

第一種使用規程承認申請書

令和4年4月19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>rep及びcap遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス9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ATP7Bタンパク質を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（AAV9-ATP7B-MBD456）</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。
- (9) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、血液、尿、糞便、唾液等の検体について、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。

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。
- (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。

	<p>(15) 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>(16) 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>(17) 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>(18) 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

*rep*及び*cap*遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス9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、改変型銅輸送P型アデノシントリホスファターゼを発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (AAV9-ATP7B-MBD456) (以下、「本遺伝子組換え生物等」という。) は、アデノ随伴ウイルス血清9型 (AAV9) に由来するキャプシド及びアデノ随伴ウイルス2型に由来するITRを有する。

組換え型アデノ随伴ウイルス血清9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 et al., 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、キャ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)、その違いが組織指向性に影響を与えている。AAV9 は肝臓、神経、筋への指向性を有する。しかし、本遺伝子組換え生物等の ATP7B-XXXXXXXXXX コード配列は肝特異的プロモーター (LSP) の制御下にある。

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、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 (Cotmore et al., 2019; Srivastava, 2016; Kerr et al., 2006; Gao et al., 2004)。

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 (Louis Leune et al., 2013; Boutin et al., 2010; Tenenbaum et al., 2003; Chirmule et al., 1999)。約85%の成人がAAVに対する抗体を持っている (Tenenbaum et al., 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非常に有望視されてきた (Gao et al., 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 et al., 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 and Carter, 1995)。それ以後、組換えAAVは様々な疾患の遺伝子治療臨床試験で使用されている (Chapin and Monahan, 2018; Ginn et al., 2018; Mingozzi and High, 2011)。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。

ウィルソン病の治療を目的とした本遺伝子組換え生物等の開発に加えて、GM1ガングリオシドーシス2型 (NCT03952637)、ダノン病 (NCT03882437)、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD; NCT03362502、NCT03368742、NCT04240314)、脊髄性筋萎縮症1型 (NCT03837184) 及びムコ多糖症IIIA型 (NCT04088734) 等に対してAAV9を使用し、複数の適応症を対象とした臨床試験が進行中である。オナセムノゲン アベパルボベクは、脊髄性筋萎縮症1型の2歳未満の小児患者に対し、静脈内投与により治療を行うAAV9ベクターを用いた遺伝子治療用製品であり、米国では食品医薬品局 (FDA) より承認され、EUでは条件付き販売承認されている。その推奨用量である 1.1×10^{14} ベクターゲノム (vg) /kg (Zolgensma, 2020; Zolgensma, 2019) は、本遺伝子組換え生物等のヒト初回投与臨床試験 (UX701-CL301) で評価される最高用量レベル () の である。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、ウィルソン病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、LSPによって制御されたヒトATP7B- コード配列を含む発現カセットを含んだ非複製型組換えAAV9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、エンベロープを持たない一本鎖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.A参照; [Santiago-Ortiz and Shaffer, 2016](#); [Wu et al., 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 ([Naso et al., 2017](#))。 *cap*領域の異なるリーディングフレームにキャプシド形成を促進するアッセンブリ活性化タンパク質 (AAP) がコードされている。

ほとんどの組換えAAVと同様に、ITRを除く全ての野生型AAV配列が削除され、本遺伝子組換え生物等の特定のプロモーターと導入遺伝子に置き換えられている (図1.B)。

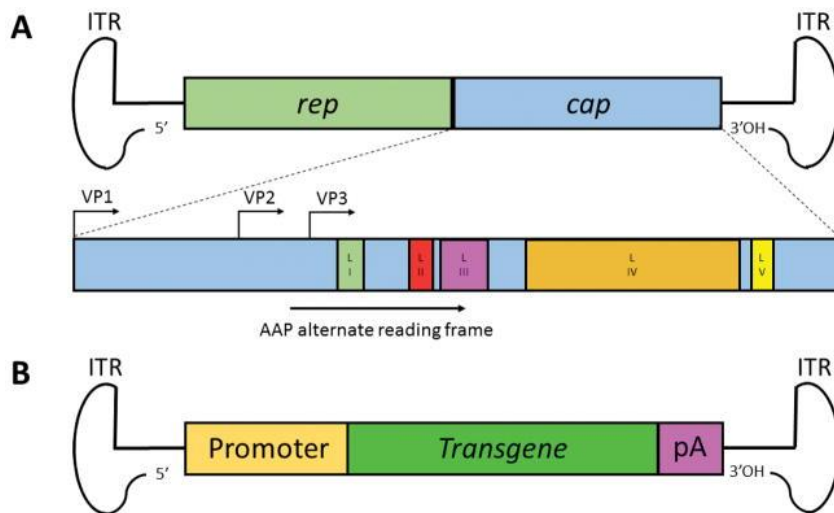


図1：野生型 AAV (A) と組換え AAV (B) のゲノム構造

(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 et al., 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 et al., 2015](#); [Tenenbaum et al., 2003](#))。

AAVの血清型が異なると、熱融解温度もpHにより異なる ([Lins-Austin et al., 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 で 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 (Weitzman and Linden, 2011; Tenenbaum et al., 2003; 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 (AAV9 では細胞表面グリカンの末端 β -ガラクトース) にウイルスが付着することから始まる (Nonnenmacher and Weber, 2012; Bell et al., 2011; Akache et al., 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。キャ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 and Weber, 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 and Berns, 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 (Zinn and Vandenberghe, 2014; Gao et al., 2004)。

(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 and Carter, 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 の生物的因子 (ヒトに病気を発症させる可能性が低い生物的因子) として定義される (EN, 2000)。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, 2019)。

(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 and Harvery, 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 and Harvery, 2017; WHO, 2004)。

- ヒト ATP7B-██████ 遺伝子 (Hasan et al., 2012) : ██████ ██████ ██████ ヒト ATPase 銅輸送 β コード領域。金属結合ドメイン 1～3 の特性を記した公表データ (Cater et al., 2004; Huster and Lutsenko, 2003; Wu et al., 2015) に基づき、ATP7B-██████ は野生型 ATP7B と類似した銅結合及びトランスゴルジ網への銅輸送等の生理活性を持つことが予測される。
- ██████ polyA シグナル (██████) : ATP7B-██████ mRNA の転写終結、及び効率的なポリアデニル化を目的とする。
- AAV2 ITRは、組換え AAV ゲノムの 5' 及び 3' 末端に位置する ██████ のヌクレオチド回文配列である。これらの配列はウイルスの複製起点となり、また事前に形成されたキャプシドへのウイルスゲノムパッケージングに必要な最小限のシスシグナルを含む (Kerr et al., 2006)。

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。本遺伝子組換え生物等は、遺伝子組換え DNA 技術を用いた野生型 AAV に由来し、██████ ヌクレオチドの一本鎖 DNA ゲノムを含んでいる。したがって、本遺伝子組換え生物等には宿主由来のウイルス性のコーディング遺伝子は含まれていない。

ウイルスの *rep* 遺伝子及び *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。

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、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 ██████ のオープンリーディングフレーム (ORF) 解析を行った結果、██████ の ATP7B 導入遺伝子とは別の ORF を発見した (██████ ██████ ██████)。発見された ██████ の ATP7B 導入遺伝子とは別の ORF はそれぞれ ██████ ██████ 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。さらに、本遺伝子組換え生物等のウイルスゲノムは、ウイルスエレメント、調節エレメント、及びその他の遺伝エレメント間に介在配列を持たず、途切れなく「シームレスに」クローン化されている。したがって、本遺伝子組換え生物等のゲノム内に追加の配列はない。

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。本遺伝子組換え生物等のベクターは、遺伝子組換え DNA 技術を用いた野生型 AAV に由来し、██████ ヌクレオチドの一本鎖 DNA ゲノムを含んでいる。したがっ

て、本遺伝子組換え生物等には宿主由来のウイルス性のコーディング遺伝子は含まれていない。

本遺伝子組換え生物等は *rep* 遺伝子及び *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型であると考えられ、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。野生型 AAV は複製欠損型であり、アデノウイルスやヘルペスウイルスのようなヘルパーウイルスとの共感染下でしか複製できない (Daya and Berns, 2008)。本遺伝子組換え生物等のような組換え AAV では *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子が除去されているため、さらに野生型 AAV の共感染を必要とする。

本遺伝子組換え生物等のゲノム構造、ドナー核酸の構成因子及び全塩基配列は、本書別紙 1 に記載する。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸は、産生過程で AAV *rep* 遺伝子が媒介し、ベクターゲノムに隣接している ITR によって、宿主 AAV キャプシド中に導入される。産生時に、微量ではあるが産生工程中の他の DNA 配列、とりわけベクターゲノム並びにパッケージング及びヘルパー遺伝子の産生細胞への導入に使用するプラスミドの DNA もキャプシド中に同時にパッケージングされることがある。

本遺伝子組換え生物等の遺伝子導入は、XXXXXXXXXX ヘルパーウイルス及び XXXXXXXXXX プラットフォームを用いて製造される。XXXXXXXXXX からの AAV 産生は、本遺伝子組換え生物等の製造工程において、野生型 XXXXXX ヘルパーウイルス感染後に開始される。

産生細胞株の詳細については、本書別紙 1 に記載する。

(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遺伝子導入は、XXXXXX ヘルパーウイルスと XXXXXXXXXX プラットフォームを用いて産生される。本遺伝子組換え生物等のベクターXXXXXX には、ベクターゲノム及びベクター DNA の増殖とパッケージングに必要な AAV *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子が含まれる。

本遺伝子組換え生物等の原薬は、XXXXXXXXXX 手順により製造される。簡潔に述べると、XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX

XXXXXXXXXX

XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX

XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX

XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXその後、最終的な本遺伝子組換え生物等の原薬をXXXXXXXXXX保管する。

許容できる工程性能を確保するため、製造工程中で工程内管理試験を実施する。この工程で使用する原材料を対象とする試験、XXXXXXXXXXを対象とする試験などの安全性試験も実施する。いずれの試験も、最終バルク原薬中に外来性のウイルス、微生物又はマイコプラズマ感染症物質がないことを確認するために実施する。本遺伝子組換え生物等のバルク原薬の出荷試験を実施して、バルク原薬が安全性、同一性、品質、純度及び力価特性に適合していることを確認する。これらの特性は、現行の規制要件及びガイダンスに基づいて設定されている。

本遺伝子組換え生物等の製剤の製造工程は原薬のXXXXXXから始まる。XXXXXXXXXX原薬XXXXXXを

■■■■■の製剤の製造に使用する。■■■■■するために必要な場合は、■■■■■原薬を■■■■■で希釈する。配合製剤を■■■■■した後に、■■■■■を施したガラスバイアルに■■■■■する。バイアルに■■■■■した後に■■■■■で保管する。出荷試験を実施して、本遺伝子組換え生物等が指定の濃度、純度、力価及び安全性（■■■■■を含む）の特性に適合していることを確認する。これらの特性は、現行の規制要件及びガイダンスに基づいて設定されている。

製造工程の詳細は、本書別紙 1 に記載する。

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は、非複製型の組換え AAV であり、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態で存在しており、細胞内 DNA に組み込まれるとは考えられない (Schnepp et al., 2003; Nakai et al., 2001; Duan et al., 1998)。

本遺伝子組換え生物等の製剤は■■■■■した場合、■■■■■まで安定であることがわかっている。

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

ウイルス粒子が周囲にどの程度放出されるかを確認することが重要である。

遺伝子組換え生物等を AAV ゲノム中の標的遺伝子で検出する。非臨床試験（生体内分布）及び臨床試験の排出試験における本遺伝子組換え生物等の検出には、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）法による DNA 増幅を用いた。qPCR に用いるフォワードプライマー及びリバースプライマーは、野生型 AAV 及びヒト組織 DNA に存在しない■■■■■に設定しており、本遺伝子組換え生物等のみを検出することが可能である。用いたプライマー配列は、遺伝子改変工程に由来する遺伝子配列を検出する。DNA プライマー配列は、野生型 AAV と遺伝子組換え生物等を区別するよう設計された。

本遺伝子組換え生物等の■■■■■において、■■■■■を採取し、試験を通してベクター排出を観察することにより、ベクター排出時期及び排出動態を十分に明らかにする。全ての検体で、少なくとも■■■■■して陰性の結果となるまで、ウイルス排出のための■■■■■検体を採取する予定である。

qPCR の感度

- 測定法の検出限界（LOD）は■■■■■であることが分かっており、定量下限（LLOQ）は全血から分離したゲノム DNA ■■■■■を含む反応あたり■■■■■であることが検証された。
- 本遺伝子組換え生物等は、尿検体では■■■■■、唾液検体では■■■■■、糞便検体では■■■■■であれば検出可能である。
- コピー数がLLOQ未満の検体は、「LLOQ未満」として報告する。
- 各患者検体のqPCRベクター排出分析は、■■■■■してLLOQ未満の結果が得られた時点で完了する。

6. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

キャプシド形成に使用された AAV 血清型は AAV9 であり、肝臓、神経、筋への指向性を有するが、本遺伝子組換え生物等の ATP7B-■■■■■コード配列は LSP の制御下にある。

■■■■■ため、本遺伝子組換え生

物等は複製能が欠損した AAV9 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、キャ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 █████ の非コード ITR である。

本遺伝子組換え生物等は、遺伝子非組み型で非複製型の組換え 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おり、細胞の DNA に組み込まれることはないと考えられる (Schnepf et al., 2003; Nakai et al., 2001; Duan et al., 1998)。

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。
- (9) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、血液、尿、糞便、唾液等の検体について、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。

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保管し、運搬する。検体は検査機関の規定に従って取

の要件に応じた廃棄物処理の方針に従う。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、
における本遺伝子組換え生物等の薬効薬理、有効性、生体内分布及び潜在的な毒性の特性評価を含めた。

本遺伝子組換え生物等は、
忍容性が良好であり、本遺伝子組換え生物等に関連する有害作用は確認されなかった。

動物試験とヒト検体では、組換え AAV ゲノム組込みと HCC 発症との間に明確な相関関係は確立されていない。

したがって、ヒト肝細胞以外の細胞への遺伝子導入が起こったとしても、そのような細胞での ATP7B- 導入遺伝子の発現は起こりにくいと考えられる (Lee et al., 2013)。さらに、本遺伝子組換え生物等の導入遺伝子タンパク質である ATP7B- は、腫瘍の進行を促進する成長因子ではなく、がん遺伝子などの腫瘍形成を開始する生物学的経路にも関与していない。

組換え AAV9 は、効率的、迅速かつ特異的に肝組織を標的とすることがマウスで示されている。様々な非臨床の動物種間での組換え AAV の全体的な組織分布は類似しており、ヒトにおける生体内分布の予測ができると期待されている (Zincarelli et al., 2008; Gao et al., 2004)。

これにより、ATP7B- 導入遺伝子は、ヒトの肝細胞以外の細胞内では全く発現しない、又は発現量が非常に少ないと考えられる (Greig et al., 2017; Wu et al., 2008)。

血友病 B に対する組換え AAV8 を用いた遺伝子導入の臨床試験では、ベクター投与後、ベクターゲノムが唾液、尿、精液、糞便、及び血漿中に最長 6 週間検出された。排出量及び排出期間は概して用量依存的であった (Nathwani et al. 2014)。オナセムノゲン アベパルボベク (脊髄性筋萎縮症 I 型の 2 歳未満の小児患者の治療を目的とした組換え AAV9 に基づく遺伝子治療用製品) では、評価した最高用量 (1.4×10^{14} vg/kg) までで分析した全種類の検体 (唾液、尿、及び糞便) において、ベクター排出の最長期間は投与後 1~2 か月であった (ZOLGENSMA 2019)。文献 (Inagaki et al. 2006, Gao et al. 2004) に基づくとマウスにおいて、

要約すると、本遺伝子組換え生物等は、非 GLP 及び GLP 適合毒性試験では薬理学及び形質導入効率試験ではそれぞれ忍容性が良好であることが認められた。

さらに非臨床及び文献データに基づくと、本遺伝子組換え生物等の遺伝毒性、がん原性及び生殖細胞系伝達のリスクは低いと考えられる。

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について要約した表を本書別紙 1 に記載する。

得られている情報のかぎりでは、ATP7B 核酸を用いたその他の遺伝子治療用製品の唯一の臨床試験は、Pfizer 社のウィルソン病治療のための VTX-801 プログラムである。AAV9 の血清型を用いたその他のプログラムを以下の表 1 に示す。

表 1 : AAV9 遺伝子治療用製品一覧

疾患	導入遺伝子	年齢	治験依頼者
脊髄性筋萎縮症	hSMN	2 歳未満	AveXis
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	ヒトマイクロジストロフィン	4~17 歳	Solid Bio
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	ヒトミニジストロフィン	5~12 歳	Pfizer
ムコ多糖症 IIIA 型 ABO-102	hSGSH	6 歳以上	Abeona

ムコ多糖症 IIIA 型 ABO-101	hNAGLU	6 か月から 2 歳、2 歳以上の 軽症型	Abeona
ダノン病	hLAMP2B	15 歳以上、その後 8~14 歳	Rocket Pharma
GM1-ガングリオシ ドーシス	GLB1	タイプ 1 : 6~12 か月 タイプ 2 : 12 か月~12 歳	Axovant と米国立ヒト ゲノム研究所 (NHGRI) 及び Sio との共同

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

本遺伝子組換え生物等に病原性はなく、植物に感染できない。AAV は野生動物に感染することが知られているが、病原性はない。

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性質、文献データ及び非臨床試験に基づくと、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、もしくは極めて低い。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 and Carter, 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の生物的因子 (ヒトに病気を発症させる可能性が低い生物的因子) として定義される (EN, 2000)。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, 2019)。

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ではなく、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。また、ATP7B-XXXXXXXXXX の宿主ゲノムへの組込みは、可能性が極めて低い事象であるため想定されておらず、組込みが生じた場合でも、ATP7B の過剰発現により病原性が生じることはないと考えられている。

さらに、増殖能を獲得したウイルス（replication-competent AAV、以下「rcAAV」という。）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 XXXXXXXXXX の rcAAV という検出限界によって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により発現する ATP7B-XXXXXXXXXX タンパク質が第三者、野生動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。

rep 遺伝子及び *cap* 遺伝子の欠失又はヘルパーウイルスが存在しないにも関わらず、組換え AAV の形質導入細胞の細胞 DNA へのランダムな組込みが確認されている。げっ歯類、イヌ、及びサルでのいくつかの非臨床試験、及び患者の肝生検において、動物の肝臓へのランダムで低頻度の組換え AAV の組込みが認められている (Colella et al., 2017; Chandler et al., 2015; Li et al., 2011; Niemeyer et al., 2009; Donsante et al., 2001; Nguyen et al., 2021)。これらのランダムな組込みイベントは、低頻度の非相同組換え経路、自発的な染色体二本鎖切断、並びに転写活性遺伝子によって促進される (Colella et al., 2017; Miller et al., 2004)。これらの組込みイベントは、新生仔マウスに注射した場合のみ、いくつかの制御性の非コード RNA をコードする *Rian* 遺伝子座部への選択的な組込みを伴う HCC の形成をもたらした (Chandler et al., 2015; Donsante et al., 2001)。これは、新生仔マウスの肝臓で肝細胞の急速な細胞分裂が生じ、それにより AAV 組込み確率が高まったことによる可能性がある。しかし、これらのランダムな組換え AAV の組込みイベントは、成体マウスに注射した場合は報告頻度が低く、成体マウス、非げっ歯類、及びヒトの肝生検で悪性腫瘍は認められなかった (Gil-Farina et al., 2016, Li et al., 2011b; Inagaki et al., 2008; Nguyen et al. 2021)。130 件以上の組換え AAV の臨床試験で、組換え AAV による治療の安全性が示されている。ベクターゲノム組込みのエビデンスがいくつか存在するが、これらの試験は組換え AAV ゲノムの組込み、及び本遺伝子組換え生物等のような組換え AAV の遺伝毒性及び病原性のリスクが低いことを裏付けている。

(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ヒト ATP7B を産生する。非臨床試験結果に基づくと、ATP7B 及び本遺伝子組換え生物等の組換え AAV ウイルス粒子は、有害な免疫原性応答を全く示さなかった。

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有有害物

質の産生性を持つことはないと考えられる。

ウィルソン病では、このATP7Bの異常により、銅が肝臓及び末梢循環に蓄積し、肝臓、脳、その他終末器官における終末器官損傷を引き起こす。正常に機能するATP7B-タンパク質の補充及び回復により、銅の代謝と恒常性が回復する。正常に機能するATP7Bタンパク質が回復すると、銅がゴルジ体へ輸送され、そのシャトルタンパク質であるセルロプラスミンに結合できるようになる。セルロプラスミン結合銅は正常に全身に運ばれ、余分な銅は胆汁中に排出される。

ATP7Bタンパク質は細胞内コンパートメント間の輸送タンパク質であり、銅のセルロプラスミンへの結合が回復することにより、銅の代謝、調節、及び恒常性が回復する。したがって、ATP7B-タンパク質の過剰発現のリスクは低く、銅代謝や銅欠乏といった有害な調節不全には至らないと考えられる。リスクは低いものの、本遺伝子組換え生物等により誘発される低銅血症の兆候を治験製品投与後に継続的に観察し、評価する。

(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*遺伝子及び*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。上述のとおり、野生型AAVとは異なり、本遺伝子組換え生物等のような組換えAAVには、野生型AAVのゲノムの組込みを引き起こすRepタンパク質及びCapタンパク質をコードする能力がない。ウイルスの*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子を除去することにより、ヘルパーウイルスの存在下であっても本遺伝子組換え生物等は複製できなくなる。本遺伝子組換え生物等の複製には、同一細胞内での野生型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）の共感染が同時に成立することが必要となる。本遺伝子組換え生物等に存在するAAV由来の唯一のエレメントは、短い非翻訳領域のITRである。本遺伝子組換え生物等の複製は、宿主細胞が3つの異なるウイルス（本遺伝子組換え生物等、野生型AAV、及びヒトアデノウイルス又は単純ヘルペスウイルス等のヘルパーウイルス）に同時に感染するという、可能性が極めて低い状況で起こり得る。これが生じるリスクはわずかであると考えられる。これにより、ゲノムの組込みリスクが低く、かつ遺伝毒性及び病原性が低いことから、組換えAAVは遺伝子治療に適している。

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水平感染が起こりうるが、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、でのrcAAVという検出限界によって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

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、糞便や体液に接触することで他者へ伝播する可能性は低い。

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* 遺伝子及び *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。

製造工程で生じうる rcAAV は、XXXXXXXXXX で XXXXXXXXXX の rcAAV という検出限界によって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

核酸を水平伝播する性質について、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。

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. Akache B, Grimm D, Pandey K, et al. (2006) The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of Virology* 80: 9831-9836.
2. Bell CL, Vandenberghe LH, Bell P, et al. (2011) The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice. *Journal of Clinical Investigation* 121: 2427-2435.
3. Berns KI. (1990) Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54: 316-329.
4. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. (2010) 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* 21: 704-712.
5. Cater MA, Forbes J, La Fontaine S, Cox D, Mercer JF. Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites. *Biochem J*. 2004;380(Pt 3):805-813. doi:10.1042/BJ20031804
6. Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, et al. (2015) Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest* 125: 870-880.
7. Chapin JC and Monahan PE. (2018) Gene Therapy for Hemophilia: Progress to Date. *BioDrugs* 32: 9-25.
8. Chirmule N, Probert K, Magosin S, et al. (1999) Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 6: 1574-1583.
9. Colella P, Ronzitti G and Mingozzi F. (2017) Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 8: 87-104.
10. [REDACTED]
11. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, et al. (2019) ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol* 100: 367-368.
12. Daya S and Berns KI. (2008) Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews* 21: 583-593.
13. DHHS. (2020) *Guidance for Industry: Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)*. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-control-cmc-information-human-gene-therapy-investigational-new-drug>.
14. Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, et al. (2001) Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* 8: 1343-1346.
15. Duan D, Sharma P, Yang J, et al. (1998) Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol* 72: 8568-8577.
16. EN. (2000) *Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC)*. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32000L0054>.
17. Favaro P, Downey HD, Zhou JS, et al. (2009) Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol Ther* 17: 1022-1030.
18. Favaro P, Finn JD, Siner JI, et al. (2011) Safety of liver gene transfer following peripheral intravascular delivery of adeno-associated virus (AAV)-5 and AAV-6 in a large animal model. *Hum Gene Ther* 22: 843-852.
19. Ferla R, Alliegro M, Marteau JB, et al. (2017) Non-clinical Safety and Efficacy of an AAV2/8 Vector Administered Intravenously for Treatment of Mucopolysaccharidosis Type VI. *Mol Ther Methods Clin Dev* 6: 143-158.

20. Flotte TR and Carter BJ. (1995) Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther* 2: 357-362.
21. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. (2004) Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78: 6381-6388.
22. Gil-Farina I, Fronza R, Kaeppl C, et al. (2016) Recombinant AAV Integration Is Not Associated With Hepatic Genotoxicity in Nonhuman Primates and Patients. *Mol Ther* 24: 1100-1105.
23. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, et al. (2018) Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med* 20: e3015.
24. Greig JA, Wang Q, Reicherter AL, et al. (2017) Characterization of Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Human Factor VIII Gene Therapy in Hemophilia A Mice. *Hum Gene Ther* 28: 392-402.
25. Gruntman AM, Su L, Su Q, et al. (2015) Stability and compatibility of recombinant adeno-associated virus under conditions commonly encountered in human gene therapy trials. *Hum Gene Ther Methods* 26: 71-76.
26. Hasan NM, Gupta A, Polishchuk E, et al. (2012) Molecular events initiating exit of a copper-transporting ATPase ATP7B from the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 287: 36041-36050.
27. Honaramooz A, Megee S, Zeng W, et al. (2008) Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation. *FASEB J* 22: 374-382.
28. Howard DB and Harvey BK. (2017) Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Hum Gene Ther Methods* 28: 39-48.
29. Huster D, Lutsenko S. The distinct roles of the N-terminal copper-binding sites in regulation of catalytic activity of the Wilson's disease protein. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):32212-8. doi: 10.1074/jbc.M305408200. Epub 2003 Jun 6. PMID: 12794172
30. Inagaki, Katsuya (2006) Robust Systemic Transduction with AAV9 Vectors in Mice: Efficient Global Cardiac Gene Transfer Superior to That of AAV8. *Mol. Ther* 14(1): 45-53
31. Kerr JR, Cotmore SF, Bloom ME, et al. (2006) *Parvoviruses*, London: Hodder Education Publishers.
32. Lee YM, Pan CJ, Koeberl DD, et al. (2013) The upstream enhancer elements of the G6PC promoter are critical for optimal G6PC expression in murine glycogen storage disease type Ia. *Mol Genet Metab* 110: 275-280.
33. Li H, Malani N, Hamilton SR, et al. (2011) Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* 117: 3311-3319.
34. Lins-Austin B, Patel S, Mietzsch M, et al. (2020) Adeno-Associated Virus (AAV) Capsid Stability and Liposome Remodeling During Endo/Lysosomal pH Trafficking. *Viruses* 12.
35. Lisowski L, Tay SS and Alexander IE. (2015) Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 24: 59-67.
36. Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, et al. (2013) Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* 24: 59-67.
37. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. (2006) Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12: 342-347.
38. Miller DG, Petek LM and Russell DW. (2004) Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* 36: 767-773.
39. Mingozzi F and High KA. (2011) Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 12: 341-355.
40. Nakai H, Yant SR, Storm TA, et al. (2001) Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* 75: 6969-6976.
41. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, 3rd, et al. (2017) Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31: 317-334.

42. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. (2014) Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 371: 1994-2004.
43. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, et al. (2009) Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 113: 797-806.
44. NIH. (2019) *NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules (NIH Guidelines)*. Available at: https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.pdf.
45. Nonnenmacher M and Weber T. (2012) Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 19: 649-658.
46. Paneda A, Vanrell L, Mauleon I, et al. (2009) Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum Gene Ther* 20: 908-917.
47. Rajasekaran S, Thatte J, Periasamy J, et al. (2018) Infectivity of adeno-associated virus serotypes in mouse testis. *BMC Biotechnol* 18: 70.
48. Santiago-Ortiz JL and Schaffer DV. (2016) Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J Control Release* 240: 287-301.
49. Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, et al. (2003) Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 77: 3495-3504.
50. Schuettrumpf J, Liu JH, Couto LB, et al. (2006) Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol Ther* 13: 1064-1073.
51. Srivastava A. (2016) In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol* 21: 75-80.
52. Tenenbaum L, Lehtonen E and Monahan PE. (2003) Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther* 3: 545-565.
53. [REDACTED]
54. Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, et al. (2018) In Vivo Genetic Manipulation of Spermatogonial Stem Cells and Their Microenvironment by Adeno-Associated Viruses. *Stem Cell Reports* 10: 1551-1564.
55. Weitzman MD and Linden RM. (2011) Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol* 807: 1-23.
56. WHO. (2004) *WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series 924*. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42921/WHO_TRS_924.pdf;jsessionid=0A21B7A590CB5D49A96D46407C431922?sequence=1.
57. Wu Z, Asokan A and Samulski RJ. (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14: 316-327.
58. Wu Z, Sun W, Zhang T, et al. (2008) Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of Hemophilia B at low vector dose. *Molecular Therapy* 16: 280-289.
59. Wu F, Wang J, Pu C, Qiao L, Jiang C. Wilson's disease: a comprehensive review of the molecular mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):6419-6431. Published 2015 Mar 20. doi:10.3390/ijms16036419
60. [REDACTED]
61. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, et al. (2008) Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16: 1073-1080.
62. Zinn E and Vandenberghe LH. (2014) Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol* 8: 90-97.
63. ZOLGENSMA. (2019) *Prescribing Information*.

64. ZOLGENSMA. (2020) Summary of Product Characteristics.