



AAVベクター製品の一般毒性評価及び免疫毒性評価

三井田 宏明^{*1,*6}, 後藤 浩一^{*1}, 太田 哲也^{*2,*6}, 高木 観^{*2}, 木下 潔^{*3,*6},
奈良岡 準^{*4,*6}, 川崎 秀吉^{*4}, 佐々木 正徳^{*5}, 直田 みさき^{*7,*8}, 櫻井 陽^{*7,*8},
小野寺 雅史^{*8}, 内田 安則^{*9}, 山下 拓真^{*9}, 吉田 徳幸^{*9}, 山本 武範^{*9}, 井上 貴雄^{*9}

Evaluation of General Toxicity and Immunotoxicity of AAV Vector Products

Hiroaki MIIDA^{*1,*6}, Koichi GOTO^{*1}, Tetsuya OHTA^{*2,*6}, Kan TAKAGI^{*2},
Kiyoshi KINOSHITA^{*3,*6}, Hitoshi NARAOKA^{*4,*6}, Hideyoshi KAWASAKI^{*4},
Masanori SASAKI^{*5}, Misaki NAOTA^{*7,*8}, Akira SAKURAI^{*7,*8},
Masafumi ONODERA^{*8}, Yasunori UCHIDA^{*9}, Takuma YAMASHITA^{*9},
Tokuyuki YOSHIDA^{*9}, Takenori YAMAMOTO^{*9} and Takao INOUE^{*9}

1. はじめに

序論¹⁾で述べたように、我々は第20回核酸・遺伝子医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム(2024年12月6日開催)²⁾において「アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター製品の安全性評価の考え方」

に関するパネルディスカッションを行い、現時点での評価の在り方を整理した。シンポジウム当日取り上げた論点を「一般毒性評価及び免疫毒性評価」, 「遺伝子組込み評価ならびに腫瘍形成及びがん化の可能性の評価」, 「生殖細胞を介した次世代移行リスク及び生殖発生毒性評価」, 並びに「AAVベクター

- * 1 第一三共株式会社 安全性研究所 東京都江戸川区北葛西1-16-13 (〒134-8630)
Daichi Sankyo Co., Ltd., 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan
 - * 2 田辺三菱製薬株式会社 創業本部 安全性研究所 神奈川県藤沢市村岡東2-26-1 湘南ヘルスイノベーションパーク (〒251-8555)
Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Shonan Health Innovation Park, 2-26-1 Muraoka-Higashi, Fujisawa-shi, Kanagawa 251-8555, Japan
 - * 3 MSD株式会社 東京都千代田区九段北1-13-12 北の丸スクエア (〒102-8667)
MSD K. K., Kitanomaru Square, 1-13-12 Kudankita, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8667, Japan
 - * 4 アステラス製薬株式会社 つくば研究センター 茨城県つくば市御幸が丘21 (〒305-8585)
Astellas Pharma Inc., Tsukuba Research Center, 21 Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585, Japan
 - * 5 中外製薬株式会社 安全性バイオサイエンス研究部 中外ライフサイエンスパーク横浜 神奈川県横浜市戸塚区戸塚町216 (〒244-8602)
Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Chugai Life Science Park Yokohama, 216 Totsukacho, Totsuka-ku, Yokohama City, Kanagawa 244-8602, Japan
 - * 6 日本製薬工業協会 東京都中央区日本橋本町2-3-11 日本橋ライフサイエンスビルディング (〒103-0023)
Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Nihonbashi Life Science Bldg., 2-3-11 Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023, Japan
 - * 7 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関3-3-2 新霞が関ビル (〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shin-Kasumigaseki Bldg., 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan
 - * 8 国立大学法人大阪大学 大学院工学研究科 大阪府吹田市山田丘2-1 (〒565-0871)
Graduate School of Engineering, the University of Osaka, 2-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan
 - * 9 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)
National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa 210-9501, Japan
- ※ 本稿は、著者の個人的見解に基づくものであり、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の公式見解を示すものではない。

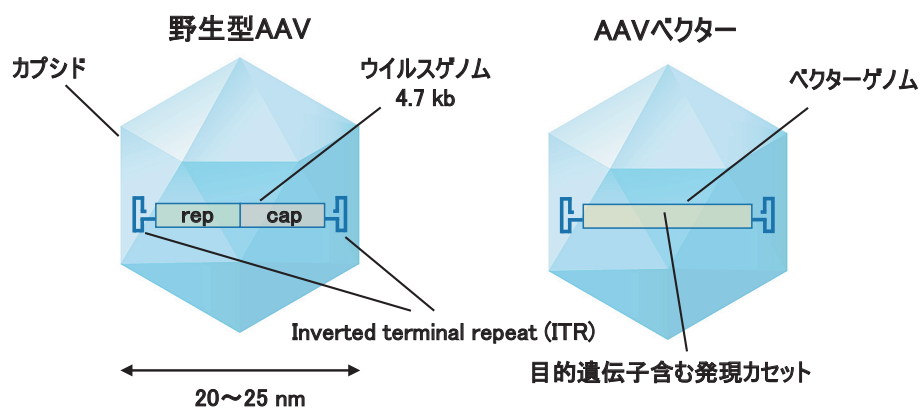


Fig. 1 アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター

製品に含まれうる不純物と安全性評価」の4稿に再編成し、それぞれについて議論された内容を本稿以降で概説する。

本稿はその第1稿となるため、AAVベクター製剤の特徴や非臨床安全性評価の一般論について概説した後、「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について」³⁾ 別添「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(指針)の中で示されている、「一般毒性評価」及び「免疫毒性評価」に焦点を当てて紹介する。

2. AAVベクター製品とは

AAVベクター製品は、治療に必要な遺伝子をAAVベクターに組み込んでヒトに投与し、ヒト細胞で当該遺伝子を発現させることで、疾病を治療する遺伝子治療用製品の一つである。

野生型のAAVはパルボウイルス科デブドウイルス属に属する単鎖DNAウイルスで、エンベロープを持たず、直径20から25 nm程度のカプシド(殻)で構成されている。ウイルスゲノムは全長が約4.7 kbで、ゲノムの両端に逆位末端反復配列(Inverted Terminal Repeat: ITR)と呼ばれるヘアピン構造があり、ウイルスの複製やパッケージングなどに必要とされる。AAVベクターは、非病原性でベクター由来のDNAのヒトゲノムへの組み込み頻度が低いことから、安全性の高いウイルスベクターとして臨床の場で用いられている。

遺伝子治療用のAAVベクター製品は、宿主の19番染色体への組み込みに必要な *rep* 遺伝子や構造タン

パク質をコードする *cap* 遺伝子を、治療に必要なタンパク質をコードする目的遺伝子(タンパク質の発現カセット)に置き換え、ベクターとして利用している(Fig. 1)。AAVにはカプシド構造タンパク質が異なる複数の血清型が存在し、その種類によって組織/細胞への感染指向性が異なる。これにより、治療を目指す疾患に応じて最適な血清型を選択することが可能である⁴⁻⁶⁾。

3. AAVベクター製品の非臨床安全性評価

非臨床安全性評価の主たる目的は、標的臓器、用量依存性、曝露との関係、回復性などの毒性の特徴を明らかにすることである。これらの情報は、初めてヒト試験を行う際の初回投与量と用量範囲の推定、並びに臨床における有害作用のモニタリングパラメータの設定に用いられる。医薬品の製造販売承認のための非臨床安全性評価には、通常、薬理試験、一般毒性試験、トキシコキネティクス及び非臨床薬物動態試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験がある。懸念すべき特別な理由がある場合や長期間の使用を目的とした医薬品の場合には、がん原性の評価も含まれる。その他、光毒性試験、免疫毒性試験、幼若動物を用いる毒性試験、及び薬物乱用に関する非臨床試験は、個々の事例に応じて実施すべき、とされている⁷⁾。

一方、AAVベクター製品の非臨床安全性評価は、指針³⁾で「一般毒性評価」、「免疫毒性評価」、「遺伝子組み込み評価」、「腫瘍形成及びがん化の可能

性の評価」,「生殖発生毒性試験（生殖細胞を介した次世代移行リスク及び生殖発生毒性評価）」等について行うべき評価の内容や各評価での留意点が示されている。

このうち本稿では、一般毒性評価及び免疫毒性評価について概説し、パネルディスカッションで行った議論の内容とそれを踏まえた現時点での考え方をまとめる。

4. AAVベクター製品の一般毒性評価

一般毒性評価とは、評価対象となる医薬品の候補化合物(被験物質)を動物に投与し、その毒性を様々な検査で評価することを指す。検査項目には一般状態の観察、体重、摂餌、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、病理解剖学的検査、病理組織学的検査、及び被験物質の血中曝露量を評価するトキシコキネティクスなどがある。化学合成医薬品(化成品)では、毒性の種差を考慮してげっ歯類、非げっ歯類各1種を用い、臨床適用期間に応じてげっ歯類では最長6か月、非げっ歯類では最長9か月までの投与期間で評価を行う⁷⁾。

一方、AAVベクター製品を含む遺伝子治療用製品の一般毒性評価は、指針³⁾の中では薬理作用を示す動物種を選択すること、通常2動物種を用いるが、合理的な理由があれば1種で十分な場合があること、最高用量は臨床投与量、意図する薬理作用が最大となる用量、最大耐量、投与可能な最大量等を考慮して選択すること、試験期間についてはベクターの発現期間、免疫原性、臨床での適応症等を考慮し、最長6か月で十分であることが記載されている。なお、AAVベクター製品は一般的に単回投与による治療が行われるため、非臨床でも単回投与で評価することが多い。これらを踏まえ、AAVベクター製品の一般毒性評価に関して生じた、以下の疑問について議論を行った。

4.1 動物種数について

疑問:「合理的な理由があれば1種で十分な場合がある」とされているが、どのようなケースで1動物種による評価で十分と考えられるであろうか。

指針³⁾では、「適切な動物種」に関して、(a) 発現ベクターに搭載した目的遺伝子が標的細胞で発現す

ること、(b) 目的遺伝子由来のタンパク質がヒトで期待される薬理学的作用を発揮すること、(c) ウイルスベクターの由来となった野生型ウイルスがヒトと同様の感染性及び組織・細胞への指向性を示すこと、(d) 臨床での投与方法を適用できること、を考慮することが記載されているが、これらに該当する動物を用いれば、一般毒性評価を1動物種で行うことは可能であろうか、という疑問が生じた。

議論: 適切な動物種選択において考慮すべき点である、(a) 発現ベクターの組織指向性や (b) 発現タンパク質の薬理学的作用などについて妥当性が説明できれば、1動物種を用いて評価が可能と考えられる。発現タンパク質の安全性評価についてはバイオ医薬品のガイドラインであるICH S6⁸⁾の考え方(被験物質が薬理学的活性を示すような適切な動物種が1種類しか確認されていない場合や、バイオ医薬品の生物学的特性が十分に解明されている場合に1動物種で評価可能)を参照できる。実際に1動物種で評価して申請し、承認されている事例も存在する(本特集の太田哲也⁹⁾の稿を参照)。

結論: 適切な動物種として考慮すべき点を満たしていれば、一般毒性評価を1動物種で行うことは許容される。

4.2 試験期間について

疑問:「最長6か月」とされているが、6か月未満での評価が許容されるのはどのようなケースが考えられるであろうか。

例えば、①発現タンパク質の定常状態への到達が早い場合(投与後4週間以内で定常状態に至るAAVベクター製品では、13週間までの評価で十分という考えも提示されている¹⁰⁾)、②酵素を欠損している患者に当該タンパク質を発現させることで酵素を補充することを企図している場合(酵素補充を目的としたバイオ医薬品で1~3か月の期間で試験を完了しているケースがある: Table 1)、③発現タンパク質が分泌タンパク質として機能するAAVベクター製品などで、発現タンパク質に対する抗体(anti-drug antibody: ADA)が産生されて効果減弱が認められ、発現タンパク質によるオンターゲット毒性を動物では適切に評価できないと考えられた場合、などでは、3か月の試験期間で評価可能と考えられるか、という疑問が生じた。

Table 1 バイオ医薬品（酵素製剤）で臨床投与期間は6か月を超えるが13週間以下の非臨床試験で承認されている事例

販売名	非臨床最大投与期間	適用，用法用量
レブコビ筋注2.4 mg	4週間（ラット，イヌ）	アデノシンデアミナーゼ欠損症：0.2 mg/kgを1週間に1回筋肉内注射
アガルシダーゼベータ BS点滴静注5 mg, 35 mg	13週間（カニクイザル）	ファブリー病：1回体重1 kgあたり1 mgを隔週，点滴静注
セレザイム注200 U	13週間（ラット，カニクイザル）	ゴーシェ病：1回体重1 kg当たり60単位を隔週，1～2時間かけて点滴静注，又は適切な用量を1単位/kg/分以下の速度で投与

議論：「短期間で標的タンパク質の発現が定常状態に至る」という基準だけでは，必ずしも判断できないと考える．(a) 生体内に存在しているなど既によく特徴づけられたタンパク質をコードする遺伝子を導入する場合（発現タンパク質によるタンパク質補充療法など），(b) カプシド，プロモーターなどが既に十分評価されており，リスクを十分に見積もれる場合，(c) ロット間の同等性確認のための試験など試験目的が通常と異なる場合，(d) 免疫原性により標的タンパク質の発現がみられなくなる場合，などの考慮事項が考えられ，これらを総合的に考察して試験期間を決めるべきであろう．3～6か月の間に新たな毒性や毒性の重篤化が起きないことを説明できることが重要である．

異種タンパク質に対する免疫原性の惹起により，ヒト由来タンパク質の発現を動物において十分維持できない場合，サロゲート（＝動物においてヒトと同等の薬効を発揮できるタンパク質をコードする遺伝子を搭載したAAVベクター）を用いたオンターゲット毒性の評価も選択肢となり得る．しかし，サロゲートは実際の開発品とは異なるため，生じた毒性がオンターゲット作用によるものか，サロゲートに特有のものかの判断がつかないケースが想定され，実施の意義を事前に慎重に検討する必要がある．

毒性評価に関する別の考慮事項として，病理学的検査を複数の時点で実施する必要があるかの観点が挙げられる．生体内分布情報を得ている場合には，その情報を参考にして，適切な剖検時点を判断すべきであり，例えば，6か月間試験では3及び6か月のタイミングで病理学的検査を行うケースがあると考えられる．

結論：既知情報に基づいてリスクを説明できる場

合や免疫原性により薬理作用が持続しない場合などでは，6か月未満での評価が可能と考えられる．

5. 免疫毒性評価

5.1 免疫毒性評価とは

免疫毒性評価とは，医薬品による非意図的な免疫抑制あるいは免疫亢進を評価することを指す．化成品ではICH S8ガイドライン¹¹⁾に評価の進め方が記載されている．標準的毒性試験から得られたデータのうち，白血球，リンパ球等の増減などの血液学的変化や胸腺，脾臓などの免疫系器官の組織学的変化，血清グロブリン濃度の変化等の免疫毒性の可能性を示す変化について評価を行う．

免疫毒性の懸念要因が特定された場合には，当該化合物の免疫毒性の有無を確認するため，追加で免疫毒性試験を実施する．試験法として，T細胞依存性抗体産生（T cell dependent antibody response, TDAR）試験や白血球サブセットの同定や計数を行うイムノフェノタイピング等がある．

5.2 遺伝子治療用製品の免疫毒性評価

指針³⁾では，「ベクター及びベクターからの発現産物が免疫系に有害な影響を与える可能性を明らかにすること」，「動物を用いた試験では特異的な免疫反応が惹起される可能性があることから，試験成績の解釈においてはその影響を留意すること」とされている．以降ではまず，AAVベクター製品による免疫系に対する影響について，特に免疫活性化に関する留意点及び評価方法について述べる．

5.2.1 AAVベクターによる免疫活性化機序及び評価に関する知見

AAVベクターに対する免疫応答としては，自然

免疫反応，補体反応，B細胞やT細胞の反応が挙げられる．自然免疫応答としては，細胞膜表面上にある toll-like receptor (TLR) 2と AAVカプシドタンパク質が結合¹²⁾，又はエンドソーム内腔でTLR9がベクターゲノムと結合することで引き起こされる^{13, 14)}．

補体の活性化機序に関しては不明な点が多いが，ベクターの大量投与や患者体内での抗AAV抗体の存在¹⁵⁾，血清型や基礎疾患に依存するとされ，補体と AAVカプシドが結合することで抗原提示細胞への取り込みを増強すること¹⁶⁾が報告されている．獲得免疫系の液性免疫に関しては，AAVベクター投与後に AAVカプシドに対する抗体が産生され，遺伝子導入に影響を与える¹⁷⁾．細胞性免疫に関しては，抗原提示細胞によるカプシド由来抗原の取り込みと MHC class Iでの提示，細胞障害性CD8陽性T細胞の活性化が報告されている¹⁸⁾．

AAVベクターによる免疫活性化を動物で評価した例として，AAV8ベクターをマウスに静脈内投与し，肝臓の免疫応答を評価した結果，肝臓において血小板の凝集，好中球の細胞外トラップ(neutrophil extracellular trap, NET)の形成，単球，B細胞，T細胞の動員を伴う中程度の炎症反応が認められた¹⁹⁾．また，高用量のAAV9ベクターをカンクイザル又はアカゲザルに静脈内投与した結果，肝洞様内皮細胞傷害を伴うトランスアミナーゼの上昇，血小板減少症，及び補体経路の活性化が認められた²⁰⁾．

一方，AAVベクターに対する免疫反応には種差があることが知られている．マウスでは，AAVに対する効率的なT細胞応答が起こらないことが多いとされている²¹⁾．また，マウス及びサルでは，AAV8カプシドに対するメモリーCD8陽性T細胞が，AAV8ベクターでトランスダクションされた肝細胞を排除できなかったことが報告されている^{22, 23)}．一方，AAV8ベクターを用いた臨床試験では，最高用量を投与された血友病B患者6人中4人でアラニンアミノトランスアミナーゼの増加，AAV8カプシド特異的末梢血T細胞数の増加，及び発現タンパク質（ファクターIX）の減少が認められ²⁴⁾，サルとヒトの細胞応答の違いを示していると考えられた．また免疫学的プロファイリングを評価した結果，非げっ歯類のCD4陽性及びCD8陽性カ

プシド反応性T細胞が，ヒト細胞と機能及び表現型が異なることが報告されている²⁵⁾．以上のことから，AAVベクターによる免疫活性化は動物でも検出できる可能性があるが，その反応にはヒトとの間に種差があることを考慮し，ヒト細胞を用いた適切な評価系によるリスク評価が有用になるケースも考えられる．

5.3 遺伝子治療用製品の免疫毒性評価に関する疑問

5.3.1 免疫原性評価及び免疫関連検査の必要性について

疑問：免疫原性の評価に関連し，①AAVベクターにコードされるタンパク質が分泌タンパク質であるなど，発現タンパク質を直接確認できる場合，あるいは，②発現タンパク質の薬理作用の持続をサロゲートマーカー等で確認できる場合は，AAVベクターに対する抗体の産生や発現タンパク質に対する抗体 (anti-drug antibody, ADA) の産生の評価は不要と考えてよいか．

また，サイトカインや補体などの免疫に関する検査は，動物で見られた毒性の解釈に有用と考えられる場合を除き，不要と考えられるか，という疑問が生じた．

結論：免疫介在性の反応は種差が大きく，動物での評価はヒトでの免疫原性を予測するものではないので，デフォルトとしての免疫毒性評価は不要と考えられる．一般毒性試験で免疫に関する懸念が示唆された場合，その毒性解釈のため，あるいは懸念のレベルに応じて，開発者の判断で追加検討を行うことでよい．

6. 終わりに

AAVベクター製品の非臨床安全性評価については，発出されている指針³⁾などの遺伝子治療用製品を対象としたガイドラインを参考に，また発現タンパク質の安全性評価についてはバイオ医薬品のガイドラインであるICH S6⁸⁾の考え方を参考に，開発品の特徴や背景を考慮して「ケースバイケース」で行う必要がある．一方，AAVベクター製品自体や発現タンパク質に対する反応には種差があるため，ヒトのリスクを評価するうえで動物を用いた試験で可

能なことと限界を考え、適切な試験を計画し、得られた結果を適切に評価する必要がある。今回は、いかに必要十分な試験を計画するかに関連する疑問点について、その課題と背景を挙げ、議論を行った。

なお、パネルディスカッションで得られた結論は、シンポジウムで議論した時点でのものであり、今後得られる知見や科学の進歩によって変わり得ることに留意が必要である。

文 献

- 1) 井上貴雄. 序論; アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター製品の安全性評価の考え方. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2025, 56(5), p.348-350.
- 2) 第20回核酸・遺伝子医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム. 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部ホームページ. <http://www.nihs.go.jp/mtgt/section2/kakusanRSsymp20.pdf> (accessed 2025-06-23).
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長. 遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について. 薬生機審発0709第2号, 令和元年7月9日 (一部改正, 医薬機審発1023第2号, 令和5年10月23日).
- 4) AAVベクターの製造・品質に関するリフレクションペーパー. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構ホームページ. <https://www.pmda.go.jp/files/000221591.pdf> (accessed 2025-06-23).
- 5) 水上浩明, 小澤敬也. 新規血清型に由来する AAV ベクターの有用性. YAKUGAKU ZASSHI. 2006, 126(11), p.1021-1028.
- 6) Issa, S. S.; Shaimardanova, A. A.; Solovyeva, V. V.; Rizvanov, A. A. Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview. *Cells*. 2023, 12(5), 785.
- 7) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について. 薬食審査発0219第4号, 平成22年2月19日.
- 8) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について. 薬食審査発0323第1号, 平成24年3月23日.
- 9) 太田哲也, 三井田宏明, 木下潔, 奈良岡準, 綾高宏, 殿村優, 本山径子, 藤原由佳理, 和泉智子. 既承認 AAVベクター製品の非臨床安全性評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2025, 56(5), p.351-362.
- 10) Moffit, J. S. Regulatory Consideration for the Nonclinical Safety Assessment of Gene Therapies. *Hum Gene Ther*. 2022, 33(21-22), p.1126-1141.
- 11) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインについて. 薬食審査発第0418001号, 平成18年4月18日.
- 12) Hösel, M.; Broxtermann, M.; Janicki, H.; Esser, K.; Arztberger, S.; Hartmann, P.; Gillen, S.; Kleeff, J.; Stabenow, D.; Odenthal, M.; Knolle, P.; Hallek, M.; Protzer, U.; Büning, H. Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology*. 2012, 55(1), p.287-297.
- 13) Zhu, J.; Huang, X.; Yang, Y. The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J Clin Invest*. 2009, 119(8), p.2388-2398.
- 14) Rogers, G. L.; Shirley, J. L.; Zolotukhin, I.; Kumar, S. R. P.; Sherman, A.; Perrin, G. Q.; Hoffman, B. E.; Srivastava, A.; Basner-Tschakarjan, E.; Wallet, M. A.; Terhorst, C.; Biswas, M.; Herzog, R. W. Plasmacytoid and conventional dendritic cells cooperate in crosspriming AAV capsid-specific CD8(+) T cells. *Blood*. 2017, 129(24), p.3184-3195.
- 15) Salabarria, S. M.; Corti, M.; Coleman, K. E.; Wichman, M. B.; Berthy, J. A.; D'Souza, P.; Tifft, C. J.; Herzog, R. W.; Elder, M. E.; Shoemaker, L. R.; Leon-Astudillo, C.; Tavakkoli, F.; Kirn, D. H.; Schwartz, J. D.; Byrne, B. J. Thrombotic microangiopathy following systemic AAV administration is dependent on anti-capsid antibodies. *J Clin Invest*. 2024, 134(1), e173510.
- 16) Zaiss, A. K.; Cotter, M. J.; White, L. R.; Clark, S. A.; Wong, N. C.; Holers, V. M.; Bartlett, J. S.; Muruve, D. A. Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors. *J Virol*. 2008, 82(6), p.2727-2740.
- 17) Chirmule, N.; Xiao, W.; Truneh, A.; Schnell, M. A.; Hughes, J. V.; Zoltick, P.; Wilson, J. M. Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J Virol*. 2000, 74(5), p.2420-2425.
- 18) Shirley, J. L.; Keeler, G. D.; Sherman, A.; Zolotukhin, I.; Markusic, D. M.; Hoffman, B. E.; Morel, L. M.; Wallet, M. A.; Terhorst, C.; Herzog, R. W. Type I IFN sensing by cDCs and CD4(+) T cell help are both requisite for cross-priming of AAV capsid-specific CD8(+) T cells. *Mol Ther*. 2020, 28(3), p.758-770.
- 19) Carestia, A.; Kim, S. J.; Horling, F.; Rottensteiner, H.; Lubich, C.; Reipert, B. M.; Crowe, B. A.; Jenne, C. N. Modulation of the liver immune microenvironment by the adeno-associated virus serotype 8 gene therapy vector. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020, 20, p.95-108.
- 20) Hordeaux, J.; Lamontagne, R. J.; Song, C.; Buchlis, G.; Dyer, C.; Buza, E. L.; Ramezani, A.; Wielechowski, E.;

- Greig, J. A.; Chichester, J. A.; Bell, P.; Wilson, J. M. High-dose systemic adeno-associated virus vector administration causes liver and sinusoidal endothelial cell injury. *Mol Ther.* 2024, **32**(4), p.952-968.
- 21) Stone, D.; Aubert, M.; Jerome, K. R. Adeno-associated virus vectors and neurotoxicity-lessons from preclinical and human studies. *Gene Ther.* 2025, **32**(1), p.60-73.
- 22) Li, H.; Murphy, S. L.; Giles-Davis, W.; Edmonson, S.; Xiang, Z.; Li, Y.; Lasaro, M. O.; High, K. A.; Ertl, H. C. Pre-existing AAV capsid-specific CD8⁺ T cells are unable to eliminate AAV-transduced hepatocytes. *Mol Ther.* 2007, **15**(4), p.792-800.
- 23) Jiang, H.; Couto, L. B.; Patarroyo-White, S.; Liu, T.; Nagy, D.; Vargas, J. A.; Zhou, S.; Scallan, C. D.; Sommer, J.; Vijay, S.; Mingozzi, F.; High, K. A.; Pierce, G. F. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood.* 2006, **108**(10), p.3321-3328.
- 24) Nathwani, A. C.; Reiss, U. M.; Tuddenham, E. G.; Rosales, C.; Chowdary, P.; McIntosh, J.; Della Peruta, M.; Lheriteau, E.; Patel, N.; Raj, D.; Riddell, A.; Pie, J.; Rangarajan, S.; Bevan, D.; Recht, M.; Shen, Y. M.; Halka, K. G.; Basner-Tschakarjan, E.; Mingozzi, F.; High, K. A.; Allay, J.; Kay, M. A.; Ng, C. Y.; Zhou, J.; Cancio, M.; Morton, C. L.; Gray, J. T.; Srivastava, D.; Nienhuis, A. W.; Davidoff, A. M. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med.* 2014, **371**(21), p.1994-2004.
- 25) Li, H.; Lasaro, M. O.; Jia, B.; Lin, S. W.; Haut, L. H.; High, K. A.; Ertl, H. C. Capsid-specific T-cell responses to natural infections with adeno-associated viruses in humans differ from those of nonhuman primates. *Mol Ther.* 2011, **19**(11), p.2021-2030.