

ROMÂNIA



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII ȘI MĂRCI

Brevet de învenție

Nr. 129563

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: PROCEDEUL DE OBȚINERE A
POLIETILENTEREFTALAT-HEXAMETILENDIAMINO-PE
ROXIDAZEI

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 03/12/2012, 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



(11) RO 129563 B1
(51) Int.Cl.
C12N 11/04 (2006.01)

BREVET DE INVENTIE

Nr. cerere: a 2012 00920

Data de depozit: 03/12/2012

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

data publicării cererii:

30/06/2014 BOPI nr. 6/2014

tular:

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

zentatori:

• 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

cumente din stadiul tehnicii:

K. PHAUGAT ȘI COL. "POLYETHYLENE
TEREPHTHALATE MEMBRANE AS A
SUPPORT FOR COVALENT

*IMMOBILIZATION OF URICASE AND ITS
APPLICATION IN SERUM URATE
DETERMINATION", J. MOL. CAT. B:
ENZYMIC, ELSEVIER, NR. 1, VOL. 62,
PP. 27-31, AMSTERDAM, 2010;
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 HORSERADISH
PEROXIDASE COPOLYMERS", APPLIED
BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY,
NR. 2, VOL. 42, PP. 127-133, 2006;
B. PALSSON ȘI COL., "PRINCIPLES AND
APPLICATIONS IN ENGINEERING SERIES.
TISSUE ENGINEERING", CAP. 9,
PP. 9-5-9-6, ED. CRC PRESS, NEW YORK,
2003*

**PROCEDEU DE OBTINERE
A POLIETILENTEREFTALAT-
HEXAMETILENDIAMINO-PEROXIDAZEI**

Invenția se referă la un procedeu de obținere a poliesterului marcat enzimatic, polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidază, utilizat în studii privind stabilitatea enzimatică legată covalent la faze solide, necesare în obținerea de biosenzori de dozare enzimatici.

În prezent, se cunosc metode pentru imobilizarea enzimei pe un suport polimeric solid [brevet de inventie număr EP 2011/073794, L. Gardossi, P. Spizzo, D. Fattor, L. Sinigoi, *"Method for covalent immobilization of enzymes on functionalized solid polymeric supports"*], în care se utilizează amestecuri de faze organice și apoase ce conțin enzima care urmează a fi cuplată. Enzimele utilizate sunt lipaze, hidrolaze, oxidoreductaze, și solventii organici ca hexan, toluen, tert-butanol, ce pot ataca faza solidă utilizată și conduc la scăderea activității specifice enzimatice precum și proceduri complexe implicând faze multiple și timp îndelungat.

În lucrarea științifică *"Polyethylene terephthalate membrane as a support for covalent immobilization of uricase and its application in serum urate determination"* J. Mol. Cat. B: Enzymatic, Elsevier, Amsterdam, Olanda, vol. 62, nr. 1, 2010-01-02, pag 27-31, avându-i ca autori pe K. Phaugat, M. Bhambi, Renu, și C.S. Pundir, se prezintă imobilizarea covalentă a uricazei pe membrană de polietilentereftalat (PET) prin intermediul carbodiimidei. În această lucrare, folia de PET este tratată cu NaOH 10 M, timp de 12...24 h, și apoi spălată cu o soluție de 50% H₂SO₄, timp de 2 h. După spălare, folia este tratată cu tampon NaOH-glicină 0,05M, iar ulterior, pe folia astfel tratată este cuplată uricaza.

În articolul științific P. K. Nakane, A. Kawaoi "Peroxidase-Labeled Antibody A New Method of Conjugation", The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1974, Vol. 22, Nr. 12, pp. 1084-1091, se prezintă o metodă de 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-dinitrofluorbenzen (FDNB) în prezență de bicarbonat de sodiu și etanol, urmată de dializă și de oxidarea peroxidazei cu NaIO₄, cu formarea aldehid-peroxidazei, care ulterior poate fi cuplată la un anticorp, iar conjugatul obținut poate fi stabilizat cu NaBH₄. Metoda descrisă este complexă, consumatoare de timp, iar produșii de oxidare pot afecta pe termen lung activitatea enzimei. În plus, articolul nu menționează obținerea derivărilor hexametilendiamin-peroxidază care sunt utilizăți la cuplajul covalent pe suprafața PET.

Lucrarea științifică L.P. Budnikova, A. N. Eryomin "Synthesis and Properties of Horseradish Peroxidase Copolymers", Applied Biochemistry and Microbiology, 2006, Vol. 42, Nr. 2, pp. 127-133 prezintă copolimerizarea peroxidazei prin oxidarea peroxidazei cu periodat de sodiu cu obținerea peroxidazei oxidate, care apoi este copolimerizată cu peroxidază, în prezență de soluție tampon, pH=9, și hexametilendiamină, iar copolimerul obținut este ulterior redus cu borohidrură de sodiu. Articolul nu menționează obținerea derivărilor hexametilendiamin-peroxidază care sunt utilizăți la cuplajul covalent pe suprafața PET.

Din literatură se mai cunoaște că grupările carboxilice se pot activa concomitent cu reacția de cuplare, de exemplu reacția concomitentă cu 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă (EDC) și N-hidroxisuccinimidă [B. Palsson și colab. *"Principles and Applications in Engineering Series. Tissue Engineering"*, cap 9, pp. 9-5-9-6, ed. CRC Press, New York, 2003, e-Book-PDF ISBN: 13:978-0-203-01142-3].

Problema tehnică pe care își propune să o rezolve inventia este aceea de a imobiliza peroxidaza pe un suport solid folosind mai puține etape de procedeu, într-un timp mai redus și fără a altera activitatea enzimatică specifică a peroxidazei native.

Procedeul conform inventiei de obținere a produsului polietilentereftalat-hexametilen-

RO 129563 B1

1 Procedeul de obținere a produsului polietilentereftalat- hexametilendiamino-peroxi-
dază constă în 6 etape:

3 E1: Activarea chimică a poliesterului polietilentereftalat (PET)

5 Benzi de polietilentereftalat de dimensiuni (0,5 cm x 5 cm) sunt imersate într-o soluție
de NaOH 2 M, la temperatura de 50°C, timp de 30 min, urmată de spălare cu apă și uscare.

7 E2: Activarea grupărilor carboxil de la suprafața polimerului, formate prin tratament
chimic la etapa E1

9 Benzile de polietilentereftalat de la etapa E1 sunt imersate într-o soluție de 100 mg
11 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă și 25 mg N-hidroxisuccinimidă în 10 ml dimetilfor-
mamidă timp de 3 h pentru activarea grupărilor carboxi libere de la suprafața polimerului.

13 E3: Oxidarea carbohidrațiilor din structura peroxidazei

15 5 mg peroxidază se dizolvă în 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7,2, apoi se adaugă
0,5 ml soluție de 30 mg/ml NaIO₄ în apă distilată timp de 30 min în vederea oxidării carbohi-
drațiilor enzimei și obținerea de bisaldehyde. Amestecul se cromatografiază pe Sephadex
G25 pentru îndepărțarea agentului oxidant, iar eluatul enzimatic, 3 ml, se utilizează la
obținerea derivatului.

17 E4: Obținerea bazei Schiff

19 Peste eluatul enzimatic rezultat prin cromatografie în etapa E3, 3 ml, se adaugă o
soluție de 1 mg/ml hexametildiamină în tampon carbonat 50 mM pH 9,6. Reacția de
obținere a bazei Schiff se desfășoară timp de 3 h la temperatură camerei.

21 E5: Obținerea derivatului peroxidază-hexametilendiamină

23 Baza Schiff formată este cromatografiată pe Sephadex G25 cu eluent tamponul fosfat
10 mM pH 7,2. Eluatul ce conține derivatul enzimatic, 3 ml, este tratat cu 1 ml soluție de
borohidrură de sodiu 1 mg/ml în vederea reducerii bazei Schiff, iar produsul final hexa-
25 metilendiamină-peroxidază a fost cromatografiat pe Sephadex G25.

27 E6: Obținerea polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidazei

29 Benzile activate de poliester din etapa E2 sunt imersate în soluția de derivat
enzimatic, iar reacția de cuplare la faza solidă (suprafața polimerului) se desfășoară timp de
12 h la 4°C. Benzile se depozitează la -20°C în vederea utilizării în studii necesare în
obținerea de biosenzori de dozare enzimatici.

31 Procedeul conform inventiei prezintă avantajul că enzima nu este în contact direct
cu solventii organici care pot scădea activitatea enzimatică specifică sau o pot denatura
33 parțial în obținerea derivatului enzimatic ce urmează a fi cuplat covalent la faza solidă. Alte
35 avanaje sunt etapele simple de obținere a produsului final, care nu implică proceduri com-
plexe care să necesite un număr mare de etape de lucru, și durata mică de obținere a pro-
dusului final.

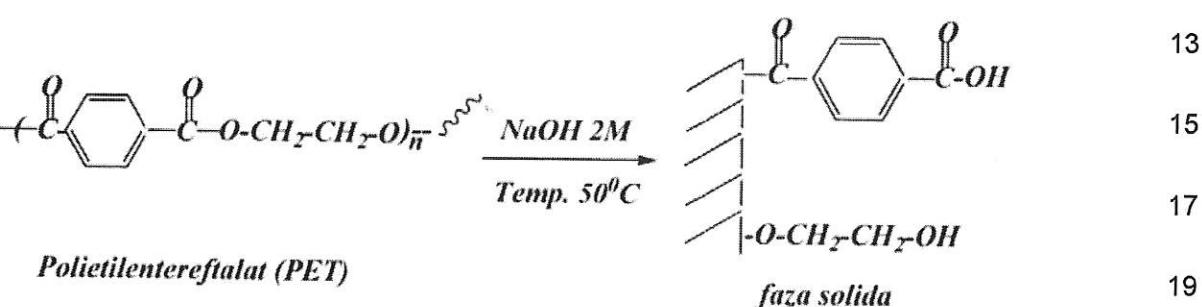
37 Se prezintă mai jos un exemplu de aplicare a procedeului conform inventiei pentru
39 obținerea polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidazei. Potrivit inventiei, benzi trans-
41 parente de poliester, polietilentereftalat (PET) de dimensiuni (0,5 cm x 5 cm) sunt tratate
chimic prin imersie în soluție de NaOH 2 M la temperatura de 50°C timp de 30 min, în
43 vederea scindării grupărilor esterice de la suprafața polimerului, urmând spălarea cu apă
distilată și uscarea lor, după care sunt imersate într-o soluție de 100 mg 1-etil-3-(3-
45 -dimetilaminopropil)-carbodiimidă și 25 mg N-hidroxisuccinimidă în 10 ml dimetilformamidă
timp de 3 h la temperatură camerei, pentru activarea grupărilor carboxi libere de la suprafața
polimerului; acestea sunt utilizate la cuplajul covalent cu derivatul enzimatic obținut prin

RO 129563 B1

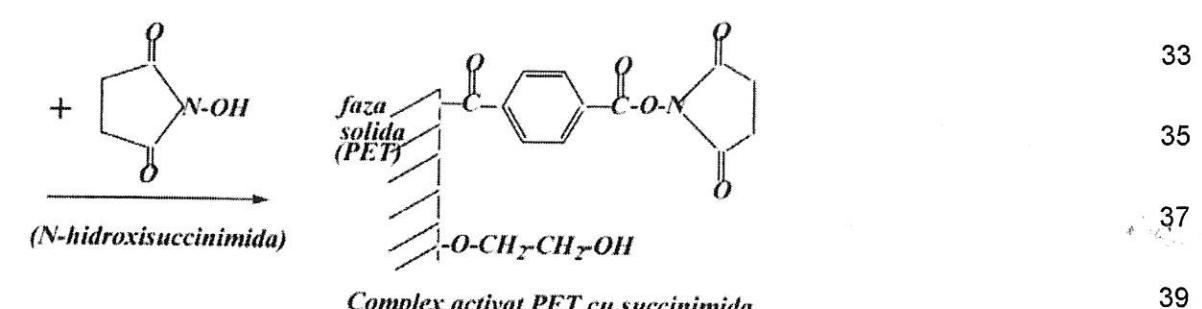
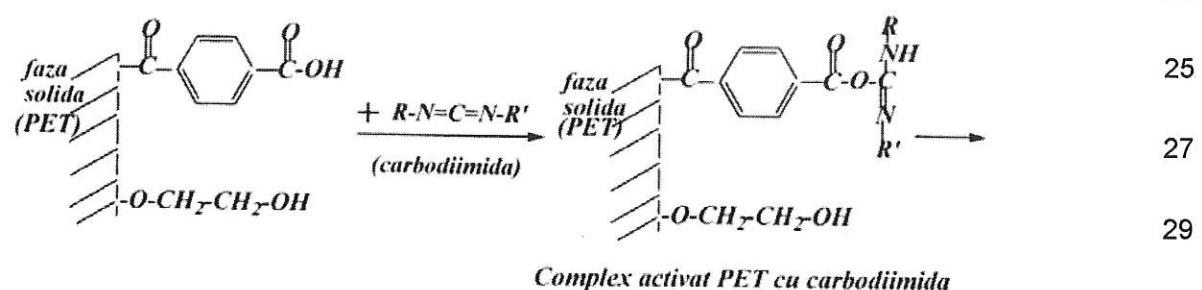
nt fiind tampon fosfat 10 mM pH 7,2, iar eluatul enzimatic, 3 ml, este combinat cu 1 ml
 1
 ţie de 1 mg/ml hexametilendiamină în tampon carbonat 50 mM pH 9,6, reacţia de
 3
 mere a bazei Schiff formate se desfăşoară pe durata a 3 h, apoi produsul este purificat
 5
 cromatografie pe Sephadex G25, iar eluatul enzimatic, 3 ml, este combinat cu o soluţie
 7
 mg/ml borohidrură de sodiu (NaBH_4) în apă distilată, pentru reducerea bazei Schiff şi
 9
 erarea derivatului hexametilendiamino-peroxidază, ce este purificat pe Sephadex G25,
 eluatul derivatului enzimatic sunt introduse benzile de poliester activate pentru cuplajul
 lent, reacţie desfăşurată pe perioada de 12 h la 4°C, iar produsul polietilenen-
 talat-hexametilendiamino-peroxidază este depozitat la -20°C în vederea utilizării.

Reacţiile de obţinere a polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidazei sunt:

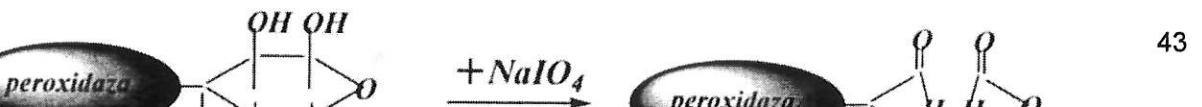
E1: Activarea chimică a suprafeţei poliesterului polietilentereftalat (PET)



E2: Activarea grupărilor carboxi de la suprafaţa polimerului, formate prin tratament
 21
 cu etapa E1

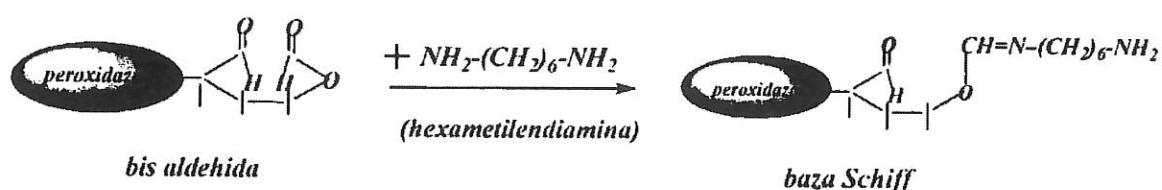


E3. Oxidarea carbohidraţilor din structura peroxidazei

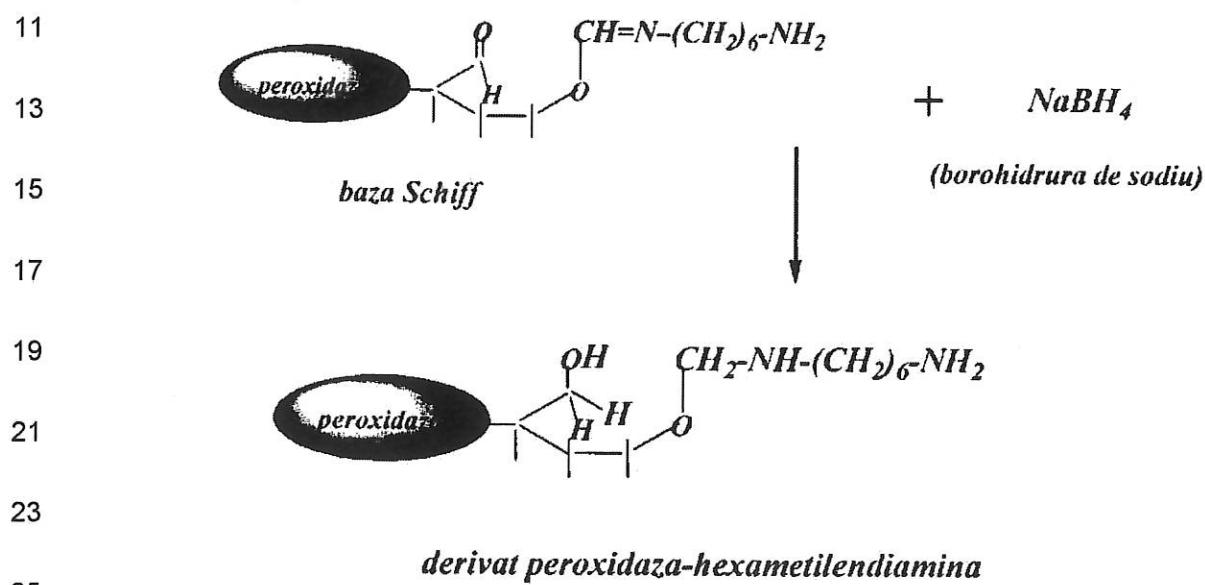


RO 129563 B1

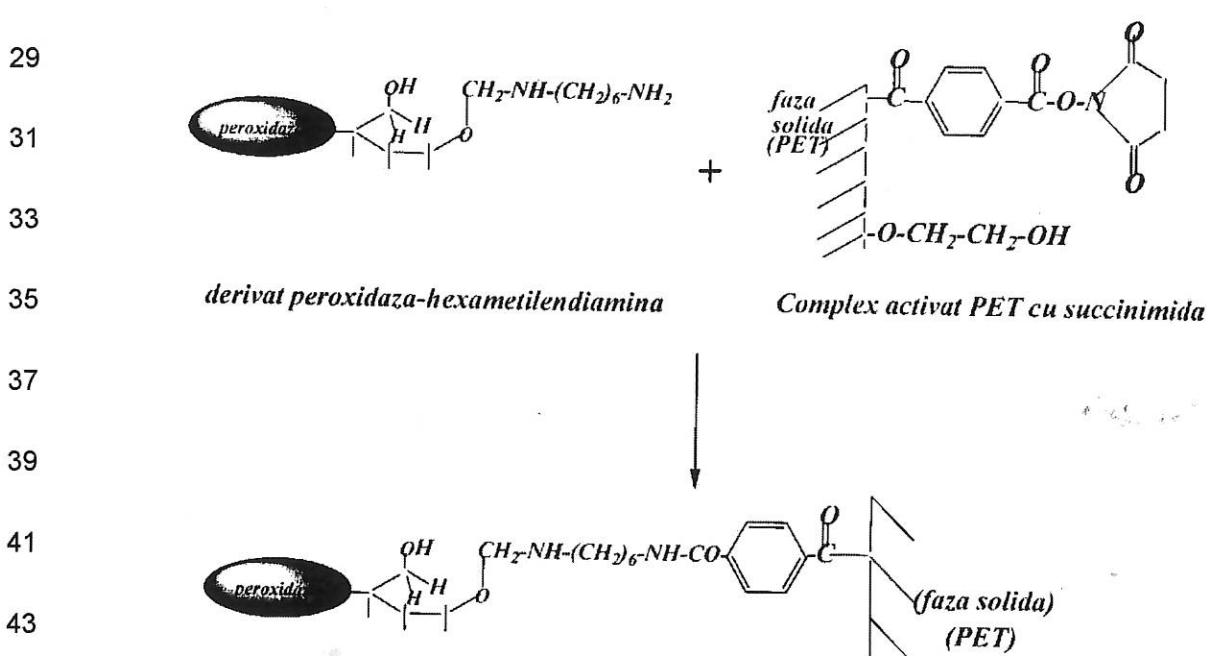
1 E4. Obținerea bazei Schiff



9 E5. Obținerea derivatului peroxidază-hexametilendiamină



E6: Obținerea polietilentereftalatului-hexametilendiamino-peroxidazei



RO 129563 B1

În continuare, se prezintă o serie de date experimentale privind activitatea enzimatică
kerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxyacetic-hexametilendiamin-peroxidaza, care sunt
ătură cu fig. 1 și 2.

Fig. 1, cinetica de reacție enzimatică. Condiții de reacție: enzima PRH 10 ng/ml (PRH
idase from horseradish, type VI-A, 1550 unități/mg solid) în tampon fosfat 10 mM pH
substratul enzimatic 50 µl TMB 2,5 mg/ml în amestec acid acetic:apă 1:10 (v/v), 50 µl
3%. Reacția de oxidare a fost stopată prin separarea chromatografică pe Sephadex G25
ime PRH de oxidant (NaO_4)

Fig. 2, calculul timpului de înjumătărire al activității enzimaticice a PRH obținut din
ca de reacție la 2 min.

Cantități egale de enzimă peroxidază (PRH peroxidase from horseradish, type VI-A,
unități/mg solid) au fost puse în reacție cu oxidantul NaO_4 30 mg/ml în tampon fosfat
M pH 7,2. Reacția de oxidare a fost oprită prin separarea componentilor reacției
ma oxidată, respectiv oxidantul NaO_4 prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25,
1) cm eluent tampon fosfat 10 mM, pH 7,2. Timpii de oxidare ai enzimei PRH aleși au
min, 30 min, 60 min, 6 h și 24 h. Eluatul care conține enzima oxidată a fost colectat,
activitatea specifică enzimatică a fost comparată față de martor (enzima fără oxidant).
ltatele analizei sunt redate în graficul de mai jos.

Tabelul 1

Scăderea activității enzimaticice a PRH în timp, în prezența oxidantului NaO_4 , unde A_p
este activitatea PRH oxidată proporțională cu densitatea optică a PRH măsurată la
lungimea de undă de 450 nm (maximul de absorbție al substratului TMB-
hexametilbenzidina oxidat de H_2O_2 în prezența PRH) la 2 min și A_M este activitatea PRH
oxidată proporțională cu densitatea optică a PRH măsurată la lungimea de undă de
450 nm la 2 min

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

Concluzie:

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

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

1 unde:

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

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

11 $T_{1/2}$ - timpul mediu de oxidare care reduce activitatea enzimei la 50% față de martor
13 (enzima neoxidată) - timp de înjumătățire al activității enzimatice;

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

17 *Tabelul 2*

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

23 Timp de oxidare	25 Ap/AM	27 2,303log(AM/AP)
29 3 min	31 0,9858	33 0,014
35 30 min	37 0,8540	39 0,158
41 60 min	43 0,7081	45 0,345
47 6 h	49 0,4935	51 0,706
53 24 h	55 0,1325	57 2,021

59 Din fig. 2, rezultă că $T_{1/2}$, timpul mediu de oxidare care reduce activitatea enzimei la
61 50% față de martor (enzima neoxidată), este 8,78 h.

RO 129563 B1

Revendicare	1
Procedeu de obținere a polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidază, caracterizat prin aceea că:	3
- se tratează chimic benzi transparente de poliester polietilentereftalat de dimensiuni 10 cm x 5 cm, prin imersie în soluție de NaOH 2 M, la temperatură de 50°C, timp de 30 min, urmată scindarea grupărilor esterice de la suprafața polietilentereftalatului, urmată de uscare cu apă distilată și uscare, apoi benzile sunt imersate într-o soluție de 100 mg 1-etil-3-imetilaminopropil)-carbodiimidă și 25 mg N-hidroxisuccinimidă în 10 ml dimetilformamidă, timp de 3 h, la temperatură camerei, pentru activarea grupărilor carboxil libere de suprafața polietilentereftalatului;	5
- se obține un derivat enzimatic prin dizolvarea a 5 mg peroxidază în 1 ml de tampon buffer 10 mM, la pH 7,2, apoi se adaugă 0,5 ml soluție de 30 mg/ml NaIO ₄ în apă distilată, la 30 min, pentru oxidarea carbohidraților din structura enzimei, cu obținerea de dehidratață, urmat de purificare pe Sephadex G25, eluent fiind tampon fosfat 10 mM pH 7,2, 3 ml de eluat enzimatic rezultat sunt combinați cu 1 ml soluție de 1 mg/ml hexametilenediamină în tampon carbonat 50 mM, pH 9,6, și sunt lăsați să reacționeze 3 h, pentru obținerea unui derivat de peroxidază de tip bază Schiff, după care soluția care conține derivatul de peroxidază este purificată prin cromatografie pe Sephadex G25, apoi 3 ml din eluat care conține derivatul de peroxidază sunt combinați cu o soluție de 1 mg/ml borohidru de sodiu în apă distilată, pentru reducerea bazei Schiff, cu obținerea derivatului peroxidază-hexametilendiamină, care este purificat pe Sephadex G25;	7
- se introduc benzile de polietilentereftalat activate în eluatul derivatului peroxidază-hexametilendiamină pentru cuplajul covalent, reacție desfășurată pe perioada de 12 h la 4°C, produsul polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidază este depozitat la -20°C în frigiderul utilizării.	9
	11
	13
	15
	17
	19
	21
	23
	25

RO 129563 B1

(51) Int.Cl.

C12N 11/04 (2006.01)

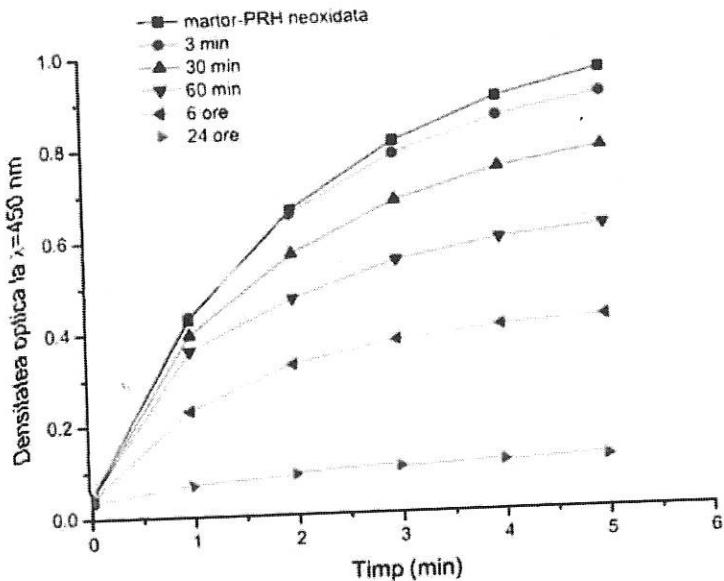


Fig. 1

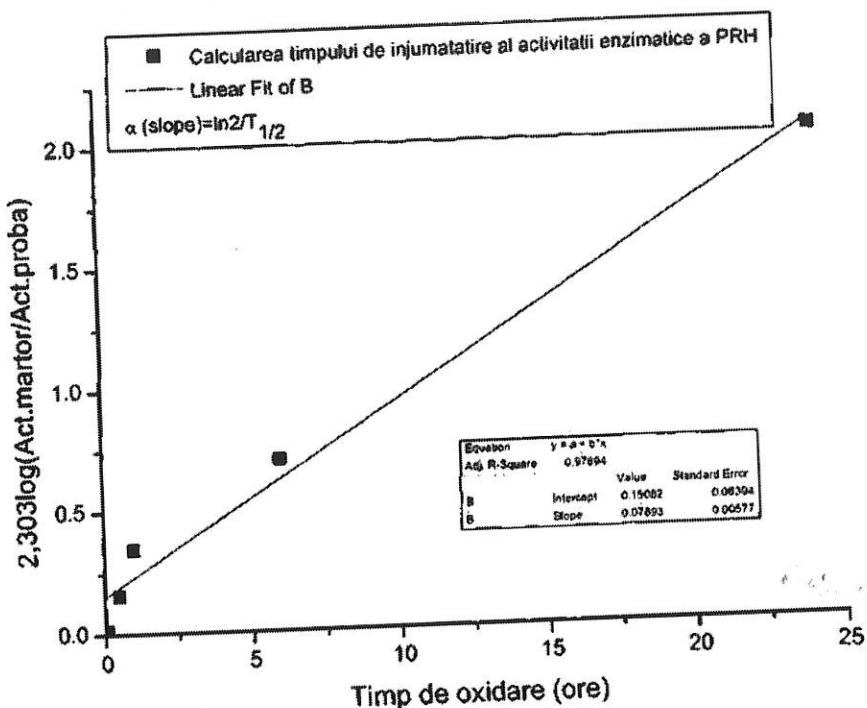


Fig. 2

**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 Industrial.

(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 consumământul 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 procedeului, 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, asa 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 exploatarii invenției;

c) efectuarea oricărui dintre actele prevăzute la art. 32 alin. (2) exclusiv în cadru privat și în scop

necomercial; producerea sau, după caz, folosirea invenției exclusiv în cadre privă și în scop necomercial;

d) comercializarea sau oferirea spre vânzare pe teritoriul Uniunii Europene a celor 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 infracțiune din patrimoniul care este afectat exploatarii intervenției;

g) exploatarea de către terți a invenției sau a unei părți a acesteia la 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 prezența lege și de regulamentul de aplicare a acesteia sunt supuse taxelor, în quantumurile 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.