

Runderlactoferrine

Bovine lactoferrin

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

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

aan/to:

de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport/
the Minister of Health, Welfare and Sport

Nr. 2010-02 BNV, Den Haag, 31 maart 2010
No. 2010-02 BNV, The Hague, 31 March 2010

Inhoudsopgave

Samenvatting en conclusies	4
1 Inleiding	6
2 Volledigheid en juistheid van het dossier	7
2.1 Administratieve gegevens	7
2.2 Algemene beschrijving van het voedselingrediënt	7
2.3 Classificatie van het voedselingrediënt voor beoordeling	7
2.4 Informatievergaring over het voedselingrediënt	7
2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager	8
2.6 Overige beoordelingen	8
2.7 Etiketteringsvoorstel van de aanvrager	8
3 Interpretatie en evaluatie van de voorgelegde gegevens	10
3.1 I Specificatie van het nieuwe voedselingrediënt	10
3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocédé op het voedselingrediënt	11
3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedselingrediënt gebruikte organisme	12
3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedselingrediënt	12
3.5 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedselingrediënt of zijn bron	14
3.6 XI Informatie over de voedingswaarde van het voedselingrediënt	17
3.7 XII Microbiologische informatie over het voedselingrediënt	19
3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedselingrediënt	19
BIJLAGEN	
Literatuur	44
De commissie	47
Samenvatting van het dossier	49

Contents (English translation)

Executive summary	25
1 Introduction	27
2 Completeness and accuracy of the dossier	28
2.1 Administrative details	28
2.2 General description of the food ingredient	28
2.3 Classification of the food ingredient for assessment	28
2.4 Collection of information regarding the food ingredient	28
2.5 Brief summary provided by the applicant	29
2.6 Other assessments	29
2.7 The applicant's labelling proposal	29
3 Interpretation and evaluation of the data submitted	30
3.1 I Specification of the novel food ingredient	30
3.2 II Effects of the production process applied to the food ingredient	31
3.3 III History of the organism used as the source of the food ingredient	32
3.4 IX Anticipated intake and extent of use of the food ingredient	32
3.5 X Information from previous human exposure to the food ingredient or its source	34
3.6 XI Nutritional information on the food ingredient	37
3.7 XII Microbiological information on the food ingredient	38
3.8 XIII Toxicological information on the food ingredient	39
APPENDICES	
Literature	44
The Committee	47
Summary of the dossier	49

Samenvatting, conclusies en aanbevelingen

De aanvrager, TNO Kwaliteit van Leven, heeft namens de producent DMV International een veiligheidsdossier ingediend voor runderlactoferrine, een eiwit afkomstig van koemelk. De aanvrager wil runderlactoferrine breed toepassen als voedselingsrediënt in allerhande levensmiddelen. Het dossier met productinformatie is voorgelegd aan de commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen ("de commissie"). Het nieuwe ingrediënt bevat tenminste 92 % runderlactoferrine in de natuurlijke vorm, naast kleine hoeveelheden andere koemelkeiwitten. De veiligheid van het productieproces en de kwaliteit van het product zijn gewaarborgd.

Koemelk bevat kleine hoeveelheden runderlactoferrine. Volgens de commissie krijgt men met de dagelijkse voeding echter nauwelijks runderlactoferrine in de natuurlijke vorm binnen, omdat het gedenatureerd wordt tijdens de gebruikelijke processen in de zuivelindustrie.

De aanvrager stelt voor om runderlactoferrine toe te voegen aan gewone levensmiddelen (waaronder producten voor peuters en kleuters) en verschillende typen bijzondere voeding (waaronder zuigelingen-, medische en sportvoeding). Het dossier bevat geen concrete aanbeveling voor het dagelijks gebruik van runderlactoferrine, maar de aanvrager verwijst naar de gemiddelden van de geschatte inname bij verschillende leeftijdsgroepen van de bevolking. Hiervoor werd de inname berekend op basis van Nederlandse voedselconsumptiegegevens uit 1998-1999. Het blijkt dat de gemiddelde inname van runderlactoferrine bij zuigelingen jonger dan zes maanden gemiddeld 1,2 gram per dag zal zijn. Voor zowel zuigelingen ouder dan zes maanden als kinderen van één tot 18 jaar schat de aanvrager de gemiddelde consumptie van runderlactoferrine op 1,9 gram per dag. Voor volwassenen bedraagt dit 1,4 gram per dag. In de bevolking ouder dan één jaar varieert de inname bij grootgebruikers (het 95^e percentiel) van 2,7 tot 4,2 gram, afhankelijk van de onderzochte leeftijdscategorie.

De vertering van runderlactoferrine lijkt niet essentieel te verschillen van die van andere eiwitten in onze voeding. Wel lijkt runderlactoferrine relatief goed bestand tegen afbraak in het maag-darmkanaal. Informatie over absorptie bij mensen ontbreekt.

In vergelijking met de totale eiwitinname komt het beoogde gebruik van runderlactoferrine overeen met 1-4 % voor mensen ouder één jaar en is het voor zuigelingen iets hoger. Het nieuwe ingrediënt bevat ijzer met een maximum van 0,25 mg per gram. Volgens de commissie heeft de ijzerinname door consumptie van runderlactoferrine geen nadelige gezondheidseffecten, ook niet voor grootgebruikers van de voorgestelde producten.

Bij proefdieren die met runderlactoferrine werden behandeld zijn geen nadelige effecten waargenomen. De teststof in de toxicologische onderzoeken is, hoewel afkomstig van een andere firma, volgens de commissie representatief voor het op de markt te brengen product van DMV International. De aanvrager verstrekt de resultaten van acute en subchronische onderzoeken met ratten waarbij runderlactoferrine direct in de maag werd toegediend. Op basis van de langste testperiode van 13 weken is de 'NOAEL'-waarde voor runderlactoferrine vastgesteld, te weten 2000 mg/kg bw/d overeenkomstig de hoogst geteste dosis. Runder-

lactoferrine was niet mutageen in een zogenoemde Ames-test. Uit de innameschatting van de aanvrager blijkt dat zuigelingen per kg lichaamsgewicht het meeste runderlactoferrine binnen krijgen. De blootstelling in deze groep is gemiddeld 210 mg/kg bw/d, dus ongeveer een factor 10 lager dan de hoogst geteste dosis bij ratten. Volgens de commissie is het niet aannemelijk dat baby's het voorgestelde consumptieniveau zullen overschrijden. Ook gezien de aard van het ingrediënt vindt de commissie deze veiligheidsmarge voldoende. Dit is verder onderbouwd met de resultaten van klinisch onderzoek met DMV's runderlactoferrine. Het blijkt dat de ijzerhuishouding, groei en gezondheid van zuigelingen niet nadelig wordt beïnvloed als gedurende het eerste levensjaar runderlactoferrine wordt geconsumeerd in hoeveelheden die vergelijkbaar zijn met die in de huidige aanvraag. De commissie stelt vast dat de veiligheidsmarges voor de andere leeftijdsgroepen van de bevolking uiteenlopen van 10 tot 50, gebaseerd op de geschatte inname van grootgebruikers (het 95^e percentiel). Ook zijn in het dossier de resultaten van verscheidene onderzoeken bij volwassenen en kinderen beschreven. Hoewel het meeste onderzoek is uitgevoerd bij patiënten en niet was opgezet om de veiligheid te evalueren, heeft de commissie geen aanwijzingen dat runderlactoferrine schadelijk is voor de gezondheid.

De omvang van het huidige gebruik van voedingssupplementen is onbekend. De commissie vindt het belangrijk dat bij een ingrediënt waarmee levensmiddelen worden verrijkt, dit gebruik zorgvuldig dient te worden afgewogen tegenover het gebruik van dezelfde stof in voedingssupplementen. Indien aangenomen wordt dat dit laatste een verdubbeling van de gemiddelde dagelijkse runderlactoferrine tot gevolg heeft, dan is er gezien de veiligheidsmarges voor volwassenen geen reden om voedingssupplementen waar runderlactoferrine aan is toegevoegd, te weren. Voor (jonge) kinderen vindt de commissie dit lastiger af te wegen, maar ook dan is er nog sprake van een veiligheidsfactor van ongeveer 10 ten opzichte van de hoogst geteste dosis bij ratten.

De aanvrager beschouwt runderlactoferrine niet als een belangrijk allergeen eiwit en meent dat het geen rol speelt bij het ontstaan van allerlei auto-immuunziekten. De commissie is niet bezorgd dat runderlactoferrine, mits adequaat gelabeld als koemelkeiwit, nadelige immunologische effecten zal hebben.

Op basis van gegevens over de aard van het ingrediënt en de voedingskundige informatie, in combinatie met de resultaten van beschikbare onderzoeken bij mensen en proefdieren concludeert de commissie dat runderlactoferrine veilig kan worden toegepast als voedselingrediënt voor zuigelingen. Ook voor volwassenen en kinderen ouder dan één jaar is de veiligheid van het nieuwe voedselingrediënt voldoende onderbouwd bij het voorgestelde gebruik. Bij haar eindoordeel heeft de commissie ook stilgestaan bij het feit dat de aanvrager voorstelt een grote diversiteit van producten te verrijken met runderlactoferrine. Als dit wordt toegelaten betekent het dat er melkeiwitten aan producten gaan worden toegevoegd die eerder vrij waren daarvan. Op het etiket van zulke producten moet niet alleen de aanwezigheid van lactoferrine maar ook de aanwezigheid van melkeiwit als mogelijk allergeen worden vermeld. De commissie benadrukt dat de garantie voor de veiligheid van deze nieuwe producten voor consumenten met een koemelkallergie afhankelijk is van het juist toepassen en opvolgen van de etiketteringsverplichtingen voor bekende allergenen.

1 Inleiding

Het Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen (BNV) van het Agentschap voor het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen adviseert de minister van VWS over de veiligheid van nieuwe voedingsmiddelen. Deze advisering is onderdeel van de Europese toelatingsprocedure voor nieuwe voedingsmiddelen die is vastgelegd in Verordening 258/97 (EC97). Dit rapport is het verslag van een zogenoemde eerste beoordeling volgens deze procedure, inzake de veiligheid voor de consument van het voedsel ingrediënt 'runderlactoferrine'. Volgens de aanvrager 'TNO Kwaliteit van Leven' werd runderlactoferrine voor 15 mei 1997 toen de verordening in werking trad, niet toegepast als ingrediënt in de voeding, voedingssupplementen uitgezonderd. TNO vraagt daarom, namens de producent DMV International, toestemming om verschillende type levensmiddelen waaraan runderlactoferrine is toegevoegd op de markt te mogen brengen, conform de hierboven genoemde wetgeving. BNV heeft het rapport van de veiligheidsbeoordeling opgesteld. Dit rapport is getoetst door de commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen, hierna te noemen 'de commissie'. De samenstelling van deze commissie is beschreven in één van de bijlagen van dit rapport.

Lactoferrine is een eiwit dat van nature voorkomt bij zoogdieren en een rol speelt bij bepaalde processen in het lichaam. Echter de gezondheidsbevorderende werking die de aanvrager op basis hiervan veronderstelt, is niet door de commissie geëvalueerd. Zij benadrukt dat dit geen onderdeel is van deze veiligheidsbeoordeling.

De beoordelingsprocedure is als volgt verlopen. In december 2008 heeft de aanvrager het dossier, waarin de veiligheid van het nieuwe product wordt geëvalueerd, ingediend (TNO08). Het dossier is meerdere keren door de commissie besproken in haar plenaire vergaderingen in 2009, en door een werkgroep uit de commissie in meer detail op 9 april 2009. In deze periode is een aantal malen om aanvullende informatie gevraagd (TNO09, TNO09a, TNO09b). De belangrijkste vragen hadden betrekking op het ijzergehalte, de teststof die in het proefdieronderzoek is gebruikt en de omvang van het gebruik van voedingssupplementen met runderlactoferrine. Ook is de aanvrager verzocht enkele immunologische thema's nader toe te lichten. Op 3 november 2009 ontving BNV voor het laatst antwoord van de aanvrager (TNO09b). Na de bespreking hiervan door de commissie in de plenaire vergadering van 1 december 2009 is de beoordeling afgerond. Dit rapport is een weergave van de bevindingen van de commissie dat definitief is vastgesteld in de plenaire vergadering van 2 maart 2010.

2 Volledigheid en juistheid van het dossier

2.1 Administratieve gegevens

Het Nederlandse bedrijf DMV International in Veghel, Nederland, is de producent van het nieuwe ingrediënt. De aanvrager namens de firma is TNO Kwaliteit van Leven (*Department Food and Chemical Risk Analysis*) te Zeist.

2.2 Algemene beschrijving van het voedselingsrediënt

Lactoferrine is een natuurlijk eiwit in koemelk. In dit advies wordt de term runderlactoferrine gebruikt ter onderscheiding van het lactoferrine dat bij mensen voorkomt. De aanvrager wil runderlactoferrine in gezuiverde vorm op de markt brengen. Het product komt niet direct beschikbaar voor de consument, maar zal worden verwerkt in gewone levensmiddelen (waaronder producten voor peuters en kleuters) en verschillende typen bijzondere voeding (waaronder zuigelingen-, medische en sportvoeding).

2.3 Classificatie van het voedselingsrediënt voor beoordeling

De commissie is het eens met de aanvrager dat het nieuwe ingrediënt valt onder categorie e 'voedingsmiddelen geïsoleerd uit planten of dieren' volgens artikel 1 (2) van de verordening voor nieuwe voedingsmiddelen (EC97). In deel I van Aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EC97a) worden zes klassen nieuwe voedingsmiddelen onderscheiden om de beoordeling van de veiligheid en de voedingsaspecten te vergemakkelijken. De aanvrager deelt het product in bij klasse 2 omschreven als complexe nieuwe voedingsmiddelen uit niet-genetisch gemodificeerde organismen. Hierbinnen valt het product onder subklasse 2.1 omdat de bron binnen de Europese Gemeenschap al eerder voor de voeding is gebruikt. De commissie merkt op dat het product ook beschouwd zou kunnen worden als een eenvoudig mengsel, waarmee een mengsel van chemisch gedefinieerde stoffen wordt bedoeld. In dat geval zou subklasse 1.1 van toepassing zijn. Dit heeft echter geen gevolgen voor de veiligheidsbeoordeling; de thema's die de commissie heeft geëvalueerd zijn gelijk aan die voor nieuwe producten uit klasse 1 of klasse 2.

2.4 Informatievergaring over het voedselingsrediënt

De aanvrager heeft de informatie die essentieel is voor de beoordeling van de geschiktheid voor de consumptie van runderlactoferrine gestructureerd volgens onderstaande thema's die zijn voorgeschreven in Aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EC97a):

- I Specificatie van het nieuwe voedselingsrediënt
- II Effecten van het gevolgde productieprocedé op het voedselingsrediënt
- III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedselingsrediënt gebruikte organisme
- IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedselingsrediënt

- X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedselingrediënt of zijn bron
- XI Informatie over de voedingswaarde van het voedselingrediënt
- XII Microbiologische informatie over het voedselingrediënt
- XIII Toxicologische informatie over het voedselingrediënt

De aanvrager bespreekt op overzichtelijke wijze elk van deze thema's, en verwijst voor de gebruikte gegevens naar bijlagen of wetenschappelijke artikelen. Het dossier inclusief aanvullende gegevens bevat voldoende informatie om de veiligheid van het nieuwe ingrediënt te kunnen beoordelen. Daarnaast heeft de commissie wetenschappelijke literatuur geraadpleegd en heeft zij de rapporten van andere lidstaten met betrekking tot een eerdere aanvraag van runderlactoferrine in beschouwing genomen. Deze aanvraag van de firma Biopole S.A. was in augustus 2007 ingediend in België, zie http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/app_list_en.pdf.

2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager

Het dossier bevat een samenvatting die aan de EU lidstaten is toegestuurd conform artikel 6, lid 2, van de Europese Verordening 258/97 (EC97). Deze samenvatting is als bijlage opgenomen in dit rapport.

2.6 Overige beoordelingen

De aanvrager vermeldt dat runderlactoferrine, geproduceerd door DMV International, de GRAS-status (Generally Recognized As Safe) heeft in de Verenigde Staten (FDA01). Dit betreft het gebruik in sportvoeding en *functional foods*, waarbij één portie van deze producten 100 mg runderlactoferrine bevat. Het veiligheidsdossier dat in 2001 in de Verenigde Staten is ingediend vormt de basis van de huidige nieuwe voedingsmiddelen aanvraag.

Aanvullend noemt de commissie een andere toepassing van DMVs product in de levensmiddelenindustrie met de GRAS-status. Omdat runderlactoferrine antibacteriële eigenschappen heeft kan het worden toegepast om rundvlees te ontsmetten, zie hiervoor de GRN-nummers 67 en 130 op de FDA website, beschikbaar via <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=grasListing>.

2.7 Etikettersvoorstel van de aanvrager

De producent zal op het etiket duidelijk vermelden dat de bron van runderlactoferrine melk is. Ook fabrikanten die runderlactoferrine gaan verwerken in levensmiddelen, zullen op de verpakking moeten vermelden dat dit ingrediënt afkomstig is van melk conform de Europese Richtlijn 2003/89/EG inzake verplichte etikettering van allergenen. Etikettering in het algemeen moet in overeenstemming zijn met Richtlijn 2000/13/EG (waarvan de eerder genoemde richtlijn een wijziging is) inzake de etikettering en presentatie van levensmiddelen alsmede inzake de daarvoor gemaakte reclame, en met artikel 8 van Verordening 258/97

(EC97). Etiketteringsvoorstellen worden in Nederland in het Regulier Overleg Warenwet besproken. Beoordeling van het etiket maakt daarom geen deel uit van de veiligheidsbeoordeling van de commissie.

3 Interpretatie en evaluatie van de voorgelegde gegevens

3.1 I Specificatie van het nieuwe voedselingrediënt

De aanvrager specificeert het nieuwe product als volgt waarbij de gehalten gewichtsprocenten weergegeven. Het eiwitgehalte is tenminste 93 % waarvan tenminste 95 % runderlactoferrine¹. Het product bevat niet meer dan 4,5 % vocht en 1 % as. Het totaal gehalte zware metalen (uitgedrukt als lood) is minder dan 1 mg/kg.

De aanvrager beschrijft de structuur van runderlactoferrine. Het is een ijzerbindend eiwit waaraan suikergroepen zijn gebonden (geglycosyleerd) en bestaat uit één polypeptideketen. Hiervan is de volgorde van de ongeveer 700 aminozuren bekend. Het eiwit bevat geen vrije sulfhydrylgroepen maar wel intramoleculaire disulfidebindingen. Ook bevat het dossier informatie over de karakteristieken van de gebonden suikergroepen en de ijzerbindende plaatsen. In een aparte tabel worden de fysische en chemische kenmerken vermeld. Bepaalde chemische eigenschappen variëren met de hoeveelheid gebonden ijzer. Gewoonlijk bevat het nieuwe product 120 mg ijzer per kg.

Uit de analysegegevens van zes productiepartijen, geproduceerd tussen december 2007 en augustus 2008, blijkt dat het eiwitgehalte varieert van 96,6 tot 97,8 %. Het vochtgehalte schommelt rond de 3 %. Het asgehalte komt niet boven de 0,3 % uit. De commissie stelt vast dat de samenstelling consistent is en voldoet aan de gespecificeerde waarden. De beschreven partijen bestaan voor tenminste 91,8 % uit runderlactoferrine. Het eiwit in het nieuwe product bevat maximaal 5 % andere eiwitten dan runderlactoferrine maar gedetailleerde informatie hierover ontbreekt in het dossier. Wel vermeldt de aanvrager bij het thema 'allergeneiteit' in het hoofdstuk met toxicologische informatie, dat er kleine hoeveelheden andere melkeiwitten aanwezig kunnen zijn. Hiervan zijn de belangrijkste caseïne en beta-lactoglobuline, maar ook alfa-lactalbumine wordt genoemd in de dossierbijlage met voedingskundige informatie.

Het oorspronkelijke dossier bevat geen informatie over de mate waarin de ijzerinname zou kunnen fluctueren bij gebruik van runderlactoferrine afkomstig van verschillende productiepartijen. Op verzoek van de commissie verstrekt de aanvrager gegevens over het ijzergehalte van individuele productiepartijen (TNO09b). Voor drie partijen uit de periode 2006-2008 ligt dit tussen 101 en 216 mg/kg, en voor 11 partijen uit 2009 worden individuele waarden gerapporteerd van ongeveer 140 mg/kg. De aanvrager zal een bovengrens van 250 mg ijzer per kg op nemen in de specificatie.

De aanvrager verstrekt geen informatie over zware metalen in de testbatches, maar de gespecificeerde bovengrenzen voor cadmium (<0,02 mg/kg), lood (<0,2 mg/kg), arseen (<0,2 mg/kg), kwik (<0,01 mg/kg) en koper (<1,5 mg/kg) van het nieuwe ingrediënt zijn volgens de commissie voldoende laag. Zij baseert dit op de geschatte inname in relatie tot de *Tolerable Daily Intake* waarden uit de literatuur voor de afzonderlijke zware metalen (Baa01).

¹ De term runderlactoferrine wordt in dit rapport zowel gebruikt voor het eiwit zelf als voor het nieuwe product inclusief de geringe hoeveelheden aan andere verbindingen. Daar waar nodig wordt expliciet onderscheid gemaakt.

De commissie concludeert dat de productinformatie betrouwbaar weergeeft wat de samenstelling is van het te vermarkten nieuwe ingrediënt. Dit bevat geen verontreinigingen die schadelijk zijn voor de gezondheid.

3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocédé op het voedselingrediënt

Het dossier beschrijft hoe runderlactoferrine uit melk en melkderivaten wordt geïsoleerd. De kwaliteit van de uitgangproducten is hetzelfde als van consumptiemelk. In de eerste fase van het productieproces wordt het eiwit geadsorbeerd aan bepaald dragermateriaal waarna het wordt uitgewassen. Vervolgens wordt de verkregen oplossing een aantal malen gefilterd. Uiteindelijk wordt het runderlactoferrine gedroogd door middel van verstuiving. Voordat het runderlactoferrine wordt verpakt in speciale zakken, worden te grote poederdeeltjes er uitgezeefd. De aanvrager verwijst voor details van het proces naar het openbare US Patent 5596082.

De aanvrager heeft de chemische en microbiologische kwaliteit geanalyseerd tijdens langdurige opslag van zeven partijen uit de productieperiode juni 2004 tot maart 2007. Het runderlactoferrinegehalte van het uitgangsmateriaal was tenminste 95 % van de totale hoeveelheid eiwit, en na 8 tot 41 maanden lag dit gehalte tussen de 91 en 98 %. Volgens de aanvrager blijft de natieve (natuurlijke) vorm behouden, maar dit wordt niet verder onderbouwd. Van dit stabiliteitsonderzoek worden ook de resultaten verstrekt van andere belangrijke kenmerken zoals oplosbaarheid, vocht- en asgehalte. De aanvrager concludeert dat het product in de voorgeschreven verpakking stabiel blijft gedurende een opslag van tenminste 3,5 jaar in de koeling. Ook bleek een partij uit 2001, die in een gewone plastic zak bij kamertemperatuur werd bewaard, na zes jaar nog 95,3 % runderlactoferrine (van totaal eiwit) te bevatten. Wel bevatte dit product relatief meer vocht. De ijzerbindende capaciteit van de producten in beide stabiliteitsonderzoeken was onveranderd.

De informatie in het dossier over de stabiliteit van runderlactoferrine in de voorgestelde levensmiddelen (eindproducten) beperkt zich tot laboratoriumonderzoek naar de optimale condities om denaturatie² ten gevolge van warmtebehandeling te voorkomen. Gebaseerd op eigen resultaten voor enkele van de belangrijkste toepassingen en gegevens van derden, concludeert de aanvrager dat de natieve vorm van het geïncorporeerde runderlactoferrine kan worden behouden bij de productie van bijvoorbeeld melk, yoghurt en zuigelingenvoeding.

De commissie concludeert dat het runderlactoferrine wordt geproduceerd met gebruikelijke technieken uit de zuivelindustrie. Volgens de aanvrager worden gecertificeerde procedures gebruikt om de kwaliteit van de productie te controleren (ISO 9000:2000 en HACCP). Ook is de productie-installatie goedgekeurd voor de bereiding van zuivelproducten conform Verordening (EG) nr. 853/2004 waarin specifieke hygiënevoorschriften voor levensmiddelen van dierlijke oorsprong zijn vastgelegd. Het dossier bevat geen documentatie over de kwaliteitssystemen, maar de commissie heeft geen reden om te twijfelen aan de veiligheid van het productieproces.

² Verlies van ruimtelijke molecuulstructuur en daarmee samenhangende eigenschappen.

De commissie is het eens met de aanvrager dat de stabiliteit van het runderlactoferrine in het nieuwe product, over een lange periode is gegarandeerd. De commissie heeft kennis genomen van de fysische en chemische factoren die een rol spelen bij de denaturatie van runderlactoferrine (TNO09). Volgens de commissie ontstaan bij een verminderde stabiliteit geen andere afbraakproducten dan gedenatureerd runderlactoferrine. Zij heeft geen reden om te verwachten dat het gedenatureerde eiwit nadeliger is voor de gezondheid dan de natuurlijke vorm. De commissie beschouwt natief runderlactoferrine daarom als potentieel schadelijker en gaat er voor de veiligheidsbeoordeling vanuit dat alle runderlactoferrine, dat aan levensmiddelen is toegevoegd, de natieve vorm bezit. Stabiliteitsgegevens over runderlactoferrine in de verschillende eindproducten zijn daarom niet relevant.

3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedselingrediënt gebruikte organisme

De aanvrager gebruikt melk van gezonde koeien (*Bos bovis*). Deze melk voldoet aan alle hiervoor geldende Nederlandse en Europese regelgeving.

Volgens de commissie is deze informatie over de herkomst van het nieuwe ingrediënt voldoende.

3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedselingrediënt

Volgens de aanvrager heeft de gezondheid van iedereen baat bij consumptie van runderlactoferrine en beoogd daarom een brede toepassing. Het nieuwe ingrediënt zal worden toegevoegd aan levensmiddelen bestemd voor bijzondere voeding, te weten voeding voor baby's en jonge kinderen, dieetvoeding voor bijzondere medische doeleinden en sportvoeding. Andere toepassingen die de aanvrager voor ogen heeft zijn gewone levensmiddelen zoals niet-alcoholische dranken, cake en koeken, producten afgeleid van kaas, producten op basis van melk, koude snacks, en snoepgoed. Het dossier bevat op pagina 28 een overzicht van de voorgestelde productgroepen waarin tevens de maximale gehalten runderlactoferrine worden vermeld, uitgedrukt in mg per 100 gram eindproduct. Voor de levensmiddelen in vaste vorm varieert dit van 670 voor baby- en peutervoeding tot 4000 voor energierepen voor sporters. Voor de verschillende vloeibare producten zijn de voorgestelde concentraties runderlactoferrine (mg/100g): 100 voor zuigelingenvoeding, 120 voor niet-alcoholische dranken, 125 voor medische voeding, 200 voor zuivelproducten (ook opgroeimelk voor peuters) en 300 voor sportdranken.

De aanvrager heeft het toekomstig gebruik van het nieuwe ingrediënt uitgebreid onderzocht en is voor zuigelingen van 0-6 maanden uitgegaan van een gemiddelde behoefte van 1,2 liter melk per dag, dat overeenkomt met 1,2 g runderlactoferrine. Voor oudere baby's maakt de aanvrager gebruik van het Nederlands onderzoek naar inname van voedingsstoffen bij jonge peuters uitgevoerd in 2002. De geschatte totale hoeveelheid runderlactoferrine die baby's van 8-10 maanden oud binnenkrijgen met melk, melkproducten en allerlei bijvoeding komt neer op gemiddeld 1,9 g per dag (TNO09).

Voor de innameschatting voor de overige bevolking (ouder dan één jaar) heeft de aanvrager gebruik gemaakt van individuele consumptiegegevens die zijn verzameld in de databank van de

Nederlandse voedselconsumptiepeilingen. Het meest recente onderzoek bij de algemene Nederlandse bevolking dateert van 1997-1998 en is gebaseerd op een tweedaagse registratie in voedingsdagboeken. Een gedetailleerde beschrijving van de levensmiddelen binnen elke productcategorie die in deze berekeningen zijn meegenomen, is in het dossier opgenomen in Annex A1 van de bijlage met voedingskundige informatie. De dagelijkse inname, gemiddeld voor de totale bevolking (>1 jaar) komt neer op 1,5 g runderlactoferrine per persoon. Daarnaast bevat het dossier de resultaten voor verschillende bevolkingsgroepen ingedeeld naar leeftijd en geslacht samengevat in Tabel 2.2.3a van de dossierbijlage met voedingskundige informatie. De verstrekte cijfers zijn afkomstig van de gehele groep (*all persons*), omdat iedereen tenminste één van de onderzochte levensmiddelen had geconsumeerd. Hierbij is een verwaarloosbaar klein aantal niet-gebruikers in de groep volwassenen (<1%) buiten beschouwing gelaten. De schatting van de gemiddelde inname is het laagst bij volwassen vrouwen (19 jaar en ouder), te weten 1,4 g/persoon/dag en het hoogst bij jongens van 10-18 jaar, te weten 2,3 g/persoon/dag. In de relatief kleine groep van zwangere vrouwen (ongeveer 1 % van alle volwassenen) lag de gemiddelde runderlactoferrineconsumptie ongeveer hier tussen in.

De aanvrager geeft ook de berekende cijfers voor het 50^e, 95^e en 97,5^e percentiel van de inname en worden hieronder toegelicht voor het 95^e percentiel. De groepen van jonge kinderen (1-3 jaar), meisjes van 4-9 jaar en volwassen vrouwen hebben de laagste inname die varieert van 2,7 tot 2,8 g/persoon/dag. Jongens van 10-18 jaar scoren opnieuw het hoogst met een inname van 4,2 g/persoon/dag (TNO09). Met het scenario dat de aanvrager schetst blijkt dat de blootstelling aan runderlactoferrine, uitgedrukt per kg lichaamsgewicht, het laagst is voor volwassenen. Gemiddeld is dit ongeveer 19 mg/kg/dag, en voor de 95^e percentiel ongeveer 39 mg/kg/dag. Er is maar weinig verschil tussen mannen en vrouwen. Kinderen krijgen relatief veel meer runderlactoferrine binnen. Voor de onderzochte groep in de leeftijd van één tot drie jaar kwam de schatting uit op een gemiddelde van 124 mg/kg/dag en voor het 95^e percentiel 203 mg/kg/dag. Als indicatie voor de gemiddelde blootstelling bij de allerjongsten van de bevolking (0-12 maanden) geeft de aanvrager een bijna tweemaal hogere waarde van ongeveer 210 mg/kg/dag, op basis van referentielichaamsgewichten.

In het algemeen blijkt het gebruik van melk en melkproducten verantwoordelijk voor de helft van de runderlactoferrineconsumptie. De aanvrager concludeert dat dit in combinatie met de categorieën 'niet-alcoholische dranken' en 'koek en gebak' voor ongeveer 70 % bijdraagt aan de dagelijkse inname van runderlactoferrine uit het onderzochte assortiment levensmiddelen.

De commissie meent dat de aanvrager degelijk onderzoek heeft gedaan naar de mogelijke inname van runderlactoferrine. Er is een gevarieerd productassortiment onderzocht dat duidelijk is beschreven. Vast staat dat kinderen, per kg lichaamsgewicht, de hoogste blootstelling hebben. De commissie realiseert zich dat de berekende runderlactoferrine-inname de werkelijke consumptie overschat, omdat er bij het onderzoek wordt aangenomen dat consumenten uitsluitend de onderzochte levensmiddelen mét runderlactoferrine (met het maximale gehalte) zullen nuttigen in het huidig eetpatroon. Maar aan de andere kant is het mogelijk dat het gebruik binnen bepaalde productgroepen in de loop der tijd sterk is uitgebreid zoals dat bijvoorbeeld het geval is voor suikervrije frisdranken en vruchtensappen bij tieners en jongvolwassenen in het bijzonder (HCN01). Ook is het consumptieonderzoek van sportvoeding en –dranken indertijd

gebaseerd op maar een zeer beperkt aantal producten. Hoewel het consumptieonderzoek representatief is voor de toenmalige Nederlandse bevolking is het dus niet bekend of, met name voor specifieke productcategorieën, de resultaten geëxtrapoleerd kunnen worden naar de huidige populatie.

De aanvrager maakt niet duidelijk in hoeverre de geschatte consumptie representatief is voor andere EU lidstaten. De commissie wijst bijvoorbeeld op het gebruik van zuivelproducten dat behoorlijk verschilt in de individuele EU lidstaten (zie ook tabel 2.1 van de dossierbijlage met voedingskundige informatie).

In de EU wordt het nieuwe ingrediënt al toegepast in voedingssupplementen. Hoewel deze producten volgens de aanvrager niet onder de nieuwe voedingsmiddelen verordening (EC97) vallen, vindt de commissie blootstelling via deze specifieke producten wel relevant voor de veiligheidsbeoordeling. Het is namelijk niet uit te sluiten dat een lactoferrinesupplement wordt gebruikt in combinatie met voedingsmiddelen waaraan runderlactoferrine is toegevoegd³. Uit aanvullende informatie met verkoopgegevens van één eigen product van DMV International blijkt dat het voorgestelde gebruik door tieners om de huid te verbeteren 160 mg runderlactoferrine per dag is (en komt overeen met een blootstelling in de orde van 4 mg/kg/dag) (DMV09,TNO09b). Een dergelijk gebruik draagt relatief weinig bij aan de totale inname zoals hierboven beschreven. Het is echter onduidelijk wat de totale omvang van het huidige gebruik van supplementen met runderlactoferrine van verschillende fabrikanten is.

3.5 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedsel ingrediënt of zijn bron

3.5.1 Huidige blootstelling

Runderlactoferrine komt van nature in kleine hoeveelheden voor in koemelk. Volgens de aanvrager is de gemiddelde concentratie ongeveer 100 mg per liter⁴. Op basis van gegevens over de consumptie van melk en melkproducten concludeert de aanvrager dat Nederlanders (ouder dan 1 jaar) gemiddeld ongeveer 40 mg runderlactoferrine per dag binnenkrijgen. Voor Scandinavische landen is dit een vergelijkbare hoeveelheid of iets meer, maar gegevens voor de meeste Zuid-Europese landen ontbreken. De gemiddelde inname bij Nederlandse zuigelingen van ongeveer 9 maanden bedraagt 63 mg runderlactoferrine per dag. Het dossier bevat ook gegevens over de bevolking van de Verenigde Staten (ouder dan 2 jaar) waaruit blijkt dat runderlactoferrine-inname wel 100 mg per dag kan bedragen (95^e percentiel). Dit is berekend op basis van de consumptiegegevens uit 1994-1998 waarbij

³ In Nederland zijn voedingssupplementen beschikbaar met een gebruiksvoorschrift van tweemaal daags 400 mg runderlactoferrine, zie http://www.aov.nl/producten/overige_preparaten/lactoferrine_400_mg/.

⁴ De commissie constateert dat het runderlactoferrinegehalte flink kan variëren. Yamauchi vermeldt 100-400 mg per liter koemelk (Yam00). Volgens Australische deskundigen ligt het tussen de 20 en 200 mg per liter (http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/Novel%20Foods%20-%20Record%20of%20views%20Oct%2009%20Update%20_2_.pdf).

zuivelproducten en melkwei-eiwitten, die als ingrediënt aan allerlei levensmiddelen zijn toegevoegd, werden gecombineerd als bron van runderlactoferrine (FDA01).

Hoewel de aanvrager dit niet bespreekt, neemt de commissie aan dat het meeste, zo niet alle, runderlactoferrine gedenatureerd wordt tijdens de gebruikelijke sterilisatie en pasteurisatie van zuivelproducten. Consumptieonderzoek in Frankrijk geeft aan dat de gemiddelde inname van natief runderlactoferrine ongeveer 5,3 mg per dag is afkomstig van rauwe melk en hiermee geproduceerde kazen (AFS08). Volgens de commissie bevat de huidige dagelijkse voeding in het algemeen weinig of geen natief runderlactoferrine.

De commissie merkt op dat er wel voedingssupplementen met natief runderlactoferrine beschikbaar zijn van verschillende firma's in de EU. De aanvrager refereert aan supplementen met dagdoseringen tot 1200 mg runderlactoferrine die er in de Verenigde Staten van Amerika op de markt zijn. Echter, consumptiegegevens en registratie van eventuele klachten ontbreken.

3.5.2 Mensgebonden onderzoek

In het dossier zijn 30 zeer uiteenlopende soorten onderzoeken met runderlactoferrine bij mensen opgenomen in Annex A2 van bijlage A "Voedingskundige informatie". Het overzicht met duidelijke samenvattingen is gestructureerd naar onderzoeksgroep (TNO09a). Volgens de aanvrager wordt in geen van deze onderzoeken, die allemaal in wetenschappelijke tijdschriften zijn gepubliceerd, melding gemaakt van nadelige effecten.

De commissie constateert dat in deze onderzoeken, op één uitzondering na, lactoferrineproducten zijn gebruikt van andere firma's dan de huidige aanvrager. Geen van de onderzoeken was opgezet om de veiligheid te evalueren maar ze betreffen de veronderstelde werkzaamheid.

Zuigelingen

Het onderzoek dat King in 2007 publiceerde is volgens de commissie essentieel voor de huidige beoordeling omdat het is uitgevoerd met het eigen product van DMV International (Kin07). Het betreft een dubbelblind, placebo-gecontroleerd interventieonderzoek bij zuigelingen geboren na een zwangerschap van minstens 34 weken en met een lichaamsgewicht van minstens 2 kg. De melk waarmee de 79 baby's gedurende het eerste levensjaar werden gevoed, bestond uitsluitend uit flesvoeding die in de experimentele groep extra toegevoegd runderlactoferrine bevatte met een totaal gehalte van 850 mg/L. De zuigelingenvoeding van de controle groep bevatte 102 mg runderlactoferrine per liter (een standaard commercieel product). Tijdens het gebruik van de producten werd de groei regelmatig bepaald aan de hand van lichaamsgewicht, lengte en hoofdomvang. Als de kinderen ongeveer 9 en 12 maanden oud waren, werd ook bloed afgenomen. Hierin zijn de volgende hematologische kenmerken bepaald: hemoglobine, hematocriet en de gemiddelde grootte van rode bloedcellen (*median corpuscular volume MCV*). Daarnaast zijn de concentraties van specifieke antilichamen gemeten, en wel die gericht tegen difterie, tetanus, Hepatitis B en *H.influenzae b.* om de respons op de gangbare vaccinaties te evalueren. Van de gewone kinderziektes, zoals diarree, luchtweginfecties en middenoorontsteking, die zich voordeden werd de frequentie en duur geregistreerd. De commissie concludeert dat het

onderzoek deugdelijk is uitgevoerd en de gepubliceerde resultaten duidelijk en betrouwbaar zijn weergegeven. Er waren geen statistisch significante verschillen tussen beide groepen zuigelingen die relevant zijn voor de veiligheidsbeoordeling. De onderzoekers tekenen aan dat de onderzoeksgroepen relatief klein zijn; bij het afsluiten van het onderzoek waren nog 26 kinderen aanwezig in elke groep. Gezien de grondigheid meent de commissie echter dat er voldoende gegevens zijn om te concluderen dat langdurige inname van runderlactoferrine, in hoeveelheden vergelijkbaar met die in de huidige aanvraag, de groei en gezondheid van zuigelingen niet nadelig beïnvloedt.

Volgens de commissie zijn de zeven andere studies met runderlactoferrine bij zuigelingen die in het dossier zijn opgenomen (gepubliceerd voor 1994), niet direct relevant voor de veiligheidsbeoordeling omdat hierin alleen de werkzaamheid werd onderzocht. Vijf onderzoeken betroffen de ijzerhuishouding en –retentie, en in twee werd de darmmicrobiota onderzocht. De commissie heeft geen opmerkingen hierover. In paragraaf 3.6 licht de commissie toe dat zij geen problemen voorziet van de extra ijzerinname met het nieuwe ingrediënt.

Kinderen

De aanvrager beschrijft drie onderzoeken bij kinderen. In één ervan werden zes kinderen die last hadden van terugkerende keelontsteking, dagelijks behandeld met 300 mg runderlactoferrine gedurende 15 dagen voorafgaand aan het knippen van hun amandelen (tonsillectomie). De commissie heeft deze gegevens niet in beschouwing genomen omdat alleen het verwijderde tonsilweefsel is onderzocht. Met betrekking tot gezonde jonge kinderen vindt de commissie het onderzoek van Ochoa (2008) waarin dagelijks 500 mg runderlactoferrine werd ingenomen over een periode van 9 maanden het meest relevant (dubbelblind, placebo-gecontroleerd). Wel waren de groepen bij de aanvang van het onderzoek relatief klein, te weten elk 26 kinderen van één tot drie jaar oud. Volgens de onderzoekers traden er geen nadelige effecten op. Hoewel het andere onderzoek door Egashira (2007) een veel grotere groep kinderen jonger dan vijf jaar betrof, die dagelijks 100 mg kregen, is dit niet door de commissie in beschouwing genomen omdat er alleen een samenvatting beschikbaar was.

Volwassenen

Van de 19 onderzoeken bij volwassenen zijn er vier onderzoeken uitgevoerd met gezonde vrijwilligers. De hoogste dosering hierbij was 1,8 of 2 g runderlactoferrine, dagelijks ingenomen gedurende 4 tot 8 weken. Dat dergelijke behandelingen zonder problemen worden verdragen blijkt ook uit het onderzoek dat is uitgevoerd met volwassenen die last hadden van voetschimmel (zwemmerseczeem). Eén groep van 14 personen kreeg 8 weken lang 0,6 g runderlactoferrine per dag en een andere groep met 12 personen 2 g/dag. De aanvrager heeft dit bij de patiëntenonderzoeken ondergebracht maar de individuen waren, afgezien van de genoemde kwaal, geheel gezond.

De 14 andere onderzoeken bij volwassenen betreft patiënten, meestal met *Helicobacter pylori* infecties of met chronische hepatitis C. Bij de patiënten met chronische hepatitis C zijn vergelijkbare blootstellingsregimes onderzocht als hiervoor beschreven voor gezonde

individuen, maar ook hogere dagdoseringen, te weten 3,6 g (drie onderzoeken) en 7,6 g (één onderzoek). Bij de meeste andere onderzoeken bij patiënten, waaronder die met *Helicobacter pylori* infecties, werd dagelijkse 200 mg runderlactoferrine toegediend gedurende een periode die uiteenliep van 7 dagen tot 12 weken. Gebaseerd op het onderzoek van Okada uit 2002, concludeert de aanvrager dat 7,2 g runderlactoferrine dagelijks ingenomen gedurende 8 weken veilig is voor volwassenen. De commissie tekent aan dat het hier chronisch zieke mensen betreft en dat er voor deze dosering geen gegevens zijn bij gezonde individuen. Wel is dit het enige onderzoek waar bijwerkingen systematisch werden bijgehouden. Uit het onderzoeksrapport blijkt dat drie van de 15 patiënten behandeld met 7,2 g/dag, en één patiënt met 3,6 g/dag, last kregen van milde tot matige bijwerkingen. Dit betrof huiduitslag, verminderde eetlust, obstipatie en diarree. Dit was van voorbijgaande aard en ging niet gepaard met klinische relevante afwijkingen van laboratoriumwaarden (bloedonderzoek). Ernstige bijwerkingen deden zich niet voor.

De commissie constateert dat er in het algemeen geen duidelijke klachten optreden bij dagelijkse consumptie van runderlactoferrine gedurende enkele maanden, in hoeveelheden zoals voorgesteld in deze aanvraag. Vanwege de antibacteriële eigenschappen is het niet ondenkbaar dat runderlactoferrine gevolgen heeft voor de samenstelling van de microbiota in het maag-darmkanaal. Hoewel de gegevens over dit thema bij zuigelingen en jonge kinderen beperkt zijn, en er voor volwassenen geen informatie is verstrekt, heeft de commissie geen aanwijzingen dat het nieuwe ingrediënt schadelijk is voor de darmmicrobiota. Op basis van het totaal aan beschikbare resultaten van mensgebonden onderzoeken, concludeert de commissie dat er geen aanleiding is voor bezorgdheid over het gebruik van runderlactoferrine in de natuurlijke vorm. Grootschalig veiligheidsonderzoek bij gezonde mensen dat dit bevestigt ontbreekt.

3.6 XI Informatie over de voedingswaarde van het voedsel ingrediënt

De aanvrager heeft de voedingskundige informatie samengevat in bijlage A van het dossier. Lactoferrine is een ijzerbindend eiwit dat behoort tot de familie van transferrinen. Het is een bestanddeel van zoogdiermelk. Daarnaast komt lichaamseigen lactoferrine ook voor in andere lichaamsafscheidingen zoals traanvocht en speeksel, en in speciale bloedcellen, de neutrofielen. Lactoferrine in de circulatie is afkomstig van deze laatst genoemde cellen. Humaanlactoferrine kan worden beschouwd als onderdeel van ons aangeboren afweersysteem vanwege de antimicrobiële en ontstekingsremmende eigenschappen.

De aanvrager beoogt met de extra consumptie van runderlactoferrine het lichaamseigen lactoferrine aan te vullen. Het dossier vermeldt dat de aminozuurvolgorde van runderlactoferrine voor ongeveer 70 % overeenkomt met die van humaanlactoferrine, en dat er verschillen zijn in de glycosylering van beide eiwitten. De commissie constateert dat de verteringsproducten van beide lactoferrinen bij de mens niet volledig equivalent zijn aangezien de gevormde peptiden verschillen in type en activiteit als gevolg van met name de omzettingen door microbiële enzymen in de dikke darm.

De commissie heeft de voedingswaarde van runderlactoferrine als eiwit vergeleken met de totale eiwitname bij de verschillende leeftijdsgroepen van de Nederlandse bevolking (<http://www.rivm.nl/vcp/>). Dit is relatief het hoogst voor zuigelingen die 5 à 10 % van hun

eiwit in de vorm van runderlactoferrine binnenkrijgen. Dit is gebaseerd op de voorschriften voor zuigelingenvoeding in de Europese Richtlijn 2006/141 (EC06) en het voorstel van de aanvrager voor een gehalte van 1 g runderlactoferrine per liter voeding. Volgens de aanvrager is dit goed vergelijkbaar met moedermelk dat 1-4 g humaanlactoferrine per liter bevat. Voor de andere bevolkingsgroepen komt het beoogde gebruik van runderlactoferrine overeen met grofweg 1 tot 4 % van de totale eiwitinname, afhankelijk van leeftijd en geslacht.

Het nieuwe ingrediënt bevat ijzer, in de vorm van reversibel gebonden Fe^{3+} , met een maximaal gehalte van 250 mg per kg. Dit laatste heeft de aanvrager op verzoek van de commissie vastgelegd in de specificatie beschreven in paragraaf 3.1 (TNO09b). Dit betekent dat per liter zuigelingenmelk of opvolgzuigelingenmelk, de voorgestelde hoeveelheid van 1 g runderlactoferrine ten hoogste 0,25 mg ijzer bevat. Dit komt overeen met ongeveer 2 a 3 % van het maximaal toegestane ijzergehalte in dit type voeding zoals vastgelegd in Richtlijn 2006/141/EG. Een belangrijk onderzoek dat volgens de commissie onderbouwt dat de ijzerhuishouding niet nadelig wordt beïnvloed, is uitgevoerd bij zuigelingen die 12 maanden runderlactoferrine kregen (Kin07). Hieruit blijkt dat de hemoglobine- en hematocrietwaarde niet veranderen onder invloed van het nieuwe ingrediënt (zie paragraaf 3.5.2 voor meer informatie). Voor andere gebruikers geldt dat zij, per gram runderlactoferrine, gewoonlijk ongeveer 0,14 mg ijzer binnenkrijgen, maar nooit meer dan 0,25 mg ijzer. In het worstcase scenario dat de aanvrager schetst consumeren jonge mannen ruim 4 gram runderlactoferrine per dag, waarmee ze één mg ijzer binnen zouden kunnen krijgen. In het licht van de 6 tot 13 mg ijzer die Nederlanders, afhankelijk van leeftijd en geslacht, dagelijks binnenkrijgen met de gewone voeding, concludeert de commissie dat de extra inname van ijzer met runderlactoferrine geen nadelige effecten met zich meebrengt.

Vertering en absorptie.

De aanvrager bespreekt uitgebreid de fysiologische processen bij volwassen en zuigelingen waarbij verschillen en overeenkomsten tussen humaanlactoferrine en runderlactoferrine aan bod komen, maar ook die tussen mens en proefdier. De commissie heeft zich in haar evaluatie in principe beperkt tot de informatie over runderlactoferrine bij mensen. De afbraak van eiwit in het maag-darmkanaal is afhankelijk van de leeftijd, omdat de darm bij de geboorte nog niet volledig is ontwikkeld. Het blijkt dat runderlactoferrine relatief langzaam wordt afgebroken bij pasgeboren mensenbaby's net als bij biggetjes en apenbaby's. Als gevolg van onvolledige proteolyse door enzymen van de maag en pancreas kunnen biologische actieve fragmenten van runderlactoferrine, maar ook het intacte molecuul, volgens de aanvrager de darm bereiken. Dit is aangetoond in onderzoek van feces van zuigelingen, maar de commissie constateert dat dergelijke gegevens bij volwassen ontbreken. De aanvrager meent dat er voldoende bewijs is dat intact lactoferrine wordt geabsorbeerd in het bloed van mensenbaby's en jonge dieren. Volgens de commissie betreft dit echter het lactoferrine van de eigen soort (via moedermelk). Het dossier bevat geen informatie waaruit blijkt dat runderlactoferrine bij zuigelingen wordt geabsorbeerd. Dit is wel aangetoond bij proefdieren met een volledig uitgerijpt maag-darmkanaal. Hiervoor refereert de aanvrager aan onderzoek van Fischer (2007) met volwassen muizen die 1 mg runderlactoferrine direct in de maag kregen toegediend. Nog geen 10 minuten later

verscheen er intact runderlactoferrine in het bloed. Volgens de onderzoekers spelen naast de lever ook de milt en nieren een rol bij de klaring van circulerend runderlactoferrine. Onderzoekingen van de absorptie en het metabolisme van runderlactoferrine bij volwassen mensen zijn de aanvrager niet bekend.

De commissie heeft geen reden om aan te nemen dat de vertering van runderlactoferrine essentieel verschilt van die van andere eiwitten in onze voeding. Wel lijkt runderlactoferrine relatief goed bestand tegen proteolytische enzymen in het maag-darmkanaal. De commissie bevestigt het gebrek aan informatie over de absorptie bij mensen.

3.7 XII Microbiologische informatie over het voedselingrediënt

De zorgvuldige productie van het nieuwe ingrediënt voorkomt volgens de aanvrager dat er besmettingen met micro-organismen optreden. Daarnaast waarborgt het gehanteerde HACCP-systeem de microbiële veiligheid van het product. Van zes productiepartijen uit 2007-2008 verstrekt de aanvrager de testresultaten van een aantal ongewenste micro-organismen en deze voldoen aan de grenswaarden die de aanvrager heeft gespecificeerd. Op basis van de gehanteerde grenswaarden voorziet de commissie geen problemen met betrekking tot de voedselveiligheid.

3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedselingrediënt

De aanvrager heeft de toxicologische en immunologische gegevens in bijlage B van het dossier opgenomen.

3.8.1 Preklinisch toxicologisch onderzoek

De aanvrager heeft acute en subchronische studies met ratten uitgevoerd, naast mutageniteitsonderzoek in bacteriën. De commissie bespreekt hieronder de belangrijkste gegevens. De gepresenteerde andere proefdierstudies over vertering en absorptie beschouwt de commissie niet als echte toxicokinetische onderzoeken en zijn daarom in paragraaf 3.6 geëvalueerd.

Bijna alle toxicologische onderzoeken zijn uitgevoerd met runderlactoferrine afkomstig van Morinaga Milk Industry Co. (Japan). De aanvrager licht toe dat deze Japanse firma, melk uit de EU gebruikt als bron voor de productie (TNO09b). Het ijzergehalte in de teststof ligt onder de bovengrens die de aanvrager hanteert (zie paragraaf 3.1). Het runderlactoferrinegehalte van dit product is minstens zo hoog als van DMV's product maar informatie over de samenstelling van de andere melkeiwitten ontbreekt. Toch is de commissie het eens met de aanvrager dat de teststof representatief is voor het op de markt te brengen product van DMV International. Zij baseert zich op de specificatie van het product van de Japanse firma en de beschikbare gegevens over de productiemethoden (TNO09b) waaruit geen verschillen naar voren komen die belangrijk zijn vanuit veiligheidsoverwegingen.

Het dossier bevat de negatieve resultaten van één standaard mutageniteitstest met vier stammen van *Salmonella typhimurium* en één stam van *Escherichia coli*. Volgens de

commissie volstaat dit om mutageniteit uit te sluiten gezien de aard van het nieuwe ingrediënt.

In de gepresenteerde toxicologische onderzoeken met ratten werd het runderlactoferrine direct in de maag toegediend. De controle dieren kregen water op dezelfde manier.

De acute toxiciteit is getest bij ratten na een eenmalige dosis van 2 g runderlactoferrine per kg lichaamsgewicht. De dieren werden 14 dagen later aan sectie onderworpen. Nadelige effecten zijn niet waargenomen. Daarnaast is een 28-dagen toxicologisch onderzoek uitgevoerd met ratten die dagelijks 0, 200, 600 of 2000 mg runderlactoferrine per kg lichaamsgewicht kregen toegediend. De uitvoering en uitgebreide analyse van standaardkenmerken was grotendeels vergelijkbaar met het hieronder beschreven 13-weken onderzoek. Volgens de aanvrager traden er geen behandelingsgerelateerde effecten op. Van beide onderzoeken is alleen een samenvatting in het nieuwe voedingsmiddelendossier opgenomen. De commissie tekent aan dat in het 28-dagen onderzoek de teststof niet is gespecificeerd.

In het subchronische onderzoek over een periode van 13 weken, werden ratten blootgesteld aan 0, 200, 600 of 2000 mg runderlactoferrine (opgelost in water) per kg lichaamsgewicht per dag. Elke groep bestond uit 12 mannetjes en 12 vrouwtjes. Bij dagelijkse controle gedurende de behandelingsperiode werd gelet op veranderingen in onder andere het gedrag en uiterlijk. De voederinname en lichaamsgewicht werd tweemaal per week bepaald. In de zesde en laatste week werd 24-uurs urine verzameld voor chemische analyse en werd gelijktijdig de waterinname gemeten. De dag na de laatste dosering werd nuchter bloed afgenomen voor analyse van standaard biochemische (ook voor urine) en hematologische kenmerken. Vervolgens werden de dieren geofferd en gecontroleerd op zichtbare afwijkingen⁵. De organen in de buik- en borstholte werden gewogen en ook de hersenen, hypofyse en speekselklieren. Bij zowel de hoogste dosisgroep als de controle dieren werd een groot aantal organen en weefsels microscopisch onderzocht. Aanvullend is de pancreas van mannetjes ratten ook bekeken in de andere dosisgroepen. Er zijn geen klinische waarnemingen gerapporteerd die konden worden toegeschreven aan de teststof. De behandelde groepen verschilden niet significant van de controlegroep met betrekking tot het lichaamsgewicht, de resultaten van het oogonderzoek (oftalmoscopie) en de laboratoriumwaarden van het bloed (hematologisch en biochemisch). In de voederinname, orgaangewichten en chemische analyses in de urine zijn enkele significante verschillen ten opzichte van de controle dieren gerapporteerd maar deze bleken niet aan de teststof gerelateerd. Met betrekking tot de urine deed de variatie in bepaalde laboratoriumwaarden zich alleen voor bij mannetjes, en was niet dosisgerelateerd, noch consistent in de tijd (6 vs. 13 weken). Deze bevindingen gingen niet gepaard met microscopisch zichtbare afwijkingen van het nierweefsel of klinische-chemische waarden van het bloed en zijn daarom volgens de aanvrager niet toxicologisch relevant. De commissie stemt hiermee in.

⁵ In beide subchronische onderzoeken zijn incidenteel zichtbare donkerrode plekken waargenomen met name in de longen en magen van de ratten. De commissie merkt op dat deze lesies niet gepaard gaan met afwijkingen in de weefselstructuur en zijn vermoedelijk veroorzaakt door technische imperfecties bij het doseren en opofferen van de dieren bij de sectie.

Daarnaast werden afwijkingen in de pancreas waargenomen (fibrose van de eilandjes van Langerhans). Deze fibrose deed zich voor bij de helft van alle mannetjes in alle dosisgroepen, tegenover een kwart van de mannetjes in de controlegroep. De commissie is het eens met de aanvrager dat er geen verband is met de runderlactoferrinebehandeling. De verklaring hiervan die in het dossier ontbreekt, is dat bij mannetjes ratten van de gebruikte Sprague–Dawley-stam deze afwijkingen spontaan kunnen voorkomen als gevolg van veroudering (Ima07, Ima09). De fibrose lijkt een herstelreactie op primaire bloedinkjes in de eilandjes van Langerhans die ontstaan bij verlaagde estradiolspiegels in het serum van oudere mannetjes ratten.

Volgens de aanvrager is het 13-weeken onderzoek bijna geheel uitgevoerd conform de internationale OECD richtlijn nr 408 (1981), maar in het onderzoeksrapport zelf wordt bij het protocol niet aan een richtlijn gerefereerd. Een GLP (*Good Laboratory Practice*) verklaring was niet beschikbaar (TNO09a, TNO09b). Op basis van de gepubliceerde gegevens (Yam00) concludeert de commissie echter dat het onderzoek van voldoende kwaliteit is.

De commissie concludeert dat runderlactoferrine geen nadelige effecten teweegbrengt bij proefdieren. Zij is het eens met de aanvrager dat geen van de waargenomen afwijkingen kan worden toegeschreven aan de behandeling met runderlactoferrine. De NOAEL-waarde (*No Observed Adverse Effect Level*) is daarom terecht vastgesteld op 2000 mg/kg bw/d voor beide geslachten. Dit is de hoogst geteste dosis in het 13-weeken onderzoek. De aanvrager beschouwt lactoferrine als een endogene verbinding en meent dat het verschil tussen de soorten mens en rat niet in de veiligheidsfactor hoeft te worden verwerkt om de veilige bovengrens van inname te berekenen. De commissie is het hier niet mee eens, omdat de beperkte gegevens die er zijn over de vertering en absorptie van runderlactoferrine in mens en rat, dit niet kunnen onderbouwen. Ook verschilt de vertering van lichaamseigen lactoferrine en runderlactoferrine wel degelijk in mensen (zie paragraaf 3.6). Daarnaast is het onbekend of de interactie van runderlactoferrine met de lactoferrinereceptoren van mensen- en rattencellen verschilt. De bij zuigelingen beoogde inname van gemiddeld 210 mg/kg bw/d (zie paragraaf 3.4) is ongeveer een factor 10 lager dan de NOAEL. De commissie vindt deze veiligheidsmarge acceptabel gezien de aard van het ingrediënt. Ook is het niet aannemelijk dat baby's het voorgestelde consumptieniveau zullen overschrijden. Bij volwassenen is er een verschil van ongeveer een factor 50 tussen de NOAEL en de 95^e percentiel van de inname (39 mg/kg bw/d) berekend op basis van het geselecteerde productassortiment. Voor jonge kinderen (1-3 jaar) is de geschatte blootstelling gemiddeld 124 mg/kg bw/d, en voor het 95^e percentiel van de inname 203 mg/kg bw/d. Bij hen ligt de veiligheidsmarge dus tussen de 10 en 16. De commissie vindt dit voldoende.

3.8.2 Immunologie

De aanvrager meent dat het gebruik van runderlactoferrine geen immunologische risico's met zich mee brengt en baseert dit op gepubliceerde onderzoeken bij mensen en enkele deskundigenverklaringen (TNO08, TNO09b).

Allergeniteit. Uit gepresenteerde onderzoeken blijkt dat er bij 40-50 % van de mensen met een koemelkallergie IgE-antilichamen tegen runderlactoferrine in het bloed aanwezig zijn, naast antistoffen specifiek voor andere melkeiwitten (Gau08, Nat04). Gezien het totaal

aan gegevens, concludeert de aanvrager dat runderlactoferrine geen "major" allergeen is (TNO09b). Formeel lijkt dit juist omdat men pas spreekt van een "major" allergeen als meer dan 50% van de allergische patiënten IgE-antilichamen in het bloed hebben, gericht tegen dit specifieke allergeen. In deze context wijst de commissie op het onderzoek met DMV's runderlactoferrine bij zuigelingen dat al eerder is besproken (zie paragraaf 3.5.2) (Kin07). De in 2007 gepubliceerde onderzoeksresultaten vermelden geen bloedwaarden voor IgE-antilichamen gericht tegen runderlactoferrine. Bij navraag door de commissie bleek dat de concentraties van deze specifieke IgE-antilichamen niet alsnog konden worden bepaald bij gebrek aan onderzoeksmateriaal (TNO09b). De commissie vindt dit een gemiste kans gezien het wetenschappelijk belang van deze informatie over de allergeniteit van runderlactoferrine. Als juist op die jonge leeftijd een IgE-response zou uitblijven, dan zou dit onderbouwen dat runderlactoferrine inderdaad geen sterk allergeen is.

De aanvrager sluit echter niet uit dat runderlactoferrine één van de mogelijk allergene melkeiwitten is, maar bij gebrek aan orale provocatietesten met runderlactoferrine ontbreekt elk bewijs (TNO09b). Zo ook in de beschreven gevallen dat in het bloed van koemelkallergische personen, runderlactoferrine het enige van de onderzochte koemelkeiwitten is waartegen IgE-antilichamen kunnen worden aangetoond. Hierbij staat niet onomstotelijk vast dat runderlactoferrine verantwoordelijk is voor de klinische reactie. Alles in beschouwing nemend, concludeert de aanvrager dat de gegevens over de mogelijke allergeniteit van runderlactoferrine niet eenduidig zijn. De commissie is het grotendeels eens met de aanvrager. Zij erkent dat, gezien de methodologische beperkingen van de verschillende onderzoeken, er geen oorzakelijk verband is aangetoond tussen consumptie van runderlactoferrine en koemelkallergie. Maar er zijn wel degelijk patiënten met een koemelkallergie gesensibiliseerd voor runderlactoferrine gezien de specifieke antistoffen in hun bloed. Bovendien heeft onderzoek uitgewezen dat runderlactoferrine bijna net zo allergeen is als sommige caseïnes (Nat04). Hoewel de klinische relevantie hiervan onbekend is, is het volgens de commissie niet uit te sluiten dat runderlactoferrine een allergische reactie uitlokt. Om personen met een koemelkallergie, en bij kinderen met een verhoogde kans op het ontwikkelen van een koemelkallergie te waarschuwen voor dit mogelijk risico is het noodzakelijk dat het nieuwe ingrediënt wordt gelabeld als koemelkeiwit (TNO08, TNO09b).

Labeling is in ieder geval vereist omdat het nieuwe ingrediënt geringe hoeveelheden caseïne, beta-lactoglobuline en alfa-lactalbumine bevat (zie ook paragraaf 3.1). Deze koemelkeiwitten kunnen bij mensen een allergische, IgE-gemedieerde reactie veroorzaken (EFSA04). Koemelkallergie is een op zich weinig voorkomende allergie bij volwassenen in tegenstelling tot (jonge) kinderen. De commissie is het eens met de aanvrager dat het voor personen met een koemelkallergie volstaat om "bevat koemelkeiwitten" te vermelden op het etiket van voedingsmiddelen waaraan het nieuwe ingrediënt wordt toegevoegd (zie ook paragraaf 2.7). Zij benadrukt dat de aanvrager runderlactoferrine niet zal verwerken in hypoallergene zuigelingenvoeding (TNO09b).

De aanvrager spreekt zich niet uit over mogelijke gevolgen van de voorgestelde runderlactoferrineconsumptie bij mensen die (nog) niet allergisch zijn voor koemelk. De commissie realiseert zich dat deze fundamentele vraag niet beantwoord kan worden op

basis van klinisch onderzoek, in ieder geval niet op korte of middellange termijn. Wel is het de commissie bekend dat volwassenen onder normale dagelijkse blootstelling aan zuivelproducten een koemelkallergie kunnen ontwikkelen (EFSA04) en dat er geen aanwijzingen zijn dat verhoogde melkconsumptie leidt tot meer sensibilisatie bij volwassenen. Het blijft onzeker of de verhoogde blootstelling aan (natief) runderlactoferrine, in de toepassing die de aanvrager voorstelt, meer mensen overgevoelig maakt voor koemelk. De commissie vindt dit echter op zich geen reden om het gebruik van runderlactoferrine af te wijzen omdat er voor elk nieuw eiwit waarmee een individu in aanraking komt een onvermijdbaar potentieel risico door sensibilisatie bestaat.

De commissie vestigt de aandacht op de sequentieovereenkomst tussen ovotransferrine in kippeneiwit en runderlactoferrine. Het blijkt dat 77 % van de aminozuurvolgorde vergelijkbaar is (persoonlijke communicatie Karin Hoffmann) (Jac08). Personen met een allergie voor kippenei hebben onder andere ovotransferrine-specifieke IgE-antilichamen in hun bloed. Voor zover de aanvrager heeft kunnen nagaan wordt kruisreactiviteit van deze antistoffen met runderlactoferrine nergens beschreven (TNO09b). De vraag of runderlactoferrine een allergische reactie kan uitlokken bij personen die gesensibiliseerd zijn voor ovotransferrine blijft vooralsnog zuiver theoretisch, aangezien geen klinisch verband is gerapporteerd.

Samenvattend concludeert de commissie dat de beschikbare informatie over de allergeniteit van runderlactoferrine zeer beperkt is. Zij is het met de aanvrager eens, dat het niet is aangetoond dat runderlactoferrine een allergische reactie teweeg kan brengen.

Auto-immuniteit. Het is bekend dat auto-immuunantilichamen tegen humaanlactoferrine een rol spelen bij allerlei chronische ontstekingen zoals reuma en inflammatoire darmziekten (ziekte van Crohn, colitis ulcerosa). Volgens de commissie is een causaal verband niet aangetoond en concludeert de aanvrager terecht dat het onwaarschijnlijk is dat runderlactoferrine bijdraagt aan het ontstaan van auto-immunproblemen of -ziekten. Hierbij merkt de commissie op dat wetenschappers een verband suggereren tussen overgevoeligheid voor koemelkeiwitten en het ontstaan van specifieke auto-immunproblemen die type-1 diabetes veroorzaken (via ontstekingen van de eilandjes van Langerhans). Dit wordt momenteel bestudeerd in grootschalig internationaal onderzoek bij jonge kinderen (Gol08, TRI07, Vaa08). Volgens de aanvrager is het niet waarschijnlijk dat extra toegevoegd runderlactoferrine in zuigelingenvoeding het risico verhoogt om type-1 diabetes mellitus te ontwikkelen, omdat de totale hoeveelheid melkeiwitten hierdoor maar in geringe mate toeneemt (TNO09b). Ook de commissie heeft geen enkele aanwijzing dat runderlactoferrine een rol zou spelen bij het ontstaan van de genoemde ziekte.

Immunomodulatie. Het is bekend dat lichaamseigen lactoferrine het immuunsysteem op verschillende manieren kan beïnvloeden. In paragraaf 4 van de dossierbijlage met voedingskundige informatie heeft de aanvrager alleen de vermeende gunstige effecten van runderlactoferrine toegelicht en dit is grotendeels gebaseerd op modelstudies. De commissie tekent hierbij aan dat runderlactoferrine, in processen waarbij interacties met specifiek humane receptoren van belang zijn, mogelijk niet dezelfde biologische activiteit heeft als humaanlactoferrine. Hoewel de commissie geen aanwijzingen heeft dat jarenlange

dagelijkse inneming van runderlactoferrine schadelijk is voor het menselijk immuunsysteem, zijn er geen gegevens van degelijk onderzoek bij gezonde vrijwilligers die dit bevestigen.

3.8.3 Conclusie

De resultaten van mensgebonden onderzoeken inclusief die bij zuigelingen en kinderen zijn in paragraaf 3.5.2 en 3.6 geëvalueerd. Hoewel de informatie met betrekking tot de veiligheid beperkt is, zijn er volgens de commissie geen redenen tot ongerustheid. Ook is de commissie niet bezorgd dat runderlactoferrine, mits adequaat gelabeld als koemelkeiwit, nadelige immunologische effecten zal hebben. De commissie stelt vast dat de veiligheidsmarges uiteenlopen van 10 tot 50. Dit is gebaseerd op de hoogste blootstelling aan runderlactoferrine in het 13-weeken rattenonderzoek waarbij geen nadelige effecten zijn waargenomen en de geschatte inname (95^e percentiel) bij de verschillende leeftijdsgroepen van de bevolking.

Summary, conclusions and recommendations

The applicant 'TNO Quality of Life' has submitted a safety dossier for bovine lactoferrin, a protein originating from cow's milk, on behalf of the manufacturer DMV International. The applicant wishes to use bovine lactoferrin as a food ingredient in a wide range of foods. The dossier with product information has been submitted to the Committee on the Safety Assessment of Novel Foods (hereinafter referred to as 'the Committee'). The novel ingredient contains at least 92 % bovine lactoferrin in its natural form, in addition to small quantities of other cow's milk proteins. The safety of the production process and the quality of the product are safeguarded.

Cow's milk contains small quantities of bovine lactoferrin. According to the Committee, however, people consume hardly any bovine lactoferrin in its natural form in their daily diet because it is denatured during the usual processes in the dairy industry.

The applicant proposes to add bovine lactoferrin to ordinary foods (including products for children under five years of age) and various types of foods for particular purposes (including infant formulae and medical and sports foods). The dossier does not contain a concrete recommendation for the daily use of bovine lactoferrin, but the applicant refers to the mean estimated intake of different age groups of the population. These estimates were based on Dutch food consumption data from 1998-1999. The mean consumption of bovine lactoferrin in infants aged up to six months is estimated at 1.2 gram per day. The mean consumption of bovine lactoferrin in infants over six months and children from 1 to 18 years of age is estimated at 1.9 gram per day. For adults, the mean consumption will be 1.4 gram per day. In the population of individuals above one year of age, intake varies in 'heavy users' (the 95th percentile) from 2.7 to 4.2 gram, depending on the age category examined.

The digestion of bovine lactoferrin does not appear to show any essential differences with that of other proteins in our diets. Bovine lactoferrin does, however, seem to be relatively resistant to breakdown in the gastrointestinal tract. There is no information available on absorption in human subjects.

In comparison with the total protein intake, the intended use of bovine lactoferrin corresponds with 1-4 % for people of one year and older and slightly more for infants. The novel ingredient contains iron with a maximum content of 0.25 mg per gram. According to the Committee, iron intake due to the consumption of bovine lactoferrin has no adverse effects on health, even for heavy users of the proposed products.

No adverse health effects were observed in laboratory animals treated with bovine lactoferrin. Although the substance tested in the toxicological studies originated from another company, according to the Committee it is representative of the product to be marketed by DMV International. The applicant provides the results of acute and sub-chronic toxicity studies performed on rats in which bovine lactoferrin was administered directly into the stomach. Based on the longest test period of 13 weeks, a NOAEL for bovine lactoferrin was determined, that is 2000 mg/kg bw/d, in accordance with the highest dose tested. Bovine lactoferrin showed no mutagenic effects in the Ames test. The applicant's estimates show that infants consume the most bovine lactoferrin per kg body weight. The mean exposure in this group is 210 mg/kg bw/d, which is lower than the highest dose tested in rats by around a

factor of ten. According to the Committee, it is not likely that babies will consume more than the proposed amounts. Also, in view of the nature of the ingredient, the Committee deems this safety margin adequate. This is further substantiated by the results of clinical trials performed with DMV's bovine lactoferrin. It appears that, during the first year of life, the iron homeostasis, growth and health of infants is not adversely affected if bovine lactoferrin is consumed in quantities comparable with those proposed in the current application. The Committee finds that the safety margins for the other age groups of the population vary from 10 to 50, based on the estimated intake of heavy users (the 95th percentile). Furthermore, the dossier describes the results of various studies performed on adults and children. Although most research has been performed on patients and was not set up to evaluate the safety of the product, the Committee has not found any evidence that bovine lactoferrin has adverse effects on health.

The extent of the current use of food supplements is unknown. In cases involving the fortification of foods with an ingredient, the Committee emphasizes that the proposed use must always be carefully weighed up in relation to the use of the same ingredient in food supplements. If it is assumed that the use of supplements results in a doubling of the mean daily intake of bovine lactoferrin, given the safety margins for adults, there is no reason to refuse marketing of foods enriched with bovine lactoferrin. The Committee finds this consideration more difficult in the case of children, and particularly young children, but even still, there is a safety factor of around 10 relative to the highest tested dosage in rats.

The applicant does not consider bovine lactoferrin to be a major allergenic protein and is of the opinion that it is not involved in the development of various autoimmune diseases. The Committee is not concerned about bovine lactoferrin having adverse immunological effects, provided it is adequately labelled as cow's milk protein.

Based on data on the nature of the ingredient and the related nutritional information, in combination with the results from the available studies performed on human and experimental animals, the Committee finds that bovine lactoferrin can be safely used as a food ingredient for infants. The safety of bovine lactoferrin for the use as proposed by the applicant, has been adequately substantiated for adults and children older than one year, as well. In its final assessment, the Committee has also considered the fact that the applicant proposes the fortification of a wide variety of products with bovine lactoferrin. If this is permitted, it will mean that milk proteins will be added to products that have so far been free from these substances. In addition to the presence of lactoferrin, the presence of milk protein as a possible allergen will also have to be stated on the labels of such products. The Committee emphasises that the safety assurance of these novel products for consumers with a cow's milk allergy will depend on the correct application of, and compliance with, labelling obligations for known allergens.

1 Introduction

The Novel Foods Unit of the Medicines Evaluation Board advises the Dutch Minister of Health, Welfare and Sport on the safety of novel foods and food ingredients. This advisory role is part of the European authorisation procedure for novel foods and food ingredients laid down in EU Regulation 258/97 (EC97). This document is the report of a so-called 'initial assessment' in accordance with this procedure, of the safety for the consumer of the food ingredient 'bovine lactoferrin'. According to the applicant 'TNO Quality of life', bovine lactoferrin was not used as an ingredient in food, with the exception of food supplements, prior to 15 May 1997, when the regulation came into effect. TNO therefore requests permission, on behalf of the manufacturer DMV International, to market various types of foods to which bovine lactoferrin has been added, in accordance with the above-mentioned legislation. The report on the safety assessment was drawn up by the Novel Foods Unit. This report has been reviewed by the Committee on the Safety Assessment of Novel Foods, hereinafter referred to as 'the Committee'. The members of the Committee are listed in one of the appendices of this report.

Lactoferrin is a protein that occurs naturally in mammals and that plays a role in certain processes in the body. However, the health-promoting effect the applicant claims on this basis has not been evaluated by the Committee. The Committee emphasizes that this is not a part of this safety assessment.

The assessment procedure took the following course. The applicant submitted the dossier evaluating the safety of the novel product (TNO08) in December 2008. The dossier was discussed by the Committee in various plenary meetings held in 2009, and by a working group from the Committee in more detail on 9 April 2009. Additional information was requested a number of times during this period (TNO09, TNO09a, TNO09b). The most important questions concerned the iron content, the test substance used in the studies performed on laboratory animals and the extent of the use of food supplements containing bovine lactoferrin. The applicant was also asked to explain some immunological themes in more detail. The Novel Foods Unit received the latest answer from the applicant (TNO09b) on 3 November 2009. After discussing it in the plenary meeting held on 1 December 2009, the Committee completed the assessment. The Committee finalized the report with its findings in the plenary meeting held on 2 March 2010.

2 Completeness and accuracy of the dossier

2.1 Administrative details

The Dutch company DMV International located in Veghel, the Netherlands, is the manufacturer of the novel ingredient in question. TNO Quality of life (Department Food and Chemical Risk Analysis) located in Zeist, the Netherlands, is acting as applicant on behalf of the company.

2.2 General description of the food ingredient

Lactoferrin is a protein that occurs naturally in cow's milk. In this report, the term 'bovine lactoferrin' is used to distinguish it from the lactoferrin that occurs in humans. The applicant wishes to market bovine lactoferrin in its purified form. The product will not be directly available to consumers, but will be processed in ordinary foods (including products for young children) and various types of foods for special purposes (including infant formulae and medical and sports foods).

2.3 Classification of the food ingredient for assessment

The Committee agrees with the applicant on the point that the novel ingredient falls under category e 'foods and food ingredients consisting of or isolated from plants or animals' as referred to in article 1 (2) of the European Regulation 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients (EC97). Part I of European Commission's Recommendation 97/618/EC (EC97a) distinguishes between six classes of novel foods and food ingredients to facilitate assessment of the safety and nutritional aspects of these substances. The applicant places the product in class 2 which is described as a class of complex novel foods and food ingredients from non-genetically modified organisms. Within this class, the product falls under subclass 2.1 because the source has already been used for foods within the European Community. The Committee points out that the product could also be considered a simple mixture, that is, a mixture of chemically-defined substances. In that case, it would fall under subclass 1.1. However, this has no consequences for the safety assessment; the themes the Committee has evaluated are the same for novel products from class 1 or class 2.

2.4 Collection of information regarding the food ingredient

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

- I Specification of the novel food ingredient
- II Effects of the production process applied to the food ingredient
- III History of the organism used as the source of the food ingredient
- IX Anticipated intake and extent of use of the food ingredient

- X Information from previous human exposure to the food ingredient or its source
- XI Nutritional information on the food ingredient
- XII Microbiological information on the food ingredient
- XIII Toxicological information on the food ingredient

The applicant discusses each of these themes in an orderly manner, and refers to appendices or scientific articles for the data used. The dossier, along with the additional data, contains sufficient information to enable the safety of the novel ingredient to be assessed. Furthermore, the Committee has consulted the scientific literature and taken the reports of other member states regarding an earlier application for bovine lactoferrin into consideration. This application from the firm Biopole S.A. was submitted in Belgium in August 2007, see: http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/app_list_en.pdf .

2.5 Brief summary provided by the applicant

The dossier contains a summary that has been sent to the other EU member states, as required by Article 6 (2) of EU Regulation 258/97 (EC97). The summary is appended to this report.

2.6 Other assessments

The applicant states that bovine lactoferrin, produced by DMV International, has the 'Generally Recognized As Safe' (GRAS) status (FDA01) in the United States (US). This concerns its use in sports and functional foods, a single portion of which contains 100 mg bovine lactoferrin. The safety dossier submitted in the US in 2001 forms the basis of this current novel food ingredient application.

Moreover, the Committee mentions another application of DMV's product in the foods industry with the GRAS status. Because bovine lactoferrin has antibacterial properties, it can be used to disinfect beef; for more information see the GRN numbers 67 and 130 on the FDA website: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=grasListing>.

2.7 The applicant's labelling proposal

The producer DMV International will clearly state on the label that the source of bovine lactoferrin is milk. Manufacturers that process bovine lactoferrin in foods must also state on the packaging that this ingredient originates from milk in conformity with EU Directive 2003/89/EC concerning the obligation to mention allergens on the label. Foods must, in general, be labelled in accordance with EU Directive 2000/13/EC (of which the above-mentioned Directive is an amendment) on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs, and with Article 8 of EU Regulation 258/97 (EC97). In the Netherlands, labelling proposals are discussed in the Regular Consultation on the Commodities Act. This is why the Committee's safety assessment does not include an evaluation of the label.

3 Interpretation and evaluation of the data submitted

3.1 I Specification of the novel food ingredient

The applicant specifies the novel product as follows, the contents being expressed as percentage by weight. The protein content is at least 93 %, at least 95 % of which is bovine lactoferrin¹. The product does not contain more than 4.5 % of water or 1 % ash. The total heavy metal content (expressed as lead) is less than 1 mg/kg.

The applicant describes the structure of bovine lactoferrin. It is an iron-binding protein which is glycosylated, that is, to which sugar groups are linked, and it consists of a single polypeptide chain. The sequence of the amino acids which make up this chain (approx. 700 in all) is known. The protein does not contain any free sulphhydryl groups but it does have intramolecular disulphide bonds. The dossier also contains information about the properties of the bound sugar groups and the iron-binding sites. The physical and chemical properties are given in a separate table. Certain chemical properties vary with the amount of bound iron. Usually the novel product contains 120 mg iron per kg.

The analytical data from six production lots, produced between December 2007 and August 2008, show that the protein content varies from 96.6 to 97.8 %. The moisture content fluctuates around 3 %. The ash content does not exceed 0.3 %. The Committee finds that the composition is consistent and that it meets the specified values. Bovine lactoferrin makes up at least 91.8% of the lots described. The protein in the novel product contains a maximum of 5 % of proteins other than bovine lactoferrin but there is no detailed information in the dossier on this point. The applicant does, however, report under the theme 'allergenicity' in the chapter with toxicological information, that small quantities of other milk proteins may be present. The most important of these are casein and beta-lactoglobulin. In addition, Appendix A 'Nutritional information' of the dossier also mentions alpha-lactalbumin.

The original dossier contains no information on the extent to which iron intake could fluctuate on the use of bovine lactoferrin originating from various production lots. At the request of the Committee, the applicant provided data on the iron content of individual production lots (TNO09b). For three lots from the period 2006-2008 this was between 101 and 216 mg/kg and, for 11 lots from 2009, individual values of around 140 mg/kg were reported. The applicant will include an upper limit of 250 mg iron per kg in the specification.

The applicant provides no information on heavy metals in the test lots but, according to the Committee, the upper limits specified for cadmium (<0.02 mg/kg), lead (<0.2 mg/kg), arsenic (<0.2 mg/kg), mercury (<0.01 mg/kg) and copper (<1.5 mg/kg) for the novel ingredient are sufficiently low. It bases this on the estimated intake in relation to the 'Tolerable Daily Intake' values from the literature on the individual heavy metals (Baa01).

The Committee concludes that the product information gives a reliable representation of

¹ In this report, the term 'bovine lactoferrin' is used both for the protein itself and for the novel product including small quantities of other compounds. If necessary, this distinction will be made explicitly.

the composition of the novel ingredient to be marketed. The ingredient does not contain any contaminants that have adverse effects on health.

3.2 II Effects of the production process applied to the food ingredient

The dossier describes how bovine lactoferrin is isolated from milk and milk derivatives. The quality of the basic products is the same as that of milk intended for human consumption. In the first phase of the production process the protein is adsorbed onto a certain carrier material and then eluted. The solution obtained is subsequently filtered a number of times. Ultimately the bovine lactoferrin is dried by means of spraying. Excessively large powder particles are sieved out before the bovine lactoferrin is packaged in special bags. The applicant refers those requiring more details about the process to the public US Patent 5596082.

The applicant analyzed the chemical and microbiological quality during long-term storage of seven lots from the production period June 2004 to March 2007. The bovine lactoferrin content of the starting material was at least 95 % of the total quantity of protein, and after 8 to 41 months this content was between 91 and 98 %. According to the applicant, the native (natural) form is retained, but this is not further substantiated. Other results from this stability study relating to important properties such as solubility, moisture content, and ash content are also provided. The applicant concludes that the product in the prescribed packaging remains stable for a storage period of at least 3.5 years when refrigerated. A lot from 2001, which was stored in an ordinary plastic bag at room temperature, still contained 95.3 % bovine lactoferrin (of the total protein) after six years. This product did, however, contain relatively more moisture. The iron-binding capacity of the products in both stability studies was unchanged.

The information in the dossier on the stability of bovine lactoferrin in the proposed foods (end products) is limited to laboratory research into the optimum conditions for preventing denaturation² as a result of heat treatment. Based on the applicant's own results for some of the most important applications, and data from third parties, the applicant concludes that the native form of the incorporated bovine lactoferrin can be retained during the production of, for example, milk, yoghurt and infant formulae.

The Committee concludes that the bovine lactoferrin is produced with techniques commonly used in the dairy industry. According to the applicant, certified procedures (ISO 9000:2000 and Hazard Analysis Critical Control Points, HACCP) are used to monitor the quality of production. The production plant has also been approved for the production of dairy products in conformity with Regulation (EC) no. 853/2004 which lays down specific hygiene rules for food of animal origin. The dossier does not contain any documentation on the quality systems, but the Committee has no reason to doubt the safety of the production process.

² Loss of spatial molecular structure and related properties.

The Committee agrees with the applicant that the stability of the bovine lactoferrin in the novel product is guaranteed for a long period. The Committee has examined the physical and chemical factors that are involved in the denaturation of bovine lactoferrin (TNO09). According to the Committee, in the event of reduced stability, no breakdown products are formed other than denatured bovine lactoferrin. It has no reasons to expect that the denatured protein will pose a greater risk to consumer's health compared to the native form. The Committee considers therefore native bovine lactoferrin to be potentially more harmful and, for the safety assessment, assumes that all bovine lactoferrin that is added to foods will be of the native form. Stability data on bovine lactoferrin in the various end products are therefore irrelevant.

3.3 III History of the organism used as the source of the food ingredient

The applicant uses milk from healthy cows (*Bos bovis*). This milk meets all the relevant, applicable Dutch and European legislation.

According to the Committee, this information on the origin of the novel ingredient is adequate.

3.4 IX Anticipated intake and extent of use of the food ingredient

According to the applicant, everyone's health will benefit from the consumption of bovine lactoferrin. The applicant is therefore aiming to use the novel product in a wide range of foods. The novel ingredient will be added to foods for particular nutritional uses, that is food for infants and young children, dietary food for special medical purposes and sports nutrition. Other applications that the applicant has in mind include ordinary foods such as non-alcoholic beverages, cakes and pastries, products derived from cheese, milk-based products, cold snacks and sweets. Page 28 of the dossier shows a list of the proposed product groups with the maximum levels of bovine lactoferrin, expressed in mg per 100 gram end product. For the foods in solid form, this varies from 670 for baby foods and follow-on foods for toddlers to 4000 for energy bars for sportsmen and women. The proposed concentrations of bovine lactoferrin in mg/100g for the various liquid products are: 100 for infant formulae, 120 for non-alcoholic beverages, 125 for food for special medical purposes, 200 for dairy products (and follow-on formulae for toddlers) and 300 for beverages for sports people.

The applicant has investigated the future use of the novel ingredient extensively and for infants from 0-6 months, has assumed a mean requirement of 1.2 litres of milk per day, which corresponds with 1.2 g bovine lactoferrin. For older babies, the applicant makes use of Dutch research into the intake of foods in young toddlers performed in 2002. The mean estimated total quantity of bovine lactoferrin that babies of 8-10 months of age consume with milk, milk products and all sorts of weaning foods amounts to 1.9 g per day (TNO09).

In order to estimate the intake of other groups in the population (older than one year) the applicant has made use of individual consumption data collected in the databank of the Dutch national food consumption surveys. The most recent study carried out amongst the general Dutch population dates from 1997-1998 and is based on records in food diaries over a two-day

period. A detailed description of the foods within each product category included in these calculations is incorporated in the dossier in Annex A1 of Appendix A 'Nutritional information'. The mean daily intake for the total population (>1 year) is 1.5 g bovine lactoferrin per person. The dossier also contains a summary of the results for various groups of the population divided according to age and gender in Table 2.2.3a of Appendix A 'Nutritional information'. The figures provided originate from the entire group (*all persons*), because everyone had consumed at least one of the foods examined. A negligibly small number of non-users in the adult group (<1%) was left out of consideration. The estimate of the mean intake is lowest in adult women (aged 19 and above), that is 1.4 g/person/day and highest in boys of 10-18 years of age, that is 2.3 g/person/day. In the relatively small group of pregnant women (around 1 % of all adults) the mean consumption of bovine lactoferrin was in between these two figures.

The applicant also gives the calculated figures for the 50th, 95th and 97.5th percentile of the intake; these are explained below for the 95th percentile. The groups of young children (aged from 1-3), girls aged 4-9, and adult women have the lowest intake, which varies from 2.7 to 2.8 g/person/day. Boys of 10-18 years of age again score the highest, with an intake of 4.2 g/person/day (TNO09). The scenario sketched by the applicant shows that exposure to bovine lactoferrin, expressed per kg body weight, is lowest in adults. The mean value is around 19 mg/kg/day, and for the 95th percentile around 39 mg/kg/day. There is little difference between men and women. Children consume much more bovine lactoferrin, relatively speaking. For the group examined in the 1-3 age group, the mean estimate was 124 mg/kg/day and for the 95th percentile 203 mg/kg/day. As an indication of the mean exposure for the very youngest members of the population (0-12 months) the applicant gives a value of almost twice as much of around 210 mg/kg/day, on the basis of reference body weights.

In general, it appears that half the bovine lactoferrin consumption can be attributed to the use of milk and milk products. The applicant concludes that this, in combination with the categories 'non-alcoholic beverages' and 'cakes and pastries', contributes about 70 % of the daily intake of bovine lactoferrin from the range of foods investigated.

The Committee is of the opinion that the applicant has carried out sound research into the possible intake of bovine lactoferrin. A varied product range was examined and this has been clearly described. It has been firmly established that children are subject to the highest exposure, per kg of body weight. The Committee realises that the calculated bovine lactoferrin intake exceeds the actual intake, because during the studies it was assumed that consumers only consume the foods under investigation, which contain bovine lactoferrin (at the maximum levels), in their current eating pattern. But on the other hand, it is possible that its use in specific product groups has been expanded over time, as has been the case with sugar-free soft drinks and fruit juices amongst teenagers and young adults in particular (HCN01). Furthermore, the consumption study for sports food and beverages at the time was based on a very limited number of products. Although the consumption study was representative of the Dutch population at the time, it is not known whether the results can be extrapolated to the current population, particularly for specific product categories.

The applicant does not make clear the extent to which the estimated consumption is representative of other EU member states. The Committee points, for example, to the use of

dairy products, which varies considerably between the individual EU member states (see also Table 2.1 of Appendix A 'Nutritional information').

The novel ingredient is already used in food supplements in the EU. Although, according to the applicant, these products do not fall under the novel foods regulation (EC97), the Committee finds that exposure by means of these specific products would be highly relevant for safety assessment. In fact, it cannot be ruled out that a lactoferrin supplement will be used in combination with foods to which bovine lactoferrin has been added³. Additional information with sales data relating to one of DMV International's own products shows that the proposed daily use of 160 mg bovine lactoferrin by teenagers to improve the skin contributes relatively little to the total intake described above (corresponding to an exposure of 3-4 mg/kg/day) (DMV09, TNO09b). The total extent of the current use of supplements with bovine lactoferrin from different manufacturers is, however, not clear.

3.5 X Information from previous human exposure to the food ingredient or its source

3.5.1 Current exposure

Bovine lactoferrin occurs naturally in small quantities in cow's milk. According to the applicant, the mean concentration is around 100 mg per litre⁴. Based on data on the consumption of milk and milk products, the applicant concludes that the mean consumption for Dutch people (above the age of 1) is around 40 mg bovine lactoferrin. For Scandinavian countries, this figure is comparable or slightly higher, but there is no data available for most South European countries. The mean intake in Dutch infants of around 9 months is 63 mg bovine lactoferrin per day. The dossier also contains data on the population of the US (above the age of 2) which show that bovine lactoferrin intake can amount to 100 mg per day (95th percentile). This is calculated on the basis of consumption data from 1994-1998, in which dairy products and whey proteins, which are added to all sorts of foods as an ingredient, were combined as a source of bovine lactoferrin (FDA01).

Although the applicant does not discuss this, the Committee assumes that most, if not all, bovine lactoferrin is denatured during the usual sterilization and pasteurization of dairy products. Consumption research in France indicates that the mean intake of native bovine lactoferrin of around 5.3 mg per day originates from raw milk and cheeses produced from raw milk (AFS08). According to the Committee, the current daily diet in general contains little, if any, native bovine lactoferrin.

The Committee points out that there are food supplements containing native bovine lactoferrin, manufactured by various firms, available in the EU. The applicant refers to

³ In the Netherlands, food supplements are available that recommend 400 mg bovine lactoferrin twice a day, see http://www.aov.nl/producten/overige_preparaten/lactoferrine_400_mg/.

⁴ The Committee concludes that the bovine lactoferrin content of cow's milk can vary considerably. Yamauchi reports 100-400 mg per litre cow's milk (Yam00). According to Australian experts, this figure is between 20 and 200 mg per litre (http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/Novel%20Foods%20-%20Record%20of%20views%20Oct%2009%20Update%20_2_.pdf).

supplements with daily dosages of up to 1200 mg bovine lactoferrin on the market in the US. However, there is no consumption data or registration of any user complaints.

3.5.2 Research involving human subjects

The dossier includes 30 very different types of studies with bovine lactoferrin in human subjects, in Annex A2 of Appendix A 'Nutritional information'. The summaries in the overview have been clearly structured according to research group (TNO09a). According to the applicant, there was no mention of any adverse effects in any of these studies, all of which were published in scientific journals.

The Committee notes that all of these studies, with one exception, used lactoferrin products from companies other than the current applicant. All studies investigated the presumed efficacy and none of these was set up to evaluate safety.

Infants

According to the Committee, the study published by King in 2007 is essential for the current assessment because DMV International's own product was used (Kin07). This study is a double-blind, placebo-controlled intervention study in infants born after a pregnancy of at least 34 weeks and with a body weight of at least 2 kg. The milk fed to 79 babies throughout the first year of life consisted exclusively of formula. The infant formula given to those in the experimental group contained added bovine lactoferrin giving a total concentration of 850 mg/L. The infant formula of the control group contained 102 mg bovine lactoferrin per litre (a standard commercial product). During the use of the products, the growth of the babies, based on body weight, length and head circumference, was determined regularly. When the babies were around 9 and 12 months old, blood was also taken. The following haematological characteristics were determined: haemoglobin, haematocrit value and the mean size of red blood cells (median corpuscular volume). Moreover, the concentrations of specific antibodies were measured, that is, those against diphtheria, tetanus, Hepatitis B and *Haemophilus influenzae b.*, in order to evaluate the response to the usual vaccinations. The frequency and duration of any of the usual children's illnesses, such as diarrhoea, respiratory infections and middle ear infections (*otitis media*) that arose were recorded. The committee concludes that the investigation has been performed soundly and the results published are reported clearly and reliably. There were no statistically-significant differences between the two groups of infants that were relevant for the safety assessment. The researchers note that the research groups were relatively small; at the completion of the study there were 26 children left in each group. Given the thorough nature of the study, however, the Committee is of the opinion that there are sufficient data to conclude that long-term consumption of bovine lactoferrin, in quantities comparable to those in the current application, does not adversely affect the growth or health of infants.

According to the Committee, the seven other studies with bovine lactoferrin in infants included in the dossier (published before 1994), are not directly relevant for the safety assessment because only efficacy was evaluated. In five of these studies, iron homeostasis and iron retention was examined, and in two, the intestinal microbiota. The Committee has

no comments on these studies. In section 3.6, the Committee explains that it does not anticipate any problems with the extra iron intake as a result of the novel ingredient.

Children

The applicant describes three studies in children. In one of these studies, six children who had problems with recurrent pharyngitis, were treated every day with 300 mg bovine lactoferrin for 15 days prior to having their tonsils removed (tonsillectomy). The Committee has not inspected these data because only the tonsil tissue removed was examined. As regards healthy young children, the Committee finds the study carried out by Ochoa (2008), in which 500 mg bovine lactoferrin was taken on a daily basis for a period of 9 months, the most relevant (double-blind, placebo-controlled). The groups were, however, relatively small at the start of the study, that is, each containing 26 children of one to three years of age. According to the researchers, no adverse effects arose. Although the other study carried out by Egashira (2007) concerned a much larger group of children under five years of age, who received 100 mg on a daily basis, this was not taken into consideration by the Committee because only a summary was available.

Adults

Of the 19 studies performed on adults, four were carried out with healthy volunteers. The highest dosage in this study was 1.8 or 2 g bovine lactoferrin, taken every day for 4 to 8 weeks. The fact that such treatments are tolerated without problems was also apparent from the study carried out in adults with athlete's foot. One group of 14 adults received 0.6 g bovine lactoferrin per day for 8 weeks and another group of 12 subjects received 2 g/day for the same period. The applicant has included this study with the patient studies, but apart from the above-mentioned complaint, the individuals were completely healthy.

The 14 other studies were performed on adults who were patients, mostly with *Helicobacter pylori* infections or with chronic hepatitis C. In the patients with chronic hepatitis C, the exposure regimes examined were comparable to those described above for healthy individuals, but involved also higher daily dosages, that is 3.6 g (three studies) and 7.6 g (one study). In most other studies performed on patients, including those with *Helicobacter pylori* infections, daily doses of 200 mg bovine lactoferrin were administered for a period that varied from 7 days to 12 weeks. Based on the study carried out by Okada in 2002, the applicant concludes that 7.2 g bovine lactoferrin taken every day for 8 weeks is safe for adults. The Committee notes that the test subjects here were chronically-sick people and that there are no data for these dosages in healthy individuals. This is, however, the only study in which adverse effects were systematically recorded. The study report shows that three of the 15 patients treated with 7.2 g/day, and one patient with 3.6 g/day, experienced slight to moderate adverse effects. These adverse effects comprised skin eruptions, a loss of appetite, constipation and diarrhoea. They were of a transient nature and were not accompanied by clinically-relevant deviations in the laboratory values (blood tests). There were no serious adverse effects.

The Committee concludes that, in general, no clear complaints arise on the daily consumption of bovine lactoferrin, in the quantities proposed in this application, for several

months. Because of its antibacterial properties, it is not inconceivable that bovine lactoferrin has consequences for the composition of the microbiota in the gastrointestinal tract. Although the data on this theme in infants and young children are limited, and no information for adults has been provided, the Committee finds no indications that the novel ingredient is harmful to intestinal microbiota. On the basis of the total available results for studies relating to humans, the Committee concludes that there is no reason for concern regarding the use of bovine lactoferrin in its natural form. There are no large-scale safety studies of this product in healthy people to substantiate this.

3.6 XI Nutritional information on the food ingredient

The applicant has summarized the nutritional information in Appendix A of the dossier. Lactoferrin is an iron-binding protein that belongs to the family of transferrins. It is a component of mammalian milk. Furthermore, lactoferrin, which is naturally produced by the body, also occurs in mucosal secretions such as tears and saliva, and in special blood cells, known as neutrophils. The lactoferrin in the human circulatory system originates from these neutrophils. Because of its antimicrobial and anti-inflammatory properties, human lactoferrin can be considered a component of our innate immune system.

With the extra consumption of bovine lactoferrin, the applicant intends to supplement the lactoferrin occurring naturally in the body. The dossier states that around 70% of the amino acid sequence of bovine lactoferrin corresponds to that of human lactoferrin, and that there are differences in the glycosylation of the two proteins. The Committee finds that the digestion products of bovine and human lactoferrins in humans will not be completely equivalent given that the peptides formed differ in type and activity, particularly as a result of conversion by microbial enzymes in the colon.

The Committee has compared the nutritional value of bovine lactoferrin as a protein with the total protein intake in the various age groups of the Dutch population (http://www.rivm.nl/vcp_en/). Relatively speaking, this is highest for infants; 5 to 10 % of the protein they consume is in the form of bovine lactoferrin. This is based on the requirements for the composition of infant formulae in EU Directive 2006/141 (EC06) and the applicant's proposal for a use level of 1 g bovine lactoferrin per litre of formula. According to the applicant, this is comparable with mother's milk, which contains 1-4 g human lactoferrin per litre. For the other groups of the population, the intended use of bovine lactoferrin corresponds roughly with 1 to 4 % of the total protein intake, depending on age and gender.

The novel ingredient contains iron, in the form of reversibly bound Fe^{3+} , with a maximum content of 250 mg per kg. At the request of the Committee, the applicant has laid down this latter content in the specification described in section 3.1 (TNO09b). This means that the proposed quantity of 1 g bovine lactoferrin per litre of infant formula or follow-on formula contains a maximum of 0.25 mg iron. This corresponds with around 2 to 3 % of the maximum acceptable level of iron in this type of formula as laid down in Directive 2006/141. A significant study which, according to the Committee, substantiates the fact that iron homeostasis is not adversely affected, was performed on infants who received bovine lactoferrin for 12 months (Kin07). This shows that the haemoglobin and haematocrit values

do not change under the influence of the novel ingredient (see section 3.5.2 for more information). The iron intake of other users is usually around 0.14 mg per gram of bovine lactoferrin, but never more than 0.25 mg iron. In the worst case scenario that the applicant sketches, young men consume more than 4 gram bovine lactoferrin per day, which could involve the consumption of one mg of iron. In the light of the 6 to 13 mg iron that Dutch people, depending on age and gender, consume on a daily basis with their ordinary diet, the Committee concludes that the extra iron consumed with bovine lactoferrin does not entail any adverse effects.

Digestion and absorption

The applicant discusses at length the physiological processes in adults and infants, also covering the differences and similarities between human and bovine lactoferrin, and those between humans and laboratory animals. In its evaluation, the Committee has, in theory, restricted itself to the information on bovine lactoferrin in people. The breakdown of protein in the gastrointestinal tract depends on age because the intestines are not fully developed at birth. It appears that bovine lactoferrin is broken down relatively slowly in newly-born human babies, just as it is in piglets and baby monkeys. As a result of incomplete proteolysis by enzymes from the stomach and pancreas, biologically-active fragments of bovine lactoferrin, as well as the intact molecule, can reach the intestine, according to the applicant. This has been shown in studies of faeces of infants, but the Committee concludes that there are no such figures available for adults. The applicant is of the opinion that there is sufficient evidence that intact lactoferrin is absorbed into the blood of human babies and young animals. According to the Committee, however, this concerns lactoferrin of the subject's own species (via mother's milk). The dossier does not contain any information to show that bovine lactoferrin is absorbed in infants. Absorption has been shown however, in laboratory animals with a fully mature gastrointestinal tract. For this, the applicant refers to a study carried out by Fischer (2007) with adult mice that received 1 mg bovine lactoferrin administered directly into the stomach. Intact bovine lactoferrin appeared in their blood less than 10 minutes later. According to the researchers, besides the liver, the spleen and kidneys also have a role in the clearance of circulating bovine lactoferrin. The applicant is not aware of any studies of the absorption and metabolism of bovine lactoferrin in adult humans.

The Committee has no reason to assume that the digestion of bovine lactoferrin differs essentially from that of other proteins in our diets. It does, however, seem as though bovine lactoferrin is relatively resistant to proteolytic enzymes in the gastrointestinal tract. The Committee acknowledges that information on absorption in humans is not available.

3.7 XII Microbiological information on the food ingredient

The careful production of the novel ingredient prevents contamination with microorganisms, according to the applicant. Moreover, the HACCP system used guarantees the microbial safety of the product. The applicant has performed tests on several undesirable microorganisms. The results provided of six production lots from 2007-2008 meet the limit

values specified by the applicant. On the basis of the limit values used, the Committee does not anticipate any problems regarding food safety.

3.8 XIII Toxicological information on the food ingredient

The applicant has included the toxicological and immunological data in Appendix B of the dossier.

3.8.1 Preclinical toxicological research

The applicant has performed acute and subchronic studies on rats and mutagenicity studies on bacteria. The Committee discusses the most significant data below. The Committee does not consider the other laboratory animal studies presented in the dossier on digestion and absorption as true toxicokinetic studies. Accordingly, these are evaluated in section 3.6.

Almost all toxicological studies were carried out using bovine lactoferrin originating from Morinaga Milk Industry Co. (Japan). The applicant explains that this Japanese firm uses milk from the EU as source material for the production of bovine lactoferrin (TNO09b). The iron content in the test substance is below the upper limit used by the applicant (see section 3.1). The bovine lactoferrin content of this product is at least as high as that of DMV's product but no information is provided concerning the composition of the other milk proteins. The Committee does, however, agree with the applicant that the test substance is representative for the product DMV International wishes to market. It bases this conclusion on the specification of the Japanese firm's product and the data available on the production methods (TNO09b) which show no differences that are significant from the safety point of view.

The dossier contains the negative results of a standard mutagenicity test with four strains of *Salmonella typhimurium* and one strain of *Escherichia coli*. According to the Committee, this suffices to rule out mutagenicity, given the nature of the novel ingredient.

In the toxicological studies with rats presented in the dossier, the bovine lactoferrin was administered directly into the stomach. The control animals received water, administered in the same manner.

The acute toxicity in rats was tested after a single dose of 2 g bovine lactoferrin per kg body weight. The animals were autopsied 14 days later. No adverse effects were observed. Furthermore, a 28-day toxicological study was performed on rats administered with daily doses of 0, 200, 600 or 2000 mg bovine lactoferrin per kg body weight. The methodology and extensive analysis of standard characteristics was largely comparable with the 13-week study described below. According to the applicant, no treatment-related effects occurred. The Committee notes that in the 28-day study the test substance was not specified. Only the summaries of these studies have been included in the novel food ingredient dossier.

In the subchronic study, rats were exposed to 0, 200, 600 or 2000 mg bovine lactoferrin (dissolved in water) per kg body weight per day for a period of 13 weeks. Each group consisted of 12 males and 12 females. In the daily examinations carried out throughout the treatment period, attention was paid to various aspects, changes in behaviour and appearance in particular. The feed intake and body weight were determined twice a week. In

the sixth and last week, urine was collected over a 24-hour period for chemical analysis and the water intake was measured at the same time. The day after the last dosage, fasting blood was taken for analysis of standard biochemical (also for urine) and haematological characteristics. Subsequently the animals were sacrificed and examined for visible abnormalities⁵. The organs in the abdomen and thoracic cavity were weighed, as were the brain, pituitary gland and salivary glands. A large number of organs and tissues from both the highest dosage group and the control animals were microscopically examined. Additionally, the pancreas of the male rats in the other dosage groups was also examined. No clinical observations were reported that could be attributed to the test substance. The body weights, the results of the ophthalmic examination and the blood laboratory values (haematological and biochemical) of the treated groups did not differ significantly from the control group. Some significant differences were reported in the feed intake, organ weights and chemical analyses of the urine compared with the control animals but these were not related to the test substance. The afore-mentioned variation in certain urine laboratory values occurred only in males, and was neither dosage related nor consistent in time (6 vs.13 weeks). These findings were not accompanied by microscopic abnormalities in the kidney tissue or blood chemical values and are therefore, according to the applicant, not toxicologically relevant. The Committee agrees with this standpoint.

Furthermore, abnormalities were observed in the pancreas (fibrosis of the Islets of Langerhans). This fibrosis occurred in half of all the males in all the dosage groups, as opposed to a quarter of the males in the control group. The Committee agrees with the applicant that this is not related to the bovine lactoferrin treatment. The explanation of this phenomenon, which is not provided by the applicant, is that in male rats of the Sprague–Dawley strain used, these abnormalities can arise spontaneously as a result of aging (Ima07, Ima09). The fibrosis seems to be a regenerative change in response to small primary haemorrhages in the Islets of Langerhans that arise with decreased oestradiol levels in the serum of older male rats.

According to the applicant, the 13-week study was almost completely carried out in conformity with the international OECD Guideline no. 408 (1981), but there was no reference to a guideline in the protocol described in the research report itself. No 'Good Laboratory Practice' declaration was available (TNO09a, TNO09b). On the basis of the data published (Yam00), however, the Committee concludes that the study is of sufficient quality.

The Committee concludes that bovine lactoferrin does not cause any adverse effects in laboratory animals. It agrees with the applicant that none of the observed abnormalities can be attributed to the treatment with bovine lactoferrin. The 'No Observed Adverse Effect Level' (NOAEL) has therefore been justifiably fixed at 2000 mg/kg bw/d for both sexes. This is the highest dosage tested in the 13-week study. The applicant considers lactoferrin to be an endogenous compound and is of the opinion that the inter-species difference between

⁵ Incidental, visible dark-red patches were observed particularly in the lungs and stomachs of the rats in both subchronic studies. The Committee notes that these lesions were not accompanied by abnormalities in the tissue structure and were presumably caused by technical imperfections when the animals were dosed and sacrificed for autopsy.

human and rat does not have to be incorporated in the safety factor to calculate the safe upper intake level. The Committee does not agree on this point because the limited data available on the digestion and absorption of bovine lactoferrin in human and rat cannot substantiate this. Moreover, the digestion of human lactoferrin in humans does actually differ from that of bovine lactoferrin (see section 3.6). Nor is it known whether the interaction of bovine lactoferrin with the lactoferrin receptors of human cells differs from that with the receptors of rat cells. The mean intended intake by infants of 210 mg/kg bw/d (see section 3.4) is around a factor of 10 lower than the NOAEL. The Committee finds this safety margin acceptable given the nature of the ingredient. Nor is it likely that babies will exceed the proposed level of consumption. In adults there is a difference of around a factor of 50 between the NOAEL and the 95th percentile of the intake (39 mg/kg bw/d) calculated on the basis of the selected product range. For young children (1-3 years) the mean estimated exposure is 124 mg/kg bw/d, and for the 95th percentile of the intake, 203 mg/kg bw/d. For such individuals, the safety margin is therefore between 10 and 16. The Committee deems this adequate.

3.8.2 Immunology

The applicant is of the opinion that the use of bovine lactoferrin entails no immunological risks and bases this on published studies performed with human subjects and several experts' opinions (TNO08, TNO09b).

Allergenicity. The studies presented showed that IgE antibodies against bovine lactoferrin were present in the blood of 40-50 % of people with a cow's milk allergy, in addition to antibodies specific to other milk proteins (Gau08, Nat04). Given the total data, the applicant concludes that bovine lactoferrin is not a 'major' allergen (TNO09b). Officially speaking, this is correct since an allergen is only termed a 'major' allergen if more than 50% of allergic patients have IgE antibodies against this specific allergen in their blood. In this context, the Committee refers to the previously-discussed study carried out with DMV's bovine lactoferrin on infants (see section 3.5.2) (Kin07). The results of the study, published in 2007, do not report any blood values for IgE antibodies against bovine lactoferrin. Further enquiries by the Committee revealed that the concentrations of these specific IgE antibodies could no longer be determined due to the lack of research material (TNO09b). The Committee deems this a missed opportunity given the scientific significance of this information on the allergenicity of bovine lactoferrin. If no IgE response takes place, particularly at a young age, this would substantiate the assumption that bovine lactoferrin is, indeed, not a strong allergen.

The applicant does not rule out the possibility that bovine lactoferrin is one of the allergenic milk proteins, but in the absence of oral provocation tests with bovine lactoferrin there is no evidence whatsoever to support this (TNO09b). For example, in certain cases reported, bovine lactoferrin is the only one of the cow's milk proteins examined against which IgE antibodies can be demonstrated in the blood of people who are allergic to cow's milk. This does not demonstrate indisputably that bovine lactoferrin is responsible for the clinical reaction. Taking everything into account, the applicant concludes that the data on the possible allergenicity of bovine lactoferrin are not unambiguous. The Committee agrees with

the applicant for the most part. It acknowledges that, given the methodological limits of the various studies, no causal relationship has been shown between the consumption of bovine lactoferrin and cow's milk allergy. But there are patients with a cow's milk allergy who have actually been sensitized to bovine lactoferrin given the specific antibodies in their blood. Furthermore, research has shown that bovine lactoferrin is almost as allergenic as some caseins (Nat04). Although the clinical relevance of this is not known, according to the Committee the possibility that bovine lactoferrin induces an allergic reaction cannot be ruled out. In order to warn people with a cow's milk allergy (and children with an increased risk of developing a cow's milk allergy) of this possible risk, the novel ingredient must be labelled as cow's milk protein (TNO08, TNO09b).

Labelling is required in any case because the novel ingredient contains small quantities of casein, beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin (see also section 3.1). These cow's milk proteins can cause an IgE-mediated allergic reaction in people (EFSA04). Cow's milk allergy occurs not frequently in adults, unlike children, and particularly young children. The Committee agrees with the applicant that it is sufficient to state 'contains cow's milk proteins' on the label of foods to which the novel ingredient is added to warn people with a cow's milk allergy (see also section 2.7). It emphasizes that the applicant will not add bovine lactoferrin to hypoallergenic infant formula (TNO09b).

The applicant expresses no opinion regarding the possible consequences of the proposed bovine lactoferrin consumption in people who are not, or not yet, allergic to cow's milk. The Committee realises that this fundamental question cannot be answered on the basis of clinical research, at least, not in the short or medium term. The Committee is, however, aware that adults can develop a cow's milk allergy as a response to normal daily exposure to dairy products (EFSA04) and that there are no indications that increased milk consumption leads to more sensitization in adults. It remains uncertain whether the increased exposure to bovine lactoferrin, native or otherwise, in the application proposed by the applicant will make more people oversensitive to cow's milk. However, the Committee does not find this in itself a reason to reject the use of bovine lactoferrin because there is an inevitable potential risk through sensitization for every novel protein with which an individual comes into contact.

The Committee draws attention to the sequence homology between ovotransferrin in chicken protein and bovine lactoferrin. It appears that 77 % of the amino acid sequence is similar (personal communication from Karin Hoffmann) (Jac08). People who are allergic to chicken's eggs have ovotransferrin-specific IgE antibodies in their blood. Insofar as the applicant has been able to ascertain, the cross-reactivity of these antibodies with bovine lactoferrin is not described anywhere (TNO09b). The question of whether bovine lactoferrin can induce an allergic reaction in people who are sensitized to ovotransferrin remains purely theoretical for the moment, given that no clinical association has been reported.

Summarizing, the Committee concludes that the information available on the allergenicity of bovine lactoferrin is very limited. The Committee agrees with the applicant that it has not been demonstrated that bovine lactoferrin can induce an allergic reaction.

Autoimmunity. Autoimmune antibodies against human lactoferrin are known to be involved in various types of chronic inflammation, such as rheumatism and inflammatory

intestinal diseases (Crohn's disease, ulcerative colitis). According to the Committee, a causal relationship has not been demonstrated and the applicant justifiably concludes that it is unlikely that bovine lactoferrin contributes to the development of autoimmune problems or diseases. The Committee also notes that scientists imply an association between oversensitivity to cow's milk proteins and the occurrence of specific autoimmune problems that cause type 1 diabetes (via inflammation of the Islets of Langerhans). This is currently being studied in young children in large-scale international studies (Gol08, TRI07, Vaa08). According to the applicant, it is not likely that the addition of extra bovine lactoferrin to infant formula will increase the probability of developing type 1 diabetes mellitus, because the total quantity of milk proteins only increases very slightly as a result (TNO09b). Moreover, the Committee has no evidence whatsoever that bovine lactoferrin might be involved in the development of the above-mentioned disease.

Immunomodulation. It is known that lactoferrin produced naturally by the human body can affect the immune system in various ways. In section 4 of Appendix A 'Nutritional information', the applicant has only explained the presumed beneficial effects of bovine lactoferrin and these are largely based on model studies. The Committee notes that bovine lactoferrin may not have the same biological activity as human lactoferrin in processes in which interactions with specific human receptors are important. Although the Committee has no indications that the daily consumption of bovine lactoferrin for many years is harmful to the human immune system, there are no data resulting from thorough research in healthy volunteers to substantiate this.

3.8.3 Conclusion

The results of studies involving human subjects, including those involving infants and children were evaluated in sections 3.5.2 and 3.6. Although the information concerning safety is limited, according to the Committee, there is no reason for concern. Neither is the Committee concerned that bovine lactoferrin, provided that it is adequately labelled as cow's milk protein, will have adverse immunological effects. The Committee concludes that the safety margins vary from 10 to 50. This is based on the highest exposure to bovine lactoferrin in the 13-week rat study in which no adverse effects were observed and on the estimated intake (95th percentile) of the various age groups of the population.

Literature / Literatuur

- AFS08 de l'Agence Française de sécurité sanitaire des aliments (*French Food Safety Agency*), report 2008-SA-0216 by the expert committee "Alimentation et nutrition humaines": <http://www.afssa.fr/Documents/NUT2008sa0216.pdf> .
- Baa01 Baars *et al*, 2001. Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. RIVM report 711701 025 (<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/711701025.pdf>)
- See also the recitals of Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities 2006; L364; 5-24.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20090701:EN:PDF>
(Zie ook de overwegingen in Verordening (EG) Nr. 1881/2006 van de commissie van 19 december 2006 tot vaststelling van de maximumgehalten aan bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen. Publicatieblad van de Europese Unie 2006; L364; 5-24, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20090701:NL:PDF>)
- DMV09 DMV International. Brochure: <http://www.dmv-international-news.com/assets/files/DMV-acne-away.pdf>
- EC97 Regulation (EC) No 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.
(Verordening (EG) nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad van 27 januari 1997 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedsel ingrediënten. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 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 and of the Council. Official Journal of the European Communities 1997; L253: 1-36.
(Aanbeveling (EG) nr. 97/618/EG 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 voedsel ingrediënten 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. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 1997; L253: 1-36)
- EC06 Commission Directive 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC. Official Journal of the European Communities 2006; L401:1-33.
(Richtlijn 2006/141/EG van de Commissie van 22 december 2006 inzake volledige zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding en tot wijziging van Richtlijn 1999/21/EG. Publicatieblad van de Europese Unie 2006; L401:1-33)
- EFSA04 European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies [NDA] on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. The EFSA Journal 2004; 32,1-197 (Available from http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/opinion_nda_04_en1.pdf)
- FDA01 Food and Drug Administration. Agency response letter GRAS Notice No. GRN 000077 concerning bovine lactoferrin of DMV International, August 14, 2001
(<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=grasListing>).

- Gau08 Gaudin JC, Rabesona H, Choiset Y, Yeretssian G, Chobert JM, Sakanyan V, Drouet M, Haertle T. Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to milk-specific proteins in allergic patients using microarrays. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 686-693. (This is included in the dossier)
- Gol08 Goldfarb MF. Relation of time of introduction of cow milk protein to an infant and risk of type-1 diabetes mellitus. *J Proteome Res* 2008; 7: 2165-2167.
- HCN01 Health Council of the Netherlands. Significant trends in food consumption in the Netherlands. The Hague: Health Council of the Netherlands, 2002; publication no. 2002/12
(<http://www.gezondheidsraad.nl/en/publications/significant-trends-food-consumption-netherlands>)
(Gezondheidsraad. Enkele belangrijke ontwikkelingen in de voedselconsumptie. Den Haag: Gezondheidsraad, 2002; publicatie nr 2002/12, pagina's 47-56: <http://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/02@12nr.pdf>)
- Ima07 Imaoka M, Satoh H, Furuhashi K. Age- and sex-related differences in spontaneous hemorrhage and fibrosis of the pancreatic islets in Sprague-Dawley rats. *Tox Path* 2007; 35: 388-394.
- Ima09 Imaoka M, Kato M, Tago S, Gotoh M, Satoh H, Manabe S. Effects of estradiol treatment and/or ovariectomy on spontaneous hemorrhagic lesions in the pancreatic islets of Sprague-Dawley rats. *Tox Path* 2009; 37: 218-226.
- Jac08 Jacobsen B, Hoffmann-Sommergruber K, Have TT, Foss N, Briza P, Oberhuber C, Radauer C, Alessandri S, Knulst AC, Fernandez-Rivas M, Barkholt V. The panel of egg allergens, Gal d 1 – Gal d 5: Their improved purification and characterization. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: S176-S185.
- Kin07 King JC, Cummings GE, Guo N, Trivedi L, Readmond BX, Keane V, Feigelman S, de Waard R. A double-blind, placebo-controlled, pilot study of bovine lactoferrin supplementation in bottle-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44: 245-251. (This is included in the dossier)
- Nat04 Natale M, Bisson C, Monti G, Peltran A, Garoffo LP, Valentini S, Fabris C, Bertino E, Coscia A, Conti A. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48: 363–369. (This is included in the additional information, see TNO09b)
- TNO08 Bovine Lactoferrin. Application for the request for authorization for the food ingredient lactoferrin under Regulation No. 258/97/EC. TNO Quality of Life (Zeist, The Netherlands), December 23, 2009.
This contains the complete safety file submitted to the FDA. The "Safety document bovine lactoferrin" is part of chapter titled Regulatory History.
(Dit bevat ook het complete veiligheidsdossier dat bij de FDA is ingediend. Het onderdeel "Safety document bovine lactoferrin" is opgenomen in het hoofdstuk "Regulatory History")
- TNO09 Additional information. Response to queries raised by the Novel Foods Unit (The Netherlands) dated February 26, 2009. TNO Quality of Life (Zeist, The Netherlands), March 19, 2009.
- TNO09a Additional information in reply to the request of the Dutch expert Committee dated March 26, 2009. TNO Quality of Life (Zeist, The Netherlands), April 8, 2009.

- TNO09b Additional information in reply to the request of the Dutch expert Committee dated July 2, 2009. TNO Quality of Life (Zeist, The Netherlands), September 2, 2009.
The e-mail with further clarification of replies to questions 2 and 4 was received November 3, 2009.
- Tom09 Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie* 2009; 91: 52-57. (This is included in the dossier as e-pub dated 10 June 2008).
- Tri07 TRIGR Study Group. Study design of the Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk (TRIGR). *Pediatr Diabetes* 2007; 8: 117-137 (see also <http://trigr.epi.usf.edu/> , and the scientific papers are available from http://trigr.epi.usf.edu/Publications_List.pdf).
- Vaa08 Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The "Perfect Storm" for type 1 diabetes the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* 2008; 57: 2555-2562.
- Yam00 Yamauchi K, Toida T, Nishimura S *et al.* 13-Week oral repeated administration toxicity study of bovine lactoferrin in rats. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 503-512. (This is included in the dossier)

The Committee/ De commissie

- Prof. dr. G.J. Mulder, *voorzitter / chairman*
emeritus hoogleraar toxicologie, Universiteit Leiden
professor emeritus of toxicology, Leiden University
- Prof. dr. C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, *adviseur / advisor*
hoogleraar dermatologie / allergologie; UMC Utrecht
professor of dermatology / allergology; University Medical Centre Utrecht
- Dr. ir. M. Dekker
levensmiddelentechnoloog; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
food technologist; Wageningen University and Research Centre
- Dr. Ir. E.J. Kok
toxicoloog; RIKILT Instituut voor Voedselveiligheid, Wageningen
toxicologist; RIKILT, Institute of Food Safety, Wageningen
- Dr. C.F. van Kreijl
moleculair-bioloog (gepensioneerd); RIVM Bilthoven
molecular biologist (retired); National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Dr. F.M. Nagengast
gastro-enteroloog; UMC St Radboud, Nijmegen
gastro-enterologist; University Medical Centre St Radboud, Nijmegen
- Dr. ir. J.M.A. van Raaij
voedingsfysioloog; Wageningen Universiteit en Researchcentrum; RIVM Bilthoven
food physiologist; Wageningen University and Research Centre; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Dr. G.J.A. Speijers
toxicoloog (gepensioneerd); RIVM Bilthoven
toxicologist (retired); National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Drs. A.I. Vilorio Alebesque, *adviseur / advisor*
Ministerie van VWS, Den Haag
Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague
- Prof. dr. W.M. de Vos (tot 31-12-2009)
hoogleraar microbiologie; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
professor of microbiology; Wageningen University and Research Centre
- Prof. dr. R.A. Woutersen
hoogleraar translationele toxicologie / toxicologisch patholoog; TNO Kwaliteit van Leven, Zeist
professor of translational toxicology / toxicologic pathologist; TNO Quality of Life, Zeist

Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen, CBG/ Novel Foods Unit, MEB

- Dr. C.M.A. van Rossum, *beoordelaar voedselveiligheid / scientific assessor food safety*
- Dr. M. Rutgers, *beoordelaar voedselveiligheid / scientific assessor food safety*
- Drs. E. van Galen, *hoofd BNV/ head NFU*
- Mr F. Zaidi, *management assistent/ management assistant*

Summary of the dossier / Samenvatting van het dossier

Level 1
Public summary

Summary and conclusions of the data according to the requirements of the Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and performed in conformance with the Commission Recommendation 97/618/EC for

Bovine Lactoferrin

DMV International
December 2008

Public summary

Scope of the dossier

Regulation No 258/97/EC of the European Parliament and of the Council on Novel Foods and Novel Food Ingredients applies to the placing on the market of foods or food ingredients, which have not hitherto been used for human consumption to a significant degree within the EU. A wide range of different Novel Foods and Novel Food Ingredients (NF) is covered by the scope of this Regulation. Their safety assessment requires a case-by-case approach embracing, among others, a toxicological assessment, a microbiological assessment and a nutritional assessment, taking into account the way in which the NF will be produced, processed, and used, and its potential intake.

DMV International intends to submit their product "Bovine Lactoferrin" as Novel Food Ingredient under Regulation (EC) No. 258/97 and Commission Recommendation 97/618/EC. The DMV International product name "Bovine Lactoferrin" will be abbreviated in this dossier and hereafter will be referred to as "bLF". This dossier provides a summary and evaluation of the data on bLF in the context of the above-mentioned Regulation and in conformance with Commission Recommendation 97/618/EC.

DMV International intends to market bLF with a purity of $\geq 95\%$ (typically 98%) bovine lactoferrin on protein basis. The content of protein in the product is minimal 93% (typically 96%).

DMV International intends to market the bLF product as ingredient for various foods in the EU for reasons of additional health benefits, covering infant nutrition, foods for special medical purposes, sports nutrition, meal replacers and foods for the general population (processed cheese, milk- and milk products, non-alcoholic drinks, cakes and pastries, cold snacks and small candy and candy bars).

Bovine lactoferrin has been consumed by humans for ages as a naturally occurring protein found in milk. In addition to dairy sources, bovine lactoferrin is currently marketed in the US and Europe as a dietary supplement. In 2001, bLF of DMV International was considered Generally Recognized As Safe (GRAS) as an ingredient in sports and functional foods at a level of 100 milligrams per product serving.

Identity and production process

Bovine lactoferrin is the common name for the iron-binding glycoprotein isolated from the bovine species. DMV International intends to market bLF with a purity of $\geq 95\%$ (typically 98%) bovine lactoferrin on protein basis. The content of protein in the product is minimal 93% (typically 96%). The remainder of the product consists of other milk proteins, salts (inorganic and organic) and moisture. bLF is obtained from milk and milk derivatives by common processes including ion exchange, filtration, spray drying and sieving.

Anticipated intake levels

The estimated mean intake of bLF from proposed enriched food products, based on all persons, is 1.4 g/d (19 mg/kg bw/d) for adults (pregnant women not included) and 1.9 g/d (73.4 mg/kg bw/d) for children (1 - 18 years old). High intake of bLF, indicated by the P95, ranges from 2.7 g/d for 1-3 year old children to ~~4.9~~ 4.2 g/d for 10-18 year old boys. Overall, the estimated intake of bovine lactoferrin per kg body weight decreases with increasing age.

Overall, the food groups “milk and milk products”, “non-alcohol drinks” and “cakes and pastries” together contribute for about 70% to the anticipated intake of bLF.

The estimated mean intake of bLF by infants is 1200 mg/d and 1868 mg/d for infants up to six and twelve months respectively. Based on 5.8 kg and 8.7 kg bodyweight of infants around 5 and 11 months the intake of bLF increases from 207 mg/kg bw/d to 214 mg/kg bw/d during the first year.

The background exposure of bovine lactoferrin, calculated based on Dutch consumption data as respectively 40 mg/d for the general public and 63 mg/d for infants of 9 months of age, was estimated to be approximately 3-5% of the total anticipated intake. For comparison, the mean background exposure as calculated in the GRAS dossier is 24 and 40 mg/d for adults and 1-12 year old children, respectively. Based on this and an expected overlap between the foods in which bovine lactoferrin is commonly present and the proposed enriched products, it is expected that the background exposure will not significantly influence the total intake of bovine lactoferrin.

Nutritional assessment

Studies on the fate of lactoferrin in the GI tract in human infants demonstrate that intact bovine lactoferrin may be found in feces, although in lower amounts than human lactoferrin in breast-fed infants. The amount of excreted lactoferrin decreases with age. Most lactoferrin appears to be degraded in the GI tract; for human lactoferrin, but not for bovine lactoferrin, there is some evidence that intact molecules are absorbed and subsequently excreted in the urine.

In adults, it has been shown that a substantial proportion of bovine lactoferrin survives gastric passage. Based on a study with recombinant human lactoferrin, it might be assumed that bovine lactoferrin is completely degraded during passage through the small intestine. Intact lactoferrin entering the colon is unlikely to originate from an exogenous, dietary source of lactoferrin. Fragments of lactoferrin that are formed during intestinal degradation may still have biological activity. The lactoferrin concentration found in plasma is probably representing endogenous lactoferrin, but data on absorption and metabolism of bovine lactoferrin in adults are lacking.

There is a body of evidence supporting that bovine lactoferrin is likely to have beneficial effects on human health, when consumed in doses in a similar range as may be achieved by enriching specific foods with bLF.

A number of studies have demonstrated an immunomodulating and anti-inflammatory effect of lactoferrin. Furthermore, lactoferrin is known to exert a broad-spectrum primary defence activity

against bacteria, fungi, protozoa and viruses through various mechanisms. It has been shown to improve symptoms of bacterial infections in the gastrointestinal tract, in infants as well as adults. Lactoferrin has been shown to inhibit the growth of pathogenic bacteria and to stimulate the growth of normal intestinal bacterial flora in mouse models. The effect of lactoferrin on the fecal microflora of infants varied across studies. It has been proposed that lactoferrin is involved in intestinal iron delivery.

Bovine lactoferrin was used in numerous clinical trials by both infants and adults that were designed to assess the effects on either iron absorption or modulation of microflora or infection. Although the performed studies were not designed to assess the safety of bLF, no adverse health effects as a result of bovine lactoferrin intake are reported in any of the studies. Also there are no indications of subjects discontinuing the study due to adverse reactions.

In studies with infants, bovine lactoferrin has been shown to be safe for consumption at doses up to 2.9 g/day for 14 days, or doses of 1.0 g/day up to 5 months. In studies with adults, bovine lactoferrin has been shown to be safe for consumption at doses of up to 7.2 g/day for 8 weeks.

Toxicological assessment

The toxicological safety of bovine lactoferrin has been studied extensively in both animals and humans.

Bovine lactoferrin resists major proteolytic degradation in the intestinal lumen in animals and can be absorbed by the intestinal lumen as an intact molecule. The absorption in adult animals is not completely clear and chronic ingestion seems to reduce the intestinal absorption. Its removal from the blood circulation is mainly regulated by the liver, but also the kidney and spleen play a role in this process.

Bovine lactoferrin showed no acute toxicity upon oral treatment, resulting in an oral LD50 value of ≥ 2000 mg/kg bw/d.

A sub-acute and a sub-chronic toxicity study with bovine lactoferrin were performed in rats. Both studies did not reveal treatment-related effects and therefore the NOAEL was considered to be higher than the highest dose tested: ≥ 2000 mg/kg bw/d. No reproductive toxicity or teratogenicity study data are available for bovine lactoferrin. However, it should be noted that in the 13-week toxicity study with bovine lactoferrin in rats no histopathological changes were observed in reproductive organs.

No mutagenic potential of bovine lactoferrin was determined in the reverse mutation assay.

In public literature, no chronic toxicity or carcinogenicity studies are described, but as no indications for preneoplastic lesions are observed in the sub-chronic toxicity test, and the mutagenicity data available are negative, no indications for chronic toxicity or carcinogenicity are present.

In conclusion, the results of the toxicity studies on bovine lactoferrin do not give rise to toxicological concern at levels ≥ 2000 mg/kg bw/d at sub-chronic exposure in rats. Human studies confirm the observation in the animal toxicity studies, showing that bovine lactoferrin is well tolerated in doses up to 2.9 g/day by infants and 7.2 g/day by adults.

Based on the data currently available, bovine lactoferrin should not be considered a major cow's milk allergen with respect to its allergenic potency. However, bLF also contains relatively small amounts of other milk proteins among which the major milk allergens casein and beta-lactoglobulin. It should be noted that all proteins in the product are derived from milk. Due to this source, irrespective whether bovine lactoferrin is an allergen or not, bLF should be labelled as containing milk proteins as is the legal requirement under Directive 2003/89/EC to warn allergic subjects of the potential risk of allergies. Furthermore, the risk for auto-immune reactions due to an increased intake of bovine lactoferrin is considered to be low.

Nutritional and toxicological risk assessment

The intake assessment resulted in an intake of bLF of 19 mg/kg bw/d for adults, 73.4 mg/kg bw/d for children and 210 mg/kg bw/d for infants. This intake does not include the background exposure to bovine lactoferrin in the daily diet. The background exposure of bovine lactoferrin is estimated to be approximately 3-5% of the total anticipated intake. It is expected that this amount does not significantly influence the total intake, taking into account the expected overlap between the foods in which bovine lactoferrin is commonly present and the proposed enriched products.

The animal toxicity studies demonstrated that bovine lactoferrin is of low toxicity with a NOAEL ≥ 2000 mg/kg bw/d. The low toxicity is confirmed in human studies, which show that bovine lactoferrin is well tolerated in doses up to up to 2.9 g/day by infants and 7.2 g/day by adults. Furthermore, bovine lactoferrin has a long history of safe use due to its presence in milk and milk products and the assumed highest sensitive population group (infants) is subject to the highest doses of lactoferrin (human, about 70% equal to bovine lactoferrin) without adverse effects. Taken the above into account and considering that no differences are expected between species (considering it is an endogenous component in ruminants with a common metabolic pathway in humans), the assessment factor to derive a safe upper limit from the animal toxicity data is set at 10. Therefore, a safe upper limit of 200 mg/kg bw/day can be assumed, but it might as well be higher considering that the NOAEL was ≥ 2000 mg/kg bw/d and human studies show no adverse effects at much higher doses.

The calculated intake of both adults (19 mg/kg bw/d) and children (73.4 mg/kg bw/d) is well below the safe upper limit of 200 mg/kg bw/d and can be regarded as safe. The intake among infants of ~210 mg/kg bw/day is slightly above the safe upper limit of 200 mg/kg bw/d. However, it should be noted that:

- infants are exposed to human lactoferrin at even higher doses (700 mg/kg bw/d (assuming weight 6 kg and intake up to 4200 mg/day) without adverse effects;
- human studies with doses up to 2.9 g/day for infants do not show adverse effects;
- the NOAEL is higher than the highest doses tested in the animal toxicity studies.

Therefore, no adverse effects are expected for infants when consuming bovine lactoferrin in these amounts.

Based on the information obtained from animal and human studies in combination with the history of safe use of bovine lactoferrin, the intake of the amounts of bLF in the proposed enriched products with the proposed purity ranges is considered to be safe for adults, children and infants.

General conclusion

A nutritional and toxicological evaluation and risk assessment was performed and led to the following conclusions:

- None of the toxicity studies showed adverse effects due to bovine lactoferrin exposure;
- Human studies confirmed this as no adverse effect were reported upon an exposure up to up to 2.9 g/day in infants and 7.2 g/day in adults;
- No adverse effects are expected at the proposed use level of bLF with the proposed purity of $\geq 95\%$.

These conclusions allow the overall conclusion that there is no indication for any health risk under the conditions of the proposed intended use of bLF.