



REPUBLIKA SLOVENIJA

## ZNANSTVENI ODBOR ZA NAMERNO SPROŠČANJE GSO V OKOLJE IN DAJANJE IZDELKOV NA TRG

Dunajska c. 48 (lokacija Dunajska 47),  
1000 Ljubljana

T: 01 478 74 00  
F: 01 478 74 22  
E: gp.mko@gov.si  
[www.mop.gov.si](http://www.mop.gov.si)

### STROKOVNO MNENJE

#### o klinični študiji:

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

#### **Mandat znanstvenega odbora:**

Na svoji 37. redni seji je Vlada Republike Slovenije dne 27. 6. 2019 (št. 01103-3/2019/5) imenovala člane in namestnike v znanstveni odbor za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje in dajanje izdelkov na trg (ZOOS) za mandatno dobo štirih let.

#### **Izhodišča priprave strokovnega mnenja:**

Znanstveni odbor je bil s strani odgovornega organa na podlagi 32. člena Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi<sup>1</sup> dne 11. 2. 2021 (št. 35419-1/2021-2550-2) naprošen, da poda strokovno mnenje glede sproščanja plazmida pORF-calL-12-ORT v okolje pri izvedbi klinične študije zdravljenja oralnih in kožnih tumorjev psov na osnovi prijave. Znanstveni odbor je na svoji virtualni 41. seji dne 29.3.2021 obravnaval zadevo in sprejel strokovno mnenje, ki ga je 1.2.2021 potrdil v tistem postopku.

## 1. OSNOVNI PODATKI O SEJI ODBORA

**Številka:** 35422-3/2020-2550

**Datum:** 29.3.2021

**Kraj:** Ljubljana

## 2. OSNOVNI PODATKI

**Številka prijave:** 35419-1/2021-2550

**Prijavitelj:** Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

**Naslov prijavitelja:** Gerbičeva 60, Ljubljana

**Namen prijave:**

- sproščanje GSO v okolje za namene klinične študije (III. poglavje ZRGSO, B del Direktive 2001/18/ES)
- GSO za uporabo kot živilo
- živilo, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljeno
- GSO za uporabo kot krma
- krma, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljena
- uvoz in predelava (C del Direktive 2001/18/ES)
- dajanje izdelkov na trg (IV. poglavje ZRGSO, C del Direktive 2001/18/ES)

<sup>1</sup> ZRGSO - Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, št. 23/05 – uradno prečiščeno besedilo, 21/10 in 90/12 – ZdZPVHVVR)

- pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom za veterinarsko uporabo, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljeno (3.1 in 31.2 člen Uredbe (ES) 726/2004 in C del Direktive 2001/18/ES ter IV. poglavje ZRGSO)
- GSO za uporabo kot seme ali drug rastlinski material za razmnoževanje/pridelavo v EU (C del Direktive 2001/18/ES)
- nadzor GSO (VII. poglavje ZRGSO)

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

**Trajanje projekta:** 5 let (2021 – 2026)

**Dokumentacija, ki jo je prejel znanstveni odbor:**

- Prijava namernega sproščanja v okolje (razen sproščanja višjih rastlin)
- Ocena tveganja namernega sproščanja GSO v okolje
- Protokol klinične študije
- Pojasnilo lastniku živali
- Navodila lastniku za ravnanje s psom po izvedeni terapiji
- Povzetek informacij za sproščanje GSO, razen višjih rastlin, v skladu z 11. členom Direktive 2001/18/ES (SNIF) v slovenskem in angleškem jeziku.

### **3. OSNOVNI PODATKI O RAVNANJU Z GSO, POVZETI PO OCENI TVEGANJA**

#### **A. SPLOŠNE INFORMACIJE (GENERAL INFORMATION)**

Namen ocene namernega sproščanja v okolje je zdravljenje psov s perifernimi tumorji na osnovi genske terapije z rekombinantnim plazmidom, ki nosi zapis za pasji interlevkin 12 (IL-12) ter kombinacijo kirurgije in elektrokemoterapije. Za elektrokemoterapijo bodo uporabili dva kemoterapevtika bleomicin in cisplatin, ki se uporabljata tudi v kliničnih protokolih kemoterapije in sama po sebi težko prehajata celično membrano. Ob aplikaciji električnih sunkov se njuna citotoksičnost močno poveča zaradi nespecifičnega vnosa v celice.

Genska terapija se bo izvajala z genskim produktom, plazmidom pORF-calL-12-ORT. Po vnosu plazmida lahko postanejo celice transgene, zato v prijavi ocenjujejo tveganje prenosa plazmida v okolje, ki po definiciji iz ZRGSO ni GSO »per se« in ovrednotijo ali lahko uporaba genske terapije s plazmidom pORF-calL-12-ORT predstavlja nevarnost za zdravje ljudi in okolje.

Lastniki bodo namreč po posegu pasje paciente odpeljali domov, kar predstavlja možnost sproščanja plazmida pORF-calL-12-ORT v okolje.

#### **B. INFORMACIJE O PREJEMNEM ALI (KJER JE PRIMERNO) STARŠEVSKEM ORGANIZMU (INFORMATION RELATING TO THE RECIPIENT OR (WHERE APPROPRIATE) PARENTAL ORGANISM)**

Ni relevantno. Prijavitelj v oceni tveganja navaja kot starševski organizem sev bakterije *E. coli* DH1-ORT, ki izvira iz oslabiljenega seva K12, ki ni sposoben kolonizirati človeka ali živali in ni patogen. Uvrščen je v 1. razred bioloških dejavnikov. Služi le za namnožitev plazmida in se namerno ne sprošča v okolje. Sev DH1-ORT so razvili za uporabo v ORT tehnologiji (<http://www.cobradio.com/Services/Technologies/Antibiotic-free-Maintenance-System->

(ORT% $\text{C2\%AE}$ /Applications), ki omogoča vzdrževanje posebnih ORT plazmidov brez gena za antibiotično rezistenco. V celicah seva DH1-ORT je esencialni bakterijski kromosomski gen (*dapD*) pod transkripcijsko kontrolo inducibilnega promotorja, tako da ne morejo rasti brez dodatka *dapD* ali inducerja IPTG, saj je na kromosomski operator (Lac O) vezan represor, ki preprečuje transkripcijo.

### **C. INFORMACIJE O GENSKI SPREMEMBI (INFORMATION RELATING TO THE GENETIC MODIFICATION)**

Gensko spremembo predstavlja vnos genskega vključka, ki ima zapis za pasji IL-12 v transfecirane celice. Za vnos genskega vključka je uporabljena plazmidna DNA. Plazmid je sestavljen iz gena za pasji IL-12: *calL-12*; promotorja za izražanje IL-12: EF-1 $\alpha$ /HTLV; poliadenilacijskega signala opičjega virusa 40: SAV40 polyA; replikacijskega začetka za sintezo DNA v *E.coli*: pUC origin in Lac operatorja: LacO, ki je potreben za selekcijo z uporabo ORT tehnologije.

Izvorni organizem, iz katerega izhaja vključek, je pes.

### **D. INFORMACIJE O GSO (INFORMATION RELATING TO THE GMO)**

#### **1. Opis lastnosti in značilnosti, ki so bile vnesene ali spremenjene**

Plazmid pORF-*calL-12-ORT*, ki sam po sebi nima značilnosti živega organizma in povsem ne ustreza definiciji GSO, omogoča izražanje gena *calL-12* v transfeciranih celicah tumorskega in obtumskega tkiva.

#### **2. Informacije o zaporedju, ki je bilo dejansko vneseno ali odstranjeno**

Vključek, gen *calL12* za pasji fuzijski IL-12, velik 1594 bp, je z restrikcijskima encimoma *NcoI* in *MssI* rezan iz plazmida pcDNA3.1zeo+sccalL12 in s kloniranjem vnesen v ekspresijski vektor plazmid pORF-hIL-12-ORT, velik 4294 bp, ki je vir EF-1 $\alpha$ /HTLV promotorja. Nato je gen za pasji IL-12 s promotorjem kloniran v plazmid pORF-mIL-12 Xmax, preko katerega je s tehnologijo ORT odstranjen zapis za odpornost proti antibiotiku.

#### **3. Informacije o izražanju vključka (Information on the expression of the insert)**

Plazmid pORF-*calL-12-ORT* omogoča izražanje interlevkina-12 v transfeciranem tumorskem in obtumskem tkivu.

#### **4. Informacije, kako se GSO razlikuje od prejemnega organizma v razmnoževanju razširjanju in preživetju (Information on how the GMO differs from the recipient organism: reproduction, dissemination, survivability)**

Ni relevantno. Plazmid se samostojno ne razmnožuje.

#### **5. Genska stabilnost vključka in fenotipska stabilnost GSO (Genetic stability of the insert and phenotypic stability of the GMO)**

Ni relevantno. Plazmid je umetno ustvarjen in se pojavlja samo v raziskovalnem laboratoriju in nima značilnosti živega organizma.

#### **6. Kakršnekoli spremembe v sposobnosti GSO za prenos genskega materiala v druge organizme (Any change to the ability of the GMO to transfer genetic material to other organisms)**

Možnost prenosa genskega materiala v druge organizme je zanemarljiva. Plazmid se tudi ne vgradi v genom psa. V naravi se plazmid hitro razgradi s pomočjo deoksiribonukleaz.

#### **7. Informacije glede patogenosti GSO (Information on pathogenicity of GMO)**

Plazmid nima značilnosti živega organizma. 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 in so uvrščeni v 1. varnostni razred bioloških dejavnikov. Uporaba genske terapije z IL12 v kliničnih študijah, tako pri ljudeh kot tudi pri živalih, ne povzroča bolezni.

#### **8. Mehanizem interakcije med GSO in ciljnim organizmi (če je primerno) (Mechanism of interaction between GMO and the target organisms (if applicable))**

Ciljni organizem bodo celice peritumoralnega in tumoralnega tkiva, v katerih se bo po transfekciji začelo izražanje transgena pasjega IL-12, s čimer bodo dosegli sistemski terapevtski protitumorski učinek preko indukcije diferenciacije limfocitov T, stimulacije produkcije interferona gama in aktivacije naravnih celic ubijalk.

#### **9. Potencialne spremembe interakcij med GSO in biotskim okoljem zaradi genske spremembe (Potential changes in the interactions of the GMO with the biotic environment resulting from the genetic modification)**

Ni verjetno. Plazmid nima lastnosti živega organizma. Vnos in razmnoževanje je možno le v kompetentnih bakterijah *E. coli*, ki v naravi niso prisotne.

#### **10. Potencialne interakcije z abiotskim okoljem (Potential interactions with the abiotic environment)**

Ni relevantno.

#### **11. Metode odkrivanja in identifikacije GSO (Detection and identification techniques of GMO)**

PCR in qRT-PCR.

#### **12. Povzetek možnih vplivov na okolje zaradi sproščanja GSO (Summary of the potential environmental impact of the release of the GMOs)**

Plazmid pORF-calL12-ORT sam po sebi nima značilnosti živega organizma ali virusa in povsem ne ustreza definiciji GSO. Sev DH1-ORT ima torej zmanjšano možnost mobilizacije vnesenega genskega materiala, nima endonukleaze in ni sposoben rekombinacije. Sev DH1-ORT so razvili za uporabo v ORT tehnologiji, ki omogoča vzdrževanje ORT plazmidov brez gena za antibiotično rezistenco. Ima tudi izvedeno odstranitev 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.

Medsebojnih vplivov z drugimi organizmi in okoljem se ne pričakuje, posebej zaradi tega ker plazmid ne nosi zapisa za odpornost na antibiotike ter se predvidoma pod vplivom zunanjih deoksiribonukleaz v okolju razgradi. Poleg tega je razmnoževanje plazmida ter njegov vnos možen le v kompetentnih bakterijah *E. coli*, ki v naravi niso prisotne. Za plazmid ni pričakovana nobena povečana kompetitivnost ali invazivnost v naravi, saj plazmid nima značilnosti živega organizma. Plazmid pORF-calL-12-ORT bi teoretično lahko prišel v stik z zemljo oz. tlemi, vendar je glede na opis značilnosti plazmida verjetnost takega dogodka ničelna. Horizontalni prenos v naravi prisotne bakterije ni mogoč, saj plazmid pORF-calL12-ORT nosi mesto Ori, specifično mesto začetka replikacije, ki je možna samo v kompetentni bakteriji *E. coli*. Prisotnost plazmida se na mestu aplikacije po 3 tednih več ne zazna, prav tako se ne zazna sproščanje v urinu, blatu ali serumu psa. Verjetnost negativnega vpliva plazmida pORF-calL12-ORT na okolje in zdravje ljudi je zaradi naštetih omejitev minimalna oziroma zanemarljiva.

#### **4. OCENA O TEM, ALI OBSEG IN VSEBINA PRIJAVE ZADOŠČATA ZA SPREJEM STROKOVNEGA MNENJA**

Prijavitelj (Veterinarska fakulteta, Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana) je znanstvenemu odboru za sproščanje v okolje (ZOOS) posredoval potrebne dokumente in

priloge z zahtevanimi informacijami, ki so vsebovale vse potrebne elemente: opis GSO ter namen sproščanja, opis postopkov, ki bodo omogočali varno sproščanje GSO ter oceno tveganja za okolje.

Priložena dokumentacija po obsegu in vsebini zadoščata za sprejem strokovnega mnenja.

## 5. STROKOVNO MNENJE (v SI in EN verziji)<sup>2</sup>

Strokovno mnenje/nasvet in dodatne pripombe iz 6.in 7. točke

### Abstrakt

Prijava se nanaša na sproščanje v okolje z namenom izvedbe I/II faze klinične študije o protitumorskih učinkih elektrogenske terapije s plazmidom pORF-calL-12-ORT za zdravljenje perifernih tumorjev psov. Znanstveni odbor meni, da ob upoštevanju trenutnega stanja znanosti in tehnike ter zagotavljanju predlaganih varnostnih ukrepov sproščanje plazmida pORF-calL-12-ORT, ki nima lastnosti živega organizma in ni GSO »*per se*«, v okolje v okviru izvedbe klinične študije predstavlja zanemarljivo tveganje za zdravje ljudi, živali ali okolje.

Oslabljeni sev *E. coli*, DH1-ORT z odstranjenim zapisom za odpornost proti antibiotiku, je zato varnejši, saj ni možen horizontalni prenos gena za odpornost proti antibiotikom na morebitne komenzalne ali okoljske bakterije. Vključki in njihovi produkti niso škodljivi in ne omogočajo spremembe v patogenosti, sposobnosti preživetja, zato so tudi novonastali organizmi nesposobni povzročiti boleznj pri ljudeh, živalih in rastlinah in nimajo negativnih vplivov na okolje.

### Abstract

The application concerns deliberate release with the aim of I/II phase clinical study of anti-tumor effects of electro-gene therapy with the pORF-calL-12-ORT plasmid in the treatment of peripheral tumors in dogs. The Scientific Committee is of the opinion that, according to current state-of the art in science and technology and assuring the proposed precautionary measures by applicant, the release of plasmid pORF-calL-12-ORT, which "*per se*" is not a GMO by definition, in the context of the clinical study represent negligible risk to humans, animals, and the environment.

An attenuated strain of *E. coli*, DH1-ORT, which has had its antibiotic resistance removed, is therefore safer, as horizontal transfer of the antibiotic resistance gene to any commensal or environmental bacteria is not possible. Inclusions and their products are not harmful and do not allow changes in pathogenicity, viability, so even newly formed organisms are unable to cause disease in humans, animals and plants and do not have negative effects on the environment.

## 6. UTEMELJITEV MNENJA

### 6.1. Uvod

Namen klinične študije "*Spremljanje kliničnega in imunskega odgovora za izboljšanje zdravljenja spontanih perifernih tumorjev psov s kombinacijo elektrokemoterapije in genskega elektrotransferja IL-12*" je zdravljenje psov s spontanimi perifernimi tumorji z uporabo genske terapije v kombinaciji z elektrokemoterapijo in/ali kirurgijo. Pričakuje se, da bo genska terapija perifernih tumorjev psov omogočila izražanje kodiranega produkta (caL12), ki bo imel terapevtski protitumorski učinek na zdravljeno tumorsko tkivo. Pasji IL-12 stimulira povečanje perifernih mononuklearnih krvnih celic, aktivira naravne celice ubijalke in stimulira tvorbo interferona gama.

Klinična študija, ki se bo izvajala na Veterinarski fakulteti, Kliniki za kirurgijo in male živali, je zasnovana kot odprta študija faze I/II. V prvem koraku bodo psi zdravljeni s kirurško odstranitvijo tumorja ali z elektrokemoterapijo (ECT). Elektrokemoterapija se bo izvajala z injiciranjem cisplatina ali bleomicina, čemur bo sledila aplikacija visokonapetostnih električnih impulzov. Temu bo sledila terapija z vbizganjem plazmida (2 mg) v tumor ali kožo z neposredno elektroporacijo. Po aplikaciji pri kožnih tumorjih bodo rano povili, če bo mesto dopuščalo. Rana bo ostala povita najmanj 7 dni. V kolikor si rano psi lahko ližejo, bodo dobili zaščitni ovrtnik, ki ga bodo morali nositi 3 tedne, saj je bilo v predhodnih raziskavah

<sup>2</sup> Na osnovi 8. člena Uredbe o delovanju znanstvenih odborov (Ur.l. RS 66/03 in 95/11) v strokovnem mnenju ne smejo biti navedeni podatki iz prijave, ki se skladno z zakonom v postopku za izdajo dovoljenja varujejo kot zaupni

ugotovljeno, da po tem času ni več zaznati plazmidne DNA na mestu aplikacije. V zdravljenje bodo vključeni psi, katerih lastniki se bodo strinjali z uporabo genske terapije. Prisotnost ostanka plazmidne DNA bodo redno sledili z merjenjem koncentracije plazmidne DNA.

Primarni cilj študije je ugotavljanje uspešnosti zdravljenja s peri in intratumoralno aplikacijo plazmida za IL-12. Sekundarni cilj pa ugotavljanje protitumorskega učinka glede na odmere citostatika, imunske biomarkerje ter črevesno mikrobioto psa.

Psi, vključeni v klinično študijo, bodo po terapijah, ki se bodo izvajale na Kliniki za kirurgijo in male živali, Veterinarske fakultete v Ljubljani, odšli domov, kar predstavlja možnost sproščanja plazmida v okolje.

Pripravljen je ustrezen nadzor nad ravnanjem z raztopino plazmida, postopkom elektroporacije in ravnanjem z odpadki.

## **6.2. Vidiki organizma**

Plazmid pORF-calL-12-ORT, ki kot tak ni GSO, omogoča izražanje calL-12 v transfeciranih celicah obtumorskega in tumorskega tkiva. IL-12 je modulator imunskega odziva. Vpliva na namnoževanje celic naravnih ubijalk in citotoksičnih limfocitov T. Genska terapija tumorjev psov bo omogočila izražanje calL12, ki bo imel terapevtski protitumorski učinek. Genski vključek in njegov produkt nista škodljiva, saj je študija o sistemskem vplivu IL.12 pokazala, minimalno toksičnost, brez zaznanih odstopanj hematoloških parametrov (Al. Daud et al. Journal of Clinical Oncology, 2008).

## **6.3. Molekularna karakterizacija**

Vključek, gen *calL12* za pasji fuzijski IL-12, izvira iz plazmida pcDNA3.1zeo+sccalL12 katerega je podaril dr. Geraldo Gileno de Sa Oliveira iz CPqGM in ekspresijskega vektorja pORF-hIL-12, ki je vir EF-1 $\alpha$ /HTLV promotorja. Nato je gen za pasji IL-12 s promotorjem kloniran v plazmid pORF-mIL-12 Xmax, preko katerega je s tehnologijo ORT odstranjen zapis za odpornost proti antibiotiku.

## **6.4. Ocena tveganja za okolje**

Genska terapija se bo izvajala s plazmidom pORF-calL-12-ORT, ki ga bodo z elektrogenskim prenosom vnesli v peritumoralno in intratumoralno tkivo psa. Celice, v katere z elektroporacijo vstopi plazmid, postanejo transgene, vendar se plazmid ne vgradi v genom celic. Plazmid se v transfeciranih celicah ne replicira. Vgradnja gole DNA v genom somatskih celic je sicer možna, vendar je dokazano, da je bila frekvenca integracije plazmidne DNA, po genskem elektroprenosu v mišico nižja, kot je raven spontanih mutacij (Kawabata in sod. 1995). Zato je tveganje zaradi inercijskih mutacij manjše od tveganja zaradi nastanka naravno pogojenih spontanih mutacij. Še manjša je verjetnost naključne vgradnje v regije, ki regulirajo celično rast in s tem tveganje za rakave transformacije. Vgradnja plazmida v spolne celice bi lahko privedla do vertikalnega prenosa na potomstvo. Raziskave niso pokazale dolgotrajne prisotnosti gole DNA v gonadah po administraciji (Melman et al., 2007; Nabel et al., 1992). Torej je tveganje za pacienta (psa) zanemarljivo. Vstop same plazmidne DNA v celice in s tem tudi vstop v krvni obtok in posledični prenos v druge organe, iz katerih bi se lahko izločala v okolico, je praktično nemogoč. Prijavitelj je v zadnji klinični študiji dokazal, da žival ob in po terapiji ne sprošča plazmidne DNA v urinu in blatu, plazmidna DNA tudi ni prisotna v serumu psa ob in po terapiji (prijava 35419-1/2014).

Tveganje za okolje zaradi genomske vgradnje je še manjše od tveganja za pacienta. Ker je pogostnost vgradnje v somatske celice zelo majhna, je verjetnost, da se bi rekombinirana somatska celica sprostila v okolje, bila nato privzeta s strani drugega osebka, kjer se mora originalni plazmid zopet vgraditi v prejemnikov genom zanemarljiva.

V okolju je razpolovni čas plazmidne DNA odvisen od mesta sproščanja. V vodnem okolju (odpadne vode, površinske vode, morska voda) je razpolovni čas med nekaj minut do nekaj ur. V zemlji in sedimentu pa se DNA lahko adsorbira, kar lahko močno podaljša njen razpolovni čas. Transformacijsko aktivna DNA se lahko v zemlji ohranja več tednov in mesecev, ker je zaradi adsorpcije na delce zemlje zaščitena pred razgradnjo z endonukleazami.

V primeru, da bi prišlo do izločanja plazmida v okolico, bi teoretično lahko prišlo do prenosa v drug organizem in izražanja transgena. Verjetnost takega dogodka je zanemarljiva, ker je transfekcija gole plazmidne DNA brez pomoči fizikalno kemijskih metod minimalna (Čemažar et al. 2002). Plazmid se zaradi specifičnega začetka podvajanja lahko pomnožuje le v bakterijah *E. coli*. Te so prisotne v okolju in v prebavnem traktu, vendar lahko plazmid vstopi le v kompetentne celice bakterije *E. coli*, ki pa v naravi praviloma niso prisotne. V bakterije, ki so naravno prisotne na koži psa, se plazmid ne prenese (Krhač Levečič, 2013). V kolikor bi prišlo do morebitne transformacije naravno prisotnih bakterij v črevesju ali urinarnem traktu, plazmid ni prenosljiv med bakterijami, kar pomeni, da prenos na druge bakterije v okolici ni mogoč.

Plazmid pORF-calL-12-ORT nima selektivne prednosti, ki bi se v pogojih nameravanega namernega sproščanja v okolje lahko uresničila, saj se v okolju sam plazmid razgradi. Možnost prenosa plazmida v druge organizme ni verjetna ker je transfekcija in transformacija same plazmidne DNA brez dodatnih kemijskih in fizikalnih metod minimalna.

Prijavitelj je predložil ustrezne podatke o nadzoru prenosa zamrznjenega plazmida iz Onkološkega inštituta na Kliniko za kirurgijo in male živali, kjer se bo terapija izvajala. Prav tako je podal ukrepe za ravnanje osebja, zaščitnih sredstvih, odpadkih, dezinfekciji prostorov. Podal je tudi ustrezne ukrepe za primer nepričakovanega sproščanja GSO v okolje. Osebe, ki bodo sodelovale v študiji, bodo seznanjene s postopki čiščenja plazmidne raztopine v primeru morebitnega razlitja. Psi bodo zavarovani po izvedbi terapije, pred morebitnim pobegom (privezani, zaprti v prostoru, pod stalnim nadzorom). Ko bodo predani lastniku, se ne pričakuje, da bodo ob sprehodih odhajali daleč od doma. V primeru pobega pa bodo o tem obveščene ustrezne službe (MOP, Regionalni center za obveščanje, Azil za živali...)

## **6.5. Splošni nadzor po sproščanju**

Elektrogenska terapija psov s plazmidom pORF-calL-12-ORT, ki se bo izvajala v okviru opisane klinične študije, ne predstavlja tveganja, ki bi zahteval dodaten nadzor in obvladovanje tveganja od predlaganega.

## **6.6. Mnenje/Nasvet**

Sam plazmid pORF-calL-12-ORT nima lastnosti živega organizma ni GSO po definiciji. Teoretično je možno, da plazmid vstopi v somatske ali spolne celice, viruse ali bakterije, kar bi lahko privedlo do neželenega nastanka GSO, ki bi se lahko razmnoževali in širili v okolju. Vendar na osnovi podatkov, ki jih je posredoval prijavitelj ter podatkov iz literature, ZOOS meni, da je verjetnost sproščanja prostega plazmida v okolje zanemarljiva. Možnost prenosa gole plazmidne DNA v drug organizem vključno z bakterijami med sproščanjem, je prav tako malo verjetna. Oslabljeni sev *E. coli*, DH1-ORT, ni zmožen kolonizacije človeških tkiv, preživetja v organizmu in okolju. Vključki in njihovi produkti niso škodljivi in ne omogočajo spremembe v patogenosti, sposobnosti preživetja ali viabilnosti novo nastalega organizma.

Zato so tudi novo nastali organizmi nesposobni povzročiti bolezni pri ljudeh, živalih in rastlinah in nimajo negativnih vplivov na okolje.

ZOOS meni, da predstavlja uporaba plazmida pORF-calL-12-ORT za intratumoralno in peritumoralno elektrogensko terapijo tumorjev psov v okviru opisane klinične študije zanemarljivo tveganje za zdravje ljudi, živali in okolje.

ZOOS tudi ugotavlja, da je prijavitelj pridobil pozitivno strokovno mnenje ZOOS za gensko terapijo z uporabo gole plazmidne DNA z zapisom za pasji interlevkin 12 že v prijavi leta 2014 (Prijava 35419-1/2014). Razlika v tokratni prijavi je v pripravi plazmida. Uporabil je plazmid, ki mu je z ORT tehnologijo odstranjen zapis za odpornost proti antibiotiku, zato je varnejši, saj ni možen horizontalni prenos gena za odpornost proti antibiotikom na morebitne komenzalne ali okoljske bakterije. Prijavitelj se v prijavi drži navodil, ki jih je prejel že v prijavi leta 2014 o rednem spremljanju prisotnosti plazmidne DNA na mestu aplikacije ter možnosti pojavljanja v krvi in sproščanja preko urina in blata.

Ker plazmid pORF-calL-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 tveganja za okolje minimalno oz. zanemarljivo.

## 6.7. Reference

- Čemažar M, Serša G, Wilson J, et al. Effective gene transfer to solid tumors using differential nonviral gene delivery techniques: electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. *Cancer Gene Ther.* 2002 Apr; 9(4):399-406.
- Čemazar M, Sersa G, Pavlin D, Tozon N. Intramuscular IL-12 Electrogenic Therapy for Treatment of Spontaneous Canine Tumors. *Targets in Gene Therapy.* 2011. 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>.
- Krhač Levačič, 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 Levačič], 2013. XIV, 77 str., [29] str. pril., preglednice, slike.
- Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 1994 Sep;58(3):563-602.
- <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/V26020>
- Daud A, DeConti RC, Andrews S, et al. Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26(36): 5896-5903.
- Kawabata K, Takakura Y, Hashida M. The Fate of Plasmid DNA After Intravenous Injection in Mice: Involvement of Scavenger Receptors in Its Hepatic Uptake. *Pharm Res* 1995; 6:825-830.
- Melman A, Bar-Chama N, McCullough A, Davies K, Christ G. Plasmid-based gene transfer for treatment of erectile dysfunction and overactive bladder: results of a phase I trial. *Isr Med Assoc J* 2007 Mar;9(3):143-6.
- Nabel EG, Gordon D, Yang ZY, et al. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther* 1992 Dec;3(6):649-56.
- Wang Z, Troilo PJ, Wang X, et al. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* 2004 Apr;11(8):711-21.
- Manam S, Ledwith BJ, Barnum AB, et al. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 2000;43(4-6):273-81.
- Martin T, Parker SE, Hedstrom R, et al. Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther* 1999 Mar 20;10(5):759-68.
- Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci* 1995 Nov 27;772:30-9.
- Comerota AJ, Throm RC, Miller KA, et al. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg* 2002 May;35(5):930-6.
- Pal R, Yu Q, Wang S, et al. Definitive toxicology and biodistribution study of a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine in rabbits. *Vaccine* 2006 Feb 20;24(8):1225-34.
- Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1992 Sep;1(6):363-9.



- Ramirez K, Barry EM, Ulmer J, et al. Preclinical safety and biodistribution of Sindbis virus measles DNA vaccines administered as a single dose or followed by live attenuated measles vaccine in a heterologous prime-boost regimen. Hum Gene Ther 2008 May;19(5):522-31.
- Gravier R, Dory D, Laurentie M, Bougeard S, Cariolet R, Jestin A. In vivo tissue distribution and kinetics of a pseudorabies virus plasmid DNA vaccine after intramuscular injection in swine. Vaccine 2007 Sep 28;25(39-40):6930-8.
- Brave, A; Gudmundsdotter, L; Sandstrom, E; et al. Biodistribution persistence and lack of integration of a multigene HIV vaccine delivered by needle-free intradermal injection and electroporation. VACCINE, 28 8203-8209, 2010.
- Pavlin D. Electrogenic therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors. Radiol Oncol. 2011; 45(1): 30-39.
- Pavlin D, Tozon N, Serša G, Pogačnik A, Čemažar M. Efficient electrotransfection into canine muscle. Technol Cancer Res Treat. 2008 Feb; 7(1):45-54.
- Pavlin D, Cemazar M, Kamensek U, Tozon N, Pogacnik A, Sersa G. Local and systemic antitumor effect of intratumoral and peritumoral IL-12 electrogenic therapy on murine sarcoma. Cancer Biol Ther. 2009 Nov;8(22):2114-22. Epub 2009 Nov 5.

## **7. ZAKLJUČKI O MOŽNEM VPLIVU SPROŠČANJA ALI DAJANJA GSO V PROMET ZA OKOLJE IN PRIPOROČILA**

Prijava se nanaša na sproščanje v okolje z namenom izvedbe I/II faze klinične študije o protitumorskih učinkih elektrogene terapije s plazmidom pORF-calL-12-ORT za zdravljenje tumorjev pri psu.

Po pregledu prijave in ob upoštevanju trenutnega stanja znanosti in tehnike ter ob zagotovitvi predvidenih varnostnih ukrepov ZOOS ugotavlja, da sproščanje plazmida pORF-calL-12-ORT, ki nima lastnosti živega organizma in »per se« ni GSO po definiciji, v okolje predstavlja zanemarljivo tveganje za zdravje ljudi, živali ali okolje.

Priporočila:

Na tej podlagi ZOOS **izdaja pozitivno mnenje** za peritumoralno in intratumoralno injiciranje gole DNA, ki zapisuje gen za pasji interleukin 12.

Podpis  
Dr. Jelka Zabavnik Piano  
PRESEDNICA ZOOS