

ROMÂNIA



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI

BREVET DE INVENȚIE

Nr. 130378

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 PRODUSULUI ACID 2,
4-DICLOROFENOXI-AMIDOPROPILEN-AMIDO BIOTINA

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 28/11/2013, 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 30/07/2018



(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
București

ROMÂNIA



(11) **RO 130378 B1**
(51) Int.Cl.
G01N 33/535 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00936**

(22) Data de depozit: **28/11/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/07/2018** BOPI nr. 7/2018

(41) Data publicării cererii:
30/06/2015 BOPI nr. 6/2015

(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:
**J. KAUR ȘI AL., "DIRECT HAPTEN
COATED IMMUNOASSAY FORMAT FOR
THE DETECTION OF ATRAZINE AND 2,4-
DICHLOROPHENOXYACETIC ACID
HERBICIDES", ANALITICA CHIMICA ACTA
607, PP. 92-99, 2008; RO 116460 B1**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A PRODUSULUI ACID
2,4-DICLOROFENOXI-AMIDOPROPILEN-AMIDO BIOTINĂ**

Examinator. biochimist **BABALIGEA IRINA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și
motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de
invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii
hotărârii de acordare a acesteia

RO 130378 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui marker utilizat în tehnica
3 imunochimică, în fază omogenă, pentru dozarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic în
5 probe biologice și de mediu.

7 În prezent sunt cunoscuți markeri enzimatici realizați prin cuplarea directă a
9 pesticidului activat cu carbodiimida, utilizând enzime ca fosfataza alcalină, sau indirectă, ca
11 peroxidaza, printr-o legare covalentă la o diamină ce formează o legătură între pesticid și
13 proteină (enzima). Markerii enzimatici obținuți și utilizați în tehnicile imunochimice de dozare
15 au mase moleculare mari și, în consecință, prezintă o cinetică de reacție lentă în reacție cu
17 anticorpus antipesticid.

19 Problema tehnică pe care rezolvă invenția este de a furniza un marker care să poată
21 fi utilizat în tehnica imunochimică, în fază omogenă, pentru dozarea pesticidului acid 2,4-
23 diclorofenoxiacetic, în probe biologice și de mediu, și care să asigure un timp cât mai scurt
25 de analiză a probei.

27 Procedeul de obținere a markerului biotinic acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-
29 amido biotină, conform invenției, constă în aceea că:

31 - se dizolvă 5 mg biotin-NHS în 1 ml dimetilsulfoxid, iar soluția rezultată se adaugă
33 picătură cu picătură, sub agitare, la 4 ml soluție de 150 mg 1,3-diaminopropan dizolvat în
35 tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH = 9,6, se lasă să reacționeze timp de 3 h la
37 temperatura camerei, pentru cuplarea diaminei la biotină, cu formarea derivatului biotin-
39 amidopropilenamină, care este purificat pe coloană de Sephadex G-10, având ca eluent
41 tamponul carbonat de sodiu 50 mM, pH = 9,6;

43 - se dizolvă 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 30 mg
45 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă, timp de 3 h, la temperatura
47 camerei, rezultând un amestec de pesticid activat;

49 - se amestecă 2 ml din fracțiunea ce conține derivatul biotin-amidopropilenamină cu
51 0,5 ml soluție de pesticid activat, și se lasă să reacționeze sub agitare la temperatura
53 camerei, timp de 3 h, iar produsul acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină obținut
55 este separat pe coloană de Sephadex G-10, având ca solvent de eluție tampon fosfat
57 10 mM, pH = 7,2, și, în final, este purificat prin cromatografie în strat subțire pe silicagel G,
59 extracție cu alcool etilic și centrifugare la 1500 x g timp de 10 min, și depozitat la -20°C, în
61 vederea utilizării acestuia în tehnica imunochimică de dozare a pesticidului acid 2,4-
63 diclorofenoxiacetic.

65 Avantajul produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina, având masă
67 moleculară mică, este acela că în reacția imună dintre pesticidul ce urmează a fi determinat
69 și anticorpus omolog (anticorpus anti 2,4-D) prezintă o cinetică rapidă, un timp scurt pentru
71 atingerea echilibrului chimic dintre componente față de markerii enzimatici sus menționați
73 și, în consecință, un timp scurt de analiză a probei.

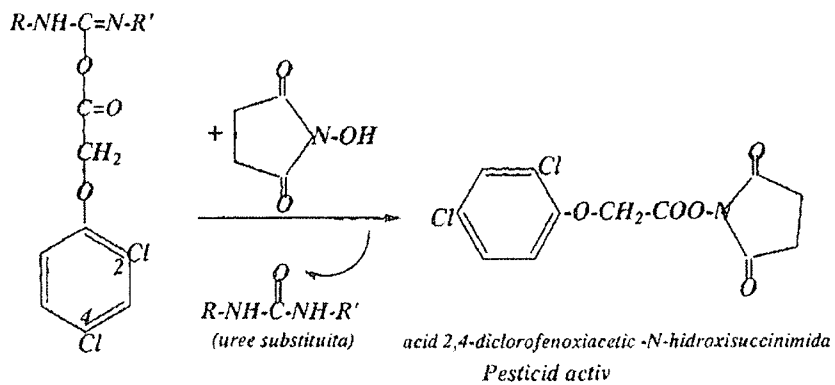
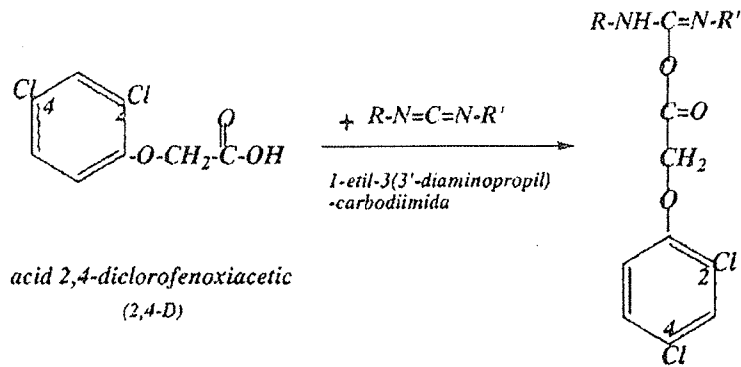
75 Procedeul conform invenției constă în aceea că 5 mg de biotin-NHS, dizolvată în
77 1 ml dimetilsulfoxid (DMSO), este introdusă picătură cu picătură, sub agitare continuă, peste
79 4 ml soluție de 1,3-diaminopropan 150 mg dizolvată în tampon carbonat de sodiu 50 mM,
81 pH = 9,6. Amestecul sub agitare este lăsat să reacționeze timp de 3 h, iar produsul biotin-
83 propilen amina se separă prin cromatografie pe coloana de Sephadex G-10 (H = 30 cm,
85 Φ = 1 cm), având ca eluent soluția de tampon carbonat 50 mM, pH = 9,6. Produsul biotin-
87 propilen amina este utilizat la cuplare cu pesticidul acid 2,4-diclorofenoxiacetic activat cu
89 carbodiimidă și N-hidroxisuccinimidă. Pentru activarea pesticidului, se dizolvă într-un volum
91 de 1 ml de dimetil formamida (DMF) 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-
93 hidroxisuccinimidă și 30 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă, și se agită 3 h, în
95 vederea activării grupării carboxi a pesticidului. În final 0,5 ml de soluție de pesticid activat
97 în DMF se adaugă picătură cu picătură, sub agitare, la 2 ml soluție de biotin-propilen amina.

RO 130378 B1

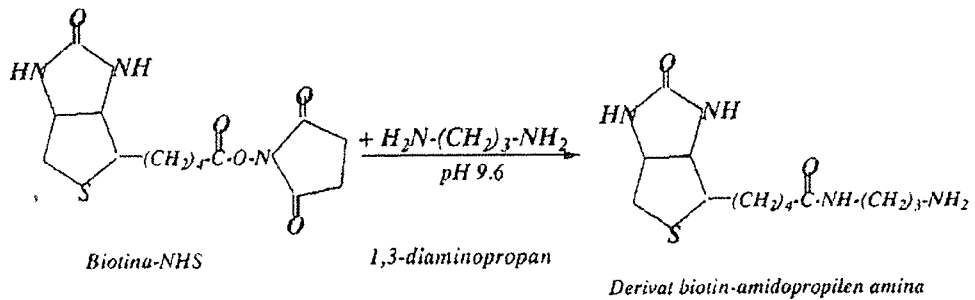
Amestecul se lasă timp de 3 h sub agitare la temperatura camerei, iar produsul obținut, acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina, se separă prin cromatografie pe coloana de Sephadex G10, iar fracțiunea ce conține produsul este purificată pe cromatografie în strat subțire de silicagel G având ca eluent amestecul benzemacetona 3:1 (V/V). Pudra de silicagel G care conține produsul se extrage cu alcool etilic, iar silicagelul este înlăturat prin centrifugare la 1500 xg, timp de 10 min. Produsul acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina în alcool etilic se depozitează la -20°C, în vederea utilizării acestuia în tehnica imunochimică de dozare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic. Procedul de obținere a markerului cu biotina constă în 6 etape, E1+E6.	1 3 5 7 9
E1) <i>Activarea pesticidului acidului 2,4-diclorofenoxiacetic cu 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă</i>	11
O soluție de 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D), 10 mg N-hidroxisuccinimidă (NHS) și 30 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă, și se agită 3 h, în vederea activării grupării carboxi a pesticidului.	13
E2) <i>Cuplarea biotinei-NHS cu 1,3-diaminopropan</i>	15
5 mg biotin-NHS se dizolvă în 1 ml dimetilsulfoxid (DMSO), iar soluția obținută se introduce picătură cu picătură, sub agitare, peste 4 ml soluție de 150 mg 1,3-diaminopropan dizolvat în tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH = 9,6 iar reacția de cuplare se desfășoară pe o durată de 3 h, la temperatura camerei.	17 19
E3) <i>Purificarea derivatului biotin-amidopropilen amină</i>	21
Amestecul de reacție obținut în etapa 2 este cromatografiat pe coloana de Sephadex G-10 (H = 30 cm, Φ = 1 cm), având ca eluent tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH = 9,6.	23
E4) <i>Reacție de cuplare a pesticidului activat (E1) la biotin-amidopropilen amină</i>	25
0,5 ml soluție de pesticid activat, obținut în etapa 1, este introdusă picătură cu picătură sub agitare peste 2 ml soluție de biotin-propilen amina obținut în etapa 3. Reacția de cuplare a pesticidului la biotin-propilen amină se desfășoară pe o perioadă de 3 h, la temperatura camerei.	27
E5) <i>Separarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină pe Sephadex G-10</i>	29
Amestecul de reacție rezultat în etapa 4 este cromatografiat pe coloana de Sephadex G-10, iar eluentul este tampon fosfat de sodiu 10 mM, pH = 7,2.	31
E6) <i>Purificarea compusului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină</i>	33
Fracțiunea ce conține produsul acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina, rezultat în etapa 5, este cromatografiat pe cromatografie în strat subțire de silicagel G, având ca eluent amestecul benzen:acetonă 3:1 (V/V). După uscarea plăcii, pudra din zona ce conține produsul este extrasă cu alcool etilic, iar silicagelul este îndepărtat prin centrifugare la 1500 x g, timp de 10 min. Produsul purificat se depozitează în alcool etilic la temperatura de -20°C, în vederea utilizării.	35 37 39

RO 130378 B1

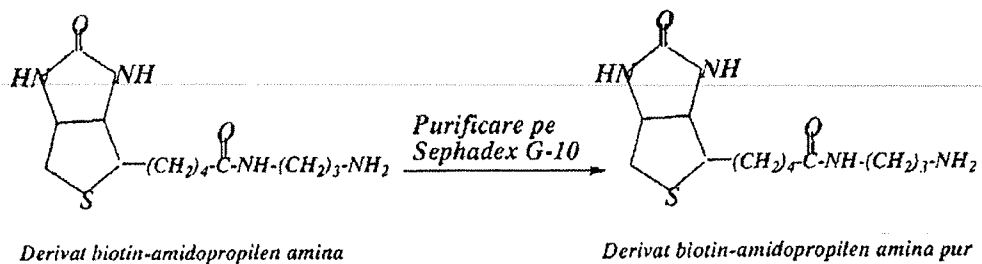
1 E1. Activarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)-
 3 carbodiimidă



25 E2. Cuplarea biotinei-NHS cu 1,3-diaminopropan



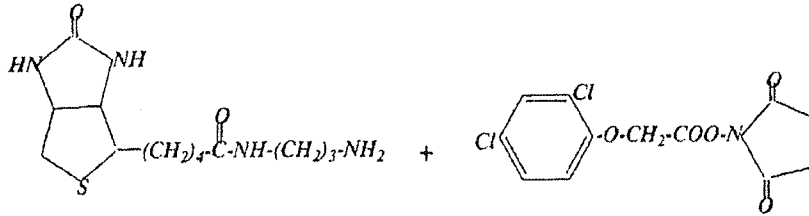
37 E3. Purificarea derivatului biotin-amidopropilen amină



RO 130378 B1

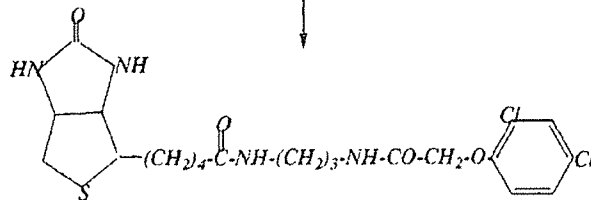
i)-

E4. Reacția de cuplare a pesticidului activat (E1) la biotin-amidopropilen amină



Derivat biotin-amidopropilen amina
(Soluție în carbonat de sodiu 50 mM
pH9,6)

Acid 2,4-diclorofenoxiacetic-NHS
(soluție în dimetil formamida)



acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

E5. Separarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină pe Sephadex G10

acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

Separare produs pe
Sephadex G-10

acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

E6. Purificarea compusului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină

acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

Purificare pe
Silicagel G,
extracție în alcool etilic

acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

Revendicare

1

3

Procedeu de obținere a markerului biotinic acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină, **caracterizat prin aceea că:**

5

- se dizolvă 5 mg biotin-NHS în 1ml dimetilsulfoxid, iar soluția rezultată se adaugă picătură cu picătură, sub agitare, la 4 ml soluție de 150 mg 1,3-diaminopropan dizolvat în tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH = 9,6, se lasă să reacționeze timp de 3 h la temperatura camerei, pentru cuplarea diaminei la biotină, cu formarea derivatului biotin-amidopropilen-amină, care este purificat pe coloană de Sephadex G-10, având ca eluent tamponul carbonat de sodiu 50 mM, pH = 9,6;

11

- se dizolvă 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 30 mg 1-etil-3(-3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă, timp de 3 h, la temperatura camerei, rezultând un amestec de pesticid activat;

13

15

- se amestecă 2 ml din fracțiunea ce conține derivatul biotin-amidopropilen-amină cu 0,5 ml soluție de pesticid activat, și se lasă să reacționeze sub agitare la temperatura camerei, timp de 3 h, iar produsul acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină obținut este separat pe coloană de Sephadex G-10, având ca solvent de eluție tampon fosfat 10 mM, pH = 7,2, și, în final, este purificat prin cromatografie în strat subțire pe silicagel G, extracție cu alcool etilic și centrifugare la 1500 x g, timp de 10 min, și depozitat la -20°C, în vederea utilizării acestuia în tehnica imunochimică de dozare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic.

17

19

21



**Extras din Legea nr. 64/1991 privind brevetele de invenție,
republicată în Monitorul Oficial al României,
Partea I, nr. 613 din 19 august 2014**

ART. 29 (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. 31 (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 procedeei, 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. 33 (1) Nu constituie încălcarea drepturilor prevăzute la art. 31 și 32

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 oricăruia dintre actele prevăzute la art. 31 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 exploatarei invenției;

c) efectuarea oricăruia dintre actele prevăzute la art. 31 alin. (2) exclusiv în cadru privat și în scop

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 exploatarei 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. 40 (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.