

CONTRATO DE LICENCIA DE CONOCIMIENTOS TÉCNICOS

**Entre**

**EL INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT**, en lo sucesivo denominado « **EI IRD** », Establecimiento Público de carácter Científico y Tecnológico, con CIF 180006025 00159 Código APE 7219Z, cuya sede social sita en el nº 44, boulevard de Dunkerque, Le Sextant, CS 90009, 13572 Marseille Cedex 02, Francia, representada por su Presidente, Don Michel LAURENT,

El cual ha delegado su firma para los fines de las presentes a Don Stéphane RAUD, Director de la Valorización en el Sur;

El IRD actuando tanto en su nombre como en el nombre y por cuenta de la Unidad mixta de investigación 226 INSTITUT DES SCIENCES DE L'EVOLUTION DE MONTPELLIER, ISEM, dirigida por Don Jean-Christophe AUFFRAY;

Por una parte,

Y

**EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA AMAZONIA PERUANA**, con RUC N° 20171781648, con domicilio legal en Av. José Abelardo Quiñones Km. 2.5, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Región Loreto, debidamente representado por su Presidente, Ing. M. Sc. KENETH REÁTEGUI DEL ÁGUILA, identificado con DNI N° 00120053, a quien en adelante se denominará "**EL IIAP**", acuerdan en los términos y condiciones siguientes:

Por otra parte,

**LA SOCIETE SKULDTECH**, en lo sucesivo denominada « **la Sociedad** », Sociedad por Acciones Simplificada, con un capital de 35 516,00€, Inscrita en el Registro Mercantil de Montpellier bajo el número 423 436 336, cuya sede social sita en el nº 1682, rue de la Valsière - Cap Delta - ZAC Euromedecine II - CS 77394 - 34184 Montpellier Cedex 4 - Francia representada por Don Didier Ritter actuando en calidad de Presidente

Por una tercera parte,

El IRD y el IIAP de forma conjunta por una parte y la Sociedad por otra parte son designadas como « **la Parte** » y juntas designadas como « **las Partes** ».

DR

**EN PRIMER LUGAR EXPONEN LO SIGUIENTE:**

El IRD y el IIAP han desarrollado la utilización de un anticuerpo policlonal contra la vitelogenina para el sexaje de peces del género *Arapaima gigas*, cuyas características están descritas en el anexo nº1 del presente contrato.

Las personas que han participado en el desarrollo del kit fueron: por parte del IIAP Fred Chu Koo y por parte del IRD Rémi Dugué y Jesús Núñez.

Esta creación, así como el conjunto de materiales y especificaciones técnicas que contribuyen a su aplicación son designadas en lo sucesivo como « los Conocimientos Técnicos ».

La Sociedad ha desarrollado una invención relativa a la utilización de este anticuerpo policlonal, invención del IRD y del IIAP, en una membrana, con el fin de poder proponer al usuario final la posibilidad de realizar él mismo, el sexaje de peces de la especie *Arapaima gigas* gracias a la utilización de un kit. Las características de la invención de la Sociedad están descritas en el anexo nº 2 del presente contrato.

La Sociedad desea beneficiarse de los Conocimientos Técnicos para fabricar y vender productos procedentes de la integración de las dos invenciones llamadas « *Arapaima gigas* Osteoglossiformes sexing kits », en lo sucesivo denominados como « los Productos ».

**EN CONSECUENCIA, HAN ACORDADO LO SIGUIENTE:**

**Artículo preliminar - Definiciones**

**Dominio:**

La presente licencia se extiende a todas las aplicaciones posibles de los Conocimientos Técnicos para la concepción, la fabricación y la explotación de los Productos.

**Productos:**

-Un kit que permite detectar la presencia de vitelogenina en la sangre de los peces y por tanto determinar con certeza si el individuo es una hembra madura de la especie *Arapaima gigas*.

-El kit está compuesto por una membrana. En esta membrana se absorbe el anticuerpo de captura de una solución de anticuerpos de detección y de una solución que permite la revelación por coloración. Estos elementos están acompañados de un conjunto de tampones que permiten optimizar las diferentes fases del proceso.

Territorio: Por territorio se entiende cualquier lugar del mundo.

Las Partes han convenido que la fabricación de los productos podrá ser realizada fuera del Territorio.

### Artículo 1- Naturaleza y extensión de la licencia

1.1 – El IRD y el IIAP conceden a la Sociedad, quien lo acepta, la autorización de explotar los Conocimientos Técnicos para la fabricación, la utilización y la venta de los Productos que atañen al Dominio.

1.2 - La presente licencia se ha concedido a título exclusivo para el Territorio definido anteriormente.

1.3 – A excepción de lo dispuesto en el artículo 2 a continuación, la presente licencia es personal, inalienable e intransmisible.

1.4 - La presente licencia se ha concedido con la garantía exclusiva sobre la existencia material de los Conocimientos Técnicos, sin que la Sociedad pueda reclamar al IRD ni al IIAP en garantía en el caso de que terceras partes se opongan a los eventuales títulos de propiedad intelectual.

### Artículo 2 – Sublicencias

2.1 - La Sociedad podrá conceder sublicencias a sus filiales o afiliados, o a cualquier tercera parte independiente de su elección, tanto para sus aprovisionamientos como para la concepción/fabricación de los Productos o su distribución.

El IRD y el IIAP serán informados regularmente por la Sociedad sobre la identidad de las sublicencias. La Sociedad se compromete a incluir en los contratos de sublicencia una cláusula según la cual el IRD y el IIAP podrán comprobar la contabilidad de la sublicencia con motivo de su contrato.

2.2 – Sobre las ventas realizadas por sus filiales o afiliados y distribuidores sublicenciados, la Sociedad deberá al IRD y al IIAP las regalías previstas en el artículo 4 más adelante.

### Artículo 3 – Transmisión de los Conocimientos Técnicos – Asistencia Técnica

3.1 – Desde la firma de la presente licencia, el IRD y el IIAP entregarán a la Sociedad el dossier técnico que contiene el conjunto de elementos e informaciones constitutivos de los Conocimientos Técnicos.

DR

3.2 – El IRD y el IIAP prestarán su colaboración según las condiciones compatibles con sus obligaciones reglamentarias. Esta colaboración será prestada de modo gratuito en forma de consejos durante el período de un (1) año desde la fecha del presente contrato.

Sin embargo, si fuera necesario que agentes del IRD o del IIAP se desplacen por solicitud de la Sociedad durante este período, los gastos de desplazamiento y estancia correrán a cargo de la Sociedad.

3.3 – Después del período definido anteriormente, las Partes definirán los términos y condiciones para la continuación de dicha asistencia técnica, la cual dará lugar llegado el caso a la firma de un contrato específico.

#### Artículo 4 – Condiciones financieras

La presente licencia es concedida según las siguientes condiciones financieras:

4.1 - En contrapartida del derecho exclusivo de explotación que se otorga en el territorio, la sociedad se compromete a transferir al IRD y al IIAP una regalía total del 8%, calculado sobre el importe de la facturación anual generados por la venta de los productos, sin considerar los gastos de transporte y aduanas de la comercialización del producto.

La Sociedad deberá abonar las regalías por las ventas realizadas directamente por sí mismo como por sus subsidiarias, filiales o distribuidores sublicenciatarios, tal como se indica en el apartado 2.2 anterior.

4.2 - Las regalías serán compartidos entre el IRD y el IIAP tomando como base el 50% para cada uno de los organismos.

4.3 - En caso de que la sociedad no pueda abonar regalía alguna al IRD y al IIAP a título de un ejercicio, el IRD y el IIAP podrán retirar la exclusividad de los derechos de explotación acordados sobre el Territorio. La retirada de los derechos de explotación acordados sobre el Territorio sólo podrá ser efectiva tres meses después del envío por el IRD y/o el IIAP de una carta certificada con acuse de recibo que exponga los motivos de la denuncia, a menos que en este plazo, la Parte incumplidora haya satisfecho sus obligaciones o haya aportado la prueba de un impedimento debido a un caso de fuerza mayor.

4.4 – En caso de que la totalidad o parte de sus Conocimientos Técnicos, sin responsabilidad de las Partes, sean de dominio público, la Sociedad no podrá reclamar al IRD ni al IIAP reembolso alguno ni reducción de las sumas que falta pagar.

#### Artículo 5 - Contabilidad

5.1 - La Sociedad tendrá una contabilidad especial en la que figurarán todos los elementos necesarios para la evaluación precisa de las transacciones comerciales efectuadas en el marco del presente contrato.

5.2 – Esta contabilidad especial estará disponible en todo momento para el IRD y el IIAP o para cualquier representante acreditado hasta la fecha de expiración o rescisión del presente contrato y durante los dos años siguientes a esta expiración o rescisión.

5.3 – Esta contabilidad será liquidada el 31 de diciembre de cada año.

5.4 – Tomando como base esta contabilidad, la Sociedad establecerá y enviará al IRD y al IIAP, durante el mes siguiente al cierre de las cuentas, un estado detallado de las ventas, en el que figurará la facturación anual los impuestos, los gastos de transporte y de aduanas.

En caso de que no se haya generado ninguna venta, la Sociedad tendrá que enviar al IRD y al IIAP durante el mes de enero año, un estado que demuestre la ausencia de toda operación durante el año considerado. Toda ausencia o retraso en la entrega del estado que demuestre la ausencia de toda operación durante el año considerado, no podrá ser considerado como una cláusula de rescisión del presente contrato.

5.5 – El importe de las regalías a ser transferidas al IRD y al IIAP por la ventas realizadas deberán estar exceptuadas de toda deducción de tasas e impuestos y o retenciones.

#### Artículo 6 – Modalidades de pago

6.1 – A la recepción del estado detallado de las ventas previsto en el artículo 5.4 el IRD y el IIAP establecerán liquidación de las regalías y emitirá cada uno la factura correspondiente al importe de las regalías que les corresponden. (Un documento formal de aceptación del informe de liquidación contable)

Las facturas serán enviadas a la Sociedad a la siguiente dirección:

Skuldtech  
1682 rue de la Valsière – CS 77394  
34184 Montpellier Cedex 4  
Francia

6.2 – Los montos de la regalías deberán ser abonados por la Sociedad en el plazo de treinta (30) días desde la recepción de la factura, en las cuentas bancarias respectivas del IRD y del IIAP con los siguientes datos bancarios:

#### Para el IRD:

Cuenta abierta en nombre del Sr. Agente Contable del IRD  
Recette Générale des Finances de Paris, 94 rue de Réaumur 75004 Paris Cedex 02 :  
Código del banco 10071  
Código de la sucursal 75000

N° cuenta 00001005045  
Digito de control 77

Para el IIAP: RDR

Nombre : INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA AMAZONÍA PERUANA  
Dirección : AV. ABELARDO QUIÑONES Km. 2.5 SAN JUAN BAUTITA  
Cuenta Corriente en Nuevos Soles: 521-024534  
Código de Cuenta Interbancario: 018 521 000521024534 55  
Nombre del Banco: BANCO DE LA NACION  
Dirección del Banco: JIRÓN LA CONDAMINE No.488 IQUITOS, MAYNAS, LORETO, PERÚ  
Código SWITH: BANCPEPL

6.3 - Toda suma no abonada en los plazos contractuales producirá unos intereses del 0,5% por cada mensualidad de retraso.

6.4 - Se ha acordado que cada organismo se encargará del pago de la prima a sus investigadores o asalariados en calidad de inventores como resultado de la participación en los beneficios y de conformidad con la reglamentación que se aplique en cada uno de las instituciones.

**Artículo 7 - Confidencialidad**

7.1 - El IRD, el IIAP y la Sociedad se comprometen a conservar la confidencialidad de toda la información relativa al objeto del presente contrato y que haya sido transmitida por una de las partes a las otras, siempre y cuando no sean de dominio público. Cada parte únicamente podrá comunicar la totalidad o parte de las citadas informaciones previo consentimiento escrito de la parte que ha transmitido dicha información.

Este compromiso será efectivo siempre que las citadas informaciones no sean de dominio público, incluso tras la expiración del presente contrato.

7.2 - La Sociedad se compromete específicamente a conservar y a mantener la confidencialidad, en particular por sus filiales, afiliados o colaboradores comerciales, toda la información relativa al objeto del presente contrato y a sus Conocimientos Técnicos, y otras informaciones facilitadas por el IRD o el IIAP.

Este compromiso será efectivo siempre que las citadas informaciones no sean de dominio público, incluso tras la expiración del presente contrato.

7.3 - La Sociedad deberá incluir unos compromisos equivalentes en los posibles contratos de sublicencia.

**Artículo 8 – Explotación**

DR

8.1 - La Sociedad es responsable de la explotación comercial de los Conocimientos Técnicos y de los Productos.

8.2 - La Sociedad es responsable de la conformidad de los Productos con las normas de seguridad aplicables. Así mismo, es responsable de la gestión de calidad correspondiente a la fabricación y distribución de los Productos.

8.3 - Los Productos comercializados por la Sociedad, directamente o a través de sus distribuidores, llevarán la mención « Licencia IRD/IIAP » con los logos de los diferentes organismos.

La misma mención, « Licencia IRD/IIAP », acompañada del nombre de los inventores deberá figurar en cualquier documento relativo a los Conocimientos Técnicos o a los Productos, como folletos publicitarios, artículos o manuales de instrucciones, sin que esta lista sea limitativa.

La Sociedad impondrá las mismas obligaciones a sus sublicenciados eventuales.

8.4 - La Sociedad proporcionará los Productos al IRD y al IIAP a una tarifa preferencial para sus necesidades de investigación.

8.5 El IRD y el IIAP no podrán transmitir a una tercera parte, colaborador o cliente potencial, los productos que hayan obtenido a una tarifa preferencial para las necesidades de investigación definidas en el capítulo 8.4.

8.6 El IRD y el IIAP tendrán la obligación de transmitir a Skuldtech un informe sobre todo colaborador o cliente potencial con el que hayan estado en contacto y el cual pueda ser un cliente potencial para la venta de los Productos.

#### Artículo 9 – Propiedad intelectual

El IRD y el IIAP seguirán siendo propietarios de los Conocimientos Técnicos y de los posibles derechos de propiedad intelectual correspondientes.

La Sociedad seguirá siendo propietaria de su propia tecnología citada en el Preámbulo y de los posibles derechos de propiedad intelectual correspondientes.

Llegado el caso, el IRD y el IIAP podrán decidir proteger la totalidad o parte de sus Conocimientos Técnicos mediante uno o varios títulos de propiedad intelectual, en particular una o varias patentes.

Así mismo, las Partes podrán decidir proteger las tecnologías respectivas mediante uno o varios títulos de propiedad intelectual, en particular una o varias patentes, registradas conjuntamente y en copropiedad.

En caso de protección de los Conocimientos Técnicos mediante un título de propiedad intelectual fuere cual fuere, realizado en común en nombre de las Partes o registrado

DR

únicamente por el IRD y el IIAP, la Sociedad se beneficiará del derecho exclusivo de explotación comercial de este o estos títulos en el marco del presente contrato.

## Artículo 10 – Mejoras al producto

10.1 – En el sentido del presente artículo, se entienden como mejoras toda innovación o mejora, patentable o no, de los Conocimientos Técnicos o de la tecnología propia de la Sociedad. Esta última prevé las futuras evoluciones de la tecnología, permitiendo concebir una versión mejor de los Productos.

10.2 – Mejoras aportadas por cada Parte a su propia tecnología:



10.2.1 – El IRD y el IIAP de una parte, y la Sociedad por otra serán propietarios de las mejoras que aporten a su propia tecnología y podrán efectuar o no, en su nombre y a su cargo, la presentación de una(s) solicitud(es) del título de propiedad intelectual para sus mejoras.



10.2.2 – Cada Parte informará a la otra con la mayor brevedad posible sobre las mejoras realizadas en caso de presentar una solicitud del título de propiedad intelectual referente a dichas mejoras.



10.2.3 – El IRD y el IIAP comunicarán de modo gratuito a la Sociedad las mejoras aportadas en los Conocimientos Técnicos, mejoras que la Sociedad podrá explotar en este marco según las modalidades del presente contrato.

La Sociedad comunicará de modo gratuito al IRD y al IIAP las mejoras aportados a su propia tecnología, mejoras que el IRD y el IIAP podrán utilizar para sus necesidades de investigación.

10.3 – Mejoras aportadas por una Parte a la tecnología de la otra parte:



10.3.1 - Si la Sociedad aporta mejoras a los Conocimientos Técnicos, estas mejoras serán propiedad conjunta de la Sociedad, del IRD y del IIAP.

Las Partes aceptarán el registro eventual de uno o varios títulos de propiedad intelectual y establecerán, si fuera necesario, un reglamento de copropiedad.

10.3.2 – Los principios enunciados en el artículo 10.3.1 más arriba se aplican del mismo modo en el caso de haber mejoras aportadas por el IRD y el IIAP a la tecnología propia de la Sociedad.



10.3.3 – Las estipulaciones de los artículos 10.2.2 y 10.2.3 son también aplicables en el caso del presente artículo 10.3.

## Artículo 11- Falsificaciones

11.1 – El IRD, el IIAP y la Sociedad se informarán de modo recíproco y con la mayor brevedad posible sobre cualquier caso de falsificación por una tercera parte del que pudieran tener conocimiento.

11.1.1 - Si las partes convienen realizar un proceso judicial conjuntamente por los casos de falsificación, las partes determinarán por anticipado la proporción de los gastos soportados por cada una de ellas. Las indemnizaciones dictadas en su beneficio por los tribunales serán compartidas entre las Partes en la misma proporción que su participación en los gastos.

11.1.2 – En caso de no existir tal acuerdo, el IRD y el IIAP podrán presentar por su cuenta una demanda. Lo harán en su nombre y a su cargo, y cobrarán la totalidad de las indemnizaciones dictadas en su beneficio por los tribunales.

11.1.3 – Si el IRD y el IIAP renuncian a emprender los procesos judiciales deseados por la Sociedad, esta podrá desarrollar tales procesos por su cuenta y riesgo. En este caso, únicamente La Sociedad se beneficiará o de las indemnizaciones dictadas eventualmente por los tribunales en beneficio de la Parte demandante.

11.2 - Si se ejercieran procesos judiciales de falsificación contra la Sociedad debido a la fabricación, la utilización o la comercialización de los Productos, el IRD y el IIAP comunicarán a la Sociedad los elementos que posean para su defensa.

En caso de dictarse una condena en su contra, la Sociedad no podrá reclamar al IRD ni al IIAP ninguna indemnización, ningún reembolso de las sumas pagadas, ninguna reducción de las sumas debidas en el momento de la decisión de juicio definitivo.

11.3 - Las Partes se comprometen a facilitar de forma recíproca todos los documentos, poderes, firmas que pudieran necesitar con motivo de los procesos judiciales anteriormente indicados.

## Artículo 12 - Duración

El presente contrato será vigente desde la fecha de firma del representante legal de la última parte que suscriba y será válido para un periodo de 7 años.

El presente contrato podrá ser prorrogado tácitamente mientras los Conocimientos Técnicos no sean de dominio público.

## Artículo 13 – Invalidez de una clausula

Si una o varias estipulaciones dentro de los artículos del presente contrato fueran consideradas como no válidas o declaradas así con motivo de la aplicación de un tratado, una ley o un reglamento o debido a una decisión definitiva de una jurisdicción competente, las otras estipulaciones conservarán toda su fuerza y alcance. Las Partes procederán sin un plazo

DR

estipulado a las modificaciones necesarias respetando, en la medida de lo posible, el acuerdo de voluntades existente en el momento de la celebración del presente contrato.

#### Articula 14- Resolución

14.1 – El presente contrato será resuelto de pleno derecho en caso de liquidación judicial de la Sociedad pronunciada por un Tribunal en aplicación de los artículos L 640 al L 642-25 del Código de Comercio Francés, así como en caso de cese de la actividad, disolución o liquidación amistosa de la Sociedad.

14.2 - El presente contrato será resuelto de pleno derecho por una u otra de las Partes en caso de incumplimiento de la otra parte, de una o varias de sus obligaciones contenidas en las diversas cláusulas. Esta resolución únicamente será efectiva tres meses después del envío por la Parte demandante de una carta certificada con acuse de recibo que exponga los motivos de la demanda, a menos que en este plazo, la Parte incumplidora haya satisfecho sus obligaciones o haya aportado pruebas de un impedimento consecuente a un caso de fuerza mayor.

El ejercicio de esta facultad de resolución no exime a la Parte incumplidora de cumplir con las obligaciones contratadas hasta la fecha de efecto de la resolución, y sin perjuicio de las indemnizaciones a las que pudiera pretender la Parte demandante en virtud de los daños sufridos por la resolución anticipada del contrato.

14.3 – El IRD y el IIAP podrán también resolver el presente contrato en el caso previsto en el artículo 4.3 .

#### Articula 15 - Stocks

En caso de que la Sociedad tuviera en la fecha de expiración del presente contrato Productos en stock, la misma está autorizada a vender estos Productos hasta que se agote el stock, teniendo la obligación de enviar al IRD y al IIAP en la fecha de expiración del contrato un estado de los stocks, y también de respetar las estipulaciones del presente contrato.

#### Artículo 16 – Legislación aplicable – Resolución del litigio

El presente contrato queda sometido a las leyes y reglamentos franceses

El presente contrato queda sometido al derecho francés.

El presente contrato constituye la traducción española del contrato francés escrito en francés.

Solo el contrato francés es el único auténtico.

Las Partes se esforzarán en resolver de modo amistoso las controversias que pudieran surgir por la interpretación o ejecución de las cláusulas del presente contrato.

En caso de litigio y a falta de resolución amistosa, los tribunales competentes que tramitarán el proceso serán los Tribunales de Montpellier.

DR

**Artículo 17 – Registro**

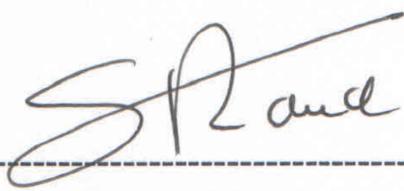
Todos los poderes son entregados al portador de un ejemplar del presente contrato para obtener su registro fiscal.

Firmado en tres (3) ejemplares 16/12/2013

En Marsella, el

En Montpellier, el

16/12/13



Por el IRD

Por la Sociedad

En Iquitos, el



Por el IIAP



## ANEXO 1

### DESCRIPCIÓN SUMARIO DE LA INVENCION LICENCIADA

En 2008, el IRD y el IIAP desarrollaron un método de sexaje mediante la determinación de la vitelogenina en la sangre para *Arapaima gigas*. Esta metodología precisa unos equipamientos de laboratorio y una formación específica del personal. En un día permite determinar la presencia de vitelogenina en la sangre de progenitores potenciales y por tanto determinar si se trata de hembras maduras. La edad de determinación del sexo de manera segura es a los cuatro años.

Al investigar una mayor accesibilidad de este tipo de test para el piscicultor y partiendo de la idea de que es posible realizar un test inmunoquímico en diferentes soportes, se ha aceptado el principio del test sobre una membrana puesto que es posible detectar a simple vista el resultado (coloración). Además, las membranas son muy fáciles de conservar y manipular.

A priori se ha seleccionado la utilización de IgG anti-Vtg marcados con la fosfatasa alcalina (anticuerpos de revelación) puesto que después de la revelación permiten obtener una coloración detectable a simple vista.

Las diferentes etapas de la elaboración del test comprenden:

- la selección de la membrana (se han probado cinco membranas preseleccionadas)
- la elaboración de la ligación de los anticuerpos de captura (concentración, selección del tampón, tiempo de incubación)
- la elaboración de la saturación (naturaleza de la proteína, tampón, tiempo de incubación)
- la selección de un método de aclarado de las membranas a lo largo del test.
- La elaboración del método de incubación de la muestra y del anticuerpo de revelación (disolución, naturaleza del tampón, tiempo de incubación)
- la elaboración de un testigo positivo que permita validar el test
- la evaluación de la sensibilidad del test

Han sido necesarios diferentes parámetros que presentan una fuerte interferencia (por ejemplo, un método de ligación será satisfactorio para una membrana y no para otra) y pruebas cruzadas entre los métodos seleccionados para cada etapa. Han sido aceptados los siguientes parámetros:

-Preparación de las membranas:

-utilización de la membrana Whatman ref. P40.

-ligación de los anticuerpos:

anticuerpos preparados en conejo (Rabbit) anti-Vtg diluido 1:8 en un tampón de carbonato anticuerpos preparados en cabra (Goat) anti-rabbit diluido 1:16 en un tampón de carbonato para el control positivo

-saturación de las membranas: Tris NaCl 0,1M + 3% BSA, 1 hora

-lavado de las membranas: Tris NaCl 0,1M + tween 20, 10 minutos

-secado

-Utilización de las membranas *in situ*:

-inmersión en el plasma o sangre de *Arapaima* diluido (Tris NaCl 0,1M + 1% de caseína), 1 hora.

- aclarado (Tris NaCl 0,1M).
- inmersión de las membranas dentro del anticuerpo de revelación diluido en 1:4000 en Tris NaCl 0,1M + 1% de caseína, 1 hora.
- aclarado (Tris NaCl 0,1M).
- revelación dentro del NBT-BCIP hasta la obtención de una coloración en el control positivo.



DR

## ANEXO 2

### DESCRIPCIÓN SUMARIO DE LA INVENCION DE LA SOCIEDAD

Skuldtech ha desarrollado una tecnología de biochips que permite realizar tests miniaturizados, de alta sensibilidad, para una o varias moléculas de interés presentes en una muestra biológica de reducido volumen. Este biochip está constituido por un soporte sólido (sílice, vidrio, metal o polímero) en el cual se han inmovilizado una o varias biomoléculas llamadas "sondas". La superficie del soporte ha sido tratada químicamente para permitir la fijación de estas sondas (fragmentos de ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, anticuerpos, azúcares, células o tejidos...) Las sondas son inmovilizadas y organizadas en matrices (de ahí procede el término « microarrays ») sobre el sustrato sólido. Cada sonda es localizada en los puntos definidos llamados « plots » o « spots ». Un spot contiene un gran número de copias de una misma sonda. Cada sonda ha sido seleccionada para reconocer específicamente, por afinidad, una molécula diana (ejemplo: proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos...) en ocasiones presente en un medio biológico que se va a analizar (suero, extracto celular u otra muestra biológica de interés). Tras eliminar las moléculas en exceso, el biochip es analizado spot por spot para detectar y determinar qué sonda ha capturado una diana). Los sistemas de detección de biomoléculas diana en biochips pueden estar basados en diferentes técnicas.

En este proyecto, Skuldetch ha elegido utilizar como soporte, una membrana de Nitrocelulosa con el fin de identificar el anticuerpo policlonal dirigido contra la vitelogenina, invención del IRD y del IIAP. La revelación se hace por colorimetría.

### TECNOLOGÍA DE CONSTRUCCIÓN DE LOS CHIPS

I- Preparación de la membrana en el robot BIOMECK 2000

1- Depósito:

El anticuerpo primario de captura (ACC) purificado (o no) de conejo anti VTG *A. gigas*, diluido al 1:4 dentro del tampón carbonato-bicarbonato

2- El Testigo positivo = GAR (anticuerpos de cabra anti conejo, SIGMA, referencia R-2004 a 1 mg/ml) diluido al 1:8 dentro del tampón de carbonato-bicarbonato

3- Secado: colocar la membrana sobre el papel Whatman unos minutos a temperatura ambiente después 30 minutos a 37 C°.

4- Saturación: en tampón TD a 3% BSA, a temperatura ambiente con agitación durante la noche.

5- Secado: 30 min a 37°C.

II- Revelación de las membranas

1- Recortar las tiras en pequeñas membranas de 0,9 cm x 0,9 cm.

Meterlas en los pocillos (placa 24 pocillos) delicadamente con ayuda de una pinza estéril.

2- Depositar el plasma/sangre (que contiene la vitelogenina) diluido al 1:250 dentro del tampón (tampón de disolución a razón de 250 µl/pocillo).

Incubar 1h a temperatura ambiente con agitación.

3- Lavados en tampón TR (tampón de aclarado) 3 veces 5 min. 500 µl/pocillo con agitación.

4- Revelación con Ac Policlonal anti-vitelogenina y fosfatasa alcalina (ACR): Agi6P Alkaline Phosphatase conjugated.

Diluir el anticuerpo al 1:4000 dentro del tampón TAC (= tampón TD a 1% BSA, o tampón TD a 1% de proteínas de leche, preparado extemporáneamente). Utilizar 250 µl por pocillo.

Incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación.

5- Lavados en tampón TR 3 veces 5 min. : 500 µl/pocillo con agitación.

6- Durante este tiempo:

Diluir el revelador (solución de NBT-BCIP, Sigma ref. 72091) al 1:115 dentro del tampón TC (tampón colorimétrico): 8,7 µl/1 ml. Distribuir 250 µl/pocillo.

Incubar a temperatura ambiente y controlar hasta la aparición del color (5 a 10 min.).

7- Detener la reacción con el tampón TA (tampón de detención = 20 mM EDTA pH 8) = 250 µl/pocillo.

