

---

# **Insectenresistente en herbicide-tolerante maïs (1507)**

Beoordeling van de veiligheid voor de consument, volgens de Europese  
verordening 258/97 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe  
voedselingredienten

---

# **Insect-resistant and herbicide-tolerant maize (1507)**

Assessment of safety for the consumer, in accordance with European  
Regulation 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients







Aan de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport

---

Onderwerp : aanbieding advies Insectenresistente en herbicide-tolerante maïs (1507)  
Uw kenmerk : GZB/VVB 2160036  
Ons kenmerk : 2003/04VNV, U-1582/CvR/cv/622-CP  
Bijlagen : 1  
Datum : 4 november 2003

Mijnheer de minister,

Hierbij bied ik u een advies aan in het kader van de door u mede namens de Minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit aan de Gezondheidsraad voorgelegde adviesaanvraag over de veiligheid van nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedselingredienten. Het advies is een zogenoemde eerste beoordeling, conform de Europese verordening 258/97, van Insectenresistente en herbicide-tolerante maïs (1507). Deze beoordeling is verricht door de Commissie 'Veiligheidsbeoordeling nieuwe voedingsmiddelen' van de Gezondheidsraad. Ik heb dit advies heden ook aangeboden aan de Minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit.

Hoogachtend,

Prof. dr JGAJ Hautvast



---

# **Insectenresistente en herbicide-tolerante maïs (1507)**

Beoordeling van de veiligheid voor de consument, volgens de Europese  
verordening 258/97 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe  
voedsel ingrediënten

---

Gezondheidsraad:

Commissie Veiligheidsbeoordeling nieuwe voedingsmiddelen (VNV)

---

aan:

de minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport

de minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit

---

Nr 2003/04VNV, Den Haag, 4 november 2003

---

---

De Gezondheidsraad, ingesteld in 1902, is een adviesorgaan met als taak de regering en het parlement “voor te lichten over de stand der wetenschap ten aanzien van vraagstukken op het gebied van de volksgezondheid” (art. 21 Gezondheidswet).

De Gezondheidsraad ontvangt de meeste adviesvragen van de bewindslieden van Volksgezondheid, Welzijn & Sport; Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening & Milieubeheer; Sociale Zaken & Werkgelegenheid en Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. De Raad kan ook eigener beweging adviezen uitbrengen. Het gaat dan als regel om het signaleren van ontwikkelingen of trends die van belang kunnen zijn voor het overheidsbeleid.

De adviezen van de Gezondheidsraad zijn openbaar en worden in bijna alle gevallen opgesteld door multidisciplinaire commissies van – op persoonlijke titel benoemde – Nederlandse en soms buitenlandse deskundigen.

---

Deze publicatie kan als volgt worden aangehaald:

Gezondheidsraad. Commissie Veiligheidsbeoordeling nieuwe voedingsmiddelen. Insectenresistente en herbicide-tolerante maïs (1507). Den Haag: Gezondheidsraad, 2003; publicatie nr 2003/04VNV.

---

auteursrecht voorbehouden

Een openbare versie van dit advies is in te zien via de website van de Gezondheidsraad: [www.gr.nl](http://www.gr.nl).

---

---

# Inhoud

---

---

Samenvatting, conclusies en aanbevelingen 9

---

1 Inleiding 11

---

2 Volledigheid en juistheid van het dossier 13

2.1 Administratieve gegevens 13

2.2 Algemene beschrijving van het voedingsmiddel 14

2.3 Classificatie van het voedingsmiddel voor beoordeling 14

2.4 Informatievergaring over het voedingsmiddel 14

2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager 15

2.6 Overige beoordelingen van het gewas 15

2.7 Etiketteringsvoorstel van de aanvrager 15

---

3 Interpretatie en evaluatie van voorgelegde gegevens 17

3.1 I Specificatie van het nieuwe voedingsmiddel (NV) 17

3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocédé op het NV 17

3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het NV gebruikte organisme 18

3.4 IV Effect van de genetische modificatie op de eigenschappen van het gastheerorganisme 18

3.5 V Genetische stabiliteit van het als bron voor het NV gebruikte genetisch gemodificeerde organisme (GGO) 20

3.6 VI Specificiteit van de expressie van het nieuwe genetisch materiaal 21

3.7 VII Overdracht van genetisch materiaal vanuit het GGO 22

---

- 3.8 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het NV 22
- 3.9 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het NV of zijn bron 23
- 3.10 XI Informatie over de voedingswaarde van het NV 23
- 3.11 XII Microbiologische informatie over het NV 25
- 3.12 XIII Toxicologische informatie over het NV 25

---

Literatuur 29

---

Bijlagen 33

- A De adviesaanvraag 35
- B De commissie 37
- C EU-procedure 39
- D Samenvatting van het dossier 41
- E Schematische weergave van de genetische modificatie 49

---

Engelse vertaling 51



---

## Samenvatting, conclusies en aanbevelingen

---

De firma's Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds dienden gezamenlijk als aanvrager een veiligheidsdossier in over de genetisch gemodificeerde maïslijn 1507. Het dossier bevat moleculair-biologische, voedingskundige en toxicologische informatie. Als referentie dient een conventionele maïslijn met een geschiedenis van veilig gebruik in de Europese Unie.

De gemodificeerde maïslijn verschilt van een conventionele lijn door de aanwezigheid van de genen *cry1F* en *pat* en de expressieproducten hiervan, het Cry1F- en het PAT-eiwit. De ingebrachte genen zijn afkomstig uit bacteriën en aangepast voor een optimale expressie in de plant. Hierdoor is de maïsplant bestand tegen vraat door bepaalde plaaginsecten en tegen behandeling met het herbicide glufosinaat-ammonium op het veld. Uit de moleculair-biologische analyse van het nieuwe gewas is gebleken dat één volledige kopie van deze beide genen aanwezig is op één enkele plaats in het DNA van 1507-maïs. Er zijn geen aanwijzingen dat de nieuwe eiwitten in de voorkomende concentraties toxisch of allergeen zijn voor de mens.

De beoogde verandering is gepaard gegaan met onbedoelde herschikkingen van DNA aan de rand van de insertie, die ook in detail zijn geanalyseerd. Er zijn geen aanwijzingen dat de veranderingen in het genoom van de maïsplant leiden tot de onbedoelde productie van andere nieuwe eiwitten.

De samenstelling van de gemodificeerde maïslijn is vergeleken met die van een vrijwel isogene, niet-gemodificeerde maïslijn door chemische analyse van een groot aantal bestanddelen: micro- en macro-nutriënten, antinutriënten en secundaire plantenstoffen. Daartoe werden op meerdere locaties veldproeven gedaan, waarvan de resultaten per

---

afzonderlijke locatie werden verwerkt. Waargenomen variaties in de onderzochte componenten blijven binnen literatuurwaarden en hebben gezondheidskundig gezien geen consequenties.

Ook uit subchronisch proefdieronderzoek zijn geen nadelige bijeffecten van de modificatie in 1507-maïs naar voren gekomen.

De commissie acht de informatie in het dossier een voldoende basis voor een veiligheidsevaluatie. De ingediende gegevens zijn in het dossier correct geïnterpreteerd. Op basis van de huidige stand van de wetenschap luidt het oordeel van de commissie dat consumptie van 1507-maïs en daaruit geproduceerde voedingsmiddelen en voedselingrediënten voor de mens even veilig is als consumptie van gangbare niet genetisch gemodificeerde maïs en maïsproducten.

---

# Inleiding

---

Op 28 februari 2001 vroeg de minister van VWS het oordeel van de commissie Veiligheidsbeoordeling nieuwe voedingsmiddelen (VNV), hierna te noemen ‘de commissie’, over de veiligheid voor de consument van voedingsmiddelen en voedsel ingrediënten die gemaakt zijn uit een nieuwe maïsvariant. Deze maïs, aangeduid als lijn 1507, is afkomstig van een plant (*Zea mays* L.) die door genetische modificatie twee nieuwe eiwitten produceert: het CRY1F- en het PAT-eiwit. Het CRY1F-eiwit beschermt de plant tegen vraat door bepaalde insecten, zoals de Europese maïsboorder (*Ostrinia nubilalis*). Het PAT-eiwit maakt de plant bestand tegen het herbicide glufosinaat-ammonium. Daardoor is het mogelijk om tijdens de groei van deze planten onkruid op de akkers te bestrijden met het herbicide, zonder dat de maïsplanten hiervan te lijden hebben. De maïsvariant is ontwikkeld door Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds, die tevens de aanvraag indienden (Pio01). De aanvraag bevatte een veiligheidsevaluatie met een aantal bijbehorende onderzoeksrapporten. In juni 2001 verzocht de commissie de aanvrager het dossier aan te vullen met extra informatie over de moleculaire karakterisering en over de analyse van de samenstelling van de nieuwe maïslijn. Tevens vroeg de commissie de aanvrager om resultaten van aanvullend proefdieronderzoek te overleggen en om het dossier te completeren door toezending van alle aangehaalde gegevens uit de literatuur. In februari 2002 verstrekke de aanvrager een deel van de gevraagde nieuwe informatie (Pio02), gevolgd door een aanvulling in februari 2003 (Pio03). Hierop vroeg de commissie in maart 2003 nog verduidelijking over de moleculair-biologische analyse, het onderzoek naar de samenstelling van de gemodificeerde maïs en het toxicologisch onderzoek aan de nieuwe eiwitten. De aanvrager verstrekke een deel van de gevraagde aanvullende

---

informatie in mei 2003 (Pio03a). In juli 2003 volgde aanvullende informatie, nadat de commissie de betreffende vraag nader had gespecificeerd (Pio03b). De commissie wijdde enkele bijeenkomsten aan de bespreking van het dossier en rondde in november 2003 haar beoordeling af. Dit rapport is de weergave van haar bevindingen.

---

## **Volledigheid en juistheid van het dossier**

---

### **2.1 Administratieve gegevens**

De namen en adressen van de aanvragers, hierna te noemen ‘Pioneer/Mycogen’ of ‘de aanvrager’, zijn als volgt:

Pioneer Hi-bred International Inc.  
400 Locust Street, Suite 800  
Des Moines, IA 50309, USA

Mycogen Seeds  
c/o Dow Agrosience LLC  
9330 Zionsville Road  
Indianapolis, IN 46268-1054, USA

Bij deze aanvraag worden deze firma's vertegenwoordigd door:

Pioneer Overseas Company,  
Avenue Tedesco 7  
B-1160 Brussel, België.

---

---

## **2.2 Algemene beschrijving van het voedingsmiddel**

De aanvraag betreft het op de Europese markt brengen en verhandelen van maïslijn 1507 voor directe consumptie en voor verdere verwerking tot voedingsmiddelen en voedsel ingrediënten. De aanvraag omvat ook kruisingen van maïslijn 1507 met niet genetisch gemodificeerde maïslijnen.

---

## **2.3 Classificatie van het voedingsmiddel voor beoordeling**

Het dossier bevat een argumentatie voor indeling in klasse 3.1, één van de zes hoofdklassen en subklassen van nieuwe voedingsmiddelen zoals genoemd in tabel 1 in deel I van Aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EG97a). Het gaat hier om een genetisch gemodificeerde plant, waarvan de conventionele variant een geschiedenis van veilig gebruik heeft in de Europese Unie. De commissie is het eens met deze indeling.

---

## **2.4 Informatievergaring over het voedingsmiddel**

De aanvrager specificeert de informatie die essentieel is bij het beoordelen van de geschiktheid voor de consumptie van een voedingsmiddel in klasse 3.1. Dit gebeurt aan de hand van de in EC-aanbeveling 97/618 voorgeschreven thema's:

- I. Specificatie van het nieuwe voedingsmiddel (NV)
- II. Effecten van het gevolgde productieproces op het NV
- III. Achtergrondinformatie over het als bron voor het NV gebruikte organisme
- IV. Effect van de genetische modificatie op de eigenschappen van het gastheerorganisme
- V. Genetische stabiliteit van het als bron voor het NV gebruikte genetisch gemodificeerde organisme (GGO)
- VI. Specificiteit van de expressie van het nieuwe genetisch materiaal
- VII. Overdracht van genetisch materiaal vanuit het GGO
- IX. Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het NV
- X. Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het NV of zijn bron
- XI. Informatie over de voedingswaarde van het NV
- XII. Microbiologische informatie over het NV
- XIII. Toxicologische informatie over het NV.

De aanvrager doorloopt de stroomschema's bij elk van deze thema's en verwijst voor de gebruikte gegevens naar bijlagen of naar de literatuur.

---

---

## **2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager**

Het dossier bevat een beknopt overzicht dat aan de lidstaten is toegestuurd, conform artikel 6, lid 2 van de Europese verordening (EG) 258/97 (EG97).

---

## **2.6 Overige beoordelingen van het gewas**

In het kader van de richtlijn 2001/18/EC (EG01) inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu worden moleculair-biologische aspecten van dit nieuwe voedingsmiddel in Nederland beoordeeld door de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) op verzoek van het ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu.

De beoordeling van de veevoederveiligheid van genetisch gemodificeerde gewassen wordt in Nederland uitgevoerd door het Rijkskwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwproducten (RIKILT).

De toestemming voor het in Nederland in het veld behandelen van deze maïs met glufosinaat-ammonium ligt bij het College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen (CTB).

---

## **2.7 Etiketteringsvoorstel van de aanvrager**

Het dossier bevat een etiketteringsvoorstel. Onlangs is de Europese verordening (EG) nr. 1830/2003 gepubliceerd over traceerbaarheid en etikettering van genetisch gemodificeerde organismen en de traceerbaarheid van daaruit geproduceerde levensmiddelen en diervoeders (EG03a). Na de inwerkingtreding van deze verordening zullen echter nog niet alle artikelen hiervan direct van toepassing zijn. Totdat de nieuwe verordening van kracht wordt, zal de etikettering in ieder geval in overeenstemming moeten zijn met EG-verordeningen 258/97 (EG97), 1139/98 (EG 98) en 49/2000 (EG00). Een etiketteringsvoorstel wordt in Nederland evenwel in het Regulier Overleg Warenwet besproken en wordt niet beoordeeld door deze commissie.





## Interpretatie en evaluatie van voorgelegde gegevens

---

### 3.1 I Specificatie van het nieuwe voedingsmiddel (NV)

Het gaat in deze aanvraag om een maïslijn, waarin twee nieuwe genen zijn geïntroduceerd. Het ene gen is het *pat*-gen, dat codeert voor het eiwit phosphinothricin-*N*-acetyltransferase (PAT). Dit is een enzym dat van nature voorkomt in de bodembacterie *Streptomyces viridochromogenes* en dat ervoor zorgt dat de gemodificeerde maïsplant ongevoelig is voor het herbicide glufosinaat-ammonium. Het tweede toegevoegde gen is het *cry1F*-gen. Dit gen codeert voor een eiwit dat overeenkomt met het biologisch actieve gedeelte van het CRY1F-eiwit uit de bodembacterie *Bacillus thuringiensis*, ondersoort *aizawai*. Ondanks dit onderscheid wordt het nieuwe eiwit in de transgene plant ook aangeduid als CRY1F. Door de productie van dit eiwit in de gemodificeerde maïsplant wordt de plant beschermd tegen vraat door bepaalde insecten, zoals de larven van de Europese maïsboorder.

---

### 3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocédé op het NV

Hele maïskorrels worden op grote schaal gebruikt als diervoeder, maar slechts in geringe mate voor directe menselijke consumptie (namelijk in het geval van suikermaïs). Uit maïskorrels geproduceerd meel, zetmeel en olie vormen echter belangrijke grondstoffen voor de productie van voedingsmiddelen. Daarbij wordt een groot deel van het maïszetmeel weer omgezet in siropen of in ethanol. De modificatie in maïslijn 1507 is van agronomische betekenis en heeft geen invloed op de productieprocessen bij de

---

verwerking van maïs tot voedingsmiddelen of voedselingrediënten. De aanvrager verwijst naar de literatuur voor een beschrijving van de hierbij gebruikelijke productieprocessen (Whi95).

---

### 3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het NV gebruikte organisme

De bron voor het nieuwe voedingsgewas is een op conventionele wijze geteelde maïslijn, te weten *Zea mays* Hi-II (achtereenvolgens geslacht, soort en variëteit). Door genetische modificatie zijn aan het maïsgenoom twee genen van bacteriële oorsprong toegevoegd, die zijn aangepast om in de plant optimaal te functioneren. De maïsplant heeft een lange geschiedenis van veilig gebruik voor voedingsmiddelen en voedselingrediënten, en wordt verbouwd in een groot aantal gebieden, verspreid over de gehele wereld (Sha88).

---

### 3.4 IV Effect van de genetische modificatie op de eigenschappen van het gastheerorganisme

Deze aanvraag betreft een maïslijn, waarin door overdracht van één lineair DNA-fragment twee nieuwe genen zijn geïntroduceerd, het *cry1F*-gen en het *pat*-gen. Hiervoor is een ballistische techniek gebruikt, waarbij het nieuwe DNA op microscopisch kleine wolframdeeltjes in embryonale maïscellen is ingebracht. Uit plantencellen waarin het nieuwe DNA was ingebouwd in het genoom, werden transgene maïsplanten geregeereerd. Daarbij werd eerst geselecteerd op tolerantie voor het herbicide glufosinaat-ammonium, en vervolgens op aanwezigheid van het CRY1F-eiwit. Uit één van deze planten is de maïslijn 1507 voortgekomen door kruising met een zuivere maïslijn. De beoogde insertie van het nieuwe DNA in deze plant is gepaard gegaan met herschikkingen in het flankerende DNA.

Het *cry1F*-gen is afkomstig uit de bacterie *Bacillus thuringiensis*, ondersoort *aizawai*. Voor een optimale expressie in plantencellen is voor de transformatie een ingekorte versie van dit gen gebruikt, waarvan de basenvolgorde tevens is aangepast aan het codongebruik in planten. Het CRY1F-eiwit in de transgene plant komt overeen met de eerste 605 aminozuren van het bacteriële eiwit, met één aminozuursubstitutie op positie 604. Dit gedeelte omvat het biologisch actieve deel van het eiwit, dat specifiek bepaalde plaaginsecten doodt door aantasting van darmcellen in deze dieren. Expressie van het *cry1F*-gen in de transgene plant wordt gecontroleerd door de *ubiZM1(2)*-promoter uit maïs en de ORF25PolyA-terminator uit de bacterie *Agrobacterium tumefaciens*.

Het *pat*-gen is afkomstig van de bodembacterie *Streptomyces viridochromogenes* en codeert voor het PAT-eiwit. Dit eiwit katalyseert de omzetting van L-phosphinothricin (L-PPT), het actieve bestanddeel van het herbicide glufosinaat-ammonium, naar N-ace-

tyl-L-PPT. De stof L-PPT bindt aan het enzym glutamine synthetase en doodt gevoelige planten, doordat de essentiële detoxificatie van ammonia wordt belemmerd. Omdat N-acetyl-L-PPT niet aan dit enzym bindt, maakt expressie van het PAT-eiwit een transgene plant tolerant voor het herbicide (OECD99). Het *pat*-gen in de gemodificeerde maïs is aangepast aan het codongebruik in planten voor een optimale expressie. De expressie van het *pat*-gen in de transgene plant staat onder controle van de 35S promoter en de 35S terminator uit het bloemkoolmozaïekvirus (CaMV).

De aanvrager analyseerde het DNA van twee verschillende generaties van maïslijn 1507 door middel van *Southern blotting* (verder besproken in paragraaf 3.5). Uit deze experimenten blijkt de aanwezigheid van één volledige kopie van het nieuwe DNA, de primaire insertie. Daarnaast werd een extra kopie van een deel van het *cry1F*-gen aangetoond. Ook werd via deze techniek bevestigd dat in het DNA van maïslijn 1507 geen andere delen aanwezig zijn van het oorspronkelijke plasmide, waaruit het voor de transformatie gebruikte DNA werd geïsoleerd.

De commissie meende dat een meer gedetailleerde analyse van de genetische modificatie gewenst was en vroeg de aanvrager daarom om aanvullende DNA sequentieanalyse uit te voeren, inclusief het DNA direct vóór en na de beoogde insertie. Aangetoond werd dat de primaire insertie inderdaad bestaat uit één enkele, vrijwel volledige kopie van het gewenste DNA. Uit de volgorde van circa 2500 basenparen vóór en circa 1600 basenparen na de primaire insertie bleek de aanwezigheid van zeven extra fragmenten van het nieuwe DNA en van vijf fragmenten, die mogelijk afkomstig zijn van chloroplast DNA (schematisch weergegeven in Bijlage E). Het ontstaan van dergelijke herschikkingen wordt vaker waargenomen, in het bijzonder wanneer de ballistische techniek is gebruikt voor de transformatie (Koh03).

Op verzoek van de commissie karakteriseerde de aanvrager vervolgens de open leesramen die zijn ontstaan door de aanwezigheid van de extra fragmenten van het nieuwe DNA. Indien DNA-sequenties in de nabijheid hiervan transcriptie mogelijk zouden maken, zouden deze open leesramen potentieel in fusie-eiwitten kunnen worden vertaald. Uit geen van de door de aanvrager uitgevoerde *Northern blot*-, *Western blot*- en RT-PCR-experimenten zijn aanwijzingen naar voren gekomen, die duiden op werkelijke vorming van zulke fusie-eiwitten. Op basis van de DNA-sequentie werden 24 open leesramen geïdentificeerd op de grensvlakken van fragmenten nieuw DNA. De denkbare translatieproducten hiervan werden onderzocht op eventuele overeenkomsten met bekende toxische of allergene eiwitten. Bij een globale vergelijking van de aminozuurvolgordes met een algemene eiwitdatabase werden geen overeenkomsten gevonden met bekende toxische eiwitten. Tevens werden vergelijkingen uitgevoerd met een door de aanvrager samengestelde specifieke database voor allergene eiwitten, volgens de aanbevelingen van FAO/WHO (FAO01). Daarbij werd gezocht naar een overeenkomst met bekende allergenen voor elk venster van 80 aminozuren en naar het vóórkomen van

identieke sequenties van zes, zeven of acht opeenvolgende aminozuren. Geen van de mogelijke eiwitten vertoonde meer dan 35 procent overeenkomst met een bekend allergeen over een lengte van 80 aminozuren. Ook werden geen identieke sequenties van zeven of acht opeenvolgende aminozuren gevonden. Wel werd in zes gevallen een opeenvolging van zes identieke aminozuren gevonden bij vergelijking met bekende allergenen. De aanvrager stelt dat bij de vergelijking van fragmenten van slechts zes of zeven aminozuren vaak toevallige overeenkomsten zullen worden gevonden, zonder klinische relevantie, en ziet daarom in dit resultaat geen indicatie voor mogelijke allergeniteit. Deze stelling is volgens de commissie aannemelijk en wordt ondersteund door recente publicaties (Hil02, Kle02).

Samengevat is de mening van de commissie dat een grondige moleculair-biologische analyse is uitgevoerd, waarbij geen andere effecten van de genetische modificatie zijn gebleken, dan de productie van de beide beoogde nieuwe eiwitten, CRY1F en PAT.

---

### **3.5 V Genetische stabiliteit van het als bron voor het NV gebruikte genetisch gemodificeerde organisme (GGO)**

De overerving van tolerantie voor glufosinaat-ammonium in de nakomelingen van de oorspronkelijke transformant is bestudeerd na drie opeenvolgende terugkruisingen met een zuivere lijn. Daarbij werd de verwachte 1:1 segregatie van deze eigenschap bevestigd. Hierna werd deze generatie planten nogmaals teruggekruist met een zuivere lijn, gevolgd door een ronde zelfbevruchting. Hieruit ontstane planten werden behandeld met glufosinaat-ammonium, zodat alleen tolerante planten overbleven, welke vervolgens weer werden gekruist met een niet-transgene zuivere lijn. Onder de nakomelingen hiervan werd de verwachte 2:1 segregatie van tolerante en gevoelige planten bevestigd. De aanvrager vermeldt dat de glufosinaat-ammonium tolerante planten uit deze test tevens resistent bleken te zijn tegen de Europese maïsboorder in een bio-assay.

Uit planten, afkomstig van de eerste terugkruising van de originele transformant met een zuivere lijn werd een generatie nakomelingen voortgebracht door zelfbevruchting. Deze planten werden gebruikt voor DNA-analyse door middel van *Southern blotting*. Ook planten ontstaan door vijf opeenvolgende terugkruisingen van de originele transformant met een zuivere lijn werden op deze wijze geanalyseerd. Bij deze experimenten werden steeds dezelfde hybridiserende DNA-fragmenten gevonden.

Uit deze resultaten blijkt dat het nieuwe DNA stabiel wordt overgedragen naar volgende generaties. Dit feit wordt ook bevestigd door de aantoonbare aanwezigheid van het CRY1F-eiwit in plantenmateriaal afkomstig van maïslijn 1507 uit een aantal veldproeven (deze resultaten zijn beschreven in de volgende paragraaf).

---

### 3.6 VI Specificiteit van de expressie van het nieuwe genetisch materiaal

In het seizoen 1998-1999 werden veldproeven uitgevoerd met 1507-maïs op vier plaatsen in Chili. Om de expressie van de nieuwe genen te onderzoeken werden monsters genomen van verschillende plantendelen in verschillende stadia van de groei (Iow97, Iow03). Dit betreft blad in het V9-stadium, stuifmeel, zaadpluis en stengel in het R1-stadium, zaden na volledige rijping (R6 stadium) en hele planten in het R4-stadium en na verdroging op het veld. Op elke locatie werden verschillende monsters genomen van elk van deze weefseltypen. Daarin werden vervolgens de hoeveelheden van CRY1F- en PAT-eiwit als fractie van de totale hoeveelheid oplosbaar eiwit bepaald via een ELISA-methode met specifieke antisera tegen deze eiwitten. De aanvrager vermeldt per weefseltype gemiddelde waarden, minima en maxima, waarbij de waarden voor de vier locaties zijn samengenomen. Op een vergelijkbare manier werden analyses uitgevoerd op materiaal uit veldproeven in 1999 op drie plaatsen in Frankrijk en drie plaatsen in Italië. Behalve bovenstaande weefseltypen werden hier ook nog hele planten in het V9- en het R1-stadium onderzocht. Tevens werden van hele planten in het R4-stadium en van maïskorrels ook monsters onderzocht na behandeling van de planten met glufosinaat-ammonium. De aanvrager verstreekte later ook gegevens van een derde serie veldproeven, uitgevoerd in 2000 op drie locaties in Frankrijk, twee in Italië en één in Bulgarije. Hierbij werden ook alle hiervoor genoemde weefseltypen onderzocht, nu echter in alle gevallen zowel met als zonder behandeling met glufosinaat-ammonium. De resultaten van de laatstgenoemde experimenten werden ook omgerekend naar hoeveelheden van de nieuwe eiwitten per eenheid drooggewicht van het onderzochte weefsel. In alle weefseltypen van 1507-maïs kon de aanwezigheid van CRY1F-eiwit worden vastgesteld, terwijl dit niet aantoonbaar was in niet-transgene planten. Bij de veldproeven in Europa in 2000 werd het gehalte CRY1F eiwit in maïskorrels vastgesteld op 2.2 ng per mg drooggewicht voor de onbehandelde maïslijn 1507 en 2.5 ng per mg drooggewicht voor maïslijn 1507 na behandeling met glufosinaat-ammonium. Voor het PAT-eiwit konden daarentegen geen waarden worden vastgesteld, doordat het gehalte in de meeste gevallen onder de detectiegrens lag.

Extracten van blad, stuifmeel, maïskorrels en hele planten van de veldproeven in Chili werden ook gebruikt voor *Western blotting* met antisera tegen het CRY1F- en PAT-eiwit. In alle weefseltypen was het CRY1F-eiwit detecteerbaar. Het PAT-eiwit kon alleen worden aangetoond in bladweefsel.

---

### **3.7 VII Overdracht van genetisch materiaal vanuit het GGO**

De aanvrager stelt dat van maïs afgeleide voedselproducten DNA kunnen bevatten. Het gehalte aan DNA is afhankelijk van het gevolgde productieproces. De commissie stelt dat mensen dagelijks grote hoeveelheden plantaardig en dierlijk DNA innemen. Het is voorstelbaar dat delen van dit DNA in de vorm van intacte DNA-fragmenten in de darmen terechtkomen en daar aan de residente microflora worden overgedragen. Als dit al gebeurt, zullen in de praktijk deze genen niet of nauwelijks tot expressie komen, omdat er geen goede promotor aan gekoppeld is. Als deze genen toch tot expressie zouden komen, bieden ze in veruit de meeste gevallen de betreffende bacteriën geen competitief voordeel, en de gastheer geen nadeel. Er kan eigenlijk alleen een probleem optreden in het geval van overdracht van markergenen voor resistentie tegen antibiotica, waarbij dan ook nog de darmflora in de consument onder selectiedruk moet staan door het gebruik van het betreffende antibioticum. In maïslijn 1507 is geen gen aanwezig dat een antibioticumresistentie tot gevolg heeft. Daarom deelt de commissie de zienswijze van de aanvrager dat geen nadelige gevolgen zijn te verwachten van overdracht van genetisch materiaal uit 1507-maïs, zo dit al zou plaatsvinden.

---

### **3.8 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het NV**

Hoewel de maïsplant en hele maïskorrels vooral als diervoeding worden gebruikt, worden van de maïskorrel afgeleide producten maïsolie en maïszetmeel in grote hoeveelheden verwerkt in producten voor menselijke consumptie. Ook uit maïszetmeel geproduceerde siropen en ethanol worden op grote schaal in de voedingsmiddelenindustrie gebruikt. Over het gebruik van maïs voor de productie van voedingsmiddelen is veel informatie beschikbaar. De nieuwe eigenschappen van maïslijn 1507 zijn van agronomische betekenis en zouden op grote schaal toepasbaar zijn. Hoewel 1507-maïs daarom in eerste instantie slechts in plaats van andere maïs zal worden gebruikt, kan niet geheel worden uitgesloten dat het in productie nemen van de nieuwe maïslijn kan leiden tot een betere concurrentiepositie als gevolg van een meer efficiënte productie van het betreffende gewas. In dat geval zou de consumptie door de mens van producten die van maïs zijn afgeleid (in het bijzonder olie en zetmeel) kunnen toenemen ten opzichte van overeenkomstige ingrediënten, afkomstig van andere gewassen. Volgens de commissie bestaan daartegen uit het oogpunt van voedingskunde echter geen bezwaren.

---

### 3.9 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het NV of zijn bron

Conventionele maïs heeft een lange geschiedenis van veilig gebruik binnen en buiten Europa. Over de gemodificeerde maïslijn 1507 zijn geen gebruiksgegevens beschikbaar.

---

### 3.10 XI Informatie over de voedingswaarde van het NV

De aanvrager heeft voedingskundige analyses laten uitvoeren op de maïs van genetisch gemodificeerde en controleplanten. In de aanvraag werden resultaten gepresenteerd van veldproeven, uitgevoerd in Chili (1998-1999), Frankrijk (1999) en Italië (1999). De commissie constateerde echter dat aanvankelijk geen afzonderlijke waarden per locatie werden vermeld. Uitgangspunt voor de commissie is dat de analyse van de samenstelling van een gemodificeerd gewas gebaseerd moet zijn op veldproeven, die zijn uitgevoerd op meerdere geografische locaties, representatief voor de commerciële productie van het gewas. Om eventuele verschillen waar te kunnen nemen tussen de gemodificeerde lijn en de best vergelijkbare controlelijn is het tevens van belang dat de waarnemingen per locatie worden geanalyseerd. In reactie op dit commentaar heeft de aanvrager de resultaten van deze veldproeven opnieuw geanalyseerd, nu per locatie. Tevens verstreekte de aanvrager aanvullende resultaten van veldproeven, uitgevoerd in Frankrijk, Italië en Bulgarije in 2000. Op verzoek van de commissie beargumenteerde de aanvrager dat deze locaties inderdaad representatief zijn voor commerciële toepassing van dit gewas.

Bij al deze experimenten werd het gehalte aan vet, eiwit, koolhydraten, vezels (ADF en NDF) en as bepaald in planten en maïskorrels. In de maïskorrels is tevens het gehalte bepaald aan calcium, fosfor, koper, ijzer, magnesium, mangaan, kalium, natrium, zink, vitamine B1, vitamine B2, foliumzuur, tocoferolen, palmitinezuur, stearinezuur, oliezuur, linolzuur en linoleenzuur. Ook is de aminozuursamenstelling bepaald en het gehalte van de secundaire plantenstoffen inositol, raffinose, *p*-coumaarzuur, furfural en ferulinezuur en de antinutriënten fytinezuur en trypsine inhibitor. Behoudens kleine aanpassingen, die door de aanvrager zijn beargumenteerd, komt deze lijst van geanalyseerde componenten overeen met aanbevelingen gedaan door de OESO (OECD02).

In Chili (seizoen 1998-1999) is op vier verschillende locaties 1507-maïs gekweekt naast controleplanten met een vergelijkbare genetische achtergrond. De 1507-maïs werd behandeld met glufosinaat-ammonium, waarna gevoelige planten werden verwijderd. Het proefveld op elke locatie was ingedeeld in zes blokken, die als herhalingen van het experiment gezien kunnen worden. Voor de analyse van de samenstelling zijn per locatie uit elk blok monsters genomen van de bovengrondse delen van drie planten en van

maïskorrels uit drie maïskolven. Voor elke geanalyseerde component vermeldt de aanvrager de gemiddelde waarde voor maïslijn 1507 en voor de controle maïs, evenals een maat voor de spreiding. Er werden een aantal statistisch significante verschillen gevonden, die merendeels willekeurig verdeeld lijken te zijn over de verschillende proefvelden. Wel valt op dat op alle locaties een hoger gehalte linoleenzuur werd gevonden voor 1507-maïs dan voor de controleplanten. Verder werden voor één locatie afwijkende waarden gevonden voor negen aminozuren. Alle vastgestelde gehalten blijven evenwel binnen bekende literatuurwaarden.

Het onderzoek in Frankrijk (1999) betreft monsters van 1507-maïs en controleplanten uit zes blokken op één locatie. In Italië (1999) werden monsters genomen op drie locaties, elk in drievoud, waarbij ook 1507-maïs behandeld met glufosinaat-ammonium werd onderzocht. Voor de drie proefvelden in Italië werden afwijkende waarden gevonden bij een groot aantal van de metingen voor verschillende aminozuren in maïslijn 1507 ten opzichte van de controleplanten. De overige gevonden verschillen lijken willekeurig verdeeld. Alle vastgestelde gehalten blijven binnen bekende literatuurwaarden.

De aanvrager verstrekte aanvullende informatie over veldproeven, die in 2000 zijn uitgevoerd op drie locaties in Frankrijk, twee in Italië en één in Bulgarije. Het proefveld op elke locatie was ingedeeld in drie blokken. Elk blok bevatte 1507-maïs, met glufosinaat-ammonium behandelde 1507-maïs en controle-maïs. Hieruit werden monsters genomen bestaande uit drie hele planten (R4 stadium) en zaden uit vijf maïskolven van afzonderlijke planten (R6 stadium). Er werden enkele statistisch significante verschillen waargenomen. Er is geen duidelijk patroon in de verdeling hiervan over de locaties en de waargenomen verschillen bleven binnen de natuurlijke variatie die uit de literatuur bekend is. Op één locatie in Frankrijk werden evenwel verschillen tussen de transgene maïs en de controle waargenomen voor vrijwel alle afzonderlijke aminozuren. Voor de controle werden hier consequent iets lagere waarden gevonden dan voor maïslijn 1507, terwijl dat op andere locaties niet het geval was.

Ook beschrijft de aanvrager een voederproef met slachtkuikens, waarbij de groei van de (uitsluitend mannelijke) dieren werd onderzocht. Gedurende de onderzoeksperiode van 42 dagen consumeerde één groep dieren maïskorrels van lijn 1507 en één groep maïskorrels van een controlelijn met vergelijkbare genetische achtergrond. Daarnaast werden dieren in vier controlegroepen gevoederd met maïskorrels van commerciële lijnen. Het voer bestond in alle gevallen gedurende de eerste twintig dagen voor 54 procent uit maïskorrels en in de daarop volgende periode voor 57 procent. Iedere groep bestond uit 35 dieren. Er werden geen significante verschillen gevonden in sterfte, toename in lichaamsgewicht of voedselconversie.

Samenvattend werd er een groot aantal verschillen waargenomen in aminozuurgehalten van maïskorrels van de gemodificeerde lijn en controleplanten voor één locatie in Chili (1998-1999), drie locaties in Italië (1999) en één locatie in Frankrijk (2000). Zulke



verschillen zijn echter niet waargenomen voor de andere veldproeven. In alle gevallen blijven de gehalten binnen de natuurlijke variatie die uit de literatuur bekend is. Ook de afwijkende waarden voor linoleenzuur die zijn gevonden bij de vier veldproeven in Chili blijven binnen dit bereik. De aanvrager stelt dat de waargenomen verschillen toe te schrijven zijn aan natuurlijke variabiliteit. De commissie is van mening dat zelfs indien deze verschillen zijn toe te schrijven aan de genetische modificatie van maïslijn 1507, dit voedingskundig niet bezwaarlijk is, gezien de geringe omvang van die verschillen, binnen de grenzen van bekende natuurlijke variatie. De commissie onderschrijft daarom de conclusie van de aanvrager dat 1507-maïs voedingskundig niet verschilt van conventionele maïs. Dit wordt ook door de beschreven voederproef bevestigd.

---

### 3.11 XII Microbiologische informatie over het NV

Het is niet te verwachten dat er op de nieuwe maïs of daarvan afgeleide producten andere micro-organismen of microbiële metaboliëten voorkomen.

---

### 3.12 XIII Toxicologische informatie over het NV

De aanvrager beschrijft toxicologisch onderzoek van de beide nieuwe eiwitten CRY1F en PAT. Omdat het CRY1F-eiwit slechts in geringe hoeveelheid in de transgene maïsplanten voorkomt, moest het eiwit voor een dierproef in bacteriën worden geproduceerd. Om een efficiënte productie te realiseren werd een fusie-eiwit tot expressie gebracht in de bacterie *Pseudomonas fluorescens*, bestaande uit het N-terminale deel van het CRY1F-eiwit en het C-terminale deel van het verwante CRY1A(b)-eiwit. Door enzymatische splitsing werd hieruit een eiwit geïsoleerd dat overeenkomt met aminozuur 28 tot 612 van het natuurlijke CRY1F-eiwit. Het CRY1F-eiwit in maïslijn 1507 komt overeen met aminozuur 1 tot 605, met een substitutie op positie 604. Uit onderzoek door de aanvrager blijkt dat deze beide eiwitten vergelijkbaar zijn voor wat betreft biologische activiteit in gevoelige insecten, reactiviteit met specifieke antisera bij *Western blotting*, afwezigheid van post-translationele glycosylering en grootte van de gevormde peptides na digestie met trypsine. Het in bacteriën geproduceerde CRY1F-eiwit bleek zijn biologische activiteit te verliezen na incubatie gedurende 30 minuten bij 75°C.

Eventuele acute toxiciteit van het bacteriële CRY1F-eiwit werd onderzocht bij CD-1 muizen. Vijf mannelijke en vijf vrouwelijke muizen kregen een dosis van 576 mg CRY1F-eiwit per kg lichaamsgewicht oraal toegediend, verdeeld over twee gelijke porties met een tussenpoos van één uur. Hiervoor werd 5050 mg per kg lichaamsgewicht gebruikt van een preparaat dat 11,4 procent CRY1F-eiwit bevat. Alle dieren bleven in leven en er werden geen klinische afwijkingen waargenomen gedurende de daaropvol-

gende veertien dagen. Bij sectie na deze periode werden geen macroscopisch zichtbare afwijkingen waargenomen.

Op verzoek van de commissie leverde de aanvrager een verdere onderbouwing van de veiligheid van het CRY1F-eiwit. Daarin wordt beargumenteerd dat de bekende toxische werking van de CRY-eiwitten beperkt is tot bepaalde insectensoorten met speciale receptoren voor dit eiwit in de darmwand. De aanvrager wijst er op dat verschillende *Bacillus thuringiensis* variëteiten reeds tientallen jaren veilig als biopesticiden worden gebruikt. Dit geldt ook voor de ondersoort *aizawai*, waaruit het CRY1F-eiwit afkomstig is. Verder heeft de aanvrager de aminozuurvolgorde van het CRY1F-eiwit vergeleken met een database van bekende eiwitten. Daarbij werden overeenkomsten gevonden met 181 sequenties. Naast sequenties van CRY-eiwitten betreft dit slechts drie andere eiwitten, die geen van alle toxines zijn. Verder is de veiligheid van nauw verwante CRY-eiwitten, zoals het CRY1A(b)-eiwit, in het verleden experimenteel bevestigd. Genetisch gemodificeerde gewassen waarin onder meer het CRY1A(b)-eiwit tot expressie is gebracht, zijn de afgelopen jaren op grote schaal geproduceerd. Er zijn geen nadelige effecten gerapporteerd van consumptie van hiervan afgeleide voedingsmiddelen.

Bij een ander onderzoek werd het PAT-eiwit toegediend aan CD-1 muizen. Vijf mannelijke en vijf vrouwelijke muizen kregen een dosis van circa 5000 mg PAT-eiwit per kg lichaamsgewicht oraal toegediend, verdeeld over twee porties met een tussenpoos van één uur. Hiervoor werd 6000 mg per kg lichaamsgewicht gebruikt van een preparaat dat in bacteriën werd geproduceerd en dat 84 procent PAT-eiwit bevat. Alle dieren bleven in leven en er werden geen klinische afwijkingen waargenomen gedurende de daaropvolgende veertien dagen. Bij sectie na deze periode werden geen macroscopisch zichtbare afwijkingen waargenomen. Tevens werd een onderzoek naar eventuele orale toxiciteit van het PAT-eiwit bij herhaalde blootstelling uitgevoerd met Wistar ratten door toevoeging gedurende veertien dagen van dit eiwit in concentraties van 0, 5.000 en 50.000 ppm aan een dieet met laag eiwitgehalte. Het hiervoor gebruikte PAT-eiwit was geproduceerd in *E.coli* en had een zuiverheid van 98 procent. De totale hoeveelheid toegevoegd eiwit was in deze drie groepen gelijk door toevoeging van respectievelijk 50.000, 45.000 en 0 ppm soja-eiwit. Elke groep bestond uit vijf mannelijke en vijf vrouwelijke ratten. Uit de voedselopname per groep werd een gemiddelde inneming van het PAT-eiwit berekend van 0, 712 en 7619 mg per kg lichaamsgewicht per dag voor de mannelijke dieren en van 0, 703 en 7965 mg per kg lichaamsgewicht per dag voor de vrouwelijke dieren. Een controlegroep kreeg een standaard dieet. Alle dieren bleven in leven en er werden geen klinische verschijnselen waargenomen gedurende de daaropvolgende veertien dagen. Na deze periode werd bloed en urine afgenomen en werden de dieren gedood. Een groot aantal algemene en klinisch chemische bepalingen werden uitgevoerd voor bloed en urine. Voor alle dieren werden orgaangewichten bepaald. Een groot aantal weefsels en organen werden microscopisch onderzocht van de dieren uit de

hoge dosisgroep, de controlegroep waarbij alleen soja-eiwit aan het voer werd toegevoegd en de controlegroep, die een standaard dieet consumeerde. Er werden geen relevante afwijkingen gevonden, die zijn gerelateerd aan de blootstelling aan het PAT-eiwit.

Naast mogelijke acute of subacute toxiciteit bij orale blootstelling is ook mogelijke allergeniteit van de nieuwe eiwitten van belang voor de beoordeling van de voedselveiligheid van 1507-maïs. Om aannemelijk te maken dat allergische reacties ten gevolge van de nieuwe eiwitten onwaarschijnlijk zijn, levert de aanvrager gegevens over de bron van de nieuwe eiwitten, eventuele overeenkomsten met bekende allergenen en de mate van resistentie tegen afbraak door proteolytische enzymen (COD02). De aanvrager stelt dat geen allergeniteit is beschreven van de algemeen voorkomende bodembacteriën waaruit de nieuwe genen zijn geïsoleerd, *Bacillus thuringiensis* en *Streptomyces viridochromogenes*. Een vergelijking van de aminozuurvolgorde van het CRY1F- en het PAT-eiwit met bekende allergenen uit een algemene eiwitdatabase leverde geen overeenkomsten op, als werd gezocht naar een venster van acht opeenvolgende identieke aminozuren. Bij een later onderzoek naar het CRY1F-eiwit heeft de aanvrager gebruik gemaakt van een specifieke database van 2033 sequenties van allergene eiwitten. Dit onderzoek is uitgevoerd volgens de aanbevelingen van FAO/WHO (FAO01). Er werden geen overeenkomstige stukken van zeven of acht identieke opeenvolgende aminozuren geïdentificeerd. Wel werden overeenkomstige sequenties van zes opeenvolgende aminozuren gevonden met drie eiwitten uit de gebruikte database. De aanvrager acht dit gegeven echter niet relevant, omdat bij een venster van zes of zeven aminozuren vaak vals-positieve resultaten worden gevonden, zoals al vermeld werd in paragraaf 3.4. Het CRY1F-eiwit werd ook met dezelfde bekende allergenen vergeleken door toepassing van het programma FASTA bij een venster van 80 aminozuren. Daarbij werden geen overeenkomsten gevonden van meer dan 35 procent, het percentage dat door de FAO/WHO als grens voor mogelijke significantie werd gesteld. Verder werd het CRY1F-eiwit binnen één minuut afgebroken in gesimuleerd maagsap bij een verhouding van één molecuul pepsine op 188 moleculen CRY1F. In een later onderzoek werd aangetoond dat het CRY1F-eiwit zelfs binnen vijftien seconden werd afgebroken in gesimuleerd maagsap met ongeveer 0,3 procent pepsine. Het PAT-eiwit werd binnen vijf seconden afgebroken in gesimuleerd maagsap met dezelfde concentratie pepsine. Een dergelijke snelle afbraak van nieuwe eiwitten bij *in vitro* digestie experimenten met pepsine, wordt in het algemeen gezien als een argument tegen eventuele allergeniteit.

Het uitgangspunt bij de genoemde onderzoeken is dat het verschil tussen maïslijn 1507 en conventionele maïs uitsluitend de aanwezigheid is van de geïntroduceerde genen, de genproducten daarvan en de daardoor veroorzaakte nieuwe eigenschappen. De commissie is echter van mening dat de moleculair-biologische karakterisering van de nieuwe maïslijn de aanwezigheid van onbedoelde additionele veranderingen in het genoom van de maïs niet geheel kan uitsluiten, en verzocht de aanvrager daarom om

naast het onderzoek van de nieuwe eiwitten ook een toxiciteitsonderzoek uit te voeren met de gehele maïskorrel, om aldus een extra garantie voor de veiligheid te verkrijgen voor humane, duurzame consumptie van 1507-maïs. In antwoord hierop heeft de aanvrager vervolgens de resultaten overlegd van een subchronisch toxiciteitsonderzoek, uitgevoerd met ratten (stam Crl:CD(SD)IGS BR). Gedurende 90 dagen kregen testgroepen 33 procent of 11 procent w/w 1507-maïs in het voer toegediend. Controlegroepen kregen 33 procent of 11 procent w/w van een vergelijkbare, niet-gemodificeerde maïs te eten. In de 11 procent-groepen werd het voer aangevuld met 22 procent w/w van een commerciële niet-gemodificeerde maïsvariant. Een andere controlegroep kreeg in het voer 33 procent w/w van deze niet-gemodificeerde maïs toegediend. De test- en controlegroepen bestonden ieder uit twaalf mannelijke en twaalf vrouwelijke ratten. Lichaamsgewicht en voedselconsumptie werden gedurende de eerste week dagelijks bepaald en daarna wekelijks. Klinische observaties werden twee maal daags gedaan op direct zichtbare verschijnselen van toxiciteit en wekelijks door een algemeen onderzoek. Aan het begin en het einde van de onderzoeksperiode werd oogonderzoek en gedragskundig onderzoek uitgevoerd. Na afloop van de onderzoeksperiode werden bloed- en urinemonsters genomen en werden de dieren gedood. Een aantal algemene en klinisch chemische parameters werden bepaald voor bloed en urine. Het gewicht van een aantal organen werd bepaald. Tevens werden een groot aantal weefsels en organen van de hoge dosis-groepen voor 1507-maïs en voor de vergelijkbare, niet-gemodificeerde maïs microscopisch onderzocht. Voor zover significante verschillen werden waargenomen, waren deze niet toe te schrijven aan de toediening van 1507-maïs. Op basis van dit proefdierexperiment en gegevens van FAO/WHO over inneming van maïs en maïsproducten berekent de aanvrager een *margin of exposure* van 12 voor het CRY1F-eiwit voor Europese consumenten ten opzichte van de hoogst geteste dosis. Daarbij is uitgegaan van het maximale gemeten gehalte aan CRY1F in maïskorrels en gebruik van uitsluitend 1507-maïs voor de productie van alle geconsumeerde maïsproducten. Tevens wordt verondersteld dat er geen verlies van CRY1F optreedt door de bewerking tot voedingsmiddelen. Zeker de laatste twee aannames zijn zeer conservatief te noemen, dat wil zeggen, het is aannemelijk dat de werkelijke consumptie van dit eiwit uit maïslijn 1507 aanmerkelijk lager zal zijn.

De commissie is van mening dat de aanvrager op een juiste wijze onderzoek heeft verricht naar de eigenschappen van de nieuwe eiwitten CRY1F en PAT. Daarbij zijn geen aanwijzingen gevonden voor toxiciteit of allergeniteit. Uit de resultaten van het door de aanvrager uitgevoerde subchronische toxiciteitsonderzoek bij ratten blijkt bovendien dat bij consumptie van 1507-maïs geen nadelige effecten zijn te verwachten ten gevolge van eventuele onbekende veranderingen in het genoom van de plant.

---

# Literatuur

- 
- COD02 Report of the third session of the CODEX ad hoc intergovernmental task force on foods derived from biotechnology. Proposed draft annex on the assessment of possible allergenicity of the draft guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Rome: FAO, 2002.
- EG97 Verordening (EG) nr. 258/97 van het Europees parlement en de Raad van 27 januari 1997 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedselingsrediënten. Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen 1997; L43: 1-6.
- EG97a Aanbeveling (EG) nr. 97/618/EC van de Commissie van 29 juli 1997 betreffende de wetenschappelijke aspecten en de presentatie van de informatie die nodig is om aanvragen voor het in de handel brengen van nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedselingsrediënten te ondersteunen alsmede het opstellen van de verslagen van de eerste beoordeling uit hoofde van Verordening (EG) nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad. Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen 1997; L253: 1-36.
- EG98 Verordening (EG) Nr. 1139/98 van de Raad van 26 mei 1998 betreffende de verplichte opneming in de etikettering van bepaalde met genetisch gemodificeerde organismen geproduceerde levensmiddelen van andere gegevens dan die waarin Richtlijn 79/112/EEG voorziet. Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen 1998; L159: 4-7.
- EG00 Verordening (EG) nr. 49/2000 van de Commissie van 10 januari 2000 houdende wijziging van Verordening (EG) nr. 1139/98 van de Raad betreffende de verplichte opneming in de etikettering van bepaalde met genetisch gemodificeerde organismen geproduceerde levensmiddelen van andere gegevens dan die waarin Richtlijn 79/112/EEG voorziet. Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen 2000; L6: 13-14.
- EG01 Richtlijn 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad van 12 maart 2001 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad. Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen 2001; L106: 1-38.
-

- EG03 Verordening (EG) nr. 1829/2003 van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2003 inzake genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders. Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen 2003; L268: 1-23.
- EG03a Verordening (EG) nr. 1830/2003 van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2003 inzake genetisch gemodificeerde organismen en de traceerbaarheid van met genetisch gemodificeerde organismen geproduceerde levensmiddelen en diervoeders en tot wijziging van Richtlijn 2001/18/EG. Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen 2003; L268: 24-28.
- FAO96 Biotechnology and Food Safety. Report of a joint FAO/WHO Consultation. Rome: FAO, 1996.
- FAO01 Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. Rome: FAO, 2001.
- GR92 Commissie Toxicologische aspecten van biotechnologisch bereide producten. Productveiligheid bij nieuwe biotechnologie (publicatienummer 1992/03). Den Haag: Gezondheidsraad, 1992.
- Hil02 Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD et al. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128(4): 280-291.
- Iow97 Iowa State University of Science and Technology. How a corn plant develops. Special report no. 48. Ames, Iowa: reprinted 1997.
- Iow03 Iowa State University of Science and Technology. How a corn plant develops. Special report no. 48. Website [http://maize.agron.iastate.edu/corn\\_grows.html](http://maize.agron.iastate.edu/corn_grows.html), geraadpleegd op 21 oktober 2003.
- Kle02 Kleter GA, Peijnenburg AA. Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE - binding linear epitopes of allergens. *BMC Struct Biol* 2002; 2(1): 8.
- Koh03 Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P. Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol* 2003;52(2):247-58.
- OECD93 Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology. Concepts and principles. Paris: OECD, 1993.
- OECD96 OECD Workshop on Food Safety Evaluation. Paris: OECD, 1996.
- OECD98 Report of the OECD workshop on the toxicological and nutritional testing of novel foods. Paris: OECD, 1998 (draft).
- OECD99 Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Paris: OECD, 1999.
- OECD00 Report of the task force for the safety of novel foods. Paris: OECD, 2000.
- OECD02 Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Paris: OECD, 2002.
- Pio01 Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Aanvraag voor toelating op de markt van voedingsmiddelen en voedsel ingrediënten afkomstig van maïslijn 1507 in het kader van de EU-verordening 258/97. Brussel: Pioneer Overseas Corporation, 2001.
- Pio02 Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Beantwoording van vragen van de Commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen van 28/06/2001. Brussel: Pioneer Overseas Corporation, 2002.
-

- Pio03 Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Aanvullende beantwoording van vragen van de Commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen van 28/06/2001. Brussel: Pioneer Overseas Corporation, 2003.
- Pio03a Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Beantwoording van vragen van de Commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen van 25/03/2003. Brussel: Pioneer Overseas Corporation, 2003.
- Pio03b Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Beantwoording van vragen van de Commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen van 11/06/2003. Brussel: Pioneer Overseas Corporation, 2003.
- SCF99 Scientific Committee on Food. Opinion concerning the scientific basis for determining whether food products, derived from genetically modified maize, could be included in a list of food products which do not require labelling because they do not contain (detectable) traces of DNA or protein. Brussels: Scientific Committee on Food of the EU, 1999.
- SSC99 Scientific Steering Committee. Opinion of the Scientific Steering Committee on microbial resistance, Brussels: Scientific Steering Committee of the EU, 1999.
- Sha88 Shaw, RH. Climatic requirement. P. 3-29 in: Corn and corn improvement, Sprague, GF and Dudley, JW (eds.). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., 1988.
- Whi95 White, PJ and Pollack, LM. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, composition and nutritive values. Cereal foods world 1995; 40: 756-762.
- WHO91 WHO. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology. Report of a joint FAO/ WHO consultation. Geneva: WHO, 1991.
- WHO00 Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology. Geneva: WHO, 2000.





- 
- A De adviesaanvraag
  - B De commissie
  - C EU-procedure
  - D Samenvatting van het dossier
  - E Schematische weergave van de genetische modificatie

---

## Bijlagen



---

## De adviesaanvraag

---

Op 18 augustus 1999 schreef de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport aan de Voorzitter van de Gezondheidsraad (brief kenmerk GZB/VVB 993428):

Sinds mei 1997 is in de Europese Unie de Verordening (EG) 258/97 van kracht inzake nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedsel ingrediënten. Daarmee werd de veiligheidsbeoordeling onderdeel van een communautaire procedure.

Met u is reeds de mogelijkheid besproken de beoordeling door de Gezondheidsraad te laten uitvoeren. Ik verzoek u dan ook mede namens de Staatssecretaris van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, in deze eerste fase van uitvoering van de Europese Verordening (EG) 258/97 gedurende een aantal jaren, de veiligheidsbeoordeling gestalte te geven. Voor het onderbrengen bij de Gezondheidsraad pleit het experimentele karakter dat de beoordeling de eerste jaren zal hebben. Dit experimentele karakter komt voort uit het feit dat het een nieuw soort beoordeling betreft van deels nieuwe categorieën van voedingsmiddelen of voedings ingrediënten. Het is namelijk een veiligheidsbeoordeling vóór het op de markt brengen van met name voedingsmiddelen van een genetisch gemodificeerde oorsprong en zogenaamd functional foods (nutriceutica). Daarnaast ga ik ervan uit dat de onafhankelijke wetenschappelijke advisering door de Gezondheidsraad het vertrouwen van de Europese Commissie en de andere lidstaten in het Nederlandse oordeel nog versterkt.

Mijn beleid is erop gericht een zo groot mogelijke openheid en transparantie te realiseren van de gevolgde procedure en de beoordeling om de consument vertrouwen te geven in de veiligheid van de

---

nieuwe voedingsmiddelen. Ik verzoek de Gezondheidsraad hieraan bij te dragen door bijvoorbeeld inzage te geven in de dossiers waarvoor een aanvraag wordt ingediend, waarbij uiteraard bedrijfsvertrouwelijke gegevens worden beschermd en door de criteria, waarop de veiligheid zal worden beoordeeld, te publiceren.

De Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport,  
w.g. dr E. Borst-Eilers

---

## De commissie

- 
- Prof. dr LM Schoonhoven, *voorzitter*  
emeritus hoogleraar entomologie; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
  - Prof. dr CAFM Bruijnzeel-Koomen  
hoogleraar dermatologie/allergologie; Academisch Ziekenhuis Utrecht
  - Ir EJ Kok  
toxicoloog; RIKILT-DLO Wageningen
  - Dr CF van Kreijl  
moleculair-bioloog; RIVM Bilthoven
  - Prof. dr P van der Laan  
hoogleraar statistiek; Technische Universiteit Eindhoven
  - Dr FM Nagengast  
gastro-enteroloog; Academisch Ziekenhuis Nijmegen
  - Dr ir JMA van Raaij  
voedingsfysioloog; Wageningen Universiteit and Researchcentrum
  - Prof. dr ir G Schaafsma  
hoogleraar voeding; TNO Voeding, Zeist
  - Prof. dr EG Schouten  
hoogleraar epidemiologie; Wageningen Universiteit and Researchcentrum
  - Dr GJA Speijers  
toxicoloog; RIVM Bilthoven
  - Prof. dr WJ Stiekema  
hoogleraar bioinformatica; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
-

- Ir R Top, *adviseur*  
Ministerie van VWS; Den Haag
- Prof. dr WM de Vos  
hoogleraar microbiologie; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
- Dr ir F van der Wilk, *adviseur*  
COGEM, Bilthoven
- Dr RA Woutersen  
toxicoloog; TNO Voeding, Zeist
- Dr CMA van Rossum, *secretaris*  
Gezondheidsraad, Den Haag

Administratieve ondersteuning: drs CL Vuijst; Gezondheidsraad, Den Haag

Layout: J van Kan; Gezondheidsraad, Den Haag

---

## **EU-procedure**

---

Als een fabrikant een nieuw voedingsmiddel op de markt brengt, dient de veiligheid voor de consument gewaarborgd te zijn. In 1997 werd de Europese verordening van kracht waarin de procedure is geregeld voor de goedkeuring voor marktintroductie van een nieuw voedingsmiddel (EG97). Bij deze procedure zijn verschillende actoren betrokken. De aanvrager moet beoordelen of het product werkelijk 'nieuw' is, dat wil zeggen dat het nog niet eerder in de Europese Unie in substantiële mate voor menselijke voeding is gebruikt en ook niet wezenlijk gelijkwaardig is aan een bestaand product. (Voor een wezenlijk gelijkwaardig product kan worden volstaan met een kennisgeving van de marktintroductie.) Ook moet het niet gaan om een levensmiddelenadditief, aroma of extractiemiddel, omdat deze producten op een andere wijze worden beoordeeld. Voor een nieuw voedingsmiddel in de zin van de Europese verordening moet de aanvrager een veiligheidsdossier overleggen volgens aanbevelingen van de Europese Commissie (EG97a). Deze aanbevelingen zijn gebaseerd op rapporten van verschillende instanties die zich met het onderwerp nieuwe voedingsmiddelen bezighouden, te weten de OECD (OECD93, OECD96) en de WHO/FAO (FAO96, WHO91). Ook de Gezondheidsraad heeft zich al eerder over dit onderwerp gebogen (GR92). Sinds het verschijnen van de aanbevelingen van de EU wordt in internationaal verband gewerkt aan explicitering en aanpassing aan de stand van de wetenschap (FAO01, OECD98, OECD00, SCF99, SSC99, WHO00). In de nabije toekomst zullen levensmiddelen geproduceerd uit genetisch gemodificeerde organismen niet meer volgens deze procedure worden beoordeeld, maar overeenkomstig een nieuwe Europese verordening (EU03).

---

De fabrikant levert het volgens de richtlijnen samengestelde dossier in bij het land waar het product het eerst op de markt zal komen. Daarop komt de nationale veiligheidsbeoordelingsautoriteit in actie. In Nederland is dat de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport. Zij heeft de Gezondheidsraad verzocht haar van advies te dienen. De Voorzitter van de Gezondheidsraad heeft hiertoe de commissie Veiligheidsbeoordeling nieuwe voedingsmiddelen (commissie VNV) ingesteld.

De commissie beoordeelt op basis van de huidige stand van de wetenschap of de door de fabrikant geleverde gegevens juist en volledig zijn en of zij het eens is met diens conclusies. Zij maakt een verslag van haar bevindingen — ook volgens de Europese aanbevelingen (EG97a, deel III) — en biedt dat de minister aan. De minister formuleert het Nederlandse oordeel over een voedingsmiddel en brengt dat in bij het Europese overleg in het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid. Alle Europese lidstaten worden uitgenodigd hun oordeel (de zogeheten tweede beoordeling) te geven over het dossier en over de eerste beoordeling alvorens genoemd Comité een eindoordeel velt. Als een dossier veel vragen oproept, gaat er een adviesvraag van de Europese Commissie naar het Wetenschappelijk Comité voor de menselijke voeding. Komt men dan nog niet tot overeenstemming dan beslist de Europese Ministerraad.



---

Bijlage

**D**

---

## **Samenvatting van het dossier**

---

## 6. SUMMARY

In accordance with Article 6.1 of the Regulation (EC) No 2258/97, this is a summary of the application for placing on the market of novel foods and novel food ingredients jointly submitted to the competent authority and the food assessment body of The Netherlands by Pioneer Hi-Bred International Inc. and Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC. Pioneer Hi-Bred International Inc., as represented by Pioneer Overseas Corporation, Avenue Tedesco 7, B-1160 Brussels, Belgium, is taking the lead for this submission.

### **Description of the product**

The product consists of foods from maize grain produced from genetically modified *B.t.* Cry1F maize line 1507 and progeny derived from conventional breeding between 1507 maize with any traditionally bred non-GM maize. The term "1507 maize" refers to grain derived from inbreds and hybrids of maize line 1507 including crosses with traditionally bred maize.

The 1507 maize has been genetically modified (GM) to express CRY1F protein for resistance to certain lepidopteran insect pests, such as the European corn borer (ECB), and to express phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT) protein for tolerance to glufosinate-ammonium herbicide.

### **Categorisation of the product**

Based on the recommendations made by the EC Scientific Committee on Food (SCF) for the scientific classification of the novel food (NF) and for the assessment of wholesomeness, 1507 maize belongs to Class 3, Subclass 3.1, under GM plants and their products (Commission Recommendation 97/618/EC of 29th July 1997). Under NF Class 3, the GM plants can be consumed directly as unprocessed foods or after having been processed into foods and food ingredients.

### **Identification and consultation of the essential information requirements**

In the case of 1507 maize and based on Table II of the SCF recommendations, the structured schemes identified to provide guidance for consultation of the essential information requirements for the NF and the assessment of wholesomeness comprise Schemes I to VII and IX to XIII.

#### ***Scheme I: Specification of the novel food (NF)***

Maize (*Zea mays* L.) has well characterised specification belonging to the Gramineae family, the genus *Zea* and the species *Z. mays* ( $2n = 20$ ). The evidence presented in this application confirms that foods derived from 1507 maize can be considered to be substantially equivalent to food products derived from traditionally-bred non-GM maize with no nutritional or toxicological changes. Traditionally-bred maize does not contain any toxic or anti-nutritional factors that need to be controlled by a specification and the characteristics, compositional analyses and safety evaluation of

the genetic modification in 1507 maize does not entail a separate specification of the NF.

A PCR detection method to confirm molecular identity and to ensure that the NF marketed is similar to that evaluated is being developed. The detection method will be submitted to the regulatory authority before the 1507 maize is placed on the EU market for food purposes.

***Scheme II: Effect of the production process applied to the NF***

Foods from 1507 maize will be used and processed as any other commercial maize. The production process applied to maize are well known and have a long history of safe use. The safety evaluation contained in this application for foods derived from 1507 maize provides further verification that no specific conditions of use and processing are required for 1507 maize, and therefore there should be no effects on the existing production processes as applied to the NF.

***Scheme III: History of the organism used as the source of the NF***

The NF, referred to as 1507 maize, is obtained from a maize plant (*Zea mays* L.) which has a long history of safe use. The genetic modification of 1507 maize was carried out by using the particle acceleration method to introduce into maize cells a purified linear DNA fragment containing the cry1F and *pat* gene coding sequences and the necessary regulatory components for expression of CRY1F and PAT proteins in maize. No other gene coding sequences have been inserted during the genetic modification of 1507 maize.

The genetic sequences obtained from the donor organisms and inserted in 1507 maize do not have any pathogenic characteristics. First of all maize as the recipient plant, and donor of the *ubiZM1(2)* promoter, is not a pathogenic organism and has a long history of domestication and safe use as an agricultural food crop.

Secondly, *Bacillus thuringiensis*, donor of the cry1F sequence, has a history of decades of safe use as a pesticide (EPA, 1996). The subspecies *aizawai* is commercially used to control wax moth larvae and various caterpillars, especially the diamondback moth caterpillar (Cornell University, 1996). *Agrobacterium tumefaciens* is the source of the ORF25PolyA terminator for the cry1F gene. No sequences involved in plant pathogenicity are encoded by this transcription terminator.

Thirdly, *Streptomyces viridochromogenes*, donor of the *pat* gene, is a common soil bacterium that produces the tripeptide L-phosphinothricyl-L-alanyl-alanine (L-PPT), which was developed as a non-selective herbicide by Hoechst Ag and there is a history of safe use of the *pat* gene in GM crops (OECD, 1999; see Annex 5). The cauliflower mosaic virus, donor of the CaMV 35S promoter and terminator sequences, is a DNA caulimovirus with a host range restricted primarily to cruciferous plants (ICTV Database, 1998).

#### ***Scheme IV: Effect of the genetic modification on the properties of the host organism***

The 1507 maize has been modified to express CRY1F protein for resistance to certain lepidopteran insect pests, such as the European corn borer (ECB), and to express phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT) protein for tolerance to glufosinate-ammonium herbicide. The particle acceleration method was used to introduce into maize cells a purified linear DNA fragment (PHI8999A; 6235 bp) containing the *cry1F* and *pat* coding sequences and the necessary regulatory components only. The *nptII* gene, conferring resistance to kanamycin, was not part of the purified linear DNA fragment used in the transformation and it is not present in 1507 maize, as confirmed by the molecular analyses carried out with Southern blots.

The insert, PHI8999A, consists of a linear DNA fragment containing we plant optimized and truncated *cry1F* gene and the plant optimized *pat* gene together with the regulatory sequences necessary for their expression in maize plants. The insert was obtained by digesting the plasmid PHP8999 (9504 bp) with the restriction enzyme *PmeI*. This produced the 6235 bp insert, which was subsequently purified by agarose gel electrophoresis and used in the transformation of 1507 maize. The 3269 bp fragment containing the *nptII* gene was discarded and was not used in the transformation.

The amino acid sequence of the core CRY IF protein expressed in 1507 maize is, with the exception of a single amino acid substitution, leucine at position 604, identical to amino acids 1-605 of the native CRY1F protein which is 1174 amino acids long. This change in the coding sequence was made to introduce *aXhoI* restriction site for fusion of sequences encoding the C-terminal domain of the protein that forms the full length protein. The amino acid sequence of the recombinant CRY1F protein (MR872) produced in *Pseudomonas fluorescens* which has been used in toxicological studies consists of a chimeric CRY1F/CRY1A(b) protein with equivalent biochemical characteristics and biological activity to the maize expressed core CRY1F protein (Evans, 1998).

The activity of the PAT protein is specific to catalysing the conversion of L-PPT to N-acetyl-L-PPT. This is an inactive form which does not bind to glutamine synthetase (De Block *et al.* 1987). The expression of the PAT protein in 1507 maize allows the detoxification of ammonia to continue and confers tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. The activity of the PAT protein has been described in detail by the OECD (1999): "Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide" (Annex 5).

Detailed molecular characterization, based on Southern blot analyses, confirms that 1507 maize contains a full-length copy of the DNA insert integrated into the maize genome and an additional copy of the *cry1F* gene (Glatt, 2000; Annex 6).

#### ***Scheme V: Genetic stability of the GMO used as NF source***

The 1507 maize has remained stable as inbreds and hybrids for at least six generations, through crossing and backcrossing to elite inbreds and selfing, as

confirmed by early and late segregation data (BC2F1 and F1 generations, respectively). This evidence, together with the molecular characterization by Southern blotting of the 1507 maize (Scheme IV) and analyses of the expression of CRY1F and PAT proteins (Scheme VI), confirms stable integration of the *cry1F* and *pat* genes in the genome of 1507 maize. These analyses support the conclusion that the *cry1F* and *pat* genes are inherited as Mendelian dominant genes and that the additional copy of the *cry1F* gene is genetically linked to the insert containing the *cry1F* and *pat* genes.

#### ***Scheme VI: Specificity of expression of novel genetic material***

Analyses of expression of the novel genetic material (*cry1F* and *pat* genes) has been carried out at ten locations over two growing seasons: four locations in Chile in 1998-1999, and six locations in France and Italy in 1999. The results obtained from tissue samples from 1507 maize have confirmed specificity of CRY1F protein expression in samples of leaf (V9 stage), pollen, silk, stalk, whole plant (both at V9 and R4 stages), grain and senescent whole plant tissues. The results have also confirmed specificity of PAT protein expression in samples of leaf (V9 stage) and whole plant (V9 stage) tissues. The ELISA results show that CRY1F is expressed in all plant material tested, with significantly lower concentrations in grain than in vegetative tissue. Additionally, Western blot analyses have confirmed that CRY1F and PAT proteins expressed in 1507 maize are of the same molecular weight and immunoreactivity as the microbially-derived proteins. Other than the expected bands for CRY1F and PAT proteins, the Western blots did not show any other bands to indicate either partial or fusion proteins in the 1507 maize tissues.

Comparison of the agronomic performance in terms of grain yield, moisture, accumulated growing degree days to reach 50% pollen shed, accumulated growing degree days to reach 50% silking, grain density, plant height, ear height, early stand count establishment, visual rating of emergence vigour from spike to one-leaf stage, visual rating of vigour at three- to five-leaf stage, stalk lodging, root lodging, dropped ears per plot and top integrity between 1507 maize and non-GM control maize with comparable genetic backgrounds, further confirms that 1507 maize is comparable to non-GM control maize. With the exception of the intended resistance to certain lepidopteran insect pests and tolerance to glufosinate-ammonium herbicide, as derived from the genetic modification, no unexpected phenotypic differences have been observed in 1507 maize. The agronomic data also provides further evidence of the specificity of expression of the novel genetic material in 1507 maize

#### ***Scheme VII: Transfer of genetic material from GMO***

Transfer of genetic material originating from 1507 maize to bacteria is a negligible concern as there is no known mechanism for, or definitive demonstration of, DNA transfer from plants to microbes under natural conditions. In any case, and even if horizontal gene transfer were to take place, transfer of the *cry1F* or *pat* gene from 1507 maize does not represent a risk to human health or animal health.

#### ***Scheme VIII: Ability of the GMM to survive in and colonize the human gut***

This is not applicable as the NF is not a GM microorganism (GMM).

*Scheme IX: Anticipated intake/extent of use of the NF*

Majority of grain and forage derived from maize is used for animal feed and about 8% of EU production is processed for human food products. The evidence provided in the application shows that the inserted genetic material and the newly expressed CRY1F and PAT proteins in 1507 maize are safe to human health. Furthermore, the properties of 1507 maize regarding its nutritional value and compositional characteristics are comparable and substantially equivalent to those of traditionally-bred non-GM maize. Based on this evidence, the anticipated use of 1507 maize derived foods will be no different from that of traditionally bred maize, and any substitution of traditionally bred maize by 1507 maize will not be of any nutritional significance.

*Scheme X: Information from previous human exposure to the NF or its source*

Food products derived from maize have been produced, prepared and consumed by humans for centuries throughout the world. Based on the evidence presented in this application, we conclude that exposure to food products derived from 1507 maize will not give rise to nutritional, microbiological, lexicological and/or allergenicity problems and that it is as safe as exposure to any other food products derived from traditionally-bred non-GM maize.

*Scheme XI: Nutritional information on the NF*

Range of data from compositional analyses of maize grain are provided in the application for the nutritional assessment of 1507 maize. Field studies representative of pertinent conditions and growth stages of the commercial production of maize were conducted on 1507 maize and non-GM control maize. Data from ten different locations over two growing seasons have been analysed: four locations in Chile (1998-1999) and six in the EU (France and Italy, 1999). At the locations in Italy, the trials also included treatments to compare 1507 maize sprayed with glufosinate-ammonium, 1507 maize unsprayed with glufosinate-ammonium, and non-GM control maize. At all locations, the non-GM control maize was of comparable genetic background to 1507 maize.

The compositional data determined the levels of protein, fiber (ADF, NDF), carbohydrates, fat, ash, five different fatty acids, five different minerals, eighteen different amino acids, four different vitamins, five different secondary metabolites and two potential anti-nutrients. The analyses on the composition clearly demonstrated that grain from 1507 maize, unsprayed or sprayed with glufosinate-ammonium, is comparable to grain from non-GM maize and to the published range of composition values in the literature. These analyses support the conclusion that 1507 maize is substantially equivalent to traditionally-bred maize.

In addition, nutritional equivalence between 1507 maize and traditionally-bred maize has been shown in a poultry feeding study where broiler chickens were fed over a 42-day period with diets containing 1507 maize grain or yellow dent grain from non-GM maize. The mortality, body weight gain and feed conversion of the chickens were

compared and no statistically significant differences were observed between chickens fed a diet containing grain from 1507 maize or grain from non-GM maize.

### ***Scheme XII: Microbiological information on the NF***

The NF does not contain any microorganisms and therefore no microbiological information is provided.

### ***Scheme XIII: Toxicological information on the NF***

#### Toxicity

Maize has a long history of use as food in the EU and constitutes a traditional counterpart to 1507 maize that can be used as a baseline to facilitate the toxicological assessment. Maize is not considered to have harmful toxicants and the genetic modification in 1507 maize does not introduce any new toxicants harmful to humans or animals.

The CRY1F protein has specific toxicity against certain lepidopteran insect pests (target organisms), and there is no evidence for CRY proteins originating from *Bacillus thuringiensis* to have any harmful effects on the health of humans and animals (EPA, 1995a; McClintock *et al.*, 1995; EPA, 1996). Furthermore, the potential toxicity of the CRY1F protein to humans and animals was specifically examined in an acute oral toxicology study where CRY1F protein was evaluated for acute toxicity in mice (Kuhn, 1998). The relatively high dose tested did not give rise to any toxicity and therefore the acute LD<sub>50</sub> for CRY1F protein could not be determined other than estimated to be higher than 576 mg CRY1F per kg body weight.

The PAT protein has already been found safe to human health during the assessment of glufosinate-ammonium tolerant maize (OECD, 1999; Annex 5). The *pat* gene was originally obtained from *Streptomyces viridochromogenes* strain Tü494 which has no known toxic or pathogenic potential. The PAT protein is enzymatically active but it has high substrate specificity to the active ingredient of glufosinate-ammonium (L-PPT). A toxicity study consisting of feeding rats with the PAT protein has been carried out (Pfister *et al.*, 1996; Health Canada, 1997). Results from the range of doses tested (up to 50000 mg/kg body weight) showed no adverse effects on the growth or histopathology of the animals. The PAT protein has also been tested in an additional acute toxicity study in mice (Brooks, 2000). As before, the relatively high dose tested did not give rise to any toxicity and therefore the acute LD<sub>50</sub> of PAT protein could not be determined other than estimated to be higher than 5000 mg PAT per kg body weight.

A 42-day long poultry feeding study has also been carried out with grain from 1507 maize and the non-GM control maize with comparable genetics. The results show that mortality, body weight gain and feed conversion of the chickens fed with 1507 maize was similar to chickens fed a standard diet containing yellow dent maize.

#### Allergenicity

The most important factor to consider in assessing allergenic potential is whether the source of the gene being introduced into plants is known to be allergenic (FDA,

1992). Neither *Bacillus thuringiensis* (the source of the *cry1F* gene) nor *Streptomyces viridochromogenes* (the source of the *pat* gene) have a history of causing allergy.

The biochemical profile of the CRY IF and PAT proteins also provides a basis for allergenic assessment when compared with known protein allergens. A database search was compiled by Meyer (1999) using the Wisconsin Genetics Computer Group (GCG) sequence analysis computer program with the keyword "allergen" to search standard DNA and protein sequence databases. Comparison of the 15 most homologous database sequences confirmed that the CRY1F and PAT proteins do not share any significant amino acid sequence homology with known protein allergens.

Furthermore, protein allergens are typically stable to the peptic and tryptic digestion, and to the acid conditions of the human digestive system, which allows them to reach and pass through the intestinal mucosa to elicit an allergenic response. Both CRY1F and PAT proteins are readily degradable in simulated digestive juice, minimising any potential for these proteins to be absorbed by the intestinal mucosa when consumed. The CRY1F protein was nearly completely proteolysed in simulated gastric conditions within one minute at a molar ratio of 188:1 (CRY1F:pepsin) (Evans, 1998). In addition, the immunoblot detection technique has demonstrated that CRY1F is not glycosylated, which is an additional indicator of the absence of allergenic potential in the CRY1F protein. Furthermore, CRY1F loses immunoreactivity after heat processing and it has a history of safe use in microbial pesticides (Evans, 1998). In addition, a study on the heat lability of CRY1F protein at various temperatures showed that CRY1F loses biological activity after exposure at 75°C or greater for 30 minutes (Herman, 2000). The PAT protein degraded to non-detectable levels within 5 seconds after introduction to simulated gastric fluid containing pepsin (Glatt, 1999; OECD, 1999; Annex 5).

Therefore, the *cry1F* and *pat* genes introduced into 1507 maize do not encode for known allergens, and neither the CRY1F nor the PAT proteins share immunologically significant amino acid sequences with known allergens. This together with the heat lability and rapid breakdown of these proteins under digestive conditions, confirms that the CRY1F and PAT proteins should not pose any allergenic risk.

### **Evaluation and conclusion**

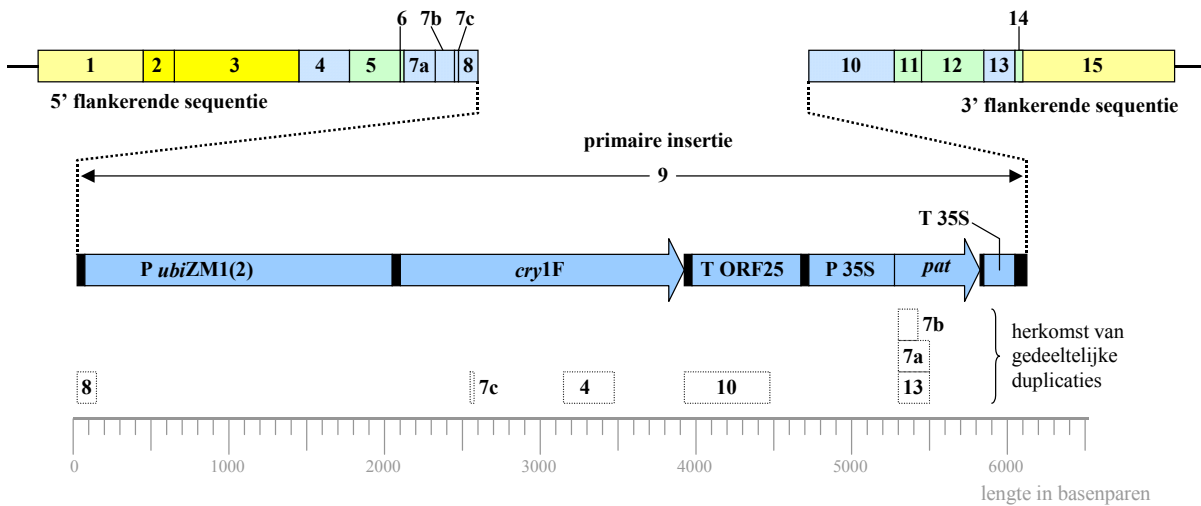
The safety evaluation of food products derived from *B.t.* Cry1F maize line 1507, referred to as 1507 maize, presented throughout this application has been carried out following thorough consideration of a series of key parameters that show wholesomeness and substantial equivalence between 1507 maize and traditionally-bred non-GM maize: Southern blot analyses and molecular characterisation, agronomic performance, Mendelian inheritance, protein expression analyses, compositional analyses, nutritional equivalence and lexicological information have demonstrated that food products from 1507 maize are as safe and nutritious as other maize products already on the EU market.



# Schematische weergave van de genetische modificatie

Schematische weergave van de genetische modificatie in 1507 maïs

- 9 = primaire insertie
- 4, 7a/b/c, 8, 10, 13 = gedeeltelijke duplicaties van de primaire insertie
- 5, 6, 11, 12, 14 = overeenkomst met chloroplast DNA
- 2,3 = overeenkomst met bekend maïs genomisch DNA
- 1, 15 = onbekend, waarschijnlijk maïs genomisch DNA





---

# **Insect-resistant and herbicide-tolerant maize (1507)**

Assessment of safety for the consumer, in accordance with European  
Regulation 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients

---



---

# Letter to the Dutch Minister of Health, Welfare and Sport

---

On November 4, 2003, professor dr JGAJ Hautvast, Vice-President of the Health Council of the Netherlands wrote as follows to the Minister of Health, Welfare and Sport:

Herewith I present you an advisory report that is prepared in response to your request for advice regarding the safety of novel foods and novel food ingredients, also made on behalf of the Minister of Agriculture, Nature and Food Quality. This advice is a so called initial assessment in the context of European Regulation (EC) 258/97, concerning Insect-resistant and herbicide-tolerant maize (1507). The assessment was carried out by the Committee on the Safety Assessment of Novel Foods of the Health Council of the Netherlands.

This advisory report is also presented to the Minister of Agriculture, Nature and Food Quality.

Signed  
professor dr JGAJ Hautvast

---



---

# **Insect-resistant and herbicide-tolerant maize (1507)**

Assessment of safety for the consumer, in accordance with European  
Regulation 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients

---

Health Council of the Netherlands:  
Committee on the Safety Assessment of Novel Foods

---

to:

the Minister of Health, Welfare and Sport

the Minister of Agriculture, Nature and Food Quality

---

No. 2003/04VNV, The Hague, November 4, 2003

---

---

The Health Council of the Netherlands, established in 1902, is an independent scientific advisory body. Its remit is “to advise the government and Parliament on the current level of knowledge with respect to public health issues...” (Section 21, Health Act).

The Health Council receives most requests for advice from the Ministers of Health, Welfare & Sport, Housing, Spatial Planning & the Environment, Social Affairs & Employment, and Agriculture, Nature and Food Quality. The Council can publish advisory reports on its own initiative. It usually does this in order to ask attention for developments or trends that are thought to be relevant to government policy.

Most Health Council reports are prepared by multidisciplinary committees of Dutch or, sometimes, foreign experts, appointed in a personal capacity. The reports are available to the public.

---

Preferred citation:

Health Council of the Netherlands: Committee on the Safety Assessment of Novel Foods. Insect-resistant and herbicide-tolerant maize (1507). The Hague: Health Council of the Netherlands, 2003; publication no. 2003/04VNV.

---

all rights reserved

A public version of this advisory report can be found on the website of the Health Council of the Netherlands: [www.healthcouncil.nl](http://www.healthcouncil.nl).

---



---

# Contents

---

---

Executive summary, conclusions and recommendations 59

---

1 Introduction 61

---

2 Completeness and accuracy of the dossier 63

2.1 Administrative data 63

2.2 General description of the food 64

2.3 Classification of the food for assessment 64

2.4 Information about the food 64

2.5 Brief summary by the applicant 65

2.6 Other assessments 65

2.7 Labelling proposal by the applicant 65

---

3 Interpretation and evaluation of the data presented 67

3.1 I Specification of the novel food (NF) 67

3.2 II Effects of the production process applied to the NF 67

3.3 III History of the organism used as the source of the NF 68

3.4 IV Effect of the genetic modification on the properties of the host organism 68

3.5 V Genetic stability of the genetically modified organism (GMO) used as NF source 70

3.6 VI Specificity of the expression of the novel genetic material 70

3.7 VII Transfer of genetic material from the GMO 71

3.8 IX Anticipated intake and extent of use of the NF 72

---

3.9	X Information from previous human exposure to the NF or its source	72
3.10	XI Nutritional information on the NF	72
3.11	XII Microbiological information on the NF	74
3.12	XIII Toxicological information on the NF	75

---

Literature 79

---

Annexes 83

A	Request for advice	85
B	The Committee	87
C	EU-procedure	89
D	Executive summary of the dossier	91
E	Schematic representation of the genetic modification	99

---

## Executive summary, conclusions and recommendations

---

Two companies, Pioneer Hi-Bred and Mycogen Seeds, jointly presented a safety dossier for the genetically modified maize line 1507. This dossier contains molecular biological, nutritional and toxicological information. The reference is a conventional maize line with a history of safe use within the European Union.

The modified maize line differs from a conventional line, due to the presence of the *cry1F* and *pat* genes and their expression products, the CRY1F and PAT proteins. The inserted genes, which are of bacterial origin, have been modified for optimal expression in the plant. This renders the maize plant resistant to damage by certain insect pests and tolerant to treatment with the herbicide glufosinate ammonium in the field. Molecular biological analysis of the new crop revealed that a single, complete copy of each of these genes is present at a single location in the DNA of 1507 maize. There are no indications that the new proteins are toxic or allergenic for humans in the concentrations at which they occur.

The intended change is associated with unintended rearrangements of the DNA flanking the insertion, which have also been analysed in detail. There are no indications that the changes in the maize plant genome result in the unintended production of other new proteins.

The modified maize line's composition has been compared with that of a near isogenic, non-modified maize line by means of a chemical analysis of a large number of components: micronutrients, macronutrients, antinutrients and secondary metabolites. To this end, field trials were conducted at several locations, the results of which were processed for each location separately. Observed variations in the components investi-

---

gated remained within the figures cited in the references and have no health-related consequences.

Furthermore, in a subchronic toxicity study on animals, no adverse effects of the modification in 1507 maize were observed.

The Committee is of the opinion that the information in the dossier provides sufficient basis for a safety assessment. The dossier contains a correct interpretation of the data submitted. Based on current scientific knowledge, the Committee's opinion is that the consumption of 1507 maize, as well as foods and food ingredients derived from this, is just as safe for humans as the consumption of non-genetically modified maize and maize products.

---

# Introduction

---

On 28 February 2001 the Minister of Health, Welfare and Sport requested the advice of the Committee on the Safety Assessment of Novel Foods (VNV), hereinafter referred to as ‘the Committee’, concerning the safety for consumers of foods and food ingredients produced from a new maize variant. This maize, which is referred to as line 1507, originates from a plant (*Zea mays* L.) which, as a result of genetic modification, produces two new proteins, the CRY1F and PAT proteins. The CRY1F protein protects the plant against damage by certain insects, such as the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*). The PAT protein renders the plant tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. As a result, it is possible to control weeds in the field during the growth phase of these plants by treatment with the herbicide, without damaging the maize plants. The maize variant was developed by Pioneer Hi-Bred and Mycogen Seeds, who also submitted the application (Pio01). The application contains a safety assessment with a number of accompanying research reports. In June 2001, the Committee requested the applicant to supplement the dossier with additional data regarding the molecular characterisation, and the compositional analysis of the new maize line. The Committee also requested the applicant to submit the results of additional animal experiments and to complete the dossier by sending all of the data cited in the references. In February 2002, the applicant supplied some of the new information requested (Pio02), followed by additional data in February 2003 (Pio03). In March 2003, the Committee responded to this by requesting further clarification concerning the molecular biological analysis, the study into the modified maize’s composition and the toxicological study into the new proteins. The applicant supplied a part of the new information requested in May 2003 (Pio03a). In July 2003, additional

---

information was supplied, after the Committee had further specified its previous question (Pio03b). The Committee devoted several meetings to discussing the dossier and completed its assessment in November 2003. This advisory report contains the Committee's findings.

---

## **Completeness and accuracy of the dossier**

---

### **2.1 Administrative data**

The names and addresses of the applicants, hereafter referred to as ‘Pioneer/Mycogen’ or ‘the applicant’, are as follows:

Pioneer Hi-bred International Inc.  
400 Locust Street, Suite 800  
Des Moines, IA 50309, USA

Mycogen Seeds  
c/o Dow Agrosience LLC  
9330 Zionsville Road  
Indianapolis, IN 46268-1054, USA

For the purpose of this application, these companies are represented by:

Pioneer Overseas Company,  
Avenue Tedesco 7  
B-1160 Brussels, Belgium.

---

---

## **2.2 General description of the food**

The application concerns the marketing and trading of maize line 1507 on the European market for direct consumption and for further processing into foods and food ingredients. The application also covers crosses of maize line 1507 with non-genetically modified maize lines.

---

## **2.3 Classification of the food for assessment**

The dossier contains arguments for classification in class 3.1, one of the six main classes and sub classes of novel foods as referred to in table 1, section 1 of Recommendation 97/618 of the European Commission (EC97a). This concerns a genetically modified plant, the conventional counterpart of which has a history of safe use in the European Union. The Committee concurs with this classification.

---

## **2.4 Information about the food**

The applicant specified the information that is essential for a safety assessment of novel food consumption in accordance with the themes prescribed in Recommendation 97/618 of the European Commission (EC97a):

- I. Specification of the novel food (NF)
- II. Effects of the production process applied to the NF
- III. History of the organism used as the source of the NF
- IV. Effect of the genetic modification on the properties of the host organism
- V. Genetic stability of the genetically modified organism (GMO) used as NF source
- VI. Specificity of the expression of the novel genetic material
- VII. Transfer of genetic material from the GMO
- IX. Anticipated intake and extent of use of the NF
- X. Information from previous human exposure to the NF or its source
- XI. Nutritional information on the NF
- XII. Microbiological information on the NF
- XIII. Toxicological information on the NF.

For every subject, the applicant follows each step in the flow charts and refers to the appendices or the references for the data used.



---

## **2.5 Brief summary by the applicant**

The dossier contains a brief summary that was sent to the EU member states in accordance with article 6, section 2 of the European Regulation (EC) 258/97 (EC97).

---

## **2.6 Other assessments**

In the context of Directive 2001/18/EC (EG01) on the deliberate release of genetically modified organisms into the environment, molecular biological aspects of this novel food will be assessed in the Netherlands by the Committee on Genetic Modification (COGEM) at the request of the Ministry of Spatial Planning, Housing and the Environment.

In the Netherlands, animal feed safety assessments of genetically modified crops are carried out by the National Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT).

In the Netherlands, permission to treat this maize in the field with glufosinate ammonium rests with the Board for the Authorisation of Pesticides (CTB).

---

## **2.7 Labelling proposal by the applicant**

The dossier contains a labelling proposal. Recently, European Regulation (EC) No. 1830/2003 was published, concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and traceability of derived food and feed products (EC03a). After the entry into force of this regulation, not all articles shall apply with effect instantly. Until the new regulation comes into force, labelling should satisfy the requirements in EC Regulations 258/97 (EC97), 1139/98 (EC98), and 49/2000 (EC00). However, in the Netherlands, a labelling proposal is discussed in the Regular Consultation on the Commodity Act and is not further assessed by this Committee.



---

## Interpretation and evaluation of the data presented

---

### 3.1 I Specification of the novel food (NF)

This application concerns a maize line, into which two new genes have been introduced. One of these genes is the *pat* gene, which codes for the protein phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT). This is an enzyme which occurs naturally in the soil bacterium *Streptomyces viridochromogenes*. It causes the modified maize plant to be tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. The second introduced gene is *cry1F*. This codes for a protein which corresponds to the biologically active part of the CRY1F protein from the soil bacterium *Bacillus thuringiensis*, subspecies *aizawai*. Despite this distinction, the new protein in the transgenic plant is also designated as CRY1F. The production of this protein in the modified maize plant protects the plant from damage by certain insects, such as the larvae of the European Corn Borer.

---

### 3.2 II Effects of the production process applied to the NF

Whole maize kernels are used as animal feed on a large scale, but only on a small scale for direct human consumption (in the case of sweet corn). However, flour, starch and oil obtained from maize are important base materials in the production of foods. For a large proportion of the maize starch, this involves conversion into syrups or ethanol. The modification in maize line 1507 is of agronomic importance and does not influence the production processes used to process maize into foods and food ingredients. The appli-

---

cant refers to the literature for a description of the production processes normally used for this purpose (Whi95).

---

### 3.3 III History of the organism used as the source of the NF

The source of the novel food plant is a conventionally cultivated maize variety, *Zea mays* Hi-II (respectively the genus, the species and the variety). Two genes of bacterial origin were inserted into the maize genome using genetic modification. These genes have been modified for optimal expression in the plant. The maize plant has a long history of safe use for foods and food ingredients. It is cultivated in many areas throughout the world (Sha88).

---

### 3.4 IV Effect of the genetic modification on the properties of the host organism

This application concerns a maize line into which two new genes, *cry1F* and *pat*, were introduced by the transfer of a single, linear DNA fragment. This was accomplished by using a particle acceleration method to transfer the novel DNA, precipitated onto microscopic tungsten particles, into embryonic maize cells. Transgenic maize plants were regenerated from plant cells whose genome incorporated the new DNA. These were first selected for tolerance to the herbicide glufosinate ammonium, then for the presence of the CRY1F protein. Maize line 1507 was created by crossing one of these plants to an inbred maize line. The intended insertion of new DNA into this plant was accompanied by rearrangements in the flanking DNA.

The *cry1F* gene originates from the bacterium *Bacillus thuringiensis*, subspecies *aizawai*. In order to achieve optimal expression in plant cells, a truncated version of this gene was used for the transformation. Its nucleotide sequence had also been optimised for plant codon usage. The CRY1F protein in the transgenic plant corresponds to the first 605 amino acids of the bacterial protein, with a single amino acid substitution at position 604. This section contains the biologically active part of the protein, that specifically kills certain insect pests by damaging these animals' intestinal cells. Expression of the *cry1F* gene in the transgenic plant is controlled by the *ubiZM1(2)* promoter from maize and the ORF25PolyA terminator from the bacterium *Agrobacterium tumefaciens*.

The *pat* gene, which originates from the soil bacterium *Streptomyces viridochromogenes*, codes for the PAT protein. This protein catalyses the conversion of L-phosphinothricin (L-PPT), the active ingredient of the herbicide glufosinate ammonium, to N-acetyl-L-PPT. L-PPT binds to the enzyme glutamine synthetase and kills susceptible plants by impeding the essential detoxification of ammonia. Since N-acetyl-L-PPT does not bind to this enzyme, expression of the PAT protein renders transgenic plants tolerant

to the herbicide (OECD99). The *pat* gene in the modified maize has been optimised for plant codon usage, to achieve optimal expression. Expression of the *pat* gene in the transgenic plant is under the control of the 35S promoter and the 35S terminator from cauliflower mosaic virus (CaMV).

The applicant analysed DNA from two different generations of maize line 1507 by means of Southern blotting (discussed in detail in section 3.5). These experiments revealed the presence of a single complete copy of the new DNA, the primary insertion. They also revealed an extra copy of part of the *cry1F* gene. This technique was also used to confirm that the DNA of maize line 1507 contains no other parts of the original plasmid, from which the DNA used for the transformation was isolated.

The Committee felt that a more detailed analysis of the genetic modification was required. It therefore asked the applicant to perform additional DNA sequence analysis, including the DNA immediately upstream and immediately downstream of the intended insertion. The primary insertion was indeed shown to consist of a single, virtually complete copy of the DNA of interest. The sequence of approximately 2500 base pairs upstream of the primary insertion and approximately 1600 base pairs downstream of the primary insertion revealed the presence of seven extra fragments of the new DNA. It also identified five fragments that may have originated from chloroplast DNA (see schematic representation in Annex E). Such rearrangements have often been observed, especially following transformations achieved through the use of the ballistic technique (Koh03).

At the Committee's request, the applicant characterised the open reading frames which originate from the presence of extra fragments of the new DNA. If neighbouring DNA sequences were to make transcription possible, then these open reading frames could potentially be translated into fusion proteins. None of the Northern blot, Western blot and RT-PCR experiments carried out by the applicant gave any indication that such fusion proteins had actually formed. On the basis of the DNA sequence, 24 open reading frames were identified spanning the junction sites of fragments of new DNA. All conceivable translation products of these open reading frames were investigated for possible similarities with known toxic or allergenic proteins. Following a broad comparison of the amino acid sequences with a general protein database, no similarities to known toxic proteins were found. Comparisons were also carried out using an allergenic protein database created by the applicant in accordance with FAO/WHO recommendations (FAO01). Searches were carried out for similarities with these known allergens using each 80-amino acid window, and for the occurrence of identical sequences of six, seven or eight contiguous amino acids. None of the possible proteins showed more than a 35% similarity with a known allergen over a length of 80 amino acids. Nor were any identical sequences of seven or eight contiguous amino acids found. However, six instances were found of sequences of six identical amino acids in comparisons with known allergens.

---

The applicant states that random similarities without clinical relevance will often be found when comparing fragments consisting of just six or seven amino acids. For this reason, the applicant sees no indication of possible allergenicity. The Committee feels that this position is acceptable and that it is supported by recent publications (Hil02, Kle02).

In summary, the Committee feels that the molecular biological analysis was very thorough, and that it found no effects of the genetic modification other than the production of both of the intended new proteins, CRY1F and PAT.

---

### **3.5 V Genetic stability of the genetically modified organism (GMO) used as NF source**

The inheritance of glufosinate ammonium tolerance in the progeny of the original transformant was studied in three successive generations of backcrossing to an inbred line. The expected 1:1 segregation of this characteristic was confirmed. This generation of plants was then backcrossed once again to an inbred line, followed by self-pollination. Progeny plants were treated to glufosinate ammonium, thereby selecting only tolerant plants. These were then crossed with a non-transgenic inbred line. The expected 2:1 segregation of tolerant and susceptible plants was confirmed in the resultant progeny. The applicant reports the results of a bio-assay, which showed that the glufosinate-ammonium tolerant plants from this experiment were also resistant to the European Corn Borer.

Plants derived from the first backcross of the original transformant to an inbred line were self-pollinated to produce a new generation of progeny. These plants were subjected to DNA analysis, by means of Southern blotting. The same analytical technique was also applied to plants derived from five successive generations of backcrossing of the original transformant to an inbred line. All of these experiments detected the same hybridising DNA fragments.

These results show that there is a stable transfer of the new DNA to subsequent generations. This fact is confirmed by the results of several field trials (described in the next section) which show that the CRY1F protein is present in plant material derived from maize line 1507.

---

### **3.6 VI Specificity of the expression of the novel genetic material**

During the 1998-1999 season, field trials of 1507 maize were carried out at four locations in Chile. In order to examine the expression of the new genes, samples were taken from different plants at different stages of growth (Iow97, Iow03). These samples were leaves at the V9 stage, pollen, silk and stalks at the R1 stage, mature kernels (R6 stage)

---

and whole plants at the R4 stage, and after drying out in the field. Multiple samples of each of these tissue types were taken at each location. Next, the amounts of CRY1F protein and PAT protein were measured as fractions of the total soluble protein content by means of an ELISA method, which used specific antisera to these proteins. The applicant provides average, minimum and maximum values for each tissue type. The data from the four locations was combined for this purpose. Material from field trials carried out in 1999, at three locations in France and three in Italy, was subjected to comparable analyses. Aside from the above-mentioned tissue types, whole plants at the V9 and R1 stages were also investigated. In addition, samples from maize kernels and whole plants at the R4 stage were also investigated following treatment with glufosinate ammonium. Later, the applicant also submitted data from a third series of field trials that had been carried out in the year 2000, at three locations in France, two in Italy and one in Bulgaria. In these trials, all of the above-mentioned tissue types were investigated. Here, however, both material from plants that had been treated with glufosinate ammonium and material from untreated plants was examined. The results of the latter experiments were also converted into amounts of the new proteins per unit of dry weight of the tissue examined. CRY1F protein was found to be present in all tissue types from 1507 maize, whereas it was not detected in non-transgenic plants. In the year 2000 European field trials, kernels from untreated plants of maize line 1507 were found to contain 2.2 ng of CRY1F protein per mg dry weight. Kernels from plants of maize line 1507 that had been treated with glufosinate ammonium contained 2.5 ng of CRY1F protein per mg dry weight. Conversely, no values for the PAT protein could be determined, since the levels were generally below the limit of detection.

Extracts from leaves, pollen, maize kernels and whole plants from the field trials in Chile were also used for Western blotting using antisera to the CRY1F and PAT proteins. The CRY1F protein was present at detectable levels in all tissue types. Only leaf tissue contained detectable levels of the PAT protein.

---

### **3.7 VII Transfer of genetic material from the GMO**

The applicant states that food products derived from maize can contain DNA. The amount of DNA present depends on the production process used. The Committee states that people ingest large amounts of vegetable and animal DNA every day. It is conceivable that parts of this DNA, in the form of intact DNA fragments, could enter the intestines and be transferred to the resident microflora. Should this occur, there will be little, if any, expression of these genes in practice, as they are not linked to a suitable promoter. If these genes were nevertheless to be expressed, they would, in the vast majority of cases, not provide the bacteria concerned with a competitive advantage and the host would not be disadvantaged. In fact, the only problem that might occur involves the

---

transfer of marker genes for antibiotic resistance, and then only if consumers' intestinal flora are exposed to selective pressure following the use of the antibiotic in question. Maize line 1507 does not contain any genes that confer antibiotic resistance. Therefore, the Committee shares the applicant's viewpoint that no adverse effects are to be expected from the transfer of genetic material from 1507 maize, if such a transfer were to occur.

---

### **3.8 IX Anticipated intake and extent of use of the NF**

Although the maize plant and whole maize kernels are mostly used as animal feed, maize oil and maize starch derived from the maize kernels are used in large quantities in products for human consumption. Syrups and ethanol produced from maize starch are also used on a large scale in the food industry. A great deal of information is available about the use of maize in the production of foods. The new properties of maize line 1507 are of agronomic importance and could be used on a large scale. Although 1507 maize will therefore initially just replace other maize, the possibility cannot be ruled out that the cultivation of the new maize line could lead to a better competitive position owing to a more efficient production of the crop concerned. In that case, the human consumption of products derived from maize (in particular oil and starch) could increase compared to equivalent ingredients derived from other crops. The Committee feels that there are no objections to this from a nutritional viewpoint.

---

### **3.9 X Information from previous human exposure to the NF or its source**

Conventional maize has a long history of safe use both within Europe's borders and beyond. No data are available concerning the previous use of modified maize line 1507.

---

### **3.10 XI Nutritional information on the NF**

The applicant has had nutritional analyses performed on maize from genetically modified plants and control plants. In the application, the results were presented of field trials that had been carried out in Chile (1998-1999), France (1999) and Italy (1999). However, the Committee notes that the values were initially pooled, rather than being reported on a location-by-location basis. The Committee's general opinion is that any analysis of the composition of a modified crop must be based on field trials carried out in several geographical locations that are representative of the crop's commercial production. In order to detect any differences between the modified line and the best comparable control line it is also important that observations be analysed on a location-by-location basis. In response to these comments, the applicant has re-analysed the results

---



of these field trials, this time on a location-by-location basis. The applicant also submitted additional results from field trials that had been carried out in the year 2000, in France, Italy and Bulgaria. At the Committee's request, the applicant made a case to support the view that these locations were indeed representative of the commercial use of this crop.

These experiments all measured the levels of fat, protein, carbohydrates, fibre (ADF and NDF) and ash in maize kernels and maize plants. The maize kernels were also analysed to determine the levels of calcium, phosphorous, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium, zinc, vitamin B1, vitamin B2, folic acid, tocopherols, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid. The amino-acid composition was also determined, as were the levels of the secondary metabolites inositol, raffinose, *p*-coumaric acid, furfural and ferulic acid. Measurements were also made of the levels of the antinutrients phytic acid and trypsin inhibitor. Aside from minor modifications, for which the applicant has made a case, this list of analysed components complies with the recommendations made by the OECD (OECD02).

During the 1998-1999 season, 1507 maize was cultivated at four different locations in Chile, alongside control plants with a comparable genetic background. The 1507 maize was treated with glufosinate ammonium, after which susceptible plants were removed. The trial field at each location was divided up into six blocks, which can be seen as repetitions of the experiment. For the purpose of compositional analysis, samples of the above-ground parts of three plants and of maize kernels from three ears of maize were taken from each block at each location. For each analysed component, the applicant reports the average value for maize line 1507 and for the control maize, as well as a measure of spread. Several statistically significant differences were found, most of which appeared to be randomly distributed between the various trial fields. Remarkably, at every location 1507 maize was found to contain higher levels of linolenic acid than the control plants. In addition, divergent values for nine amino acids were found at one particular location. Nonetheless, all of the measured levels fall within value ranges that have been published in the literature.

The study carried out in France (1999) involved samples of 1507 maize and control plants from six blocks at a single location. In Italy (1999), samples were taken at three locations, each in triplicate. Samples of 1507 maize that had been treated with glufosinate ammonium were also investigated. A large number of measurements of material from the three trial fields in Italy produced divergent values for various amino acids. The remaining differences seemed to be randomly distributed. All of the measured levels fall within value ranges that have been published in the literature.

The applicant supplied new information about field trials that had been carried out in the year 2000, at three locations in France, two in Italy and one in Bulgaria. The trial fields at each location were divided up into three blocks. Each block contained 1507

maize, together with 1507 maize that had been treated with glufosinate ammonium and with control maize. Samples taken from these blocks consisted of three entire plants (R4 stage) and seeds from five ears of maize taken from different plants (R6 stage). Several statistically significant differences were observed. There was no clear pattern in their distribution across the various locations. In addition, the observed differences remained within the range of natural variation reported in the literature. At one location in France, differences were also found between the transgenic maize and the control, in terms of virtually all individual amino acids. Here, consistently lower values were found for the control than for maize line 1507, although this was not the case at other locations.

The applicant also describes an animal feeding experiment with broiler chicks, where the growth of male chicks was investigated. Throughout the study period of 42 days, one group of animals were fed maize kernels from line 1507 while another group were fed maize kernels from a control line with a comparable genetic background. In addition, animals in four control groups were fed maize kernels from commercial lines. In all cases, 54% of the feed provided during the first 20 days consisted of maize kernels. During the subsequent period, this figure was 57%. Each group consisted of 35 animals. No significant differences were found in terms of mortality, body weight gain or food conversion.

In summary, a large number of differences were observed in terms of amino-acid levels in maize kernels from the modified lines and from control plants at a single location in Chile (1998-1999), three locations in Italy (1999) and a single location in France (2000). No such differences were observed in the other field trials. In all cases the levels remained within the range of natural variation reported in the literature. The divergent values for linolenic acid found during the four field trials in Chile also fall within this range. The applicant states that the observed differences can be attributed to natural variation. The Committee takes the view that even if these differences could be ascribed to the genetic modification of maize line 1507, there can be no nutritional objections, given the limited extent of the differences, within the limits of known natural variation. The Committee therefore endorses the applicant's conclusion that 1507 maize does not differ nutritionally from conventional maize. This was also confirmed by the feeding experiment described above.

---

### **3.11 XII Microbiological information on the NF**

Neither the new maize, nor products derived from it, are expected to contain unusual microorganisms or microbial metabolites.

---

---

### 3.12 XIII Toxicological information on the NF

The applicant describes toxicological studies into both new proteins, CRY1F and PAT. For the purposes of an animal study, it was necessary to produce the CRY1F protein in bacteria, since the protein only occurs in limited quantities in transgenic maize plants. In order to achieve efficient production, a fusion protein was expressed in the bacterium *Pseudomonas fluorescens*, consisting of the N-terminal region of the CRY1F protein and the C-terminal region of the related CRY1A(b) protein. This was then subjected to enzymatic splitting, after which a protein was isolated that corresponded to the region of the natural CRY1F protein from amino acid 28 to amino acid 612. The CRY1F protein in maize line 1507 corresponds to the region from amino acid 1 to amino acid 605, with a substitution at position 604. Research carried out by the applicant has shown that these proteins are comparable in terms of their biological activity in susceptible insects, their reactivity with specific antisera in Western blotting, the absence of post-translational glycosylation and the size of the peptides remaining after digestion with trypsin. The CRY1F protein produced in bacteria was shown to lose its biological activity after being incubated at a temperature of 75°C for 30 minutes.

The bacterial CRY1F protein was investigated for possible acute toxicity, using CD-1 mice. Five male mice and five female mice received a dose of 576 mg of CRY1F protein per kg of body weight. The protein was administered orally, as two equal portions separated by an interval of one hour. For this purpose a dose of 5050 mg per kg body weight was used, from a preparation containing 11.4 % of CRY1F protein. None of the animals died nor were any clinical anomalies observed throughout the subsequent 14-day period. Autopsies conducted after this period revealed no macroscopically visible anomalies.

At the Committee's request, the applicant provided further material in support of the safety of the CRY1F protein. This made the case that the known toxic action of the CRY proteins is limited to certain insect species, which have specific receptors for that protein in the cells of the intestinal wall. The applicant points out that various *Bacillus thuringiensis* varieties have been safely used as biopesticides for several decades. This also applies to the subspecies *aizawai*, from which the CRY1F protein was derived. In addition, the applicant has compared the amino-acid sequence of the CRY1F protein with a database of known proteins. The search showed that there were similarities with 181 sequences. Besides sequences from CRY proteins, there were only three other proteins in this list, none of which were toxins. Furthermore, past experiments have confirmed the safety of closely related CRY proteins, such as the CRY1A(b) protein. Genetically modified crops in which proteins such as CRY1A(b) are expressed, have been produced

---

on a large scale in recent years. No adverse effects have been reported in relation to the consumption of foods derived from these crops.

In another study, PAT protein was administered to CD-1 mice. Five male mice and five female mice received a dose of approximately 5000 mg of PAT protein per kg of body weight. The protein was administered orally, as two equal portions separated by an interval of one hour. For this purpose a dose of 6000 mg per kg body weight was used, from a preparation produced in bacteria, which contained 84% of PAT protein. None of the animals died nor were any clinical anomalies observed throughout the subsequent 14-day period. Autopsies conducted after this period revealed no macroscopically visible anomalies. A study was also carried out into the possible oral toxicity of the PAT protein following repeated exposure. This protein was incorporated into a low-protein diet for Wistar rats over a period of 14 days, at concentrations of 0 ppm, 5000 ppm and 50000 ppm. The PAT protein used for this purpose was produced in *E.coli* and had a purity of 98%. The total amount of added protein in these three groups was adjusted to a uniform level by the addition of 50000 ppm, 45000 ppm and 0 ppm soya protein respectively. Each group contained five male and five female rats. The food uptake per group was used to calculate an average PAT intake. The values were 0, 712 and 7619 mg per kg body weight per day for the male animals and 0, 703 and 7965 mg per kg body weight per day for the female animals. A control group was fed a standard diet. None of the animals died nor were any clinical symptoms observed throughout the subsequent 14-day period. At the end of this period, blood and urine samples were taken and the animals were sacrificed. Numerous general and clinical chemistry tests were performed on the blood and urine samples. Organ weights were recorded for all animals. Numerous tissue and organ samples were microscopically examined for animals in the high-dose group, the control group in which only soya protein had been added to the diet and the control group which had been fed on a standard diet. The findings showed no relevant anomalies related to exposure to the PAT protein.

In addition to possible acute or sub-acute oral toxicity, possible allergenicity of the new proteins is another important issue in the food safety assessment of 1507 maize. In order to make the case that the new proteins are unlikely to give rise to allergic reactions, the applicant has supplied data about the source of the new proteins, possible similarities to known allergens and the degree of resistance to breakdown by proteolytic enzymes (COD02). The applicant states that no cases of allergenicity have been reported in relation to the widely occurring soil bacteria (*Bacillus thuringiensis* and *Streptomyces viridochromogenes*) from which the new genes were isolated. A comparison of the amino acid sequences of CRY1F protein and PAT protein with known allergens in a general protein database found no similarities, when a search was made for a window of eight contiguous, identical amino acids. In a subsequent investigation of the CRY1F protein, the applicant used a specific database of 2033 sequences of allergenic

proteins. This study was carried out in accordance with FAO/WHO recommendations (FAO01). No matches of seven or eight identical, contiguous amino acids were identified. However, corresponding sequences of six contiguous amino acids were found in three proteins from the database used. Nonetheless, the applicant does not consider this fact to be relevant, since using a window of six or seven amino acids often produces false positive results, as stated in section 3.4. The CRY1F protein was also compared to the same known allergens, using the FASTA program and an 80-amino acid window. This produced no results with a similarity in excess of 35%, the percentage set by the FAO/WHO as the limit for possible significance. Furthermore, the CRY1F protein was digested in simulated gastric fluid within one minute, at a ratio of one molecule of pepsin to 188 molecules of CRY1F. A subsequent study showed that the CRY1F protein was digested within as little as 15 seconds in simulated gastric fluid containing approx. 0.3% pepsin. The PAT protein was digested within five seconds in simulated gastric fluid containing the same concentration of pepsin. When new proteins are digested so rapidly during *in vitro* digestion experiments with pepsin, it is generally seen as an argument against possible allergenicity.

The above-mentioned studies are based on the assumption that the only difference between maize line 1507 and conventional maize is the presence of the introduced genes, their gene products and the resultant new properties. However, the Committee feels that molecular biological characterisation of the new maize line cannot entirely eliminate the possibility that unintended additional changes might have occurred in the maize genome. Accordingly, it requested the applicant to supplement the studies of the new proteins with a toxicity study using whole maize kernels, to provide an extra guarantee of 1507 maize's safety in terms of long-term human consumption. In response to this, the applicant then submitted the results of a sub-chronic toxicity study in rats (strain CrI:CD(SD)IGS BR). The test groups received 33% or 11% w/w 1507 maize in their feed over a 90-day period. Control groups received 33% or 11% w/w of comparable, non-modified maize in their feed. In the 11% groups, the feed was supplemented with 22% w/w of a commercial non-modified maize variant. Another control group received 33% w/w of this non-modified maize in their feed. The test and control groups contained 12 male and 12 female rats. Body weight and food consumption were measured each day during the first week, and once a week thereafter. Clinical observations were made twice a day for visible symptoms of toxicity and weekly by means of a general examination. Eye examinations and behavioural experiments were conducted at the start and end of the study period. Once the study had been completed, blood and urine samples were taken and the animals were sacrificed. Numerous general and clinical chemistry parameters of the blood and urine samples were measured. The weight of a number of organs was determined. A large number of tissue and organ samples from the animals in the high dose groups for 1507 maize and for comparable, non-modified maize were also

---

investigated microscopically. Any significant differences found were not attributable to the administration of 1507 maize. On the basis of this experimental animal study and of data from FAO/WHO concerning the intake of maize and maize products, the applicant has calculated that, in relation to the highest dose tested, the CRY1F protein's margin of exposure for European consumers has a value of 12. This was based on the maximum measured content of CRY1F in maize kernels, and the sole use of 1507 maize for the production of all maize products consumed. In addition, it was assumed that no CRY1F would be lost during the processing of maize into foods. The latter two assumptions in particular can be said to be extremely conservative, therefore the actual consumption of this protein from maize line 1507 is likely to be substantially lower.

The Committee feels that the applicant's study of the properties of the new proteins, CRY1F and PAT, was appropriately designed and correctly carried out. The results gave no indication of either toxicity or allergenicity. In addition, the results of the subchronic toxicity study in rats carried out by the applicant show that no adverse effects from the consumption of 1507 maize can be expected as a consequence of possible unknown changes in the genome of the plant.

---

## Literature

---

- 
- COD02 Report of the third session of the CODEX ad hoc intergovernmental task force on foods derived from biotechnology. Proposed draft annex on the assessment of possible allergenicity of the draft guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Rome: FAO, 2002.
- EC97 Regulation (EC) 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. Official Journal of the European Communities 1997; L43: 1-6.
- EC97a 97/618/EC: Commission Recommendation of 29 July 1997 concerning the scientific aspects and the presentation of information necessary to support applications for the placing on the market of novel foods and novel food ingredients and the preparation of initial assessment reports under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament of the Council. Official Journal of the European Communities 1997; L253: 1-36.
- EC98 Council Regulation (EC) No. 1139/98 of 26 May 1998 concerning the compulsory indication of the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. Official Journal of the European Communities 1998; L159: 4-7.
- EC00 Commission Regulation (EC) No. 49/2000 of 10 January 2000 amending Council Regulation (EC) No. 1139/98 concerning the compulsory indication on the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. Official Journal of the European Communities 2000; L6: 13-14.
- EC01 Directive 2001/18/EG of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Official Journal of the European Communities 2001; L106: 1-38.
- EC03 Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Official Journal of the European Communities 2003; L268: 1-23.
-

- EC03a Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EG. Official Journal of the European Communities 2003; L268: 24-28.
- FAO96 Biotechnology and Food Safety. Report of a joint FAO/WHO Consultation. Rome: FAO, 1996.
- FAO01 Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. Rome: FAO 2001.
- HCN92 Commissie Toxicologische aspecten van biotechnologisch bereide producten. Productveiligheid bij nieuwe biotechnologie (publication number 1992/03). The Hague: Health Council of the Netherlands, 1992.
- Hil02 Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD et al. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128(4): 280-291.
- Iow97 Iowa State University of Science and Technology. How a corn plant develops. Special report no. 48. Ames, Iowa: reprinted 1997.
- Iow03 Iowa State University of Science and Technology. How a corn plant develops. Special report no. 48. Website [http://maize.agron.iastate.edu/corn\\_grows.html](http://maize.agron.iastate.edu/corn_grows.html), consulted on 21 October, 2003.
- Kle02 Kleter GA, Peijnenburg AA. Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE - binding linear epitopes of allergens. *BMC Struct Biol* 2002; 2(1): 8.
- Koh03 Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P. Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol* 2003; 52(2):247-58.
- OECD93 Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology. Concepts and principles. Paris: OECD, 1993.
- OECD96 OECD Workshop on Food Safety Evaluation. Paris: OECD, 1996.
- OECD98 Report of the OECD workshop on the toxicological and nutritional testing of novel foods. Paris: OECD, 1998.
- OECD99 Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Paris: OECD, 1999.
- OECD00 Report of the task force for the safety of novel foods and feeds. Paris: OECD, 2000.
- OECD02 Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Paris: OECD, 2002.
- Pio01 Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Application for placing on the market of novel foods and novel food ingredients containing genetically modified organisms in accordance with regulation (EC) No. 258/97: 1507 maize. Brussels: Pioneer Overseas Corporation, 2001.
- Pio02 Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Response to the VNV-Committee's questions of 28/06/2001. Brussels: Pioneer Overseas Corporation, 2002.
- Pio03 Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Additional response to the VNV-Committee's questions of 28/06/2001. Brussels: Pioneer Overseas Corporation, 2003.
- Pio03a Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Response to the VNV-Committee's questions of 25/03/2003. Brussels: Pioneer Overseas Corporation, 2003.
-



- Pio03b Pioneer Hi-Bred en Mycogen Seeds. Response to the VNV-Committee's questions of 11/06/2003. Brussels: Pioneer Overseas Corporation, 2003.
- SCF99 Opinion concerning the scientific basis for determining whether food products, derived from genetically modified maize, could be included in a list of food products which do not require labelling because they do not contain (detectable) traces of DNA or protein. Brussels: Scientific Committee on Food of the EU, 1999.
- SSC99 Opinion of the Scientific Steering Committee on microbial resistance. Brussels: Scientific Steering Committee of the EU, 1999.
- Sha88 Shaw, RH. Climatic requirement. P. 3-29 in: Corn and corn improvement, Sprague, GF and Dudley, JW (eds.). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., 1988.
- Whi95 White, PJ and Pollack, LM. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, composition and nutritive values. *Cereal foods world* 1995; 40: 756-762.
- WHO91 Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology. Report of a joint FAO/WHO Consultation. Geneva: WHO, 1991.
- WHO00 Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology. Geneva: WHO, 2000.



- 
- A Request for advice
  - B The committee
  - C EU-procedure
  - D Executive summary of the dossier
  - E Schematic representation of the genetic modification

---

## Annexes



---

## **Request for advice**

---

On 18 August 1999, the Minister of Health, Welfare and Sport wrote as follows to the President of the Health Council of the Netherlands (under reference GZB/VVB 993428):

Since May 1997, Regulation (EC) 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients has been in force in the European Union. Under the Regulation, the safety of novel foods has to be assessed as part of a community procedure.

Following discussions regarding the possibility of the Health Council making such assessments, the State Secretary for Agriculture, Nature Management and Fisheries and I wish the Council to take responsibility for safety assessment for a period of several years during the first phase of implementation of European Regulation (EC) 258/97. It is considered appropriate that the Health Council should initially take on this role because the assessment activities will be of an experimental nature, involving both a new form of assessment (i.e. pre-marketing assessment) and, in many cases, new categories of foodstuff (primarily foodstuffs with a genetically modified basis and functional foods or nutraceuticals). We also feel that if assessments are made by a body with the Council's independent scientific status, this will support the validity of the Netherlands' opinion in the eyes of the European Committee and other member states.

My wish is to make the procedure and the assessment as open and transparent as possible, so as to enhance consumer trust in the safety of novel foods. I would like the Health Council to support this objective by, for example, allowing perusal of the application dossier (insofar as consistent with the need to protect the confidentiality of commercially sensitive information) and publishing the criteria upon which safety assessments are made.

The Minister of Health, Welfare and Sport,  
(signed) dr E. Borst-Eilers

---

## The Committee

- 
- Prof. dr LM Schoonhoven, *chairman*  
emeritus professor of entomology; Wageningen University and Research centre
  - Prof. dr CAFM Bruijnzeel-Koomen  
professor of dermatology/allergology; Academic Hospital Utrecht
  - Ir EJ Kok  
toxicologist; National Institute for Quality Control of Agricultural Products,  
Wageningen
  - Dr CF van Kreijl  
molecular biologist; National Institute of Public Health and the Environment,  
Bilthoven
  - Prof. dr P van der Laan  
professor of statistics; Technical University Eindhoven
  - Dr FM Nagengast  
gastro enterologist; Academic Hospital Nijmegen
  - Dr ir JMA van Raaij  
food physiologist; Wageningen University and Research centre
  - Prof. dr ir G Schaafsma  
professor of nutrition; TNO Nutrition and Food Research, Zeist
  - Prof. dr EG Schouten  
professor of epidemiology; Wageningen University and Research centre
  - Dr GJA Speijers  
toxicologist; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
-

- Prof. Dr WJ Stiekema  
professor of bioinformatics; Wageningen University and Research centre
- Ir R Top, *advisor*  
Ministry of Health, Welfare and Sport; The Hague
- Prof. dr WM de Vos  
professor of microbiology; Wageningen University and Research centre
- Dr ir F van der Wilk, *advisor*  
Committee on Genetic Modification, Bilthoven
- Dr RA Woutersen  
toxicologist; TNO Nutrition and Food Research, Zeist
- Dr CMA van Rossum, *scientific staff member*  
Health Council of the Netherlands, The Hague

Administrative assistance:

CL Vuijst, MSc; Health Council of the Netherlands, The Hague

Layout: J van Kan; Health Council of the Netherlands, The Hague



---

## **EU-procedure**

---

When manufacturers bring novel foodstuffs onto the market, consumer safety has to be ensured. In 1997, a European Regulation (EC97) came into force, laying down the procedure for approving the market introduction of novel foodstuffs. The procedure recognizes various actors. The applicant must decide whether a product is a novel foodstuff, i.e. a substance that has not previously been available for human consumption to any substantial extent within the European Union and is not substantially equivalent to any existing product. (If a foodstuff is substantially equivalent to any existing product, it is sufficient to inform the authorities of its market introduction). Food additives, aromas and extracts are excluded from the provisions of the directive, since they fall within the scope of an established assessment regime. Before marketing a novel foodstuff, the applicant must compile a safety dossier that complies with the Recommendations of the European Commission (EC97a). These Recommendations are based on reports by a number of bodies that have studied the issue of novel foodstuffs, in particular the OECD (OECD93, OECD96) and the WHO/FAO (FAO96, WHO91). The Health Council of the Netherlands has also considered the question earlier (HCN92). Since publication of the EU recommendations, international efforts have been made to clarify and adapt the latest scientific knowledge in the field (FAO01, OECD98, OECD00, SCF99, SSC99, WHO00). In the near future, foods derived from genetically modified organisms will no longer be assessed using this procedure, but according to a new European regulation (EC03).

Having compiled a dossier in line with the guidelines, the manufacturer has to submit it to the competent authority in the country where the product is to be marketed first.

---

This dossier is assessed by the national safety assessment authority. In the Netherlands, this is the Minister of Health, Welfare and Sport, who is advised by the Health Council. The President of the Health Council has created a Committee on the Safety Assessment of Novel Foods (VNV Committee) to advise the minister on behalf of the Council.

On the basis of the scientific state of the art, the committee has to decide whether the information provided by the manufacturer is accurate and complete and whether the manufacturer's conclusions are sound. The committee then draws up a report on its findings for the minister; this report must also comply with the European Recommendation (EC97a, part III). After considering the report, the minister formulates the Netherlands' opinion regarding the foodstuff in question, which is discussed at European level in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health. All other European member states are invited to express a 'second opinion' regarding the dossier and the first opinion. The Standing Committee then arrives at a final judgement. If a dossier is particularly contentious, the European Commission calls upon the Scientific Committee on Food for advice. If consensus still cannot be reached, the issue is referred to the European Council of Ministers.

---

Annex

# D

---

## Executive summary of the dossier

---

## 6. SUMMARY

In accordance with Article 6.1 of the Regulation (EC) No 2258/97, this is a summary of the application for placing on the market of novel foods and novel food ingredients jointly submitted to the competent authority and the food assessment body of The Netherlands by Pioneer Hi-Bred International Inc. and Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC. Pioneer Hi-Bred International Inc., as represented by Pioneer Overseas Corporation, Avenue Tedesco 7, B-1160 Brussels, Belgium, is taking the lead for this submission.

### **Description of the product**

The product consists of foods from maize grain produced from genetically modified *B.t.* Cry1F maize line 1507 and progeny derived from conventional breeding between 1507 maize with any traditionally bred non-GM maize. The term "1507 maize" refers to grain derived from inbreds and hybrids of maize line 1507 including crosses with traditionally bred maize.

The 1507 maize has been genetically modified (GM) to express CRY1F protein for resistance to certain lepidopteran insect pests, such as the European corn borer (ECB), and to express phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT) protein for tolerance to glufosinate-ammonium herbicide.

### **Categorisation of the product**

Based on the recommendations made by the EC Scientific Committee on Food (SCF) for the scientific classification of the novel food (NF) and for the assessment of wholesomeness, 1507 maize belongs to Class 3, Subclass 3.1, under GM plants and their products (Commission Recommendation 97/618/EC of 29th July 1997). Under NF Class 3, the GM plants can be consumed directly as unprocessed foods or after having been processed into foods and food ingredients.

### **Identification and consultation of the essential information requirements**

In the case of 1507 maize and based on Table II of the SCF recommendations, the structured schemes identified to provide guidance for consultation of the essential information requirements for the NF and the assessment of wholesomeness comprise Schemes I to VII and IX to XIII.

#### ***Scheme I: Specification of the novel food (NF)***

Maize (*Zea mays* L.) has well characterised specification belonging to the Gramineae family, the genus *Zea* and the species *Z. mays* ( $2n = 20$ ). The evidence presented in this application confirms that foods derived from 1507 maize can be considered to be substantially equivalent to food products derived from traditionally-bred non-GM maize with no nutritional or toxicological changes. Traditionally-bred maize does not contain any toxic or anti-nutritional factors that need to be controlled by a specification and the characteristics, compositional analyses and safety evaluation of

the genetic modification in 1507 maize does not entail a separate specification of the NF.

A PCR detection method to confirm molecular identity and to ensure that the NF marketed is similar to that evaluated is being developed. The detection method will be submitted to the regulatory authority before the 1507 maize is placed on the EU market for food purposes.

***Scheme II: Effect of the production process applied to the NF***

Foods from 1507 maize will be used and processed as any other commercial maize. The production process applied to maize are well known and have a long history of safe use. The safety evaluation contained in this application for foods derived from 1507 maize provides further verification that no specific conditions of use and processing are required for 1507 maize, and therefore there should be no effects on the existing production processes as applied to the NF.

***Scheme III: History of the organism used as the source of the NF***

The NF, referred to as 1507 maize, is obtained from a maize plant (*Zea mays* L.) which has a long history of safe use. The genetic modification of 1507 maize was carried out by using the particle acceleration method to introduce into maize cells a purified linear DNA fragment containing the cry1F and *pat* gene coding sequences and the necessary regulatory components for expression of CRY1F and PAT proteins in maize. No other gene coding sequences have been inserted during the genetic modification of 1507 maize.

The genetic sequences obtained from the donor organisms and inserted in 1507 maize do not have any pathogenic characteristics. First of all maize as the recipient plant, and donor of the *ubiZM1(2)* promoter, is not a pathogenic organism and has a long history of domestication and safe use as an agricultural food crop.

Secondly, *Bacillus thuringiensis*, donor of the cry1F sequence, has a history of decades of safe use as a pesticide (EPA, 1996). The subspecies *aizawai* is commercially used to control wax moth larvae and various caterpillars, especially the diamondback moth caterpillar (Cornell University, 1996). *Agrobacterium tumefaciens* is the source of the ORF25PolyA terminator for the cry1F gene. No sequences involved in plant pathogenicity are encoded by this transcription terminator.

Thirdly, *Streptomyces viridochromogenes*, donor of the *pat* gene, is a common soil bacterium that produces the tripeptide L-phosphinothricyl-L-alanyl-alanine (L-PPT), which was developed as a non-selective herbicide by Hoechst Ag and there is a history of safe use of the *pat* gene in GM crops (OECD, 1999; see Annex 5). The cauliflower mosaic virus, donor of the CaMV 35S promoter and terminator sequences, is a DNA caulimovirus with a host range restricted primarily to cruciferous plants (ICTV Database, 1998).

#### ***Scheme IV: Effect of the genetic modification on the properties of the host organism***

The 1507 maize has been modified to express CRY1F protein for resistance to certain lepidopteran insect pests, such as the European corn borer (ECB), and to express phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT) protein for tolerance to glufosinate-ammonium herbicide. The particle acceleration method was used to introduce into maize cells a purified linear DNA fragment (PHI8999A; 6235 bp) containing the *cry1F* and *pat* coding sequences and the necessary regulatory components only. The *nptII* gene, conferring resistance to kanamycin, was not part of the purified linear DNA fragment used in the transformation and it is not present in 1507 maize, as confirmed by the molecular analyses carried out with Southern blots.

The insert, PHI8999A, consists of a linear DNA fragment containing we plant optimized and truncated *cry1F* gene and the plant optimized *pat* gene together with the regulatory sequences necessary for their expression in maize plants. The insert was obtained by digesting the plasmid PHP8999 (9504 bp) with the restriction enzyme *PmeI*. This produced the 6235 bp insert, which was subsequently purified by agarose gel electrophoresis and used in the transformation of 1507 maize. The 3269 bp fragment containing the *nptII* gene was discarded and was not used in the transformation.

The amino acid sequence of the core CRY IF protein expressed in 1507 maize is, with the exception of a single amino acid substitution, leucine at position 604, identical to amino acids 1-605 of the native CRY1F protein which is 1174 amino acids long. This change in the coding sequence was made to introduce *aXhoI* restriction site for fusion of sequences encoding the C-terminal domain of the protein that forms the full length protein. The amino acid sequence of the recombinant CRY1F protein (MR872) produced in *Pseudomonas fluorescens* which has been used in toxicological studies consists of a chimeric CRY1F/CRY1A(b) protein with equivalent biochemical characteristics and biological activity to the maize expressed core CRY1F protein (Evans, 1998).

The activity of the PAT protein is specific to catalysing the conversion of L-PPT to N-acetyl-L-PPT. This is an inactive form which does not bind to glutamine synthetase (De Block *et al.* 1987). The expression of the PAT protein in 1507 maize allows the detoxification of ammonia to continue and confers tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. The activity of the PAT protein has been described in detail by the OECD (1999): "Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide" (Annex 5).

Detailed molecular characterization, based on Southern blot analyses, confirms that 1507 maize contains a full-length copy of the DNA insert integrated into the maize genome and an additional copy of the *cry1F* gene (Glatt, 2000; Annex 6).

#### ***Scheme V: Genetic stability of the GMO used as NF source***

The 1507 maize has remained stable as inbreds and hybrids for at least six generations, through crossing and backcrossing to elite inbreds and selfing, as

confirmed by early and late segregation data (BC2F1 and F1 generations, respectively). This evidence, together with the molecular characterization by Southern blotting of the 1507 maize (Scheme IV) and analyses of the expression of CRY1F and PAT proteins (Scheme VI), confirms stable integration of the *cry1F* and *pat* genes in the genome of 1507 maize. These analyses support the conclusion that the *cry1F* and *pat* genes are inherited as Mendelian dominant genes and that the additional copy of the *cry1F* gene is genetically linked to the insert containing the *cry1F* and *pat* genes.

#### ***Scheme VI: Specificity of expression of novel genetic material***

Analyses of expression of the novel genetic material (*cry1F* and *pat* genes) has been carried out at ten locations over two growing seasons: four locations in Chile in 1998-1999, and six locations in France and Italy in 1999. The results obtained from tissue samples from 1507 maize have confirmed specificity of CRY1F protein expression in samples of leaf (V9 stage), pollen, silk, stalk, whole plant (both at V9 and R4 stages), grain and senescent whole plant tissues. The results have also confirmed specificity of PAT protein expression in samples of leaf (V9 stage) and whole plant (V9 stage) tissues. The ELISA results show that CRY1F is expressed in all plant material tested, with significantly lower concentrations in grain than in vegetative tissue. Additionally, Western blot analyses have confirmed that CRY1F and PAT proteins expressed in 1507 maize are of the same molecular weight and immunoreactivity as the microbially-derived proteins. Other than the expected bands for CRY1F and PAT proteins, the Western blots did not show any other bands to indicate either partial or fusion proteins in the 1507 maize tissues.

Comparison of the agronomic performance in terms of grain yield, moisture, accumulated growing degree days to reach 50% pollen shed, accumulated growing degree days to reach 50% silking, grain density, plant height, ear height, early stand count establishment, visual rating of emergence vigour from spike to one-leaf stage, visual rating of vigour at three- to five-leaf stage, stalk lodging, root lodging, dropped ears per plot and top integrity between 1507 maize and non-GM control maize with comparable genetic backgrounds, further confirms that 1507 maize is comparable to non-GM control maize. With the exception of the intended resistance to certain lepidopteran insect pests and tolerance to glufosinate-ammonium herbicide, as derived from the genetic modification, no unexpected phenotypic differences have been observed in 1507 maize. The agronomic data also provides further evidence of the specificity of expression of the novel genetic material in 1507 maize

#### ***Scheme VII: Transfer of genetic material from GMO***

Transfer of genetic material originating from 1507 maize to bacteria is a negligible concern as there is no known mechanism for, or definitive demonstration of, DNA transfer from plants to microbes under natural conditions. In any case, and even if horizontal gene transfer were to take place, transfer of the *cry1F* or *pat* gene from 1507 maize does not represent a risk to human health or animal health.

#### ***Scheme VIII: Ability of the GMM to survive in and colonize the human gut***

This is not applicable as the NF is not a GM microorganism (GMM).

*Scheme IX: Anticipated intake/extent of use of the NF*

Majority of grain and forage derived from maize is used for animal feed and about 8% of EU production is processed for human food products. The evidence provided in the application shows that the inserted genetic material and the newly expressed CRY1F and PAT proteins in 1507 maize are safe to human health. Furthermore, the properties of 1507 maize regarding its nutritional value and compositional characteristics are comparable and substantially equivalent to those of traditionally-bred non-GM maize. Based on this evidence, the anticipated use of 1507 maize derived foods will be no different from that of traditionally bred maize, and any substitution of traditionally bred maize by 1507 maize will not be of any nutritional significance.

*Scheme X: Information from previous human exposure to the NF or its source*

Food products derived from maize have been produced, prepared and consumed by humans for centuries throughout the world. Based on the evidence presented in this application, we conclude that exposure to food products derived from 1507 maize will not give rise to nutritional, microbiological, lexicological and/or allergenicity problems and that it is as safe as exposure to any other food products derived from traditionally-bred non-GM maize.

*Scheme XI: Nutritional information on the NF*

Range of data from compositional analyses of maize grain are provided in the application for the nutritional assessment of 1507 maize. Field studies representative of pertinent conditions and growth stages of the commercial production of maize were conducted on 1507 maize and non-GM control maize. Data from ten different locations over two growing seasons have been analysed: four locations in Chile (1998-1999) and six in the EU (France and Italy, 1999). At the locations in Italy, the trials also included treatments to compare 1507 maize sprayed with glufosinate-ammonium, 1507 maize unsprayed with glufosinate-ammonium, and non-GM control maize. At all locations, the non-GM control maize was of comparable genetic background to 1507 maize.

The compositional data determined the levels of protein, fiber (ADF, NDF), carbohydrates, fat, ash, five different fatty acids, five different minerals, eighteen different amino acids, four different vitamins, five different secondary metabolites and two potential anti-nutrients. The analyses on the composition clearly demonstrated that grain from 1507 maize, unsprayed or sprayed with glufosinate-ammonium, is comparable to grain from non-GM maize and to the published range of composition values in the literature. These analyses support the conclusion that 1507 maize is substantially equivalent to traditionally-bred maize.

In addition, nutritional equivalence between 1507 maize and traditionally-bred maize has been shown in a poultry feeding study where broiler chickens were fed over a 42-day period with diets containing 1507 maize grain or yellow dent grain from non-GM maize. The mortality, body weight gain and feed conversion of the chickens were



compared and no statistically significant differences were observed between chickens fed a diet containing grain from 1507 maize or grain from non-GM maize.

### ***Scheme XII: Microbiological information on the NF***

The NF does not contain any microorganisms and therefore no microbiological information is provided.

### ***Scheme XIII: Toxicological information on the NF***

#### Toxicity

Maize has a long history of use as food in the EU and constitutes a traditional counterpart to 1507 maize that can be used as a baseline to facilitate the toxicological assessment. Maize is not considered to have harmful toxicants and the genetic modification in 1507 maize does not introduce any new toxicants harmful to humans or animals.

The CRY1F protein has specific toxicity against certain lepidopteran insect pests (target organisms), and there is no evidence for CRY proteins originating from *Bacillus thuringiensis* to have any harmful effects on the health of humans and animals (EPA, 1995a; McClintock *et al.*, 1995; EPA, 1996). Furthermore, the potential toxicity of the CRY1F protein to humans and animals was specifically examined in an acute oral toxicology study where CRY1F protein was evaluated for acute toxicity in mice (Kuhn, 1998). The relatively high dose tested did not give rise to any toxicity and therefore the acute LD<sub>50</sub> for CRY1F protein could not be determined other than estimated to be higher than 576 mg CRY1F per kg body weight.

The PAT protein has already been found safe to human health during the assessment of glufosinate-ammonium tolerant maize (OECD, 1999; Annex 5). The *pat* gene was originally obtained from *Streptomyces viridochromogenes* strain Tü494 which has no known toxic or pathogenic potential. The PAT protein is enzymatically active but it has high substrate specificity to the active ingredient of glufosinate-ammonium (L-PPT). A toxicity study consisting of feeding rats with the PAT protein has been carried out (Pfister *et al.*, 1996; Health Canada, 1997). Results from the range of doses tested (up to 50000 mg/kg body weight) showed no adverse effects on the growth or histopathology of the animals. The PAT protein has also been tested in an additional acute toxicity study in mice (Brooks, 2000). As before, the relatively high dose tested did not give rise to any toxicity and therefore the acute LD<sub>50</sub> of PAT protein could not be determined other than estimated to be higher than 5000 mg PAT per kg body weight.

A 42-day long poultry feeding study has also been carried out with grain from 1507 maize and the non-GM control maize with comparable genetics. The results show that mortality, body weight gain and feed conversion of the chickens fed with 1507 maize was similar to chickens fed a standard diet containing yellow dent maize.

#### Allergenicity

The most important factor to consider in assessing allergenic potential is whether the source of the gene being introduced into plants is known to be allergenic (FDA,

1992). Neither *Bacillus thuringiensis* (the source of the *cry1F* gene) nor *Streptomyces viridochromogenes* (the source of the *pat* gene) have a history of causing allergy.

The biochemical profile of the CRY IF and PAT proteins also provides a basis for allergenic assessment when compared with known protein allergens. A database search was compiled by Meyer (1999) using the Wisconsin Genetics Computer Group (GCG) sequence analysis computer program with the keyword "allergen" to search standard DNA and protein sequence databases. Comparison of the 15 most homologous database sequences confirmed that the CRY1F and PAT proteins do not share any significant amino acid sequence homology with known protein allergens.

Furthermore, protein allergens are typically stable to the peptic and tryptic digestion, and to the acid conditions of the human digestive system, which allows them to reach and pass through the intestinal mucosa to elicit an allergenic response. Both CRY1F and PAT proteins are readily degradable in simulated digestive juice, minimising any potential for these proteins to be absorbed by the intestinal mucosa when consumed. The CRY1F protein was nearly completely proteolysed in simulated gastric conditions within one minute at a molar ratio of 188:1 (CRY1F:pepsin) (Evans, 1998). In addition, the immunoblot detection technique has demonstrated that CRY1F is not glycosylated, which is an additional indicator of the absence of allergenic potential in the CRY1F protein. Furthermore, CRY1F loses immunoreactivity after heat processing and it has a history of safe use in microbial pesticides (Evans, 1998). In addition, a study on the heat lability of CRY1F protein at various temperatures showed that CRY1F loses biological activity after exposure at 75°C or greater for 30 minutes (Herman, 2000). The PAT protein degraded to non-detectable levels within 5 seconds after introduction to simulated gastric fluid containing pepsin (Glatt, 1999; OECD, 1999; Annex 5).

Therefore, the *cry1F* and *pat* genes introduced into 1507 maize do not encode for known allergens, and neither the CRY1F nor the PAT proteins share immunologically significant amino acid sequences with known allergens. This together with the heat lability and rapid breakdown of these proteins under digestive conditions, confirms that the CRY1F and PAT proteins should not pose any allergenic risk.

### **Evaluation and conclusion**

The safety evaluation of food products derived from *B.t.* Cry1F maize line 1507, referred to as 1507 maize, presented throughout this application has been carried out following thorough consideration of a series of key parameters that show wholesomeness and substantial equivalence between 1507 maize and traditionally-bred non-GM maize: Southern blot analyses and molecular characterisation, agronomic performance, Mendelian inheritance, protein expression analyses, compositional analyses, nutritional equivalence and lexicological information have demonstrated that food products from 1507 maize are as safe and nutritious as other maize products already on the EU market.

## Schematic representation of the genetic modification

