

**DEL 1 (ODLOČBA SVETA 2001/813/ES)**

**PART 1 (COUNCIL DECISION 2002/813/EC)**

**OBLIKA POVZETKA INFORMACIJ PRIJAVE ZA SPROŠČANJE GENSKO  
SPREMENJENIH ORGANIZMOV, RAZEN VIŠJIH RASTLIN, V SKLADU Z 11.  
ČLENOM DIREKTIVE 2001/18/ES**

**SUMMARY NOTIFICATION INFORMATION FORMAT FOR THE RELEASE OF GENETICALLY MODIFIED  
ORGANISMS OTHER THAN HIGHER PLANTS IN ACCORDANCE WITH ARTICLE 11 OF DIRECTIVE  
2001/18/EC**

**A. Splošne informacije**

**A. General information**

*1. Podrobnosti prijave*

*1. Details of notification*

(a) Država članica prijave **Slovenija**  
Member State of notification

(b) Številka prijave **B/SI/21/01**  
Notification number

(c) Datum potrditve prijave  
Date of acknowledgement of notification

(d) Naslov projekta ...  
Title of the project

***Klinična študija " Spremljanje kliničnega in imunskega odgovora za izboljšanje zdravljenja spontanih  
perifernih tumorjev psov s kombinacijo elektrokemoterapije in genskega elektrotransferja IL-12"***

(e) Predvideno obdobje sproščanja **do 30/4/2026**  
Proposed period of release From .././.... until .././....

*2. Prijavitelj*

*2. Notifier*

Ime ustanove ali podjetja:

*Name of institution or company:*

**Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, Ljubljana**

*3. Značilnosti GSO*

*3. GMO characterisation*

(a) Navedite, ali je GSO:

(a) Indicate whether the GMO is a:

Viroid (.)

viroid	(.)
RNK virus	(.)
RNA virus	(.)
DNK virus	(.)
DNA virus	(.)
Bakterija	(.)
bacterium	(.)
Gliva	(.)
fungus	(.)
Žival	
animal	
- sesalec	(.)
- mammals	(.)
- žuželka	(.)
- insect	(.)
- riba	(.)
- fish	(.)
- ostale živali;	(.)
- other animal	(.)

drugo, določite (kraljestvo, vrsto in razred)  
specify (phylum, class)

**pORF-caIL-12-ORT je umetno ustvarjen plazmid in v okolju ne obstaja naravno. Plazmid je namenjen uporabi v raziskovalne namene. Sam po sebi nima značilnosti živega organizma, zato oznaka "GSO" zanj ni primerna.**

(b) Identiteta GSO (rod in vrsta)

(b) Identity of the GMO (genus and species)

**Plazmida ni mogoče taksonomsko klasificirati**

(c) Genska stabilnost – glede na Prilogo IIIa, II, A(10)

(c) Genetic stability – according to Annex IIIa, II, A(10)

**Plazmid pORF-caIL-12-ORT poleg gena za IL12 vsebuje mesto Ori. Pomnoževanje plazmida je zaradi specifičnega mesta začetka replikacije (Ori) možna samo v bakterijah *E. coli*.**

**Te bakterije niso prisotne v tkivih, ki bodo tranfecirali. V prejšnji študiji (Krhač Levačič 2013, Sproščanje v okolje št. 35419-1/2009) je bilo za podoben plazmid dokazano, da se ne prenese v bakterije, ki so normalno prisotne na koži psov. Poleg tega je bilo dokazano, da se plazmid ne sprošča v urinu, blatu in serumu, na mestu aplikacije pa takoj po aplikaciji ostane minimalna količina plazmidne DNA, katere 4 tedne po aplikaciji ni več moč zaznati (Sproščanje v okolje št. 35419-1/2014).**

**Plazmid bo apliciran peritumoralno ali intratumoralno, temu pa bo neposredno sledila elektroporacija s sterilnim aplikatorjem z elektrodami. Mesto vboda, kamor bo aplicirana plazmidna DNA in električni pulzi, bodo pred aplikacijo razkuženi po standardih za kirurško razkuževanje. Po aplikaciji bo rana povita, če bo na koži, psi pa bodo dobili zaščitni ovratnik. Rana bo ostala povita najmanj 7-10 dni. Pred odhodom psa domov, bodo lastniki dobili natančna navodila o oskrbi rane in koliko časa morajo psi nositi ovratnik. Psi morajo nositi ovratnik 3 tedne, ker v tem času ni bilo v predhodnih študijah več detektirane plazmidne DNA na mestu aplikacije, če je tumor (in s tem mesto aplikacije) na takem mestu, da si ga pes**

lahko liže (Sproščanje v okolje št. 35419-1/2009).

Vstop same plazmidne DNA v celice kože in s tem tudi vstop v krvni obtok in prenos v druge organe, iz katerih bi se lahko izločala v okolico, je praktično nemogoč.

V kolikor bi prišlo do izločanja plazmida v okolico, bi bila možnost prenosa plazmida v drug organizem in učinkovita ekspresija transgena, zlasti v toksičnih odmerkih, zanemarljiva, saj je učinkovitost transfekcije in transformacije gole plazmidne DNA brez dodatnih fizikalnih ali kemijskih metod zelo majhna (Čemažar M in sod., 2002).

4. *Je enako sproščanje GSO predvideno drugod v Skupnosti (skladno s členom 6(1)), istega prijavitelja?*  
4. *Is the same GMO release planned elsewhere in the Community (in conformity with Article 6(1)), by the same notifier?*

Da (.)                      Ne    (x)  
Yes (.)                    No    (.)

Če da, vstavite kodo(e) držav(e): ...  
If yes, insert the country code(s)                      ...

5. *Je bil enak GSO prijavljen za sproščanje drugod v Skupnosti, istega prijavitelja?*  
5. *Has the same GMO been notified for release elsewhere in the Community by the same notifier?*

Da (.)                      Ne    (x)  
Yes (.)                    No    (.)

Če da:

If yes:

- Država članica prijave                      ...  
- Member State of notification                      ...  
- Številka prijave                      B/././...  
- Notification number                      B/././...

6. *Je bil enak GSO prijavljen za sproščanje ali dajanje na trg izven Skupnosti, istega ali drugega prijavitelja?*

6. *Has the same GMO been notified for release or placing on the market outside the Community by the same or other notifier?*

Da (.)                      Ne    (x)  
Yes (.)                    No    (.)

Če da:

If yes:

- Država članica prijave                      ...  
- Member State of notification                      ...  
- Številka prijave                      B/././...  
- Notification number                      B/././...

7. *Povzetek možnih vplivov na okolje zaradi sproščanja GSO*  
7. *Summary of the potential environmental impact of the release of the GMOs.*

Plazmid pORF-caIL-12-ORT nima značilnosti živega organizma ali virusa in ga zato ne moremo definirati kot GSO. Ima izvedeno delečijo vseh genov za mobilizacijo plazmida in ni prenosljiv med transfeciranimi in netransfeciranimi celicami. V organizmu se ne pomnožuje in se z namnoževanjem celic v tkivu redči. Plazmid se v genom prejemnika ne vgrajuje.

V kolikor bi prišlo do izločanja plazmida v okolico, bi bila možnost prenosa plazmida v drugo žival oziroma človeka in učinkovita ekspresija transgena, zlasti v večjih koncentracijah, zanemarljiva, saj je učinkovitost transfekcije gole plazmidne DNA brez dodatnih fizikalnih ali kemijskih metod zelo majhna. Plazmid prav tako ni prenosljiv med bakterijami, kar pomeni, da v kolikor bi prišlo do morebitne transfekcije naravno prisotnih bakterij v prebavnem ali urinarnem traktu tretiranih psov in izločanje v

okolje, prenos na druge bakterije v okolici ni mogoč. Replikacija plazmida je zaradi specifičnega začetka replikacije možna samo v bakterijah *E. coli*, ki pa ne izražajo genskega produkta. Verjetnost, da bi plazmid prišel v stik s kompetentno *E. coli*, ki bi lahko prevzela plazmid in ga replicirala, je zelo majhna. Vertikalni prenos plazmida ni mogoč.

Plazmid pORF-caIL-12-ORT ne nosi zapisa za odpornost na antibiotike. Verjetnost, da plazmid pORF-caIL-12-ORT v pogojih nameravanega namernega sproščanja v okolje postane obstojen in invaziven v naravnih habitatih, je zanemarljiva, ker plazmid pORF-caIL-12-ORT nima značilnosti živega organizma in nima naravnega habitata, saj je pripravljen sintetično v umetnih pogojih.

Plazmid pORF-caIL-12-ORT nima morebitne selektivne prednosti ali pomanjkljivosti, ki bi se v pogojih nameravanega namernega sproščanja v okolje lahko uresničila, saj se v okolju sam plazmid razgradi in je možnost prenosa plazmida v druge organizme manj verjetna.

Ker plazmid pORF-caIL-12-ORT nima lastnosti živega organizma, ker se v naravi hitro razgradi in ker je možnost njegovega prenosa v druge organizme majhna, ocenjujemo, da je verjetnost negativnega vpliva in raven tveganja za okolje minimalno oz. zanemarljivo.

## B. Informacije o prejemnih ali starševskih organizmih, iz katerih GSO izhajajo

### B. Information relating to the recipient or parental organism from which the GMO is derived

#### 1. Značilnosti prejemnega ali starševskega organizma:

##### 1. Recipient or parental organism characterisation:

(a) Navedite, ali je prejemni ali starševski organizem:

(a) Indicate whether the recipient or parental organism is a:

(izberite samo enega)

(select one only)

- |           |     |
|-----------|-----|
| Viroid    | (.) |
| viroid    | (.) |
| RNK virus | (.) |
| RNA virus | (.) |
| DNK virus | (.) |
| DNA virus | (.) |
| Bakterija | (.) |
| bacterium | (.) |
| Gliva     | (.) |
| fungus    | (.) |
| Žival     |     |
| animal    |     |
| - sesalec | (.) |
| - mammals | (.) |
| - žuželka | (.) |
| - insect  | (.) |
| - riba    | (.) |
| - fish    | (.) |

- ostale živali; (.)  
(določite vrsto, razred) ...
- other animal (.)  
(specify phylum, class) ...

drugo, določite  
other, specify

**Umetno ustvarjen plazmid pORF-caIL-12-ORT, ki nima taksonomske klasifikacije in v okolju ne obstaja naravno.**

## 2. Ime

### 2. Name

- (i) red in/ali višja sistematska kategorija (za živali) ...
- (i) order and/or higher taxon (for animals) ...
- (ii) rod ...
- (ii) genus ...
- (iii) vrsta ...
- (iii) species ...
- (iv) podvrsta ...
- (iv) subspecies ...
- (v) sev ...
- (v) strain ...
- (vi) patovar (biotip, ekotip, pasma, itd.) ...
- (vi) pathovar (biotype, ecotype, race, etc.) ...
- (vii) domače ime **pORF-caIL-12-ORT**
- (vii) common name ...

## 3. Geografska razširjenost organizma

### 3. Geographical distribution of the organism

(a) Avtohton ali kako drugače dokazan v državi prijave:

(a) Indigenous to, or otherwise established in, the country where the notification is made:

Da (.)	Ne (.)	Ni znano (.)	(.)
Yes (.)	No (.)	Not known (.)	(.)

**Pojavlja se samo v raziskovalnih laboratorijih, nima naravnega okolja.**

(b) Avtohton ali kako drugače dokazan v drugih državah ES:

(b) Indigenous to, or otherwise established in, other EC countries:

(i) Da (.)	(.)
(i) Yes (.)	(.)

**Pojavlja se samo v raziskovalnih laboratoriji, nima naravnega okolja.**

Če da, navedite tip ekosistema, v katerem se nahaja: raziskovalni laboratoriji

If yes, indicate the type of ecosystem in which it is found:

Atlantski	..
(Atlantic	..)
Sredozemski	..
(Mediterranean	..)
Arktičen	..
(Boreal	..)

Alpski ..

(Alpine ..)

Celinski ..

(Continental ..)

Makaroneški ..

(Macaronesian ..)

(ii) Ne (.)

(ii) No (.)

(iii) Ni znano (.)

(iii) Not known (.)

(c) Se pogosto uporablja v državi prijave?

(c) Is it frequently used in the country where the notification is made?

Da (.)

Yes (.)

Ne (x)

No (.)

(d) Se pogosto goji v državi prijave?

(d) Is it frequently kept in the country where the notification is made?

Da (.)

Yes (.)

Ne (x)

No (.)

#### 4. Naravni habitat organizma

##### 4. Natural habitat of the organism

#### Plazmid je umetno ustvarjen in nima naravnega habitata.

(a) Če je organizem mikroorganizem

(a) If the organism is a microorganism

voda(water) (.)

zemlja, prostoživeči(soil, free-living) (.)

zemlja, v povezavi z rastlinskimi koreninskimi sistemi(soil in association with plant-root systems) (.)

v povezavi z rastlinskimi sistemi listov/stebel(in association with plant leaf/stem systems) (.)

drugo, določite(other, specify) ...

(b) Če je organizem žival: naravni habitat ali običajen kmetijski ekosistem: ...

(b) If the organism is an animal: natural habitat or usual agroecosystem: ...

#### 5.(a) Metode odkrivanja

##### 5.(a) Detection techniques

#### PCR in qRT-PCR

#### 5.(b) Metode identifikacije

##### 5.(b) Identification techniques

#### PCR in qRT-PCR

#### 6. Je prejemni organizem uvrščen na osnovi obstoječih pravil Skupnosti glede varovanja zdravja ljudi

*in/ali okolja?*

6. *Is the recipient organism classified under existing Community rules relating to the protection of human health and/or the environment?*

Da (.)                      Ne (x)  
Yes (.)                      No (.)

Če da, opredelite: ...

If yes, specify...

7. *Je prejemni organizem značilno patogen ali škodljiv na kakršen koli drug način (vključno z zunajceličnimi produkti), živ ali mrtev?*

7. *Is the recipient organism significantly pathogenic or harmful in any other way (including its extracellular products), either living or dead?*

Da (.)                      Ne (x)                      Ni znano (.)  
Yes (.)                      No (.)                      Not known (.)

Če da:

If yes:

(a) katerim izmed naslednjih organizmov:

(a) to which of the following organisms:

ljudje (humans) (.)  
živali (animals) (.)  
rastline (plants) (.)  
drugo (other) (.)

(b) posredujte ustrezne informacije, navedene v Prilogi III A, točka II. (A)(11)(d) Direktive 2001/18/EC ...

(b) give the relevant information specified under Annex III A, point II. (A)(11)(d) of Directive 2001/18/EC

...

8. *Informacije o razmnoževanju*

8. *Information concerning reproduction*

(a) Generacijski čas v naravnih ekosistemih:

(a) Generation time in natural ecosystems:

**Generacijski čas pORF-caIL-12-ORT v naravnem habitatu ni znan. pORF-caIL-12-ORT se lahko replicira le v kompetentnih bakterijah *E. coli*. V laboratorijskih kulturah ima čas podvajanja 24-71 min (Bremer H et al, 1986).**

(b) Generacijski čas v ekosistemih, kjer se bo izvajalo sproščanje

(b) Generation time in the ecosystem where the release will take place:

**Plazmid pORF-caIL-12-ORT se lahko zaradi specifičnega mesta začetka replikacije (Ori) pomnožuje le v kompetentnih bakterijah *E. coli* DH1-ORT. Te bakterije niso prisotne v tkivih, ki bodo transfecirane.**

(c) Način razmnoževanja: Spolno ..                      Nespolno (x)

(c) Way of reproduction: Sexual ..                      Asexual ..

**Nespolno z replikacijo v bakterijah (možno samo v *E. coli*)**

(d) Dejavniki, ki vplivajo na razmnoževanje

(d) Factors affecting reproduction:

**Razmnoževanje (replikacija) plazmida je možna samo v bakterijah *E. coli* (sev DH1-ORT), zaradi**

specifičnega začetka replikacije (Ori). Sev DH1-ORT izvira iz oslabiljenega laboratorijskega seva *E. coli*, K12, ki ni sposoben kolonizirati in ne producira toksinov, zato ni patogen za človeka ali živali. Za povrnitev patogenosti bi bili potrebne večkratne rekombinacije. Poleg tega imajo oslabiljeni sevi K12 slabe možnosti preživetja v okolju, saj se razmnožuje le na ustreznih gojiščih pri temperaturi 37°C, kar je možno le v ustrezno opremljenih laboratorijih. Poleg tega te bakterije niso prisotne v tkivih, ki bodo transfecirane. Sam plazmid, pa se ne prenese v bakterije, ki so normalno prisotne na koži psov (Krhač Levačič 2013).

Injicirani plazmid se hitro razgradi v krvi in ostalih tkivih, kamor bi se lahko eventuelno širil. Študije dokazujejo, da se v mišicah večina plazmida razgradi v 30 min po aplikaciji (Bureau et al, 1995). V krvi ima razpolovno dobo manj kot 5 min (Lew et al 1995; Parker et al 1995). Študija, v kateri so določili količino plazmida v spolnih žlezah so pokazale, da je bila količina le-tega pod mejo detekcije dostopnih metod (PCR) (Vilalta et al, 2005). V študiji, v kateri so ugotavljali možnost integracije plazmida po električno-posredovanem vnosu v mišice in druga tkiva, je bilo ugotovljeno, da se v genomsko DNA integrira približno 1 kopija plazmidne DNA na 50 mg plazmida, ki se aplicira v mišico. Zaradi tehničnih omejitev čistilnih postopkov, ni možno zagotoviti bolj natančnih podatkov (Wang et al, 2004).

V primeru, da plazmid pride v kontakt z bakterijami *E. coli* v prebavnem traktu, je vnos v take bakterije zelo majhen, saj je vnos možen le v kompetentne bakterije, ki pa se v naravi praviloma ne pojavljajo. V kolikor bi prišlo do morebitne transfekcije naravno prisotnih bakterij v črevesju ali urinarnem traktu, plazmid ni prenosljiv med bakterijami, kar pomeni, da prenos na druge bakterije v okolici ni mogoč.

Količina plazmida, ki se bo aplicirala, bo odvisna od velikosti tumorja in ne bo preseгла 2 mg ob enkratni aplikaciji.

## 9. Sposobnost preživetja

### 9. Survivability

(a) sposobnost tvorbe struktur, ki povečujejo možnosti preživetja ali mirovanja:

(a) ability to form structures enhancing survival or dormancy:

- (i) endospore(endospores) (.)
- (ii) ciste (cysts) (.)
- (iii) sklerociji (sclerotia) (.)
- (iv) nespolne spore (glive) (asexual spores (fungi)) (.)
- (v) spolne spore (glive) (sexual spores (funghi)) (.)
- (vi) jajčeca (eggs) (.)
- (vii) bube (pupae) (.)
- (viii) ličinke (larvae) (.)
- (ix) drugo, določite (other, specify) (.)

Ne tvori nobene od zgoraj navedenih struktur. Plazmid, ki se na mestu vnosa ne bo vključil v celice, se v medceličnem prostoru s pomočjo endonukleaz hitro razgradi, zato ni možen prenos v druge celice, v krvni obtok, prebavila in ne v spolovila ali katere koli druge organe, ki bi lahko predstavljali izvor izpusta plazmida v okolje. Ker pes predstavlja učinkovito zaprt sistem za vnešeni plazmid, je tveganje za izpust plazmida v okolje zanemarljivo.

(b) pomembni dejavniki, ki vplivajo na sposobnost preživetja:

(b) relevant factors affecting survivability:

V primeru, da bi prišlo do razlitja plazmida v okolico, pride do hitre degradacije zaradi naravno prisotnih endonukleaz.

## 10(a) Načini razširjanja

### (a) Ways of dissemination

Verjetnost, da bi plazmid prišel v stik s kompetentno *E. coli*, ki bi lahko prevzela plazmid in ga replicirala, je zanemarljivo majhna. Vertikalni prenos plazmida ni mogoč.



(b) Dejavniki, ki vplivajo na razširjanje

(b) Factors affecting dissemination

Plazmid pORF-caIL-12-ORT ima mesto Ori, ki omogoča začetek replikacije samo v *E. coli*. Te bakterije niso pogosti prebivalci v tkivih ki bodo transfecirana. V organizmu se ne pomnožuje in se z namnoževanjem celic v tkivu redči. Plazmid se v genom prejemnika ne vgrajuje.

Vnos pORF-caIL-12-ORT v ali v okolico tumorja bo v študiji potekal s pomočjo elektroporacije prejemnega tkiva (kože ali oralne sluznice), pri čemer bo dosežen lokalni vnos DNA le v tkivo, v katerem je dosežena elektroporacija celic. Številne študije so pokazale, da je aplikacija plazmidne DNA, brez električnih pulzov, relativno neučinkovita metoda transfekcije, saj je ekspresija transgena po takem vnosu zelo slaba (<1% nivo transfekcije), z uporabo električnih pulzov pa se učinkovitost transfekcije signifikantno poveča (Čemažar, 2002). Goli plazmid, ki z elektroporacijo ne vstopi v celice, se v medceličnini oz. plazmi razgradi s pomočjo endonukleaz, zato je vstop v krvni obtok in prenos v druge organe (prebavila, dihala, urinarni trakt, rodila), iz katerih bi se lahko izločal v okolico, zanemarljivo majhen.

11. Predhodne genske spremembe prejemnika ali starševskega organizma, ki so že prijavljene za sproščanje v državi prijave (navedite številko prijave) ..., B/././...

11. Previous genetic modifications of the recipient or parental organism already notified for release in the country where the notification is made (give notification numbers) ..., B/././...

Jih ni.

### C. Informacije o genskem spreminjanju

#### C. Information relating to the genetic modification

1. Vrsta genske spremembe

1. Type of the genetic modification

- |   |     |
|---|-----|
| (i) vnos genetskega materiala (insertion of genetic material)       | (x) |
| (ii) odstranitev genetskega materiala (deletion of genetic materia) | (.) |
| (iii) zamenjava baz (base substitution)                             | (.) |
| (iv) fuzija celic (cell fusion)                                     | (.) |
| (v) drugo, določite (others, specify) ...                           |     |

2. Predviden rezultat genske spremembe

2. Intended outcome of the genetic modification

Plazmid pORF-caIL-12-ORT, ki sam po sebi ni GSO, je umetno sestavljen plazmid.

3 (a) Je bil v procesu spreminjanja uporabljen vektor?

3.(a) Has a vector been used in the process of modification?

Da(.)                      Ne      (x)  
Yes                      (.)                      No                      (.)

Če ne, pojdite k vprašanju 5.

If no, go straight to question 5.

3(b) Če da, je vektor v spremenjenem organizmu prisoten v celoti ali delno?

3 (b) If yes, is the vector wholly or partially present in the modified organism?

Da                      (.)                                      Ne                      (.)  
Yes                      (.)                                      No                      (.)

Če ne, pojdite k vprašanju 5.

If no, go straight to question 5.

4. Če je odgovor na vprašanje 3(b) pritrdilen, posredujte naslednje informacije

4. If the answer to 3(b) is yes, supply the following information

(a) Vrsta vektorja

(a) Type of vect

plazmid (plasmid)	(.)
bakteriofag (bacteriophage)	(.)
virus (virus)	(.)
kozmid (cosmid)	(.)
transpozicijski element(transposable element)	(.)
drugo, opredelite (others, specify)	...

(b) Identiteta vektorja

(b) Identity of the vector

...

(c) Gostiteljsko območje za vektor

(c) Host range of the vector

...

(c) Prisotnost zaporedij v vektorju, ki mu dajejo selekcijski ali identifikacijski fenotip

(d) Presence in the vector of sequences giving a selectable or identifiable phenotype

Da (.)	Ne (.)
Yes (.)	No (.)

odpornost na antibiotike	(.)
antibiotic resistance	

drugo, določite (others, specify) ...

Navedite kateri gen odpornosti na antibiotike je vnesen

Indication of which antibiotic resistance gene is inserted

...

(e) Sestavni deli vektorja

(e) Constituent fragments of the vector

...

(f) Metoda vnosa vektorja v prejemni organizem

(f) Method for introducing the vector into the recipient organism

(i) transformacija (transformation)	(.)
(ii) elektroporacija (electroporation)	(.)
(iii) makroinjiciranje (macroinjection)	(.)
(iv) mikroinjiciranje (microinjection)	(.)
(v) infekcija (infection)	(.)
(vi) drugo, opredelite (others, specify)	...

5. Če je odgovor na vprašnji B.3(a) in (b) nikalen, katera metoda je bila uporabljena v procesu spreminjanja

5. If the answer to question B.3(a) and (b) is no, what was the method used in the process of modification?

(i) transformacija (transformation)	(.)
(ii) mikroinjiciranje (microinjection)	(.)
(iii) mikroinkapsulacija (microencapsulation)	(.)
(iv) makroinjiciranje (microinjection)	(.)
(v) drugo, opredelite (others, specify)	

**pORF-caIL-12-ORT je bil ustvarjen z uporabo standardnih rekombinantnih metod za**

## Kloniranje DNA

### 6. Sestava vključka

#### 6. Composition of the insert

##### (a) Sestava vključka

##### (a) Composition of the insert

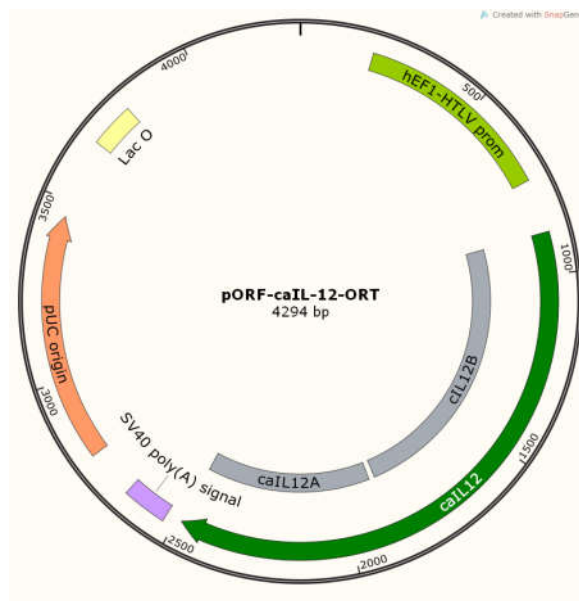
Genska sprememba bo narejena z vnosom genskega vključka, ki kodira pasji IL-12. Gen za pasji IL-12 in je sestavljen iz dveh podenot IL-12p35 in IL-12p40. Izvorni organizem, iz katerega izhaja vključek, je pes.

##### (b) Izvor vsakega sestavnega dela vključka

##### (b) Source of each constituent part of the insert

Ostali sestavni deli plazmida ( Slika 1) so:

- **EF-1 $\alpha$ /HTLV promotor:** Izražanje pasjega IL-12 je pod nadzorom konstitutivnega hibridnega promotorja EF-1 $\alpha$ /HTLV
- **caIL12:** gen za pasji fuzijski IL-12 od start do stop kodona, velikosti 1594 bp. Ca IL-12 je edini del plazmida, ki se lahko izraža v sesalskih celicah.
- **SV40 polyA:** poliadenilacijski signal opičjega virusa 40 (Simian virus 40 polyadenylation signal)
- **pUC origin:** replikacijski začetek (origin of replication) za sintezo DNA v *E. coli*.
- **Lac O:** Lac operator, del laktoznega operona. Potreben za selekcijo z uporabo ORT tehnologije.



Slika 1: Plazmid pORF-caIL-12-ORT

##### (c) Nameravana funkcija vsakega sestavnega dela vključka v GSO

##### (c) Intended function of each constituent part of the insert in the GMO

- **EF-1 $\alpha$ /HTLV promotor:** Izražanje pasjega IL-12 je pod kontrolo konstitutivnega hibridnega promotorja EF-1 $\alpha$ /HTLV
- **caIL12:** gen za pasji fuzijski IL-12 od start do stop kodona, velikosti 1594 bp. Ca IL-12 je edini del plazmida, ki se lahko izraža v sesalskih celicah.
- **SV40 polyA:** poliadenilacijski signal opičjega virusa 40 (Simian virus 40 polyadenylation signal)
- **pUC origin:** replikacijski začetek (origin of replication) za sintezo DNA v *E. coli*.
- **Lac O:** Lac operator, del laktoznega operona. Potreben za selekcijo z uporabo ORT tehnologije.

##### (d) Lokacija vključka v gostiteljskem organizmu

##### (d) Location of the insert in the host organism

- na prostem plazmidu (x)
- on a free plasmid
- vključen v kromosom (.)
- integrated in the chromosome
- drugo, določite (others, specify) ...

(e) Ali vključek vsebuje dele, katerih produkti ali delovanje so nepoznani?

(e) Does the insert contain parts whose product or function are not known?

- |         |        |
|---------|--------|
| Da (.)  | Ne (x) |
| Yes (.) | No (.) |

Če da, opredelite

If yes, specify

...

#### D. Informacije o organizmu(-ih), iz katerega(ih) vključek izhaja

#### D. Information on the organism(s) from which the insert is derived

1. Navedite, ali je:

1. Indicate whether it is a:

- |                                   |  |     |
|-----------------------------------|--|-----|
| Viroid (viroid)                   | (.)  |     |
| RNK virus (RNA virus)             | (.)  |     |
| DNK virus (DNA virus)             | (.)  |     |
| Bakterija (bacterium)             | (.)  |     |
| Gliva (fungus)                    | (.)  |     |
| Žival (animal)                    |  |     |
| - sesalec (mammals)               | (.)  |     |
| - žuželka (insect)                | (.)  |     |
| - riba (fish)                     | (.)  |     |
| - druga žival (other animal)      | (.)  |     |
|                                   | določite vrsto, razred (specify phylum, class) | ... |
| Drugo, določite (others, specify) | <b>Pes</b>                                     |     |

2. Popolno ime

2. Complete name

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| (i) red in/ali višja sistematska kategorija (za živali) | <b>Mammalia, Carnivora, Canidae</b> |
| (ii) order and/or higher taxon (for animals)            | ...                                 |
| (ii) družina (za rastline)                              |                                     |
| (ii) family name for plants                             | ...                                 |
| (iii) rod   | <b>Canis</b>                        |
| (iii) genus   | ...                                 |
| (iv) vrsta  | <b>C. lupus</b>                     |
| (iv) species  | ...                                 |
| (v) podvrsta  | <b>C. lupus familiaris</b>          |
| (v) subspecies  | ...                                 |
| (vi) sev  | ...                                 |
| (vi) strain   | ...                                 |
| (vii) sorta/linija križanja                             | ...                                 |

- (vii) cultivar/breeding line ...  
 (viii) patovar (biotip, ekotip, pasma, itd.) ...  
 (viii) pathovar (biotype, ecotype, race, etc.) ...  
 (ix) domače ime **Domači pes**  
 (ix) common name ...

3. Je organizem značilno patogen ali škodljiv na kakršen koli drug način (vključno z zunajceličnimi produkti), živ ali mrtev?  
 3. Is the organism significantly pathogenic or harmful in any other way (including its extracellular products), either living or dead?

Da (.) Ne (x) Ni znano (.)  
 Yes (.) No (.) Not known (.)

Če je, opredelite naslednje  
 If yes, specify the following:

(a) katerim izmed naslednjih organizmov:

(a) to which of the following organisms:

ljudje (humans) (.)  
 živali (animals) (.)  
 rastline (plants) (.)  
 drugo (other) (.)

(b) so darovana zaporedja kakor koli vključena v patogene ali škodljive lastnosti organizma?

(b) are the donated sequences involved in any way to the pathogenic or harmful properties of the organism

Da (.) Ne (x) Ni znano (.)  
 Yes (.) No (.) Not known (.)

Če da, posredujte ustrezne informacije v skladu s Prilogo III A, točka II (A)(II)(d):

If yes, give the relevant information under Annex III A, point II(A)(11)(d):

...

4. Je donorski organizem razvrščen na osnovi obstoječih pravil Skupnosti glede varovanja zdravja ljudi in okolja, kot je Direktiva 90/679/EEC o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkemu dejavniku pri delu?

4. Is the donor organism classified under existing Community rules relating to the protection of human health and the environment, such as Directive 90/679/EEC on the protection of workers from risks to exposure to biological agents at work?

Da (.) Ne (x)  
 Yes (.) No (.)

Če da, opredelite

If yes, specify ...

5. Si donorski in prejemni organizem izmenjujeta genski material po naravni poti?

5. Do the donor and recipient organism exchange genetic material naturally?

Da (.) Ne (x) Ni znano (.)  
 Yes (.) No (.) Not known (.)

## E. Informacije o genetsko spremenjenem organizmu

### E. Information relating to the genetically modified organism

1. *Genske lastnosti in fenotipske značilnosti prejemnega ali starševskega organizma, ki so bile spremenjene kot rezultat genske spremembe*

1. *Genetic traits and phenotypic characteristics of the recipient or parental organism which have been changed as a result of the genetic modification*

(a) se GSO razlikuje od prejemnika glede sposobnosti preživetja?

(a) is the GMO different from the recipient as far as survivability is concerned?

Da	(.)	Ne	(x)	Ni znano	(.)
Yes	(.)	No	(.)	Not known	(.)

Opreделите

Specify ...

**pORF-caIL-12-ORT nima naravnega okolja, saj v naravi ne obstaja.**

**Preživetje pORF-caIL-12-ORT v naravnem okolju ni raziskano. Zmožnost preživetja pORF-caIL-12-ORT v naravnem okolju pod pogoji nameravane uporabe ocenjujemo kot malo verjetno (nepomembno).**

(b) se GSO kakor koli razlikuje od prejemnika, glede načina in/ali hitrosti razmnoževanja?

(b) is the GMO in any way different from the recipient as far as mode and/or rate of reproduction is concerned?

Da	(.)	Ne	(x)	Ni znano	(.)
Yes	(.)	No	(.)	Not known	(.)

Opreделите

Specify ...

(c) se GSO razlikuje od prejemnika, glede razširjanja?

(c) is the GMO in any way different from the recipient as far as dissemination is concerned?

Da	(.)	Ne	(x)	Ni znano	(.)
Yes	(.)	No	(.)	Not known	(.)

Opreделите

Specify ...

(d) se GSO razlikuje od prejemnika, glede patogenosti?

(d) is the GMO in any way different from the recipient as far as pathogenicity is concerned?

Da	(.)	Ne	(x)	Ni znano	(.)
Yes	(.)	No	(.)	Not known	(.)

Opreделите

Specify ...

**Vpliv genetsko spremenjenih celic na psa kot celoto, razen želenega povečanega celičnega imunskega odziva, je zanemarljiv in varen, kar je bilo dokazano že na podobnih kliničnih študijah na ljudeh in živalih (Daud AL**

in sod., 2008; Heller LC in Heller R, 2010; Pavlin in sod 2009; Čemažar in sod. 2011; neobjavljeni podatki). Dodatno je teoretična možnost prenosa v celice reproduktivnih organov psa zanemarljiva, saj je dokazano, da je bila frekvenca integracije plazmidne DNA, po genskem elektroprenosu v mišico, nižja, kot je raven spontanah mutacij (Kawabata in sod. 1995). Drugih medsebojni vplivov z drugimi organizmi in okoljem se ne pričakuje, saj se plazmid predvidoma pod vplivom zunanjih deoksiribonukleaz v okolju razgradi.

2. Genska stabilnost gensko spremenjenega organizma

2. Genetic stability of the genetically modified organism

Glej A (3).

3. Je GSO značilno patogen ali škodljiv na kakršen koli način (vključno z zunajceličnimi produkti), živ ali mrtev?

3. Is the GMO significantly pathogenic or harmful in any way (including its extracellular products), either living or dead?

Da	(.)	Ne	(x)	Ni znano	(.)
Yes	(.)	No	(.)	Not known	(.)

(a) katerim izmed naslednjih organizmov:

(a) to which of the following organisms:

ljudje (humans)	(.)
živali (animals)	(.)
rastline (plants)	(.)
drugo (other)	(.)

(b) posredujte ustrezne informacije, navedene v Prilogi III A, točka II (A)(II)(d) in II(C)(2)(i)

(b) give the relevant information specified under Annex III A, point II(A)(11)(d) and II(C)(2)(i)

Genska terapija perifernih tumorjev psov bo omogočila izražanje kodiranega produkta (caIL12), ki bo imel terapevtski protitumorski učinek. IL-12 stimulira proliferacijo perifernih mononuklearnih krvnih celic, aktivira naravne celice ubijalke in stimulira tvorbo interferona gama. Visoki odmerki IL-12 lahko povzročajo neželene učinke (povišana telesna temperatura, slabosti) (Leonard et al, 1997), vendar pa z odmerki, ki bodo uporabljeni v študiji, ni možno doseči toksičnih koncentracija IL-12 v kateremkoli človeškem ali živalskem organizmu (Pavlin et al 2008; Daud et al 2008; Pavlin et al 2011; Čemažar et al 2011; Sproščanje v okolje št. 35419-1/2009).

4. Opis metod identifikacije in odkrivanja

4. Description of identification and detection methods

(a) Uporabljene tehnike za odkrivanje GSO v okolju

(a) Techniques used to detect the GMO in the environment

PCR in qRT-PCR

(b) Uporabljene tehnike za identifikacijo GSO

(b) Techniques used to identify the GMO

PCR in qRT-PCR

## F. Informacije o sproščanju

F. Information relating to the release

1. Namen sproščanja (vključno s pomembnejšimi možnimi ugodnostmi za okolje, ki se lahko pričakujejo)

1. Purpose of the release (including any significant potential environmental benefits that may be expected)

Namen sproščanja je klinična študija z naslovom« Spremljanje kliničnega in imunskega odgovora za

izboljšanje zdravljenja spontanih perifernih tumorjev psov s kombinacijo elektrokemoterapije in genskega elektrotransferja IL-12«.

Pacienti, vključeni v klinično študijo, bodo po izvedeni terapiji, ki se bo izvajala na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete, odpuščeni v domačo oskrbo k lastniku. Namen raziskave je primerjanje uspešnosti zdravljenja z uporabo peri in intra-tumoralne aplikacije plazmida, ki nosi zapis za IL-12 (GET z IL-12) in ugotavljanje protitumorskega učinka glede na odmerek citostatika (v primeru uporabe bleomicina), imunske biomarkerje ter črevesno mikrobioto pacienta.

2. *Se mesto sproščanja razlikuje od naravnega habitata ali od ekosistema, v katerem se prejemni ali starševski organizem redno uporablja, goji ali nahaja?*  
2. *Is the site of the release different from the natural habitat or from the ecosystem in which the recipient or parental organism is regularly used, kept or found?*

Da (.)                      Ne (.)  
Yes (.)                      No (.)

Če da, opredelite

Specify ...

**Ni relevantno, ker plazmid pORF-caIL-12-ORT nima naravnega habitata ali ekosistema.**

3. *Informacije o sproščanju in bližnji okolici*  
3. *Information concerning the release and the surrounding area*

(a) Geografska lokacija (upravna regija in, kjer je to primerno, geografske koordinate):

(a) Geographical location (administrative region and where appropriate grid reference):

**Ni relevantno - sproščanje bo potekalo na različnih delih Slovenije glede na prebivališče skrbnikov pacientov. Zato geografskih lokacij vnaprej ni možno predvideti.**

(b) Velikost mesta (Size of the site)(m<sup>2</sup>): ... m<sup>2</sup>

(i) Dejansko mesto sproščanja (actual release site) (m<sup>2</sup>): ... m<sup>2</sup>

(ii) Širše območje sproščanja (wider release site) (m<sup>2</sup>): ... m<sup>2</sup>

**Ni relevantno oz. se ne da določiti**

(c) Neposredna bližina mednarodno priznanih biotopov ali zavarovanih območij (vključno z nahajališči pitne vode), ki so lahko prizadeti:

(c) Proximity to internationally recognised biotopes or protected areas (including drinking water reservoirs), which could be affected:

**Ni relevantno.**

(d) Rastlinstvo in živalstvo, vključno s poljščinami, živino in selivskimi vrstami, ki lahko pridejo v stik z GSO

(d) Flora and fauna including crops, livestock and migratory species which may potentially interact with the GMO

**Ni relevantno**

Točke (b) - (d) niso relevantne, ker bo sproščanje potekalo v zelo omejenem obsegu, z občasnim odpuščanjem individualnih pacientov. Terapija se bo izvajala na Veterinarski fakulteti, Kliniki za kirurgijo in male živali. Psom, ki bodo odgovarjali vključitvenim kriterijem klinične študije, bo plazmid apliciran peritumoralno ali intratumoralno v nepoškodovano kožo, sluznico ali tumor, temu pa bo neposredno sledila elektroporacija s sterilnim aplikatorjem z elektrodami. Odmerek plazmida ne bo presegal 2 mg ob eni aplikaciji.

Ker bodo pacienti večinoma starejši psi, ki zaradi narave svoje bolezni (napredovale stopnje različnih rakavih obolenj) večinoma ne zmorejo normalne fizične aktivnosti, bo to pomenilo, da lastniki dnevne sprehode večinoma izvajajo le na krajših razdaljah v bližini svojega doma s psi na povodcih.



#### 4. Način in obseg sproščanja

##### 4. Method and amount of release

(a) Količine GSO, ki se bodo sproščale:

(a) Quantities of GMOs to be released:

**do največ 2 mg na tretiranega psa**

(b) Trajanje projekta:

(b) Duration of the operation:

**maj 2021 – april 2026**

(c) Metode in postopki za preprečevanje in/ali zmanjšanje na najmanjšo možno mero širjenja GSO izven mesta sproščanja

(c) Methods and procedures to avoid and/or minimise the spread of the GMOs beyond the site of the release

**Mesto vboda, kamor bo aplicirana plazmidna DNA in električni pulzi, bodo pred aplikacijo razkuženi po standardih za kirurško razkuževanje. Po aplikaciji bo rana povita, če bo na koži, vsi psi pa bodo dobili zaščitni ovratnik. Rana bo ostala povita najmanj 7-10 dni. Pred odhodom psa domov, bodo lastniki dobili natančna navodila o oskrbi rane in koliko časa morajo psi nositi ovratnik. Psi bodo morali nositi ovratnik 3 tedne, ker v tem času ni več možno določiti plazmidne DNA na mestu aplikacije, če je mesto aplikacije na takem mestu, da si ga pes lahko liže (Sproščanje v okolje št. 35419-1/2009).**

#### 5. Kratak opis povprečnih pogojev v okolju (vreme, temperatura, itd.)

##### 5. Short description of average environmental conditions (weather, temperature, etc.)

**pORF-caIL-12-ORT bo apliciran pacientom na Klinike za male živali v zaprtem prostoru na sobni temperaturi.**

6. Pomembni podatki o morebitnih predhodnih sproščanjih enakega GSO, če so, posebej o možnih vplivih na okolje in zdravje ljudi zaradi sproščanja.

6. Relevant data regarding previous releases carried out with the same GMO, if any, specially related to the potential environmental and human health impacts from the release.

**Ni podatkov, ker predhodnega sproščanja enakega plazmida še ni bilo.**

#### G. Medsebojna učinkovanja GSO z okoljem in možen vpliv na okolje, če se značilno razlikuje od prejemnega ali starševskega organizma

##### G. Interactions of the GMO with the environment and potential impact on the environment, if significantly different from the recipient or parent organism

#### 1. Imena ciljnih organizmov (če je primerno)

##### 1. Name of target organism (if applicable)

(i) red in/ali višja sistematska kategorija (za živali) **Mammalia, Carnivora, Canidae**

(ii) order and/or higher taxon (for animals)

(ii) družina (za rastline) ...

(ii) family name for plants

(iii) rod **Canis**

(iii) genus

(iv) vrsta **Canis lupus**

(iv) species

(v) podvrsta **C. lupus familiaris**

(v) subspecies

(vi) sev ...

(vi)strain	
(vii) sorta/linija križanja	...
(vii) cultivar/breeding line	
(viii)patovar (biotip, ekotip, pasma, itd.)	...
(viii)pathovar (biotype, ecotype, race, etc.)	
(ix)domače ime	<b>domači pes</b>
(ix)common name	

2. *Predviden mehanizem in rezultati medsebojnega učinkovanja med sproščenim GSO in ciljnim organizmom (če je primerno)*  
2. *Anticipated mechanism and result of interaction between the released GMOs and the target organism (if applicable)*

**Po izvedeni genski terapiji tumorskega ali obtumorskega tkiva psov, se bo v tumorskem/obtumorskem tkivu začelo izražanje transgena (caIL-12). Na ta način dosežemo terapevtski protitumorski učinek preko stimulacije proliferacije mononuklearnih krvnih celic, aktivacije naravnih celic ubijalk in stimulacije produkcije interferona gama.**

3. *Kakršna koli druga morebitna značilna medsebojna učinkovanja z drugimi organizmi v okolju*  
3. *Any other potentially significant interactions with other organisms in the environment*

**Verjetnost morebitnih medsebojnih učinkovanj z drugimi organizmi v okolju je zanemarljivo majhna zaradi lastnosti plazmida, opisanih v točkah A7 in B 8-10.**

4. *Se utegne po sproščanju pojaviti selekcija, kot je na primer povečana kompetitivnost ali povečana invazivnost GSO?*  
4. *Is post-release selection such as increased competitiveness, increased invasiveness for the GMO likely to occur?*

Da	(.)	Ne	(x)	Ni znano	(.)
Yes	(.)	No	(.)	Not known	(.)

Navedite podrobnosti ...  
Give details

5. *Vrste ekosistemov, v katere se lahko GSO razširijo in naselijo iz mesta sproščanja*  
5. *Types of ecosystems to which the GMO could be disseminated from the site of release and in which it could become established*

**Plazmid pORF-caIL-12-ORT bi teoretično lahko prišel v stik z zemljo oz. tlemi (razlitje vial s plazmidom, luščenje transfeciranih celic iz tretiranega tumorja). Glede na opis značilnosti plazmida in prisotnosti naravnih endonukleaz, ki hitro razgradijo DNA, je verjetnost kakšnegakoli škodljivega vpliva takega dogodka izredno majhna.**

6. *Popolno ime neciljnih organizmov, katerim lahko (če upoštevamo vrsto prejemnega okolja) nenamerno sproščanje GSO značilno škoduje*  
6. *Complete name of non-target organisms which (taking into account the nature of the receiving environment) may be unintentionally significantly harmed by the release of the GMO*

(i) red in/ali višja sistematska kategorija (za živali)	<b>Primates, Hominidae</b>
(i) order and/or higher taxon (for animals)	
(ii)družina (za rastline)	...
(ii) family name for plants	
(iii) rod	<b>Homo</b>
(iii) genus	
(iv)vrsta	<b>H. sapiens</b>
(iv) species	
(v) podvrsta	...

(v) subspecies	
(vi) sev	...
(vi) strain	
(vii) sorta/linija križanja	...
(vii) cultivar/breeding line	
(viii) patovar (biotip, ekotip, pasma, itd.)	...
(viii) pathovar (biotype, ecotype, race, etc.)	
(ix) domače ime	<b>Človek</b>
(ix) common name	
(i) red in/ali višja sistematska kategorija (za živali) ...	
(ii) order and/or higher taxon (for animals)	
(ii) družina (za rastline)	<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>
(ii) family name for plants	
(iii) rod	<b><i>Escherichia</i></b>
(iii) genus	
(iv) vrsta	<b><i>E. coli</i></b>
(iv) species	
(v) podvrsta	...
(v) subspecies ...	
(vi) sev	...
(vi) strain	
(vii) sorta/linija križanja	...
(vii) cultivar/breeding line	
(viii) patovar (biotip, ekotip, pasma, itd.)	...
(viii) pathovar (biotype, ecotype, race, etc.)	
(ix) domače ime	<b><i>E. coli</i></b>
(ix) common name	

### 7. Verjetnost genske izmenjave in »vivo«

#### 7. Likelihood of genetic exchange in vivo

(a) iz GSO v druge organizme v ekosistemu sproščanja

(a) from the GMO to other organisms in the release ecosystem:

**Glede na lastnosti plazmida in način sproščanja, opisani predhodno (A7 in B 8-10) je možnost prenosa plazmida v katerikoli neciljni organizem, zanemarljivo majhna.**

(b) iz drugih organizmov v GSO:

(b) from other organisms to the GMO:

**Ni relevantno, ker pORF-caIL-12-ORT ni GSO**

(c) možne posledice prenosa gena:

(d) likely consequences of gene transfer:

**Človek – v primeru, da bi prišlo do transfekcije kateregakoli tkiva pri človeku in posledično izražanja IL12, bi bil nivo izražanja genskega produkta pri uporabljenih količinah plazmida zanemarljivo nizek, brez kakršnihkoli možnosti doseganja koncentracij IL12, toksičnih za človeka ali živali.**

***E. coli* - plazmid ni prenosljiv med bakterijami, kar pomeni, da v kolikor bi prišlo do malo verjetne morebitne transfekcije naravno prisotnih bakterij v prebavnem ali urinarnem traktu tretiranih psov in izločanje v okolje, prenos na druge bakterije v okolici ni mogoč. Replikacija plazmida je zaradi specifičnega začetka replikacije možna samo v bakterijah *E. coli*, ki pa ne izražajo genskega produkta.**

### 8. Podajte reference k ustreznim rezultatom (če so na voljo) študij odzivov in lastnosti GSO in njegovega

- ekološkega vpliva, ki so bile opravljene v simuliranem naravnem okolju (na primer mikrokozmos, itd.):*
8. *Give references to relevant results (if available) from studies of the behaviour and characteristics of the GMO and its ecological impact carried out in stimulated natural environments (e.g. microcosms, etc.):*

**Take študije niso bile izvedene.**

9. *Možna okoljsko značilna medsebojna učinkovanja z biogeokemijskimi procesi (če se razlikujejo od prejemnega ali starševskega organizma)*
9. *Possible environmentally significant interactions with biogeochemical processes (if different from the recipient or parental organism)*

**Medsebojnih učinkovanj ne pričakujemo.**

## **H. Informacije o spremljanju (monitoringu)**

### **H. Information relating to monitoring**

#### *1. Načini spremljanja GSO*

*1. Methods for monitoring the GMOs*

#### *2. Načini spremljanja učinkov na ekosistem*

*2. Methods for monitoring ecosystem effects*

...

#### *3. Metode za odkrivanje prenosa donorskega genskega materiala iz GSO v druge organizme*

*3. Methods for detecting transfer of the donated genetic material from the GMO to other organisms*

...

#### *4. Velikost območja spremljanja (m<sup>2</sup>)*

*4. Size of the monitoring area (m<sup>2</sup>)*

... m<sup>2</sup>

#### *5. Trajanje spremljanja*

*5. Duration of the monitoring*

...

#### *6. Pogostost spremljanja*

*6. Frequency of the monitoring*

**Psi, ki bodo podvrženi genski terapiji tumorjev in ki bodo začasni nosilci transfeciranega tumorskega tkiva, bodo pregledani 1x tedensko na Kliniki za kirurgijo in male živali,**

## **I. Informacije o ravnanju po sproščanju in ravnanju z odpadki**

### **I. Information on post-release and waste treatment**

#### *1. Ravnanje z mestom po sproščanju*

*1. Post-release treatment of the site*

**Posebno ravnanje ni potrebno**

#### *2. Ravnanje z GSO po sproščanju*

*2. Post-release treatment of the GMOs*

**Po aplikaciji plazmida ter elektroporaciji bodo pri kožnih tumorjih mesto aplikacije povto, pes pa bo**

dobil zaščitni ovratnik. Rana bo ostala povita 7-10 dni. Psi bodo ovratnik morali nositi 3 tedne, ker v tem času nismo več detektirali plazmidne DNA na mestu aplikacije. Za ta čas bo lastnikom tudi svetovano omejeno gibanje živali - sprehodi na povodcih na krajših razdaljah v okolici doma oziroma zadrževanje na domačih dvoriščih ter preprečevanje stika z drugimi živalmi.

Neškodljiva odstranitev uporabljenih elektrod, skalpelov, brizg, igel, rokavic in drugih predmetov, ki bi lahko vsebovali ostanke plazmida, bo izvedena po postopkih v skladu s Pravilnika o kakovosti Veterinarske fakultete.

### 3. (a) Vrsta in količina nastalih odpadkov

#### 3.(a) Type and amount of waste generated

- Predmeti za enkratno uporabo (elektrode, skalpeli, brizge, šivalni material, igle, rokavice, itd), ki bi lahko vsebovali plazmid, v količini, ki ne bo preseгла 2 mg.

### 3. (b) Ravnanje z odpadki

#### 3. (b) Treatment of waste

Vsi predmeti za enkratno uporabo, ki prihajajo v stik s psimi bodo odloženi v plastične posode iz trde plastike z odprtino, v katero ne moremo več segati. Odloženi material bo v skladu z dobro laboratorijsko prakso na podlagi evropskega standarda 17025 in na podlagi Pravilnika o kakovosti Veterinarske fakultete odpeljan v sežig (akreditirano podjetje Saubermacher Slovenija d.o.o.).

Kirurški instrumenti, ki bodo prišli v stik s psimi, se bodo odlagali v plastično posodo z dezinfekcijsko raztopino (Sekusept plus, 1% raztopina) in bodo nato avtoklavirani.

Z odpadnim blatom in urinom tretiranih psov se ravna enako kot pri drugih živalih, saj tretirani psi ne izločajo nikakršnih posebnih toksinov, alergenov ali drugih škodljivih snovi.

## J. Informacije o načrtih ukrepov za primer nesreče

### J. Information on emergency response plans

#### 1. Metode in postopki za nadziranje širjenja GSO v primeru nepričakovanega razširjanja

##### 1. Methods and procedures for controlling the dissemination of the GMO(s) in case of unexpected spread

Osebjem, ki bo sodelovalo v študiji, bo obveščeno o postopku čiščenja plazmidne raztopine v primeru morebitnega razlitja vial s plazmidom (mehanična odstranitev z mesta razlitja v kontejner za nevarne odpadke, pri čemer mora oseba nositi zaščitno opremo - rokavice in zaščitno obleko).

Kljub temu da pacienti sami po sebi niso gensko spremenjeni organizmi, bi teoretično lahko širili plazmid pORF-caIL-12-ORT, če bi po izvedeni elektrogenski terapiji ušli izpod nadzora skrbnika oziroma delavcev Klinike za kirurgijo in male živali. Verjetnost, da bi se to zgodilo, je zanemarljiva, saj bodo psi med izvajanjem terapije v splošni anesteziji in takoj po anesteziji še niso zmožni normalne fizične aktivnosti. Takoj po izvedeni terapiji bodo ustrezno zavarovani (privezani s povodcem, zaprti v ambulanti in pod stalnim nadzorom osebja, dokler se ne vrnejo lastniku živali).

V primeru, da bi pacientu vseeno uspelo pobegniti in bi bil izgubljen stik z njim se takoj obvesti odgovorno osebo in vodjo projekta, pooblaščenca za biološko varnost ali osebo, odgovorno za nadzor in varnost ter skrbnika, ki aktivirajo načrt in vodijo ukrepe v primeru nepričakovanega širjenja. V tem primeru se aktivira osebje Klinike in skrbnika, da takoj začnejo iskati žival in veterinarsko higiensko službo NVI. Vodja projekta takoj obvesti ministrstvo za okolje in prostor .

Glede na majhno število pacientov v klinični študiji, varovalne ukrepe in specifične lastnosti živali (domači ljubljenci, ki se odzivajo na odpoklic) menimo, da ne obstaja kakršnakoli nevarnost za zdravje ljudi ali pojav škodljivih učinkov na okolje. Obveščanje je zato zgolj informativnega značaja.

#### 2. Načini za odstranjevanje GSO iz potencialno prizadetih območij

##### 2. Methods for removal of the GMO(s) of the areas potentially affected

Mehanična odstranitev materiala, ki je prišel v stik s plazmidno raztopino in brisanje razlite plazmidne raztopine v primeru razlitja raztopine.

3. *Načini odstranjevanja ali sanitacije rastlin, živali, zemlje, itd., ki bi lahko bili izpostavljeni med ali po širjenju*

3. *Methods for disposal or sanitation of plants, animals, soils, etc. that could be exposed during or after the spread*

**Odstranjevanje ali sanitacija rastlin, živali, zemlje ni potrebno zaradi majhnega tveganja kakršnihkoli škodljivih posledic izpostavitve.**

4. *Načrti za varovanje zdravja ljudi in okolja v primeru nezaželenih učinkov*

4. *Plans for protecting human health and the environment in the event of an undesirable effect*

**Ker je možnost pojava kakršnihkoli neželenih učinkov na zdravje ljudi in okolje zaradi uporabe plazmida pORF-caIL-12-ORT v genski terapiji tumorjev zanemarljivo majhna, ni pripravljen poseben načrt za varovanje zdravja ljudi in okolja.**

---

Reference:

Bureau, M. F.; Naimi, S.; Torero Ibad, R.; Seguin, J.; Georger, C.; Arnould, E.; Maton, L.; Blanche, F.; Delaere, P.; Scherman, D. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1676, 138-148

Cemazar M et al., 2011. Intramuscular IL-12 Electrogenic Therapy for Treatment of Spontaneous Canine Tumors, Targets in Gene Therapy, Prof. Yongping You (Ed.), ISBN: 978-953-307-540-2, InTech, DOI: 10.5772/20734. Available from: <http://www.intechopen.com/books/targets-in-gene-therapy/intramuscular-il-12-electrogenic-therapy-for-treatment-of-spontaneous-canine-tumors>.

Cemazar M, Sersa G, Wilson J, Tozer GM, Hart SL, Grosel A, Dachs GU. Effective gene transfer to solid tumours using different non-viral gene delivery techniques: electroporation, liposomes and integrin-targeted vector. *Cancer gene therapy* 2002; 9:399-406.

Daud AI, DeConti RC, Andrews S, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5896-903.

Krhač Levačić, A. Testiranje prenosa terapevtskega plazmida za gensko zdravljenje v naravno prisotne bakterije na koži pri psih z mastocitomi : magistrsko delo = Testing the transfer of therapeutic plasmid for gene therapy in the skin microbiota of dogs with mast cell tumors : M. Sc. thesis, (Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Magistrsko delo magistrskega študija 2. stopnja Biotehnologija, 12). Ljubljana: [A. Krhač Levačić], 2013. XIV, 77 str., [29] str. pril., preglednice, slike.

Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, et al. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 1997; 90: 2541-8.

Lew D, Parker SE, Latimer T, Abai AM, Kuwahara-Rundell A, Doh SG, Yang ZY, Laface D, Gromkowski SH, Nabel GJ, et al. Cancer gene therapy using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. *Hum Gene Ther.* 1995; 6(5):553-64.

Parker SE, Vahlsing HL, Serfilippi LM, Franklin CL, Doh SG, Gromkowski SH, Lew D, Manthorpe M, Norman J. Cancer gene therapy using plasmid DNA: safety evaluation in rodents and non-human primates. *Hum Gene Ther.* 1995; 6(5):575-90.

Pavlin D, 2011. Electrogenic therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors. *Radiol Oncol*; 45(1): 30-39.

Pavlin D, Tozon N, Sersa G, Pogacnik A, Cemazar M. Efficient Electrotransfection into Canine Muscle. *TCRT* 2008; 7(1): 45-54.

Bremer H, Lin-Chao S. Analysis of the physiological control of replication of ColE1-type plasmids. *J Theor Biol.* 1986;123(4):453-70.

Vilalta A, Mahajan RK, Hartikka J, Rusalov D, Martin T, Bozoukova V, Leamy V, Hall K, Lalor P, Rolland A, Kaslow DC. Poloxamer-formulated plasmid DNA-based human cytomegalovirus vaccine: evaluation of plasmid DNA biodistribution/persistence and integration. *Hum Gene Ther.* 2005; 16(10):1143-50.

Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths II TG, Pacchione SJ, Barnum AB, Harper LB, Pauley CJ, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Rizzuto G, Cilieberto G, Fattori E, Monica NL, Manam S, Ledwith BJ. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Therapy* 2004, 11: 711-721.