



Ampliqon A/S
Stenhuggervej 22
5230 Odense

Pesticider og Biocider
J.nr. MST-6840-00014
/2019-5584
Ref. SEKHA
Den 21. november 2019

Miljøstyrelsens afgørelse om godkendelse af faciliteter til produktion med genetisk modificeret *Escherichia coli* til fremstilling af DNA polymeraser på Ampliqon A/S 5230 Odense

Miljøstyrelsen godkender hermed lokale 1.24 til produktion af DNA polymeraser med genetisk modificerede *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) samt -80°C fryser i lokale 1.36 og autoklave i rum 1.37.

Miljøstyrelsens afgørelse

Denne afgørelse meddeles ifølge § 8, stk. 1, i lov om miljø og genteknologi¹ og § 3, stk. 3, i bekendtgørelsen om indesluttet anvendelse² og omfatter alene forhold, der er omfattet af godkendelse efter genteknologiloven. Der er således ikke taget stilling til andre relevante tilladelser i henhold til miljøbeskyttelsesloven eller anden lovgivning.

Afgørelsen meddeles på følgende vilkår:

1. Anvendelse, indretning og drift.

- 1.1. Produktionen skal foregå i overensstemmelse med de i ansøgningen opførte oplysninger og procedurer.
- 1.2. Til produktionen må kun anvendes den genetisk modificerede produktionsstamme, der er beskrevet i ansøgningen, eller som fremgår af senere anmeldelser.

2. Sikkerhedsforanstaltninger

- 2.1. Produktionen og apparaturet skal indrettes, anvendes og vedligeholdes på en hensigtsmæssig måde, så spild og udslip forebygges.
- 2.2. De opsamlede spildstrømme fra produktion, rengøring mv. som kan indeholde levende genetisk modificerede produktionsorganismer skal

¹ Se lovbekendtgørelse nr. 9 af 4. januar 2017

² Bekendtgørelse nr. 225 af 19. marts 2009 om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer

opsamles og inaktiveres efter en valideret metode inden udledning til det kommunale spildevandssystem.

- 2.3. Virksomheden skal udføre en validering af den valgte inaktiveringsmetode for inaktivering af spildevand, der dokumenterer, at metoden medfører et effektivt drab af produktionsorganismen.
- 2.4. Fast affald, der kan indeholde levende genetisk modificerede produktionsorganismer, skal inaktiveres ved autoklavering og herefter bortskaffes ved forbrænding.

3. Tilsyn

- 3.1. Tilsynsmyndigheden kan bestemme, at der udføres kontrolmålinger for indholdet af produktionsorganismer i spildevandet. Udgifterne hertil afholdes af virksomheden.
- 3.2. Tilsynsmyndigheden kan bestemme, at der skal udføres kontrolmålinger for indholdet af produktionsorganismer i fast affald og flydende affald. Udgifterne hertil afholdes af virksomheden.

4. Virksomhedens egenkontrol

- 4.1. Virksomheden skal 1 gange årligt udtage en prøve fra det inaktiverede flydende affald med henblik på at dokumentere effektiviteten af kimdrabet.
- 4.2. Virksomheden skal føre journal over egenkontrol og driftsuheld. Journalen skal indeholde resultaterne af egenkontrollen jf. vilkår 4.1. Optegnelser i journalen skal være tilgængelig for tilsynsmyndigheden i 5 år.
- 4.3. Tilsynsmyndigheden er Miljøstyrelsen.

5. Tidsbegrænsning

- 5.1. Godkendelsen gælder i 8 år fra dato for afgørelsen.

Klagevejledning

Denne afgørelse kan påklages til Miljø- og Fødevareklagenævnet, jf. § 34 i lov om miljø og genteknologi.

Klage til nævnet indgives skriftligt til Miljøstyrelsen ved anvendelse af digital selvbetjening, jf. dog § 18 b, stk. 2-4, i lov om Miljø- og Fødevareklagenævnet³.

Efterfølgende kommunikation om klagesagen skal ske ved anvendelse af digital selvbetjening.

³ Se lovbekendtgørelse nr. 1715 af 27. december 2016 om Miljø- og Fødevareklagenævnet

Klagefristen er 4 uger fra den dag, afgørelsen er meddelt, jf. samme lovs § 31. Ved annoncering regnes klagefristen fra annonceringsdatoen. Hvis klagefristen udløber på en lørdag, en søndag eller en helligdag, forlænges klagefristen til den følgende hverdag. Afgørelsen bekendtgøres ved elektronisk annoncering 21. november 2019.

En klage anses for indgivet, når den er tilgængelig for myndigheden.

Ampliqon A/S kan under iagttagelse af de fastsatte vilkår udnytte godkendelsen fra datoen for afgørelsen. Klagemyndigheden kan dog i sin afgørelse i en eventuel klagesag ændre disse vilkår, eller fastsætte andre vilkår i lyset af behandlingen af klagesagen.

Retsbeskyttelse

Virksomhedens retsbeskyttelse efter § 17 i genteknologiloven medfører, at godkendelsesmyndigheden indtil 4 år efter afgørelsen er truffet, kun kan give påbud eller forbud, hvis

- der er fremkommet nye oplysninger om de genetisk modificerede cellers skadelige virkning, eller
- de genetisk modificerede celler medfører uønskede virkninger på miljø, natur eller sundhed, der ikke kunne forudses, da godkendelsen blev givet, eller
- påvirkningen af miljø, natur eller sundhed i øvrigt går ud over det, som blev lagt til grund ved godkendelsen.

Produktionsområdets indretning og drift

Miljøstyrelsen har truffet denne afgørelse på baggrund af virksomhedens beskrivelse af indretning og produktion i det godkendte område.

Ampliqon A/S skal forudgående underrette godkendelsesmyndigheden om væsentlige ændringer i områdets indretning og drift, samt udvidelser af produktionen i forhold til de oplysninger, der fremgår af den fremsendte ansøgning. Godkendelsesmyndigheden tager derefter stilling til, om ændringen eller tilføjelsen kræver fornyet godkendelse, jf. § 15, stk. 2, i lov om miljø og genteknologi.

Redegørelse for sagen

Ampliqon A/S har med ansøgning af 4. oktober 2019 anmodet Miljøstyrelsen om fornyet godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer til fremstilling af DNA polymeraser ved hjælp af genetisk modificeret *E. coli* BL21 i virksomhedens laboratorium på Stenhuggervej 22, 5230 Odense. Miljøstyrelsen besigtigede virksomheden den 27. august 2019, i forbindelse med et tilsyn.

Virksomhedens oplysninger

Produktionen foregår i laboratorium med lokale nr. 1.24. Lokalet er indrettet og anvendes som traditionelt laboratorium. Der er ikke gulvafløb i lokalet. Inaktivering af affald indeholdende GMO sker ved autoklaving i rum 1.37.

Produktionen foregår ved at 12 x 500 mL *E. coli* kulturer vokses op i ca. 2-7 timer ved 37°C i lukkede 2 L kolber. *E. coli* kulturen induceres med isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), hvorved det rekombinante protein startes udtrykt. Efter 2-16 timer høstes kulturen ved centrifugering. Supernatanten inaktiveres ved autoklaving og bortskaffes. Pellet genopløses i 10-20 mL Tris lyseringsbuffer, der tilsættes lysozyme og opløsningen inkuberes ved 75°C i 30 min, hvorved alle endogene proteiner fra *E. coli* denatureres. Der centrifugeres endnu en gang, og supernatanten, bl.a. bestående af det rekombinante protein, sterilfilteres. Supernatanten betragtes nu som almindelig kemi, og den efterfølgende FPLC oprensning foregår således udenfor GMO faciliteterne. Pellet betragtes som GMO affald.

Ventilation

Udsugning er adskilt fra resten af bygningen i lokale 1.24.

Afløb

Spildevand fra virksomheden afledes til det offentlige spildevandssystem. Flydende affald dekontamineres ved autoklaving, og hældes herefter i vasken. Al affald forsegles og mærkes, inden det transporteres til autoklaven, hvor det autoklaveres straks.

Fast affald

Fast affald dekontamineres ved autoklaving, og bortskaffes derefter som brændbart affald. Glasvarer og andre flergangsting autoklaveres, inden det lægges til opvask. Al affald forsegles og mærkes, inden det transporteres til autoklaven, hvor det autoklaveres straks.

Sikkerhedsrutiner

Der er udarbejdet regler for arbejde i produktionslokalerne, en sikkerhedsforskrift, en beredskabsinstruks, en rengøringsforskrift samt en sikkerhedsforskrift ved håndværkerbesøg/besøg af servicetekniker.

Virksomhedens oplysninger om donor, vært og produktionsorganisme

Recipientorganismen

Den anvendte recipientorganisme er *E. coli* BL21(DE3), som er en kommercielt tilgængelig *E. coli* stamme på samme fareklasseniveau som *E. coli* K12. *E. coli* BL21(DE3) anvendes til rutinemæssig og udbredt molekylærbiologiske protein udtryksundersøgelser.

Ifølge Center for Disease Control and Prevention (CDC) Guidelines (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories) kan *E. coli* BL21 betragtes som Biological Safety Level One (BSL-1) materiale. BSL-1 materiale er ikke fundet til konsistent at medføre sygdom hos raske voksne mennesker med et velfungerende immunsystem. Materialet udgør desuden en minimal potentiel fare for laboratoriepersonale og miljøet.

Recipientorganismeorganismen forventes derfor ikke at kunne fremkalde sygdomme hos mennesker, dyr eller planter. Det indsatte materiale er af en sådan art, at det ikke giver den genetisk modificerede mikroorganisme en fænotype, der forventes at kunne fremkalde sygdomme hos mennesker, dyr og planter eller at få miljøskadelige virkninger. Den endelige GMO forventes derfor ikke at kunne fremkalde sygdomme hos mennesker, dyr og planter, og forventes ikke at få miljøskadelige virkninger. Desuden er *E. coli* BL21 ude af stand til overleve uden for laboratoriet.

Donororganismen

Det eneste materiale der benyttes fra donororganismer, er i digital form (gensekvenser). Der opformeres således ikke levende donororganismer, og der benyttes heller ikke inaktiveret/dødt cellemateriale. Donororganismerne vil i alle tilfælde være varmeresistente bakterier eller arkæer, af slægten *Thermus* eller *Thermococcus*/*Pyrococcus*.

Den indsatte gensekvens

Insertet vil i alle tilfælde kode for et enzym af typen DNA polymerase (fx Taq DNA Polymerase). De DNA polymeraser generne koder for, anvendes inden for molekylærbiologiske teknik Polymerase Chain Reaction (PCR).

Vektoren

Her benyttes det meget velkendte pET-ekspressionssystem. Ekspressionen af insert (gen for DNA polymerase) styres af T7 promotoren samt en lac operator. T7 promotoren kan kun benyttes af T7 RNA Polymerasen. Ekspressionen af denne polymerase styres også af lac operatoren, dog på genomisk niveau (i værtsorganismen). Således vil aktivering af lac operonet (ved tilsætning af IPTG), både medføre en øget ekspression af T7 RNA Polymerase samt tillade adgang til T7 promotoren. Dette resulterer i at T7 RNA Polymerasen kan påbegynde transskription af insert-genet. Vektoren bærer desuden på et antibiotikaresistens-gen. Dette vil enten være ampicillin eller kanamycin. Benyttelsen af T7 promotoren sikrer at gen-insertet i vektoren kun kan transskriberes i en værtsorganisme bærende genet for T7 RNA Polymerase. T7-systemet er viralt af oprindelse (kaldet

DE3 lysogenet), så chancen for at systemet er tilstede i en naturligt forekommen *E. coli* organisme er minimal.

Horizontal "gene transfer" af indsat genetisk materiale

Det anses ikke for sandsynligt, at det indsatte gen vil være i stand til at blive overført til andre organismer uden for *E. coli* BL21 ved hjælp af transformation, transduktion eller bakteriel konjugation. Størst risiko for "gene transfer" anses i forbindelse med de resistente gener. Forholdsregler vil blive truffet, således at den modificerede *E. coli* stamme ikke på nogen måde kommer i kontakt med det omgivne miljø.

Produktionsorganismen

Den endelige produktionsorganisme Organismen vil være en *E. coli* BL21(DE3) - derivat bærende på et proteinekspresions-plasmid af pET-klassen. Organismen vil være resistent overfor enten ampicillin eller kanamycin. Ved tilsætning af IPTG, vil organismen påbegynde produktion af proteiner – dette vil i alle tilfælde være en DNA polymerase. Organismen kan vokse i standard laboratorie vækstmedie (som fx Luria-Bertani Broth) – her vil den have en generationstid på 20-40 min når den inkuberes ved 37°C med omryst.

Produktionsorganismen klassificeres som en klasse 1 organisme.

Resume af virksomhedens risikovurdering

Humanhelbredsovervejelser

E. coli BL21 (DE3) er ikke kendt for at forårsage sygdom hos dyr eller planter eller forårsage nogen negative påvirkninger i miljøet. Organismen er yderligere ikke beskrevet til at have særlige allergi-fremkaldende egenskaber. Gensplejsningen beskrevet her vil ikke øge risikoen for, at GMO'en forårsager sygdomsfremkaldende egenskaber. Dog vil der blive anvist at håndtere GMO kultur ved brug af udsugningsarm for at beskytte brugere af GMO lokalet.

Miljøovervejelser

Der er hverken gulv afløb eller håndvask i laboratoriet. Alt brugt medie og udstyr i direkte kontakt med GMO bliver inaktiveret ved autoklavering. Supernatanten bliver varmeinaktiveret ved 75 °C, og herefter centrifugeret. Der foretages nedklassificering af supernatanten ved sterilfiltrering.

Horizontal "gene transfer" af indsat genetisk materiale

Der er ikke risiko for horisontalt gen-transfer. Plasmiderne kan kun overføres til andre organismer ved manipulation.

Klassificering

E. coli BL21 har en etableret registrering af sikkerhed i laboratoriet, og vil derfor næppe forårsage sygdom hos mennesker, dyr eller planter. Genmodifikationen med tilstedeværelse af DNA polymerase forventes ikke at ændre dette. pET vektorsystemet anvendes som vektor. Vektorerne alene, eller i den endelige GMO, forventes ikke at kunne frembringe nogen uønskede egenskaber eller skadelig virkning. Den indsatte gensekvens i kombination med recipientorganismen forventes ikke at give en fænotype, som kan forårsage sygdom eller have skadelige

virksomheder på miljøet. Derfor vil GMO'erne næppe forårsage sygdom eller have skadelige virkninger på miljøet, og kan henføres til klasse 1 aktiviteter.

Vurdering af muligheden for skadelige virkninger som kunne indtræffe ved arten af aktiviteter, der skal gennemføres

Forsøgene indebærer standard molekylærbiologiske teknikker, som ikke udgør nogen særlig risiko. Alle aktiviteter bliver gennemført i overensstemmelse med standard sikkerhedsforskrifter som opbevares i kopi i de tilhørende klassificerede lokaler.

Koncentration og omfang

Produktionsorganismen dyrkes i mængder på max. 12 x 0,5 liter ad gangen

Eksponering

Kun det umiddelbare laboratoriemiljø vil blive udsat for produktionsorganismen. Som beskrevet er betydelige foranstaltninger iværksat for at sikre, at produktionsorganismen er indesluttet, og at områder uden for laboratoriet ikke er udsat for produktionsorganismen. Desuden forventes det, at produktionsorganismen ikke vil kunne overleve i en længere periode i miljøet.

Tilstedeværelse af modtagelige arter

Hverken mennesker, dyr eller planter er modtagelige for *E. coli* BL21, og det udtrykte genprodukt anses ikke for at kunne ændre patogenicitet/overlevelsessevnen for recipientorganismen.

Hvorvidt miljø kan støtte overlevelse af GMM

De valgte *E. coli* stammer er alle apatogene. De anses ikke for at udgøre nogen fare ved indtrængen i luftveje eller blodbane, og det forventes ikke, at disse stammer vil kunne overleve i miljøet.

Foranstaltninger til imødegåelse af driftsforstyrrelser og uheld

Ved ulykker, uheld eller større spild træffes foranstaltninger i samråd med den GMO-ansvarlige. Telefonnumre samt navne på ansvarlige hænger på væggen ved døren til GMO-lokale. Alle uheld og spild noteres i laboratoriets logbog. Ved spild af biologisk aktivt materiale (GMO) skal dette straks tørres op med engangsklude. Ved store mængder anvendes væskesugende materiale (chemizorb, placeret i laboratoriet). Efter optørring rengøres området med 70% ethanol. Hvis der ikke skal arbejdes i rummet umiddelbart efter, anvendes i stedet en Virkon S. opløsning. (Engangsklude, chemizorb og andet forurenede materiale bortskaffes som GMO-affald). Hvis et område på kroppen ved et uheld bliver kontamineret, afvaskes det med 70% ethanol og skylles herefter under vandhane eller bruser. Der findes øjenskyller på væggen ved håndvask i GMO-lokale.

Virkninger på det fysiske miljø

Da produktionsorganismen anses ude af stand til at overleve i miljøet, forventes ingen indvirkning på det fysiske miljø.

Bestemmelser af den endelige klassificering og indeslutningsforanstaltninger

E. coli BL21 er ikke sygdomsfremkaldende, og har en historie som sikre laboratorie-stammer til dette formål. Vektoren og de udtrykte genprodukter anses ikke for skadelige eller for at kunne ændre patogenicitet/overlevelsesevnen/fitness på modtageren/værtsorganismen. På dette grundlag anses GMO'erne ikke for at udgøre en risiko for mennesker, dyr og planters sundhed eller for miljøet. Derfor konkluderes det, at indeslutningssystemet som kræves for at kontrollere denne risiko er på niveau 1.

Aktiviteten er derfor klassificeret som klasse 1.

Miljøstyrelsens verificering af virksomhedens vurdering og klassifikation

Virksomhedens ansøgning af 4. oktober 2019 er i overensstemmelse med § 5, stk. 1 i Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer, samt beskrivelse af den genetisk modificerede produktionsstamme.

Ansøgningen indeholder oplysninger om produktionsområdets indretning og drift, herunder indeslutningsforanstaltninger, samt beskrivelse af den genetisk modificerede produktionsstamme.

Ampliqon A/S har endvidere udført en miljø-, natur- og sundhedsmæssig risikovurdering af produktionsaktiviteten i overensstemmelse med § 3, stk. 1. i Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer. Vurderingen er udført efter bekendtgørelsens fastsatte procedurer for udarbejdelse af en risikovurdering, og omfatter en samlet vurdering i forhold til produktionsaktivitetens omfang, karakter og det ydre miljø, jf. bekendtgørelsens bilag 3 om principper for risikovurdering.

De fremsendte oplysninger beskriver produktionsforhold, indeslutningsforanstaltninger, og bortskaffelse af fast og flydende affald. Miljøstyrelsen har vurderet at de enkelte trin i fremstillingsprocessen, herunder de indeslutningsforanstaltninger, virksomheden har etableret. Miljøstyrelsen kan konstatere, at dyrkning, oprensning og inaktivering af levende produktionsorganismer udelukkende foregår i de dertil indrettede lokaler, samt at virksomheden har etableret procedurer vedrørende arbejdet med den genetisk modificerede produktionsorganisme.

Miljøstyrelsen konkluderer, at produktionsaktiviteten vil følge de generelle principper for god mikrobiologisk produktionspraksis, og at indretningen og driften er i overensstemmelse med de indeslutnings- og beskyttelsesforanstaltninger, der er fastsat for produktionsaktiviteter i "klasse 1", jf. Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer bilag 4 om generelle principper og relevante indeslutnings- og beskyttelsesforanstaltninger.

Ampliqon A/S har, ud fra risikovurderingen samt kriterierne for klassifikationen af produktionen med genetisk modificerede mikroorganismer i Bekendtgørelse om

godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer bilag 3, klassificeret produktionen i "klasse 1".

Miljøstyrelsen kan verificere at udarbejdelsen af risikovurderingen er i overensstemmelse med Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer bilag 2 og 3, og finder at risikovurderingen fører til en korrekt klassifikation af aktiviteten.

Med venlig hilsen



Selina Kruuse Hansen
+45 20 86 42 87
sekha@mst.dk

Kopi sendt til:

- Sundhedsstyrelsen
- Danmarks Sportsfiskerforbund
- Danmarks Fiskeriforening
- Forbrugerrådet Tænk
- Arbejderbevægelsens Erhvervsråd
- Danmarks Naturfredningsforening
- Odense Kommune
- Arbejdstilsynet