

## **CONTRATTO DI RICERCA**

TRA

SANYpet S.p.A (di seguito "la Società") con sede in Bagnoli di Sopra (PD), Via Austria 3, Codice fiscale e Partita IVA 03663040289, rappresentata per la firma del presente atto dal legale rappresentante Gianandrea Guidetti,

E

La cattedra di Biochimica del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale (BIOCH-DMCS) dell'Università di Foggia con sede in via Napoli 20, Foggia, Codice Fiscale 94045260711, Partita IVA n. 03016180717, rappresentato per la firma del presente atto dal Direttore, prof. Lorenzo Lo Muzio.

### **PREMESSO CHE**

- la Società opera nel settore del pet food;  
BIOCH-DMCS possiede tra le proprie competenze scientifiche e tecnologiche una consolidata e comprovata esperienza e un ampio know-how nello studio del metabolismo cellulare ed in particolare della fisiologia mitocondriale a livello funzionale e molecolare;
- la Società è interessata ad avvalersi delle specifiche competenze di BIOCH-DMCS al fine di studiare gli effetti di antibiotici (in particolare dell'ossitetraciclina) sui processi di sintesi proteica mitocondriale e valutarne le conseguenze metaboliche utilizzando modelli cellulari in vitro o ex vivo

### **Si conviene e si stipula quanto segue**

#### **Art. 1 – Oggetto**

Con il presente contratto la Società affida a BIOCH-DMCS, che accetta, la realizzazione di uno studio di fattibilità tecnica per la fenotipizzazione metabolica di modelli cellulari trattati con ossitetraciclina, o derivati alimentari contenenti, l'antibiotico con particolare riferimento al loro ruolo interferente nella sintesi di proteine codificate dal DNA mitocondriale. Il programma di attività è dettagliato nell'Allegato Tecnico al presente contratto di cui costituisce parte integrante e sostanziale.

#### **Art. 2 – Responsabilità della commessa e luogo di esecuzione dell'attività**

- 2.1 Per quanto concerne l'esecuzione del presente contratto la Società affida il compito dei necessari rapporti con BIOCH-DMCS al Dott. Gianandrea Guidetti, quale Responsabile della Commessa di ricerca. Egli si connota quindi nei confronti di BIOCH-DMCS come responsabile dei lavori richiesti.

- 2.2 BIOCH-DMCS identifica quale responsabile scientifico delle attività in oggetto il Prof. Nazzareno Capitanio.
- 2.3 L'attività oggetto del presente contratto sarà svolta presso i laboratori di BIOCH-DMCS siti all'interno del Polo Biomedico "E. Altomare" dell'Università degli Studi di Foggia.

### **Art. 3 – Corrispettivo e modalità di pagamento**

Per l'esecuzione delle attività in oggetto la Società si impegna a corrispondere a BIOCH-DMCS un corrispettivo pari complessivamente a Euro 32.000 oltre Iva ai sensi di legge, sulla base delle seguenti modalità:

- Euro 10.000 erogati entro 20 giorni dalla data della stipula del contratto, previa emissione di regolare fattura da parte dell'Università;
- Euro 22.000 erogati a partire dal 1 gennaio 2018, previa emissione di regolare fattura da parte dell'Università.

Qualsiasi eventuale variazione/rimodulazione della destinazione d'uso del suddetto finanziamento dovrà essere concordato da entrambe le Parti ed essere funzionale alla realizzazione del progetto scientifico.

### **Art. 4 – Durata del contratto**

La durata del presente contratto è fissata in 15 mesi con decorrenza dalla data della sua sottoscrizione.

Tale durata potrà essere prorogata di comune accordo su richiesta scritta e motivata della parte che richiede la proroga.

### **Art. 5 – Stati di avanzamento e relazioni tecniche**

BIOCH-DMCS si impegna a fornire alla Società le seguenti relazioni tecniche relative ai risultati conseguiti rispetto ai successivi stati d'avanzamento dell'attività oggetto del presente contratto:

- Relazione 1: relativa ai risultati intermedi conseguiti rispetto all'Attività descritta nell'Allegato Tecnico, da consegnarsi alla scadenza del sesto mese dall'inizio del contratto e comunque entro Marzo 2018;
- Relazione 2: relativa ai risultati conclusivi conseguiti rispetto all'Attività descritta nell'Allegato Tecnico da consegnarsi alla scadenza del contratto.

### **Art. 6 – Riservatezza e tutela del segreto**

BIOCH-DMCS si impegna a conservare e a far conservare al proprio personale il più scrupoloso segreto su tutte le informazioni, i dati, i metodi di analisi, le ricerche, ecc., di cui venga a conoscenza nell'ambito di svolgimento dell'incarico conferitogli nell'ambito del presente contratto.

Gli obblighi di cui sopra sopravvivranno al completamento del contratto ed alla sua conseguente estinzione. Essi cesseranno di essere efficaci quando le informazioni diventeranno di pubblico dominio per fatti non imputabili a BIOCH-DMCS e/o alle persone da esso impiegate nell'esecuzione del presente contratto e comunque decorsi due anni dalla cessazione di detto contratto.

#### **Art. 7 – Pubblicazioni proprietà dei risultati**

Eventuali pubblicazioni da parte del personale di BIOCH-DMCS che avessero per argomento parziale o totale i risultati dell'attività oggetto del presente contratto dovranno essere preventivamente approvate dalla Società che dovrà comunicare la propria autorizzazione, o il proprio diniego, per iscritto entro 30 (trenta) giorni a decorrere dalla ricezione della richiesta scritta da parte di BIOCH-DMCS. In mancanza di una risposta da parte della Società nei modi sopra descritti, la pubblicazione si intende automaticamente accettata nella forma proposta.

#### **Art. 8 – Proprietà dei risultati**

Ai fini dell'applicazione del presente articolo valgono le seguenti definizioni:

- per "Background" si intende tutte le informazioni (compreso il know how non brevettabile), nonché i diritti patrimoniali d'autore e ogni altro diritto di proprietà intellettuale e industriale relativi a tali informazioni, detenuti a qualsiasi titolo da ciascuna delle Parti prima della sottoscrizione del presente contratto, che ciascuna delle Parti mette a disposizione in quanto necessarie allo svolgimento delle attività oggetto della stesso.
- per "Foreground" si intende tutti i risultati, incluse le informazioni, proteggibili e non, quali diritto d'autore, brevetti, know how e ogni altra privativa industriale, generati dall'attività di ricerca oggetto del contratto.
- per "Sideground" si intende tutte le conoscenze sviluppate e i risultati conseguiti da ciascuna delle Parti durante il periodo di efficacia del contratto, quali diritto d'autore, brevetti, know how e ogni altra privativa industriale non rientranti tra gli obiettivi previsti dal contratto medesimo, anche se attinenti al medesimo campo scientifico, e indipendentemente dal fatto che possano essere protetti o meno;

Ciascuna Parte è titolare dei diritti di proprietà intellettuale e industriale relativi al proprio Background e al proprio Sideground. Le Parti si danno reciprocamente atto del fatto che niente di quanto previsto nel presente contratto deve considerarsi in modo diretto o indiretto come implicante la cessione di alcun diritto in relazione al proprio Background e al proprio Sideground.

La proprietà ed i diritti di sfruttamento di tutti i risultati di Foreground conseguiti nella ricerca oggetto del presente contratto apparterranno alla Società per gli ambiti specifici in cui questa opera, ed in particolare:

- nel settore del Petfood

- nel settore della nutraceutica.

Essi non potranno essere ceduti, comunicati a terzi, divulgati o fatti oggetto di pubblicazioni scientifiche in alcun modo senza il preventivo assenso scritto della Società. Nel caso verranno definite quote di titolarità con apposito accordo scritto e che terranno conto dell'effettivo apporto di risorse e del contributo inventivo apportato da ciascuna Parte.

In relazione agli eventuali risultati, conoscenze e/o invenzioni brevettabili scaturiti dalla ricerca qui regolata, fermo restando il diritto morale dell'autore e/o inventore ad essere riconosciuto tale, come previsto dalla normativa vigente, la Società avrà il diritto al deposito del brevetto e ai pertinenti diritti di Proprietà Intellettuale, il cui regime di sfruttamento industriale sarà definito in successivi e specifici accordi, sulla base dell'apporto fornito da ciascuna Parte, che altresì definiranno il regime di utilizzo delle suddette conoscenze tra le Parti e verso i terzi.

Contestualmente al deposito della domanda relativa al brevetto/i avente ad oggetto invenzioni/risultati brevettabili conseguite nell'ambito delle attività di cui a questo contratto, BIOCH-DMCS cederà la propria quota di titolarità o l'intera parte di dette prime domande di brevetto alla Società; quest'ultima si impegna a richiedere all'Ufficio Brevetti, italiano o estero, presso il quale è stata depositata la prima domanda del brevetto in questione, la trascrizione dell'atto di acquisizione della piena titolarità solo dopo la pubblicazione di tale prima domanda.

Ogni costo di deposito, gestione, mantenimento e trascrizione delle relative domande di brevetto sarà a carico della Società.

Qualora le Parti non riescano ad accordarsi sul corrispettivo equo di cui sopra, ciascuna di esse avrà diritto ad una licenza d'uso non esclusiva ai fini dello sfruttamento commerciale con diritto a sublicenza della/e domande di brevetto depositate ed ogni loro estensione.

Qualora la società dichiari di non avere interesse a brevettare l'invenzione di cui sopra, BIOCH-DMCS potrà depositare domanda di brevetto a nome e spese proprie, previa comunicazione scritta alla Società.

#### **Art.9 – Sicurezza e salute sul luogo di lavoro.**

Il personale della BIOCH-DMCS che prestasse eventualmente la propria attività presso la Società è tenuto all'osservanza delle disposizioni di legge in materia di sicurezza e salute dei lavoratori sul luogo di lavoro e a quanto indicato nella normativa vigente presso la Società.

BIOCH-DMCS è tenuta ad informare il proprio personale che prestasse attività presso la medesima sui rischi presenti presso gli ambienti di lavoro frequentati sulle misure di prevenzione e protezione eventualmente adottate.

**Art. 10 – Personale, assicurazioni**

Il personale della BIOCH-DMCS che si rechi presso la Società e vi svolga attività oggetto del presente contratto è coperto da assicurazione per i danni contemplati dalle polizze stipulate dalla BIOCH-DMCS per responsabilità civile verso terzi e infortuni.

In caso di infortunio del personale della BIOCH-DMCS durante lo svolgimento delle attività di cui al presente contratto, condotte nelle sedi di svolgimento delle stesse ed in itinere, la parte interessata deve procedere, nei modi e nei tempi previsti dalla normativa vigente.

**Art. 11 – Registrazione e spese**

Le prestazioni di cui al presente contratto sono soggette a I.V.A. e pertanto il contratto è soggetto a registrazione solo in caso d'uso e a tassa fissa ai sensi degli artt.5 e 40 del D. P. R. n.131 del 26.04.1986. Le spese di registrazione sono a carico della parte che la richiede.

Le spese di bollo e registrazione saranno a carico de La società.

**Art. 12 - Controversie**

Le Parti concordano di definire amichevolmente qualsiasi controversia che possa nascere dal presente contratto. Per le vertenze che dovessero comunque insorgere tra le Parti in ordine alla validità, efficacia, interpretazione ed esecuzione del presente contratto e successivi patti e comunque ad esso connessa, sarà competente il Foro di Roma.

Letto, approvato e sottoscritto,

Per **SANYPET SPA**

Per **BIOCH-DMCS**

\_\_\_\_\_, li \_\_\_\_\_

**SANYPET** S.p.A.  
Legale rappresentante  
Gianandrea Guidetti

Foggia, li 21-09-2017

Il Direttore

Prof. Lorenzo Lo Muzio



## ALLEGATO TECNICO

al contratto di ricerca tra SANYpet S.p.A e BIOCH-DMCS dell' Università degli Studi di Foggia

### **Valutazione degli Effetti Mitotossici dell'Ossitetraciclina contenuta in Prodotti Zootecnici ad Uso Alimentare**

#### *1 - Introduzione e Obiettivi Generali*

Le tetracicline hanno un forte impatto sulla fisiologia mitocondriale in cellule di mammifero a concentrazioni comparabili con quelle utilizzate per combattere le infezioni batteriche. Esse inibiscono la sintesi proteica mitocondriale alterando i meccanismi di presentazione degli amminoacil t-RNA alla subunità minore dei ribosomi mitocondriali. Gli effetti della inibizione della traduzione proteica mitocondriale alterano la espressione bi-genomica coordinata dei complessi della fosforilazione ossidativa. Ciascuno di questi complessi è costituito da più subunità delle quali alcune sono codificate dal DNA mitocondriale (7 per il CxI, 1 per il CxIII, 3 per il CxIV, 2 per il CxV) e un difetto di coordinamento con l'espressione delle subunità codificate dal DNA nucleare causa una condizione nota come "nuclear-mitochondrial protein unbalance" che comporta una alterazione della "proteostasi" mitocondriale con l'attivazione di risposta adattative quali la "mitochondrial unfolded protein response (mtUPR)" e la degradazione selettiva di organelli danneggiati (mitophagy). La prolungata inibizione della sintesi proteica mitocondriale porta all'arresto della proliferazione cellulare e all'accumulo delle cellule in fase G1 del ciclo cellulare. In aggiunta all'azione depressiva sulla bioenergetica cellulare, le tetracicline possono avere altri effetti "protein translation-independent" legati alla loro capacità di chelare cationi divalenti quali il  $Ca^{2+}$  (oltre a  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e altri). Il  $Ca^{2+}$  in particolare svolge una importante azione di modulazione concentrazione-dipendente sulla fisiologia respiratoria del mitocondrio. Dato il crescente riconoscimento del ruolo svolto dal metabolismo nel controllo della risposta immunologica innata e acquisita, tutto ciò può spiegare gli effetti immunosoppressivi delle tetracicline in termini di impatto sulla fisiologia di cellule immunocompetenti.

Date le summenzionate premesse il presente progetto intende verificare gli effetti della esposizione alla ossitetraciclina (OTC), e a derivati di prodotti ad uso alimentare contenenti OTC (PAC-OTC), su vari aspetti della fisiologia mitocondriale con particolare riguardo a cellule immunocompetenti. L'obiettivo è definire gli aspetti biochimici/molecolari degli effetti indotti dalla OTC e in una prospettiva a medio termine sviluppare/applicare protocolli atti a compensarne l'azione immunosoppressiva. Questi ultimi potrebbero includere l'uso di estratti naturali fitoterapici messi a punto dalla Divisione Ricerca & Sviluppo della SANYpet SpA (Bagnoli di Sopra, PD). La sperimentazione sarà condotta mediante test in vitro su linee cellulari e colture primarie presso i laboratori di Biochimica del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Foggia e dell'Unità di Genetica Medica dell'Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo (FG).

## 2 – Descrizione dell' Attività Specifica

Attività : **Analisi della biogenesi del sistema OxPhos mitocondriale e valutazione di sue alterazioni sulla fisiologia di cellule immuno-competenti.**

Gli effetti di OCT e PAC-OTC sulla espressione delle proteine costituenti i complessi della fosforilazione ossidativa mitocondriale saranno valutati attraverso immunoblots su lisati proteici ottenuti dalla cellula intera o dalla sola componente mitocondriale ottenuta mediante frazionamento differenziale. A tale scopo saranno utilizzate principalmente: la linea cellulare eritroleucemica K562, dermo-fibroblasti umani neonatali HDFneo, linfo-monociti isolati da sangue periferico umano o canino (PBMN). Le proteine oggetto di analisi saranno sia quelle codificate dal DNA nucleare che quelle codificate dal DNA mitocondriale per ciascuna delle quali sono disponibili in commercio anticorpi specifici. L'assemblaggio delle differenti subunità nei complessi (I, III, IV, V) sarà valutato mediante elettroforesi bi-dimensionale (nativa vs denaturante). Saranno inoltre valutati mediante RT-qPCR e immunoblotting l'espressione a livello di trascritti e proteine dei principali fattori trascrizionali (PGC1a, NRF1/2, TFAM) noti essere coinvolti nella biogenesi mitocondriale. Sarà inoltre, eventualmente, valutata l'espressione di biomarcatori della mtUPR e della mitofagia. Le suddette analisi saranno complementate da misure funzionali atte a determinare l'attività respiratoria cellulare ed enzimatica specifica di tutti i complessi della fosforilazione ossidativa. Queste saranno condotte mediante protocolli standardizzati i) su cellule intatte; ii) su lisati cellulari con metodi spettrofotometrici o iii) su gel elettroforetici nativi mediante "staining" funzionale.

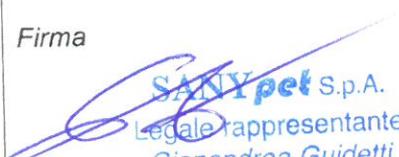
Risultati intermedi: Standardizzazione delle concentrazioni e tempi di esposizione di OCT e PAC-OTC valutati mediante test di vitalità cellulare; analisi dei profili di espressione proteica dei complessi OxPhos mediante immunoelettroforesi utilizzando cocktail di anticorpi specifici; valutazione delle conseguenze metaboliche mediante misurazione della respirazione cellulare in condizioni mimanti differenti stati funzionali.

Durata: 6 mesi a partire dall'inizio del contratto di ricerca

Risultati conclusivi: Determinazione dell'impatto della inibizione della sintesi proteica mitocondriale sul coordinamento bigenomico cellulare e sulla fisiologia cellulare mediante valutazione dell'espressione di geni nucleari coinvolti nell'assemblaggio dei complessi OxPhos e nel controllo della loro biogenesi. I risultati saranno ottenuti mediante: i) immunoelettroforesi bidimensionale (BN-PAGE), atta a definire il livello di assemblaggio dei complessi OxPhos; ii) valutazione mediante test cinetici dell'attività catalitica dei singoli complessi; iii) valutazione tramite q-RT-PCR dei livelli di espressione di

subunità dei complessi OxPhos a codifica nucleare; iv) valutazione dei livelli di espressione di fattori trascrizionali coinvolti nella biogenesi mitocondriale; v) valutazione di biomarkers dell' unfolded protein response mitocondriale mtUPR e della (mito)autofagia.

Durata: dal 6° mese al termine del contratto

Il Responsabile Scientifico <b>SANYPET SPA</b>	Il Responsabile scientifico di BIOCH-DMCS
Dr. <u>Alessandro Di Cerbo</u> <del>Prof. Andrea Alessandrini</del>  Firma  <b>SANYPet</b> S.p.A. Legale rappresentante Gianandrea Guidetti	Prof. Nazzareno Capitanio  Firma <b>IL DIRETTORE</b> <b>Prof. Lorenzo LO MUZIO</b> 

