

第一種使用規程承認申請書

令和3年10月4日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 株式会社新日本科学 PPD
申請者 ゼネラルマネージャー 栗岡 康雅 印
住所 東京都中央区明石町8番1号 聖路加タワー12階

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項（同法第9条第4項において準用する場合を含む。）の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p><i>rep</i> 及び <i>cap</i> 遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス 8 型に由来するキャプシドタンパク質及びアデノ随伴ウイルス 2 型に由来する ITR を有し、改変型オルニチントランスカルバミラーゼを発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（AAV8OTC）</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>ヒトの遺伝子治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>本遺伝子組換え生物等の原液の保管</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物等の原液は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、治療施設内の適切に管理された冷凍庫及び冷蔵庫において保管する。</p> <p>本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管</p> <p>(2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。</p> <p>(3) 希釈液は、容器に漏出しない状態で保管する。</p> <p>運搬</p> <p>(4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。</p> <p>患者への投与</p> <p>(5) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、患者の静脈内に注入することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。</p>

投与後の患者からの排出等の管理

- (6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間、対策を講じる。
- (7) 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (8) 投与を受けた患者が当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留めるために必要となる期間、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。

患者検体の取扱い

- (9) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (10) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に保管し、運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (11) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

感染性廃棄物等の処理

- (12) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。
- (13) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液並びに本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあつては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。

	<p>(14) 患者が自宅で用いたドレッシング材及び洗浄に用いた器材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で廃棄する。</p> <p>(15) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和 46 年政令第 300 号）の別表第 1 の 4 の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。</p> <p>(16) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液、検体等の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体は漏出しない容器に入れ、本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。</p> <p>(17) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等を廃棄する場合は、密封された状態で焼却又は高圧蒸気滅菌により不活化処理を行い、廃棄する。</p>
--	--

生物多様性影響評価書

I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1. 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

本遺伝子組換え生物等は、組換え型アデノ随伴ウイルス血清8型（組換えAAV8）である（INN：avalotcagene ontaparvovec）。

組換え型アデノ随伴ウイルス血清8型：

アデノ随伴ウイルス（AAV）は一本鎖DNAウイルスで、パルボウイルス科ディペンドパルボウイルス属（Parvoviridae Dependoparvovirus）ファミリーに分類される（[Cotmore 2019](#)）。ディペンドウイルス属に分類されるウイルスは、ウイルス単独では増殖せず、複製にヘルパーウイルス（アデノウイルス及び単純ヘルペスウイルス等）の共感染を必要とする。AAVは、カプシドタンパク配列の違いから複数の血清型に分類されており（[Srivastava 2016](#)）、その違いが細胞指向性に影響を与えている。AAV8は肝指向性のため、本遺伝子組換え生物等ではこのカプシドを使用している。

分類：ウイルス、ssDNAウイルス、パルボウイルス科、パルボウイルス亜科、ディペンドパルボウイルス属、未分類ディペンドウイルス属、アデノ随伴ウイルス

宿主の範囲：

AAVは、ヒト、サル、イヌ、コウモリ及びげっ歯類を含む哺乳類や、ヘビ、アヒル、ガチョウ、アゴヒゲトカゲのような非哺乳類にも感染する（[Gao 2004](#); [Srivastava 2016](#); [Cotmore 2019](#); [Kerr 2005](#)）。

範囲：細胞性生物、真核生物、後方鞭毛生物、後生動物、真正後生動物、左右相称動物、後口動物、脊索動物門、有頭動物、脊椎動物

地理的分布：

AAVは事実上、世界中に分布し、既知の環境宿主は脊椎動物である。欧州と米国の人口の90%超がAAVに曝露されている（[Chirmule 1999](#); [Boutin 2010](#); [Jeune 2013](#); [Tenenbaum 2003](#)）。約85%の成人がAAVに対する抗体をもっている（[Tenenbaum 2003](#)）。

2. 使用等の歴史及び現状（人用若しくは動物用医薬品としての利用の歴史又は産業的な利用の歴史及び現状を含む。）

1980年代初期に遺伝子導入ベクターとして野生型AAVが最初に遺伝子操作されて以来、遺伝子組換えAAV（以下、「組換えAAV」という。）は、疾患治療のための有効かつ安全な遺伝子導入媒体として有望視されてきた（[Gao 2004](#)）。アデノ随伴ウイルスはエンベロープをもたない正二十面体構造をもつ一本鎖DNAウイルスである。野生型AAVが幅広い組織指向性を示し、病原性をもたず、組織中に長期間持続可能であることから、組換えAAVは、遺伝子導入の手段として広く利用されている。さらに、組換えAAVは自らで複製できず、そのベクターゲノムは組織形質導入後にエピソームとして存在するため、挿入突然変異のリスクが最小限となっている（[Nakai 2001](#)）。組換えAAVはウイルスタンパク質をコードする遺伝子である*rep*及び*cap*を取り除き、ドナー核酸に置き換えることで作成される。組換えAAV中の唯一のウイルス配列は、ベクターゲノムの両端に1つずつコードされている145塩基の非翻訳領域である末端逆位反復配列（ITR）である。

最初の組換えAAV遺伝子治療試験は、嚢胞性線維症患者を対象に1995年に実施された（[Flotte 1995](#)）。それ以後、組換えAAVはさまざまな疾患の遺伝子治療臨床試験で使用されている

(Mingozzi 2011; Chapin 2018; Ginn 2018)。現在まで、組換えAAVを用いた遺伝子治療は広く実施されており、全般として安全と考えられている (Colella et al. 2017)。2020年時点で、約202件の実施中又は完了した組換えAAV遺伝子治療の臨床試験が登録されている (<http://clinicaltrials.gov>)。臨床試験の多くが、遺伝性の希少疾患を対象に実施されており、組換えAAV2に基づくベクターが広く用いられている。完了した組換えAAVの第I相、第I/II相、及び第III相試験で検討された適応症は、バッテン病、脊髄性筋萎縮症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、サンフィリポ症候群B、色覚異常、レーバー先天性黒内障、ポンペ病などである。オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症向けに開発中の本遺伝子組換え生物等の他にも、X連鎖網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、ポンペ病、糖原病Ia型 (GSDIa) などの組換えAAV8に基づくベクターを使用した臨床試験 (GSDIaについてはUltragenyx社が開発しているDTX401) が進行中である。さらに、2種類の製品 (ゾルゲンスマ [Zolgensma] 及びLuxturna) が、組換えAAVを用いるヒト遺伝子治療用製品として欧州及び米国で承認されている。ゾルゲンスマは本邦で2020年2月に承認された。なお、他の組換えAAVを用いた臨床試験における安全性に関する知見を本書別紙2に記載する。

本遺伝子組換え生物等は、OTC欠損症の治療薬として開発されている遺伝子治療用製品である。本遺伝子組換え生物等は、ヒト肝特異的エンハンサー及びプロモーターによって発現が推進されるコドン最適化OTC (OTCco) 発現カセットを含んだ非複製型組換えAAV8ベクターで構成される。

3. 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

AAVは直径約25 nmの正二十面体構造の、エンベロープをもたない一本鎖DNAである。野生型AAVゲノムは約4.7 kbで、両端に位置するITRと、それらに挟まれた2つの遺伝子 (*rep*及び*cap*) 領域により構成されている (図1参照; Santiago-Ortiz and Schaffer 2016; Wu 2006)。ITRは複製及びパッケージングに必要なシスエレメントを含んでいる。複数のプロモーター、選択的スプライシング、及び別の翻訳開始コドンを使用することにより、この2種のAAV遺伝子それぞれが複数のタンパク質をコードしている。

*rep*遺伝子は、DNA複製に必要な4つのRepタンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52及びRep40) をコードし、*cap*遺伝子は、相互作用して正二十面体のカプシドを形成する3つのカプシドタンパク質 (VP1、VP2及びVP3) をコードする (Naso 2017)。*cap*領域の異なるリーディングフレームにカプシドの形成を促進するアッセムブリ活性化タンパク質 (AAP) がコードされている。

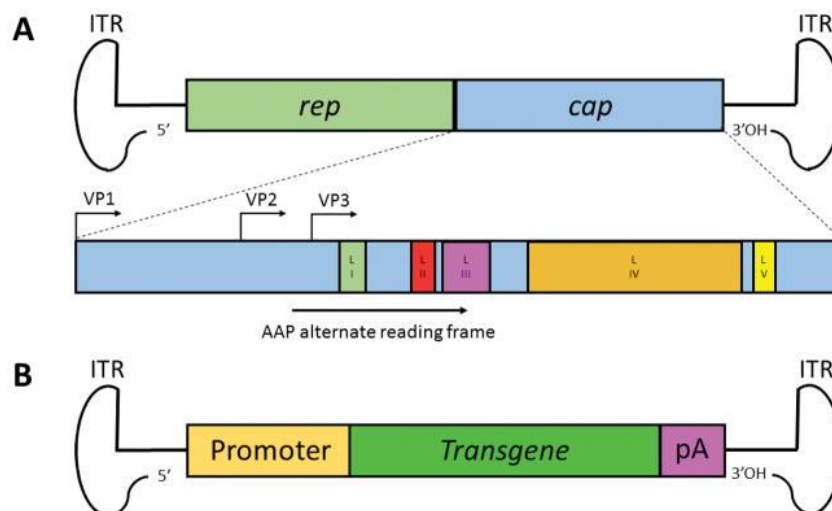


図1：野生型 AAV (A) と組換え AAV (B) のゲノム構造

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

AAVは、エンベロープをもたないウイルスで、比較的安定かつ乾燥に強い (Gruntman 2015) ため、環境中で長期間潜在的に生存する可能性がある。ただし、AAVは、ヘルパーウイルス又は他のヘルパー機能が存在しないと感染を確立できない。

野生型AAVは、宿主への感染又は感染細胞の核内に潜伏感染して環境中に存続している。AAVはヒト、サル、イヌ、げっ歯類等の哺乳動物に感染することができるが、例えばアデノウイルスや、単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルス非存在下では増殖しない (Lisowski 2015, Tenenbaum 2003)。

AAV血清型が異なると、熱融解温度もpHにより異なる (Lins-Austin 2020)。AAV1、AAV2及びAAV8の安定性は酸性条件下で上昇したが、AAV5の安定性は酸性条件下で低下した。

(3) 捕食性又は寄生性

該当なし

(4) 繁殖又は増殖の様式

野生型AAVのヒトへの感染は、主に呼吸器で粘膜接触を介して起こる。AAVのヒトでの増殖は、アデノウイルスのようなヘルパーウイルスとの共存下で起こる。アデノウイルスが共感染している間、AAV Repを産生するp5プロモーターのトランス活性を含むいくつかの必須のヘルパー機能が、ヘルパーウイルス由来のE1a、E1b、E2a、E4及びVA RNAにより供給され、AAVの複製が可能となる (Tenenbaum 2003; Weitzman 2012; Berns 1990)。

AAVの生活環は、宿主細胞表面のグリカン受容体及びタンパク性コレセプター (AAV8ではLamR) にウイルスが付着することから始まる (Nonnenmacher 2012; Akache 2006)。続いて、AAVはエンドサイトーシスによって取り込まれる。ビリオンは、細胞内膜系内で逆行性輸送によって輸送される。カプシド立体配座の変化の後、ビリオンはゴルジ装置又は小胞体から細胞質内へ放出され、核膜孔複合体を介して核内に輸送される。その後、核内で部分的脱殻によるゲノム放出が起こる (Nonnenmacher 2012)。核侵入後、適切なヘルパーウイルスの有無に応じて、AAVの生活環が溶菌経路又は溶原経路に沿って進行する。アデノウイルスや単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスが存在することで、AAV遺伝子の発現、ゲノム複製、及びウイルス粒子の産生が促進される (Daya 2008)。ヘルパーウイルス非存在下では、野生型AAVは複製能をもたない。このように、AAVの世代時間は適切なヘルパーウイルスの有無によって変わる。

AAVは塩基配列の比較解析により、ヒトとサル、ブタ間での種間伝播について示唆されている (Gao 2004; Zinn 2014)。

(5) 病原性

ヒトでの推定される血清抗体陽性率が共通に高いにもかかわらず、AAV感染による病原性は報告されていない (Flotte 1995)。その結果、AAVは欧州での指令2000/54/ECに基づいてリスクグループ1の生物学的因子 (ヒトに病気を発症させる可能性が低い生物学的因子) として定義される。また、米国国立衛生研究所 (NIH) の遺伝子組換え又は合成核酸分子を含む研究に関するガイドラインでは、バイオセーフティレベル1として定義される (NIH Guidelines, USA; 2019年4月)。

(6) 有害物質の産生性

感染細胞内で宿主のウイルスゲノム由来のタンパク質が産生されるが、細胞外に分泌される遊離有害物質は知られていない。

(7) その他の情報 (不活化条件等を含む。)

他のパルボウイルスと同様に、AAV は物理化学的に非常に安定である。そのため、自然環境中での生存期間が長く、数か月間、感染能を有する場合がある。バイオセーフティキャビネットあるいは金属製の実験室ベンチ表面を模倣したステンレス板上に AAV が付着した場合、室温で少なくとも 6 日間、感染力のある AAV が生存することが報告されている (Howard 2017)。

AAV のようなパルボウイルスは、オートクレーブ、UV 照射、ガンマ線照射、電子線照射又は化学薬品処理により不活化される (例えば、水酸化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム、ヨウ素、過酢酸) (Howard 2017; WHO 2004)。

II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1. 供与核酸に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

本遺伝子組換え生物等の原薬は、コドン最適化したヒト OTC 配列を含む発現カセットをコードする自己相補ウイルス DNA ゲノムを内包した非複製型の組換え AAV8 ウイルス粒子から成る。

本遺伝子組換え生物等のウイルス粒子は、3種類のカプシドタンパク質 VP1、VP2 及び VP3 で構成される。[redacted] [redacted] より、これらは約 [redacted] の相対比で存在し、[redacted] [redacted] による分子量測定値は、それぞれ約 [redacted] [redacted] [redacted] Da である。このウイルス粒子（ウイルス DNA を含む）の理論的計算による大きさは約 [redacted] Da であり、正二十面体であることがわかっている（Tseng and Agbandje-McKenna 2014）。

本遺伝子組換え生物等のウイルス粒子は、野生型 AAV2 ITR 及び自己相補的 AAV2 ITR が隣接しているヒト OTC 発現カセットを含むウイルス DNA を内包している。図 1 と図 2 に発現カセットと隣接している 2 つの ITR の概略図を示す。この発現カセットはコドン最適化 OTC コード配列を含む。また、この発現カセットは、[redacted] プロモーターに先行する [redacted] [redacted] エンハンサーエレメントの [redacted] [redacted] を含む肝特異的プロモーターによって推進される（Wang 2012）。ポリアデニル化シグナルは、[redacted] [redacted] ポリアデニル化シグナルである。標準的な遺伝子組換え DNA 技術を使用したカセットの組み立てにより、発現カセットには少量の非機能的介在 DNA 配列も存在する。

OTC（標的タンパク質）のアミノ酸配列は、本書別紙 1 に記載した。



略語

[redacted] ITR	[redacted] 末端逆位反復配列
[redacted] Enh	ヒト [redacted] [redacted] エンハンサー領域
[redacted] Pro	ヒト [redacted] プロモーター
hOTC	ヒトオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子 [redacted]
[redacted] pA	[redacted] [redacted] ポリアデニル化シグナル
ITR	末端逆位反復配列（野生型 AAV）

(2) 構成要素の機能

供与核酸の構成要素の機能を以下に記載する（Wang 2012）。詳細情報は、本書別紙 1 に記載する。

- [redacted] [redacted] エンハンサー：[redacted] エンハンサーは肝細胞における OTC 遺伝子の発現をさらに増強するために挿入された。
- [redacted] [redacted] プロモーター：[redacted] プロモーターは強力な肝細胞特異的プロモーターであり、肝臓を標的とした OTC 遺伝子の発現を目的として挿入された。
- [redacted] [redacted] ヒトオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子：OTC タンパク質の発現又は活性に影響を及ぼす遺伝子の突然変異によって、当該疾患が引き起こされるとするな

らば、OTC 遺伝子の導入が OTC 欠損症の治療に有効であることが期待されるため、OTC 遺伝子を挿入した。

- [REDACTED] ポリアデニル化シグナル：ヒト OTC mRNA の効率的なポリアデニル化のためのシス配列を提供する。このエレメントは、新生転写物の 3'末端での特定の切断イベント及び長いポリアデニルテール付加のシグナルとして機能する。

本遺伝子組換え生物等のウイルスゲノムは、その複製能を欠如させるため、親ウイルスと比較して大幅に改変されている。AAV の *rep* 及び *cap* 遺伝子は真核生物の発現カセットに置き換えられ、非コード DNA 配列 ([REDACTED]) であるウイルス ITR のみが残存する。したがって、本遺伝子組換え生物等には野生型のウイルス遺伝子は含まれていない。

ウイルスの *rep* 及び *cap* 遺伝子を除去すると、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下でも、本遺伝子組換え生物等の複製はできなくなる。本遺伝子組換え生物等の複製には、野生型 AAV の存在及びヘルパーウイルス（アデノウイルス又はヘルペスウイルス）の共感染が必要とされる。

5' ITR は、末端分離部位 (TRS) を削除することで改変され、一本鎖ゲノムが OTC 発現領域に対して自己相補的になっている (McCarty 2008)。自己相補的組換え AAV は、形質導入効率が高いことが示されている。

本遺伝子組換え生物等のベクターゲノムの相同性検索を行った結果、生物学的機能をもつタンパク質をコードしている可能性は示されていない。米国国立生物工学情報センター (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索にて相同性検索を行ったが、本遺伝子組換え生物等のベクターゲノム中には既知の有害もしくはがん原性となる配列は見出されていない。以下の条件にて [REDACTED] のオープンリーディングフレーム (ORF) 解析を行った結果、[REDACTED] 個の OTC 組換え遺伝子とは別の ORF を発見した [REDACTED]。発見された [REDACTED] 個の ORF はそれぞれ [REDACTED] を産生すると予想されたが、生物学的機能をもつタンパク質が産生されるとは考えられない。

2. ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

該当なし

(2) 特性

該当なし

3. 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

本遺伝子組換え生物等のウイルスゲノムは、その複製能を欠如させるため、親ウイルスと比較して大幅に改変されている。野生型 AAV の *rep* 及び *cap* 遺伝子は真核生物の発現カセットに置き換えられ、非コード DNA 配列 ([REDACTED]) であるウイルス ITR のみが残存する。したがって、本遺伝子組換え生物等には野生型のウイルス遺伝子は含まれていない。

本遺伝子組換え生物等は *rep* 及び *cap* 遺伝子を除去しているため、アデノウイルスのようなヘルパーウイルスの存在下でも複製することはない。

本遺伝子組換え生物等のベクターゲノムは、そのウイルスゲノムが除去されていることから複製欠損であると考えられ、増殖に必要なウイルス複製タンパク質の発現が起こらない。本遺伝子組換え生物等のベクターゲノムは、本遺伝子組換え生物等、野生型 AAV 及びアデノウイルス

6. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

カプシド形成に使用された AAV 血清型は AAV8 で肝指向性を有し、OTC 遺伝子はヒト肝特異的エンハンサー及びプロモーターによって発現が推進され、その結果、
■を制限する。

全ウイルスコード配列は OTC 発現カセットに置き換えられているため、本遺伝子組換え生物等は、複製能が欠損した AAV8 である。本遺伝子組換え生物等のウイルス DNA の ■は除去されている。本遺伝子組換え生物等と野生型ウイルスとの唯一の共通点は、カプシドタンパク質及び、ベクターゲノムの両端に1つずつコードされている ■ ■非コード ITR である。

AAV8ベクターである本遺伝子組換え生物等は、遺伝子非組込み、非複製型の組換えAAVで、形質導入された細胞中では主にコンカテマーとしてエピソーム状で存在している。そのため、本遺伝子組換え生物等が細胞のDNAに組み込まれる可能性は低い (Schnepf et al., 2003; Nakai et al., 2001; Duan et al., 1998)。さらに、
■
■
■

上記の試験結果に基づくと、本遺伝子組換え生物等の組込みが発生する可能性は極めて低いと考えられる。

III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1. 使用等の内容

ヒトの遺伝子治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

2. 使用等の方法

本遺伝子組換え生物等の原液の保管

- (1) 本遺伝子組換え生物等の原液は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、治療施設内の適切に管理された冷凍庫及び冷蔵庫において保管する。

本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管

- (2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。
- (3) 希釈液は、容器に漏出しない状態で保管する。

運搬

- (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。

患者への投与

- (5) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、患者の静脈内に注入することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

投与後の患者からの排出等の管理

- (6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間、対策を講じる。
- (7) 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (8) 投与を受けた患者が当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留めるために必要となる期間、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。

患者検体の取扱い

- (9) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (10) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に保管し、運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。

- (1 1) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

感染性廃棄物等の処理

- (1 2) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。
- (1 3) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液並びに本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあっては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。
- (1 4) 患者が自宅で用いたドレッシング材及び洗浄に用いた器材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で廃棄する。
- (1 5) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和46年政令第300号）の別表第1の4の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。
- (1 6) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液、検体等の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体は漏出しない容器に入れ、本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。
- (1 7) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等を廃棄する場合は、密封された状態で焼却又は高圧蒸気滅菌により不活化処理を行い、廃棄する。

3. 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

本遺伝子組換え生物等が投与される患者に接触する医療提供者、家族、又はその他の人々へのリスクはわずかであるとみなされる。本遺伝子組換え生物等は複製することなく、環境中に広がることもできず、ヒトへの病原性がない。加えて、標的細胞タイプは肝細胞、また、本遺伝子組換え生物等の海外第 I/II 相試験で明確になったように、唾液、尿、便中のウイルス量は低いと予想される。したがって、本治験の患者を介して遺伝子組換え生物等に偶発的に曝露されることになる第三者に対し、悪影響を与える可能性は低い。

本遺伝子組換え生物等の投与後のベクター排出に関して、排出時期及び排出動態を明確にするため、海外第 I/II 相試験で検体を採取した。最初の12週は唾液、尿及び糞便から検体を集中的に採取した。ベクター排出動態を明確にするため、試験に参加した9名の患者の検体を評価した。9名の患者全員において、本遺伝子組換え生物等の投与後、ベクターDNAは唾液、尿及び糞便中で検出され、概して糞便中により多く、次に唾液、尿であった。DNAベクター量のピークは、唾液では投与後9日目から14日目に認められ、尿及び糞便からは投与後9日目から18日目に認められた。ベクターDNAレベルが検出不可能（すなわち、検出限界未満）となったのは、唾液、尿、及び糞便中ではそれぞれ12週目、16週目、及び52週目であった。[REDACTED] 今後の試験ではベクター排出に関するデータは収集しない予定である。本書別紙1に、301OTC01試験での個々の被験者のベクターゲノム濃度、及び採取した検体毎の検体全体のベクター排出データを記載した。

4. 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

本遺伝子組換え生物等に起因する即時的又は遅延的な環境への影響は分かっておらず、予測もできない。非標的生体と接するリスクを軽減するために、製剤は制御条件下で管理される予定である。

本遺伝子組換え生物等は、訓練を受けた医療従事者が保管、調製及び投与する。施設スタッフは、本遺伝子組換え生物等の調製及び投与に使用した消耗品の廃棄に対して、現地医療機関の要件に応じた廃棄物処理の方針に従う。使い捨て容器・資材等は、鋭利廃棄物又はバイオハザード廃棄物として処理され、オートクレーブ又は焼却、その両方で除染する。使い捨て以外の容器・資材等は、施設等の手順に従って除染する。なお、偶発的に下水等への廃棄が発生したとしても、環境へのリスクはわずかである。

5. 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

本遺伝子組換え生物等の非臨床プログラムには、
での潜在的な有効性、生体内分布及び毒性の評価を含めた。

[Redacted text block containing multiple lines of blacked-out information]

詳細は、本書別紙1に記載する。

6. 国外における使用等により得られた情報

米国及び米国領に含まれないその他の国において、本遺伝子組換え生物等を使用した臨床試験を実施中である。本遺伝子組換え生物等の計画中、実施中及び完了済みの臨床試験の概要を

本書別紙 1 及び以下に記載する。

本遺伝子組換え生物等のベクター排出の臨床評価

本遺伝子組換え生物等のベクター排出パターンは、301OTC01 試験でその特性が明らかにされた。ベクター排出を評価するために、ベースライン及び 1 日目から 80 日目までは 4 日から 10 日ごとに、その後 12 週目から 52 週目までは 4 週間ごとに唾液、尿及び糞便の検体を採取した。検体は、各検体が ████████ 陰性となるまで採取した。ベクターゲノムの有無は qPCR で確認した。

表 2 にコホート 1 から 3 の全被験者の概要を示す。本遺伝子組換え生物等を投与した 9 例の被験者全例の唾液、尿及び糞便中にベクター DNA が検出され、被験者内では概ね糞便中に高レベルで、次いで唾液及び尿中であった。投与後のベクター DNA レベルのピークは、唾液中で 9 日目から 14 日目、尿及び糞便中では 9 日目から 18 日目に認められた。ベクター DNA レベルが ████████ で検出不可能（つまり検出限界未満）となった時点は、唾液、尿、及び糞便中ではそれぞれ 12 週目、16 週目及び 52 週目であった。██████████ で検出限界未満となった 1 回目の時点又は検出限界未満が確認された最後の時点は、唾液、尿、及び糞便中ではそれぞれ 12 週目、62 日目及び 20 週目であった。ほとんどの被験者において、20 週目までに唾液、尿及び糞便中のベクター排出が検出限界未満となった。

また、血中のベクターゲノム濃度も 301OTC01 試験で明らかとなった。ベクターゲノム濃度を評価するため、ベースライン及び 2、4、6、10、12、16、20、24、36、及び 52 週目に検体を採取した。表 3 にコホート 1 から 3 までの全被験者の概要を示す。全 9 例の被験者にわたって、血中ベクターゲノム濃度のピークは、本遺伝子組換え生物等の投与後 2 週目から 4 週目に認められた。検出不可能なレベルのベクターゲノム量（つまり検出限界未満）は 36 週目から確認され、52 週目までに非常に低い濃度又は検出限界未満（9 例中 3 例で、52 週目に検出限界未満）となった。

301OTC01 試験における個々の被験者の血中ベクターゲノム濃度及び検体のベクター排出量は、本書別紙 1 の図 16~24 に提示した。

表 2 : qPCR によるベクターゲノム測定 (301OTC01 試験、██████████)

	██████████			██████████			██████████		
	唾液	尿	糞便	唾液	尿	糞便	唾液	尿	糞便
被験者 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
被験者 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
被験者 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
被験者 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
被験者 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
被験者 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
被験者 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
被験者 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
被験者 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+

■ [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]

表 3：本遺伝子組換え生物等の被験者別の血中ベクターゲノム濃度 [Redacted]

[Redacted]	[Redacted]			[Redacted]			[Redacted]		
	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]

安全性の概要：301OTC01 及び 301OTC02 試験 [Redacted]

[Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]
 [Redacted]

[Redacted] 用量制限毒性（DLT；治験責任（分担）医師が治験製品に関連ありとみなしたグレード 3 以上（重度）の有害事象（AE）として定義）、及び試験中止又は死亡に至った TEAE は報告されていない。全被験者の臨床状態は安定を維持していた。

IV 生物多様性影響評価

1. 他の微生物を減少させる性質

(1) 影響を受ける可能性のある微生物の特定

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は野生型 AAV と同様であると考えられており、微生物に感染せず、また影響を受ける可能性のある微生物は特定されていない。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当なし

(3) 影響の生じやすさの評価

該当なし

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、他の微生物を減少させる性質に基づいて、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

2. 病原性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

野生型AAVはヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型AAVと本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等に病原性はない。

本遺伝子組換え生物等の非臨床試験及び臨床試験結果に基づくと、本遺伝子組換え生物等への曝露による病原性は予想されない。さらに、ヒトでの推定される血清抗体陽性率が共通に高いにもかかわらず、AAV感染による病原性は報告されていない (Flotte 1995)。その結果、AAVは欧州での指令2000/54/ECに基づいて、リスクグループ1の生物学的因子 (ヒトに病気を発症させる可能性が低い生物学的因子) として定義される。また、NIHの遺伝子組換え又は合成核酸分子を含む研究に関するガイドラインでは、バイオセーフティレベル1として定義される (NIH Guidelines, USA; 2019年4月)。

また、AAV粒子がパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、本遺伝子組換え生物等は野生型AAVと同一又は極めて近い構造になると考えられるため、本遺伝子組換え生物等が病原性を持つことはないと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスが標的細胞に共感染しても増殖することはなく、野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ増殖が起こりうるが、その可能性は極めて低い。さらに、rcAAVが発生した場合であっても、環境中で増殖するため

には、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じうるrcAAVは、XXXXXXXXXXで陰性であることを確認するため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。

よって、本遺伝子組換え生物等及びrcAAVが第三者、野生動植物等に対して病原性を示す可能性は極めて低いと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法に従うかぎり、本遺伝子組換え生物等の使用により生物多様性影響が生ずるおそれはない。

3. 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型 AAV と本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等は、形質導入された細胞内でヒト OTC を産生する。本遺伝子組換え生物等の用量試験における非臨床及び臨床試験結果に基づくと、OTC 酵素及び本遺伝子組換え生物等の組換え AAV ウイルス粒子は、免疫原性を含む有害性を示さなかった。

また、AAV粒子がパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、本遺伝子組換え生物等は野生型AAVと同一又は極めて近い構造になると考えられるため、本遺伝子組換え生物等が有害物質の産生性を持つことはないと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスと共感染しても増殖することはない。野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ増殖が起こりうるが、その可能性は極めて低い。さらに、rcAAVが発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じうるrcAAVは、XXXXXXXXXXで陰性であることを確認するため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。

よって、本遺伝子組換え生物等が発現するOTCタンパク質が第三者、野生動植物等に対して有害作用を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

野生動物や植物に影響を与える可能性に関しては、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法に従うかぎり、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

4. 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物又は他の微生物の特定

動物（脊椎動物）は本遺伝子組換え生物等が形質導入される可能性がある。植物に影響はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者の排泄物や体液等から第三者（ヒト及び哺乳類）へ伝播する可能性は理論上あるが、予想される排出は低濃度であり、AAV粒子の低い感染力を考慮すると、ベクター排出による本遺伝子組換え生物等の核酸が細胞に形質導入することはほとんどありえない。

また、AAV粒子へパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、本遺伝子組換え生物等は野生型AAVと同一又は極めて近い構造になると考えられるため、本遺伝子組換え生物等が核酸を水平伝達する性質はないと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。本遺伝子組換え生物等は*rep*及び*cap*遺伝子の欠失により増殖能力がないため、本遺伝子組換え生物等由来の核酸が感染細胞のゲノムに組み込まれる可能性は極めて低い。

また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスと共感染しても増殖することはない、野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ水平感染が発生する可能性があるが、その可能性は極めて低い。

さらに、rcAAVが発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じるrcAAVは、XXXXXXXXXXで陰性であることを確認するため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、核酸を水平伝播する性質に基づいて、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

5. その他の性質

該当なし

V 総合的評価

理論的に、本遺伝子組換え生物等が感染する動物はヒトを含む脊椎動物であり、植物及び他の微生物への感染はない。本遺伝子組換え生物等による病原性はなく、第三者や哺乳動物に核酸を水平伝播する可能性は極めて低い。したがって、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法に従うかぎり、本遺伝子組換え生物等による生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

参考文献

1. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger AM, Hughes J, Mietzsch M, Modha S, Ogliastro M, Péntzes JJ, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol*. 2019 Mar;100(3):367-368. doi: 10.1099/jgv.0.001212. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30672729; PMCID: PMC6537627.
2. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol*. 2016 Dec;21:75-80. doi: 10.1016/j.coviro.2016.08.003. Epub 2016 Sep 3. PMID: 27596608; PMCID: PMC5138125.
3. Parvoviruses, Edited by J. Kerr, S. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden & C. R. Parrish. London: Hodder Arnold 2005
4. Gao, Guangping, et al. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol*. 78(12), 2004, 6381-6388.
5. Chirmule N, Propert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther*. 1999 Sep;6(9):1574-83. doi: 10.1038/sj.gt.3300994. PMID: 10490767.
6. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther*. 2010 Jun;21(6):704-12. doi: 10.1089/hum.2009.182. PMID: 20095819
7. Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, Weber T. Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods*. 2013 Apr;24(2):59-67. doi: 10.1089/hgtb.2012.243. Epub 2013 Apr 3. PMID: 23442094; PMCID: PMC3732124.
8. Tenenbaum L, et al. Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors. *Current Gene Therapy* 3, 2003, 545-565.
9. Nakai H, Yant SR, Storm TA, et al. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol*. 2001;75(15):6969-76.
10. Flotte TR, Carter BJ. Adeno-associated virus for gene therapy. *Gene Ther*. 2,1995, 357-362
11. Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges. *Nat Rev Genet*. 12, 2011, 341-355.
12. Chapin JC, Monahan PE. *Gene Therapy for Hemophilia: Progress to Date* , 2018.
13. Ginn, SL., et al. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2017: An update, *J Gene Med.*, 2018, e3015.
14. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017 Dec 1;8:87-104. doi: 10.1016/j.omtm.2017.11.007. PMID: 29326962; PMCID: PMC5758940.
15. Santiao-Ortiz and Shaffer. Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Cancer Gene Therapy. *J Control Release*. 2016 October 28; 240: 287–301. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.00
16. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther*. 14, 2006, 316-327
17. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*. 31(4), 2017, 317-334
18. Gruntman AM, Su L, Su Q, Gao G, Mueller C, Flotte TR. Stability and compatibility of recombinant adeno-associated virus under conditions commonly encountered in human gene therapy trials. *Hum Gene Ther Methods*. 2015 Apr;26(2):71-6. doi: 10.1089/hgtb.2015.040. PMID: 25819833; PMCID: PMC4403013
19. Lisowski L, Tay SS, Alexander IE. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 24, 2015, 59-67.
20. Bridget Lins-Austin, et al. Adeno-Associated Virus (AAV) Capsid Stability and Liposome Remodeling During Endo/Lysosomal pH Trafficking. *Viruses*. 2020 Jun 20;12(6):668. doi: 10.3390/v12060668.
21. Weitzman M.D., Linden R.M. (2012) Adeno-Associated Virus Biology. In: Snyder R., Moullier P. (eds) Adeno-Associated Virus. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 807. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-370-7_1

22. Berns KI. Parvovirus replication. *Microbiol Rev.* 1990 Sep;54(3):316-29. PMID: 2215424; PMCID: PMC372780
23. Nonnenmacher M, Weber T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* 2012 Jun;19(6):649-58.
24. Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol.* 2006 Oct;80(19):9831-6. doi: 10.1128/JVI.00878-06.
25. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Oct;21(4):583-93.
26. Zinn E, et al. Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol.* 2014, 90-97.
27. Directive 2000/54/EC <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000L0054&from=EN>
28. NIH Guidelines 2019 (https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.pdf)
29. Howard DB and Harvey BK. Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Human Gene Therapy Methods* 28(1), 2017, 39-48.
30. WHO Technical Report, Series No. 924, 2004
31. Tseng and Agbandje Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors. *Front Immunol.* 2014 Jan 30;5:9. doi: 10.3389/fimmu.2014.00009. eCollection 2014 Wang L, Morizono H, Lin J, Bell P, Jones D, McMenamin D, Yu H, Batshaw ML, Wilson JM. Preclinical evaluation of a clinical candidate AAV8 vector for ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency reveals functional enzyme from each persisting vector genome. *Mol Genet Metab.* 2012 Feb;105(2):203-11. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.10.020. Epub 2011 Nov 7. PMID: 22133298; PMCID: PMC3270700.
32. Wang L, Morizono H, Lin J, et al. Preclinical evaluation of a clinical candidate AAV8 vector for ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency reveals functional enzyme from each persisting vector genome. *Mol Genet Metab.* 2012 Feb;105(2):203-11.
33. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther.* 2008 Oct;16(10):1648-56. doi: 10.1038/mt.2008.171. Epub 2008 Aug 5. PMID: 18682697.
34. Duan D, Sharma P, Yang J, et al. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol.* 1998;72:8568-77.
35. Schnepp BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson, PR. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol.* 2003(77):3495-3504.