

様式第1（第7条関係）

第一種使用規程承認申請書

令和4年1月31日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 ファイザー株式会社
申請者 代表取締役社長 原田 明久（印）
住所 東京都渋谷区代々木3丁目22番7号
新宿文化クイントビル

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 3B 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、ヒトミニ ATP7B タンパク質 (miniATP7B) を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (AAV3B-miniATP7B)</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、容器に入れ、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、患者の静脈内に投与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> <p>投与後の患者からの排出等の管理</p>

- (6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位から排出される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投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、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、当該患者に適切な指導を行う。
- (9) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。

患者検体の取扱い

- (10) 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。
- (11) 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入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規程に従って取り扱う。
- (12) 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

- (13) 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。
- (14) 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。
- (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。

- (16) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び患者から採取した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患者から採取した検体等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。
- (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、密封された状態でオートクレーブ等により不活化処理を行い、廃棄する。

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

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、パルボウイルス科デペンドウイルス属 (*Parvoviridae Dependovirus*) に分類される一本鎖 DNA ウイルスである (文献 1)。

AAV はヒト以外にサル、イヌ及びげっ歯類等の哺乳動物に感染し、塩基配列解析に基づいて 108 株以上が同定されている (文献 2 及び文献 3)。これまでに AAV は、キャプシドの違いから複数の血清型に分類されている (文献 3)。AAV は自然界に広く分布しており、成人の約 85% は AAV に対する抗体を有するとされるが (文献 4)、病原性は報告されていない (文献 5)。

本遺伝子組換え生物等は肝臓に組織指向性がある AAV の血清型 3B (AAV3B) (文献 6) 由来のキャプシドタンパク質を有する。AAV3B は AAV 血清型 3A と塩基配列の違いは 16 塩基である (文献 7)。

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。)

AAV のウイルスタンパク質 (Rep 及び Cap) をコードする遺伝子を取り除き、遺伝子治療用の供与核酸に置き換えることにより作製された遺伝子組換え AAV は、様々な疾患の遺伝子治療の臨床試験で用いられている (文献 8、9 及び 10)。AAV を利用したヒトの遺伝子治療として、欧米にて 3 製品 (うち 1 製品は販売終了)、国内にて 1 製品が承認されている。

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 20 面体構造の、エンベロープを持たないキャプシド粒子である。AAV ゲノムは約 4.7 kb の線状一本鎖 DNA である。DNA 鎖は両端に位置する逆位末端反復配列 (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 (文献 11)。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。*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 20 面体のキャプシドを形成する 3 つのキャプシドタンパク質 (VP1、VP2 及び VP3) をコードする (文献 12)。

AAV の感染は、細胞表面に発現している血清型非特異的受容体 AAVR を介して感染する

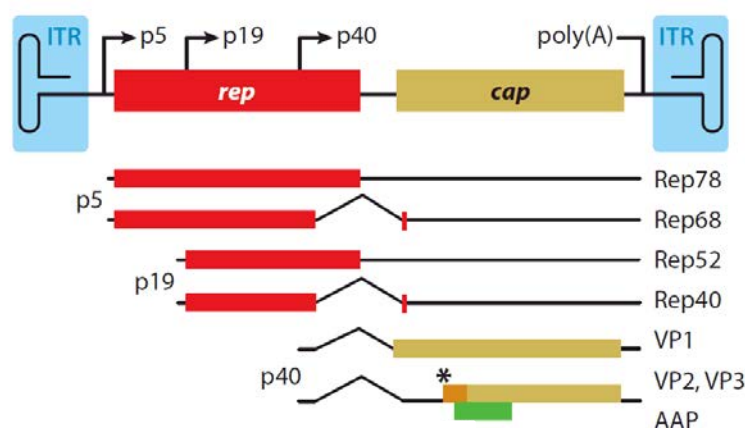
が、血清型により組織移行性を規定している受容体（又はコレセプター）が異なることが報告されている（文献 13）。例えば、AAV 血清型 2（AAV2）では、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、線維芽細胞増殖因子（Fibroblast growth factor、以下 FGF）受容体、肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor、以下 HGF）受容体、 $\alpha V\beta 5$ インテグリン、 $\alpha V\beta 1$ インテグリン及びラミニン受容体等に結合し、血管平滑筋細胞、骨格筋、中枢神経及び肝臓等に組織指向性を示すことが知られている。また、AAV 血清型 3（AAV3）もヘパラン硫酸プロテオグリカンを含む各種の受容体に結合することが知られているが、特に HGF 受容体の関与が強いことから、AAV3 は肝臓への指向性が高い（文献 14）。本遺伝子組換え生物等のキャプシドタンパク質の起源である AAV3B は AAV3 の亜型であり、同様に肝臓に組織指向性を示すことが報告されている（文献 6）。

図 1 に野生型 AAV のゲノム構造を示す。図における矢印（→）はプロモーター配列（p5、p19 及び p40）の位置を示す。野生型 AAV のウイルスゲノムの両端には ITR が存在し、ゲノムの内部には *rep* 及び *cap* 遺伝子が存在する。

rep 遺伝子は p5 及び p19 プロモーターから転写開始され、ウイルスの複製に必要な 4 つの非構造タンパク質（Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40）をコードする（赤色）。*cap* 遺伝子は p40 プロモーターから転写開始され、キャプシドを形成する 3 つの構造タンパク質（VP1、VP2 及び VP3）をコードする（黄色）。VP2 のスタートコドンは、VP3 より手前（図 1 における*の位置）にあるため、VP2 タンパク質の N 末残基がより長くなる（オレンジ色）。

加えて、VP2/VP3 mRNA はアセンブリ活性化タンパク質（AAP）もコードする（緑色）。ゲノムは、3 つの AAV 構造タンパク質の VP1、VP2 及び VP3 から構成される正 20 面体のキャプシド内にパッケージングされる。キャプシドは、VP1 : VP2 : VP3 を 1 : 1 : 10 のモル比で有する 60 個のタンパク質からなると推定される。

図 1 野生型 AAV のゲノム構造（出典：文献 15）



AAV の各構成要素の機能を以下に示す。

- ITR : ゲノムの両末端には、T字型のヘアピン構造が存在し、複製の開始、ウイルス

粒子へのパッケージング、宿主細胞の染色体DNAへの組込み等に関与するとされる。

- *rep* 遺伝子：*rep* 遺伝子は、野生型 AAV ウイルスの複製に必要な4種の Rep タンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40) をコードする。そのうち、large Rep と呼ばれる Rep78 及び Rep68 タンパク質の発現は、p5 プロモーター制御下に生じる2つのスプライシングバリエント mRNA にコードされ、ともに部位特異的エンドヌクレアーゼ、インテグラーゼ及びヘリカーゼとして機能する。small Rep と呼ばれる Rep52 及び Rep40 は下流のプロモーター (p19) による制御下に転写されるスプライシングバリエント mRNA によりコードされ、そのアミノ酸配列は、それぞれ Rep78 及び Rep68 タンパク質の C 末端側の部分配列である。Rep52 及び Rep40 タンパク質の正確な役割は分かっていないが、ヘリカーゼドメインが含まれている。
- *cap* 遺伝子：*cap* 遺伝子は3種のキャプシドタンパク質 (VP1、VP2 及び VP3) をコードしている。これらのタンパク質は AAV の構造を構成している。いずれの mRNA も同一のプロモーター p40 の制御下に転写されるが、VP1 と VP2/VP3 は異なるスプライシングバリエントにコードされる。また、VP2 及び VP3 の翻訳には異なる開始点が用いられる。VP1 及び VP2 に存在する N 末端配列は核局在化シグナル及びホスホリパーゼ A2 活性を有し、感染に必要である。更に最近、異なるリーディングフレームから Assembly-activation protein (AAP) が翻訳されていることが報告されている。AAP は、主要なキャプシドタンパク質 VP3 の核内への局在、キャプシドの構築及び成熟を促進する。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

AAV は、宿主への持続感染又は感染細胞の核内に潜伏感染して環境中に生存しており、ヒト、サル、イヌ及びげっ歯類等の哺乳動物に感染することが報告されているが、ヘルパーウイルス非存在下では増殖しない (文献 16)。アデノウイルス及び単純ヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスの同時感染、又は AAV が潜伏感染した細胞に更にヘルパーウイルスが重複感染することにより、AAV が複製され増殖する可能性がある (文献 17)。

(3) 捕食性又は寄生性

「該当なし」

(4) 繁殖又は増殖の様式

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 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 (文献 2 及び 18)。AAV のヒトでの増殖は、ヘルパーウイルスとの共存下で起こる。ヘルパーウイルス存在下の AAV の増殖様式として、ヘルパーウイルスとしてアデノウイルスが共感染した場合には、ヘルパーウイルス由来の *E1a*、*E1b*、*E2a*、*E4* 及び *VA* 遺伝子の産物により、*rep* 及び *cap* 遺伝子の産物が産生され、AAV の複製が可能となる (文献 17)。ヘルパーウイルス

非存在下では AAV は複製されず、主にエピソームとして存在するが、まれに第 19 番染色体に組み込まれて潜伏することが知られている（文献 19 及び 20）。なお、本遺伝子組換え生物等のキャプシドタンパク質である AAV3B は、肝臓に組織指向性を示すことが報告されている（文献 6）。

（5） 病原性

成人の約 85%は AAV に対する抗体を有するとされるが（文献 4）、病原性は報告されていない（文献 5）。

（6） 有害物質の産生性

感染細胞内で産生される宿主のウイルスゲノム由来タンパク質である Rep、VP、AAP タンパク質に有害性は認められていない。

（7） その他の情報（不活化条件等を含む。）

AAV が属するパルボウイルスは、エンベロープがない一本鎖 DNA ウイルスで、物理化学的に安定なキャプシドを有し、自然環境中での生存期間が長く、数ヶ月間感染能を有する可能性がある。乾いたプラスチック表面に付着した場合は 15 日間感染力のある AAV が生存すること、マウスのケージの敷物に付着した場合は少なくとも 3 日間は生存することが報告されている（文献 21）。また、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（文献 22）。

パルボウイルスは、加熱（74℃ 以上）、水酸化ナトリウム、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（文献 23 及び 24）、AAV は、高圧蒸気滅菌（121℃、20 分）、次亜塩素酸ナトリウム（1～10%溶液、20 分）、ヨウ素又は 0.25%過酢酸により不活化される（文献 22）。なお、ウイルスが接触した金属面には、次亜塩素酸ナトリウム及びヨウ素は腐食性を示し適さないため、0.25%過酢酸の使用によりウイルスを不活化することが望ましい（文献 22）。

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供与核酸は、以下の構成要素から成る。また、各構成要素は合成由来の短いスペーサー配列により連結されている。なお、本項の詳細は別紙 1 に示す。

- i. ITR（両末端）：AAV2由来
- ii. ██████████ プロモーター：████████、アクセッション番号 ██████████ の配列と非常に類似した配列である。
- iii. *ATP7B* ミニ遺伝子：ヒト由来、アクセッション番号 ██████████ の配列と

非常に類似した配列である。本遺伝子では、ヒトATP7Bタンパク質のアミノ酸残基中、[REDACTED]位に位置するmetal binding sites (MBS) ドメインの[REDACTED]をコードする遺伝子を除いている。MBSドメイン[REDACTED]を除いたことによる、銅-ATPaseへの影響はない。また、シグナル配列であるヒトATP7Bタンパク質の[REDACTED]のアミノ酸残基は維持されている。

- iv. 合成ポリアデニル化シグナル：[REDACTED]

(2) 構成要素の機能

本遺伝子組換え生物等の供与核酸の構成要素の機能を以下に示す。なお、本項の詳細は別紙1に示す。

- i. ITR (両末端) : AAV一本鎖DNAゲノムのパッケージングと複製に関与する。
- ii. [REDACTED]プロモーター：[REDACTED]遺伝子に由来する肝臓特異的プロモーターであり、肝臓でのATP7Bミニ遺伝子の発現を調節する。
- iii. ATP7Bミニ遺伝子：ヒトATP7B遺伝子の短縮型cDNA配列であり、短縮型ATP7Bタンパク質（ミニATP7Bタンパク質）をコードする。肝細胞内でのミニATP7Bタンパク質の発現によりヒトATP7Bタンパク質の機能を代替し、銅の輸送機能を改善する。
- iv. 合成ポリアデニル化シグナル：ポリアデニル酸鎖は、mRNAを分解から保護し、成熟mRNAの細胞質への輸送を促進し、翻訳開始にかかわるタンパク質との結合に関与する。

本遺伝子組換え生物等は野生型のAAVに由来しているが、ウイルスのタンパク質をコードする *rep* 及び *cap* 遺伝子を欠失している。*rep* 及び *cap* 遺伝子産物はウイルス DNA の複製、感染細胞染色体への組込み（潜伏感染時）、AAV粒子の形成に必須であり、本遺伝子組換え生物等は自然界でその複製が生じないようにこれらの遺伝子を欠失させている。なお、本遺伝子組換え生物等の構築によって意図しないオープンリーディングフレーム (ORF) が生じる可能性及びそれらが有害な配列をコードしている可能性について、供与核酸の塩基配列を NCBI nr データベースに対する BLAST 検索により検討したが、これまでのところ有害な可能性のある配列との相同性は見出されていない。

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は、ウイルス粒子 (AAV2 由来) の複製及びパッケージングに必要な *rep* 及び *cap* 遺伝子を取り除き、上記 II-1 (供与核酸に関する情報) に示す供与核酸に置換している。本遺伝子組換え生物等のゲノム構造及び全塩基配列並びに発現されるタンパク質の構成を別紙 1 に示す。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への核酸の移入は、[REDACTED] プラスミド (ベクタープラスミド) 及び [REDACTED] プラスミド (ヘルパー *rep/cap* プラスミド) をヒト胎児腎臓由来細胞 (HEK293 細胞) へトランスフェクションすることにより行う。これらのプラスミドの概略を以下に示す。なお、本項の詳細は別紙 2 に示す。

- i. ベクタープラスミド: 本プラスミドは、治療用遺伝子 (*ATP7B* ミニ遺伝子) 発現カセットを含むプラスミドである。治療用遺伝子発現カセットは AAV2 由来の ITR に挟まれた区間にクローニングされている。治療用遺伝子発現カセットは、[REDACTED] プロモーター、*ATP7B* ミニ遺伝子、合成ポリアデニル化シグナルから成る。
- ii. ヘルパー *rep/cap* プラスミド: 本プラスミドは、[REDACTED] の Rep タンパク質及び AAV3B 由来の Cap タンパク質を発現する。また、本プラスミドは、*rep* 及び *cap* 遺伝子の発現を誘導するために必要なアデノウイルス血清型 5 のヘルパー遺伝子 (*E2a*、*E4* 及び *VA RNA* 等) を有しているが、アデノウイルスを生成するために必要な遺伝子は有していない。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本遺伝子組換え生物等の製造は、米国にて行う。

本遺伝子組換え生物等の製造工程の概略を以下に示す。なお、本項の詳細は別紙 2 に示す。

解凍したセルバンクを培養して得られた HEK293 細胞に、[REDACTED] プラスミド及び [REDACTED] プラスミドをトランスフェクションして培養後、細胞を溶解し、細胞片を除去する。清澄化した液からウイルス粒子を精製し、濃縮後透析ろ過して原薬のプールを得る。原薬は無菌ろ過後に容器に充填して本遺伝子組換え生物等の製剤を得る。得られた本遺伝子組換え生物等について、品質管理試験を実施する。なお、本遺伝子組換え生物等の品質管理試験において、複製能を有する AAV を管理する試験 (細胞を用いた定量 PCR 法) を設定している。

4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

本遺伝子組換え生物等に移入した核酸は、AAV2 由来の ITR に挟まれた治療用遺伝子及びその発現調節エレメントを含む一本鎖 DNA として存在する（別紙 1）。移入した核酸は、凍結保管中は極めて安定で、感染する動植物等の種類及び感染方法が保管中に変化することはない。また、本遺伝子組換え生物等は複製に関わる遺伝子を欠損した非増殖型であり、ヘルパーウイルスが存在しても複製されることはない。

本遺伝子組換え生物等が標的細胞に感染すると、細胞の核内にてパッケージから解かれた一本鎖 DNA は、5'及び3'末端に位置する ITR により複製され、環状二本鎖 DNA として存在する。染色体中への AAV ゲノムの組込み頻度は低いため、環状二本鎖 DNA は安定したエピソームとして核内に存在し（文献 26、27）、導入遺伝子を発現するよう転写される。

5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本遺伝子組換え生物等の排出を測定するため、ICH Q2 (R1) ガイドライン「分析法のバリデーション」に従い、ヒト尿、唾液、糞便および血液中の本遺伝子組換え生物等に特異的な DNA 配列を検出および定量するための定量 PCR 法を検証した。PCR 法に用いるプライマー及びプローブのセットは、本遺伝子組換え生物等を特異的に検出するために、ヒト *ATP7B* 遺伝子から metal binding sites をコードする遺伝子を欠失させ再結合した部分を増幅するように設計した。本分析法は、 $20 \sim 1 \times 10^8$ コピー/5 μL の定量範囲にわたって、直線性、定量範囲、精度、定量限界、95%信頼区間での検出限界、特異性、真度および頑健性について、あらかじめ設定したパラメーターに適合した。定量限界は、ヒトゲノム DNA 1 μg までの濃度で 20 コピー/5 μL であった。

唾液、尿、血液および糞便において、本遺伝子組換え生物等の DNA に特異的な DNA 配列の回収が認められた。バリデーションデータに基づき、抽出に最適な検体量は、唾液および尿については 220 μL 、血液は 100 μL であり、糞便は 50 mg であった。本分析法は、臨床検体中の本遺伝子組換え生物等の DNA に特異的な配列を定量する分析法として検証済みと判断した。バリデーション結果の詳細は別紙 5 に記載した。

カニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験における本遺伝子組換え生物等の生体内分布及び排出の検討には、カニクイザルの各生体試料（各組織、血漿、尿、糞便、唾液及び鼻汁）に対して適切にバリデートされた上記と同様の定量 PCR 法を用いた。定量限界は 50 コピー/ μg DNA（組織、糞便）または 50 コピー/5 μL （血漿、尿、唾液、鼻汁）であった。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

本遺伝子組換え生物等のキャプシドは、野生型 AAV3B のキャプシドと同様の構成である（VP1、VP2 及び VP3 の 3 つのキャプシドタンパク質から構成されている）。そのため、本遺伝子組換え生物等と野生型 AAV3B との感染宿主域に違いはない。

本遺伝子組換え生物等は、野生型 AAV3B を宿主として作製されたものであり、野生型

AAV3B と同様に、感染により細胞の核内に移行した一本鎖 DNA が複製され環状二本鎖 DNA となり、安定したエピソームとして存在する。また、野生型 AAV3B と同様に、肝臓に組織指向性がある。

本遺伝子組換え生物等の複製には、野生型 AAV とヘルパーウイルスが同時に感染（3重感染）する必要があるため、自然界で本遺伝子組換え生物等の複製が起こる可能性は極めて低い。すなわち、本遺伝子組換え生物等は、野生型 AAV3B と異なり、ウイルス粒子の複製及びパッケージングに必要な *rep* 及び *cap* 遺伝子を持たないことから、ヘルパーウイルスと共感染するのみでは、本遺伝子組換え生物等は複製されない。また、本遺伝子組換え生物等は、ゲノム DNA が野生型 AAV3B と異なり、AAV2 由来の ITR の間に治療用遺伝子及びその発現調節エレメントを含む一本鎖 DNA が含まれる。

本遺伝子組換え生物等は *rep* 遺伝子を持たないため、染色体への組込み頻度が野生型 AAV3B と比べて低いと考えられる。

本遺伝子組換え生物等は、2つの ITR に挟まれた *rep* 及び *cap* 遺伝子領域が *ATP7B* ミニ遺伝子発現カセットに置換されており、感染細胞内で Rep 及び Cap タンパク質の代わりにミニ ATP7B タンパク質が産生される。

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、容器に入れ、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、患者の静脈内に投与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、投与部位から排出される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投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、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、当該患者に適切な指導を行う。
- (9) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。

患者検体の取扱い

- (10) 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。
- (11) 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入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規程に従って取り扱う。
- (12) 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

- (13) 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。
- (14) 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。
- (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。

(16) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び患者から採取した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患者から採取した検体等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。

(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、密封された状態でオートクレーブ等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の患者への投与後、本遺伝子組換え生物等及び複製能を獲得した遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (rcAAV) について十分な排出データが得られるまでの間、患者から該当する各検体を採取し、ウイルス排出を定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) 法にて繰り返しモニターする。現在予定している排出試験計画概要を別紙 4 に記載する。

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

該当なし

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について、単回静脈内投与毒性試験及び生体内分布試験を含む非臨床安全性試験を実施した。詳細については別紙 3 に示す。

(1) 単回静脈内投与毒性試験及び生体内分布試験 (GLP 試験)

本遺伝子組換え生物等のカニクイザルを用いた単回静脈内投与試験 (2 用量、観察期間: 6 ヶ月) を実施し、生体内分布及び排出についても評価した。

● 一般毒性

本遺伝子組換え生物等の忍容性はいずれの用量 ([] 及び [] vg/kg) でも良好であり、評価した一般状態、摂餌量、体重、眼科検査、心血管機能、呼吸機能、血液学的検査、凝固検査及び尿検査の各パラメーターについて、投与による影響は認められなかった。本試験で評価したサイトカイン及び補体のレベルには、投与に関連した影響は認められなかった。高用量群で一過性の ALT 又は AST の軽度の増加が認められたが、変化の程度及び発現率が低く、一過性であり、関連する病理組織学的所見を伴わなかったことから、毒性ではないと判断された。病理組織学的検査で脾臓の白脾髄の胚中心の増加が観察されたが、本遺伝子組換え生物等の投与との関連は明確ではなく毒性学的意義は低いと

考えられた。以上のように、いずれの用量においても忍容性は良好であり、毒性所見は認められなかった。

- 生体内分布

投与後 1、3 及び 6 ヶ月のカニクイザルにおける本遺伝子組換え生物等の生体内分布から、分析した全例（低用量及び高用量群）において、肝臓が主に本遺伝子組換え生物等の標的となる臓器であることが示された（ $2.8 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^7$ コピー/ μg DNA）。投与後 1 ヶ月では、本遺伝子組換え生物等のゲノムは脾臓、胆嚢、リンパ節、腎臓及び副腎などにも検出された。肝臓/脾臓ベクターゲノム比は低用量群で 12、高用量群では 47 であった。いずれの剖検時点においても、低用量及び高用量群ともに中枢神経系にベクターDNA は検出されなかった。雌 1 例を除く高用量群のすべての個体及び低用量群の雌雄各 2 例の生殖腺において、投与後 1、3 及び 6 ヶ月に本遺伝子組換え生物等のゲノムが検出されたが、卵巣では $92 \sim 6.5 \times 10^2$ コピー/ μg DNA、精巣では $81 \sim 3.4 \times 10^3$ コピー/ μg DNA と定量限界値（50 コピー/ μg DNA）の 2~68 倍程度であり、経時的に定量下限値付近まで減少した。

以上の結果より、カニクイザルにおいて、AAV3B の肝臓への強い指向性が確認され、肝指向性 AAV（AAV3B を含む）で報告されている生体内分布及び毒性（肝毒性を示さない）プロファイル（文献 28）と非常に類似していた。本遺伝子組換え生物等の生体内分布プロファイルに性差は認められず、評価したいずれの臓器においても組織学的所見は認められなかった。

- 排出

血漿中では、低用量群の 9 例のうち、投与後 8 日で 5 例、投与後 15 日では 2 例の動物が陽性であったが、投与後 29 日以降に定量限界値（50 コピー/ $5 \mu\text{L}$ ）以上のベクターDNA が検出されたのは 2 例（ 6.85×10^1 コピー/ $5 \mu\text{L}$ ：投与後 29 日、 5.04×10^1 コピー/ $5 \mu\text{L}$ ：投与後 57 日）のみであった。高用量群における血漿中のベクターDNA は、全例において投与後 8 日まで陽性、9 例中 3 例においては投与後 15 日まで陽性（最大 4×10^2 コピー/ $5 \mu\text{L}$ ）、9 例中 1 例においては投与後 29 日まで持続して陽性（ 1.7×10^2 コピー/ μg DNA）であったが、投与後 57 日以降では全例が陰性であった。

唾液中への排出は、投与後 29 日まで低用量群の 9 例中 4 例、及び高用量群の 9 例中 6 例で検出された。1 例のみ、投与後 57 日まで陽性が持続していたが（ 1.8×10^2 コピー/ $5 \mu\text{L}$ ）、その後の 2 時点（投与後 92 及び 120 日）では陰性であった。

鼻汁中への排出は、低用量群の 1 例でのみ投与後 57 日まで検出されたが、投与後 92 日では全例で陰性であった。

尿中への排出は、いずれの用量群でも投与後 8 日まで検出され、投与後 15 日では全例で陰性であった。

糞便中への排出は、低用量群ではいずれの個体でも投与後 15 日まで検出されたが、高用量群では 4 例のみで陽性であった。投与後 29 日では全例で陰性であった。

以上の結果より、投与後 3 ヶ月以降はベクターDNA の血液、唾液、鼻汁、尿及び糞便中への排出は認められなかった。

なお、カニクイザルに投与した本遺伝子組換え生物等の用量は、臨床試験での予定最高用量よりも高い。

6 国外における使用等により得られた情報

欧米に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を用いた国外の臨床試験の概略及び情報を別紙 4 に示す。

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 AAV3B と同一と考えられ、微生物に感染することはなく、影響を受ける可能性のある微生物は特定されない。

(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従う限り、生物多様性へ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

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 AAV3B 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と考えられ、ヒト以外にサル、イヌ及びげっ歯類等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等の非臨床試験の実績からは、本遺伝子組換え生物等及び感染細胞

で産生されるヒトの ATP7B タンパク質に由来するミニ ATP7B タンパク質等の病原性は認められていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等の環境中への拡散は殆どなく、ヘルパーウイルスが共存しても野性型 AAV が共感染しない限り増殖しない。

野生型 AAV に病原性は認められていないことから、本遺伝子組換え生物等に病原性が生じる可能性は極めて小さい。

製造工程で生じうる rcAAV は、原薬の規格試験で検出されない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限り、環境中で増殖することはない。したがって、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

当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、病原性に起因した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

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 AAV3B 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と考えられ、ヒト以外にサル、イヌ及びげっ歯類等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等により、感染細胞でヒトの ATP7B タンパク質に由来するミニ ATP7B タンパク質が新たに産生されるが、内在性の ATP7B を発現している健康なカニクイザルに vg/kg (臨床での開始用量の 倍) までの用量で静脈内投与した非臨床試験において、ミニ ATP7B タンパク質に対する体液性及び細胞性の免疫反応並びに銅の恒常性について評価したところ、ATP7B (サルの内在性 ATP7B と本遺伝子組換え生物等により発現するミニ ATP7B の両方) タンパク質の過剰発現に関連する有害事象を示唆する影響はみられなかった。これらの結果は、ATP7B の過剰発現に起因する有害性 (特に銅の恒常性への影響) を及ぼさないことを示すものである。また、他に新たな有害物質が産生されることはない。なお、異種動物においては、アレルゲンとなる可能性を除いては、ミニ ATP7B タンパク質の有害性は知られていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等は環境中への拡

散は殆どなく、ヘルパーウイルスが共存しても野生型 AAV が共感染しない限り増殖しない。

そのため、本遺伝子組換え生物等により有害物質が生じる可能性は極めて小さい。製造工程で生じうる rcAAV は、原薬の規格試験で検出されないことを確認するため、最終製品から 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限り、環境中で増殖することはない。したがって、本遺伝子組換え生物等が発現するミニ ATP7B 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

当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、有害物質の産生性に起因した生物多様性影響が生ずるおそれはない。

4 核酸を水平伝播する性質

(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

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は、野生型 AAV3B と同様と考えられ、ヒト以外にサル、イヌ及びげっ歯類等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。

(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等から第三者（ヒトを含む哺乳類）へ伝播する可能性があるが、相同組換えにより本遺伝子組換え生物等の核酸が、感染細胞の染色体に組み込まれる可能性は極めて低い。しかしながら、野生型 AAV の DNA は感染細胞の染色体 DNA の特定部位に組み込まれることが知られており、外来性の Rep タンパク質の存在下で、本遺伝子組換え生物等の核酸が、感染細胞の染色体に組み込まれる可能性は否定できない。

(3) 影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者の排泄物等から第三者（ヒトを含む哺乳類）へ伝播する可能性は、第一種使用規程に従う限り、極めて低い。野生型 AAV 及びヘルパーウイルスとの共感染により、第三者や野生動物に水平感染する可能性はあるものの、患者に投与された本遺伝子組換え生物等が水平感染を生ずるおそれは極めて低い。また、本遺伝子組換え生物等は *rep* 及び *cap* 遺伝子を失っているために核酸が感染細胞の染色体 DNA の特定部位に組み込まれる可能性も極めて低い。

製造工程で生じうる rcAAV は原薬の規格試験で検出されないことを確認するため、最終製品から 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限り、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

当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、核酸を水平伝播する性質に起因した生物多様性影響が生ずるおそれはない。

5 その他の性質

雌雄カニクイザルにおける本遺伝子組換え生物等の生体内分布について評価した非臨床試験において、観察期間を通して生殖器官でベクターゲノムが検出されたものの（別紙3）、AAVの生殖細胞への組込みに関する公表文献（文献29、30、31、32、33）に基づき、本遺伝子組換え生物等が生殖細胞に組み込まれる可能性及び垂直感染する可能性は極めて低いと判断される。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物等が感染する動植物等の種類は野生型AAV3Bと同等で、哺乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

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従う限り、本遺伝子組換え生物等の環境中への拡散は極力抑えられており、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* 遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型AAV3Bと本質的に同一であり、本遺伝子組換え生物等による *ATP7B* ミニ遺伝子の発現はヒト及び他の哺乳動物に病原性、有害物質の産生性及び核酸を水平伝達する性質をもたないことから、生物多様性への影響はないと考えられる。また、本遺伝子組換え生物等は複製に関わる遺伝子を欠損しているため、野生型AAV及びヘルパーウイルスと3重感染しない限り、環境中で増殖することはなく、その可能性は極めて低い。ヒト体内の同一の細胞に本遺伝子組換え生物等と野生型AAV及びそのヘルパーウイルスが感染する可能性は極めて低く、本遺伝子組換え生物等はやがて環境中から消滅すると考えられる。

したがって、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従う限り、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。

文献

- 1 Carter BJ. In Lasic DD and Templeton NS. Gene Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies. New York: Marcel Dekker, Inc. 2000, 41-59.
- 2 Guangping G, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. Clades of Adeno-Associated Viruses are widely disseminated in Human Tissues. *J. Virol.* 78(12), 2004, 6381-8.
- 3 Srivastava A. In vivo Tissue-Tropism of Adeno-Associated Viral Vectors. *Curr Opin Virol.* 21, 2016, 75-80.
- 4 Berns KI. Parvovirus Replication. *Microbiological Reviews*, Sept. 1990, 316-29.
- 5 Flotte TR, Carter BJ. Adeno-Associated Virus for Gene Therapy. *Gene Ther.* 2, 1995, 357-62.
- 6 Shaoyong Li, Chen L, Li Z, et al. Efficient and Targeted Transduction of Nonhuman Primate Liver with systemically delivered Optimized AAV3B Vectors. *Mol Ther.* 23(12), 2015, 1867-76.
- 7 Rutledge E, Halbert C, Russell D. Infectious Clones and Vectors derived from Adeno-Associated Virus (AAV) Serotypes other than AAV Type 2. *J Virol.* 72(1), 1998, 309-19.
- 8 Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo Gene Transfer for Genetic Disease using AAV: Progress and Challenges. *Nat Rev Genet.* 12, 2011, 341-55.
- 9 Chapin JC, Monahan PE. Gene Therapy for Hemophilia: Progress to Date. *BioDrugs.* 32, 2018, 9-25.
- 10 Ginn, SL, Amaya AK, Alexander IE, et al. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2017: An update, *J Gene Med.*, 2018, e3015.
- 11 Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol Ther.* 14, 2006, 316-27.
- 12 Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 31(4), 2017, 317-34.
- 13 Nonnenmacher M, Weber T. Intracellular Transport of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors. *Gene Ther.* 19(6), 2012 Jun, 649-58.
- 14 Ling C, Yuan L, Jasmine K, et al. Human Hepatocyte Growth Factor Receptor is a Cellular Coreceptor for Adeno-Associated Virus Serotype 3. *Hum Gene Ther.* 21(12), 2010, 1741-7.
- 15 Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu. Rev. Virol.* 1(1), 2014, 427-51.
- 16 Lisowski L, Tay SS, Alexander IE. Adeno-Associated Virus Serotypes for Gene Therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 24, 2015, 59-67.
- 17 Tenenbaum L., Lehtonen E, Monahan PE. Evaluation of Risks related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors. *Current Gene Therapy* 3, 2003, 545-65.
- 18 Zinn E, Vandenberghe LH. Adeno-Associated Virus: fit to serve. *Curr Opin Virol.* 2014, 90-7.
- 19 Chen CL, Jensen RL, Schnepf BC, et al. Molecular Characterization of Adenoassociated Viruses infecting Children. *J Virol.* 79, 2005, 14781-92.
- 20 Schnepf BC, Jensen RL, Chen CL, et al. Characterization of Adeno-Associated Virus Genomes isolated from Human Tissues. *J Virol.* 79, 2005, 14793-803.

- 21 Reuter JD, Xiaoqun F, Christina SL, et al. Assessment of Hazard Risk associated with the Intravenous Use of Viral Vectors in Rodents. *Comparative Medicine* 62(5), 2012, 361-70.
- 22 Howard DB, Harvey BK. Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Human Gene Therapy Methods* 28(1), 2017, 39-48.
- 23 WHO Technical Report, Series No. 924, 2004.
- 24 Sofer G. Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century. *BioPharm International*, 2003, 42-68.
- 25 Levitt N., Briggs.D, Gil A, et al. Definition of an Efficient Synthetic Poly(A) Site. *GENES & DEVELOPMENT* 3 1989, 1019-25.
- 26 Nakai H, Storm TA, Kay MA. Recruitment of Single-Stranded Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes and Intermolecular Recombination are responsible for Stable Transduction of the Liver in vivo. *J Virol.* 74, 2000, 9451-63.
- 27 Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, et al. Adeno-Associated Virus Vector Genomes persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle. *J Virol.* 82, 2008, 7875-85.
- 28 Wang L, Bell P, Somanathan S, et al. Comparative Study of Liver Gene Transfer with AAV Vectors Based on Natural and Engineered AAV Capsids. *Mol Ther.* 23(12), 2015, 1877-87.
- 29 Rajesekaran S, Thatte J, Periasamay J, et al. Infectivity of Adeno-Associated Virus Serotypes in Mouse Testis. *BMC Biotech.* 18:70, 2018; 1-9.
- 30 Couto LB, Parker A, Gordon JW. Direct Exposure of Mouse Spermatozoa to very high Concentrations of Serotype-2 Adeno-Associated Virus Gene Therapy Vector fails to lead to Germ Cell Transduction. *Hum Gen Ther.* 15(3), 2004, 287-91.
- 31 Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful Transduction of Liver in Hemophilia by AAV-Factor IX and Limitations imposed by the Host Immune Response. *Nat Med.* 12(3), 2006; 342-7.
- 32 Schuettrumpf J, Liu J-H, Couto LB, et al. Inadvertent Germline Transmission of AAV2 Vector: Findings in a Rabbit Model correlate with those in a Human Clinical Trial. *Molecular Therapy.* 13(6), 2006, 1064-73.
- 33 Favaro P, Downey HD, Zhou JS, et al. Host and Vector-Dependent Effects on the Risk of Germline Transmission of AAV Vectors. *Mol Ther.* 17(6), 2009, 1022-30.
- 34 Kramer G, Barajas M, Razquin N, et al. In vitro and in vivo Comparative Study of Chimeric Liver-Specific Promoters. *MOLECULAR THERAPY*, 7(3), 2003, 375-85.
- 35 Landegger L, Pan B, Askew C, et al. A Synthetic AAV Vector enables Safe and Efficient Gene Transfer to the Mammalian Inner Ear. *Nat Biotechnol.* 35(3), 2017, 280-4.
- 36 Grimm D, Kern A, Rittner K, et al. Novel Tools for Production and Purification of recombinant Adenoassociated Virus Vectors. *Hum Gene Ther.* 9(18), 1998, 2745-60.
- 37 Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA. Helper Virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based Production of Adeno-associated Virus Vectors of Serotypes 1 to 6. *Mol Ther.* 7(6), 2003, 839-50.

- 38 Everds N., Reindel J, Werner J, et al. Variability of Spleen and Mesenteric Lymph Node in Control Cynomolgus Monkeys (*Macaca Fascicularis*) from Nonclinical Safety Studies: A Retrospective Assessment. *Toxicol Pathol*, 47(1), 2019, 53-72.