

ROMÂNIA



DUPLICAT

ELIBERAT INVENTATORULUI  
în baza Art.34 alin.(2),  
din Legea nr.64/1991 republicată

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI

# Brevet de invenție

## Nr. 129459

Acordat în temeiul Legii nr.64/1991 privind brevetele de invenție, republicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr.613, din 19 august 2014.

Titular: INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI", MĂGURELE, IF, RO

Titlul invenției: PROCEDU DE OBTINERE A MARKERULUI ENZIMATIC ACID 2,4-DICLOROFENOXIACETIC-HEXAMETILENDIAMIN-PEROXIDAZĂ

Inventatori: DOROBANȚU IOAN, BUCUREȘTI, B, RO; NEAGU LIVIA, BUCUREȘTI, B, RO

Descrierea invenției, revendicările și desenele la care se face referință în acestea, fac parte integrantă din prezentul brevet de invenție.

Durata brevetului de invenție este de 20 ani, cu începere de la data de 26/11/2012, cu condiția plății taxelor anuale de menținere în vigoare a brevetului.

Confirm cele de mai sus prin  
semnarea și aplicarea sigiliului  
Director General

București, Data eliberării 29/11/2017





(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00869

(22) Data de depozit: 26/11/2012

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: 29/11/2017 BOPI nr. 11/2017

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2014 BOPI nr. 6/2014

(73) Titular:

• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI  
INGINERIE NUCLEARĂ  
"HORIA HULUBEI", STR. REACTORULUI  
NR. 30, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:

• DOROBANȚU IOAN,  
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR. 1, BL. OD 2,  
SC. C, AP. 110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• NEAGU LIVIA,  
STR. ALEXANDRU LĂPUȘNEANU NR. 81,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

RO 125536 B1; P. K. NAKANE, A. KAWAOI,  
"PEROXIDASE-LABELED ANTIBODY  
A NEW METHOD OF CONJUGATION",  
THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY  
AND CYTOCHEMISTRY, NR. 12, VOL. 22,  
PP. 1084-1091, 1974; L. P. BUDNIKOVA,  
A. N. ERYOMIN, "SYNTHESIS AND  
PROPERTIES OF HORSE RADISH  
PEROXIDASE COPOLYMERS",  
APPLIED BIOCHEMISTRY AND  
MICROBIOLOGY, NR. 2, VOL. 42,  
PP. 127-133, 2006

(54)

**PROCEDEU DE OBTINERE A MARKERULUI ENZIMATIC  
ACID 2,4-DICLOROFENOXIACETIC-  
-HEXAMETILENDIAMIN-PEROXIDAZĂ**



1           Invenția se referă la un procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 2,4-diclorofen-  
3           oxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază utilizat în tehnica imunochimică în fază omogenă,  
pentru dozarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic din probe biologice și de mediu.

5           În prezent, sunt cunoscuți markeri enzimatici realizați prin cuplarea directă a pestici-  
7           dului cu enzimă prin activarea acestuia cu carbodiimida, utilizând enzime ca fosfataza alca-  
9           lină cu masa moleculară mare sau prin intermediul unei punți de legătură între enzimă și pes-  
11          tucid, iar aceștia pot fi utilizați în tehnica ELISA (tehnica imunochimică de analiză care folo-  
13          sește markeri enzimatici cuplați la imunosorbent-faza solidă, care au la suprafață compo-  
nente imune, anticorpi sau antigene) heterogenă, cuplajul componentului imun, anticorpul  
la suprafață de plastic a godeurilor plăcii ELISA, și nu pot fi utilizați în faza omogenă (cazul  
în care cele două componente, anticorpul și antigenul fiind în soluție, iar separarea com-  
plexului imun de markerul enzimatic nereacționat este dificilă din cauza masei moleculare  
mari a acestuia). Un alt dezavantaj este scăderea activității enzimatice a markerului în timpul  
sintezei.

15          Brevetul RO 125536 B1 descrie un procedeu care cuprinde activarea grupării carboxil  
17          a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic prin reacția acestuia cu N-hidroxisuccinimidă  
și 1-etil-3(-3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 2 ml dimetilformamidă, cuplarea pesticidului  
19          activat de hexametildiamină în tampon carbonat de sodiu 50 mM la pH 9,6, urmată de  
purificarea derivatului obținut prin cromatografie pe coloană, iar apoi de cuplare la fosfatază  
alcalină.

21          În lucrarea științifică "Peroxidase-Labeled Antibody A New Method of  
23          Conjugation", *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1974, Vol. 22, Nr. 12,  
pp.1084-1091, avându-i ca autori pe P. K. Nakane și A. Kawaoi, se prezintă o metodă de  
25          conjugare a peroxidazei din hrean cu proteine. Metoda presupune blocarea grupărilor α- și  
ε-amino și a grupărilor hidroxil, rămase libere în molecula peroxidazei, cu 2,4-dinitrofluor-  
27          benzen (FDNB) în prezență de bicarbonat de sodiu și etanol, urmată de dializă și de oxida-  
rea peroxidazei cu NaIO<sub>4</sub>, cu formarea aldehyd-peroxidazei, care ulterior poate fi cuplată la  
un anticorp, iar conjugatul obținut poate fi stabilizat cu NaBH<sub>4</sub>. Metoda descrisă este com-  
29          plexă, consumatoare de timp, iar produșii de oxidare pot afecta pe termen lung activitatea  
enzimei.

31          Lucrarea științifică "Synthesis and Properties of Horseradish Peroxidase  
33          Copolymers", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, Vol. 42, Nr. 2, pp. 127-133,  
avându-i ca autori pe L.P. Budnikova și N. Eryomin, prezintă obținerea unui copolimer al  
35          peroxidazei native prin oxidarea peroxidazei cu periodat de sodiu, reacția peroxidazei oxidate  
cu hexametildiamină și peroxidază, copolimerul obținut fiind ulterior redus cu borohidruură  
37          de sodiu. Copolimerul peroxidază-hexametilendiamină nu este însă un indicator pentru  
utilizare ca marker pesticid-diamină-peroxidază în tehnica ELISA.

39          Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a obține marker enzimatic care  
să poată fi utilizat în tehnica imunochimică pentru dozarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic  
din probe biologice și de mediu.

41          Procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexa-  
metilen-peroxidază conform invenției se caracterizează prin aceea că:

43          - se dizolvă 25 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 100 mg  
45          1-etil-3(-3'-diaminopropil)carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă la temperatura camerei, timp  
de 3 h, rezultând un amestec de pesticid activat, care se introduce peste o soluție de hexa-  
47          metildiamină 8 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și se lasă ca acestea  
să reacționeze timp de 3 h, obținându-se un derivat acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilen-  
diamină,

# RO 129459 B1

- se oxidează 5 mg de peroxidază cu 0,5 ml  $\text{NaIO}_4$  30mg/ml timp de 30 min, iar apoi se purifică prin cromatografie pe coloană Sephadex G25 pentru îndepărtarea agentului oxidant, rezultând un eluat enzimatic care conține 4,5 ml enzimă,

- amestecul format de eluatul enzimatic, conținând 4,5 mg enzimă, se supune, timp de 3 h, reacției cu 200  $\mu\text{l}$  soluție de derivat 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamină, produsul 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază fiind apoi purificat prin cromatografie pe Sephadex G25, redus cu 200  $\mu\text{l}$   $\text{NaBH}_4$  5 mg/ml și purificat din nou pe Sephadex G25, soluția de marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamin-peroxidază fiind, în final, amestecată cu glicerol în proporție volumică 1:1 (v/v) și depozitată la  $-20^\circ\text{C}$ , în vederea utilizării în tehnica imunochimică.

Procedeul conform invenției prezintă atât avantajul că produsul marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamin-peroxidază prezintă o activitate enzimatică specifică ridicată, cât și avantajul că acest produs se obține într-un timp mult mai scurt, de aproximativ 3...5 h, față de procedeele descrise pentru alți conjugați peroxidază-proteine din stadiul tehnicii.

Procedeul conform invenției constă în aceea că 25 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 100 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă se dizolvă în 1 ml dimetilformamidă și se agită 3 h în vederea activării grupării carboxi a pesticidului. Amestecul de pesticid activat se introduce peste 8 mg hexametilendiamină în 1 ml tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și lăsat să reacționeze 3 h pentru cuplarea diaminei la pesticid și obținerea derivatului acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamină, ce este utilizat la cuplarea cu enzima. 5 mg de enzimă peroxidază ce conține circa 20% carbohidrați în structură, dizolvată în 1 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2, a fost tratată cu 0,5 ml soluție de  $\text{NaIO}_4$  (periodat de sodiu) 30 mg/ml în vederea oxidării carbohidratului existent pe suprafața enzimei, timp de 30 min, după care a fost purificată prin cromatografie pe Sephadex G25 în vederea separării de agentul oxidant. Eluatul enzimatic (4,5 mg enzimă) rezultat în operația de cromatografiere a fost amestecat cu 200  $\mu\text{l}$  soluție de derivat 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamină, iar reacția de cuplare între enzimă și derivatul pesticidic s-a desfășurat timp de 3 h, urmat de purificare pe Sephadex G25.

Eluatul ce conține markerul enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamina-peroxidază (baza Schiff formată) rezultat din cromatografiere a fost redus prin amestec cu 200  $\mu\text{l}$   $\text{NaBH}_4$  (borohidruură de sodiu) 5 mg/ml și în final purificat din nou pe Sephadex G25 și eluatul enzimatic amestecat în final cu glicerol în proporție volumică 1:1 (v/v) și depozitat la  $-20^\circ\text{C}$  în vederea utilizării în tehnica imunochimică. Procedeul de obținere a markerului enzimatic constă în 7 etape, E1...E7.

E1) Activarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic

O soluție de 25 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 100 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă sunt agitate 3 h în vederea activării grupării carboxi a pesticidului.

E2) Cuplarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic cu hexametilendiamina

Amestecul de pesticid activat rezultat în etapa E1 se introduce peste o soluție de hexametilendiamină 8 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, iar reacția de cuplare s-a desfășurat pe o durată de 3 h.

E3) Reacția de oxidare a carbohidratului peroxidazei

1 ml peroxidază 5 mg/ml în tampon fosfat 10 mM pH 7,2 a fost tratat cu 0,5 ml soluție de  $\text{NaIO}_4$  30 mg/ml timp de 30 min pentru oxidarea carbohidratului enzimei.

E4) Purificarea produsului oxidat

Soluția rezultată în etapa E3 (1,5 ml) a fost cromatografiată pe coloana de Sephadex G25 ( $\Phi = 1$  cm, H = 30 cm) pentru îndepărtarea agentului oxidant.

1 E5) Reacția de cuplare a peroxidazei oxidate cu derivatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic  
 cu hexametildiamina

3 Eluatul enzimatic (4,5 mg enzimă) rezultat în etapa E4 a fost amestecat cu 200  $\mu$ l  
 soluție de derivat acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilenamina rezultat în etapa E2 pe  
 5 durata de 3 h.

7 E6) Purificarea și reducerea bazei Schiff formate

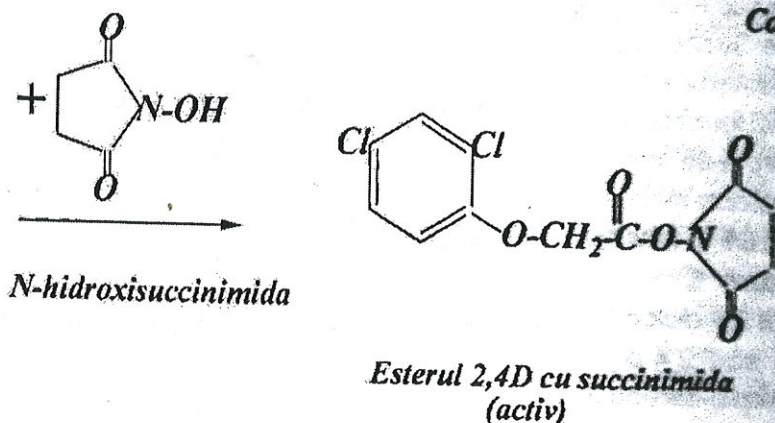
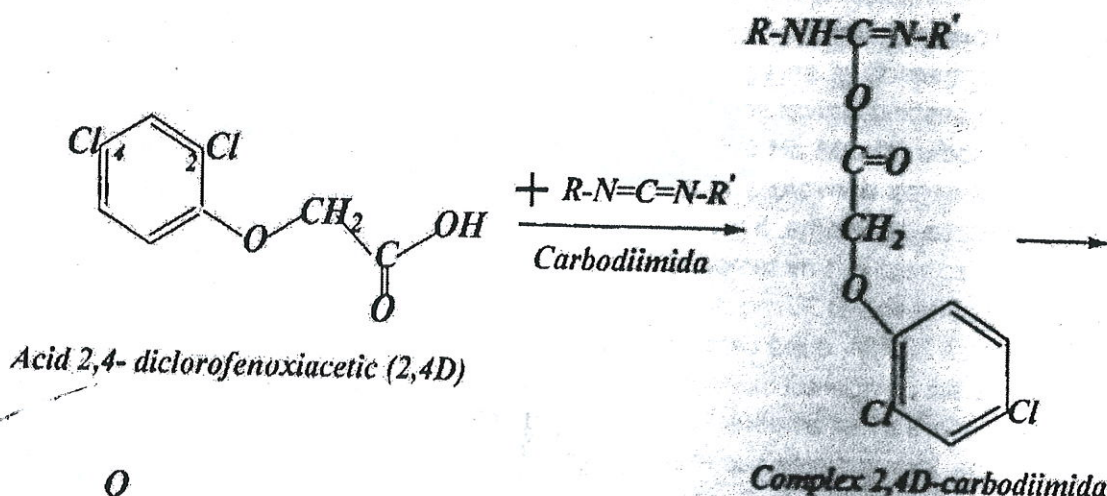
Amestecul chimic din etapa E5 a fost cromatografiat pe Sephadex G25, iar baza  
 Schiff formată a fost redusă cu 200  $\mu$ l soluție de  $\text{NaBH}_4$  5 mg/ml.

9 E7) Purificarea markerului enzimatic

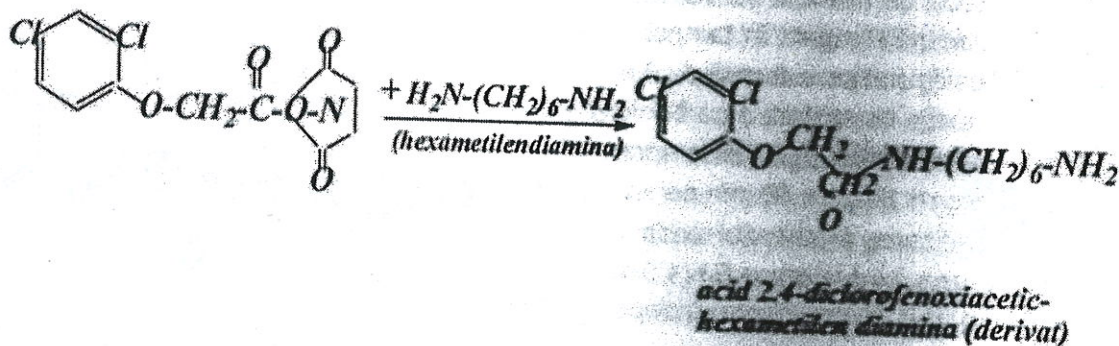
11 Amestecul din etapa E6 a fost cromatografiat pe Sephadex G25 cu eluent tampon  
 fosfat 10 mM la pH 7,2, iar soluția de marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic- hexa-  
 metilendiamin-peroxidază a fost amestecată cu glicerol în proporție volumică 1:1 (v/v) și  
 13 depozitată la  $-20^\circ\text{C}$  în vederea utilizării acesteia în tehnicile imunochimice.

15 Etape în obținerea markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilen-  
 diamin-peroxidază

17 E1: Reacția de activare a acidului 2,4-diclorofenoxiacetic

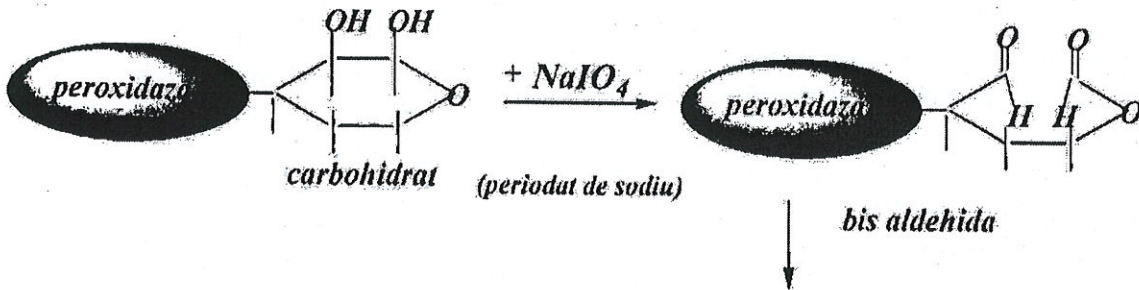


41 E2: Reacția de cuplare a acidului 2,4-diclorofenoxiacetic activat cu hexametilen  
 diamina



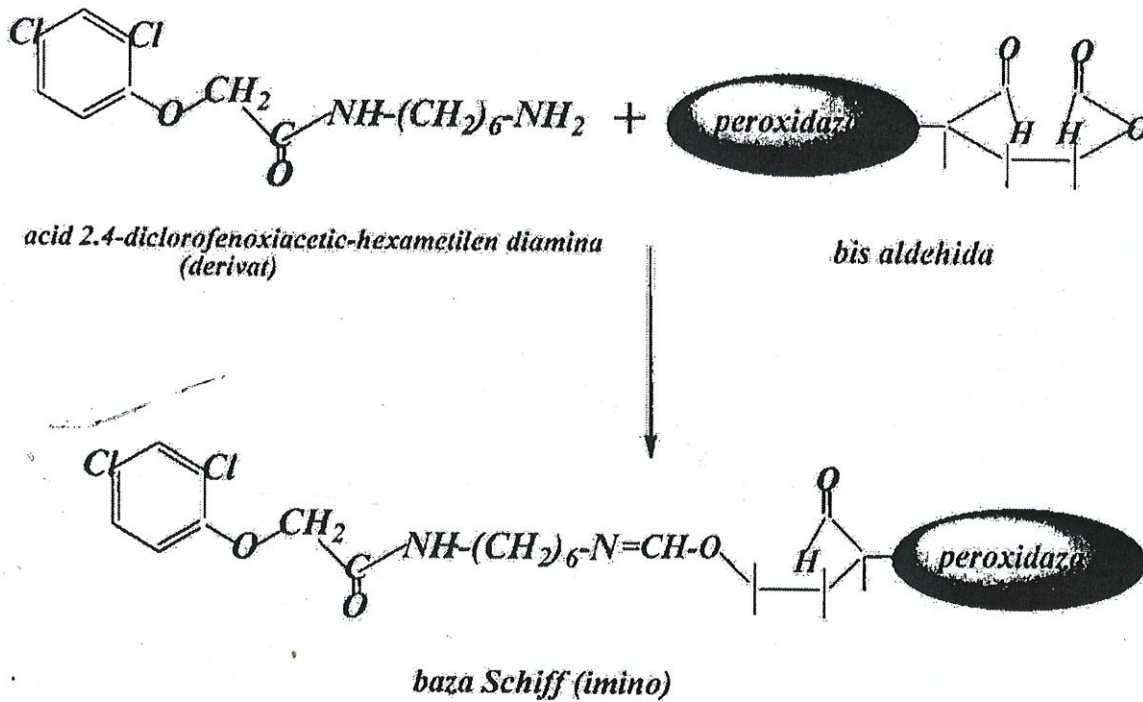
# RO 129459 B1

E3: Reacția de oxidare a carbohidratului peroxidazei

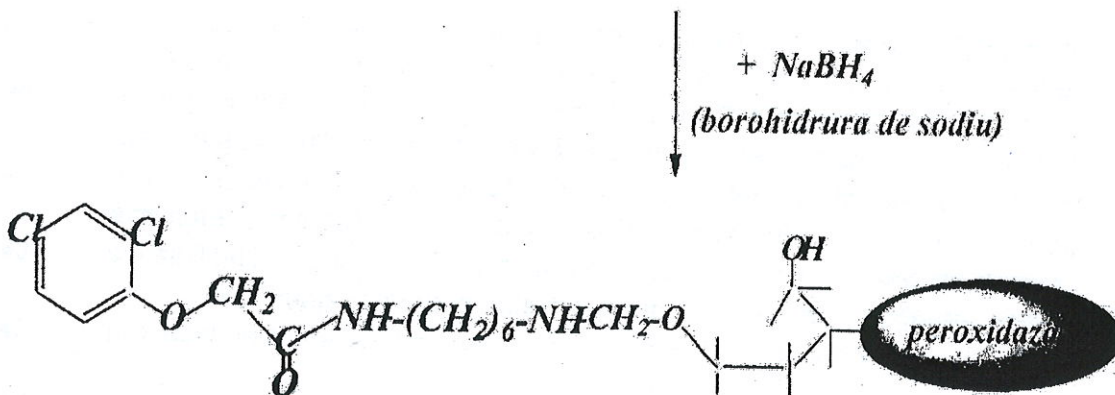


E4: Purificarea produsului oxidat prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25 (operația de îndepărtare a agentului oxidant)

E5: Reacția de cuplare a peroxidazei oxidate cu derivatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilen diamina



E6: Reacția de reducere a bazei Schiff formate



1 Marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamin-peroxidază  
E7: Purificarea markerului enzimatic

3 Purificare prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25.

5 În continuare, se prezintă o serie de date experimentale privind **activitatea** enzimatică  
a markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază, care sunt  
în legătură și cu fig. 1 și 2.

7 Fig. 1 - cinetica de reacție enzimatică; Condiții de reacție: **enzima PRH** 10 ng/ml în  
tampon fosfat 10 mM pH 7,2 și substratul enzimatic 50  $\mu$ l TMB 2,5 mg/ml în amestec acid  
9 acetic:apă 1:10 (v/v), 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Reacția de oxidare a fost **stopată** prin separarea  
cromatografică pe Sephadex G25 a enzimei PRH de oxidant (NaIO<sub>4</sub>);

11 Fig. 2 - calculul timpului de înjumătățire al **activității enzimatică** a PRH obținut din  
cinetica de reacție la 2 min.

13 Cantități egale de enzimă peroxidază (PRH peroxidase from horseradish, type VI-A,  
15 1550 unități/mg solid) au fost puse în reacție cu oxidantul NaIO<sub>4</sub> 30 mg/ml în tampon fosfat  
10 mM pH 7,2. Reacția de oxidare a fost oprită prin separarea **componentelor** reacției  
17 (enzima oxidată, respectiv oxidantul NaIO<sub>4</sub>) prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25,  
(30 x 1) cm eluent tampon fosfat 10 mM, pH 7,2. Timpii de oxidare ai **enzimei PRH** aleși au  
19 fost 3 min, 30 min, 60 min, 6 h și 24 h. Eluatul care conține **enzima oxidată** a fost colectat,  
iar **activitatea specifică enzimatică** a fost comparată față de **martor (enzima fără oxidant)**.  
21 Rezultatele analizei sunt redate în graficul de mai jos.

23 *Tabelul 1*  
Scăderea **activității enzimatică** a PRH în timp, în prezența oxidantului NaIO<sub>4</sub>, unde  $A_p$   
25 este **activitatea PRH oxidată** proporțională cu **densitatea optică a PRH măsurată la**  
lungimea de undă de 450 nm (maximul de absorbție al substratului TMB-  
27 tetrametilbenzidină oxidat de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> în prezența PRH) la 2 min, și  $A_M$  este  
activitatea PRH neoxidată proporțională cu **densitatea optică a PRH măsurată la**  
lungimea de undă de 450 nm la 2 min

29 Timp de oxidare	$A_p/A_M$ (%)
31 3 min	98,20
30 min	85,40
33 60 min	70,80
6 h	49,35
35 24 h	13,26

37 Concluzie:

La 30 min, **activitatea enzimatică** în procesul de oxidare al PRH, în comparație cu cea  
de la 3 min, este de 85,4% față de 98,2%, deci intervalul de timp de oxidare este optim  
39 pentru obținerea markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-  
peroxidază. **Activitatea enzimatică** la 24 h duce la o scădere de 84,94% față de cea de la  
41 3 min, rezultând în final, dacă s-ar aplica procedura de oxidare la 24 h, un produs cu  
activitate enzimatică specifică de 8,49 ori mai mică, ceea ce ar rezulta la scăderea  
43 sensibilității de analiză prin folosirea produsului final în sisteme de dozare.

45 Din datele experimentale de cinetică enzimatică obținute, **activitatea enzimei** în  
procesul de oxidare a fost reprezentată considerând modelul:

$$47 A_p = A_M e^{-\frac{\ln 2}{T_{1/2}} t_{oxidare}}$$

# RO 129459 B1

unde:

$A_p$  - activitatea enzimatică a probei oxidate proporțională cu densitatea optică a probei martor la lungimea de undă de 450 nm;

$A_M$  - activitatea enzimatică a martorului, enzima PRH neoxidată proporțională cu densitatea optică a probei oxidată la lungimea de undă de 450 nm;

$T_{1/2}$  - timpul mediu de oxidare care reduce activitatea enzimei la 50% față de martor (enzima neoxidată) - timp de înjumătățire al activității enzimatice;

$t_{oxidare}$  - este timpul de oxidare în cazul de față de 3 min, 30 min, 60 min, 6 h și 24 h.

Tabelul 2

Datele experimentale utilizate la calculul timpului de înjumătățire al activității enzimatice a PRH

Timp de oxidare	$A_p/A_M$	$2,303 \log(A_M/A_p)$
3 min	0,9858	0,014
30 min	0,8540	0,158
60 min	0,7081	0,345
6 h	0,4935	0,706
24 h	0,1325	2,021

Din fig. 2, rezultă că  $T_{1/2}$ , timpul mediu de oxidare care reduce activitatea enzimei la 50% față de martor (enzima neoxidată), este 8,78 h.



## Revendicare

1

3

Procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilen-peroxidază, caracterizat prin aceea că:

5

- se dizolvă 25 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 100 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)carbodiimida în 1 ml dimetilformamidă la temperatura camerei, timp de 3 h, rezultând un amestec de pesticid activat, care se introduce peste o soluție de hexametilendiamină 8 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și se lasă ca acestea să reacționeze timp de 3 h, obținându-se un derivat acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamină;

7

9

11

- se oxidează 5 mg de peroxidază cu 0,5 ml  $\text{NaIO}_4$  30 mg/ml timp de 30 min, iar apoi se purifică prin cromatografie pe coloană Sephadex G25 pentru îndepărtarea agentului oxidant, rezultând un eluat enzimatic care conține 4,5 ml enzimă;

13

15

- amestecul format de eluatul enzimatic, conținând 4,5 mg enzimă, se supune, timp de 3 h, reacției cu 200  $\mu\text{l}$  soluție de derivat 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamină, produsul 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază fiind apoi purificat prin cromatografie pe Sephadex G25, redus cu 200  $\mu\text{l}$   $\text{NaBH}_4$  5 mg/ml și purificat din nou pe Sephadex G25, soluția de marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamin-peroxidază fiind, în final, amestecată cu glicerol în proporție volumică 1:1 (v/v) și depozitată la  $-20^\circ\text{C}$  în vederea utilizării în tehnica imunochimică.

17

19

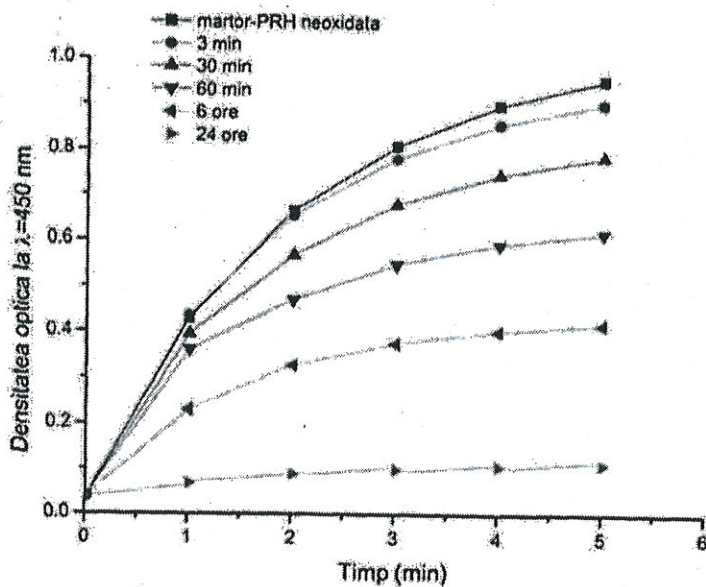


Fig. 1

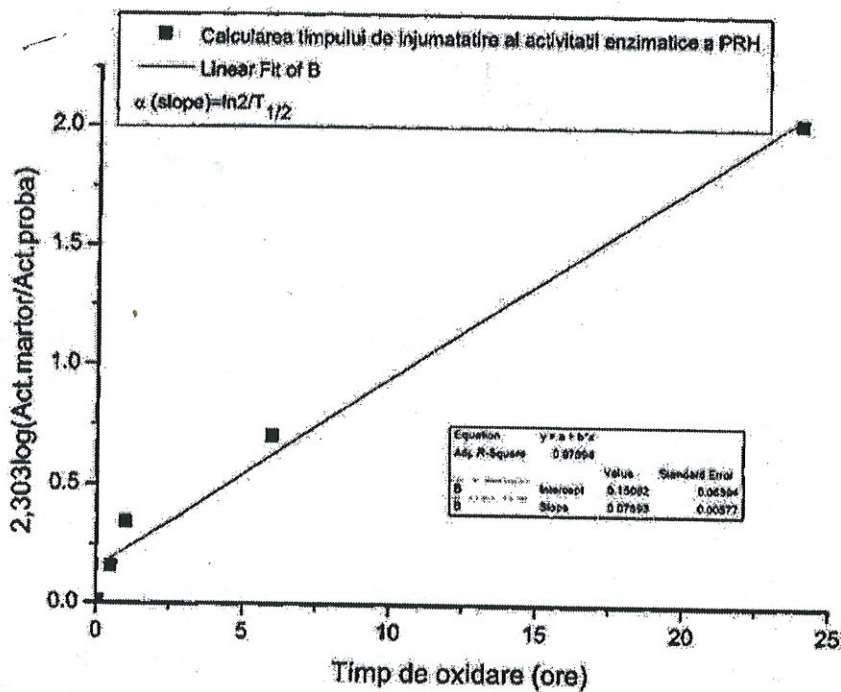


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 585/2017

**Extras din Legea nr. 64/1991 privind brevetele de invenție,  
republicată în Monitorul Oficial al României,  
Partea I, nr. 541 din 8 august 2007**

**ART. 30** (1) Brevetul de invenție este eliberat de directorul general al OSIM, în temeiul hotărârii de acordare a acestuia. Pentru brevetul european, OSIM certifică validitatea brevetului în România, conform legii.

(2) Data eliberării brevetului de invenție este data la care mențiunea hotărârii de acordare este publicată în Buletinul Oficial de Proprietate Industrială.

(3) Brevetele se înscriu în Registrul național al brevetelor de invenție.

**ART. 32** (1) Brevetul de invenție conferă titularului său un drept exclusiv de exploatare a invenției pe întreaga sa durată.

(2) Este interzisă efectuarea fără consimțământul titularului a următoarelor acte:

a) fabricarea, folosirea, oferirea spre vânzare, vânzarea sau importul în vederea folosirii, oferirii spre vânzare ori vânzării, în cazul în care obiectul brevetului este un produs;

b) utilizarea procedului, precum și folosirea, oferirea spre vânzare, vânzarea sau importul în aceste scopuri al produsului obținut direct prin procedeul brevetat, în cazul în care obiectul brevetului este un procedeu.

**ART. 34** (1) Nu constituie încălcarea drepturilor prevăzute la art. 32 și 33.

a) folosirea invențiilor în construcția și în funcționarea vehiculelor terestre, aeriene, precum și la bordul navelor sau la dispozitivele pentru funcționarea acestora, aparținând statelor membre ale tratatelor și convențiilor internaționale privind invențiile, la care România este parte, când aceste vehicule sau nave pătrund pe teritoriul României, temporar sau accidental, cu condiția ca această folosire să se facă exclusiv pentru nevoile vehiculelor sau navelor;

b) efectuarea oricărui dintre actele prevăzute la art. 32 alin. (2) de către o persoană care a aplicat obiectul brevetului de invenție sau cel al cererii de brevet, așa cum a fost publicată, ori a luat măsuri efective și serioase în vederea producerii sau folosirii lui cu bună-credință pe teritoriul României, independent de titularul acestuia, cât și înainte de constituirea unui depozit național reglementar privind invenția sau înainte de data la care curge termenul de prioritate recunoscută; în acest caz, invenția poate fi folosită în continuare de acea persoană în volumul existent la data de depozit sau a priorității recunoscute și dreptul de folosire nu poate fi transmis decât cu patrimoniul persoanei ori cu o fracțiune din patrimoniul afectat exploatarea invenției;

c) efectuarea oricărui dintre actele prevăzute la

necomercial; producerea sau, după caz, folosirea invenției exclusiv în cadru privat și în scop necomercial;

d) comercializarea sau oferirea spre vânzare pe teritoriul Uniunii Europene a acelor exemplare de produs, obiect al invenției, care au fost vândute anterior de titularul de brevet ori cu acordul său expres;

e) folosirea în scopuri experimentale, exclusiv cu caracter necomercial, a obiectului invenției brevetate;

f) folosirea cu bună-credință sau luarea măsurilor efective și serioase de folosire a invenției de către terți în intervalul de timp dintre decăderea din drepturi a titularului de brevet și revalidarea brevetului. În acest caz, invenția poate fi folosită în continuare de acea persoană în volumul existent la data publicării mențiunii revalidării și dreptul la folosire nu poate fi transmis decât cu patrimoniul persoanei care utilizează invenția ori cu o fracțiune din patrimoniul care este afectat exploatarea intervenției;

g) exploatarea de către terți a invenției sau a unei părți a acesteia la a cărei protecție s-a renunțat.

(2) Orice persoană care, cu bună-credință, folosește invenția sau a făcut pregătiri efective și serioase de folosire a invenției, fără ca această folosire să constituie o încălcare a cererii de brevet sau a brevetului european în traducerea inițială, poate, după ce traducerea corectată are efect, să continue folosirea invenției în întreprinderea sa ori pentru necesitățile acesteia, fără plată și fără să depășească volumul existent la data la care traducerea inițială a avut efect.

**ART. 43** (1) Procedurile efectuate de OSIM privind cererile de brevet de invenție și brevetele de invenție prevăzute de prezenta lege și de regulamentul de aplicare a acesteia sunt supuse taxelor, în cuantumurile și la termenele stabilite de lege.

(2) Pe întreaga durată de valabilitate a brevetului de invenție, titularul datorează anual taxe de menținere în vigoare a brevetului.

(3) Neplata acestor taxe atrage decăderea titularului din drepturile decurgând din brevet. Decăderea titularului din drepturi se înregistrează în Registrul național al brevetelor de invenție și se publică în Buletinul Oficial de Proprietate Industrială. Taxele de menținere în vigoare pot fi plătite și anticipat, în condițiile prevăzute de regulamentul de aplicare a prezentei legi, pentru o perioadă care nu poate depăși 4 ani.

(4) Taxele datorate de persoane fizice sau juridice străine se plătesc în valută în contul OSIM