

OCENA TVEGANJA ZA NAMERNO SPROŠČANJE GSO V OKOLJE

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

Datum izdelave: 26.1.2021

**Oceno tveganja je pripravila: prof. dr. Maja Čemažar, dr. Urška Kamenšek in dr. Urša Lampreht
Tratar**

Datum pregleda:

**Podpis odgovorne osebe
za pripravo ocene tveganja**

1. UVOD

Namen namernega sproščanja je zdravljenje psov s spontanimi perifernimi tumorji z uporabo genske terapije, ki jih bodo lastniki po opravljeni terapiji odpeljali v domačo oskrbo. Poleg genske terapije bomo uporabili tudi kirurgijo ali elektrokemoterapijo. Uporaba terapij bo odvisna od izbire lastnika, ki mu bo vedno najprej ponujeno standardno zdravljenje s kirurgijo. Elektrokemoterapija je učinkovit način lokalnega zdravljenja tumorjev, pri katerem z uporabo električnih sunkov povečamo vnos kemoterapevtika v tumorje. Trenutno se za elektrokemoterapijo uporabljata dva kemoterapevtika, ki se uporabljata tudi v kliničnih protokolih kemoterapije. To sta bleomicin in cisplatin, ki sta primerna izbira zato, ker sama po sebi težko prehajata celično membrano, ob aplikaciji električnih sunkov pa se njuna citotoksičnost močno poveča zaradi nespecifičnega vnosa v celice.

Gensko terapijo bomo izvajali z genskim produktom, plazmidom pORF-calL-12-ORT. Plazmid sam po sebi nima značilnosti živega organizma, zato oznako "GSO" zanj ni primerna. Plazmid bomo z genskim elektroprenosom vnesli v tumorsko ali peritumoralno tkivo psa in posledično lahko določene celice postanejo transgene. Po definiciji iz Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO, Uradni list RS, št. 23/05 – uradno prečiščeno besedilo, 21/10 in 90/12 – ZdZPVHVVR) je gensko spremenjeni organizem (GSO) organizem z izjemo človeka, katerega genski material je bil spremenjen na način, ki se ne pojavlja v naravi s križanjem in/ali naravno rekombinacijo. Zato bomo v dokumentu v nadaljevanju ocenili tveganje prenosa plazmida v okolje in ovrednotili ali lahko uporaba genske terapije s plazmidom pORF-calL-12-ORT predstavlja nevarnost za zdravje ljudi in okolja.

2. ANALIZA ZNAČILNOSTI GSO IN NAMERAVANEGA SPROŠČANJA V OKOLJE

Uporabili bomo plazmid pORF-calL-12-ORT, ki nosi zapis za pasji interlevkin 12 (IL-12). Plazmid smo pripravili s kloniranjem gena za pasji IL-12 iz plazmida pcDNA3.1zeo+sccalL12 (darilo Geralda Gileno de Sa Oliveira; restriksijska mesta NcoI in MssI) v komercialno dostopni ekspresijski vektor pORF-hIL-12 (Invivogen), ki je vir EF-1 α /HTLV promotorja. Nato je gen za pasji IL-12 s promotorjem (t.i. ekspresijska kaset) kloniran v plazmid pORF-mIL-12 Xmark, preko katerega je s pomočjo ORT tehnologije ([http://www.cobrabio.com/Services/Technologies/Antibiotic-free-Maintenance-System-\(ORT%C2%AE\)/Applications](http://www.cobrabio.com/Services/Technologies/Antibiotic-free-Maintenance-System-(ORT%C2%AE)/Applications)) odstranjen zapis za odpornost proti antibiotiku. Plazmid je umetno ustvarjen, pojavlja se le v raziskovalnem laboratoriju, nima taksonomske klasifikacije in v naravnem okolju ne obstaja. Plazmid pORF-calL-12-ORT vsebuje mesto Ori, ki mogoča, da se plazmid lahko pomnožuje le v bakterijskih celicah *E. coli*. Plazmid ne vsebuje zapisa za odpornost na antibiotike, zato je varnejši, kot konvencionalni plazmidi, saj ni možnosti za horizontalen prenos gena za odpornost na antibiotike na morebitne komenzalne ali okolijske bakterije. Tehnika za detekcijo in identifikacijo plazmida je polimerazna verižna reakcija (PCR) v realnem času.

2.1 Lastnosti prejemnega in starševskega organizma

Prejemni ali starševski organizem so kompetentne celice *Escherichia coli*, sev DH1-ORT.

Večina sevov *E. coli* je običajnih prebivalcev prebavnega trakta ljudi in toplokrvnih živali (mikroflora). So fakultativni anaerobi, porabljajo kisik, ki vdira v anaerobni sistem prebavil. Divji sevi redko potrebujejo rastne dejavnike, so prehransko nezahtevni. Vir ogljika predstavljajo organske kisline,

aminokisliline in sladkorji. Nekateri sevi so patogeni. Povzročajo dizenterije (krvava driska) in vročine. Za pritrnitev na epitel prebavnega trakta in sproščanje enterotoksina je pomemben antigen K. Okužbe z enteropatogenimi sevi so pogoste v nerazvitih deželah. Možne so tudi sistemske infekcije. Kolonizacija sluznice poteka s pomočjo pilov in drugih adhezijskih dejavnikov. Nekateri sevi E. coli povzročajo okužbe urinarnega trakta.

Sev DH1-ORT izvira iz oslabljenega laboratorijskega seva E. coli, K12, ki ni sposoben kolonizirati in ne producira toksinov, zato ni patogen za človeka ali živali. Značilnosti oslabljenih sevov K12 so:

1. odsotnost flagela potrebnega za pritrnitev bakterije na steno črevesne sluznice
2. okvarjen lipopolisahrid, kar onemogoča vezavo polisaharidne verige antigena O
3. odsotnost kapsularnih antigenov K, ki so polisaharidi potrebni za kolonizacijo in virulentnost
4. odsotnost faktorjev potrebnih za prodiranje v tkivo
5. odsotnost endo- in entero-toksinov

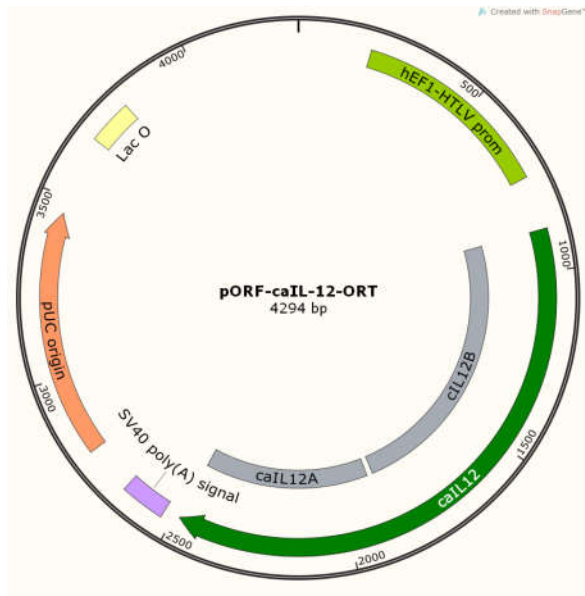
Za povrnitev patogenosti bi bili potrebne večkratne rekombinacije. Poleg tega imajo oslabljeni sevi K12 slabe možnosti preživetja v okolju, saj se razmnožuje le na ustreznih gojiščih pri temperaturi 37°C, kar je možno le v ustrezno opremljenih laboratorijih. Ti sevi bakterij imajo okrnjene gene restriksijsko-modifikacijskega sistema, torej so izredno občutljive na UV sevanje in/ali so avksotrofi za nekatere snovi, prisotne le v specializiranih gojiščih. Glede na dolgoletno varno uporabo oslabljenih sevov K12 v laboratorijih brez negativnih vplivov na zdravje ljudi, živali in rastlin in brez vplivov na okolje, so uvrščeni v 1. varnostni razred bioloških dejavnikov

Sev DH1-ORT ima torej zmanjšano možnost mobilizacije vnesenega genskega materiala. Nima endonukleaze (endA1), ni sposoben rekombinacije (recA1), kar omogoča večjo stabilnost vključka in izboljša kvaliteto in kvantiteto izolacije plazmida. Sev DH1-ORT so razvili za uporabo v ORT tehnologiji ([http://www.cobrabio.com/Services/Technologies/Antibiotic-free-Maintenance-System-\(ORT%C2%AE\)/Applications](http://www.cobrabio.com/Services/Technologies/Antibiotic-free-Maintenance-System-(ORT%C2%AE)/Applications)), ki omogoča vzdrževanje posebnih ORT plazmidov brez gena za antibiotično rezistenco. V DH1-ORT sevu je esencialni bakterijski kromosomalni gen (dapD) pod transkripcijsko kontrolo inducibilnega promotorja, tako da ne morejo rasti brez dodatka dapD ali inducerja IPTG, saj je na kromosomalni operator (Lac O) vezan represor, ki preprečuje transkripcijo. Če pa takšen sev transformiramo s plazmidom, ki prav tako vsebuje ta isti operator, lahko številne kopije plazmida titrirajo represor iz kromosomskega operatorja, transkripcija je tako spet omogočena in bakterijske celice lahko rastejo.

Genotip: F- glnV44 recA1 endA1 gyr96A(Nalr) thi1 hsdR17 (rK- mK-) relA1 PdapD::(lacI PlacZ)

2.2 Opis genske spremembe

Gensko spremembo bomo naredili z vnosom genskega vključka, ki kodira pasji IL-12. Gen za pasji IL-12 je sestavljen iz dveh podenot IL-12p35 in IL-12p40. IL-12 je modulator imunskega odziva, saj vpliva na namnoževanje naravnih celic ubijalk in citotoksičnih limfocitov T. Kot vektor za vnos genskega materiala bomo uporabili plazmidno DNA, zato je insercijska aktivacija ali deaktivacija genov v kožnih celicah manj verjetna. Plazmid smo pripravili z uporabo standardnih rekombinantnih metod za kloniranje DNK. Izvorni organizem, iz katerega izhaja vključek, je pes.



Slika 1: Plazmid pORF-caIL-12-ORT

Ostali sestavni deli plazmida (Slika 1) so:

- EF-1 α /HTLV promotor: Izražanje pasjega IL-12 je pod kontrolo konstitutivnega hibridnega promotorja EF-1 α /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.

2.3 Lastnosti novonastalega GSO

To poglavje ni relevantno saj plazmid pORF-caIL-12-ORT sam po sebi ni GSO, ker nima značilnosti živega organizma.

Genski vključki in njihovi produkti niso škodljivi in ne omogočajo spremembe v patogenosti, saj je gen za IL-12 naravno prisoten v organizmih sesalcev. Genski vključek ne spremeni sposobnosti preživetja ali viabilnosti plazmida. Plazmid ni zmožen povzročiti bolezni pri ljudeh, živalih in rastlinah, ter nima negativnega vpliva na okolje, saj serumske koncentracije genskega produkta po transferju ne dosežajo koncentracij, primerljivih z aplikacijo rekombinantnega IL-12, ki so se izkazale za toksične (Pavlin D in sod., 2008, 2009; Leonard JP in sod., 1997; Gollob JA in sod., 2000). Plazmid se ne vgradi v genom psa, vnašamo ga samo lokalno v tumorsko ali obtumorsko tkivo in tudi tu se ne vgradi v genom ampak ostaja episomalno. Plazmid se tudi ne more vnesti v komenzalne bakterije, ker je vnos plazmida možen le v kompetentne celice *E. coli*, ki pa se kot take praviloma v naravi ne pojavljajo, kar smo pokazali v naši prejšnji raziskavi. Verjetnost »preživetja« plazmida pORF-caIL-12-ORT v naravnem okolju do sedaj še ni bila preiskovana, vendar sklepamo, da bi se plazmid v naravi zelo hitro razgradil s pomočjo deoksiribonukleaz, tako kot plazmid, ki smo ga uporabili v naši prejšnji klinični raziskavi, ki

je nosil zapis za hIL-12 (Pavlin in sod., 2010). Prisotnost plazmida na koži psov na mestu aplikacije ni bilo moč več določiti v 3 tednih po terapiji. V prejšnji klinični raziskavi smo uporabili plazmid pCMVcaIL-12 (plazmid, ki nosi zapis za pasji IL-12 in odpornost na kanamicin). V študiji nismo ugotovili nobenih neželenih stranskih učinkov pri zdravljenih psih. Poleg tega smo spremljali morebitno sproščanje plazmidne DNA v urin, blato in serum. Plazmidne DNA nismo zaznali v nobenem vzorcu ob zdravljenju ali po njem. Minimalne količine plazmidne DNA smo zaznali le na koži takoj po aplikaciji, vendar plazmidne DNA ni bilo moč zaznati pri nobenem pacientu po 4 tednih po aplikaciji (Sproščanje 35419-1/2014).

2.4 Opis nameravanega sproščanja in njegovega obsega

Namerno sproščanje v okolje bo potekalo v okviru klinične študije, ki je zasnovana kot odprta študija faze I/II, kjer bodo v prvem koraku psi zdravljeni s kirurško odstranitvijo tumorja ali z elektrokemoterapijo (ECT), temu bo sledila terapija z intratumoralnim ali peritumoralnim vbrizganjem plazmida v tumor ali kožo z neposredno elektroporacijo (GET) (v kolikor se bodo lastniki strinjali).

Primarni cilj: Primerjanje uspešnost zdravljenja speri in intratumoralno aplikacijo plazmida, ki nosi zapis za IL-12 (GET z IL-12)

Sekundarni cilj: Ugotavljanje protitumorskega učinka glede na odmerek citostatika (v primeru uporabe bleomicina), imunske biomarkerje ter črevesno mikrobioto pacienta.

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

V študijo bo vključeno najmanj 100 psov, v namerno sproščanje pa bodo vključeni psi, katerih lastniki se bodo strinjali z uporabo genske terapije. Maksimalni odmerek plazmida bo 2 mg na aplikacijo/tumor. Plazmid bomo aplicirali intratumoralno v tumorsko tkivo ali peritumoralno v kožo, temu pa bo neposredno sledila elektroporacija s sterilnim aplikatorjem z elektrodami. Mesto vboda, kamor bomo aplicirali plazmidno DNA in električne pulze, bomo pred aplikacijo razkužili po standardih za kirurško razkuževanje. Če bo mesto aplikacije dopuščalo, bomo po aplikaciji to zaščitili z obvezo, psi pa bodo dobili zaščitni ovratnik. Mesto aplikacije bo ostala povito najmanj 7 dni. Pred odhodom psa domov, bodo lastniki dobili natančna navodila o oskrbi mesta aplikacije in koliko časa morajo psi nositi ovratnik. Če bo tumor (in s tem mesto aplikacije) na takem mestu, da si ga pes lahko liže, bodo morali psi nositi ovratnik 3 tedne, ker po tem času na mestu aplikacije nismo več detektirali plazmidne DNA.

2.5 Opis predvidenega prejemnega okolja

Predvideno prejemno okolje bo tumorsko tkivo ali koža. Kadar bo mogoče, bomo mesto aplikacije povili, pes pa bo nosil zaščitni ovratnik. Goli plazmid, ki z elektroporacijo ne bo vstopil v celice, bomo odstranili s sterilno gazo in uničili. 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. Poleg tega smo v zadnji klinični študiji dokazali, 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 (Sproščanje 35419-1/2014).

Zaradi prisotnosti plazmidne DNA nekaj dni po terapiji na mestu aplikacije je teoretično možen prenos plazmidne DNA v usta psa (zaradi lizanja – katerega bomo sicer poskušali onemogočiti s povitjem rane in/ali nošenjem ovratnika) in ugriz drugega psa. V tem primeru bi teoretično lahko prišlo do prenosa plazmidne DNA v krvni obtok in naprej v organe. Zaradi vseh preprečevalnih postopkov in mehanizmov (povitje rane, nošenje zaščitnega ovratnika, pes na povodcu, razgradnja plazmidne DNA pod vplivom zunanjih deoksiribonukleaz) je prenos plazmidne DNA v krvni obtok in naprej v organe praktično nemogoč. Poleg tega je razmnoževanje plazmida ter njegov vnos možen le v kompetentnih bakterijah *E. coli*, ki v naravi niso prisotne.

2.6 Medsebojno vplivanje

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

Vpliv gensko modificiranih celic na psa kot celoto, razen želenega povečanega celičnega imunskega odziva, je zanemarljiv in varen, kar so dokazali 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 so dokazali 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 ne pričakujemo, saj se plazmid 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 glede na opis značilnosti plazmida in naravno prisotnih deoksiribonukleaz, ki razgradijo DNA, menimo, da je verjetnost škodljivega vpliva takega dogodka ničelna. V prejšnji klinični raziskavi smo izvedli tudi študijo zmožnosti horizontalnega prenosa podobnega plazmida v naravno prisotne bakterije. Ugotovili smo, da horizontalni prenos ni mogoč (Krhač Levačić 2013). Poleg tega smo v zadnji klinični študiji dokazali, 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 (Sproščanje 35419-1/2014).

3. OVREDNOTENJE MOŽNIH VPLIVOV NAMERAVANEGA SPROŠČANJA GSO V OKOLJE IN RAVNI TVEGANJA ZA OKOLJE IN ZDRAVJE LJUDI

3.1 Možni vplivi in tveganje za okolje

Sev *E. coli* DH1-ORT bomo gojili izključno za pomnoževanje plazmida pORF-calL-12-ORT in izolacijo plazmidne DNA. Gensko spremenjene bakterije bomo gojili izključno v primerno opremljenih prostorih »bakteriološkega laboratorija«, na ploščah ali v majhni količini gojišča (do 1 litra) v

prostorih Oddelka za Eksperimetalno Onkologijo (Onkološki inštitut Ljubljana), ki je registriran zaprti sistem za delo z gensko spremenjenimi organizmi (reg. št. 0003/2012) Vse predmete, ki bodo prihajali v stik s kulturo ali supernatanti kultur in zgoščenimi supernatanti kultur, bomo odlagali v plastične posode z dezinfekcijsko raztopino in v zbiralnik za infektivne odpadke. Laboratorijski prostori, v katerih bo potekalo gojenje, imajo omejen dostop.

Plazmid pORF-calL-12-ORT sam po sebi ni GSO in nima lastnosti živega organizma, zato so možni škodljivi vplivi na okolje zanemarljivi. Plazmid se pri genski terapiji pasjih tumorjev s pomočjo elektroporacije vključi v celice in prenos med celicami ni mogoč. Plazmid, ki se na mestu vnosa ni 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. Plazmid bi se lahko izločal iz telesa psa le na mestu aplikacije plazmida. Če bo mesto aplikacije na koži, bo ta predel povit. V primeru, da bi lahko ta del pes lizal, bo pes nosil ovratnico. Poleg tega smo to teorijo preverili tudi v prejšnji študiji, kjer smo odvzeli vzorce urina, blata in seruma ob in po terapiji s plazmidom pCMVcalL-12. Zaznali nismo nobene prisotnosti plazmidne DNA v urinu, blatu ali serumu, ob ali po terapiji (Sproščanje 35419-1/2014).

V kolikor pa 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). Pomnoževanje plazmida je zaradi specifičnega mesta začetka replikacije (Ori) možna samo v bakterijah *E. coli*. Te bakterije niso prisotne v tkivih, ki jih bomo tranfecirali (Krhač Levačič 2013). Dokazali smo, da se plazmid ne prenese v bakterije, ki so normalno prisotne na koži psov (Krhač Levačič 2013). 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 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 ne nosi zapisa za odpornost na antibiotike. Verjetnost, da plazmid pORF-calL-12-ORT v pogojih nameravanega namernega sproščanja v okolje postane obstojen in invaziven v naravnih habitatih, je zanemarljiva, ker plazmid pORF-calL-12-ORT nima značilnosti živega organizma in nima naravnega habitata, saj je pripravljen sintetično v umetnih pogojih.

Plazmid pORF-calL-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.

Plazmid pORF-calL-12-ORT ne mora priti do neciljanih organizmov, ker je uspešnost transfekcije in transformacije same plazmidne DNA brez dodatnih kemijskih in fizikalnih metod minimalna, zato takojšnji in kasnejši vpliv posrednega ali neposrednega medsebojnega vplivanja plazmida pORF-calL-12-ORT in neciljanih organizmov na okolje, vključno z vplivi na populacijske ravni tekmecev, plenjenja, gostiteljev, simbiotov, plenilcev in patogenov, ni mogoč.

Plazmid pORF-call-12-ORT nima lastnosti živega organizma, zato takojšnjih in kasnejših učinkov na biogeokemijske procese, kot posledica možnega neposrednega in posrednega medsebojnega vplivanja plazmida in ciljnih ter neciljnih organizmov v bližnji okolici kraja namernega sproščanja GSO v okolje, ni.

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 raven tveganja za okolje minimalno oz. zanemarljivo.

3.2 Možni vplivi in tveganje za zdravje ljudi

Novo nastali organizmi in njihovi metabolni produkti ne bodo imeli toksičnih ali alergenih učinkov. Prav tako ne bodo bolj patogeni kot starševski organizem in ne bodo ogrožali zdravja ljudi.

Kot že opisano, oslabljeni sevi *E. coli*, med drugim tudi DH1-ORT, niso zmožni kolonizacije človeških tkiv, preživetja v organizmu in okolju, torej ne morejo povzročati črevesnih infekcij. Starševski organizem *E. coli* DH1-ORT, ki izvira iz *E. coli* K12, se uvršča v 1. varnostni razred bioloških dejavnikov, tudi genski vključek in njegov produkt nista nevarna za zdravje ljudi, za zaščito zdravja ljudi zato zadostujejo ukrepi 1. zadrževale stopnje.

Prenos genskega vključka na sorodne mikroorganizme je zaradi mobilno defektnega ekspresijskega vektorja malo verjeten, ker do prenosa v druge organizme lahko pride le s pomočjo "transfer" plazmidov.

Starševski organizem je uvrščen v razred 1. Vključki in njihovi produkti niso škodljivi in ne omogočajo spremembe v patogenosti, sposobnosti preživetja ali viabilnosti novo nastalega organizma. Zato so tudi novonastali organizmi nesposobni povzročiti bolezni pri ljudeh, živalih in rastlinah in nimajo negativnih vplivov na okolje.

Tveganja, ki bi ga bilo potrebno nadzorovati ali obvladovati ni, zato načrtovanje ukrepov in strategij za njegovo nadzorovanje in obvladovanje ni potrebno.

4. POSTOPEK IZDELAVE OCENE TVEGANJA

Ocena tveganja je bila izdelana v skladu s Pravilnikom o oceni tveganja za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje (Uradni list RS 23/05). Pri njeni izdelavi so sodelovali strokovnjaki iz ustreznih področij. Viri informacij so zanesljivi in ažurni.

5. LITERATURA

- 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 Electrogene 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-electrogene-therapy-for-treatment-of-spontaneous-canine-tumors>.
- 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.
- Gollob JA, Mier JW, Veenstra K, et al. Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: Ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clinical Cancer Research* 2000; 6(5); 1678-92.
- Heller LC, Heller R, 2010. Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr Gene Ther*; 10(4): 312-317.
- 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.
- Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Ryan JL. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood*, 1997 Oct 1;90(7):2541-5.
- Mary EB, Pinto-Gonzalez D, Orson FM, et al. Role of Endogenous Endonucleases and Tissue Site in Transfection and CpG-Mediated Immune Activation after Naked DNA Injection. *Human Gene Therapy*. October 1999, 10(15): 2461-2480.
- Pavlin D. Electrogene therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors. *Radiol Oncol*. 2011; 45(1): 30-39.
- Pavlin D, Tozon N, Serša G, Pogačnik A, Čemazar M. Efficient electrotransfection into canine muscle. *Technol Cancer Res Treat*. 2008 Feb; 7(1):45-54.
- Pavlin D, Čemazar M, Kamensek U, Tozon N, Pogačnik A, Sersa G. Local and systemic antitumor effect of intratumoral and peritumoral IL-12 electrogene therapy on murine sarcoma. *Cancer Biol Ther*. 2009 Nov;8(22):2114-22. Epub 2009 Nov 5.
- <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/V26020>
- 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.

6. ZAKLJUČEK

Sev DH1-ORT izvira iz oslabiljenega seva K12, ki ni sposoben kolonizacije in ni patogen za človeka in živali. Ima slabe možnosti preživetja v okolju. Glede na dolgoletno varno uporabo sevov K12 v laboratorijih brez negativnih vplivov na zdravje ljudi, živali in rastlin in brez vplivov na okolje so uvrščeni v 1. varnostni razred bioloških dejavnikov.

V starševski organizem bo s transformacijo vnesen na novo narejeni plazmid pORF-caIL-12-ORT. Ta je sestavljen iz vključka pcDNA3.1zeo+sccaIL12 in ekspresijskega vektorja pORF-hIL-12 (Invivogen), ki je vir EF-1 α /HTLV promotorja. Nato je gen za pasji IL-12 s promotorjem kloniran v plazmid pORF-mIL-12 Xmark, preko katerega je s pomočjo ORT tehnologije odstranjen zapis za odpornost proti antibiotiku. Plazmid je umetno ustvarjen, pojavlja se le v raziskovalnem laboratoriju, nima lastnosti živega organizma in ni GSO.

Po elektroporaciji plazmida v intratumoralno ali peritumoralno tkivo, pride do izražanja caIL-12, ki povzroči povečan imunski odziv na tumorske celice in posledično tumorske celice umrejo. Možnost izločanja plazmida na mestu aplikacije je zamerljiva, saj je mesto aplikacije, če je mogoče, povito. V kolikor bo to mesto na takšnem mestu, da bi lahko prišlo do lizanja povoja, bo pes nosil ovratnik, razen v primeru oralnih tumorjev. Vnos plazmida je možen le v kompetentne celice *E. coli*, ki se v naravi in na koži psov ne pojavljajo. V naravi bi se plazmid hitro razgradil, možnost prenosa plazmide v druge organizme je minimalna. Genski vključki in produkti niso škodljivi, saj v celicah ne dosežejo nivoja izražanja, ki bi lahko bil toksičen za psa.

Na osnovi te analize tveganja in rezultatov študij s plazmidi tako na ljudeh kot tudi na živalih, zaključujemo na osnovi podanih dejstev, da plazmid pORF-caIL-12-ORT ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi, živali in okolje, oziroma je raven tveganja zanemarljiva. Poleg tega genska terapija pasjih tumorjev s plazmidom golo DNK ne predstavlja tveganja za okolje v primeru kontakta z bakterijami *E. coli* v prebavnem traktu psa, ker je vnos možen le v kompetentne bakterije, ki se v naravi praviloma ne pojavljajo.