 800 do 1000 nm, w sposób analogiczny do otrzymywania struktury jednowarstwowej, z zachowaniem gradientu porowatości.

Korzystnie protezy otrzymane sposobem według wynalazku mają grubość ściany w zakresie od 200 do 400 mikrometrów, bardziej korzystnie w zakresie od 250 do 350 mikrometrów.

Odpowiedni dobór parametrów procesowych, czyli odległości roboczej oraz stężenia polimeru, umożliwia otrzymanie różnych wariantów szkieletu protezy, takich jak np.:

- proteza jednowarstwowa zawierająca jedną warstwę porowatą o stałej porowatości,
- proteza jednowarstwowa zawierająca jedną warstwę porowatą o zmiennej porowatości,
- proteza dwuwarstwowa zawierająca warstwę nieporowatą oraz warstwę porowatą o stałej porowatości,
- proteza dwuwarstwowa zawierająca warstwę nieporowatą oraz warstwę porowatą o zmiennej porowatości,
- proteza dwu- lub wielowarstwowa zawierająca warstwy porowate różniące się średnim rozmiarem włókien.

Protezy naczyniowe otrzymane sposobem według wynalazku można następnie poddać modyfikacji przez wprowadzenie na wewnętrzną powierzchnię protezy związków łącznikowych zawierających grupy funkcyjne COOH, do których następnie przyłącza się oligopeptyd zbudowany z co najwyżej 20 aminokwasów, zawierający sekwencje rozpoznawalne przez receptory błonowe komórek śródbłónka, takie jak: REDV, IKVAV, CAG, YIGSR, RGD.

Jeżeli związek łącznikowy nie zawiera grup COOH możliwe jest zastosowanie związku łącznikowego zawierającego grupy funkcyjne NH_2 lub OH, które następnie przekształca się w grupy COOH.

Korzystnie związkiem łącznikowym jest silan lub nienasycony kwas karboksylowy.

Modyfikację protezy przeprowadza się w układzie przepływowym, dzięki czemu modyfikacji podlega wewnętrzna powierzchnia protezy, która kontaktuje się z roztworem modyfikującym przepływającym przez układ. Modyfikacja przebiega w dwóch etapach: (1) przyłączanie związku łącznikowego (linkera) oraz (2) przyłączanie związku bioaktywnego (biomolekuły).

Związek bioaktywny przyłączany do powierzchni wewnętrznej protezy odpowiada za nadanie powierzchni cech selektywności względem komórek śródbłónka. Dołączane peptydy promują adhezję komórek śródbłónka, co w konsekwencji prowadzi do utworzenia monowarstwy na wewnętrznej powierzchni protezy i ogranicza proces adhezji innych typów komórek do wewnętrznej powierzchni protezy. Takie cechy powierzchni gwarantują jej wysoką bio- i hemozgodność.

Biomolekuła przyłączana jest do linkera za pomocą obecnych w jej strukturze terminalnych grup funkcyjnych NH_2 lub COOH. Grupy te reagują z grupami NH_2 lub COOH obecnymi w związku łącznikowym. Korzystnie wiązanie pomiędzy polimerem bazowym i linkerem oraz linkerem i biomolekułą jest wiązaniem chemicznym kowalencyjnym. Środowisko reakcji (pH) promuje udział w tworzonego wiązaniu terminalnych grup funkcyjnych obecnych w cząsteczce biomolekuły.

Proces modyfikacji może być przeprowadzony kilkoma sposobami. Jednym z nich jest metoda z użyciem silanów, która polega na użyciu jako związku modyfikującego wysoce reaktywnego silanu, korzystnie fluorowcowego związku krzemu, w bezwodnym rozpuszczalniku organicznym [18]. Związek modyfikujący reaguje z atomem wodoru obecnym w polimerze bazowym użytym do produkcji szkieletu protezy. Związek modyfikujący stosuje się w stężeniu z zakresu 0,1–10% wag., korzystnie 0,5–5% wag. Reakcję prowadzi się przez 1–15 minut, korzystnie 2–10 minut. Następnie materiały płucze się w bezwodnym rozpuszczalniku i pozostawia się do całkowitego odparowania stosowanego rozpuszczalnika, po czym prowadzi się proces hydrolizy, prowadzący do utworzenia grup silanolowych na powierzchni protezy. Na wstępnie zmodyfikowaną protezę działa się następnie roztworem silanu, będącym właściwym związkiem łącznikowym. Jest to związek posiadający wolne grupy karboksylowe zlokalizowane na jednym końcu łańcucha węglowodorowego oraz grupy silanolowe zlokalizowane na przeciwnym końcu łańcucha. Na tym etapie dochodzi do kondensacji grup silanolowych obecnych na cząsteczce łącznikowej oraz grup silanolowych obecnych na powierzchni protezy. Stosuje się stężenia 0,5–10% roztworu modyfikującego, korzystnie 1–5%. Reakcję prowadzi się przez 1–150 minut. Następnie materiały płucze się i suszy.

Efektem tego etapu jest wprowadzenie na powierzchnię wewnętrzną protezy silanowego związku łącznikowego zakończonego grupą COOH. Możliwe jest również wprowadzenie związku łącznikowego posiadającego grupę NH_2 na końcu łańcucha węglowodorowego. W takim przypadku należy przeprowadzić dodatkowy etap – etap karboksylacji, polegający na przekształceniu terminalnej grupy aminowej w grupę karboksylową. Proces karboksylacji prowadzi się przy użyciu roztworu zawierającego bezwodnik oraz aminę. Schemat opisanego powyżej procesu modyfikacji przedstawiono na Fig. 2.

Druga metoda modyfikacji powierzchni wewnętrznej protezy to metoda z użyciem nienasyconych kwasów karboksylowych [19]. Protezę zanurza się w kwaśnym wodnym roztworze. Następnie dodaje się związek wytwarzający wolne rodniki na powierzchni protezy, korzystnie sól nieorganiczną zawierającą czterowartościowy cer np. dihydrat siarczanu amonu i ceru (IV) oraz kwas karboksylowy. Reakcję prowadzi się przez 30–120 minut. Następnie materiały płucze się i suszy. Schemat opisanego powyżej procesu modyfikacji przedstawiono na Fig. 3.

Obie opisane powyżej metody prowadzą do wprowadzenia na wewnętrzną powierzchnię protezy cząsteczek łącznikowych zakończonych grupami karboksylowymi. Niezależnie od metody oraz rodzaju wprowadzonej cząsteczki, w kolejnym etapie procesu modyfikacji przeprowadza się przyłączenie biomolekuły. Wiązanie biomolekuła – związek łącznikowy jest tworzone przez terminalną grupę karboksylową cząsteczki łącznikowej oraz terminalną grupę aminową obecną w cząsteczce biomolekuły. Proces realizuje się przy użyciu roztworu aktywującego grupy karboksylowe – buforowany roztwór sulfo-NHS (N-hydrosulsulfoimid kwasu bursztynowego, sól sodowa, CAS: 106627-54-7) oraz EDC (N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimid, CAS: 1892-57-5). Następnie proteza jest przemywana buforem i kontaktowana z roztworem peptydu. pH roztworu dobrane jest tak, aby zwiększyć reaktywność terminalnej grupy aminowej peptydu.

Proteza naczyniowa według wynalazku w wersji zmodyfikowanej łączy odpowiednie cechy morfologiczne protezy, takie jak rozmiar porów, zróżnicowanie struktury, ułożenie włókien, oraz działanie

bioaktywne (selektywne biomolekuły), co w konsekwencji pozwala na otrzymanie protezy wysoce biozgodnej.

Sposób według wynalazku pozwala na wytworzenie cylindrycznej struktury włóknistej, jednowarstwowej, dwuwarstwowej i/lub wielowarstwowej, o określonym ułożeniu włókien i średnicy włókien. Po poddaniu procesowi modyfikacji powierzchnia wewnętrzna protezy wykazuje selektywność względem komórek śródbłonka, promując ich adhezję i wzrost na powierzchni protezy i prowadząc do utworzenia monowarstwy komórek śródbłonka.

Struktura szkieletu protezy według niniejszego wynalazku wykazuje cechy gradientu porowatości. Niezależnie od liczby warstw porowatość szkieletu rośnie wraz z oddalaniem się od powierzchni wewnętrznej protezy do jej powierzchni zewnętrznej. Stworzenie cylindrycznej struktury o mniejszych rozmiarach porów i niższej porowatości ogólnej na powierzchni wewnętrznej oraz o większych rozmiarach porów i wyższej porowatości ogólnej na powierzchni zewnętrznej umożliwia osadzenie się komórek śródbłonka tylko na powierzchni wewnętrznej protezy, bez migracji do wnętrza jej struktury oraz utworzenie tzw. monowarstwy. Dlatego też, korzystniejszym rozwiązaniem proponowanym w niniejszym wynalazku jest zastosowanie protezy dwu- lub wielowarstwowej, gdzie warstwa wewnętrzna stanowi warstwę o porowatości zbliżonej do 0%.

Utworzenie monowarstwy śródbłonka ma kluczowe znaczenie dla uzyskania wysokiej biozgodności protezy. Warstwa komórek śródbłonka wykazuje dwojakie działanie przeciwzakrzepowe: stanowi fizyczną barierę oddzielającą implant od krwi oraz aktywnie wydziela szereg substancji przeciwzakrzepowych. Z drugiej strony, duże średnice porów na powierzchni zewnętrznej umożliwią infiltrację komórek mięśni gładkich do wnętrza zewnętrznej warstwy protezy, co skutkuje szybszym odtwarzaniem mięśniówki, lepszą integracją z otaczającymi tkankami, ograniczeniem procesów zapalnych. Zapewnienie odpowiedniego ułożenia włókien przyspiesza proces odtworzenia mięśniówki. Wszystkie ww. cechy przyczyniają się do uzyskania powierzchni o wysokiej biozgodności.

Powierzchnia wewnętrzna protezy jest modyfikowana określonymi biomolekułami, krótkimi sekwencjami peptydowymi, które są rozpoznawane przez receptory błonowe komórek śródbłonka. Wprowadzenie selektywnych peptydów ma za zadanie promować proces adhezji komórek śródbłonka do wewnętrznej powierzchni protezy, a w trakcie pracy protezy umożliwić proces jej samoodnawiania (ewentualne ubytki w monowarstwie będą mogły być „na bieżąco” uzupełniane poprzez „wyłapywanie” z krwioobiegu komórek progenitorowych śródbłonka). Taka cecha protezy stanowi ogromną przewagę w stosunku do alternatywnych, obecnie proponowanych rozwiązań.

Połączenie odpowiednich cech morfologicznych protezy (rozmiar porów, zróżnicowania struktury, ułożenie włókien) i działania bioaktywnego (selektywne biomolekuły) pozwoliło na utworzenie protezy wysoce biozgodnej, która z jednej strony ogranicza procesy aktywacji elementów morfotycznych krwi w kontakcie z powierzchnią protezy, a z drugiej zapewnia odpowiednią integrację z otaczającymi tkankami i ogranicza tworzenie odczynu zapalnego.

W protezie według wynalazku, w korzystnej wersji, powierzchnia wewnętrzna jest modyfikowana biomolekułami w celu stworzenia powłoki bioaktywnej promującej adhezję i wzrost komórek śródbłonka. Powierzchnia zewnętrzna protezy utworzona jest z nanowłókien o określonej średnicy i ułożeniu w celu poprawy integracji protezy z otaczającymi tkankami. Właściwości protez umożliwią prowadzenie procesu endotelializacji w dwojaki sposób: *in vitro* oraz *in situ*.

Na rysunku przedstawiono:

Fig. 1 – Schemat przedstawiający układ do rozdmuchu roztworu polimeru.

Fig. 2 – Schemat przedstawiający układ przepływowy stosowany do modyfikacji powierzchni wewnętrznej szkieletów protez.

Fig. 3 – Schemat modyfikacji powierzchni wewnętrznej protezy bazujący na użyciu silanów.

Fig. 4 – Schemat modyfikacji powierzchni wewnętrznej protezy bazujący na użyciu jonów ceru i nienasyconych kwasów karboksylowych.

Wynalazek został bliżej przedstawiony w przykładach. We wszystkich przykładach stosowano polimery ChronoFlex C75A oraz ChronoFlex C75D, o oznaczeniach odpowiednio: C75A i C75D. Proces prowadzono w układzie do rozdmuchu roztworu polimeru przedstawionym na Fig. 1, na którym 1 oznacza układ koncentrycznych dysz, 2 oznacza pompę powietrza, 3 oznacza pompę iniekcyjną, 4 oznacza obrotowy kolektor poruszający się ruchem posuwisto-zwrotnym, 5 oznacza czujnik ciśnienia.

P r z y k ł a d 1

Proteza jednowarstwowa o średniej średnicy 250 nm.

W celu otrzymania protezy z poliuretanu C75A rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 2% masowe. Peletki polimeru 0,4 g, zalano 19,6 gramami rozpuszczalnika, a następnie zabezpieczono pojemnik przed odparowaniem rozpuszczalnika i mieszaninę poddano mieszaniu z szybkością obrotową około 350 rpm przez noc. Tak przygotowane 20 g roztworu umieszczono w strzykawce, a strzykawkę umieszczono na pompie iniekcyjnej. Stosując przepływ roztworu polimeru wynoszący 30 ml/h oraz ciśnienie robocze powietrza (gazu roboczego w rozdmuchu roztworu polimeru) wynoszące 1×10^5 Pa otrzymano strukturę włóknistą. Podczas procesu zmieniano odległość roboczą od 15 do 60 cm, co 5 cm, w równych odstępach czasu co 5 minut. Prędkość obrotową kolektora nastawiono na 3000 obr/min. Proces prowadzono do otrzymania struktury o grubości ściany protezy 350 μm .

W celu otrzymania protezy z poliuretanu C75D rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 3% masowe. Pozostałe czynności wykonano tak samo jak dla polimeru C75A.

Przykład 2

Proteza jednowarstwowa o średniej średnicy włókna 500–600 nm.

W celu otrzymania protezy z C75A rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 4% masowe. Peletki polimeru 0,8 g, zalano 19,2 gramami rozpuszczalnika, a następnie zabezpieczono pojemnik przed odparowaniem rozpuszczalnika i mieszaninę poddano mieszaniu z szybkością obrotową około 350 rpm przez noc. Tak przygotowane 20 g roztworu umieszczono w strzykawce, a strzykawkę umieszczono na pompie iniekcyjnej. Stosując przepływ roztworu polimeru wynoszący 30 ml/h oraz ciśnienie robocze powietrza (gazu roboczego w rozdmuchu roztworu polimeru) wynoszące 1×10^5 Pa otrzymano strukturę włóknistą. Podczas procesu zmieniano odległość roboczą od 15 do 60 cm, co 5 cm w równych odstępach czasu co 1,25 minuty. Prędkość obrotową kolektora nastawiono na 3000 obr/min. Proces prowadzono do otrzymania struktury o grubości ściany protezy 320 μm .

W celu otrzymania protezy z C75D rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 5% masowe. Pozostałe czynności wykonano tak samo jak dla polimeru C75A.

Przykład 3

Proteza jednowarstwowa o średniej średnicy włókna 800–1000 nm.

W celu otrzymania protezy z C75A rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 5% masowych. Peletki polimeru 1 g, zalano 19 gramami rozpuszczalnika, a następnie zabezpieczono pojemnik przed odparowaniem rozpuszczalnika i mieszaninę poddano mieszaniu z szybkością obrotową około 350 rpm przez noc. Tak przygotowane 20 g roztworu umieszczono w strzykawce, a strzykawkę umieszczono na pompie iniekcyjnej. Stosując przepływ roztworu polimeru wynoszący 30 ml/h oraz ciśnienie robocze powietrza (gazu roboczego w rozdmuchu roztworu polimeru) wynoszące 1×10^5 Pa otrzymano strukturę włóknistą. Podczas procesu zmieniano odległość roboczą od 15 do 60 cm, co 5 cm w równych odstępach czasu co 1,25 minuty. Prędkość obrotową kolektora nastawiono na 3000 obr/min. Proces prowadzono do otrzymania struktury o grubości ściany protezy 350 μm .

W celu otrzymania protezy z C75D rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoroizopropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 5,5% masowego. Pozostałe czynności wykonano tak samo jak dla polimeru C75A.

Przykład 4

Proteza dwuwarstwowa o średniej średnicy włókna 250 nm.

W celu otrzymania protezy z C75A rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 2% masowe. Peletki polimeru, 0,4 g, zalano 19,6 gramami rozpuszczalnika, a następnie zabezpieczono pojemnik przed odparowaniem rozpuszczalnika i mieszaninę poddano mieszaniu z szybkością obrotową około 350 rpm przez noc. Tak przygotowane 20 g roztworu umieszczono w strzykawce, a strzykawkę umieszczono na pompie iniekcyjnej. Stosując przepływ roztworu polimeru wynoszący 30 ml/h oraz ciśnienie robocze powietrza (gazu roboczego w rozdmuchu roztworu polimeru) wynoszące 1×10^5 Pa otrzymano strukturę protezy. W pierwszym etapie procesu stosowano odległość roboczą 10 cm, do utworzenia folii o grubości do około 50 mikrometrów. Proces prowadzono przez 8 minut. W następnym etapie procesu zmieniano odległość roboczą od 15 do 60 cm, co 5 cm, w równych odstępach czasu co 4 minuty. Prędkość obrotową kolektora nastawiono na

3000 obr/min. Proces prowadzono do otrzymania struktury dwuwarstwowej o całkowitej grubości ściany protezy 300 μm .

W celu otrzymania protezy z C75D rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 3% masowe. Pozostałe czynności wykonano tak samo jak dla polimeru C75A.

Przykład 5

Proteza dwuwarstwowa o średniej średnicy włókna 500–600 nm.

W celu otrzymania protezy z C75A rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 4% masowe. Peletki polimeru 0,8 g, zalano 19,2 gramami rozpuszczalnika, a następnie zabezpieczono pojemnik przed odparowaniem rozpuszczalnika i mieszaninę poddano mieszaniu z szybkością obrotową około 350 rpm przez noc. Tak przygotowane 20 g roztworu umieszczono w strzykawce, a strzykawkę umieszczono na pompie iniekcyjnej. Stosując przepływ roztworu polimeru wynoszący 30 ml/h oraz ciśnienie robocze powietrza (gazu roboczego w rozdmuchu roztworu polimeru) wynoszące 1×10^5 Pa otrzymano strukturę protezy. W pierwszym etapie procesu stosowano odległość roboczą 10 cm do utworzenia folii o grubości do około 50 mikrometrów. Proces prowadzono przez 2 minuty. W następnym etapie procesu zmieniano odległość roboczą od 15 do 60 cm, co 5 cm, w równych odstępach czasu co 1 minutę. Prędkość obrotową kolektora nastawiono na 3000 rpm. Proces prowadzono do otrzymania struktury dwuwarstwowej o całkowitej grubości ściany protezy 330 μm .

W celu otrzymania protezy z C75D rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 5% masowe. Pozostałe czynności wykonano tak samo jak dla polimeru C75A.

Przykład 6

Proteza dwuwarstwowa o średniej średnicy włókna 800–1000 nm.

W celu otrzymania protezy z C75A rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 5% masowych. Peletki polimeru 1 g, zalano 19 gramami rozpuszczalnika, a następnie zabezpieczono pojemnik przed odparowaniem rozpuszczalnika i mieszaninę poddano mieszaniu z szybkością obrotową około 350 rpm przez noc. Tak przygotowane 20 g roztworu umieszczono w strzykawce, a strzykawkę umieszczono na pompie iniekcyjnej. Stosując przepływ roztworu polimeru wynoszący 30 ml/h oraz ciśnienie robocze powietrza (gazu roboczego w rozdmuchu roztworu polimeru) wynoszące 1×10^5 Pa otrzymano strukturę protezy. W pierwszym etapie procesu stosowano odległość roboczą 10 cm do utworzenia folii o grubości do około 50 mikrometrów. Proces prowadzono przez 2 minuty. W następnym etapie procesu zmieniano odległość roboczą od 15 do 60 cm, co 5 cm, w równych odstępach czasu co 1 minutę. Prędkość obrotową kolektora nastawiono na 3000 rpm. Proces prowadzono do otrzymania struktury dwuwarstwowej o całkowitej grubości ściany protezy 300 μm .

W celu otrzymania protezy z C75D rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 5,5% masowe. Pozostałe czynności wykonano tak samo jak dla polimeru C75A.

Przykład 7

Proteza trzywarstwowa

W celu otrzymania protezy z poliuretanu C75A o trzech warstwach rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworu o stężeniu 2% masowe. Peletki polimeru 0,4 g, zalano 19,6 gramami rozpuszczalnika, a następnie zabezpieczono pojemnik przed odparowaniem rozpuszczalnika i mieszaninę poddano mieszaniu z szybkością obrotową około 350 rpm przez noc. Przygotowano również roztwór o stężeniu 4% masowe. Peletki polimeru 0,8 g, zalano 19,2 gramami rozpuszczalnika, a następnie zabezpieczono pojemnik przed odparowaniem rozpuszczalnika i mieszaninę poddano mieszaniu z szybkością obrotową około 350 rpm przez noc. Przygotowano również roztwór o stężeniu 5% masowych. Peletki polimeru, 1 g, zalano 19 gramami rozpuszczalnika, a następnie zabezpieczono pojemnik przed odparowaniem rozpuszczalnika i mieszaninę poddano mieszaniu z szybkością obrotową około 350 rpm przez noc. Tak przygotowane roztwory umieszczano kolejno w strzykawce, a strzykawkę umieszczono na pompie iniekcyjnej i wykonywano proces rozdmuchu roztworu polimeru. Stosując przepływ roztworu polimeru wynoszący 30 ml/h oraz ciśnienie robocze powietrza (gazu roboczego w rozdmuchu roztworu polimeru) wynoszące 1×10^5 Pa otrzymano strukturę włóknistą, najpierw z roztworu o stężeniu 2% masowe. Proces prowadzono przez 20 minut. Następnie, otrzymano strukturę włóknistą z roztworu o stężeniu 4% masowe na powierzchni zewnętrznej pierwszej

otrzymanej struktury. Proces prowadzono 5 minut. Następnie, otrzymano strukturę włóknistą z roztworu o stężeniu 5% masowych na powierzchni zewnętrznej drugiej struktury otrzymanej na powierzchni wewnętrznej pierwszej struktury. Proces prowadzono 5 minut. Podczas procesu stosowano stałą odległość roboczą wynoszącą 30 cm. Prędkość obrotową kolektora nastawiono na 3000 obr/min. Proces prowadzono do otrzymania struktury o grubości ściany protezy 300 μm .

W celu otrzymania protezy z C75D rozpuszczono polimer w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP) do otrzymania roztworów o stężeniach 3, 5, i 5,5% masowych. Pozostałe czynności wykonano tak samo jak dla polimeru C75A.

Przykład 8

Wprowadzenie na powierzchnię wewnętrzną protezy cząsteczki łącznikowej – metoda z użyciem silanów.

Protezę (proteza jednowarstwowa o średniej średnicy włókna 250 nm otrzymana zgodnie z Przykładem 1) umieszcza się w układzie do modyfikacji przepływowej powierzchni wewnętrznej przedstawionym na Fig. 2, na którym 1 oznacza protezę, 2 oznacza naczynie z roztworem modyfikującym lub płuczającym, a 3 oznacza pompę perystaltyczną. W naczyniu 2 umieszcza się odpowiedni roztwór. Dzięki pompie perystaltycznej 3, roztwór przepływa przez protezę 1 modyfikując/płuczając jej wewnętrzną powierzchnię. Następnie roztwór przepływa z powrotem do naczynia 2, skąd jest ponownie zawracany do układu.

Podczas pierwszego etapu, tzw. silanizacji, protezę poddaje się modyfikacji 1% roztworem czterochlorku krzemu w bezwodnym toluenie. Reakcję prowadzi się przez 5 minut, następnie protezę dwukrotnie płucze się w bezwodnym toluenie, każde płukanie trwa 10 minut. Po tym kroku, protezę pozostawia się do całkowitego odparowania rozpuszczalnika. Następnie, przeprowadzana jest godzinna hydroliza w zamkniętych pojemnikach, w temperaturze 37°C. Po tym czasie, protezę pozostawia się do wyschnięcia.

W drugim etapie, tzw. aminacji, na wolne grupy silanolowe działa się 2% (v/v) roztworem 3-aminopropylotrietoksylanu w 96% etanolu o pH 5. Reakcję prowadzi się przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie protezę płucze się 96% roztworem etanolu oraz dwukrotnie wodą, każde płukanie trwa 15 minut. Następnie protezę suszy się w cieplarni w temperaturze 40°C przez 1 godzinę. Podczas trzeciego etapu, tzw. karboksylacji, protezę poddaje się reakcji z 1% roztworem bezwodnika glutarowego w 0,1M buforze fosforanowym (pH 7) z dodatkiem trietyloaminy w stężeniu 1 mg/ml. Reakcję prowadzi się przez 1 godzinę. Po tym czasie, protezę dwukrotnie płucze się wodą destylowaną przez 15 minut i pozostawia do wyschnięcia.

Przykład 9

Wprowadzenie na powierzchnię wewnętrzną protezy cząsteczki łącznikowej – metoda z użyciem kwasu akrylowego i jonów ceru.

Protezę (proteza dwuwarstwowa o średniej średnicy włókna 250 nm otrzymana zgodnie z Przykładem 4) umieszcza się w układzie do modyfikacji przepływowej powierzchni wewnętrznej (Fig. 2), kontaktuje z 2,3% roztworem HNO_3 w wodzie destylowanej. Do roztworu modyfikującego dodaje się dihydrat siarczanu amonu i ceru (IV) (0,1% w/v) i kwas akrylowy (1% v/v). Proces prowadzi się przez 1 godzinę. Następnie protezę przepłukuje się roztworem 0,1% SDS, trzykrotnie wodą destylowaną i suszy się w cieplarni w temperaturze 37°C przez noc.

Przykład 10

Protezę (proteza dwuwarstwowa o średniej średnicy włókna 500–600 nm otrzymana zgodnie z Przykładem 5) zawierającą na wewnętrznej powierzchni związek łącznikowy z terminalnymi grupami COOH umieszcza się w układzie do modyfikacji przepływowej powierzchni wewnętrznej (Fig. 2). Do układu wprowadza się bufor aktywujący MES na 1 godzinę. Następnie przez 15 minut materiały inkubuje się w 5 mM sulfo-NHS i 2mM EDC roztworze w buforze aktywującym. Po zakończeniu reakcji, protezę przemywa się buforem MES. Od razu po tym przeprowadza się reakcję z peptydem GSGRE-DVGSG. Protezę modyfikuje się roztworem peptydu w buforze fosforanowym (pH 8), reakcję prowadzi się przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji, protezę przemywa się buforem fosforanowym o pH 9 i pozostawiają w nim na 1 godzinę, podczas której zachodzi hydroliza. Następnie dwukrotnie protezę płucze się w buforze PBS przez 5 minut.

Literatura:

- [1] H. J. Salacinski, G. Hamilton, A. M. Seifalian, Surface functionalization and grafting of heparin and/or RGD by an aqueous-based process to a poly(carbonate-urea)urethane cardiovascular graft for cellular engineering applications., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 66 (2003) 688–97. doi: 10.1002/jbm.a. 10020.
- [2] G. P. A. Michanetzi, N. Katsala, Y. F. Missirlis, Comparison of haemocompatibility improvement of four polymeric biomaterials by two heparinization techniques., *Biomaterials.* 24 (2003) 677–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12437962> (accessed June 15, 2013).
- [3] W. L. J. Hinrichs, H. W. M. Hoopen ten, M. J. B. Wissink, G. H. M. Engbers, J. Feijen, Design of a new type of coating for the controlled release of heparin, *J. Control. Release.* (1997). <http://doc.utwente.nl/11822/l/Hinrichs97design.pdf> (accessed June 15, 2013).
- [4] Y. J. Kim, I. K. Kang, M. W. Huh, S. C. Yoon, Surface characterization and in vitro blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge., *Biomaterials.* 21 (2000) 121–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10632394>.
- [5] Z. Zhou, M. E. Meyerhoff, Preparation and characterization of polymeric coatings with combined nitric oxide release and immobilized active heparin., *Biomaterials.* 26 (2005) 6506–17. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.046.
- [6] Y. Elsayed, C. Lekakou, F. Labeed, P. Tomlins, Fabrication and characterisation of biomimetic, electrospun gelatin fibre scaffolds for tunica media-equivalent, tissue engineered vascular grafts, *Mater. Sci. Eng. C.* 61 (2016) 473–483. doi: 10.1016/j.msec.2015.12.081.
- [7] M. J. McClure, S. A. Sell, D. G. Simpson, B. H. Walpoth, G. L. Bowlin, A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: A preliminary study, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2422–2433. doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.029.
- [8] X. Kapfer, W. Meichelboeck, F. M. Groegler, Comparison of Carbon-impregnated and Standard ePTFE Prostheses in Extra-anatomical Anterior Tibial Artery Bypass: A Prospective Randomized Multicenter Study, *Eur. J. Vase. Endovasc. Surg.* 32 (2006) 155–168. doi: 10.1016/j.ejvs.2005.12.015.
- [9] S. Enomoto, M. Sumi, K. Kajimoto, Y. Nakazawa, R. Takahashi, C. Takabayashi, et al, Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material, *J. Vase. Surg.* 51 (2010) 155–164. doi:10.1016/j.jvs.2009.09.005.
- [10] T. E. Warkentin, A. Greinacher, A. Koster, Heparin-induced thrombocytopenia in patients with ventricular assist devices: are new prevention strategies required?, *Ann. Thorac. Surg.* 87 (2009) 1633–40. doi: 10.1016/j.athoracsur.2008.10.060.
- [11] J. N. Schroder, M. A. Daneshmand, N. R. Villamizar, R. P. Petersen, L. J. Blue, I. J. Welshy, et al, Heparin-induced thrombocytopenia in left ventricular assist device bridge-to-transplant patients., *Ann. Thorac. Surg.* 84 (2007) 841–5; discussion 845–6. doi : 10.1016/j.athoracsur.2007.03.049.
- [12] S. De Valence, J. C. Tille, J. P. Giliberto, W. Mrówczyński, R. Gummy, B. H. Walpoth, et al, Advantages of bilayered vascular grafts for surgical applicability and tissue regeneration, *Acta Biomater.* 8 (2012) 3914–3920. doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.035.
- [13] Y. M. Ju, J. S. Choi, A. Atala, J. J. Yoo, S. J. Lee, Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels, *Biomaterials.* 31 (2010) 4313–4321. doi : 10.1016/j.biomaterials.2010.02.002.
- [14] L. Soletti, Y. Hong, J. Guan, J. J. Stankus, M. S. El-Kurdi, W. R. Wagner, et al., A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts., *Acta Biomater.* 6(2010) 110–22. doi: 10.1016/j.actbio.2009.06.026.
- [15] E. Tomecka, M. Wojasinski, E. Jastrzebska, M. Chudy, T. Ciach, Z. Brzózka, Poly(1-lactic acid) and polyurethane nanofibers fabricated by solution blow spinning as potential substrates for cardiac cell culture, *Mater. Sci. Eng. C.* 75 (2017) 305–316. doi:10.1016/J.MSEC.2017.02.055.
- [16] E. S. Medeiros, G. M. Glenn, A. P. Klamczynski, W. J. Orts, L. H. C. Mattoso, Solution blow spinning, US 8,641,960 B1, 2014.
- [17] J. L. Daristotle, A. M. Behrens, A. D. Sandler, P. Kofinas, A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 3495–34963. doi:10.1021/acsami.6b12994.
- [18] B. A. Butruk-Raszeja, M. S. Dresler, A. Kuźmińska, T. Ciach, Endothelialization of polyurethanes: Surface silanization and immobilization of REDV peptide, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 144 (2016) 335–343. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.04.017.

- [19] B. A. Butruk-Raszeja, P. A. Trzaskowska, A. Kuźmińska, T. Ciach, Polyurethane modification with acrylic acid by Ce(IV)-initiated graft polymerization, *Open Chem.* 14 (2016) 206–214.
doi: 10.1515/chem-2016-0020.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania cylindrycznej protezy naczyniowej posiadającej co najmniej jedną warstwę porowatego polimeru przeznaczonego do wytwarzania protez naczyniowych, **znamienny tym**, że protezę wytwarza się metodą rozdmuchu roztworu polimeru w rozpuszczalniku, o stężeniu w zakresie 2–8% w/w, przy czym rozdmuch roztworu polimeru prowadzi się z zastosowaniem kolektora cylindrycznego o średnicy niższej niż 6 mm, stosuje się szybkość obrotową kolektora w zakresie od około 100 do około 15000 obr/min, a odległość roboczą ustawia się w zakresie od 5 cm do 100 cm, przy czym w przypadku, gdy warstwa protezy jest warstwą o stałej porowatości stosuje się stałą wartość odległości roboczej, zaś w przypadku gdy warstwa protezy jest warstwą porowatą o zmiennej porowatości stosuje się zmienną odległość roboczą, a w przypadku, gdy proteza zawiera dwie lub więcej warstw różniące się średnim rozmiarem włókien, każdą z tych warstw wytwarza się z roztworu polimeru o innym stężeniu.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że warstwę protezy o porowatości poniżej 30% wytwarza się stosując stałą wartość odległości roboczej z zakresu 5–14 cm.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że warstwę protezy o stałej porowatości o wartości co najmniej 30% wytwarza się stosując stałą wartość odległości roboczej z zakresu 15–100 cm.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku stosowania zmiennej odległości roboczej odległość roboczą zmienia się co 5 cm, w stałych odstępach czasu.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rozdmuch roztworu polimeru prowadzi się przy stałym ciśnieniu gazu roboczego.
6. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że stosuje się ciśnienie gazu roboczego na wlocie do układu koncentrycznych dysz wynoszące od 0,1 do 3 barów.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rozdmuch roztworu polimeru prowadzi się przy stałym natężeniu przepływu roztworu.
8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że stosuje się natężenie przepływu na wlocie do układu koncentrycznych dysz wynoszące od 0,1 do 100 ml/h.
9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako polimer stosuje się: poliuretan, poli(kwas glikolowy), poli(kwas mlekowy), kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego, poli(kaprolakton), poli(tlenek etylenu), polialkohol winylowy, poli(tereftalan etylenu), kolagen, elastyna, chitozan oraz ich mieszaniny i kopolimery.
10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalnik polimeru stosuje się: aceton, chloroform, tetrahydrofuran, toluen, dimetyloformamid, dimetyloacetamid, cykloheksan, dimetylosulfotlenek, 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-ol, 2,2,2-trifluoroetanol, alkohole, wodę, kwas mrówkowy, kwas octowy lub ich mieszaniny.
11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że procesowi rozdmuchu poddaje się roztwór poliuretanu zawierającego wiązania węglanowe -OCOO- w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu.
12. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wytworzone protezy naczyniowe poddaje się modyfikacji przez wprowadzenie na wewnętrzną powierzchnię protezy związków łącznikowych zawierających grupy funkcyjne COOH, do których następnie przyłącza się oligopeptyd zbudowany z co najwyżej 20 aminokwasów, zawierający sekwencje rozpoznawalne przez receptory błonowe komórek śródbłonna, takie jak: REDV, IKVAV, CAG, YIGSR, RGD.
13. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że na wewnętrzną powierzchnię protezy wprowadza się związek łącznikowy zawierający grupy funkcyjne MH lub OH, które następnie przekształca się w grupy COOH.
14. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że związkiem łącznikowym jest silan lub nienasycony kwas karboksylowy.

Rysunki

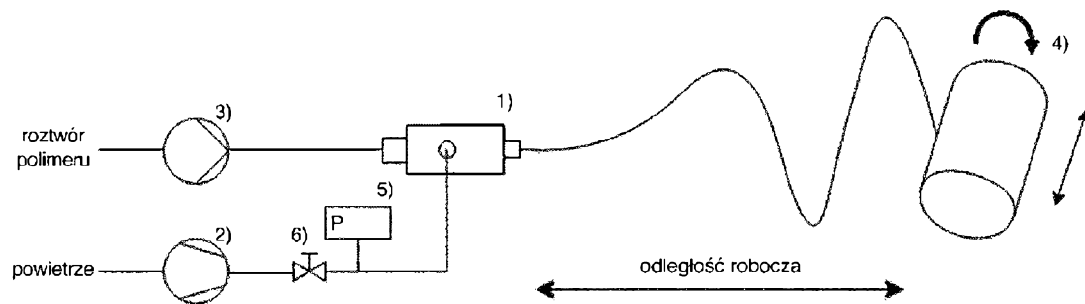


Fig. 1

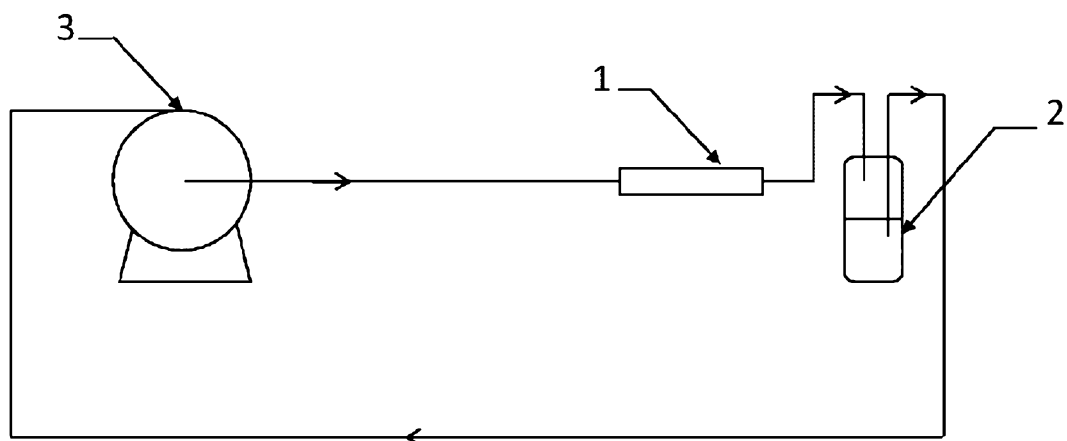


Fig. 2

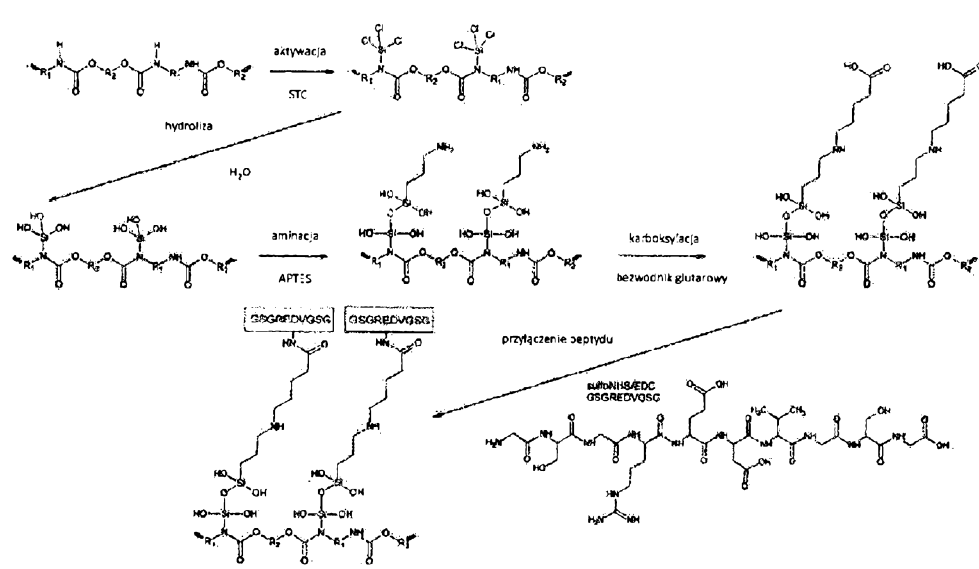


Fig. 3

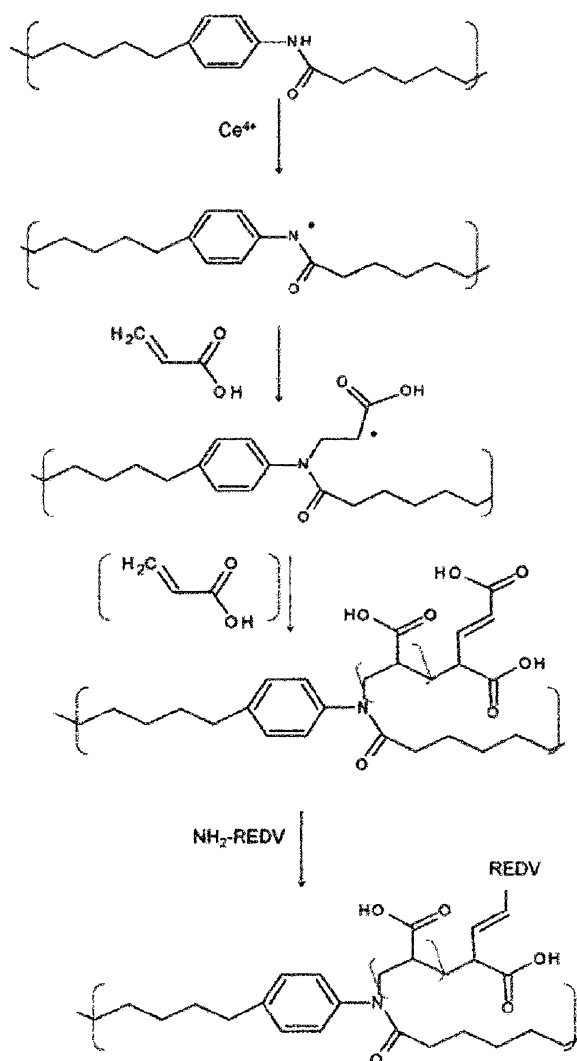


Fig. 4