



BUNDESMINISTERIUM FÜR
GESUNDHEIT UND FRAUEN



TOXIKOLOGIE UND ALLERGOLOGIE VON GVO-PRODUKTEN – TEIL 2B

**Untersuchung von Regelungen zur Sicherheitsbewertung
von gentechnisch veränderten Lebensmitteln in der EU
und den USA**

Armin SPÖK
Sandra KARNER
Susanne STIRN
Helmut GAUGITSCH

MONOGRAPHIEN
Band 164B
M-164B

Wien, 2003

Projektleitung

Helmut Gaugitsch, Umweltbundesamt Wien

Projektkoordination

Armin Spök, Interuniversitäres Forschungszentrum für Technik, Arbeit und Kultur (IFZ) Graz

AutorInnen

Armin Spök, IFZ Graz (Projektkoordination, Kapitel 0, 1 bis 4, sowie 6)
Sandra Karner, IFZ Graz (Kapitel 2 bis 4, sowie 6)
Susanne Stirn, FSP BIOGUM, Universität Hamburg
(Kapitel 5 und 6, Kommentierung des Gesamtberichts)
Helmut Gaugitsch, Umweltbundesamt Wien (Projektleitung)

Satz/Layout

Manuela Kaitna, Umweltbundesamt Wien
Tina Stadler, IFZ Graz

Graphik- und Tabellenbearbeitung

Manuela Kaitna, Umweltbundesamt Wien

Titelbild/Symbolfoto

Manuela Kaitna (*Fotos: Bernhard Gröger*), Umweltbundesamt Wien

Danksagung

Das Umweltbundesamt dankt dem Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit sowie dem Bundesministerium für Gesundheit und Frauen für die Finanzierung der vorliegenden Studie sowie die freundliche Genehmigung zur Veröffentlichung der Arbeit als Monographie des Umweltbundesamtes.

Hinweise

Der erste Teil dieser Arbeit wurde im Jahr 2002 als Monographie M-109 des Umweltbundesamtes unter dem Titel „Toxikologie und Allergologie von GVO-Produkten – Empfehlungen zur Standardisierung der Sicherheitsbewertung von gentechnisch veränderten Pflanzen auf Basis der Richtlinie 90/220/EWG (2201/18/EG)“ veröffentlicht.

Zum vorliegenden Band gibt es einen Band M-164 A mit dem Titel „Toxikologie und Allergologie von GVO-Produkten – Teil 2A – Untersuchung zur Praxis und Empfehlungen zur Standardisierung der Sicherheitsbewertung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln“.

Die Bände M-109 sowie M-164A und B bilden thematisch und inhaltlich eine Einheit, können selbstverständlich aber auch jeder für sich selbst gelesen werden.

Weitere Informationen zu Publikationen des Umweltbundesamtes finden Sie unter: <http://www.ubavie.gv.at>

Impressum

Medieninhaber und Herausgeber: Umweltbundesamt GmbH (Federal Environment Agency Ltd)
Spittelauer Lände 5, A-1090 Wien (Vienna), Austria

Druck: Manz Crossmedia GmbH & Co KG, A-1051 Wien

© Umweltbundesamt GmbH, Wien, 2003
Alle Rechte vorbehalten (all rights reserved)
ISBN 3-85457-693-5

INHALTSVERZEICHNIS

KURZFASSUNG	7
Rechtliche Rahmenbedingungen in der EU	7
Abschätzung des humantoxischen Potentials bei GV-Lebensmitteln	8
Abschätzung des allergenen Potentials bei GV-Lebensmitteln	9
Substanzielle Äquivalenz	10
Sicherheitsabschätzung in den USA	10
EXECUTIVE SUMMARY	12
Regulatory context in the EU	12
Assessment of toxic properties	13
Assessment of potential allergenic properties of GM food	14
Substantial equivalence	14
Risk assessment in the USA	15
1 EINLEITUNG	17
1.1 Motivation und Problemstellung	17
1.2 Projektrahmen und Vorgehensweise	19
1.3 Aufbau der Studie	21
2 TOXISCHES UND ALLERGENES POTENTIAL VON LEBENSMITTELN UND GRUNDLAGEN DER SICHERHEITSBEWERTUNG	23
2.1 Humantoxisches Potential	23
2.2 Allergenes Potential	25
3 TOXIKOLOGISCHE UND ALLERGOLOGISCHE ASPEKTE IM RAHMEN VON EU-REGELUNGEN UND LEITLINIEN	27
3.1 Gentechnikspezifische gesetzliche Regelungen	27
3.1.1 Die Novel Food Verordnung der EU	27
3.1.1.1 Verordnung (EG) Nr. 178/2002	31
3.1.1.2 Empfehlung der EU-Kommission 97/618/EG	32
3.1.2 Vorschlag der EU-Kommission für eine neue Verordnung	36
3.2 Abschätzungskonzepte und Empfehlungen	37
3.2.1 Toxisches Potential	37
3.2.1.1 OECD	37
3.2.1.2 FAO/WHO	38
3.2.1.3 Vergleich der Empfehlungen	39
3.2.2 Allergenes Potential	42
3.2.2.1 IFBC/ILSI	42
3.2.2.2 OECD	43
3.2.2.3 FAO/WHO	44
3.2.2.4 LEHRER et al. (1996)	47
3.2.2.5 Vergleich der Abschätzungskonzepte	49

3.3	Nicht-gentechnikspezifische Regelungen	50
3.3.1	Gesetzliche Regelungen in der EU	50
3.3.2	Gesetzliche Regelungen in Österreich	51
3.4	ZUSAMMENFASSUNG	53
4	DAS KONZEPT DER SUBSTANZIELLEN ÄQUIVALENZ	56
4.1	Etablierung des Konzepts	56
4.2	Regulatorischer Kontext	62
4.2.1	Europäische Union	62
4.2.2	USA	63
4.2.3	Kanada.....	64
4.2.4	Interpretationsformen	65
4.2.4.1	EU	65
4.2.4.2	USA	66
4.3	Kritik und Evaluierung	66
4.3.1	Kritik am Konzept	66
4.3.2	Evaluierung der Praxis	70
4.3.2.1	Studie NOVAK & HASLBERGER (2000)	70
4.3.2.2	Studie SPELSBERG et al. (2000)	72
4.3.2.3	Studie CLARK (2000a).....	74
4.3.2.4	Studie SCHENKELAARS (2001):.....	74
4.3.2.5	UBA/IFZ-Studie (2002).....	76
4.3.2.6	Zusammenfassung der Evaluationsstudien und Schlussfolgerungen	77
4.4	Problem Fütterungsstudien	80
4.5	Problem Vergleichsbasis	81
4.6	Neue Methoden	82
4.7	Zusammenfassung	86
5	SICHERHEITSABSCHÄTZUNG IN DEN USA	88
5.1	Regulierung gentechnisch veränderter Pflanzen in den USA	88
5.2	Überblick über die beteiligten Behörden	88
5.2.1	Das US Department of Agriculture	90
5.2.2	Die Environmental Protection Agency	93
5.2.3	Die Food and Drug Administration	95
5.2.3.1	Heutige Regulierungspraxis	95
5.2.3.2	Vorgeschlagene Änderungen der Regulierungspraxis.....	98
5.2.4	Zusammenarbeit zwischen den Behörden.....	98
5.3	Anforderungen der Gesetzgebung an die Sicherheitsbewertung	99
5.3.1	Gesetzliche Anforderungen des USDA	100
5.3.2	Gesetzliche Anforderungen der EPA.....	100
5.3.3	Gesetzliche Anforderungen der FDA.....	103

5.4	Durchgeführte Untersuchungen der Firmen	104
5.4.1	Herbizidtolerante Sojabohne	105
5.4.2	Hochölsäurehaltige Sojabohne	108
5.4.3	Insekten- und virusresistente Kartoffel	109
5.4.4	Insektenresistenter Mais	112
5.5	Kritik an der Regulierung gentechnisch veränderter Pflanzen in den USA	115
5.5.1	Kritik an der Regulierung durch das USDA.....	115
5.5.2	Kritik an der Regulierung durch die EPA.....	116
5.5.3	Kritik an der Regulierung durch die FDA.....	117
5.5.4	Kritik an der Zusammenarbeit der Behörden.....	119
5.6	Zusammenfassung	119
6	REGULATORISCHER KONTEXT UND REGULUNGSPRAXIS: EU – USA IM VERGLEICH	121
6.1	Toxikologische Sicherheitsbewertung	123
6.2	Allergologische Sicherheitsbewertung	125
6.3	Vergleich mit konventionellen Produkten und substanzielle Äquivalenz	126
7	LITERATUR	128
8	VERZEICHNIS DER GUTACHTEN UND KOMMENTARE	139
8.1	Gutachten für den vorliegenden Band	139
8.2	Kommentare des vorliegenden Bandes	139
9	MITARBEITERINNEN UND MITARBEITER	140
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	141
ANHÄNGE		
Anhang I:	Fließdiagramme der FDA zur Sicherheitsabschätzung neuer Nahrungsmittel	144
Anhang II	Entscheidungsbäume der EU-Empfehlungen 618/97/EG	150

KURZFASSUNG

Die vorliegende Studie beschreibt und vergleicht gesetzliche Regelungen zur Vorgangsweise bei der toxikologischen und allergologischen Sicherheitsbewertung von GVO-Produkten in den EU und den USA sowie diesbezügliche Leitlinien u. a. von OECD und FAO/WHO. Aufgrund des engen Zusammenhangs mit dem Konzept der substanzialen Äquivalenz, werden auch diesbezügliche Regelungen und Leitlinien einbezogen. Bisherige Untersuchungen zur Praxis der substanzialen Äquivalenz werden zusammengefasst. Um die regulatorische Praxis in den USA nachvollziehen zu können, wurden zudem Kurzfassungen von US-Antragsunterlagen miteinbezogen. Diese Studie ist ein Teilergebnis des Projektes „Toxikologie und Allergologie von GVO-Produkten“, das auch die Untersuchungen zur Praxis der Sicherheitsbewertung von gentechnisch veränderten Pflanzen nach der Novel Food Verordnung und die Formulierung von Empfehlungen zur Standardisierung mit einschließt (siehe Endberichtsband „Toxikologie und Allergologie von GVO-Produkten. Untersuchungen zur Praxis und Empfehlungen zur Standardisierung der Sicherheitsbewertung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln“).

Bei der Abschätzung möglicher gesundheitlicher Risiken von Lebensmitteln aus gentechnisch veränderten Organismen (GVO) stehen toxikologische und allergologische Aspekte im Vordergrund. Toxische oder antinutritive Wirkungen können von neuen im GVO exprimierten Proteinen selbst ausgehen – sofern diese im Lebensmittel noch vorhanden sind. Nicht-intendierte Sekundäreffekte der gentechnischen Veränderung könnten aber auch zur vermehrten Bildung von bekannten oder zur Bildung von neuen Toxinen führen, z. B. könnte als Folge einer gesteigerten Enzymaktivität bzw. einer enzymatischen Inhibition die Synthese toxischer oder antinutritiver Komponenten verändert werden.

Bei Proteinen handelt es sich um Einzelstoffe, die mit verfügbaren Methoden der Toxikologie relativ gut untersucht werden können. Für die Abschätzung von Sekundäreffekten in einer gentechnisch veränderten Pflanze (GVP) oder einem Lebensmittel sind diese Methoden jedoch nur bedingt geeignet, da Pflanzen oder Lebensmittel sehr komplexe Stoffgemische sind und aus einer hohen Zahl von Einzelkomponenten bestehen. Deshalb und aufgrund von methodischen Problemen kann eine absolute Toxizität in diesen Fällen nicht ermittelt werden. Es wird daher versucht, durch indirekte Verfahren und einen Vergleich mit konventionellen Pflanzen oder Lebensmittelprodukten zur Abschätzung einer relativen Toxizität zu gelangen.

Proteine können auch allergenes Potential haben. Durch gentechnische Verfahren können Proteine in Lebensmittel gelangen, die aus bekanntermaßen allergenen Organismen stammen oder aus solchen, mit denen bislang keine nennenswerte Exposition in Lebensmitteln stattgefunden hat und somit auch keine Erfahrung vorliegt. Zudem kann ein allergenes Potential – analog wie bei der Toxizität – auch das Resultat von Sekundäreffekten sein, indem beispielsweise ein vorhandenes pflanzenspezifisches Allergen hochreguliert wird.

Rechtliche Rahmenbedingungen in der EU

Lebensmittel aus GVO (GV-Lebensmittel), die innerhalb der EU in Verkehr gebracht werden, müssen derzeit (Stand: März 2003) ein Zulassungsverfahren im Rahmen der Verordnung 258/97 für neuartige Lebensmittel und Lebensmittelzutaten (Novel Food Verordnung) durchlaufen, in welchem mögliche gesundheitliche Risiken geprüft werden. Toxikologische und allergologische Aspekte werden in der Verordnung nicht explizit erwähnt, sind implizit jedoch ein Schwerpunkt dieser Prüfungen.

Zur Orientierung für die Antragsteller und die zuständigen Behörden für die Ausgestaltung der Sicherheitsbewertung können die Empfehlungen der EU-Kommission 97/618/EG herangezogen werden. Darin werden die Untersuchungsaspekte auf toxikologischer und allergo-

logischer Ebene zwar etwas konkreter gefasst, jedoch sind weder Art und Umfang der vom Antragsteller zu erbringenden Informationen und durchzuführenden Untersuchungen, noch Kriterien der Bewertung der Daten hinreichend detailliert festgelegt. Außerdem kommt den Empfehlungen keine rechtliche Verbindlichkeit zu. Aus diesen Gründen werden die Erfordernisse für die allergologische und toxikologische Sicherheitsbewertung zumeist erst im Zulassungsverfahren detailliert.

Eine zentrale Rolle bei der Sicherheitsbewertung von GV-Lebensmitteln kommt dem Konzept der substanziellen Äquivalenz zu, da der Äquivalenz-Status zum einen Art und Umfang der für die Sicherheitsbewertung erforderlichen toxikologischen, allergologischen und ernährungswissenschaftlichen Untersuchungen definiert, zum anderen, ob ein Genehmigungsverfahren nach Artikel 4 oder – im Fall von substanziell äquivalenten Produkten – ein vereinfachtes Anmeldeverfahren nach Artikel 5 erfolgen muss.

Nach einem Vorschlag für eine neue EU-Verordnung für Lebens- und Futtermittel aus GVO soll diese Differenzierung zugunsten eines einheitlichen Verfahren aufgegeben werden. Das Konzept der substanziellen Äquivalenz soll dabei allerdings erhalten bleiben. Die Anträge werden dann auch nicht mehr bei den nationalen Behörden gestellt werden, sondern bei der neu eingerichteten European Food Safety Authority, was eine einheitlichere Beurteilungspraxis mit sich bringen soll. Konkretere Ausführungen zur Bewertung des toxikologischen und allergologischen Risikos sind dem Vorschlag aber ebenfalls nicht zu entnehmen.

Neben gentechnikspezifischen Regelungen können auf dem Weg vom „Acker auf den Teller“ auch zahlreiche nicht-gentechnikspezifische EU-Regelungen zur Anwendung kommen: Harmonisierte Regelungen liegen für den Saatgut-, Pflanzengut- und Sortenzulassungsbe- reich vor, wobei toxikologische und allergologische Aspekte nicht berücksichtigt werden. Für konventionelle Lebensmittelprodukte ist in der EU kein Zulassungsverfahren vorgesehen. Ausnahmen bestehen allerdings z. B. für Lebensmittelzusatzstoffe. Im österreichischen Lebensmittelrecht werden toxikologische Aspekte nur in Zusammenhang mit Mycotoxinen, Rückständen und Aromen erwähnt. Die toxikologische und allergologische Sicherheitsbewertung von GV-Lebensmitteln ist somit auf die gentechnikspezifischen Zulassungsverfah- ren beschränkt.

Abschätzung des humantoxischen Potentials bei GV-Lebensmitteln

Zur Abschätzung des humantoxischen Risikos wird gemäß den Empfehlungen 97/618/EG das Konzept der substanziellen Äquivalenz als Ausgangsbasis herangezogen. Nur wenn keine substanzielle Äquivalenz festgestellt wird, müssen chemische Struktur, chemisch-physikalische Eigenschaften des neuartigen Lebensmittels, Zusammensetzung, Donororganismus und die erwartbare Exposition vor allem gefährdeter Bevölkerungsgruppen berücksichtigt werden. Im Falle einer vollständigen substanziellen Äquivalenz sind keine weiteren Toxizitätstests vorgesehen, im Falle einer partiellen Äquivalenz beschränken sich die weiteren Tests auf die abweichenden Merkmale. Die Empfehlungen beinhalten auch Entscheidungsbäume zur Vorgangsweise bei der Sicherheitsbewertung.

Teilweise konkretere Vorschläge werden im Rahmen von OECD und FAO/WHO Empfehlungen gemacht. Weitestgehend Übereinstimmung zu den EU-Empfehlungen besteht in einigen Eckpfeilern der Sicherheitsbewertung, nämlich der substanziellen Äquivalenz sowie der Berücksichtigung der möglichen Toxizität des neu eingeführten Genprodukts und – infolge von möglichen Sekundäreffekten auf vorhandene Pflanzentoxine – auch der gesamten GVP. Ferner sollen unterschiedliche Anbau- und Herstellungsbedingungen sowie die Exposition spezieller Bevölkerungsgruppen berücksichtigt werden.

Die deutlichsten Unterschiede zwischen den Empfehlungen bestehen in den Erfordernissen zur Untersuchung der neu eingebrachten Proteine im GVO: Toxikokinetische Untersuchun-

gen sowie Tests zur Feststellung subchronischer und chronischer Toxizität, Karzinogenität und Teratogenität werden in den EU-Empfehlungen verlangt. In den FAO/WHO Empfehlungen sind dieselben Tests hingegen nur für neue nicht proteinogene Substanzen vorgesehen, während die OECD keine Vorschläge zu konkreten Tests macht. Die FAO/WHO schlägt auch Sequenzvergleiche mit bekannten Toxinen und Antinutritiva sowie Tests zur Thermostabilität und zum gastro-intestinalen Abbau vor, als auch eine Sicherstellung, dass das untersuchte Genprodukt (meist mikrobiellen Ursprungs) strukturell und funktionell mit dem für den Verzehr bestimmten Protein (pflanzlichen Ursprungs) identisch ist.

Bei der Berücksichtigung des toxischen Potentials des gesamten Lebensmittels besteht weitgehend Übereinstimmung, dass dieses untersucht werden sollte, gleichzeitig wird aber auf die beschränkte Aussagekraft von traditionellen Fütterungsstudien hingewiesen. Die EU-Empfehlungen schlagen zumindest einen 90-Tage-Test vor. Der Einsatz von anderen alternativen Methoden wird in allen Empfehlungen vorgeschlagen.

Abschätzung des allergenen Potentials bei GV-Lebensmitteln

Die Abschätzung des allergenen Potentials wird entlang von Entscheidungsbäumen durchgeführt. Im allgemeinen wird zunächst geprüft, ob das neu eingeführte Protein aus einer bekannten allergenen Quelle stammt oder aus einer Quelle mit der keine diesbezügliche Erfahrung vorliegt. Trifft ersterer Fall zu, soll nach den Empfehlungen 97/618/EG das allergene Potential des neu eingeführten Proteins durch *in-vitro* und *in-vivo* Allergietests (RAST, ELISA, Immuno-Blotting) ermittelt werden. Bei Proteinen, die nicht aus allergen bekannten Quellen stammen, wird empfohlen, das allergene Potential durch Vergleiche mit bekannten Allergenen abzuschätzen. Hierfür können Molekülgröße, Glykosylierungsgrad, Sequenzhomologien und Stabilität im Gastro-Intestinaltrakt herangezogen werden.

Auch OECD, FAO/WHO und das International Food Biotechnology Council (IFBC/ILSI) legen Empfehlungen vor. Die OECD-Empfehlungen sehen gegenüber der bisherigen Praxis umfangreichere Vergleichstudien mit bekannten Allergenen vor: Neben der Aminosäuresequenz sollten auch Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins in den Vergleich miteinbezogen werden. Ebenfalls sollte die Lokalisierung von homologen Sequenzen im Protein berücksichtigt werden. Die OECD-Empfehlungen äußern sich zudem kritisch gegenüber der Aussagekraft von *in-vitro* Verdauungsstudien.

Einzelnen Kritikpunkten versucht ein von der FAO/WHO vorgeschlagener Entscheidungsbaum Rechnung zu tragen. Es werden Tests zu strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten mit bekannten Allergenen vorgeschlagen, und beim Vorliegen negativer Sequenzhomologie hat ein spezifisches und zielgerichtetes Serumscreening unter Berücksichtigung der Auswahl entsprechender Seren, der Möglichkeit posttranslationaler Glykosilierungen und der Anwesenheit von Glykan-Epitopen zu erfolgen. Zudem werden im Sinne einer einheitlichen und nachvollziehbaren Prüfpraxis genaue Anleitungen für die Durchführung der vorzunehmenden Tests gegeben. Es werden bei Proteinen aus nicht allergen bekannten Quellen neben Homologiestudien auch ein gestaffeltes Target Serumscreening und erweiterte Verdauungsstudien empfohlen. Ein „neues“ Protein soll bereits ab einem deutlich geringeren Homologiegrad (> 35 % oder > als sechs aufeinanderfolgende Aminosäuren) als allergen eingestuft und direkten *in-vitro* und *in-vivo* Tests unterzogen werden.

Die IFBC/ILSI Empfehlungen werden bei den Ausführungen über die US Regelungen beschrieben.

Substanzielle Äquivalenz

Der Vergleich eines GV-Lebensmittels bzw. einer GVP mit einem konventionellen Lebensmittel bzw. einer konventionellen Pflanze zur Feststellung der „wesentlichen Gleichwertigkeit“ wurde erstmals 1990 im Rahmen einer FAO/WHO-Experten-Konsultation in den Kontext der Sicherheitsbewertung eingebracht. Seither wurde das auf diesem Vergleich beruhende Konzept der substanziellen Äquivalenz im Rahmen von OECD, FAO/WHO, Codex Commission, Behörden und wissenschaftlichen Komitees weiterentwickelt und konkretisiert. Seit 1993 wurde es in zahlreichen Ländern als Grundlage für die Sicherheitsbewertung neuartiger Lebensmittel und Lebensmittelzutaten etabliert, so z. B. in der EU, den USA und in Kanada.

Der Vergleich von GVP und konventionellen Pflanzen beruht auf morphologischen und agronomischen Merkmalen und der Untersuchung von ausgewählten Inhaltsstoffen. Aus Gründen der Durchführbarkeit ist das Spektrum der untersuchten Inhaltsstoffe sehr begrenzt, und beschränkt sich zumeist auf Makronutrients, bekannte Antinutritiva und Toxine. Der Schluss von dem Vergleich eines solchen Parametersets auf gesundheitliche Unbedenklichkeit insgesamt stößt auf massive Bedenken – vor allem dann, wenn keine oder nicht hinreichende toxikologische und allergologische Untersuchungen durchgeführt wurden und folgen. Mögliche Sekundäreffekte könnten, so die Kritik, auf diese Weise nicht mit hinreichender Sicherheit detektiert werden. „Whole food“ Langzeitfütterungsstudien werden deshalb von den einen gefordert, während andere auf die beschränkte Aussagekraft dieser Tests für eben diese Zwecke hinweisen. Auch die Durchführung von klinischen Tests zur Untersuchung des allergenen Potentials wird verlangt.

Untersuchungen zur praktischen Anwendung des Konzepts in Zulassungsverfahren kritisieren den zu geringen Untersuchungsumfang bei den Inhaltsstoffanalysen und die mangelnde Nachvollziehbarkeit und Schlüssigkeit in der Argumentation. Die sehr unterschiedliche Praxis hinsichtlich Untersuchungsumfang, Methoden und statistischer Auswertung weist deutlich auf (zu) große Interpretationsspielräume hin.

Konkretisierungsbedarf lässt sich beispielsweise bezüglich der Auswahl der Vergleichspflanzen erkennen: Die GVP soll mit einer „möglichst“ isogenen Varietät verglichen werden, die unter den selben Anbaubedingungen wie die GVP kultiviert wurde. Welches Ausmaß an genetischer Homologie nötig ist und wie festgestellte Abweichungen im Vergleich zu gewichten und interpretieren sind, ist jedoch noch unklar. Nicht festgelegt ist auch, auf welcher Verarbeitungsstufe der Vergleich erfolgen soll. In der Praxis erfolgt er meist auf Basis der unverarbeiteten GVP oder des jeweiligen Pflanzenteils.

Als Reaktion auf die vorgebrachte Kritik wurden konkretere Empfehlungen zu Anbaubedingungen und Auswertungsmethoden vorgelegt und u. a. im Rahmen der OECD Konsensus-Dokumente die zu untersuchenden pflanzenspezifischen Inhaltsstoffe aufgelistet. Die Einrichtung von Datenbanken mit Spannbreiten von pflanzenspezifischen Inhaltsstoffen ist im Gange. Zudem werden neue Methoden zur Detektion von Sekundäreffekten und für die Sicherheitsbewertung der nächsten Generation von GVP getestet: Diese Methoden beruhen darauf, komplexe Profile von Inhaltsstoffen wie mRNA, Proteine, Metabolite etc. sichtbar zu machen und Unterschiede in den Profilen zwischen GVP und konventioneller Pflanze zu detektieren. Allerdings sind diese Methoden noch nicht für eine routinemäßige Verwendung geeignet und es müssen noch die Grundlagen erarbeitet werden, die so detektierten Unterschiede auch entsprechend interpretieren zu können.

Sicherheitsabschätzung in den USA

In den USA wird davon ausgegangen, dass gentechnische Methoden an sich nicht riskanter sind, als konventionelle Methoden, deshalb wird auch keine Erfordernis für gentechnik-spezifische Regelungen gesehen. Der Deregulierungsantrag beim US Department of Agriculture

entspricht in etwa dem Antrag auf Inverkehrbringen nach Teil C der Richtlinie 90/220/EWG (2001/18/EG) und ermöglicht den kommerziellen Anbau von GVP. GV-Lebensmittel fallen unter die Zuständigkeit der Food and Drug Administration (FDA) und bei schädlingsresistenten Pflanzen auch der Environmental Protection Agency (EPA).

Eine toxikologische Sicherheitsbewertung wird im letzteren Fall noch vor der FDA von der EPA durchgeführt. Diese beruht auf Sequenzvergleichen der eingebrachten Proteine mit bekannten Toxinen, *in-vitro* Verdauungsstudien, Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des pestizid-wirkenden Proteins und akuten oralen Toxizitätsstudien. Wenn auf Basis dieser Tests eine langfristige Wirkung angenommen werden kann, werden auch subchronische und chronische Toxizitätstests verlangt.

Im Gegensatz zur EU existiert in den USA für GV-Lebensmittel keine generelle Zulassungspflicht. Freiwillige Konsultationen mit der FDA werden jedoch nicht zuletzt aufgrund des strengeren Haftungsrechts in den USA von den Herstellern bereitwillig in Anspruch genommen. GV-Lebensmittel müssen in den USA nur dann zugelassen werden, wenn sie nicht als substanziiell äquivalent oder als „generally recognized as safe“ (GRAS) eingestuft worden sind. Sowohl die rekombinante DNA selber als auch ihre Genprodukte gelten als GRAS, es sei denn sie stellen eine in Lebensmitteln ursprünglich nicht vorhandene Substanz dar oder weichen erheblich von den vorhanden Komponenten ab.

Das Konzept der substanziiellen Äquivalenz wird in den USA allerdings unterschiedlich zur EU und zu den OECD-Empfehlungen von 1996 interpretiert: Im Gegensatz zur EU können Produkte, die rekombinante DNA bzw. davon abgeleitete Proteine enthalten oder veränderte Inhaltsstoffe, z. B. eine veränderte Fettsäurezusammensetzung aufweisen, als substanziiell äquivalent eingestuft werden, wenn Erfahrungen mit Lebensmitteln bestehen, die diese Fettsäuren beinhalten. Substanziielle Äquivalenz liegt nur dann nicht vor, wenn allergene Proteine übertragen wurden, eine erhöhte Konzentration von Toxinen festgestellt wurde oder eine veränderte Nährstoffzusammensetzung im Vergleich zu bisherigen Lebensmitteln vorliegt. Entsprechend dieser weiten Interpretation wurde allen bisher in den USA kommerzialisierten GVP substanziielle Äquivalenz attestiert.

Untersuchungen zum allergenen Potential müssen laut FDA dann erfolgen, wenn das Produkt des eingeführten Gens oder der Donor als allergen bekannt ist. Bei der allergologischen Sicherheitsbewertung wird in den USA das IFBC-Schema favorisiert, das bei Proteinen aus allergenen Quellen eine andere Vorgangsweise vorsieht als die entsprechenden Schemata der EU. In den USA wird bezüglich des Donors noch weiter zwischen „commonly allergenic“ und „less commonly allergenic“ unterschieden.

Bei Proteinen, die aus Quellen stammen, welche als allergen gelten, wird in beiden Schemen zuerst ein *in-vitro* Allergietest empfohlen (RAST, ELISA, Immuno-Blotting). An diesen schließt ein Skin-Prick Test an. Ist der Skin-Prick Test positiv, wird in beiden Schemen eine Kennzeichnung empfohlen. Ist dieser negativ, dann erfolgt im US-Schema ein Double-Blind Placebo-Controlled Expositionstest (DBPCFC), im EU-Schema eine *in-vitro* Charakterisierung auf Basis von Homologie und Proteinestabilität. Bei negativem Ergebnis wird in beiden Fällen eine Markteinführung, bei positivem eine Kennzeichnung empfohlen.

Für Proteine aus einer „less commonly allergenic“ Quelle wird im US-Schema eine verkürzte Vorgangsweise empfohlen: Zeigt sich im *in-vitro* Immunoassay keine Reaktivität, kann auf weitere immunologische Versuche (Skin-Prick Test, DBPCFC) verzichtet werden. Eine Kennzeichnung wird aber jedenfalls empfohlen.

Für ein Protein aus einer Quelle, die nicht als allergen bekannt ist, ist die Vorgangsweise in beiden Konzepten ähnlich und basiert auf Sequenzhomologie und Verdauungsstabilität.

EXECUTIVE SUMMARY

The study describes and compares regulations of and procedures in toxicological and allergological risk assessment of GM food in the EU and the USA as well as guidelines from e. g. OECD and FAO/WHO. Due to its major role in risk assessment regulations and guidelines pertaining the concept of substantial equivalence are also included. A summary will be provided what is known so far about how the concept is applied. In order to trace the regulatory practice in the US summaries of US applications are also taken into account. The study is part of the project “Toxicology and Allergology of GMO Products” which also included both investigations on the practice of risk assessment on genetically modified plants according to the Novel Food Regulation and recommendations for further standardizing of risk assessments.

Toxicological and allergological aspects are probably the most eminent part in the assessment of potential health risks of food derived from genetically modified organisms (GMOs). Proteins introduced via gene transfer might themselves have toxic or anti-nutritive properties – in case that they are still present in the final food product. In addition, the modified plant itself could exhibit toxic properties. As a result of non-intended secondary effects of the genetic modification, plant toxins might be expressed at a higher rate or so far unknown toxins might be synthesized. E. g. the synthesis of toxic compounds or anti-nutrients could be changed as a result of both increased enzyme activity and enzyme inhibition.

The toxicity of proteins can in principle be assessed by standard toxicity testing. In order to test for secondary effects in a genetically modified plant (GMP), however, these methods are of rather limited applicability. In the former a single compound, in the latter a highly complex mixture comprising a large number of compounds has to be assessed. Since absolute toxicity cannot not be assessed with whole plants or food, a relative toxicity is estimated by application of indirect approaches and by comparison to a conventional counterpart (food or plant).

Proteins could also exhibit allergic properties. Proteins originating from organisms which are known to cause allergic reactions or from organisms with no preceding exposure in food might be introduced into a food stuff. Similar to what is mentioned above allergic properties could probably appear as result of secondary effects, e. g. in case of upregulation of a plant allergen.

Regulatory context in the EU

In order to introduce food originating from GMO (GM food) into the EU market the product has to be approved in the course of an authorization procedure – presently (status: March 2003) according to Regulation 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients (Novel Food Regulation). This procedure also includes an assessment of potential health risks. Toxicological and allergological aspects are not mentioned in the Regulation, but are implicitly a focus of the assessment.

Commission Recommendation 97/618/EC was issued to give further guidance for applicants and authorities as well. Toxicological and allergological aspects are thereby put into more concrete terms. However, the Recommendation does not specify in sufficient detail the requirements for data and testing, nor the criteria that should be used in the assessment of the data. As a matter of the legal status of the Recommendation, applicants are not obliged to comply. Hence, the requirements are being put into concrete terms in the course of the authorization procedure, only.

The extent of toxicological and nutritional testing of GM food largely depends on the degree of substantial equivalence. Instead of passing through the authorization procedure according to Article 4 GM food deemed to be substantial equivalent can be introduced by a simplified

notification procedure according to Article 5. The concept of substantial equivalence therefore plays a major role in risk assessment.

According to the EU Proposal for a Regulation on genetically modified food and feed this distinction will be abandoned in favour of a consistent authorization procedure. Nevertheless, the concept of substantial equivalence will still be part of the new Regulation. Applications will no longer be submitted to national competent authorities but to the newly established European Food Safety Authority. This should result in a more consistent assessment practice. However, the Proposal does not specify any details on toxicological or allergological risk assessment.

Beyond regulations that are specifically focusing on products resulting from genetic engineering techniques harmonised regulations are covering the placing on the market of seeds, propagating material and new plant varieties. However, these regulations do not consider toxicological and allergological aspects. Conventional food does not need to be authorized or notified at all. Excepted from this general principle are e. g. food additives. The Austrian Food Law considers toxicological aspects only in case of mycotoxins, residues and flavours. As a consequence, toxicological and allergological risk assessment of GM food is essentially confined to GMO regulations.

Assessment of toxic properties

The assessment procedure is based on the concept of substantial equivalence. Only in case the product is not deemed substantial equivalent chemical structure, physico-chemical properties, composition of the food, donor organism, and exposure – especially of particularly vulnerable groups – has to be considered. In case of total substantial equivalence no further toxicity testing is considered necessary. In case of partial substantial equivalence, further testing is confined to the novel traits of the GMO. The EU Recommendation also includes flow sheets in order to guide the assessment procedures.

OECD and FAO/WHO guidelines specify some more details. Considering some major aspects of risk assessment these guidelines are largely in accordance with the EU Recommendation: the use of substantial equivalence, the need to consider toxicity of both the newly introduced protein and – regarding to known plant toxins – the whole GMP; different schemes of both cultivation and manufacturing should be considered as well as the possible exposure of particularly vulnerable groups.

The most distinct differences can be found in the requirements for analysis of the newly introduced gene products: toxicokinetics, chronic and sub-chronic toxicity, carcinogenicity, teratogenicity are suggested in the EU Recommendation. The FAO/WHO guideline, in contrast, is suggesting these tests for novel non-protein substances only. FAO/WHO proposes sequence comparisons to known toxins and anti-nutrients, thermostability and digestibility studies. Furthermore, evidence should be provided that the gene product investigated (mostly of microbial origin) is structurally and functionally identical to the one which will eventually be consumed (of plant origin).

The EU-Recommendation and the OECD and FAO/WHO guidelines agree that potential toxic properties of the whole plant should be investigated. It is however, stressed that conventional feeding studies are of limited value. Still, the EU Recommendations suggest to carry out at least a 90-day feeding study. Alternative methods are proposed in the Recommendation and in all guidelines.

Assessment of potential allergenic properties of GM food

The assessment of allergenic properties is based on decision tree approaches. Firstly, it is usually investigated, whether or not the donor organism is known to be allergenic. According to the EU Recommendation *In-vitro* and *in-vivo* tests (RAST, ELISA, immunoblotting) should be applied if the donor is known to be allergenic. If the donor organism is not known to be allergenic the potential allergic properties should be investigated by comparison to known allergens, considering molecular weight, glycosylation, sequence homology, and stability in the gastrointestinal tract.

OECD, FAO/WHO, and the International Food Biotechnology Council IFBC/ILSI issued guidelines as well. The OECD recommendations propose extended comparisons to known allergens: apart from amino acid sequence comparisons also secondary and tertiary structure should be taken into account. The localisation of homologous sequences should also be considered. The validity of *in-vitro* digestibility studies is however questioned.

Some of these criticisms are taken into account in a subsequent FAO/WHO decision tree. Comparative studies of functional and structural characteristics to known allergens are recommended. In case there is no homology whatever, the protein should be subsequently tested by serum screening. In doing so the selection of sera is crucial and possible post-translational glycosylation has to be considered as well. More detailed guidance is given on the testing in order to ensure a more consistent and verifiable procedure. Proteins originating from donors not known to be allergenic should be subjected to homology studies and a progressive serum screening as well as extended digestibility studies. Proteins considered as novel and exceeding a homology of 35 % or more than six subsequent amino acids respectively should be classified as allergenic and subjected to direct *in-vitro* and *in-vivo* testing.

Substantial equivalence

The idea to compare GM food or GMP to conventional counterparts in order to estimate their “substantial equivalence“ was introduced into the context of risk assessment in a FAO/WHO expert consultation in 1990. Ever since the concept of substantial equivalence has been developed further in the framework of OECD, FAO/WHO, Codex Committee, competent authorities, and scientific committees. Since 1993 the concept has been established as a basis for risk assessment of novel food and food ingredients in many countries such as EU, USA and Canada.

Comparing GMP and conventional counterparts is based on morphological and agronomical characteristics as well as a set of plant compounds. For reasons of feasibility the range of compounds investigated is however, limited to macro nutrients, known anti-nutrients, and plant toxins. Grave doubts have been raised on the actual safety of a GM food if safety is concluded on the basis of such a comparative analysis if no toxicity and allergenicity testing is performed at all or if toxicity testing was not deemed sufficient **and** no tests are going to be performed. Furthermore, secondary effects would hardly be detected by this approach anyway. Some critics, therefore, call for long-term whole-food feeding studies while others emphasise the limited validity of these test in this context. Others demand clinical studies in order to properly assess the allergenic properties.

Studies on how the concept is applied in the course of risk assessment procedures reveal both lacking validity and conclusiveness in the line of reasoning and criticise also the limited range of compounds analysed. Furthermore, a lack of consistency in the range of testing and methods applied as well as in statistical evaluation could be shown. This points to the wide margins of interpretation of the requirements.

This could also be seen in terms of selecting the conventional counterpart. Usually a variety that is as isogenic to the GMP as possible and cultivated under identical conditions should be used for comparison. The extent of genetic homology needed is however still a matter of dispute as well as the particular consequences if significant differences will be detected. It is also still not clarified what stage of the food manufacturing process would be relevant for the comparative analysis. So far, the unprocessed plant or the respective part of the plant is used in practice.

As a response to this criticism more detailed recommendations in terms of cultivation and methods applicable for statistical evaluation were given and OECD Consensus Documents specifying sets of plant-specific compounds to be analysed were issued. Databases are going to be established compiling data on the ranges of plant-specific compounds. Besides, novel methods are being tested which will probably be more appropriate to detect any secondary effects and which might prove to be very useful in the course of risk assessment of second generation GMPs. By the use of such methods profiles of complex mixtures of compounds e. g. mRNA, proteins, metabolites can be visualised and subjected to further comparative analysis between the GMP and conventional counterparts. However, these methods are still not applicable in routine testing and the scientific basis is still to be developed in order to properly interpret any detected differences.

Risk assessment in the USA

In the USA genetic engineering is not considered to pose higher risks compared to conventional breeding methods. Hence, there is no need to introduce regulations specifically dealing with products derived from these techniques. Upon application the US Department of Agriculture could assign a non-regulated status which is a prerequisite for commercial cultivation. This largely corresponds to an approval according to Part C of Directive 90/220/EEC (2001/18/EC). GM food is regulated by the Food and Drug Administration (FDA) and in case of pest tolerant crops also by the Environmental Protection Agency (EPA).

In case of GMP containing plant-pesticides the assessment of potential toxic properties is carried out by EPA first. This assessment comprises sequence comparisons to known toxins, *in-vitro* digestibility studies, characterisation of the mechanism of the plant-pesticide, and testing of acute oral toxicity. If on the basis of these studies a long-term effect could be assumed then additional sub-chronic and chronic toxicity testing will also be required.

In contrast to the situation in the EU GM foods do not require to authorization. Manufacturers, however, usually take advantage of voluntary consultations with FDA – not least because of the strict US liability regime. GM food is only subjected to an authorisation procedure if it is deemed to be neither substantial equivalent nor “generally recognized as safe“ (GRAS). Recombinant DNA as well as their respective gene products are generally classified as GRAS, unless they are considered as novel compounds to food or as significantly different from compounds already present in foods.

The US interpretation of the concept of substantial equivalence is however quite different compared to the EU and to the OECD Guidelines of 1996. Products containing recombinant DNA, or their respective gene products are considered to be substantial equivalent. This is also true for products containing altered compounds, e. g. modified composition of fatty acids, if there is preceding experience with these particular fatty acids in foods. A product is not considered substantial equivalent only if the proteins introduced exhibits allergenic properties, if an increased level of toxins was detected or if the composition of the food stuff was modified in comparison with foods already on the market. Hence, all GMP commercialised in the USA so far, are considered substantial equivalent.

According to the FDA possible allergenic properties have to be tested if either the protein itself or the donor is known to be allergenic. In the US the IFBC decision tree is preferred, which encompasses different procedures in case of allergenic sources compared to the decision trees used in the EU. In contrast to the EU the US scheme distinguishes further between “commonly allergenic” and “less commonly allergenic” donor organisms.

In case of proteins from allergenic donors, both schemes suggest *in-vitro* tests (RAST, ELISA, immunoblotting) followed by an *in-vivo* skin-prick test. If the skin-prick test turns out to be positive, labelling is recommended. If the test leads to negative results, the US scheme proposes a Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenge (DBPCFC), whereas the EU scheme suggests *in-vitro* characterisation on the basis of both homology and stability studies. In case of a negative result both schemes endorse placing on the market, in case of a positive result labelling is recommended.

In case of proteins from less commonly allergenic donors the US scheme enables a shortcut procedure. In case of a negative immune reactivity in the *in-vitro* immunoassay no further immunological testing (Skin-Prick test, DBPCFC) is required. Still, labelling is recommended.

If the donor is not known to be allergenic, the proposed procedures are similar in both the US and the EU schemes and comprise sequence comparisons to known allergens and digestibility studies.