



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2023 00782**

(22) Data de depozit: **04/12/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2024 BOPI nr. **5/2024**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,**
ȘOS.PANDURI NR.90, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **TIHĂUAN BIANCA MARIA,**
STR. CODRII NEAMȚULUI, NR.5-7, BL.A,
AP.8, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• **CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,**
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **AXINIE MĂDĂLINA, STR.RADU VODĂ,**
NR.12G, COMUNA BERCENI, IF, RO;
• **MAIER SERGIU STELIAN,**
STR. FÂNTĂNILOR, NR.37, IAȘI, IS, RO

(54) **HYDROSCAR- HIDRO-EMULSIE HIBRIDĂ CU ACȚIUNE
CICATRIZANTĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs dermato-cosmetic funcționalizat cu acțiune cicatrizantă la nivelul plăgilor cutanate utilizat în terapia de mediere a procesului de cicatrizare. Procedeu, conform invenției, constă în etapele:

a) formulare a unei suspensii lipozomale care încorporează canabidiol (CBD) obținută prin solubilizarea a 10% lecitină de soia în 50% ulei de cânepă, sub agitare continuă, înglobarea a 3% CBD, 0,5% glicerină, 0,1% vitamina E și apă, cu omogenizarea și sonicarea suspensiei, în atmosferă inertă,

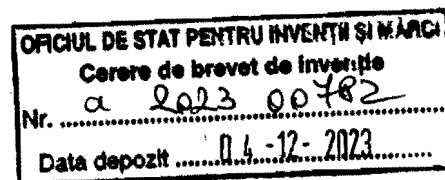
b) formularea unei baze hidro-emulsionante prin încălzirea la 70°C a unei faze A formată din 1...10% colagen marin, 0,5% glicerină, 0,3% agenți reologici uzuali și 61,7% apă purificată, includerea fazei B constând în suspensia lipozomală cu CBD și o fază C formată din 0,5% conjugat acid hialuronic-colesterol, 0,1% vitamina E și 0,9% conservant uzual, emulsionată, din care rezultă un produs de tip hidrogel biopolicimeric care reprezintă o alternativă non-invazivă de îmbunătățire a calității vieții pacienților cu un fond inflamator.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



DESCRIEREA INVENȚIEI



Titlul invenției

HYDROSCAR – HIDRO-EMULSIE HIBRIDĂ CU ACȚIUNE CICATRIZANTĂ

Invenția se referă la un produs dermatocosmetic cu acțiune cicatrizantă obținut prin includerea unui sistem lipozomal care încorporează canabidiol într-o bază tip hidrogel formată prin conjugarea acidului hialuronic cu o moleculă de colesterol și încorporarea acestora într-o formulă tip apă/ulei pe bază de colagen marin și ulei de cânepă. Invenția se încadrează în categoria dermatocosmeticelelor funcționalizate care vizează administrarea topică în ultimele două etape ale procesului de vindecare a unei plăgi (proliferare și mai ales remodelare, când pacienții nu mai necesită spitalizare și au nevoie de tratamente topice de auto-îngrijire pentru sporirea și creșterea eficienței tratamentului sistemic), facilitarea închiderii rapide a cicatricilor, redobândirea elasticității și îmbunătățirea texturii și aspectului general al pielii.

Stadiul actual al cunoașterii

Pielea este un organ multi-funcțional și parte importantă a sistemului imunitar înăscut, care îndeplinește roluri multiple, prin care contribuie la homeostazia organismului: funcția de barieră de protecție, senzorială, reglarea temperaturii și tensiunii arteriale, procese metabolice vitale (Abdallah, Mijouin, and Pichon 2017; Wickett and Visscher 2006) Ținând cont de faptul că pielea poate fi deteriorată de o multitudine de agenți chimici, factori termici, mecanici, sau ca urmare a reacțiilor pe care aceștia le generează, procesul de regenerare epidermală este unul versatil care asigură restabilirea funcției de barieră a pielii pentru a evita pierderea de sânge și/sau infectarea și restabilirea proprietăților mecanice și fiziologice. Vindecarea epidermei după leziuni cutanate fiind astfel un proces imperfect, care duce inevitabil la formarea cicatricilor pe măsură ce pielea își restabilește integritatea (Galliot et al. 2017; Sidgwick, McGeorge, and Bayat 2015b). Prelungirea perioadei de vindecare a rănilor sau răspunsurile excesive ale organismului la vătămare împiedică vindecarea normală, conducând la cicatrici care necesită o gestionare atentă. De aceea, unul din principalele motive pentru intervenția rapidă la nivelul plăgilor cutanate în vederea vindecării lor este restaurarea funcției de barieră și prevenirea infecțiilor. Aceste intervenții trebuie să aibă în vedere interacțiunile complexe între o multitudine de celule și mediatori. În acest context, stimularea tranziției rapide de la stadiul inflamator la cel proliferativ al reparării leziunilor este scopul principal pe care produsul HydroSCAR îl abordează în vederea furnizării de soluții cu valențe clinice.

Din literatura de specialitate este cunoscut faptul că plăgile superficiale, mici și curate sunt de obicei asociate cu o durată scurtă a fazei hemostatice și inflamatorii, cu formarea dopului de fibrină care închide rana, cu eliminarea unor cantități minore de resturi celulare. Intervenția cât mai rapidă la situsul afectat diminuează complicațiile asociate infecțiilor și formării de biofilme microbiene, mai ales ținând cont de faptul că reepitelizarea începe deja la câteva ore după rănire prin activarea keratinocitelor care sunt redirecționate către patul plăgii constituit din fibrină, fibronectină și vitronectină (A, A, and P 2001; R and G 2005; NS 2007; WC, PJ, and MW 1984; WS 1971; L 2016; SW and MW 2013; Reinke and Sorg 2012; Sorg et al. 2017) De remarcat, acest proces de reparare se efectuează de la straturile superficiale către bază cu scopul închiderii rapide a plăgii pentru a preveni pierderea suplimentară de lichid sau infecția. Condiția preliminară pentru epitelizarea eficientă este prezența unei matrici extracelulare adecvate care facilitează migrarea keratinocitelor.

Plecând de la aceste specificități structurale ale pielii, industria cosmetică vizează în permanență realizarea de produse noi și eficiente, înzestrate cu o activitate biologică îmbunătățită și cu eliberarea controlată a unor substanțe active la nivelul pielii. Proiectarea și formularea produselor dermato-cosmetice cunoaște în prezent o amplă transformare, în special datorită tehnicilor moderne de formulare, susținute de studii complexe privind biodisponibilitatea principiilor active, dar și datorită modificărilor conceptuale privind efectele fiziologice ale cosmeticelor, similare cu cele așteptate de la un medicament. Formularea unui produs cosmetic trebuie optimizată astfel încât principiul activ să ajungă la ținta terapeutică în concentrația necesară pentru eficacitate maximă, dar cu absorbție minimă la nivelul pielii.

Tehnologia formulării, în mod special cea a cosmeticelor regenerative, abordează acest domeniu aproape similar formulării produselor topice farmaceutice, arta formulării fiind o abordare cu un pronunțat caracter aplicativ interdisciplinar, care face apel la principii de fizică, chimie-fizică, chimia coloizilor, chimie analitică și tehnologie. Succesul unei noi formulări constă în stabilirea unui echilibru optim între creativitatea în formulare și bazele științifice aplicate (interacțiunile multiple ce apar în procesele de absorbție, distribuție și metabolizare a principiilor active, concentrațiile cu efect citotoxic ale principiilor active stabilite prin *teste in vitro* ș.a.m.d. (Wiechers et al. 2004). Aceste noi tehnologii controlează cinetica eliberării la țintă și durata activității terapeutice (Patravale and Mandawgade 2008b; Vikas et al. 2018).

În ultimii ani, cercetarea și elaborarea de formulări cosmetice avansate de tipul celor regeneratoare s-a axat pe crearea de sisteme de transport cu eliberare controlată. Aceste tipuri de formulări, cunoscute sub denumirea de **sisteme pentru transport la țintă**, au câteva avantaje comparativ cu preparatele convenționale. Capacitatea de a **controla eliberarea**

principiilor active conferă eficacitate îmbunătățită, toxicitate redusă și sporirea complianței grupului țintă (Watkins et al. 2015). Eliberarea la țintă permite controlarea locului, momentului, frecvenței și cadenței disponibilizării substanțelor active. Printre sistemele de eliberare controlată se regăsesc și sistemele coloidale (Patravale and Mandawgade 2008a; Algin Yapar, Evren, and Yapar n.d.; Puglia and Bonina 2012) similare celor abordate de prezentul proiect.

Aplicarea topică și transdermică a principiilor active trebuie să fie sigură și non-toxică, pentru a nu provoca iritații. Conservarea principiilor active este esențială în timpul formulării, depozitării și aplicării produselor finale, deoarece acestea pot fi instabile și sensibile la variații de temperatură, pH, lumină și în prezenta agenților oxidanți. Astfel, **încapsularea reprezintă o necesitate pentru protejarea ingredientelor active** în raport cu factorii externi și pentru medierea eliberării țintite și controlată a acestora (Ammala 2013).

Problema pe care o rezolvă invenția, soluții tehnice, avantaje

Utilizarea bazelor de produs de tipul **hidrogelurilor biopolimerice** (cu colagen și acid hialuronic) este considerată în prezent una dintre **strategiile cele mai eficiente în terapiile de mediere a procesului de cicatrizare**. Astfel de produse prezintă avantajul de a favoriza vindecarea rănilor prin menținerea unor valori optime ale umidității și permării speciilor micromoleculare cu rol fiziologic. În plus, hidrogelurile de colagen, de exemplu, reprezintă matrici eficiente pentru înglobarea controlată și facilă a numeroși compuși farmacologic activi, cu scopul de a obține produse (multi)functionale destinate tratării eficiente a afecțiunilor sau efectelor secundare care implică denaturarea barierei epidermale.

Încapsularea reprezintă o tehnică prin care un agent activ (în cazul nostru canabidiolul) este immobilizat într-o altă substanță (înveliș - lipozom). Se obțin astfel particule a căror dimensiuni acoperă un spectru larg, începând de la câțiva nanometri și până la câțiva milimetri, fiind adaptate scopului încapsulării și substanțelor utilizate.

Până în prezent, în bazele de date ale Agenției Europene a Medicamentului (EMA) și *Food and Drug Administration* (FDA), au fost autorizate pentru utilizarea în terapii doar 14 tipuri de produse lipozomale. Trebuie remarcat faptul că această listă exclude medicamentele generice, complexe lipidice (de exemplu, Abelcet, Amphotec și Onpattro) și produsele lipozomale autorizate la nivel național în Europa. Doxil (Doxorubicin HCl lipozomi injectabil) a fost primul produs lipozomal aprobat de FDA în 1995. Dintre aceste produse comercializate, 43% au fost aprobate înainte de anul 2000, iar 57% acestea au fost aprobate înainte de anul 2010. Cu toate că focusul terapiilor sistemice care vizează aplicabilitatea lipozomilor se

concentrează în principal pe terapia cancerului, există totuși interes științific și pentru alte domenii, cum ar fi terapia infecțiilor, anestezia, vaccinurile, bolile pulmonare și terapia fotodinamică. Formele de dozare acceptate de EMA și FDA se concentrează în principal pe suspensiile sterile și pulberile liofilizate a căror căi de administrare includ perfuzie intravenoasă, injecție intramusculară și intratecală, infiltrație epidurală, locală și inhalare orală (Liu, Chen, and Zhang 2022).

În ultimii ani, s-au făcut numeroase descoperiri legate de modul în care canabinoizii precum **canabidiolul (CBD)** ar putea aduce beneficii pielii. Aceste cunoștințe au determinat comunitatea științifică să meargă un pas mai departe și să investigheze **potențialul cicatrizant al CBD-ului** (Palmieri, Laurino, and Vadala 2019). Canabinoizii sau fitocanabinoizii, de ex.(CBD), canabicromen (CBC), canabigerol (CBG), canabinol (CBN) și delta (9)-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), sunt constituenții activi ai plantei *Cannabis sativa* și își manifestă activitatea prin legarea de anumiți receptori: receptorii canabinoizi CB1 și CB2 (fig 2) (întâlniți la nivelul neuronilor, celulele gliale și, respectiv, în țesutul splinei (Van Sickle et al. 2005; Munro, Thomas, and Abu-Shaar 1993), fac parte din clasa de proteine G (proteine care leagă nucleotidele guaninei) și activarea lor are ca rezultat inhibarea activității adenilat-ciclazei (Di Marzo, Bifulco, and De Petrocellis 2004; Iversen 2003; Baker et al. 2003). Fiind doar unul dintre numeroșii compuși activi pe care îi produce canabisul, CBD-ul a intrat în curentul principal în ultimii ani datorită lipsei sale de efecte intoxicante, adverse. De asemenea, fiind posibilă extragerea CBD-ului din cânepa industrială, acesta nu face subiectul reglementărilor privind substanțele interzise, psihoactive. Compusul funcționează acționând asupra sistemului endocannabinoid (ECS), responsabil pentru reglarea unei game largi de funcții biologice. Este prezent în majoritatea țesuturilor umane, inclusiv în piele, stimulând creșterea și dezvoltarea celulelor și fiind implicat în reglarea răspunsului inflamator. ECS pare a avea un rol important, deși foarte puțin cunoscut, în sănătatea pielii, și în vindecarea rănilor. Cercetările actuale sugerează că CBD ar putea juca un rol în **îmbunătățirea procesului de vindecare a rănilor și reducerea formării cicatricilor**, precum și în **reducerea inflamației** (Palmieri, Laurino, and Vadala 2019; Tóth et al. 2019; Zurier and Burstein 2016) putând fi o alternativă non-invazivă de îmbunătățire a calității vieții pacienților cu un fond inflamator.

Un alt aspect pe care invenția își propune să îl rezolve este legat de **biodisponibilitatea transdermală a canabidiolului**. Administrarea transdermică evită efectul metabolismului primar care este asociat cu calea orală și astfel ar putea crește biodisponibilitatea CBD în comparație cu calea orală. Cu toate acestea, este posibil ca alți factori să scadă absorbția, cum ar fi posibilitatea de iritație locală și penetrarea scăzută în piele a substanțelor chimice care sunt puternic lipofile, cum ar fi CBD, despre care se estimează că are o valoare $\log Kow/\log P$ de aproximativ 6 (Tabboon, Pongjanyakul, and

Limpongsa 2022). Mai multe studii au demonstrat că calea topică de administrare a CBD reprezintă un instrument terapeutic semnificativ; concentrațiile plasmatice ale CBD au fost observate la modelele animale după aplicarea unui gel transdermic (Liput et al. 2013; Lodzki et al. 2003; Paudel et al. 2010); CBD a fost propus pentru mai multe indicații terapeutice legate de piele (Sophie A. Millar et al. 2018; Sophie Anne Millar et al. 2020); pentru capacitatea sa de a modula răspunsul inflamator al pielii în cazul mai multor afecțiuni dermatologice, inclusiv psoriazis, dermatită atopică și acnee (Bruni et al. 2018; Sophie Anne Millar et al. 2020; Sheriff et al. 2020). Produsele de calitate cosmetică sunt disponibile comercial de la numeroși producători (Kiehl's, Josie Maran, Ildi Pekar, etc.), dar pentru uz medical (în special în tratamentul cicatricilor), nu sunt atât de multe opțiuni disponibile. Potrivit FDA (Food and Drug Administration), până în prezent, niciun medicament care conține CBD nu a îndeplinit cerințele FDA aplicabile pentru a fi comercializat în mod legal pentru utilizare fără prescripție medicală ("U.S. Food and Drug Administration," n.d.). Pentru a reduce decalajul dintre știință și tratamentul clinic, există o nevoie clinică nesatisfăcută de tratamente eficiente pentru cicatrizarea pielii, în special pentru a aborda inflamația, pruritul, uscăciunea și roșeața, citate în mod obișnuit de pacienți ca fiind factorii care îi afectează cel mai mult (Sidgwick, McGeorge, and Bayat 2015a).

Exemplul 1. Operații tehnologice necesare obținerii produsului HydroSCAR

a) Formularea suspensiei lipozomale care încorporează CBD

Canabidiolul utilizat a fost furnizat de compania producătoare Absolute Essential Oils, acesta fiind obținut dintr-o cultură controlată de *Cannabis sativa* (valori ale THC < 0.2%), varietatea Futura 75, printr-un proces de extracție, decarboxilare, purificare și concentrare care a condus la obținerea unui produs de puritate similară standardelor analitice.

Protocolul de obținere al suspensiei lipozomale utilizează în formulare ca bază 10% lecitină din soia, solubilitată în 50% ulei de cânepă, la 30°C, sub agitare continuă (min. 1000 rpm). Urmează înglobarea a 3% CBD prin agitare continuă la viteză de mixare crescută (4000 rpm), a glicerinei (0,5%), a vitaminei E (0,1%) și a apei. Suspensia formată a fost omogenizată la viteze de mixare mari timp de o ora, la 30°C. A urmat sonicarea timp de 10 minute la 20 kHz (1 minut sonicare cu 1 minut pauză). Reacțiile au avut loc în atmosfera inertă, pentru evitarea oxidării timp de 30 h.

b) Formularea conjugatului format din acid hialuronic și colesterol

Sinteza conjugatului format din acid hialuronic (HA) și colesterol (Chol) s-a realizat utilizând Colesterol (Cho) de la Sigma-Aldrich, hialuronat de sodiu 93% - Lipo™ Hyaluronic

acid – produs disponibil comercial, având masa moleculară $1.1 - 2.2 \times 10^6$ Daltons) de la Vantage Specialty Chemicals™ și apă distilată. Procesul de preparare a probelor a constat în realizarea unor soluții stoc de acid hialuronic și colesterol în apă distilată la o concentrație de 10mg/mL. Omogenizarea s-a realizat folosind o baie de ultrasunete, fiecare soluție a fost sonicată timp de un minut, cu pauză de 2 minute între fiecare etapă de sonicare, întreg procesul repetându-se de trei ori. S-au preparat trei concentrații diferite de colesterol (25μM, 20μM și respectiv 5μM), volumul final al probelor preparate a fost de 0.5mL cu o concentrație finală de acid hialuronic de 5mg/mL. Reacțiile au avut loc în atmosfera inertă, pentru evitarea oxidării timp de 30 h. Probele au fost supuse liofilizării în vederea obținerii produșilor de complexare.

c) Formularea bazei hidro-emulsifiante

Baza hidro-emulsifiantă s-a obținut prin încălzirea la 70°C a componentelor fazei A formată din collagen marin (1-10%), glicerină (0.5%), agenți reologici (0.3%) și apă purificată (61.7%). Urmată de includerea în faza A a fazei B – suspensia lipozomală cu CBD. Faza C formată din conjugatul acid hialuronic-colesterol (0.5%), vitamina E (0.1%) și conservant (0.9%) a fost emulsionată la 70°C, răcită apoi la 30°C și incorporată în bază (A/B).

Exemplul 2. Demonstrarea proprietăților antimicrobiene

Determinarea cantitativă a activității antimicrobiene s-a realizat prin metoda microdiluțiilor. Suspensiile bacteriene ale tulpinilor standardizate *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* și *Streptococcus agalactiae* au fost realizate din culturi tinere de 18-24 h, cultivate pe mediu Müller-Hinton și ajustate la o densitate de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, utilizând standardul nefelometric 0,5 McFarland. S-au obținut diluții binare în mediu lichid (bulion Müller-Hinton), iar concentrația minimă inhibitoare (CMI) este concentrația minimă de compus capabilă să inhibe creșterea microbiană, apreciată macroscopic prin absența turbidității mediului de cultură, după însămânțare și incubare 24h. Volumul final din fiecare godeu a fost de 150μL, iar volumul de suspensie microbiană de 15μL. Măsurarea absorbției s-a realizat la 620 nm. În vederea evaluării influenței produsului HidroSCAR și a principalaalului activ al acestuia – CBD, asupra dezvoltării de biofilme microbiene au fost utilizate următoarele materiale și metode experimentale: celulele microbiene reprezentate de tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 și *Candida albicans* ATCC 10321 au fost cultivate în prezența probelor cu bulion nutritiv, au fost incubate la 37 °C timp de 24 ore. Plăcile conținând probele de interes au fost apoi golite și spălate de două ori cu A.F.S; urmând fixarea timp de 5 minute a celulelor aderente cu metanol. Soluția de metanol s-a îndepărtat prin răsturnare; a urmat colorarea celulelor aderente cu soluție alcalină de cristal violet 1% timp de 15 minute. Soluția de colorare s-a îndepărtat apoi godeurile au fost spălate sub jet de apă de la robinet. Biofilmele microbiene formate au fost resuspendate în acid

acetic 33% (prin barbotare), iar intensitatea suspensiei colorate a fost evaluată prin măsurarea absorbantei la 490 nm.

Exemplul 3. Demonstrarea biocompatibilității in vitro pe modele celulare

Evaluarea gradului de biocompatibilitate s-a realizat cu ajutorul testelor MTT și LDH. Testul MTT este un test de viabilitate ce permite evaluarea cantitativă a celulelor vii din cultură. Compusul MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu] este permeabil pentru membranele celulelor vii. După metabolizarea compusului MTT se formează cristale de formazan solubile în izopropanol. Rezultă o soluție (culoare violet) cu densitatea optică ce poate fi citită la 550 nm. Pentru testul MTT, din placa de testat cu osteoblaste cu 24 de godeuri s-a îndepărtat restul de mediul de cultură. S-a spălat suprafața cu PBS pentru a îndepărta orice urmă de ser fetal bovin, care inhibă compusul MTT. S-a preparat o soluție de MTT 1mg/ml și fiecare proba a fost incubată în prezența a 1 ml soluție MTT timp de 4 h la 37°C și 5%CO₂. Pentru a se putea face citirea rezultatelor, cristalele de formazan formate au fost solubilizate cu izopropanol. Soluția rezultată, de culoare violet, a fost citită la spectrofotometru la 550 nm. Intensitatea culorii este direct proporțională cu numărul de celule vii din probă. Pentru testul LDH, din placa de testat cu osteoblaste cu 24 de godeuri s-a îndepărtat restul de mediul de cultură. S-a spălat suprafața cu PBS, apoi s-a adăugat soluția LDH conform instrucțiunilor din kit și probele au fost incubate 30 de minute la 37°C cu 5%CO₂. Soluția rezultată, de culoare roșu intens, a fost citită cu ajutorul unui spectrofotometru (Elisa reader) la 492 nm.

Proba	Viabilitate 24 ore post tratament	Viabilitate 48 ore post tratament
HS1 0.750 mg/ml	81.27 ± 2.46	77.497 ± 3.58
HS2 0.375 mg/mL	88.52 ± 7.12	89.116 ± 2.42
HS3 0.187 mg/mL	96.86 ± 5.67	84.200 ± 3.60
CBD 1 30 mg/mL	71.79 ± 1.68	84.082 ± 5.89
CBD 2 3 mg/mL	90.72 ± 1.18	107.721 ± 1.34
CBD 3 0.3 mg/mL	91.95 ± 4.39	98.959 ± 7.42
DMSO	95.12 ± 3.89	93.496 ± 5.29

Proba	NADH eliberat 24H	Activitate LDH 24 H	NADH eliberat 48H	Activitate LDH 48 H
HS1 0.750 mg/ml	1.94 ± 0.03	12.92 ± 0.27	2.09 ± 0.12	13.96 ± 1.18
HS2 0.375 mg/mL	1.61 ± 0.09	10.72 ± 0.86	1.92 ± 0.01	12.80 ± 0.14
HS3 0.187 mg/mL	2.55 ± 0.11	16.98 ± 1.07	0.93 ± 0.03	6.23 ± 0.25
CBD 1 30 mg/mL	2.77 ± 0.31	18.44 ± 2.97	1.05 ± 0.03	6.98 ± 0.03
CBD 2 3 mg/mL	2.35 ± 0.16	15.64 ± 1.51	1.32 ± 0.08	8.80 ± 0.72
CBD 3 0.3 mg/mL	2.37 ± 0.01	15.81 ± 0.13	0.73 ± 0.10	4.85 ± 0.96
DMSO	3.41 ± 0.11	22.74 ± 1.08	0.97 ± 0.05	6.50 ± 0.48
Celule viabile	2.32 ± 0.13	15.46 ± 1.25	1.20 ± 1.20	8.00 ± 0.01
Control pozitiv	4.28 ± 0.09	28.56 ± 0.85	5.07 ± 1.20	33.76 ± 0.10

Exemplul 4. Evaluarea eliberării în mediul celular a oxizilor nitrici

Determinarea cantitativă a nitriților și nitraților eliberați în mediu celular a fost efectuată pe fibroblaste umane, linia HDF. Celulele cultivate așa cum s-a descris anterior (test de citotoxicitate) au fost tratate cu 3 concentrații de produs HidroSCAR și CBD timp de 24 de ore. Supernatantul au fost colectat și utilizați pentru determinarea nitriților și nitraților folosind kitul de testare pe fază de reactivi Griess a oxizilor nitrici (Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA) urmând instrucțiunile producătorului.

Exemplul 5. Determinarea imunotoxicității și capacității de stimulare a proliferației celulare**Exemplul 6. Evaluarea inducerii de apoptoză și necroză**

Determinarea apoptozei timpurii și târzii a fost efectuată prin citometrie în flux utilizând citometrul FACS Alexa și un kit Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Thermo Scientific, SUA). În total, 10.000 de celule au fost analizate per măsurare. Datele au fost analizate folosind software-ul FlowJo 10.0.7 (Treestar Inc., Ashland, SUA). Celulele T HEK-293 au fost cultivate în mediu DMEM suplimentat cu 10% FBS în condiții standard de cultură celulară (37°C, 5% CO₂). Numărul de celule a fost evaluat utilizând un hemocitometru. S-a folosit tripsină/EDTA (0,05%, Invitrogen) pentru a detașa celulele din balon, fie pentru trecere, inducerea șocului termic sau citometrie în flux. Pentru inducerea apoptozei, celulele au fost expuse la temperatura camerei (22°C) pentru o perioadă de 24 de ore la schele de colagen. Celulele T HEK-293 (3 × 10⁶) au fost colorate folosind Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit conform instrucțiunilor producătorului. Celulele colorate au fost diluate în tampon de legare a anexinei V. Celulele suspendate au fost utilizate pentru a efectua testul de citometrie în flux.

Exemplul 7. Demonstrarea capacității de proliferație și migrare celulară – wound healing*Surse bibliografice citate în descrierea invenției*

1. A, Jacinto, Martinez-Arias A, and Martin P. 2001. "Mechanisms of Epithelial Fusion and Repair." *Nature Cell Biology* 3 (5). <https://doi.org/10.1038/35074643>.
2. Abdallah, Florence, Lily Mijouin, and Chantal Pichon. 2017. "Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism." *Mediators of Inflammation* 2017 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1155/2017/5095293>.
3. Algin Yapar, Evren, Assoc Evren, and Algin Yapar. n.d. "Herbal Cosmetics and Novel Drug Delivery

- Systems.” *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 51. Accessed October 11, 2019. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.3>.
4. Ammala, Anne. 2013. “Biodegradable Polymers as Encapsulation Materials for Cosmetics and Personal Care Markets.” *International Journal of Cosmetic Science* 35 (2): 113–24. <https://doi.org/10.1111/ics.12017>.
 5. Baker, David, Gareth Pryce, Gavin Giovannoni, and Alan J. Thompson. 2003. “The Therapeutic Potential of Cannabis.” *Lancet Neurology*. *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00381-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00381-8).
 6. Bruni, Natascia, Carlo Della Pepa, Simonetta Oliaro-Bosso, Enrica Pessione, Daniela Gastaldi, and Franco Dosio. 2018. “Cannabinoid Delivery Systems for Pain and Inflammation Treatment.” *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23102478>.
 7. Galliot, Brigitte, Marco Crescenzi, Antonio Jacinto, and Shahragim Tajbakhsh. 2017. “Trends in Tissue Repair and Regeneration.” *Development (Cambridge)* 144 (3): 357–64. <https://doi.org/10.1242/dev.144279>.
 8. Iversen, Leslie. 2003. “Cannabis and the Brain.” *Brain*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/brain/awg143>.
 9. L, Rittié. 2016. “Cellular Mechanisms of Skin Repair in Humans and Other Mammals.” *Journal of Cell Communication and Signaling* 10 (2): 103–20. <https://doi.org/10.1007/S12079-016-0330-1>.
 10. Liput, Daniel J., Dana C. Hammell, Audra L. Stinchcomb, and Kimberly Nixon. 2013. “Transdermal Delivery of Cannabidiol Attenuates Binge Alcohol-Induced Neurodegeneration in a Rodent Model of an Alcohol Use Disorder.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 111: 120–27. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.08.013>.
 11. Liu, Peng, Guiliang Chen, and Jingchen Zhang. 2022. “A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives.” *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>.
 12. Lodzki, M., B. Godin, L. Rakou, R. Mechoulam, R. Gallily, and E. Touitou. 2003. “Cannabidiol - Transdermal Delivery and Anti-Inflammatory Effect in a Murine Model.” *Journal of Controlled Release* 93 (3): 377–87. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.001>.
 13. Marzo, Vincenzo Di, Maurizio Bifulco, and Luciano De Petrocellis. 2004. “The Endocannabinoid System and Its Therapeutic Exploitation.” *Nature Reviews Drug Discovery*. *Nat Rev Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/nrd1495>.
 14. Millar, Sophie A., Nicole L. Stone, Andrew S. Yates, and Saoirse E. O’Sullivan. 2018. “A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans.” *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01365>.
 15. Millar, Sophie Anne, Ryan Francis Maguire, Andrew Stephen Yates, and Saoirse Elizabeth O’Sullivan. 2020. “Towards Better Delivery of Cannabidiol (CBD).” *Pharmaceuticals* 13 (9): 219. <https://doi.org/10.3390/ph13090219>.
 16. Munro, Sean, Kerrie L. Thomas, and Muna Abu-Shaar. 1993. “Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids.” *Nature* 365 (6441): 61–65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>.
 17. NS, Gov. 2007. “Collective Cell Migration Patterns: Follow the Leader.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (41): 15970–71. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0708037104>.
 18. Palmieri, B., C. Laurino, and M. Vadala. 2019. “A Therapeutic Effect of Cbd-Enriched Ointment in Inflammatory Skin Diseases and Cutaneous Scars.” *Clinica Terapeutica* 170 (2): E93–99. <https://doi.org/10.7417/CT.2019.2116>.
 19. Patravale, V. B., and S. D. Mandawgade. 2008a. “Novel Cosmetic Delivery Systems: An Application Update.” *International Journal of Cosmetic Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00416.x>.
 20. Patravale, V B, and S D Mandawgade. 2008b. “Novel Cosmetic Delivery Systems: An Application Update.” *International Journal of Cosmetic Science* 30 (1): 19–33. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00416.x>.
 21. Paudel, Kalpana S., Dana C. Hammell, Remigius U. Agu, Satyanarayana Valiveti, and Audra L. Stinchcomb. 2010. “Cannabidiol Bioavailability after Nasal and Transdermal Application: Effect of Permeation Enhancers.” *Drug Development and Industrial Pharmacy* 36 (9): 1088–97. <https://doi.org/10.3109/03639041003657295>.
 22. Puglia, Carmelo, and Francesco Bonina. 2012. “Lipid Nanoparticles as Novel Delivery Systems for Cosmetics and Dermal Pharmaceuticals.” *Expert Opinion on Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.666967>.
 23. R. Farooqui, and Fenteany G. 2005. “Multiple Rows of Cells behind an Epithelial Wound Edge Extend Cryptic Lamellipodia to Collectively Drive Cell-Sheet Movement.” *Journal of Cell Science* 118 (Pt 1): 51–63. <https://doi.org/10.1242/JCS.01577>.

24. Reinke, J.M., and H. Sorg. 2012. "Wound Repair and Regeneration." *European Surgical Research* 49 (1): 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>.
25. Sheriff, Tabrez, Matthew J. Lin, Danielle Dubin, and Hooman Khorasani. 2020. "The Potential Role of Cannabinoids in Dermatology." *Journal of Dermatological Treatment*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1675854>.
26. Sickle, Marja D. Van, Marnie Duncan, Philip J. Kingsley, Abdeslam Mouihate, Paolo Urbani, Ken Mackie, Nephi Stella, et al. 2005. "Neuroscience: Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB2 Receptors." *Science* 310 (5746): 329–32. <https://doi.org/10.1126/science.1115740>.
27. Sidgwick, G. P., D. McGeorge, and A. Bayat. 2015a. "A Comprehensive Evidence-Based Review on the Role of Topicals and Dressings in the Management of Skin Scarring." *Archives of Dermatological Research*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00403-015-1572-0>.
28. Sidgwick, G P, D. McGeorge, and A. Bayat. 2015b. "A Comprehensive Evidence-Based Review on the Role of Topicals and Dressings in the Management of Skin Scarring." *Archives of Dermatological Research* 307 (6): 461–77. <https://doi.org/10.1007/s00403-015-1572-0>.
29. Sorg, Heiko, Daniel J. Tilkorn, Stephan Hager, Jörg Hauser, and Ursula Mirastschijski. 2017. "Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts." *European Surgical Research* 58 (1–2): 81–94. <https://doi.org/10.1159/000454919>.
30. SW, Volk, and Bohling MW. 2013. "Comparative Wound Healing--Are the Small Animal Veterinarian's Clinical Patients an Improved Translational Model for Human Wound Healing Research?" *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 21 (3): 372–81. <https://doi.org/10.1111/WRR.12049>.
31. Tabboon, Peera, Thaned Pongjanyakul, and Ekapol Limpongsa. 2022. "Mucosal Delivery of Cannabidiol : Influence of Vehicles and Enhancers," 1–19.
32. Tóth, Kinga, Dorottya Ádám, Tamás Bíró, and Attila Oláh. 2019. "Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the 'C(Ut)annabinoid' System." *Molecules* 24 (5): 918. <https://doi.org/10.3390/molecules24050918>.
33. "U.S. Food and Drug Administration." n.d. <https://www.fda.gov/>.
34. Vikas, Yadav, Kumar Sandeep, Dutt Braham, Choudhary Manjusha, and Vikas Budhwar. 2018. "Cyclodextrin Complexes : An Approach To" 2018 (2): 394–409.
35. Watkins, Rebekah, Ling Wu, Chenming Zhang, Richey M. Davis, and Bin Xu. 2015. "Natural Product-Based Nanomedicine: Recent Advances and Issues." *International Journal of Nanomedicine* 10: 6055–74. <https://doi.org/10.2147/IJN.S92162>.
36. WC, Lambert, Cohen PJ, and Lambert MW. 1984. "Role of the Epidermis and Other Epithelia in Wound Healing: Selected Concepts." *Clinics in Dermatology* 2 (3): 24–33. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(84\)90024-5](https://doi.org/10.1016/0738-081X(84)90024-5).
37. Wickett, R. Randall, and Marty O. Visscher. 2006. "Structure and Function of the Epidermal Barrier." *American Journal of Infection Control* 34 (10): S98–110. <https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2006.05.295>.
38. Wiechers, J W, C L Kelly, T G Blease, and J C Dederen. 2004. "Formulating for Efficacy." *International Journal of Cosmetic Science* 26 (4): 173–82. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00211.x>.
39. WS, Krawczyk. 1971. "A Pattern of Epidermal Cell Migration during Wound Healing." *The Journal of Cell Biology* 49 (2): 247–63. <https://doi.org/10.1083/JCB.49.2.247>.
40. Zurier, Robert B., and Sumner H. Burstein. 2016. "Cannabinoids, Inflammation, and Fibrosis." *The FASEB Journal* 30 (11): 3682–89. <https://doi.org/10.1096/fj.201600646R>.

REVENICĂRI

1. Formula produsului **HydroSCAR** – produs dermatocosmetic cu acțiune cicatrizantă obținut prin includerea unui sistem lipozomal care încorporează canabidiol într-o bază tip hidrogel formată prin conjugarea acidului hialuronic cu o moleculă de colesterol și încorporarea acestora într-o formulă tip apă/ulei pe bază de colagen marin și ulei de cânepă. Invenția se încadrează în categoria dermatocosmeticelelor funcționalizate care vizează administrarea topică a hidro-emulsiei în ultimele două etape ale procesului de vindecare a unei plăgi - proliferare și mai ales remodelare, pentru sporirea și creșterea eficienței tratamentului sistemic, facilitarea închiderii rapide a cicatricilor, redobândirea elasticității și îmbunătățirea texturii și aspectului general al pielii.

Formula produsului propus spre brevetare are următoarea compoziție: apă – 61.7%, ulei de cânepă – 20%, sistem lipozomal pe bază de lecitină și polisorbit 80 – 10%, canabidiol – 3%, copolimer din acilați de sodiu – 2%, colagen marin – 1%, agent antibacterian/antifungic – 0.9%, conjugat HA-Col – 0.5%, glicerină – 0.5%, agenți reologici – 0.3%, vitamina E – 0.1%.