

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-551987

(P2022-551987A)

(43)公表日 令和4年12月14日(2022.12.14)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	Z N A 4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全68頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-522789(P2022-522789)
 (86)(22)出願日 令和2年10月14日(2020.10.14)
 (85)翻訳文提出日 令和4年6月9日(2022.6.9)
 (86)国際出願番号 PCT/US2020/055500
 (87)国際公開番号 WO2021/076566
 (87)国際公開日 令和3年4月22日(2021.4.22)
 (31)優先権主張番号 62/915,765
 (32)優先日 令和1年10月16日(2019.10.16)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く

(71)出願人 501102988
 ユニバーシティ オブ ピッツバーグ - オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイヤー エデュケーション
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 5 2 6 0、ピッツバーグ、サッカレイ アベニュー 1 3 0、ガードナー スティール カンファレンス センター ファースト フロア
 1st Floor Gardner Steel Conference Center, 130 Thackeray Avenue, Pittsburgh PA 15260, United States of America
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肝疾患を治療するための組成物および方法

(57)【要約】

転写因子である HNF 4 の対象における肝細胞の核への輸送または保持を増加させることによって、対象における肝疾患を治療するための組成物および方法が開示されている。いくつかの実施形態では、本方法は、PROX 1、NR5A 2、NR0B 2、MTF 1、SREBP 1、EP300 および POM121C ならびにその機能的断片からなる群から選択される 1 つまたは複数の転写因子の発現または機能をアップレギュレートすること、ならびに / あるいは 1 つまたは複数の転写因子 DNA JB 1 / HSP 40、ATF 6、ATF 4 および PERK ならびにその機能的断片の発現または機能をダウンレギュレートすることを含む。

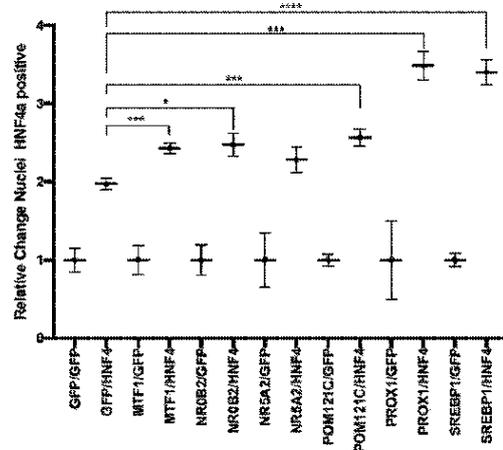


Figure 16

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする対象において肝疾患を治療する方法であって、前記対象に組成物を投与することを含み、前記組成物が、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量または機能を増加させる、方法。

【請求項 2】

前記組成物がベクターであり、前記ベクターが、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cのうちの1つまたは複数のコードする1つまたは複数の核酸を含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記組成物がベクターであり、前記ベクターが、PROX1および/またはSREBP1をコードする1つまたは複数の核酸を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記1つまたは複数の核酸が、DNAまたはmRNAである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記組成物の前記投与が、前記対象における肝細胞の核のHNF4の量を増加させる、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記組成物の前記投与が、前記肝細胞のHNF4の総量を増加させない、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記組成物の前記投与が、前記肝細胞のHNF4の総量を増加させる、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記ベクターが、HNF4をコードする核酸をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象にHNF4をコードする核酸を含むベクターを投与することをさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記核酸が、HNF4アイソフォーム2(P1)をコードする、請求項8または9に記載の方法。

【請求項 11】

HNF4をコードする前記核酸が、配列番号1を含む、請求項8または9に記載の方法。

【請求項 12】

前記肝疾患が、肝線維症、肝硬変、肝がん、または末期肝疾患である、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記肝疾患が肝硬変である、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記対象がヒトである、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

それを必要とする対象において肝疾患を治療する方法であって、前記対象に組成物を投与することを含み、前記組成物が、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERKからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量を減少させるか、またはその機能を抑制する、方法。

【請求項 16】

50

前記組成物が核酸である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記核酸が DNA または RNA である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記核酸の前記投与が、前記対象における肝細胞の核の HNF4 の量を増加させる、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記組成物の前記投与が、前記肝細胞の HNF4 の総量を増加させない、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記組成物の前記投与が、前記肝細胞の HNF4 の総量を増加させる、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記組成物が、HNF4 をコードする核酸をさらに含む、請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記対象に HNF4 をコードする核酸を含むベクターを投与することをさらに含む、請求項 15 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記核酸が、HNF4 アイソフォーム 2 をコードする、請求項 21 または 22 に記載の方法。

【請求項 24】

HNF4 をコードする前記核酸が、配列番号 1 を含む、請求項 21 または 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記肝疾患が、肝線維症、肝硬変、肝がん、または末期肝疾患を含む、請求項 15 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記対象がヒトである、請求項 15 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

ベクターを含む組成物であって、前記ベクターが、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、および POM121C、ならびにその機能的断片からなる群から選択される 1 つまたは複数の転写因子をコードする 1 つまたは複数の核酸を含む、組成物。

【請求項 28】

HNF4 をコードする核酸を含む別のベクターをさらに含む、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

HNF4 をコードする前記核酸が、配列番号 1 を含む、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

それを必要とする対象において肝疾患を治療する方法であって、前記対象に HNF4 アイソフォーム 2 をコードする核酸を含むベクターを投与することを含む方法。

【請求項 31】

前記核酸が、配列番号 1 を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記肝疾患が、肝線維症、肝硬変、肝がん、または末期肝疾患である、請求項 30 または 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記肝疾患が肝硬変である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

10

20

30

40

50

前記対象がヒトである、請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2019年10月16日に
出願された米国特許仮出願第62/915,765号の優先権を主張する。

連邦政府により後援された研究または開発に関する陳述

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号DK099257の下で
、政府支援を受けて行われた。政府は本発明においてある一定の権利を有する。

10

本開示は、例えば、肝疾患および/または肝障害を治療するためのHNF4の発現ま
たは活性のモジュレーションに関する。

【背景技術】

【0002】

進行性肝硬変の結果として起こる終末期肝不全(TLF)は、2015年には死因の第
12位であることが報告されており、世界の人口10万人あたりの死者は15.8人であ
ると推定されている(Tsochatzis EA et al., 2014)。米国では、2015年の慢性
肝疾患および肝硬変に結び付けられる死亡登録者数は40,326人であり、人口10万
人あたりの死者は12.5人、年々増加率は3.8%であった(Murphy SL et al., 2
017; Goldman L, et al., 2016)。影響を最も受ける年齢層は45歳~64歳で、
人口10万人あたりの死者は26.4人であり、慢性肝疾患および肝硬変は、がん、心臓
病、および不慮の事故に次いで、この年齢層における第4位の主要死因としてランク付け
されている(Murphy SL et al., 2017)。TLFの唯一の決定的な治療法は同所性肝
移植であり、肝移植を必要とする患者の数と利用可能な臓器が不十分な数であることを考
えると、本質的にTLFは治療不可能な疾患となる(Lopez PM et al., 2006)。

20

【0003】

慢性肝疾患には、肝炎ウイルスによる慢性感染、アルコール媒介性肝硬変、および非ア
ルコール性脂肪性肝炎(NASH)を含む、様々な原因があり(Archambeaud I et a
l., 2015; Donato F et al., 2006; Gelatti U et al., 2005; Kuper H et al.,
2000)、それぞれ肝細胞不全を引き起こす可能性がある(Guzman-Lepe J et al., 2
018; Hernaez R et al., 2017; Lee YA et al., 2015; Pessayre D et al., 19
78)。ヒトにおける肝細胞機能の低下および最終的には肝不全の原因を担う機序は余り
解明されていない。

30

【0004】

慢性肝疾患、肝硬変、および最近のTLFの主要な原因は、B型およびC型肝炎ウイルス
による感染、アルコール媒介性ラエンネック肝硬変、および非アルコール性脂肪性肝炎
(NASH)/メタボリック症候群に関係している(Archambeaud et al., 2015; D
onato F et al., 2006; Gelatti et al., 2005; Kuper et al., 2000)。これらの
病因因子は、血管系の変化を伴う正常な小葉の構造を破壊する線維症を引き起こす(Gol
dman L, et al., 2016)。これらの病理学的変化は、肝細胞不全および肝細胞がその
正常な機能を果たすことができないことに関連していたが(Guzman-Lepe J et al., 2
018; Hernaez R et al., 2007; Lee Ya et al., 2015; Pessayre D et al., 19
78)、肝細胞機能の低下および最終的な肝不全の原因を担う機序は、ヒトにおいて不明
である。慢性肝損傷は、酸化ストレス(Cichoz-Lach H et al., 2014; Simoes ICM
et al., 2018)および小胞体ストレス(Malhi H et al., 2011; Zhang XQ et al.,
2014)を発生させ、これらが細胞死を誘導し(Cichoz-Lach H et al., 2014; Mal
hi H et al., 2011; Zhang XQ et al., 2014; Wang K et al., 2014; Seki E e
t al., 2015)、最終的に肝細胞の増殖能力を低下させる(Zhang BH et al., 1999
; Michalopoulos GK et al., 2015; Dubuquoy L et al., 2015)。

40

【0005】

50

末期肝硬変のラット由来の肝細胞では、肝臓に豊富な転写因子が安定的にダウンレギュレートされていること (Nishikawa T et al., 2014 ; Guzman-Lepe J et al., 2019)、また、それらのうちの1つである肝細胞核因子4アルファ (HNF4) の強制的な再発現が機能障害性肝細胞を再プログラムして、培養と *in vivo* の両方において機能を回復させること (Nishikawa T et al., 2014) が判明している。進行性肝疾患の患者の大規模なコホートについての研究では、罹患した肝臓の HNF4 mRNA 発現のレベルが肝機能障害の程度と相関していること (チャイルド・ピュー分類)、また HNF4 発現が核に局在していなかったことが明らかにされている (Guzman-Lepe J et al., 2019)。肝細胞核因子4アルファ (HNF4) の強制的な再発現は、新たな肝細胞または幹細胞を増殖させることなく、培養および *in vivo* の両方において、機能障害性肝細胞を再プログラムして、終末期の肝硬変の肝臓から再び機能させることができる (Nishikawa T et al., 2014)。HNF4 の核内局在および mRNA 発現の有意な減少を含む、LET F のダウンレギュレーションは、TLF のあるヒト肝臓の大規模コホートにおける肝機能障害の程度と関係している (Guzman-Lepe J et al., 2018)。

10

【0006】

HNF4 は、成体肝臓における肝臓器官形成と肝細胞機能に重要な役割を果たす転写因子である (Nishikawa T et al., 2014 ; Babeu JP et al., 2014)。主な HNF4 の作用は、脂質、グルコース、生体異物、および薬物の代謝に参与する特異的な標的遺伝子の制御であった (Nishikawa T et al., 2014 ; Babeu JP et al., 2014)。ヒトでは単一遺伝子が HNF4 をコードしており (Kritis AA et al., 1999)、これは2つの異なるプロモーターによって制御されている。これらのプロモーターは、2つのアイソフォームクラス、P1およびP2を生成する (Babeu JP et al., 2014)。P1アイソフォームは、主として成体肝臓で発現されるが、P2アイソフォームは胚発生中の肝臓で、およびがんなどの病的状況下での肝臓で検出されている (Babeu JP et al., 2014 ; Walesky C et al., 2015 ; Tanaka T et al., 2006)。HNF4 の発現および機能は、複数のレベルで制御されている (Chellappa K et al., 2012 ; Guo H et al., 2014 ; Hong YH et al., 2003 ; Lu H et al., 2016、Song Y et al., 2015 ; Soutoglou E et al., 2000 ; Sun K et al., 2007 ; Xu Z et al., 2007 ; Yokoyama A et al., 2011 ; Zhou W et al., 2012)。

20

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、HNF4 の発現をモジュレートし、ならびに/あるいは肝疾患および/または肝障害を治療するための組成物および方法が必要とされている。本明細書に開示されている組成物および方法は、これらのニーズおよび他のニーズに対処する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本明細書に開示されている組成物および方法は、肝疾患治療におけるある特定の未だ対処されていないニーズに対処する。いくつかの態様では、本明細書では、肝疾患および/または肝障害を治療するための医薬のための組成物およびその使用であって、組成物が、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300および/またはPOM121Cからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量または機能を増加させるか、あるいはDNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4およびPERKからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量を減少させるか、またはその機能を抑制する、組成物およびその使用が開示されている。いくつかの実施形態では、組成物はベクターであり、ベクターは、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、および/またはPOM121Cのうちの1つまたは複数にコードする1つまたは複数の核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、HNF4 (例えば、HNF4 アイソフォーム2) をコードする核酸を含むベクターである。本明

40

50

細書に開示されている組成物および方法は、肝細胞のHNF4の量の驚くべき増加（例えば、肝細胞のHNF4の総量の増加、および/または肝細胞の核のHNF4の量の増加）をもたらす、肝疾患（例えば、末期肝疾患）の効果的な治療をもたらされる。

【0009】

いくつかの態様では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療する方法であって、対象に組成物を投与することを含み、組成物が、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量または機能を増加させる、方法が開示されている。

【0010】

いくつかの態様では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療するための医薬を調製するための組成物の使用であって、対象に組成物を投与することを含み、組成物が、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量または機能を増加させる、使用が開示されている。

10

【0011】

いくつかの実施形態では、組成物はベクターであり、ベクターは、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、PROX1および/またはSREBP1をコードする1つまたは複数の核酸を含む。1つまたは複数の核酸は、DNAまたはmRNAであり得る。

20

【0012】

いくつかの態様では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療する方法であって、対象に組成物を投与することを含み、組成物が、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERKからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量を減少させるか、またはその機能を抑制する、方法が開示されている。

【0013】

いくつかの態様では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療するための医薬を調製するための組成物の使用であって、対象に組成物を投与することを含む、組成物が、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERKからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量または機能を減少させる、使用が開示されている。

30

【0014】

いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対象における肝細胞の核のHNF4の量を増加させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、肝細胞のHNF4の総量を増加させない。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、肝細胞のHNF4の総量を増加させる。

【0015】

いくつかの実施形態では、ベクターは、HNF4をコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、この方法は、対象にHNF4をコードする核酸を含むベクターを投与することをさらに含む。一例では、核酸は、HNF4アイソフォーム2をコードする。

40

【0016】

いくつかの態様では、本明細書では、ベクターを含む組成物であって、ベクターが、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121C、ならびにその機能的断片からなる群から選択される1つまたは複数の転写因子をコードする1つまたは複数の核酸を含む、組成物が開示されている。

【0017】

いくつかの態様では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療する方法であって、対象にHNF4アイソフォーム2をコードする核酸を含むベクターを投

50

与することを含む方法が開示されている。

【0018】

いくつかの態様では、本明細書では、肝疾患を治療するための医薬を調製するためのベクターの使用であって、ベクターが、HNF4 アイソフォーム2をコードする核酸を含む、使用が開示されている。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1A~1Cは、正常肝臓および硬変した肝臓からの肝細胞におけるHNF4の局在を示す。図1Aは、NASH非代償性肝臓および正常ヒト肝細胞からの単離したヒト肝細胞のHNF4免疫蛍光法の代表的な写真を示す。機能的に非代償性の肝臓から単離した肝細胞(NASHおよびアルコール媒介性ラエンネック肝硬変)(n=6)および正常肝臓対照から単離した肝細胞(n=2)におけるベータアクチンに対して、HNF4のウェスタンブロット分析および定量化を正規化した。図1Aは、総HNF4；正常ヒト肝細胞対非代償性ヒト肝細胞、 $P=0.166$ を示す。図1Bは、細胞質のHNF4；正常ヒト肝細胞対非代償性ヒト肝細胞、 $P=0.023$ を示す。図1Cは、核のHNF4；正常ヒト肝細胞対非代償性ヒト肝細胞、 $P=0.023$ を示す。A~Cのグラフは、平均±SDとしてプロットされる。統計学的に有意($P<0.05$)。ひし形は、チャイルド・ピュー「B」を示し、四角は、チャイルド・ピュー「C」を示す。

【図2-1】図2A~2Cは、HNF4翻訳後修飾剤のタンパク質の発現およびスピアマンの順位相関試験を示す。図2Aおよび2Bは、非代償性NASHの肝細胞(n=4)およびアルコール媒介性ラエンネック肝硬変の肝細胞(n=2)および正常な対照肝細胞(n=2)における、EGFR($P=0.904$)、cMET($P=0.023$)、総AMPK($P>0.999$)、p-AMPK(Thr172)($P=0.547$)、総AKT($P=0.047$)、p-AKT(Ser473)($P=0.547$)、p-AKT(Thr308)($P=0.024$)、p-AMPK(Thr172)/AMPKの比率($P=0.5476$)、p-AKT(Ser473)/AKTの比率($P=0.1667$)およびp-AKT(Thr308)/総AKTの比率($P=0.0238$)のウェスタンブロット分析(2A)および定量化(2B)を示す。

【図2-2】図2A~2Cは、HNF4翻訳後修飾剤のタンパク質の発現およびスピアマンの順位相関試験を示す。図2Aおよび2Bは、非代償性NASHの肝細胞(n=4)およびアルコール媒介性ラエンネック肝硬変の肝細胞(n=2)および正常な対照肝細胞(n=2)における、EGFR($P=0.904$)、cMET($P=0.023$)、総AMPK($P>0.999$)、p-AMPK(Thr172)($P=0.547$)、総AKT($P=0.047$)、p-AKT(Ser473)($P=0.547$)、p-AKT(Thr308)($P=0.024$)、p-AMPK(Thr172)/AMPKの比率($P=0.5476$)、p-AKT(Ser473)/AKTの比率($P=0.1667$)およびp-AKT(Thr308)/総AKTの比率($P=0.0238$)のウェスタンブロット分析(2A)および定量化(2B)を示す。図2Bにおいて、中黒の四角は、チャイルド・ピュー「B」を指し、中黒のひし形は、チャイルド・ピュー「C」を指す。

【図2-3】図2A~2Cは、HNF4翻訳後修飾剤のタンパク質の発現およびスピアマンの順位相関試験を示す。図2Cは、スピアマンの順位相関試験が示されており、核のHNF4が、cMET($r=0.71$ ； $P=0.037$)、総AKT($r=0.71$ ； $P=0.037$)、ホスホ-AKT(Thr308)($r=0.82$ ； $P=0.011$)、およびホスホ-AKT(Thr308)/総AKTの比率($r=0.73$ ； $P=0.031$)と有意に相関することを実証している。細胞質のHNF4は、cMET($r=-0.80$ ； $P=0.014$)、総AKT($r=-0.73$ ； $P=0.031$)、ホスホ-AKT(Thr308)($r=-0.77$ ； $P=0.021$)、およびホスホ-AKT(Thr308)/総AKTの比率($r=-0.72$ ； $P=0.037$)との有意な相関を示した。図2Bの棒グラフは、平均±SDとしてプロットされる。統計学的に有意($P<0$

10

20

30

40

50

. 05)。

【図3-1】図3A~3Dは、翻訳後修飾剤およびHNF4細胞局在性の関係を示す。図3Aは、パス解析が、HNF4局在と、cMET(0.56; P=0.004)、ホスホAKT(Thr308)/総AKTの比率(0.05; P=0.006)および総HNF4レベル(0.60; P=0.042)との有意な直接的な関係を解明したことを示す。パス解析により、cMETと総HNF4との間の負の有意な関係(-0.37; P=0.024)が明らかになった。図3Bは、線形回帰分析が、核のHNF4発現と、肝機能障害の程度(チャイルド・ピュースコア)との有意な関係を示した($R^2=0.80$ 、P=0.007)ことを描写する。

【図3-2】図3A~3Dは、翻訳後修飾剤およびHNF4細胞局在性の関係を示す。図3Cは、主成分分析(PCA)が、HNF4発現と相関するタンパク質プロファイルが正常ヒト肝細胞(n=2)の特徴を肯定的に説明する一方で、細胞質のHNF4、活性カスパーゼ3、p-AKT(Ser473)/総AKTの比率およびp-AMPK(Ser172)/AMPKは、NASH(n=4)の肝臓およびアルコール媒介性ラエンネック肝硬変の肝臓(n=2)からの非代償性ヒト肝細胞の特徴を示したことを図示する。

【図3-3】図3A~3Dは、翻訳後修飾剤およびHNF4細胞局在性の関係を示す。図3Dのグラフは、正常ヒト肝細胞と比べた、非代償性ヒト肝細胞(チャイルド・ピュースコアBおよびC)における、総HNF4、核内HNF4、または細胞質HNF4(上の列における3つのグラフ)、cMET、p-AMPK(Ser172)/AMPK、p-AKT(Ser473)/総AKT、p-AKT(Ser473)/総AKTおよびホスホAKT(Thr308)/総AKTの比率、p-H3(Ser10)および活性カスパーゼ(2列目および下の列におけるグラフ)のPCA分析に使用されたタンパク質発現の変化倍率を示す。グラフは平均±SDとしてプロットされる。統計学的に有意(P<0.05)。

【図4】図4A~4Cは、核のHNF4のアセチル化が、NASHの外植した肝臓およびアルコール媒介性ラエンネック肝硬変の外植した肝臓からのヒト非代償性肝細胞において変更されることを示す。図4Aおよび4Bは、非代償性NASH(n=4)の外植した肝臓からのヒト肝細胞の核画分およびアルコール媒介性ラエンネック肝硬変(n=4)の外植した肝臓からのヒト肝細胞の核画分におけるHNF4(Lys106)のアセチル化形態のウェスタンプロットおよび定量化を示す(P=0.024)。図4Cにおける線形回帰分析は、HNF4(Lys106)のアセチル化形態の低減と肝機能障害との有意な相関($R^2=0.71$ 、P=0.004)を示す。棒グラフは、平均±SDとしてプロットされる。統計学的に有意(P<0.05)。

【図5】図5は、HNF4-翻訳後修飾(PTM)のインシリコ分析を示す。図5は、HNF4-PTMの一覧を提供する。

【図6】図6A~6Bは、活性化されたAKT経路と、NASHの外植した肝臓およびアルコール媒介性ラエンネック肝硬変の外植した肝臓からのヒト非代償性肝細胞におけるHNF4翻訳後修飾剤およびp-EGFR発現との関係を示す。図6Aは、ホスホ-AKT(Thr308)/AKTに関するスピアマンの相関を示す。図6Bは、ホスホ-AKT(Ser473)/AKTに関するスピアマンの相関を示す。

【図7-1】図7A~7Cは、免疫組織化学による、新たに単離した正常ヒト肝細胞のものと比較した、mRNAレベル(図7A)およびタンパク質レベル(図7B)での、アルコール性肝炎を有する患者の外植された肝臓から単離したヒト肝細胞における肝臓に豊富な転写因子であるHNF4の発現レベルを示し、アルコール性肝炎の肝細胞の約40%のみが、核において弱い強度でHNF4を発現し、それらの細胞の約10%が、HNF4の細胞質内の発現を有していたことを実証する。

【図7-2】図7Cに関して、新たに単離したヒトアルコール肝炎肝細胞を、HNF4をコードするレンチウイルス(Systems Bioscience、カタログ番号CS970S-1; CD511B-1中のHNF4)で処理した。この図は、72時間後、HNF4発現は、核でHNF4を発現する肝細胞のパーセントを変化させなかった

10

20

30

40

50

ことを示す。しかしながら、HNF4 発現強度は、既存の細胞で劇的に増加した。全体的にみると、このデータは、核へのHNF4 輸送が、アルコール性肝炎を有するヒトにおいて肝細胞が機能を回復するのに重要な役割を果たす可能性があることを示す。

【図8-1】図8A~8Fは、初代ヒト肝細胞におけるMTF1発現を示す。図8Aは、NASHまたはアルコール誘導性肝硬変のために肝移植を受けた患者の肝臓から単離した初代ヒト肝細胞を、ウェスタンブロットによって、MTF1 (MA5-26738 1:1000) およびHNF4 (ab41898 1:1000) の発現について分析したことを示す。

【図8-2】図8A~8Fは、初代ヒト肝細胞におけるMTF1発現を示す。図8Bおよび8Cは、対照肝細胞、子供B肝細胞および子供C肝細胞間のHNF4 (図8Bおよび8C) およびMTF1 (図8Dおよび8E) の相対強度を、ブラウン・フォーサイズの一元配置ANOVAおよび多重比較のためのウェルチのANOVA検定によって比較したことを示す。HNF4 およびMTF1の発現は、子供B肝細胞と比較して、子供C肝細胞においてより低い。図8Bおよび8D、* $p < 0.003$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.0001$ 、 $n = 25$ 。図8C $R^2 = 0.019$ 、 $p = 0.06$ 、 $n = 19$ 。図8E $R^2 = 0.015$ 、 $p = 0.1$ 、 $n = 19$ 。

【図8-3】図8A~8Fは、初代ヒト肝細胞におけるMTF1発現を示す。図8Fは、チャイルド・ピュースコア、HNF4 およびMTF1のタンパク質発現を用いた相関研究を、単純線形回帰を使用して実行したことを示す。黒丸は対照を指し、薄灰色の丸は子供Bを指し、濃い灰色の丸は子供Cを指す。HNF4 のタンパク質発現は、MTF1のタンパク質発現と相関する ($R^2 = 0.28$ 、 $p = 0.007$ 、 $n = 25$)。

【図9-1】図9A~9Dは、初代ヒト肝細胞におけるNR0B2発現を示す。図9Aは、NASHまたはアルコール誘導性肝硬変のために肝移植を受けた患者の肝臓から単離した初代ヒト肝細胞を、ウェスタンブロットによって、NR0B2 (Abc1onal A1836 1:500) およびHNF4 (ab41898 1:1000) の発現について分析したことを示す。

【図9-2】図9A~9Dは、初代ヒト肝細胞におけるNR0B2発現を示す。図9Bおよび9Cは、対照肝細胞、子供B肝細胞および子供C肝細胞間のNR0B2の相対強度を、ブラウン・フォーサイズの一元配置ANOVAおよび多重比較のためのウェルチのANOVA検定によって比較したことを示す。図9B * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、 $n = 25$ 。図9C $R^2 = 0.19$ 、 $p = 0.06$ 、 $n = 19$ 。NR0B2の発現は、子供C、子供Bおよび対照肝細胞で異なる。

【図9-3】図9A~9Dは、初代ヒト肝細胞におけるNR0B2発現を示す。図9Dは、チャイルド・ピュースコア、HNF4 およびNR0B2のタンパク質発現を用いた相関研究を、単純線形回帰を使用して実行したことを示す。黒丸は対照を指し、薄灰色の丸は子供Bを指し、濃い灰色の丸は子供Cを指す ($R^2 = 0.12$ 、 $p = 0.1$ 、 $n = 25$)。

【図10-1】図10A~10Dは、初代ヒト肝細胞におけるNR5A2発現を示す。図10Aは、NASHまたはアルコール誘導性肝硬変のために肝移植を受けた患者の肝臓から単離した初代ヒト肝細胞を、ウェスタンブロットによって、NR5A2 (Novus NBP2-27196 1:500) およびHNF4 (ab41898 1:1000) の発現について分析したことを示す。

【図10-2】図10A~10Dは、初代ヒト肝細胞におけるNR5A2発現を示す。図10Bおよび10Cは、対照肝細胞、子供B肝細胞および子供C肝細胞間のNR5A2の相対強度を、ブラウン・フォーサイズの一元配置ANOVAおよび多重比較のためのウェルチのANOVA検定によって比較したことを示す。図10B * $p < 0.05$ 、 $n = 25$ 。図10C $R^2 = 0.17$ 、 $p = 0.07$ 、 $n = 19$ 。NR5A2の発現は、子供Bおよび子供Cならびに対照肝細胞の間で異なる。

【図10-3】図10A~10Dは、初代ヒト肝細胞におけるNR5A2発現を示す。図10Dは、チャイルド・ピュースコア、HNF4 およびNR0B2のタンパク質発現を

10

20

30

40

50

用いた相関研究を、単純線形回帰を使用して実行したことを示す。NR5A2のタンパク質発現は、HNF4の発現と相関する。黒丸は対照を指し、薄灰色の丸は子供Bを指し、濃い灰色の丸は子供Cを指す($R^2 = 0.17$ 、 $p < 0.05$ 、 $n = 25$)。

【図11-1】図11A~11Dは、初代ヒト肝細胞におけるProx1発現を示す。図11Aは、NASHまたはアルコール誘導性肝硬変のために肝移植を受けた患者の肝臓から単離した初代ヒト肝細胞を、ウェスタンブロットによって、PROX1(R&D AF2727 1:500)およびHNF4(ab41898 1:1000)の発現について分析したことを示す。

【図11-2】図11A~11Dは、初代ヒト肝細胞におけるProx1発現を示す。図11Bおよび11Cは、対照肝細胞、子供B肝細胞および子供C肝細胞間のPROX1の相対強度を、ブラウン・フォーサイズの一元配置ANOVAおよび多重比較のためのウェルチのANOVA検定によって比較したことを示す。図11B * $p < 0.02$ 、 $n = 25$ 。図11C $R^2 = 0.02$ 、 $p = 0.6$ 、 $n = 19$ 。PROX1の発現は、子供Cおよび対照肝細胞で異なる。

10

【図11-3】図11A~11Dは、初代ヒト肝細胞におけるProx1発現を示す。図11Dは、チャイルド・ピュースコア、HNF4およびPROX1のタンパク質発現を用いた相関研究を、単純線形回帰を使用して実行したことを示す。黒丸は対照を指し、薄灰色の丸は子供Bを指し、濃い灰色の丸は子供Cを指す($R^2 = 0.02$ 、 $p = 0.46$ 、 $n = 25$)。

【図12-1】図12A~12Dは、初代ヒト肝細胞におけるPOM121C発現を示す。図12Aは、NASHまたはアルコール誘導性肝硬変のために肝移植を受けた患者の肝臓から単離した初代ヒト肝細胞を、ウェスタンブロットによって、POM121C(PA5-85161 1:500)およびHNF4(ab41898 1:1000)の発現について分析したことを示す。

20

【図12-2】図12A~12Dは、初代ヒト肝細胞におけるPOM121C発現を示す。図12Bおよび12Cは、対照肝細胞、子供B肝細胞および子供C肝細胞間のPOM121Cの相対強度を、ブラウン・フォーサイズの一元配置ANOVAおよび多重比較のためのウェルチのANOVA検定によって比較したことを示す。図12B $n = 25$ 。図12C $R^2 = 0.08$ 、 $p = 0.24$ 、 $n = 25$ 。

【図12-3】図12A~12Dは、初代ヒト肝細胞におけるPOM121C発現を示す。図12Dは、チャイルド・ピュースコア、HNF4およびPOM121Cのタンパク質発現を用いた相関研究を、単純線形回帰を使用して実行したことを示す。黒丸は対照を指し、薄灰色の丸は子供Bを指し、濃い灰色の丸は子供Cを指す($R^2 = 0.06$ 、 $p = 0.23$ 、 $n = 25$)。

30

【図13-1】図13A~13Dは、初代ヒト肝細胞におけるSREBP1発現を示す。図13Aは、NASHまたはアルコール誘導性肝硬変のために肝移植を受けた患者の肝臓から単離した初代ヒト肝細胞を、ウェスタンブロットによって、SREBP1(Abcam ab28481 1:500)およびHNF4(ab41898 1:1000)の発現について分析したことを示す。

【図13-2】図13A~13Dは、初代ヒト肝細胞におけるSREBP1発現を示す。図13Bおよび13Cは、対照肝細胞、子供B肝細胞および子供C肝細胞間のSREBP1の相対強度を、ブラウン・フォーサイズの一元配置ANOVAおよび多重比較のためのウェルチのANOVA検定によって比較したことを示す。図13B $n = 25$ 。図13C $R^2 = 0.02$ 、 $p = 0.54$ 、 $n = 19$ 。

40

【図13-3】図13A~13Dは、初代ヒト肝細胞におけるSREBP1発現を示す。図13Dは、チャイルド・ピュースコア、HNF4およびSREBP1のタンパク質発現を用いた相関研究を、単純線形回帰を使用して実行したことを示す。黒丸は対照を指し、薄灰色の丸は子供Bを指し、濃い灰色の丸は子供Cを指す($R^2 = 0.01$ 、 $p = 0.86$ 、 $n = 25$)。

【図14-1】図14A~14Dは、初代ヒト肝細胞におけるEP300発現を示す。図

50

14Aは、NASHまたはアルコール誘導性肝硬変のために肝移植を受けた患者の肝臓から単離した初代ヒト肝細胞を、ウェスタンブロットによって、EP300 (Novus NB100-616 1:500) およびHNF4 (ab41898 1:1000) の発現について分析したことを示す。

【図14-2】図14A~14Dは、初代ヒト肝細胞におけるEP300発現を示す。図14Bおよび14Cは、対照肝細胞、子供B肝細胞および子供C肝細胞間のEP300の相対強度を、ブラウン・フォーサイスの一元配置ANOVAおよび多重比較のためのウェルチのANOVA検定によって比較したことを示す。図14B $n = 25$ 。図14C $R^2 = 0.32$ 、 $p = 0.01$ 、 $n = 19$ 。

【図14-3】図14A~14Dは、初代ヒト肝細胞におけるEP300発現を示す。図14Dは、チャイルド・ピュースコア、HNF4 およびEP300のタンパク質発現を用いた相関研究を、単純線形回帰を使用して実行したことを示す。黒丸は対照を指し、薄灰色の丸は子供Bを指し、濃い灰色の丸は子供Cを指す ($R^2 = 0.01$ 、 $p = 0.69$ 、 $n = 25$)。

【図15】図15AおよびBは、HepG2細胞におけるEP300、MTF1、NR0B2、NR5A2、POM121C、PROX1またはSREBP1のCRISPR/Cas9ノックアウトを実行し、細胞内HNF4 の局在を免疫蛍光法で分析した (ab41898 1:500) ことを示す。DAPIおよびHNF4 陽性の核 (図15A) および細胞質におけるHNF4 陽性の細胞 (図15B) の総数を計数した。統計的分析を、ブラウン・フォーサイスの一元配置ANOVAおよび多重比較のためのウェルチのANOVA検定を使用して実行した。EP300、MTF1、NR0B2、NR5A2、POM121C、PROX1およびSREBP1のノックアウトは、は、HNF4 の核内局在の低減およびHNF4 の細胞質内局在の増加を示した。* $p < 0.05$ 。

【図16】図16は、肝移植を受けたNASHを有する患者から単離した初代ヒト肝細胞を、AAV-HNF4 およびAAV-MTF1、NR0B2、NR5A2、POM121C、PROX1、SREBP1またはGFPで、 10^5 のMOIで形質導入したことを示す。HNF4 陽性の核のパーセンテージを計数した。統計的分析を、ブラウン・フォーサイスの一元配置ANOVAおよび多重比較のためのウェルチのANOVA検定を使用して実行した。HNF4 、MTF1、NR0B2、POM121C、PROX1およびSREBP1での共形質導入は、GFP HNF4 共形質導入群と比較して、陽性核の数における増加をもたらす (***) $p < 0.0001$ 、*** $p < 0.0005$ 、** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$)。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本明細書では、対象における肝細胞の核への転写因子HNF4 の発現および/または輸送または保持を増加させることによって、対象における肝疾患を治療するための組成物および方法が開示されている。いくつかの実施形態では、この方法は、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121C、ならびにその機能的断片からなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の発現または機能をアップレギュレートすること、ならびに/あるいは1つまたは複数の転写因子DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERK、ならびにその機能的断片の発現または機能をダウンレギュレートすることを含む。これらの転写因子がHNF4 の発現および/または局在をモジュレートし、したがって、肝疾患の治療に使用することができることは驚くべき発見である。

【0021】

いくつかの実施形態では、この方法は、ベクターを投与することを含み、ベクターは、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121C、ならびにその機能的断片からなる群から選択される1つまたは複数の転写因子をコードする核酸 (例えば、DNA、cdNA、またはmRNA) を含む。いくつかの態様では、この方法は、HNF4 (例えば、HNF4 アイソフォーム2) をコー

10

20

30

40

50

ドする核酸（例えば、DNA、cDNAまたはmRNA）を含むベクターを投与することを含む。他の実施形態またはさらなる実施形態では、この方法は、組成物を投与することを含み、組成物は、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERK、ならびにその機能的断片からなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量を減少させるか、またはその機能を抑制する。他の実施形態では、この方法は、Lys106でのHNF4のアセチル化を増加させること、cMETの発現を増加させること、および/またはThr308でのリン酸化を介したAKTの活性化を増加させることを含む。本明細書に開示されている方法は、肝細胞の核のHNF4の量を驚くほど増加させることを示している。HNF4のそのような操作は、肝疾患を有する患者における肝細胞の機能を改善する。

10

【0022】

本出願を通して使用されている用語は、当業者にとって通常で典型的な意味で解釈されるものとする。しかし、出願人は、次の用語に以下のような特定の定義を付与することを望む。

【0023】

用語

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかにそうでないことを示さない限り、複数形の言及を含む。例えば、「細胞」という用語には、それらの混合物を含む、複数の細胞が含まれる。

20

【0024】

例えば量、パーセンテージなどの測定可能な値を指す場合に本明細書で使用される「約」という用語は、測定可能な値から $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または $\pm 1\%$ の変動を包含することを意味する。

【0025】

対象への「投与」または「投与する」には、対象に薬剤を導入するまたは送達する任意の経路が含まれる。投与は、静脈内、腹腔内などを含む、任意の適切な経路によって実施することができる。投与には、自己投与および他者による投与が含まれる。

【0026】

本明細書で使用される場合の「含む (comprising)」という用語およびその変化形には、「含む (including)」という用語およびその変化形と同義的に使用され、オープンで非限定的な用語である。本明細書では、様々な実施形態を説明するために「含む (comprising)」および「含む (including)」という用語を使用してきたが、「から本質的になる (consisting essentially of)」および「からなる (consisting of)」という用語を「含む (comprising)」および「含む (including)」の代わりに使用し、より具体的な実施形態を提供することができ、開示もされている。

30

【0027】

「組成物」とは、有益な生物学的効果を有する任意の薬剤を指す。有益な生物学的効果には、治療効果、例えば、障害または他の望ましくない生理学的状態の治療と、予防効果、例えば、障害または他の望ましくない生理学的状態（例えば、肝疾患）の予防の両方が含まれる。この用語はまた、限定するものではないが、ベクター、ポリヌクレオチド、細胞、塩、エステル、アミド、プロエージェント (proagent)、活性代謝物、異性体、断片、類似体などを含む、本明細書で詳しく言及されている有益な薬剤の薬学的に許容される薬理学的に活性のある誘導體も包含する。次に、「組成物」という用語が使用される場合、または特定の組成物が詳しく特定される場合、その用語には、組成物それ自体、ならびに薬学的に許容される薬理学的に活性のあるベクター、ポリヌクレオチド、塩、エステル、アミド、プロエージェント、コンジュゲート、活性代謝物、異性体、断片、類似体などが含まれるものと理解されたい。いくつかの態様では、本明細書に開示されている組成物はベクターを含み、ベクターは、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121C、ならびにその機能的断片からなる群から選択される1つまたは複数の転写因子をコードする核酸を含む。いくつかの態様では、

40

50

本明細書に開示されている組成物は、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERK、ならびにその機能的断片からなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量を減少させるか、またはその機能を抑制する核酸を含む。いくつかの態様では、本明細書に開示されている組成物はベクターを含み、ベクターは、HNF をコードする核酸を含む。

【0028】

「有効量」は、限定するものではないが、病状または障害（例えば、肝疾患）の症状または徴候を改善、逆転、軽減、予防、または診断することができる量を包含する。別段の指示がない限り、明示的にまたは文脈によって、「有効量」は状態を改善するのに十分な最小量に限定されない。疾患または障害の重症度、ならびに疾患または障害を予防、治療、または軽減する治療の能力は、何ら限定を意味することなく、バイオマーカーによって、または臨床パラメーターによって測定することができる。「ベクターの有効量」または「組成物の有効量」という用語は、肝疾患の軽減または肝機能の回復をいくらか引き起こすのに十分なベクターまたは組成物の量を指す。

10

【0029】

「断片」は、他の配列に結合しているか否かにかかわらず、断片の活性が非修飾ペプチドまたはタンパク質と比較して有意に変化しないか、または損なわれない限り、特定の領域または特定のアミノ酸残基の挿入、欠失、置換、または他の選択された修飾を含むことができる。これらの修飾は、例えば、ジスルフィド結合が可能なアミノ酸を除去または付加すること、その生体の寿命延長（bio-longevity）を高めること、その分泌特性を変更することなど、いくつかの追加の特性を提供することができる。いずれの場合にも、断片は、標的遺伝子の転写を調節するなどの生物活性特性を有することが必要である。

20

【0030】

「遺伝子」または「遺伝子配列」という用語は、コード配列もしくは制御配列、またはその断片を指す。遺伝子は、コード配列および制御配列の任意の組合せ、またはその断片を含んでいてもよい。したがって、本明細書で言及される場合の「遺伝子」は、天然遺伝子の全部または一部であり得る。本明細書で言及される場合のポリヌクレオチド配列は、「遺伝子」という用語と交換可能に使用され得るか、または任意のコード配列、非コード配列もしくは制御配列、その断片、およびそれらの組合せを含み得る。「遺伝子」または「遺伝子配列」という用語は、例えば、コード配列の上流の制御配列（例えば、リボソーム結合部位）を含む。

30

【0031】

本明細書で使用される場合の「肝疾患」は、一般に、肝臓に影響を及ぼす疾患、障害、および状態を指し、例えば、肝細胞における脂肪の単純な蓄積（脂肪症）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、アルコール性肝疾患（ALD）、アルコール関連肝疾患（限定するものではないが、脂肪性肝、アルコール性肝炎、アルコール関連肝硬変を含む）、大滴性脂肪変性（macrovesicular steatosis）、門脈周囲および小葉の炎症（脂肪性肝炎）、肝硬変、線維症、肝虚血、肝細胞がんを含む肝がん、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、特発性肝疾患、末期肝疾患、ならびに肝不全を包含する広範囲の重症度を有し得る。「肝硬変」は、本明細書では、肝臓組織の線維性肥厚および/または再生結節を特徴とする肝臓の慢性疾患として定義される。「肝硬変」の程度または重症度は、チャイルド・ピュースコア（Child-Pugh score）によって指定することができ、その分類では、5種の臨床項目である総ビリルビン、血清アルブミン、プロトロンビン時間延長、腹水、および肝性脳症のレベルが、各臨床項目の様々なレベルに対応して1点、2点、および3点の値の点数方式を使用して点数化され、各項目の最も重度には3点の値が割り当てられる。5種のすべての項目の合計点数を加算することにより、チャイルド・ピュースコアおよび分類（Child-Pugh score and classification）に到達する。5～6点はチャイルド・ピューのクラスAに指定し、7～9点はチャイルド・ピューのクラスBに指定し、10～15点はチャイルド・ピューのクラスCに指定する。一般に、チャイルド・ピューのクラスAは最も低い重症度の肝疾患を示し

40

50

、チャイルド・ピューのクラスCは最も高い重症度の肝疾患を示す。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法は、チャイルド・ピューのクラスB肝疾患またはチャイルド・ピューのクラスC肝疾患を有する対象を治療するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法は、チャイルド・ピューのクラスA肝疾患を有する対象を治療するために使用することができる。様々な態様では、この方法は、対象のチャイルド・ピュースコアを改善する。いくつかの実施形態では、肝疾患はアルコール性肝炎である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法は、虚血性ドナー肝臓を *ex vivo* 灌流で治療するために使用することができる。本発明は、肝切除前または肝切除後を含む、がん治療前またはがん治療後の肝がんを治療するために使用することができる。

10

【0032】

本明細書で使用される場合の「核酸」という用語は、ヌクレオチド、例えばデオキシリボヌクレオチド(DNA)またはリボヌクレオチド(RNA)から構成されるポリマーを意味する。本明細書で使用される場合の「リボ核酸」および「RNA」という用語は、リボヌクレオチドから構成されるポリマーを意味する。本明細書で使用される場合の「デオキシリボ核酸」および「DNA」という用語は、デオキシリボヌクレオチドから構成されるポリマーを意味する。いくつかの実施形態では、核酸はDNA(例えば、*ceDNA*または*cDNA*)である。いくつかの実施形態では、核酸は*mRNA*である。

【0033】

「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドモノマーから構成される一本鎖ポリマーまたは二本鎖ポリマーを指す。

20

【0034】

「ポリペプチド」という用語は、D-アミノ酸もしくはL-アミノ酸の一本鎖、またはペプチド結合によって結合されているD-アミノ酸とL-アミノ酸との混合物から構成される化合物を指す。

【0035】

「プロモーター」または「制御エレメント」という用語は、転写の開始から上流または下流に位置し、RNAポリメラーゼおよび転写を開始するための他のタンパク質の認識および結合に関与する領域または配列決定因子を指す。プロモーターは細菌起源である必要はなく、例えば、ウイルスまたは他の生物に由来するプロモーターが本明細書に記載の組成物、システム、または方法において使用され得る。

30

【0036】

「薬学的に許容される担体」(「担体」と呼ばれることもある)は、一般に安全で無毒な医薬組成物または治療用組成物を調製するのに有用な担体または賦形剤を意味し、動物用および/またはヒト用の医薬または治療上の使用に許容される担体を含む。「担体」または「薬学的に許容される担体」という用語は、限定するものではないが、リン酸緩衝生理食塩水、水、エマルジョン(例えば、油/水もしくは水/油エマルジョン)および/または様々なタイプの湿潤剤を含み得る。

【0037】

本明細書で使用される場合、「担体」という用語は、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、脂質、安定化剤、または医薬製剤において使用するための当技術分野で周知の他の材料を包含する。組成物で使用するための担体の選択は、その組成物の意図した投与経路によって決まる。これらの材料を含む薬学的に許容される担体および製剤の調製は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Edition, ed. University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005に記載されている。生理学的に許容される担体の例には、生理食塩水、グリセロール、DMSO、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液などの緩衝液、および他の有機酸を含む緩衝液;アスコルビン酸を含む抗酸化剤;低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリン;親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン;アミノ酸、例えば、グリ

40

50

シン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトール；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；ならびに／あるいは非イオン界面活性剤、例えば、TWEEN（商標）（ICI, Inc.; Bridgewater, New Jersey）、ポリエチレングリコール（PEG）、およびPLURONICS（商標）（BASF; Florham Park, NJ）が含まれる。所望の治療処置をするためのそのような用量の投与を提供するために、本明細書に開示されている組成物は、有利には、担体または希釈剤を含む組成物全体の重量に基づいて、1つまたは複数の対象化合物の総量を約0.1重量%～99重量%で含むことができる。

10

【0038】

「対象」という用語は、本明細書では、限定するものではないが、霊長類（例えば、ヒト）、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどを含む、哺乳動物などの動物を含むように定義される。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【0039】

本明細書で使用される「転写因子」という用語は、DNAをRNAに転写するプロセスに関与するタンパク質を指す。典型的には、転写因子は、特定の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー領域に結合するドメインを有する。転写因子はまた、RNAポリメラーゼおよび／またはいくつかの他の転写因子と相互作用するドメインを有し、そのような相互作用により、結果的にDNAから転写されるRNAの量を調節することができる。転写因子は細胞質に存在し、活性化の際に核に移動することができる。

20

【0040】

本明細書で使用される場合の「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、「治療」という用語、およびそれらの文法的な変化形は、障害もしくは状態の1つもしくは複数の付随症状の強さを部分的もしくは完全に遅延、緩和、軽減もしくは低減すること、および／または障害もしくは状態の1つもしくは複数の原因を緩和、軽減、または阻害することを含む。本発明による治療は、予防的、防止的（prophylactically）、軽減的または治療的に施すことができる。治療は、発症前（例えば、肝疾患の明らかな兆候の前）、初期発症中（例えば、肝疾患の最初の徴候および症状の際）、肝疾患の発症が樹立された後、または終末期肝不全の段階で対象に施される。防止的施術は、肝疾患の症状が現れる数日前から数年前にわたり行われ得る。

30

【0041】

いくつかの場合では、「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、「治療」という用語、およびそれらの文法的な変化形は、対象の治療前と比較して、または一般集団もしくは研究集団におけるそのような症状の発生率と比較して、対象における肝疾患を軽減すること、肝機能を回復させること、および／または肝細胞の核のHNFの量を増加させることを含む。

【0042】

本明細書で使用される場合の「ベクター」は、単離された核酸を含み、単離された核酸を細胞の内部に送達するために使用することができる物質の組成物である。ベクターは、自己複製する染色体外ベクターまたは宿主ゲノムに組み込まれるベクターのいずれかであり得る。あるいは、ベクターはまた、前述の核酸配列を含むビヒクルであってもよい。ベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、ウイルスベクター（単離された、弱毒化された、組換えの、ウイルス粒子としてカプセル化されたもの、など）、リポソーム、エキソソーム、細胞外小胞、微粒子および／またはナノ粒子であり得る。ベクターは、二本鎖または一本鎖のDNA、RNA、あるいは二本鎖および／または一本鎖のヌクレオチドを含むハイブリッドDNA/RNA配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ベクターは、1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸配列をパッケージングすることを担うウイルスパッケージング配列である核酸配列を含むウイルスベクターで

40

50

ある。いくつかの実施形態では、ベクターはプラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターはエキソソームである。いくつかの実施形態では、ベクターはウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子はレンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、ベクターは、天然のおよび/または操作されたキャプシドを有するウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、制御配列に作動可能に連結された核酸配列を含むウイルス粒子を含み、その核酸配列は、1つまたは複数のAAVウイルス粒子ポリペプチドまたはその断片を含む融合タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ベクターは、核酸またはポリペプチドを含むナノ粒子である。様々な実施形態では、ベクターは脂質ベースのナノ粒子である。

【0043】

10

組成物

上記のように、本明細書では、転写因子であるHNF4の、対象における肝細胞の核への発現および/または輸送および/または保持を増加させることによって、肝疾患を治療する方法が開示されている。いくつかの実施形態では、この方法は、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の発現または機能をアップレギュレートすること、ならびに/あるいはDNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERKからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の発現または機能をダウンレギュレートすることを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、細胞(例えば、肝細胞)の内側で、好ましくは細胞の核の内側で、任意選択で、内因性HNF4の発現を増加させることによって、または外因性HNF4を導入することによって、HNF4の発現または機能をアップレギュレートすることをさらに含む。本明細書では、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cのアップレギュレーションならびに/あるいはDNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERKのダウンレギュレーションが肝細胞の核のHNF4のレベルを増加させ、肝機能の回復および肝疾患の軽減をもたらすことが記載されている。他の実施形態では、この方法は、Lys106でのHNF4のアセチル化を増加させること、cMETの発現を増加させること、および/またはThr308でのリン酸化を介したAKTの活性化を増加させることを含む。これらの方法は、参照によりその全体が組み込まれる、米国特許出願公開第2014/0249209号明細書に記載されている方法と組み合わせ使用することができる。

20

30

【0044】

いくつかの実施形態では、この方法は、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子とともに、HNF4の発現または機能をアップレギュレートすることをさらに含む。いくつかの実施形態では、組成物は、HNF4およびPROX1の発現または機能をアップレギュレートすることをさらに含む。いくつかの実施形態では、この方法は、HNF4およびSREBP1の発現または機能をアップレギュレートすることをさらに含む。いくつかの実施形態では、この方法は、HNF4、PROX1、およびSREBP1の発現または機能をアップレギュレートすることをさらに含む。

40

【0045】

したがって、本明細書には、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の発現または機能を増加させ、ならびに/あるいはDNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERKからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の発現または機能を減少させる組成物が含まれる。いくつかの実施形態では、組成物は、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子とともに、HNF4の発現または機能をアップレギュレートする。いくつかの実施形態では、組成物は、HNF4およびPROX1の発現または機能をアップレギュレートする。いくつかの実施

50

形態では、組成物は、HNF4 およびSREBP1の発現または機能をアップレギュレートする。いくつかの実施形態では、組成物は、HNF4、PROX1、およびSREBP1の発現または機能をアップレギュレートする。

【0046】

本明細書では、ベクターを含む組成物であって、ベクターが、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、および/またはPOM121C、ならびにその機能的断片からなる群から選択される1つまたは複数の転写因子をコードする核酸を含む、組成物が開示されている。いくつかの実施形態では、ベクターは、PROX1またはその機能的断片をコードする核酸を含む。他の実施形態では、ベクターは、NR5A2またはその機能的断片をコードする核酸を含む。他の実施形態では、ベクターは、NR0B2またはその機能的断片をコードする核酸を含む。他の実施形態では、ベクターは、MTF1またはその機能的断片をコードする核酸を含む。他の実施形態では、ベクターは、SREBP1またはその機能的断片をコードする核酸を含む。他の実施形態では、ベクターは、EP300またはその機能的断片をコードする核酸を含む。他の実施形態では、ベクターは、POM121Cまたはその機能的断片をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、HNF4をコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、PROX1およびSREBP1をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、HNF4、PROX1、およびSREBP1をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、HNF4およびPROX1をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、HNF4およびSREBP1をコードする核酸を含む。

10

20

【0047】

HNF4は肝臓の他に、腎臓、小腸、結腸、および膵臓においても高度に発現しており、そこでまた重要な役割を担っている。HNF4遺伝子の多型変異は、若年発症成人型糖尿病(MODY)、クローン病、および炎症性腸症候群を含む、広範囲の疾患に関連している。選択的スプライシングと組み合わせたP1またはP2プロモーターからの転写は、12種の異なる転写産物を生成することができる。相対的なアイソフォーム発現は組織依存的である。12種のアイソフォームは、転写の活性化および抑制をそれぞれ担っている、N末端およびC末端でのみ異なっている(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ko et al., Cell Rep. 2019 Mar 5; 26(10):2549-2557.e3を参照)。各アイソフォームが組織依存的に遺伝子の特定のサブセットを制御する別個の機能を果たしていることは、次第に認識されてきている。例えば、報告によれば、HNF4アイソフォーム2は肝臓に豊富に存在し、腫瘍抑制因子として作用し、その喪失は本出願に記載されているように肝細胞がんまたは肝不全に関連しているが、HNF4アイソフォーム8は結腸で高度に発現され、増殖促進遺伝子の発現を調節する。

30

【0048】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているベクターは、HNF4アイソフォーム2ポリペプチドをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、HNF4アイソフォーム2ポリペプチドは、配列番号1と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、もしくは約98%同一の配列またはその断片を含む。いくつかの実施形態では、その核酸は、配列番号31と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、または約98%同一であるか、またはその断片である。いくつかの態様では、HNF4アイソフォーム2ポリペプチドはプロモーター1(P1)駆動され、言い換えれば、その発現はHNF4のP1プロモーターによって駆動される。これは、本明細書ではHNF4アイソフォーム2(P1)と呼ばれる。したがって、いくつかの実施形態では、HNF4アイソフォーム2ポリヌクレオチドまたは核酸は、P1プロモーターに作動可能に連結されている。

40

【0049】

ベクターは、発現可能な遺伝子の複製を調節する制御核酸配列を含む核酸配列であり得る。いくつかの実施形態では、第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーター(例えば

50

、転写因子をコードするポリヌクレオチド)を含むベクターは、人為的操作による結果として(例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)または*Current Protocols in Molecular Biology Volumes 1-3*, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998)に記載されている方法によって)、第2の核酸(例えば、転写因子をコードするポリヌクレオチド)に対して異種であるプロモーターを含むことができる。本明細書に記載されているいずれかの態様のベクターは、上記の転写因子のうちの1つまたは複数に作動可能に連結され得る、プロモーター、エンハンサー、抗生物質耐性遺伝子、および/または開始点をさらに含むことができることを本明細書において理解されたい。

10

【0050】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターであり得る。本明細書に開示されている場合の「ウイルスベクター」は、ビヒクルに関して、ウイルス、ウイルス様粒子、ビリオン、ウイルス粒子、またはシュードタイプウイルスにおける核酸配列のパッケージングを指示する核酸配列を含む任意のウイルス、ウイルス様粒子、ビリオン、ウイルス粒子、またはシュードタイプウイルスを意味する。いくつかの実施形態では、ウイルス、ウイルス様粒子、ビリオン、ウイルス粒子、またはシュードタイプウイルスは、ベクター(例えば、核酸ベクター)を宿主細胞内に、および/または宿主細胞間で移送することができる。いくつかの実施形態では、ウイルス、ウイルス様粒子、ビリオン、ウイルス粒子、またはシュードタイプウイルスは、ベクター(例えば、核酸ベクター)を、対象の肝臓の肝細胞などの標的細胞内に、および/または標的細胞間で移送することができる。重要なことには、いくつかの実施形態では、ウイルス、ウイルス様粒子、ビリオン、ウイルス粒子、またはシュードタイプウイルスは、標的細胞(例えば、肝細胞)の核に輸送することができる。「ウイルスベクター」という用語はまた、あらゆる目的のために参照により本書に組み込まれる、米国特許出願公開第2018/0057839号明細書中により完全に記載されているそれらの形態を指すことを意味する。適切なウイルスベクターには、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、パキユロウイルスおよびレトロウイルス、パルボウイルス、およびレンチウイルスが含まれる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターである。

20

30

【0051】

複製欠損アデノウイルスの構築は開示されている(Berkner et al., *J. Virology* 61:1213-1220 (1987); Massie et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:2872-2883 (1986); Haj-Ahmad et al., *J. Virology* 57:267-274 (1986); Davidson et al., *J. Virology* 61:1226-1239 (1987); Zhang "Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis" *BioTechniques* 15:868-872 (1993))。これらのウイルスをベクターとして使用する利点は、最初に感染した細胞内では複製はできるが、新しい感染性ウイルス粒子を形成することはできないため、他の細胞種に広がる可能性のある範囲が制限されることである。組換えアデノウイルスは、気道上皮、肝細胞、血管内皮、CNS実質部および他の多くの組織部位に直接 *in vivo* 送達した後に、高効率の遺伝子導入が達成されることが示されている(Morsy, *J. Clin. Invest.* 92:1580-1586 (1993); Kirshenbaum, *J. Clin. Invest.* 92:381-387 (1993); Roessler, *J. Clin. Invest.* 92:1085-1092 (1993); Moullier, *Nature Genetics* 4:154-159 (1993); LaSalle, *Science* 259:988-990 (1993); Gomez-Foix, *J. Biol. Chem.* 267:25129-25134 (1992); Rich, *Human Gene Therapy* 4:461-476 (1993); Zabner, *Nature Genetics* 6:75-83 (1994); Guzman, *Circulation Research* 73:1201-1207 (1993); Bout, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994); Zabner, *Cell* 75:207-216 (1993); Caillaud, *Eur. J. Neuroscience* 5:1287-1291 (1993); および Ragot, *J. Gen. Virology* 74:501-507 (1993))。組換えアデノウイル

40

50

スは、特定の細胞表面受容体に結合することによって遺伝子導入を達成し、その後、ウイルスは、野生型または複製欠損型アデノウイルスと同様に、受容体介在性エンドサイトーシスによって内在化される (Chardonnet and Dales, *Virology* 40:462-477 (1970); Brown and Burlingham, *J. Virology* 12:386-396 (1973); Svensson and Persson, *J. Virology* 55:442-449 (1985); Seth, et al., *J. Virol.* 51:650-655 (1984); Seth, et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:1528-1533 (1984); Varga et al., *J. Virology* 65:6061-6070 (1991); Wickham et al., *Cell* 73:309-319 (1993))。

【0052】

別の種類のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) に基づくものである。この欠損型パルボウイルスは、多くの細胞種に感染でき、ヒトには非病原性である。AAV型ベクターは約4~5 kbを輸送することができ、野生型AAVは19番染色体に安定的に挿入することが知られている。AAV逆位末端配列 (ITR) またはその修飾は、感染性と部位特異的組込みを付与するが、細胞毒性はなく、プロモーターは細胞特異的発現を指示する。AAVベクターに関連する資料としての米国特許第6,261,834号明細書は、参照により本明細書に組み込まれる。肝細胞に *in vivo* で形質導入するためにAAVベクターを使用する方法は、当技術分野では公知である。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第9,981,048号明細書を参照されたい。

【0053】

ウイルスベクター、特にアデノウイルスベクターは、カチオン性両親媒性物質、例えば、カチオン性脂質、ポリ-L-リジン (PLL)、およびジエチルアミノエチルデキストラン (DELAE-デキストラン) などと複合体を形成することができ、標的細胞へのウイルス感染の効率が向上する (例えば、参照により本明細書に組み込まれる、1997年11月20日に出願されたPCT/US97/21496号を参照されたい)。AAVベクター、例えば、その開示が本明細書に組み込まれる、Zhong et al., *J. Genet Syndr Gene Therapy* 2012 Jan. 10; S1. pii: 008、米国特許第5,139,941号明細書、同第5,252,479号明細書および同第5,753,500号明細書、ならびにPCT出願公開の国際公開第97/09441号パンフレットに開示されているようなAAVベクターはまた、これらのベクターが宿主染色体に組み込まれて、ベクターを繰り返し投与する必要性が最小限となるため、有用である。遺伝子治療におけるウイルスベクターの概説については、McConnell et al., 2004, *Hum Gene Ther.* 15(11):1022-33; Mccarty et al., 2004, *Annu Rev Genet.* 38:819-45; Mah et al., 2002, *Clin. Pharmacokinet.* 41(12):901-11; Scott et al., 2002, *Neuromuscul. Disord.* 12(Suppl 1):S23-9を参照されたい。

【0054】

いくつかの実施形態では、ベクターはナノ粒子である。本明細書で使用されるナノ粒子は、核酸を送達するのに有用な任意のナノ粒子であり得る。本明細書で使用される場合の「ナノ粒子」という用語は、十分な数のナノ粒子が適用部位または治療部位への送達後に実質的に無傷のままであるように、そのような使用の環境による化学的および/または物理的破壊と生体適合性があり、十分に耐性があり、そのサイズがナノメートル範囲である、粒子または構造物を指す。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質様ナノ粒子を含む。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2016/187531号パンフレット、国際公開第2017/176974号パンフレット、国際公開第2019/027999号パンフレット、またはLi, B et al., *An Orthogonal array optimization of lipid-like nanoparticles for mRNA delivery in vivo.* *Nano Lett.* 2015, 15, 8099-8107を参照されたい。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質二重層またはリポソームを含み得る。いくつかの実施形態では、ベクターは、mRNA脂質ナノ粒子である。

【0055】

いくつかの実施形態では、開示したナノ粒子は、生物学的実体、例えば、標的細胞上の

特定の膜成分または細胞表面受容体（例えば、肝細胞への送達を促進する受容体もしくは肝細胞上の受容体）に効率的に結合され得るか、さもなければそれと会合し得る。例えば、開示したナノ粒子は、正常な肝細胞または罹患した肝細胞で発現される受容体（例えば、肝アジアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）もしくは低密度リポタンパク質（LDLR）受容体）に結合するリガンドを含むように操作することができる。

【0056】

いくつかの態様では、本明細書に開示されているナノ粒子は、肝細胞への核酸の送達を促進する補足成分を含み得る。ナノ粒子は、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、コレステロール、およびポリエチレングリコール（PEG）を含み得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、5A2-SC8、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、コレステロール、および/または1,2-ジミリスティル-rac-グリセロール-メトキシ（ポリ（エチレングリコール））、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、5A2-SC8、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、コレステロール、および1,2-ジミリスティル-rac-グリセロール-メトキシ（ポリ（エチレングリコール））をさらに含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン（DOTAP）をさらに含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子の5A2-SC8、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、コレステロール、および1,2-ジミリスティル-rac-グリセロール-メトキシ（ポリ（エチレングリコール））のモル比は、約15/15/30/3である。

10

20

【0057】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、DLin-MC3-DMA、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、コレステロール、および1,2-ジミリスティル-rac-グリセロール-メトキシ（ポリ（エチレングリコール））を含む。いくつかの実施形態では、DLin-MC3-DMA、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、コレステロール、および1,2-ジミリスティル-rac-グリセロール-メトキシ（ポリ（エチレングリコール））のモル比は、約50/10/38.5/1.5である。

【0058】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、C12-200、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、コレステロール、および1,2-ジミリスティル-rac-グリセロール-メトキシ（ポリ（エチレングリコール））を含む。いくつかの実施形態では、C12-200、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、コレステロール、および1,2-ジミリスティル-rac-グリセロール-メトキシ（ポリ（エチレングリコール））のモル比は、約35/16/46.5/2.5である。

30

【0059】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているナノ粒子は、5A2-SC8、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、コレステロール、1,2-ジミリスティル-rac-グリセロール-メトキシ（ポリ（エチレングリコール））、および1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン（DOTAP）を含む。ナノ粒子は、約0.1%~約30%mol/molのDOTAPを含んでいてもよい。例えば、ナノ粒子中に存在するDOTAPの量は、そのナノ粒子の約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%mol/mol、約0.7%mol/mol、約0.8%mol/mol、約0.9%mol/mol、約1%mol/mol、約2%mol/mol、約2.5%mol/mol、約3%mol/mol、約3.5%mol/mol、約4%mol/mol、約4.5%mol/mol、約5%mol/mol、約5.5%mol/mol、約6%mol/mol、約6.5%mol/mol、約7%mol/mol、約7.5%mol/mol、約8

40

50

% mol / mol、約 8.5 % mol / mol、約 9 % mol / mol、約 9.5 % mol / mol、約 10 % mol / mol、約 10.5 % mol / mol、約 11 % mol / mol、約 11.5 % mol / mol、約 12 % mol / mol、約 12.5 % mol / mol、約 13 % mol / mol、約 13.5 % mol / mol、約 14 % mol / mol、約 15 % mol / mol、約 16 % mol / mol、約 17 % mol / mol、約 18 % mol / mol、約 19 % mol / mol、約 20 % mol / mol、約 22 % mol / mol、約 24 % mol / mol、約 26 % mol / mol、約 28 % mol / mol、約 30 % mol / mol であり得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子中に存在する DOTAP の量は、そのナノ粒子の約 20 % mol / mol である。

【0060】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている肝臓特異的送達のためのナノ粒子および方法は、当技術分野において、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Cheng et al., *Nat Nanotechnol.* 2020 Apr; 15(4):313-320. Epub 2020 Apr 6; Trepotec et al., *Mol Ther.* 2019 Apr 10; 27(4):794-802. Epub 2018 Dec 22; Truong, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 Oct 15; 116(42):21150-21159. Epub 2019 Sep 9 で記載されているものである。

【0061】

さらなる実施形態では、本明細書に開示されているベクターは、ポリ(アミド-アミン)、ポリ-ベータアミノ-エステル(PBAE)、および/またはポリエチレンイミン(PEI)を含む。いくつかの実施形態では、ベクターはポリアクリジンPEGを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているベクターは、外側のPEGシェルとナノ粒子ベースのコアを含む。

【0062】

脂質ベースのナノ粒子は、治療用ペイロードを肝臓に正常に送達する。例えば、Witzigmann et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 2020 Jul, doi: 10.1016/j.addr.2020.06.026 を参照されたい。リポソームは、いくつかの異なる種類の脂質から調製することができる。しかし、リン脂質が、薬物担体として脂質ベースのナノ粒子を生成するのに最も一般的に使用される。本発明において使用するための脂質粒子は、リポソーム形成脂質およびリン脂質、ならびに膜活性ステロール(例えば、コレステロール)を含むように調製することができる。リポソームは、リポソーム形成脂質ではない他の脂質およびリン脂質を含むことができる。

【0063】

リン脂質は、例えば、レシチン(例えば、卵レシチンまたは大豆レシチン); ホスファチジルコリン(例えば、卵ホスファチジルコリン); 水素化ホスファチジルコリン; リゾホスファチジルコリン; ジパルミトイルホスファチジルコリン; ジステアロイルホスファチジルコリン; ジミリストイルホスファチジルコリン; ジラウロイルホスファチジルコリン; グリセロリン脂質(例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルイノシトールホスフェート、ホスファチジルイノシトールビスホスフェートおよびホスファチジルイノシトールトリホスフェート); スフィンゴミエリン; カルジオリピン; ホスファチジン酸; プラズマローゲン; またはそれらの混合物から選択することができる。それぞれの可能性は、本発明の個別の実施形態を表している。使用され得る他の脂質の例には、糖脂質(例えば、グリセロ糖脂質、例えば、ガラクト脂質およびスルホ脂質、スフィンゴ糖脂質、例えば、セレブロシド、グルコセレブロシドおよびガラクトセレブロシド、ならびにグリコシルホスファチジルイノシトール); リン脂質(例えば、セラミドホスホリルコリン、セラミドホスホリルエタノールアミンおよびセラミドホスホリルグリセロール); またはそれらの混合物が含まれる。それぞれの可能性は、本発明の個別の実施形態を表している。負または正に帯電した脂質ナノ粒子は、例えば、アニオン性またはカチオン性のリン脂質または脂質を使用することによって得ることができる。そのようなアニオン性/カチオン性のリン脂質または脂質は、典型的には

10

20

30

40

50

、ステロール、アシルまたはジアシル鎖などの親油性部分を有し、その脂質は全体的に正味の負電荷 / 正電荷を有する。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているナノ粒子は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の生体適合性および / または生分解性ポリマーを含む。例えば、考えられるナノ粒子は、生分解性ポリマーおよびポリエチレングリコールを含む1つまたは複数のブロックコポリマーを約10～約99重量パーセントと、生分解性ホモポリマーを約0～約50重量パーセントを含み得る。ポリマーには、例えば、生体安定性ポリマーおよび生分解性ポリマーの両方が含まれ、例えば、微結晶性セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレンオキシド (P E G) などの
10
ポリアルキレンオキシド、ポリ無水物、ポリ (エステル無水物) 、ポリヒドロキシ酸、例えばポリラクチド (P L A) 、ポリグリコリド (P G A) 、ポリ (ラクチド - c o - グリコリド) (P L G A) 、ポリ - 3 - ヒドロキシブチレート (P H B) およびそれらのコポリマー、ポリ - 4 - ヒドロキシブチレート (P 4 H B) およびそれらのコポリマー、ポリカプロラクトンおよびそれらのコポリマー、ならびにそれらの組合せが含まれ得る。

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、約1nm～約1000nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、例えば、約1000nm、約950nm、約900nm、約850nm、約800nm、約750nm、約700nm、約650nm、約600nm、約550nm、約500nm、約450nm、約400nm、約350nm、
20
約300nm、約290nm、約280nm、約270nm、約260nm、約250nm、約240nm、約230nm、約220nm、約210nm、約200nm、約190nm、約180nm、約170nm、約160nm、約150nm、約140nm、約130nm、約120nm、約110nm、約100nm、約90nm、約80nm、約70nm、約60nm、約50nm、約40nm、約30nm、約20nm、または約10nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、例えば、約20nm～約1000nm、約20nm～約800nm、約20nm～約700nm、約30nm～約600nm、約30nm～約500nm、約40nm～約400nm、約40nm～約300nm、約40nm～約250nm、約50nm～約250nm、約50nm～約200nm、約50nm～約150nm、約60nm～約150nm、約70nm～約1
30
50nm、約80nm～約150nm、約90nm～約150nm、約100nm～約150nm、約110nm～約150nm、約120nm～約150nm、約90nm～約140nm、約90nm～約130nm、約90nm～約120nm、100nm～約140nm、約100nm～約130nm、約100nm～約120nm、約100nm～約110nm、約110nm～約120nm、約110nm～約130nm、約110nm～約140nm、約90nm～約200nm、約100nm～約195nm、約110nm～約190nm、約120nm～約185nm、約130nm～約180nm、約140nm～約175nm、150nm～175nm、または約150nm～約170nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、約100nm～約250nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、約150nm～約175nmの直径
40
を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、約135nm～約175nmの直径を有する。粒子は任意の形状を有し得るが、一般的には球状である。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるベクターはエキソソームである。本明細書で使用される場合の「微小胞」および「エキソソーム」という用語は、約10nm～約5000nm、より典型的には30nm～1000nm、最も典型的には約50nm～750nmの直径 (または粒子が球状ではない場合には最大の寸法) を有する膜状粒子を指し、ここで、エキソソームの膜の少なくとも一部は、細胞から直接得られるものである。最も一般的には、エキソソームは、ドナー細胞の5%以下の大きさ (平均直径) を有する。したがって、特に考えられるエキソソームには、細胞から排出されるものが含まれる
50

。エキソソームを作製する方法は、当技術分野では公知である。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2018/0177727号明細書を参照されたい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを送達するためのエキソソームおよびその使用は、当技術分野で公知である。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第10,577,630号明細書を参照されたい。

【0067】

本明細書にはまた、RNA活性化(RNAa)を介して、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の発現または機能を増加させる組成物も含まれる。したがって、いくつかの実施形態では、この組成物は、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、およびPOM121Cの1つまたは複数

10

【0068】

「HNF4」は、本明細書では、ヒトにおいて、HNF4A遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、HNF4ポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである：HGNC：5024、Entrez Gene：3172、Ensembl：ENSG00000101076、OMIM：600281、UniProtKB：P41235。いくつかの実施形態では、HNF4ポリペプチドは、配列番号1の配列(HNF4アイソフォーム2)、または配列番号1と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号1の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号1のHNF4ポリペプチドは、成熟HNF4の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号1のHNF4ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、HNF4ポリペプチドは、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2014/0249209号明細書に記載されているものである。いくつかの実施形態では、HNF4ポリヌクレオチドは、配列番号31、配列番号32、配列番号33、もしくは配列番号34の配列、または配列番号31、配列番号32、配列番号33、もしくは配列番号34と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号31、配列番号32、配列番号33、もしくは配列番号34の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

20

30

【0069】

PROX1(プロスペロ関連ホメオボックス1)は、通常、肝臓器官形成中のマウスの内胚葉細胞で胚8.5日目(E8.5)に初めて発現される。成人の肝臓では、PROX1の役割は、肝細胞のエネルギー代謝を制御することであり得る。さらに重要なことには、Prox1は、そのホメオドメインを特定のDNAエレメントに直接結合することによって、遺伝子転写の活性化因子として機能し得ることが報告されている。「PROX1」は、本明細書では、ヒトにおいて、PROX1遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、PROX1ポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである：HGNC：9459、Entrez Gene：5629、Ensembl：ENSG00000117707、OMIM：601546、UniProtKB：Q92786。いくつかの実施形態では、PROX1ポリペプチドは、配列番号2の配列、または配列番号2と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号2の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号2のPROX1ポリペプチドは、成熟PROX1の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号2のPROX1ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、PROX1ポリヌクレオチドは、配列番号13の配列、または配列番号13と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約9

40

50

5%以上、もしくは約98%以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号13の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

【0070】

NR5A2 (核内受容体5A2; 肝臓受容体ホモログ-1; LRH-1) は、その標的遺伝子のプロモーターおよび制御領域内の特定の応答エレメントに単量体として結合する核内受容体である。NR5A2はまた、胆汁酸生成酵素、脂肪酸代謝、およびミトコンドリア機能をコードする遺伝子を正に制御することができる。「NR5A2」は、本明細書では、ヒトにおいて、NR5A2遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、NR5A2ポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである: HGNC: 7984、Entrez Gene: 2494、Ensembl: ENSG00000116833、OMIM: 604453、UniProtKB: O00482。いくつかの実施形態では、NR5A2ポリペプチドは、配列番号3の配列、または配列番号3と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の相同性を有するポリペプチド配列、または配列番号3の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号3のNR5A2ポリペプチドは、成熟NR5A2の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号3のNR5A2ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、NR5A2ポリヌクレオチドは、配列番号14、配列番号15、もしくは配列番号16の配列、または配列番号14、配列番号15、もしくは配列番号16と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号14、配列番号15、もしくは配列番号16の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

10

20

【0071】

NR0B2 (核内受容体スモールヘテロダイマーパートナー; SHP) は、通常、正常な肝細胞で高度に発現されており、胆汁酸、グルコース、脂質代謝の重要な転写制御因子として作用する。NR0B2のSUMO化は、核輸送と、胆汁酸のホメオスタシスの維持および肝毒性からの保護に重要な胆汁酸生合成のフィードバック阻害におけるSHPの遺伝子抑制機能に必要となり得る (Kim DH et al., 2016)。「NR0B2」は、本明細書では、ヒトにおいて、NR0B2遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、NR0B2ポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである: HGNC: 7961、Entrez Gene: 8431、Ensembl: ENSG00000131910、OMIM: 604630、UniProtKB: Q15466。いくつかの実施形態では、NR0B2ポリペプチドは、配列番号4の配列、または配列番号4と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の相同性を有するポリペプチド配列、または配列番号4の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号4のNR0B2ポリペプチドは、成熟NR0B2の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号4のNR0B2ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、NR0B2ポリヌクレオチドは、配列番号17の配列、または配列番号17と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号17の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

30

40

【0072】

MTF1 (金属応答性転写因子1) は、メタロチオネイン遺伝子の基礎転写および重金属誘導転写の両方を媒介でき、細胞ストレス応答および金属恒常性に関する他の遺伝子を制御することもできる。MTF1はまた、他の金属応答性遺伝子、例えば、亜鉛トランスポーター1の転写制御にも関与し得る。MTF1は、肝細胞において亜鉛のレベルを制御することができる。「MTF1」は、本明細書では、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーの自己リガンド受容体であり、ヒトにおいて、MTF1遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、MTF1ポリペプチドは、次

50

のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである：HGNC：7428、Entrez Gene：4520、Ensembl：ENSG00000188786、OMIM：600172、UniProtKB：Q14872。いくつかの実施形態では、MTF1ポリペプチドは、配列番号5の配列、または配列番号5と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号5の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号5のMTF1ポリペプチドは、成熟MTF1の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号5のMTF1ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、MTF1ポリヌクレオチドは、配列番号18の配列、または配列番号18と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号18の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

10

【0073】

SREBP1（ステロール制御因子エレメント結合タンパク質1）は、コレステロール、脂肪酸、およびトリグリセリドの生合成に参与する転写因子である。SREBP1は、AKT/P13Kシグナル伝達経路の発現および活性を制御することができ、またその逆も可能である（Shi Q et al., 2016; Porstmann T et al., 2008）。「SREBF1」は、本明細書では、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーの自己リガンド受容体であり、ヒトにおいて、SREBF1遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、SREBF1ポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである：HGNC：11289、Entrez Gene：6720、Ensembl：ENSG00000072310、OMIM：184756、UniProtKB：P36956。いくつかの実施形態では、SREBF1ポリペプチドは、配列番号6の配列、または配列番号6と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号6の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号6のMTF1ポリペプチドは、成熟SREBF1の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号6のSREBF1ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、SREBP1ポリヌクレオチドは、配列番号19、配列番号20、もしくは配列番号21の配列、または配列番号19、配列番号20、もしくは配列番号21と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号19、配列番号20、もしくは配列番号21の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

20

30

【0074】

EP300（ヒストンアセチルトランスフェラーゼp300）EP300は、C/EBPタンパク質と複合体を形成し、脂肪肝の発症時のトリグリセリド合成、グルコース代謝、および肝臓において高度に発現されるいくつかの転写因子、例えばFoxo1およびファルネソイドX受容体（FXR）の制御に参与する遺伝子のプロモーターを活性化することができる。「EP300」は、本明細書では、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーの自己リガンド受容体であり、ヒトにおいて、EP300遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、EP300ポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである：HGNC：3373、Entrez Gene：2033、Ensembl：ENSG00000100393、OMIM：602700、UniProtKB：Q09472。いくつかの実施形態では、EP300ポリペプチドは、配列番号7の配列、または配列番号7と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号7の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号7のEP300ポリペプチドは、成熟EP300の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号7のEP300ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、EP300ポリヌクレオ

40

50

チドは、配列番号 22 もしくは配列番号 23 の配列、または配列番号 22 もしくは配列番号 23 と約 80% 以上、約 85% 以上、約 90% 以上、約 95% 以上、もしくは約 98% 以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号 22 もしくは配列番号 23 の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

【0075】

POM121C (核膜孔膜タンパク質 POM121) は、核膜孔の生合成に関与すると考えられている、孔膜タンパク質と呼ばれるタンパク質群のメンバーである膜タンパク質である。「POM121C」は、本明細書では、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーの自己リガンド受容体であり、ヒトにおいて、POM121C 遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、POM121C ポリペプチドは、次のような 1 つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである：HGNC: 34005、Entrez Gene: 100101267、Ensembl: ENSG00000272391、OMIM: 615754、UniProtKB: A8CG34。いくつかの実施形態では、POM121C ポリペプチドは、配列番号 8 の配列、または配列番号 8 と約 80% 以上、約 85% 以上、約 90% 以上、約 95% 以上、もしくは約 98% 以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号 8 の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号 8 の POM121C ポリペプチドは、成熟 POM121C の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号 8 の POM121C ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、POM121C ポリヌクレオチドは、配列番号 24 の配列、または配列番号 24 と約 80% 以上、約 85% 以上、約 90% 以上、約 95% 以上、もしくは約 98% 以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号 24 の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

10

20

【0076】

本明細書ではまた、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、および PERK からなる群から選択される 1 つまたは複数の転写因子の量を減少させるか、またはその機能を抑制する組成物も開示されている。したがって、本明細書には、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、および PERK ポリヌクレオチドと関連および/または作用する、低分子活性化 RNA (saRNA)、例えば、低分子干渉 RNA (siRNA) およびマイクロ RNA (miRNA)、または CRISPR RNA、例えば crisgRNA もしくは tracr/mate RNA を含む組成物が含まれる。タンパク質の機能を低下または抑制するために saRNA を使用する方法は、当技術分野において公知である。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第 2019/048632 号パンフレットを参照されたい。したがって、本明細書には、saRNA を使用して HNF4 の発現を増加させて、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、および PERK からなる群から選択される 1 つまたは複数の転写因子の量を減少させるか、またはその機能を抑制する方法が含まれる。いくつかの実施形態では、組成物は、DNAJB1/HSP40 の量を減少させるか、またはその機能を抑制する核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、ATF6 の量を減少させるか、またはその機能を抑制する核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、ATF4 の量を減少させるか、またはその機能を抑制する核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、PERK の量を減少させるか、またはその機能を抑制する核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、HNF4 をコードする核酸をさらに含む。

30

40

【0077】

DNAJB1/HSP40 (ヒートショックタンパク質 40) は、遺伝子発現および翻訳開始、フォールディングおよびアンフォールディング、ならびにタンパク質の移行および分解に不可欠な役割を果たし得る分子シャペロンタンパク質である。DNAJ/HSP40 の活性は、いくつかの翻訳後修飾により制御される。多くの場合、DNAJ/HSP40 はリン酸化タンパク質であり (例えば、DnaJA1、DnaJB4、DnaJC1、DnaJC29)、その発現および機能は、それぞれ、アセチル化 (例えば、DnaJ

50

A 1、DnaJB2、DnaJB12、DnaJC5、DnaJC8、DnaJC13)、グリコシル化(DnaJB11、DnaJC10、DnaJC16)、パルミトイル化(DnaJC5、DnaJC5B、DnaJC5G)、メチル化(DnaJA1~4)、プレニル化(DnaJA1、DnaJA2、DnaJA4)、および分子内ジスルフィド結合(DnaJB11、DnaJC3、DnaJC10)の形成によって、さらに同時翻訳修飾および翻訳後修飾され得る。「DNAJB1/HSP40」は、本明細書では、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーの自己リガンド受容体であり、ヒトにおいて、DNAJB1遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、DNAJB1ポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである：HGNC：5270、Entrez Gene：3337、Ensembl：ENSG00000132002、OMIM：604572、UniProtKB：P25685。いくつかの実施形態では、DNAJB1ポリペプチドは、配列番号9の配列、または配列番号9と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号9の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号9のDNAJB1ポリペプチドは、成熟DNAJB1の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号9のDNAJB1ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、DNAJB1ポリヌクレオチドは、配列番号25もしくは配列番号26の配列、または配列番号25もしくは配列番号26と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号25もしくは配列番号26の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

【0078】

ATF6は、小胞体ストレス応答(折りたたみ不全タンパク質応答(unfolded protein response)、UPR)のセンサーであり、転写発現を制御するように機能する。いくつかの場合では、小胞体ストレスの際に、ATF6は小胞体(ER)からゴルジ体へと輸送され、そこでタンパク質分解により切断されて、タンパク質のフォールディングおよび輸送に関わる遺伝子の転写因子であるN末端ATF6セグメントを遊離することが明らかになっている。「ATF6」は、本明細書では、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーの自己リガンド受容体であり、ヒトにおいて、ATF6遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、ATF6ポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである：HGNC：791、Entrez Gene：22926、Ensembl：ENSG00000118217、OMIM：605537、UniProtKB：P18850。いくつかの実施形態では、ATF6ポリペプチドは、配列番号10の配列、または配列番号10と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号10の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号10のATF6ポリペプチドは、成熟ATF6の未熟型または前処理型を表していてもよく、したがって、本明細書には、配列番号10のATF6ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、ATF6ポリヌクレオチドは、配列番号27の配列、または配列番号27と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号27の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

【0079】

ATF4は、アミノ酸代謝および酸化ストレス耐性に関わる遺伝子の転写発現を増強する役割を果たし得るUPR標的遺伝子の転写活性化因子である(Fusakio ME et al., 2016)。「ATF4」は、本明細書では、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーの自己リガンド受容体であり、ヒトにおいて、ATF4遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、ATF4ポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである：HGNC

: 786、Entrez Gene: 468、Ensembl: ENSG00000128272、OMIM: 604064、UniProtKB: P18848。いくつかの実施形態では、ATF4ポリペプチドは、配列番号11の配列、または配列番号11と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号11の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号11のATF4ポリペプチドは、成熟ATF4の未熟型または前処理型を表してもよく、したがって、本明細書には、配列番号11のATF4ポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、ATF4ポリヌクレオチドは、配列番号28の配列、または配列番号28と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号28の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

10

【0080】

PERK(プロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ)は、典型的には、PERKから離れたシャペロンの動員により活性化されて、サイトソルキナーゼドメインのオリゴマー化および活性化をもたらす1型膜貫通タンパク質である。PERKおよびATF4の下流でアポトーシス促進性シグナル伝達を媒介する重要なタンパク質はCCAATエンハンサー結合タンパク質(C/EBP)相同タンパク質(CHOP)であり、これは肝疾患の進行に關与している(Malhi H et al., 2011)。「PERK」はまた、「EIF2AK3」としても知られており、本明細書では、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーの自己リガンド受容体であり、ヒトにおいて、EIF2AK3遺伝子によってコードされているポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、PERKポリペプチドは、次のような1つまたは複数の公的に利用可能なデータベースにおいて同定されるものである: NC: 3255、Entrez Gene: 9451、Ensembl: ENSG00000172071、OMIM: 604032、UniProtKB: Q9NZJ5。いくつかの実施形態では、PERKポリペプチドは、配列番号12の配列、または配列番号12と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリペプチド配列、または配列番号12の一部を含むポリペプチドを含む。配列番号12のPERKポリペプチドは、成熟PERKの未熟型または前処理型を表してもよく、本明細書には、配列番号12のPERKポリペプチドの成熟部分または処理部分が含まれる。いくつかの実施形態では、PERKまたはEIF2AK3ポリヌクレオチドは、配列番号29もしくは配列番号30の配列、または配列番号29もしくは配列番号30と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列、または配列番号29もしくは配列番号30の一部を含むポリヌクレオチドを含む。

20

30

【0081】

任意の先行する態様の組成物は、HNF4アゴニストをさらに含んでもよく、HNF4アゴニストは、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2014/0249209号明細書中に、より完全に記載されているそれらの組成物を指すことを意味する。

【0082】

いくつかの実施形態では、任意の先行する態様の組成物および/またはベクターは、生物学的に許容される担体を用いて製剤化することができる。いくつかの実施形態では、生物学的に許容される担体は、組成物および/またはベクターを宿主細胞内および/または宿主細胞間に導入することができる。いくつかの実施形態では、生物学的に許容される担体は、組成物および/またはベクターを、対象の肝臓の肝細胞などの標的細胞内および/または標的細胞間に導入することができる。重要なことには、いくつかの実施形態では、組成物および/またはベクターは、生物学的に許容される担体と一緒に、機能性高分子、例えばDNAおよびRNAを標的細胞(例えば、肝細胞)の核に輸送することができる。

40

【0083】

治療の方法

50

本明細書では、転写因子である HNF 4 の対象における肝細胞の核への発現および / または輸送および / または保持を増加させることによって肝疾患を治療する方法が提供されている。いくつかの実施形態では、この方法は、PROX 1、NR5A2、NR0B2、MTF 1、SREBP 1、EP300、および POM121C からなる群から選択される 1 つまたは複数の転写因子の発現または機能をアップレギュレートすること、ならびに / あるいは DNAJB 1 / HSP 40、ATF 6、ATF 4、および PERK からなる群から選択される 1 つまたは複数の転写因子の発現または機能をダウンレギュレートすることを含む。いくつかの態様では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療する方法であって、対象にベクターを投与することを含み、ベクターが、PROX 1、NR5A2、NR0B2、MTF 1、SREBP 1、EP300、および / または POM121C、ならびにその機能的断片からなる群から選択される 1 つまたは複数の転写因子をコードする核酸を含む、方法が開示されている。いくつかの態様では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療する方法であって、対象に DNAJB 1 / HSP 40、ATF 6、ATF 4 および PERK からなる群から選択される 1 つまたは複数の転写因子の発現または機能をダウンレギュレートする組成物を投与することを含む方法が開示されている。いくつかの態様では、この組成物は、siRNA、miRNA、sgRNA または tracr / mate RNA を含む。他の実施形態では、この方法は、Lys 106 での HNF 4 のアセチル化を増加させること、cMET の発現を増加させること、および / または Thr 308 でのリン酸化を介した AKT の活性化を増加させることを含む。

10

20

【0084】

いくつかの実施形態では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療する方法であって、対象にベクターを投与することを含み、ベクターが、PROX 1 をコードする核酸を含む、方法が開示されている。いくつかの実施形態では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療する方法であって、対象にベクターを投与することを含み、ベクターが、SREBP 1 をコードする核酸を含む、方法が開示されている。いくつかの実施形態では、ベクターは、HNF 4 をコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、HNF 4、PROX 1、および SREBP 1 をコードする 1 つまたは複数の核酸を含む。いくつかの実施形態では、この方法は、HNF 4 をコードする核酸を含むベクターを投与することをさらに含む。

30

【0085】

上述のように、PROX 1、NR5A2、NR0B2、MTF 1、SREBP 1、EP300、および POM121C はすべて、例えば、HNF 4 のアセチル化、細胞代謝経路、または核膜孔複合体の形成を含めた、直接的または間接的な機序を介して、HNF 4 核輸送を制御する転写因子および / または制御因子である。HNF 4 に対するこのような作用は、肝疾患を有する患者の肝細胞機能を回復させることができる。

【0086】

したがって、いくつかの実施形態では、1 つまたは複数のベクターの投与は、対象における肝細胞の核の HNF 4 の量を増加させる。いくつかの実施形態では、ベクター（複数可）の投与は、肝細胞の HNF 4 の総量を増加させない。いくつかの実施形態では、ベクター（複数可）の投与は、肝細胞の HNF 4 の総量を増加させる。いくつかの実施形態では、任意の先行する態様のベクターは、HNF 4 をコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているベクターは、HNF 4 アイソフォーム 2 ポリペプチドをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、HNF 4 アイソフォーム 2 ポリペプチドは、配列番号 1 と少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、もしくは約 98% 同一の配列またはその断片を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 31 と少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、または約 98% 同一であるか、またはその断片である。

40

【0087】

したがって、いくつかの態様では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾

50

患を治療する方法であって、HNF4 アイソフォーム2をコードする核酸を含むベクターを対象に投与することを含む方法が開示されている。また本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療するための医薬を調製するための組成物の使用であって、対象に組成物を投与することを含み、組成物が、HNF4 アイソフォーム2をコードする核酸を含む、使用も含まれる。

【0088】

この方法で使用されるベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、ウイルス粒子（単離されたもの、弱毒化されたもの、組換え体など）、エキソソーム、細胞外小胞および/またはナノ粒子を含む、本明細書に記載のいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、ベクターはプラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターはウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、ベクターは、天然のおよび/または操作されたキャプシドを有するウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターはエキソソームである。いくつかの実施形態では、ベクターはナノ粒子である。いくつかの実施形態では、ベクターは、mRNA脂質ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、核酸は、DNA（例えば、閉鎖型DNA（closed-ended DNA、ceDNA）またはRNAである。ceDNAおよびceDNAを作製および使用する方法は、当技術分野において公知である。例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公報の国際公開第2019/169233号パンフレットおよび国際公開第2017/152149号パンフレットを参照されたい。方法、材料、送達ナノ粒子、ならびに量および処方などに関するそれらの製造および使用を含む、ナノ粒子、その成分、およびそのような成分の送達に関する一般的な情報に関しては、すべてが本発明の実施に有用であり、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429, 1987、米国特許出願公開第2011/0274706号明細書および国際公開第2018/170405号パンフレットに言及されている。

【0089】

いくつかの態様では、本明細書では、それを必要とする対象における肝疾患を治療する方法であって、対象に組成物を投与することを含み、組成物が、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERKからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量を減少させるか、またはその機能を抑制する、方法が開示されている。

【0090】

上述のように、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERKは、すべて小胞体（ER）ストレスの転写調節因子である。ERは、タンパク質の適切なフォールディング、修飾、および輸送にとって重要な真核細胞の膜性オルガネラの一種である。タンパク質をフォールディングするERの能力が飽和した場合に発生するERストレスは、細胞死および炎症などの反応を引き起こし得る。これらの転写制御因子は、ERストレスに関連する経路を介して、HNF4 核輸送を制御する。本明細書では、これらの転写制御因子の1つまたは複数の量を減少させるか、またはその機能を抑制することが、肝疾患を有する患者における肝細胞の機能を回復させ得ることが示されている。したがって、いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対象における肝細胞の核のHNF4 の量を増加させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、肝細胞のHNF4 の総量を増加させない。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、肝細胞のHNF4 の総量を増加させる。いくつかの実施形態では、組成物は、HNF4 をコードする核酸をさらに含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、組成物は、これらの遺伝子のノックダウンによって、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、および/またはPERKからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量を減少させる。DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、および/またはPERKのノックダウンは、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、および/またはPERKをコードするmRNA、あるいはDNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、および/またはPERK活性に必要な酵素をコ

10

20

30

40

50

ードする mRNA などの、関連 mRNA の相補的 RNA 分子により認識され、RNA 干渉により媒介されることによってもたらされ得る。例えば、干渉 RNA (RNAi) をコードする分子は、トランスフェクションまたは形質導入などの方法を介して、適切なベクター、例えば、レンチウイルス、レトロウイルスベクター、またはナノ粒子によって肝細胞または肝細胞前駆体に導入され得る。

【0092】

いくつかの実施形態では、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、および/または PERK からなる群から選択される1つまたは複数の転写因子をノックアウトするためのいずれか1つまたは複数のCRISPR複合体成分は、本明細書に開示されているウイルス粒子、ビリオンまたはウイルスベクターとともに、またはその中に入れて投与することができる。いくつかの実施形態では、sgRNAまたはtracr/mate RNAは、1つまたは複数のリプログラミング因子とともにパッケージ化することができる。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子、ビリオン、またはウイルスベクターによってカプセル化されたsgRNA分子は、1つまたは複数のリプログラミング因子とともにパッケージ化され得る。方法、材料、送達ビヒクル、ベクター、粒子、AAV、ならびに量および処方などに関するそれらの製造および使用を含む、CRISPR Casシステム、その成分、およびそのような成分の送達に関する一般的な情報に関しては、すべてが本発明の実施に有用であり、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2018/0057839号明細書に言及されている。

【0093】

上述のように、本明細書で使用される場合の「肝疾患」は、一般に、肝臓に影響を及ぼす疾患、障害、および状態を指し、例えば、肝細胞の脂肪の単純蓄積(脂肪症)、大滴性脂肪変性、門脈周囲および小葉の炎症(脂肪性肝炎)、肝硬変、繊維症、肝虚血、肝細胞がんを含む肝がん、初期病期の肝疾患、末期の肝疾患、および肝不全を包含する広範囲の重症度を有し得る。したがって、脂肪症、大滴性脂肪変性、脂肪性肝炎、肝硬変、線維症、肝がん、肝細胞がん、末期肝疾患、慢性肝疾患、および肝不全はそれぞれ「肝疾患」の定義に含まれる。「肝硬変」の程度または重症度は、チャイルド・ピュースコアによって指定することができ、その分類では、5種の臨床項目である総ビリルビン、血清アルブミン、プロトロンビン時間延長、腹水、および肝性脳症のレベルが、各臨床項目の様々なレベルに対応して1点、2点、および3点の値の点数方式を使用して点数化され、各項目の最も厳しいレベルには3点の値が割り当てられる。5種のすべての項目の合計点数を加算することにより、チャイルド・ピュースコアおよび分類に到達する。5~6点はチャイルド・ピューのクラスAに指定し、7~9点はチャイルド・ピューのクラスBに指定し、10~15点はチャイルド・ピューのクラスCに指定する。一般に、チャイルド・ピューのクラスAは最も低い重症度の肝疾患を示し、チャイルド・ピューのクラスCは最も高い重症度の肝疾患を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法は、チャイルド・ピューのクラスB肝疾患またはチャイルド・ピューのクラスBC肝疾患を有する対象を治療するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法は、チャイルド・ピューのクラスA肝疾患を有する対象を治療するために使用することができる。いくつかの実施形態では、肝疾患はアルコール性肝炎である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法は、虚血性ドナー肝臓をex vivo灌流で治療するために使用することができる。本発明は、肝切除前または肝切除後を含む、がん治療前またはがん治療後の肝がんを治療するために使用することができる。初期病期の肝疾患は、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、限定するものではないが脂肪性肝、アルコール性肝炎、およびアルコール関連肝硬変を含めたアルコール関連肝疾患であり得ると理解されたく、また本明細書では企図されているものとする。本明細書に開示されている末期肝疾患は、例えば、ウイルス性、アルコール性、非アルコール性、および特発性(cryptogenic)を含む、当技術分野において公知のすべての原因に起因し得ることも理解されたい。

【0094】

したがって、本明細書に開示されている方法は、任意の先行する態様の肝疾患を有する対象における肝機能を改善するために使用され得る。そのような肝機能の改善は、例えば、血清アルブミンの増加、血清アンモニアレベルの低下、総ビリルビンの減少、脳症スコアの上昇、および/またはプロトロンビン時間延長の減少によって示すことができる。したがって、本明細書に開示されている方法は、血清アルブミンレベルを増加させ、血清アンモニアレベルを低下させ、総ビリルビンレベルを低下させ、脳症スコアを上昇させ、および/またはプロトロンビン時間延長を減少させるために使用され得る。

【0095】

肝疾患は、炎症、線維症、肝硬変、末期肝疾患、および肝がんを含む、複数のステージで進行し得る。肝炎ウイルスによる慢性感染、アルコール媒介性肝硬変、および/または非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を含む慢性肝疾患には様々な原因があることが知られているはずである。肝疾患の時期は予測できないことが多いため、肝疾患を治療、予防、軽減、および/または抑制する開示された方法は、炎症、線維症、肝硬変、末期肝疾患、および/または肝がんの発症前または発症後に使用でき、さらには肝炎ウイルス感染、アルコール媒介性肝硬変、および/または非アルコール性脂肪性肝炎の前または最中であっても使用でき、肝疾患のいずれかのステージの治療、予防、抑制、および/または緩和のために使用できることを理解されたい。開示された方法は、炎症、線維症、肝硬変、末期肝疾患、および/または肝がんの発症前であればいつでも実施することができる。一態様では、開示された方法は、炎症、線維症、肝硬変、末期肝疾患、および/または肝がんの発症の60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1年前；12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1か月前；30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、または3日前；60、48、36、30、24、18、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、または2時間前に使用することができるか；あるいは、炎症、線維症、肝硬変、末期肝疾患、および/または肝がんの発症の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、90、105、120分後；3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18、24、30、36、48、60時間後；3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、45、60、90日、またはそれ以上の後；4、5、6、7、8、9、10、11、12か月、またはそれ以上の後；60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1年後に使用することができる。

【0096】

肝切除は、肝疾患（例えば、肝硬変、末期肝疾患、および/または肝がん）を有する対象の肝臓の全部または一部の外科的除去である。開示された方法は、肝切除前または切除後のいつでも対象に実施することができる。一態様では、開示された方法は、肝切除の手術の5、4、3、2、または1年前；12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1か月前；30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4または3日前；60、48、36、30、24、18、15、12、10、9、8、7、6、5、4または2時間前に使用することができるか；あるいは、肝切除の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45

、50、55、60、75、90、105、120分後；3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18、24、30、36、48、60時間後；3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、45、60、90日、またはそれ以上の後；4、5、6、7、8、9、10、11、12か月またはそれ以上の後；60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1年後に使用することができる。

10

【0097】

本明細書に記載のベクターまたは組成物は、経口、局所、静脈内、皮下、経皮(transcutaneous)、経皮吸収(transdermal)、筋肉内、関節内、非経口、動脈内、皮内、脳室内、頭蓋内、腹腔内、病巣内、鼻腔内、直腸内、腔内を含む任意の経路によって、吸入により、または埋め込みリザーバーを介して、対象に投与することができる。「非経口」という用語には、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑膜内、胸骨内、髄腔内、肝臓内、病巣内、および頭蓋内の注射または注入の技術が含まれる。いくつかの実施形態では、ベクターまたは組成物の投与は静脈内投与である。

【0098】

本開示の別の態様は、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、および/またはPOM121C、ならびにその機能的断片からなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量または機能を増加させる上記の組成物と、DNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4、およびPERKからなる群から選択される1つまたは複数の転写因子の量を減少させるか、またはその機能を抑制する組成物の両方を投与することに関する。いくつかの実施形態では、両方の組成物は同時に投与される。他の実施形態では、一方の組成物が他方の組成物の前に投与される。いくつかの実施形態では、任意の先行する態様の方法は、HNF4の発現または機能をアップレギュレートすることをさらに含む。いくつかの実施形態では、任意の先行する態様の方法は、HNF4アゴニストをさらに投与することを含み、この用語は、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2014/0249209号明細書中

20

30

【0099】

任意の先行する態様のベクターまたは組成物の投与頻度には、限定するものではないが、少なくとも毎年1回、2年毎に1回、3年毎に1回、4年毎に1回、5年毎に1回、6年毎に1回、7年毎に1回、8年毎に1回、9年毎に1回、10年毎に1回、少なくとも2か月毎に1回、3か月毎に1回、4か月毎に1回、5か月毎に1回、6か月毎に1回、7か月毎に1回、8か月毎に1回、9か月毎に1回、10か月毎に1回、11か月毎に1回、少なくとも毎月1回、3週間毎に1回、2週間毎に1回、週1回、週2回、週3回、週4回、週5回、週6回、または毎日が含まれる。投与はまた継続的であってもよく、化合物のレベルを任意の所望する指定した範囲内に維持するように調整することができる。任意の先行する態様のベクターおよび/または組成物を使用して肝疾患を治療するために本明細書で使用される「投与」または「投与する」という用語には、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2018/0057839号明細書中

40

【実施例】

【0100】

以下の実施例は、開示された主題に従って組成物、方法、および結果を例示するために以下に記載される。これらの実施例は、本明細書で開示される主題のすべての態様を含むことを意図するのではなく、代表的な方法および結果を例示することを意図する。これらの実施例は、当業者に明白な本発明の均等物およびバリエーションを排除することは意図し

50

ない。

【 0 1 0 1 】

[実施例 1]

方法および材料。

ヒト試料および肝細胞単離。非特定化された正常ヒト肝臓組織および/または細胞を、書面によるインフォームドコンセントを得た後に、Liver Tissue Cell Distribution System (Pittsburgh, PA) を介して、NIH 契約番号 HSN276201200017C により資金援助されたピッツバーグ大学の Human Research Review Committee によって承認されたプロトコルによって得た。成体ヒト肝臓組織および/または細胞も、ピッツバーグ大学の Human Research Review Committee および Institutional Review Board (識別子の除去は免除される; IRB 番号: PRO12090466) によって承認されたプロトコルによって、UPMC の小児病院の Ira J Fox Laboratory から得た (表 1)。肝細胞を、以前に記載された通りの 3 工程のコラゲナーゼ消化技術を使用して単離した (Gramignoli R et al., 2012)。単離後に、以前に記載された通りにトリパンプルー排除を使用して細胞生存率を評価し、生存率 > 80% の細胞のみの調製物を分析に使用した。

【 0 1 0 2 】

【表 1】

表 1.この研究における患者の臨床パラメーター

病因/コード、n	年齢(年)	性別(M,F)	総ビリルビン(mg/dL)	アルブミン(g/dL)	MELD	チャイルドピュー
健康な肝臓 4	64±13	2,2	—	—	—	—
NASH, 5	60±10	2,3	1.76±0.6	2.9±0.1	12.4±6.1	9.4±0.9
NASH 1	71	0,1	1.7	3.0	8	9(B)
NASH 2	68	0,1	1.7	2.9	8	9(B)
NASH 3	53	1,0	1.1	2.8	8	9(B)
NASH 4	59	1,0	1.6	2.8	21	11(C)
NASH 5	48	0,1	2.7	3.0	17	9(B)
アルコール 2	55±5	3,0	2.03±1.0	2.53±0.6	14.0±2.6	10.0±1.0
アルコール 1	52	1,0	1.5	1.9	16	11(C)
アルコール 2	61	1,0	1.4	3.2	11	9(B)

【 0 1 0 3 】

インシリコの HNF 4 翻訳後修飾 (PTM) 分析。HNF 4 細胞局在性をモジュールする PTM を同定するために、データベースおよび刊行物でのコンピューター検索を介してインシリコ分析を実行した (図 5)。プロセスを、3 つの相、すなわち同定、スクリーニング、および選択に分けた。最初に、51 種の PTM を同定した。次に、スクリーニング相中、2 つの除外基準の適用によって 23 種の PTM を選択した (図 5)。選択相で、評価することが可能な HNF 4 局在に関して最も信頼性のある PTM として、2 つのリン酸化および 1 つのアセチル化修飾を同定した。

【 0 1 0 4 】

ガスクロマトグラフィー - 質量分析を使用した安定同位体分析。100 万個のヒト肝細胞を、ダルベッコ改変イーグル培地 F12 を用いて、13 - C6 標識グルコースおよびグルタミン同位体トレーサーの存在下で、96 時間培養した (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)。培地を除去し、細胞を氷冷したリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。次に、細胞を、1 μL のノルバリンを含有する 400 μL のメタノールおよび 400 μL の水でクエンチし、掻き取り、800 μL の氷冷したクロロホルムで洗浄し、4 で 30 分ボルテックス混合し、7, 300 rpm で、4 10 分遠心分離した。上の水性相を代謝物分析のために収集した。代謝物抽出物を、14, 000 g で 10 分遠心分離して、極性相、タンパク質中間相、およびクロロホルム相を分離し

た。極性代謝物を含有する水/メタノール相を新しいマイクロ遠沈管に移し、Speed Vac中で乾燥させ、ガスクロマトグラフィー-質量分析(GC-MS)分析まで-80で貯蔵した。次いで、30 μ Lのメトキシアミン塩酸塩(Thermo Scientific)を乾燥させた試料に添加し、間欠的にボルテックス混合しながら30で2時間インキュベートした。合計45 μ LのMBTSTFA+1%のtert-ブチルジメチルクロロシランを試料に添加し、55で1時間インキュベートした。誘導体化された試料を、ガラスインサートを用いてガスクロマトグラフィー(GC)バイアルに移し、GC-MSオートサンプラーに添加した。GC-MS分析を、Agilent 5977B質量分析計に接続された30mのHP-5MSUIキャピラリーカラムを備えたAgilent 7890GC(Santa Clara, CA)を使用して実行した。極性代謝物のために、以下のGCオープンのための加熱サイクルを使用した: 100で3分、それに続いて5/分の一定割合で300に昇温し、300で48分の総ランタイムを保持する。スキャンモードでデータを獲得した。代謝物の相対的な存在量を、各代謝物断片につきすべての標識された可能性があるイオンの統合したシグナルから計算した。モデルでの分析の前に、同位体置換体の質量分布を、IsoCorrectorを使用して天然の存在量に合わせて補正した。代謝物レベルを内部標準であるノルバルリンのシグナルに正規化した。濃縮の分数計算は、基質から中間代謝物への ^{13}C の寄与率の分数を表す。これは以下のように計算される:

10

【0105】

【数1】

20

$$MPE = \left(\sum_{i=0}^{N_C} i \cdot x_i \right) / N_C$$

式中、 N_C は、 ^{13}C として標識可能な炭素の数であり、 x_i は、 $(M+i)$ 番目の同位体置換体の分数である。

【0106】

免疫組織化学およびHNF4の定量化。パラフィン包埋肝臓組織のパラフィンをキシレンを用いて除き、エタノールで水分を除いた。クエン酸緩衝液、pH6.0中で沸騰させることによって抗原の脱マスクングを実行した。次いでスライドを3%過酸化水素中でインキュベートし、正常動物血清でブロッキングし、その後、4で一晩そのまま一次抗体と共にインキュベートした。表2に、使用された一次抗体を列挙する。次いで組織切片を一次抗体の動物種に対応するビオチン化二次抗体(BA-1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA)と共にインキュベートし、3,3'-ジアミノベンジジン(SK-4105; Vector Laboratories)に曝露して、ペルオキシダーゼ活性を可視化した。対比染色を、Richard-Allan Scientific Signatureシリーズのヘマトキシリン(Thermo Scientific, Waltham, MA)を用いて実行した。定量化のために、核および細胞質のHNF4の免疫反応性を、独立して、2人の肝臓病理医によって、3つの強拡大視野で試料1つ当たり計数された1,000個の肝細胞を用いて格付けした。これらの分析に、正常な肝臓($n=2$)、チャイルド・ピューB($n=4$)、およびチャイルド・ピューC($n=2$)が組み入れられた。チャイルド・ピューBおよびCは、硬変したヒト肝臓として群分けされ、結果は、計数された細胞の総数に対するパーセンテージとして表される。

30

40

【0107】

50

【表 2】

表 2

抗体/標的	種	免疫組織化学 希釈率	ウェスタンブロット 希釈率	会社/ カタログ番号
HNF4α	マウス	1:200	1:1000	Abcam/Ab41898
アセチル- HNF4α(Lys106)	ウサギ	-	1:500	Cusabio/CSB- PA727840
cMET	ウサギ	1:200	1:1000	Cell Signaling/8198T
総 AKT	ウサギ	-	1:1000	Cell Signaling/ 4691S
ホスホ-AKT(Ser473)	ウサギ	1:50	1:1000	Cell Signaling/4060S
ホスホ-AKT(Thr308)	ウサギ	1:100	1:1000	Cell Signaling/9275S
総 AMPKα	ウサギ	-	1:1000	Cell Signaling/5831S
ホスホ-AMPKα(Thr172)	ウサギ	1:100	1:1000	Cell Signaling/2535S
総 EGFR	ウサギ	-	1:1000	Cell Signaling/ 4267S
ホスホ-EGFR(Y1086)	ウサギ	-	1:1000	Cell Signaling/2220S
ホスホ-H3(Ser10)	ウサギ	1:200	1:1000	Cell Signaling/9701S
カスパーゼ 3 活性型	ウサギ	1:100	1:500	Abcam/Ab32042
HDAC1	ウサギ	-	1:100	Cell Signaling/2062
ヒストン H3	マウス	-	1:100	Santa
B-アクチン	ウサギ	-	1:2000	Cruz/SC517576 Cell Signaling/4970S

10

20

【0108】

タンパク質抽出およびウェスタンブロッティング。タンパク質発現分析を実行するために、単離した肝細胞を、2つの画分に分け、一方の画分を、これまでに記載された標準的手順に従って総タンパク質抽出に使用し (Bell AW et al., 2006)、他方の画分を核タンパク質単離に使用した。核タンパク質単離のために、患者1人当たり 1×10^7 から 5×10^7 個の間の単離した肝細胞を洗浄し、 40 mmol/L のトリス (pH 7.6)、 14 mmol/L の NaCl、および 1 mmol/L の EDTA 中に回収し、次いで遠心分離した (5分、 100 g)。細胞ペレットを、 2 mL の低張性緩衝液 [プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル (Sigma, St. Louis, MO) を含む、 10 mmol/L の HEPES (pH 7.9)、 10 mmol/L の NaH_2PO_4 、 1.5 mmol/L の MgCl_2 、 1 mmol/L の DTT、 0.5 mmol/L のスベルミジン、および 1 mol/L の NaF] に懸濁した。氷上で10分インキュベートした後、ダウンス型ホモジナイザー中で試料をホモジナイズし、次いで遠心分離した (5分、 800 g)。細胞溶解物を、トリパンブルー染色を用いてモニターした。上清を、細胞質内抽出物として保存した。核ペレットを同じ緩衝液で追加で2回洗浄した。

30

【0109】

核タンパク質を、 $50 \sim 100 \mu\text{L}$ の高張性緩衝液 [プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル (Sigma, St. Louis, MO) を含む、 30 mmol/L の HEPES (pH 7.9)、25%グリセロール、 450 mmol/L の NaCl、 12 mmol/L の MgCl_2 、 1 mmol/L の DTT、および 0.1 mmol/L の EDTA] に、4で45分、連続的にかき混ぜながら抽出した。抽出物を $30,000 \text{ g}$ で遠心分離し、上清を収集し、 150 mmol/L の NaCl を含有すること以外は同じ溶液に対して2時間透析した。タンパク質濃度を、ピシンコニン酸アッセイ (Sigma, St. Louis, MO) によって決定した。

40

【0110】

ウェスタンブロット分析を標準的手順に従って実行した (Natarajan A et al., 200

50

7)。各タンパク質バンドの強度を、National Institutes of HealthのImage Jソフトウェアを使用して定量化した。上記に示した表2に、一次抗体およびその希釈率を列挙する。

【0111】

RNAシーケンシングおよび分析。全ゲノム鎖特異的なRNA配列(RNA-seq)を使用して、単離したヒト初代肝細胞からのRNA発現レベルをプロファイリングした。RNA配列ライブラリーを、すでに述べられた通りに(Hainer SJ et al., Genes Dev.2015)、さらに文献で述べられた通りに(Kumar R et al., 2012)調製した。RNAを、TRIzolを使用して腸細胞から抽出し、続いて製造元の指示に従ってカラムで精製した(Zymo RNAクリーンおよびコンセントレーターカラム)。全RNAから、rRNAを、これまでに記載された通りに、プールしたアンチセンスオリゴハイブリダイゼーションおよびRNアーゼH消化を介した枯濁を使用して枯濁させた(Morlan JD et al., 2012; Adiconis X et al., 2013)。Zymo RNAクリーンおよびコンセントレーターカラム上で精製した後、第1の鎖のcDNAを合成した。その後、第2の鎖のcDNAを合成し、精製し、断片化した。RNA配列ライブラリーを、Illumina技術を使用して調製した。簡単に言えば、末端修復、A-テリング、およびバーコード化したアダプターのライゲーション、それに続いてPCR増幅およびサイズ選択である。ライブラリーの完全性を、各ライブラリーからの約10断片の、qubit定量化、断片分析器の粒度分布評価、およびサンガーシーケンシングによって確認した。ライブラリーを、ペアエンドIlluminaシーケンシングを使用してシーケンシングした。

10

20

【0112】

ペアエンドリードを、QIAGENのCLC Genomics workbenchを使用してhg38にアライメントし、TPM(transcript per million)として評価した。データをソーティングするために、K平均法クラスタリングをCluster 3.0(De Hoon MJ et al., 2004)を使用して実行し、Java TreeView(Saldanha AJ, 2004)を使用してヒートマップを作成した。ミスマッチ(Murphy SL et al., 2015)、インサクションコスト(insertion cost)(Goldman L et al., 2016)、およびデリションコスト(deletion cost)(Goldman L et al., 2016)のデフォルト設定を使用した。Ingenuityパスウェイ解析(IPA)を使用して、差次的に発現される遺伝子を同定し、下流の作用を予測し、標的(QIAGEN Bioinformatics; www.qiagen.com/ingenuity)を同定した。IPA内の調節作用分析を使用して、上流調節因子と生物学的機能との関係を同定した。分析においてデフォルト設定を使用した(すなわち、上流調節因子を遺伝子、RNA、およびタンパク質に限定した)。RNA配列データは、Gene Expression Omnibusで入手可能である(受託番号www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE134422)。

30

【0113】

正常ヒト肝細胞におけるAKT阻害。正常ヒト肝細胞(細胞100万個/ウェル)を、コラーゲンでコーティングされたウェル上で培養した。細胞を、増殖因子または血清の非存在下で6時間培養した。次いで細胞を、AKT阻害剤である5μMのMK-2206(Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan)で24時間処理した。総タンパク質、細胞質タンパク質および核タンパク質を、上述したようにウェスタンブロットングのために抽出した。

40

【0114】

統計的分析。データを、平均±SDとして表した。2つの統計群のウェスタンブロットからの結果を、マン・ホイットニーのノンパラメトリック検定によって評価し、3つの統計群の結果を、クラスカル・ウォリスのノンパラメトリック検定によって評価した。群間の比較を、ダンの多重比較試験によって実行した。分析したタンパク質間の関連を、スピアマンの順位相関試験を使用して評価した。線形回帰を使用して、タンパク質発現と、チ

50

ヤイルド・ピュースコアおよびMELDスコアとして測定された臨床ステータスとの関係を説明した。統計を、Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) を使用して実行した。P < 0.05の場合、差を有意とみなした。

【0115】

ウェスタンブロットによって分析したタンパク質間の直接の依存性を同定するために、パス解析(構造的な方程式モデル)を使用した。パス解析モデルは、従属変数と複数の独立変数との間で観察された相関の間での可能性のある原因となる関連を説明するという目的を有する。パスモデルを試験し、調査フレームワークならびに回帰重みおよびモデルフィッティングの結果に基づいて、パスを追加および除去することによって改変した。結果は、研究システムに対する変数の直接および間接的な作用を示す線図としてプロットされる。変数間の相関の程度および直線的な関係は、P < 0.05および重要性のレベルを示す任意の係数(数字が大きいほど、より大きい関係を表す)によって決定される。パス解析を、InfoStatバージョン2013 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cordoba, Cordoba, Argentina) を使用して実行した。

【0116】

教師なし多変量主成分分析(PCA)をウェスタンブロットデータに適用して、試料の臨床状態を区別するタンパク質の群を解明した。分散のほとんどを説明する主成分(PC)の散乱プロットを描画した。PCA分析に、統計ソフトウェアJMPバージョン14 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用した。

【0117】

[実施例2]

HNF4 の核内局在は、末期肝不全を有するヒト肝臓で減少するが、細胞質内局在は増加する

HNF4 は転写因子として機能し、核内局在は活性に必要である(Babeu JP et al., 2014; Chellappa K et al., 2012; Guo H, 2014; Hong YH et al., 2003; Lu H et al., 2016, Song Y et al., 2015; Soutoglou E et al., 2000; Sun K et al., 2007; Yokoyama A et al., 2011; Zhou W et al., 2012; Bell AW et al., 2006; Kritis AA et al., 1996; Tanaka T et al., 2006; Walesky C et al., 2015)。それゆえに、罹患した肝臓検体からの肝細胞での免疫組織化学およびウェスタンブロットを実行して、HNF4 の局在を決定し、発現と肝臓の非代償性との相関を示した。終末期肝不全を有する肝臓からの肝細胞の約78%が、HNF4 の細胞質内みの発現または細胞質内発現および弱い核内発現を示したが、それに対して正常ヒト肝臓は、肝細胞の75%がHNF4 の強い核内局在を示した。単離した肝細胞からの総HNF4 タンパク質発現は、ウェスタンブロットによって評価したところ、末期肝臓と正常な対照との間にいかなる統計学的差異も示さなかった(P = 0.166; 図1A)。この結果は驚くことではなかった。その理由は、機能的な非代償性の程度に基づいて、変性疾患を有する患者および対照からの肝臓中でのHNF4 発現における差を見極める能力は、患者の大きいコホートの研究を必要とするからである(Guzman-Lepe J et al., 2018)。しかしながら、この研究において、HNF4 のに基づき統計学的に有意な差が観察された。HNF4 は、正常な対照から単離した肝細胞と比較して、機能的に非代償性の肝臓から単離した肝細胞の細胞質で高いレベルで検出され(P = 0.023; 図1B)、核で低いレベルで検出された(P = 0.023; 図1C)。

【0118】

HNF4 の機能および安定性が多数の翻訳後修飾剤によってレギュレートされるため(Chellappa K et al., 2012; Guo H, 2014; Hong YH et al., 2003; Lu H et al., 2016、Song Y et al., 2015; Soutoglou E et al., 2000; Sun K et al., 2007; Yokoyama A et al., 2011; Zhou W et al., 2012)、さらに、その核内局在がその活性にとって重要であるため、インシリコ分析を実行して、どの修飾剤がHN

10

20

30

40

50

F4 局在をレギュレートするかを評価した。AMPK の活性化がHNF4 の転写を制御することが見出された (Hong YH et al., 2003)。加えて、HNF4 のアセチル化は、AKT 経路によって媒介でき、これが分子を安定化させ、その核内での保持に好ましい (Soutoglou E et al., 2000) (図5)。

【0119】

[実施例3]

HNF4 は進行性肝疾患におけるヒト肝細胞の機能の主要な調節因子である。

次に、正常な対照からのヒト肝細胞 (n = 4) と、肝硬変および終末期肝不全を有する患者から回収したものの (n = 4) (チャイルド・ピューC) との間の遺伝子発現の差を比較するための評価を実行して、研究をNASHおよびアルコール媒介性ラエンネック肝硬変を有する患者に限定した。RNA配列データの階層的クラスタリングから、肝硬変および肝機能障害に関連する3つの主要な動的パターン、K平均法クラスタリングのヒートマップでの計算値 (対照に対する $\log_2 FC$; $K = 3$) が解明された。対照ヒト肝細胞と比べて終末期肝不全を有する患者からの肝細胞において中程度から高度にアップレギュレートされた遺伝子の代表例として、クラスターI (3478種の遺伝子) およびIII (1669種の遺伝子) が示された。これらのクラスターにおけるほとんどの遺伝子が自食作用およびアポトーシスのシグナル伝達に関連していた (データは示されない)。

10

【0120】

しかしながら、クラスターIIIは、末期肝細胞において有意にダウンレギュレートされた1669種の遺伝子からなり、セリン - スレオニンプロテインキナーゼ (AKT1)、シトクロムP450 (シトクロムP450 [CYP] c8、CYP2c9、CYP2e1、CYP3A4)、および肝細胞核内因子 (HNF4、フォークヘッドボックスa1 [FOXa1]) をコードする遺伝子を含んでいた。このクラスターに提示される上の経路は、ファルネソイドX受容体/レチノイドX受容体 (RXR) および肝臓X受容体/RXR活性化、ミトコンドリア機能障害、酸化リン酸化、およびRXR機能の阻害を含んでいた。これらのダウンレギュレートされた遺伝子におけるパスウェイ解析は、HNF4 が中心的な上流調節因子であったことを示し、ヒートマップは、NASHおよびアルコール媒介性ラエンネック肝硬変を有する患者からの肝細胞の遺伝子発現プロファイルにおける多くの類似性を確認した (データは示されない)。これらの結果は、終末期不全を有する硬変した肝臓から回収されたラット肝細胞の遺伝子発現プロファイルとほぼ同一であった (Liu L et al., 2012)。

20

30

【0121】

[実施例4]

cMETおよびAKTリン酸化は末期肝不全を有する患者からのヒト肝細胞においてHNF4 の核内局在と相関する

EGFRおよびcMETは、HNF4 の重要なモジュレーターとしてインシリコおよびRNA配列分析で同定されたAMPKおよびAKT経路をレギュレートすることが示されるため (Komposch K et al., 2015; Paranjpe S et al., 2016; Tsagianni A et al., 2018)、肝臓検体におけるこれらの分子のための抗体ベースのアッセイを実行した。非代償性肝臓検体におけるcMET発現は、免疫組織化学とウェスタンブロットの両方によって測定したところ、単離した対照ヒト肝細胞と比較して著しく低減した ($P = 0.023$; 図2Aおよび2B)。正常な肝臓検体と罹患した肝臓検体との間で、EGFR発現における有意差はなかった (図2Aおよび2B)。しかしながら、EGFRの活性型であるホスホ - EGFR (Y1086) は、正常ヒト肝細胞と比較して、非代償性疾患を有する患者からの罹患した肝臓由来の肝細胞で高度に発現された (図6Aおよび6B)。加えて、細胞死および肝細胞複製の連続的なサイクルは、肝硬変の顕著な特徴であるので (Tsochatzis EA et al., 2014)、この観察が終末期肝不全を有する患者からの肝細胞において確認されて、免疫組織化学およびウェスタンブロットを使用して、末期肝細胞において、[ホスホ - H3 (Ser10)] および細胞死 (活性カスパーゼ3) の再現性あるマーカー発現が実証された。

40

50

【0122】

機能的に非代償性の肝臓からの肝細胞において、cMETはAMPK およびAKTを制御することができ、cMETは有意にダウンレギュレートされることから、AMPK およびAKTに関する活性化プロセスを分析した。総AMPK、活性化AMPK (Thr172) およびその比率は、非代償性の機能を有する肝細胞と正常ヒト肝細胞とで統計学的に異なっていなかった(図2Aおよび2B)。しかしながら、総AKT、活性化AKT (Thr308)、およびその比率は、非代償性肝機能を有する患者からの肝臓検体および単離された肝細胞において有意に減少した(図2Aおよび2B)。別のAKTリン酸化部位(Ser473)は、正常な対照または非代償性検体からの単離された肝臓検体または肝細胞において不変であった(図2AおよびB)。

10

【0123】

HNF4、その核内局在、および翻訳後修飾間の関係をさらに分析するために、スピアマンの順位相関試験を実行した。cMET発現は、総HNF4 ($r = 0.76$; $P = 0.021$; 図2C) および核のHNF4 ($r = 0.71$; $P = 0.037$; 図2C) と正の統計学的に有意な相関を示した。活性化AKT (Thr308) も、総HNF4 ($r = 0.73$; $P = 0.031$; 図2C) および核のHNF4 ($r = 0.82$; $P = 0.011$; 図2C) と正の統計学的に有意な相関を示し、それに対して細胞質のHNF4 は、cMET ($r = -0.80$; $P = 0.014$; 図2C) および活性化AKT (Thr308) ($r = -0.77$; $P = 0.021$; 図2C) と負の相関を示した。加えて、ホスホ-AKT (Thr308) / 総AKTの比率は、cMET ($r = 0.80$; $P = 0.014$; 図6A) および総AKT ($r = 0.71$; $P = 0.037$; 図6A) と正に相関した。したがって、低減したcMETは、AKT経路の低減した活性化、核における低減したHNF4、および細胞質におけるHNF4 のより高い発現に関連していた。

20

【0124】

[実施例5]

HNF4の核内局在はcMET/AKT軸の影響を受け、肝機能障害の程度と相関する。図3Aでわかるように、パスウェイ解析は、cMET発現と核のHNF4発現との間の有意な因果関係(0.56 ; $P = 0.004$) および核のHNF4のレベルと活性化AKT (Thr308) / 総AKTの比率との間の直接的な関係(0.05 ; $P = 0.006$) を明らかにした。モデリングもまた、総HNF4発現レベルが核内局在に寄与することを実証した(0.60 ; $P = 0.042$)。しかしながら、cMET発現は総HNF4発現と負の関連を示したことから(-0.37 ; $P = 0.024$) (図3A)、cMET発現が、総HNF4発現に直接影響しないが、その核内局在にだけ影響することが示される。核内発現のレベルが肝機能障害の程度(チャイルド・ピュースコア)と相関するかどうかを評価するために、線形回帰分析を実行したところ、核のHNF4発現レベルがチャイルド・ピュースコアと有意な逆の関係を有することを示した($R^2 = 0.80$; $P = 0.007$) (図3B)。まとめると、これらのタンパク質の発現のパスウェイおよび線形回帰統計分析は、HNF4局在が、肝疾患進行に関連すること、およびcMET発現およびAKTリン酸化が、肝細胞HNF4の核内局在および機能を維持することにおいて中心的な役割を果たすことを示す。

30

40

【0125】

次に、主成分分析(PCA)を実行して、HNF4翻訳後修飾剤関連の分子を評価し、分子のパターンが末期肝細胞における肝機能(チャイルド・ピュースコア)と相関するかどうかを描画した(図3Cおよび3D)。図3Cで示されるように、PC1(69.9%) およびPC2(30.1%)は、研究される単離された肝細胞において、肝機能のレベル(チャイルド・ピュースコア)における変動の100%を識別する。正常ヒト肝細胞を特徴付けたベクトルは、cMETおよび活性化AKT (Thr308) / 総AKTの比率、総HNF4、および核のHNF4であったが、それに対して不全のヒト肝細胞を特徴付けた負の特徴は、細胞質のHNF4 および活性カスパーゼ3発現であった(図3Cおよび3D)。まとめると、この統計的分析は、終末期肝不全を有するヒト肝細胞の分

50

子プロファイリングを確認し、cMET、活性化AKT(Thr308)、ならびに総および核のHNF4の発現の間の原因となる関係を確立する。

【0126】

[実施例6]

核内でのHNF4の保持は、末期肝不全を有する患者において減少したアセチル化を介して低減される。

AKTの標的の1つは、CREB結合タンパク質の活性化である(Dekker FJ et al., 2009)。CREB結合タンパク質は、ヌクレオソームヒストンにおける固有のアセチル化活性を有し、これは、転写因子のヌクレオソームDNAへの接近を増加し、したがって核中での転写因子の転写および保持を活性化することが周知である。したがって、この軸は、HNF4の核内保持に関連する可能性がある(Soutoglou E et al., 2000)。ゲノム全体的なトランスクリプトーム分析およびインシリコ分析により、cMET/AKTキナーゼ軸経路は、CREB結合タンパク質の活性化を介してHNF4の局在および安定性を制御できることが示されたことから(Kumar R et al., 2012)、アセチル化HNF4の核発現を測定し(図4A~4C)、核中のHNF4アセチル化が、正常な対照と比較して、終末期肝不全を有する患者からの肝細胞において有意に低減されることを見出した($P = 0.024$; 図4A)。さらにHNF4のアセチル化が肝機能障害の程度(チャイルド・ピュースコア)に関連することを確認するために、線形回帰分析を実行して、アセチル化HNF4における減少は、肝機能障害と直接かつ有意に相関することを示した($R^2 = 0.71$; $P = 0.004$; 図4C)。原理の証明として、HNF4の核内局在における活性化AKT(Thr308)の役割を確認するために、AKTシグナル伝達を阻害することによって、新たに単離した正常ヒト肝細胞で予備実験を実行した。新たに単離した正常ヒト肝細胞を、有力なアロステリック汎AKT阻害剤であるMK-2206で処理した。AKT阻害処理の24時間後、未処理対照と比較して、活性化AKT(Thr308)の80%、核のHNF4の25%、およびアセチル化された核のHNF4の発現の14%が低減した。

10

20

【0127】

[実施例7]

核内でのHNF4の保持は複数のシグナル伝達分子によってレギュレートされ、末期肝不全と有意な負の関連を示す。

HNF4は、肝機能のマスター調節因子である(Babeu JP et al., 2014; Chellappa K et al., 2012; Guo H et al., 2014; Lu H et al., 2016、Song Y et al., 2015; Soutoglou E et al., 2000; Sun K et al., 2007; Xu Z et al., 2007; Zhou W et al., 2012; Bell AW et al., 2006)。HNF4発現における変更は、肝疾患を、複数の病因、例えばがん、B型およびC型肝炎、アルコール媒介性肝硬変、およびNASHと関連付けられている(Babeu JP et al., 2014; Chellappa K et al., 2012; Guo H et al., 2014; Lu H et al., 2016、Song Y et al., 2015; Soutoglou E et al., 2000; Sun K et al., 2007; Xu Z et al., 2007; Zhou W et al., 2012; Bell AW et al., 2006)。TLFを有する動物モデルにおいて、HNF4発現における強い低減が同定され、遺伝子治療を使用してHNF4の生産を回復させることによって、肝臓細胞をリブートして正常に機能させる(Nishikawa T et al., 2014)。この観察がヒトに適用されるかどうかを評価するために、非代償性肝機能を有する患者の大きいコホートの肝臓における肝臓に豊富な転写因子の発現に対する研究を行った(Guzman-Lepe J et al., 2018)。HNF4のmRNAレベルがダウンレギュレートされ、チャイルド・ピュー分類に基づく肝機能障害の程度と相関することが見出された。これらの研究におけるHNF4の核内局在は一貫性がなかった(Guzman-Lepe J et al., 2018)。

30

40

【0128】

ヒト肝細胞を、NASHによって引き起こされる肝硬変および末期(チャイルド・ピューB、C)肝不全ならびにアルコール媒介性ラエンネック肝硬変を有する患者の外植され

50

た肝臓から単離した。これらの単離された肝細胞において、正常な対照肝細胞で見られるものと比較して、細胞質に局在されたHNF4は増加し、核におけるHNF4は減少した。加えて、ヒトの不全な硬変した肝細胞における細胞質または核へのHNF4の局在は、肝細胞の機能障害の程度と相関していた。これらのデータは、HNF4の核輸送または保持をレギュレートする経路は、終末期肝不全の治療のための標的であり得ることを示す。

【0129】

AMPKおよびAKTキナーゼは、HNF4の局在をレギュレートできる主要な構成要素である(Hong YH et al., 2003; Song Y et al., 2015; Soutoglou E et al., 2000)。AMPKは、エネルギーホメオスタシスを維持すること、アデノシン三リン酸(ATP)生産経路を促進すること、およびATP消費を低減することにおいて中心的な役割を果たし(Woods A et al., 2017)、一方でAKT活性化は、細胞の増殖、生存、および成長を促進する(Manning BD et al., 2017; Morales-Ruiz M et al., 2017)。AKT活性化は、スレオニン308および/またはセリン473でのリン酸化によって媒介される(Praveen P et al., 2016; Inoue J et al., 2017)。末期ヒト肝細胞において活性化AKT(Thr308)レベルが有意に減少したことから、活性化AKT(Thr308)とHNF4局在化との間の有意な相関を示すことが本明細書で開示される。これらの発見は、Thr308におけるAKTリン酸化が、肝疾患の終末期における肝細胞の不全において重要な役割を果たす可能性があることを示す。

【0130】

cMETおよびEGFRについての分析を行った。これら2つの中心的な受容体は、AKTおよびAMPKの上流調節因子であり、肝臓の機能および再生に関連する(Natarajan A et al., 2007; Komposch K et al., 2015; Paranjpe S et al., 2016; Tsagianni A et al., 2018; Alam A et al., 2017)。マウスにおけるcMETおよびEGFRの破壊の組合せは、肝臓のホメオスタシスを変更し、終末期肝不全をもたらす(Tsagianni A et al., 2018)。ヒトの不全の硬変した肝細胞において、低減したcMETの発現、およびHNF4局在と直接相関する減少した発現がみられた。対照的に、ヒトの不全の硬変した肝細胞または対照ヒト肝細胞のいずれにおいても総EGFR発現の差はなかった。したがって、ヒト肝臓において、cMETは、AKTの経路活性化ならびにHNF4の局在および機能をレギュレートするのに重要な役割を果たし得る。さらに、異なる統計分析(スピアマンの順位相関試験、パスウェイ解析、線形回帰分析および主成分分析)を使用することは、ヒトの不全の硬変したおよび正常な肝細胞で分析された翻訳後修飾剤の間の関連の確立を可能にする。これらの統計分析は、cMETおよび活性化AKT(Thr308)が核のHNF4の発現レベルと直接関連することを明らかにした。cMETタンパク質発現と総HNF4との間に見出された負の関連は、cMET発現が総HNF4発現に直接影響しないが、その核内局在にだけ影響することを示す。

【0131】

HNF4のアセチル化は、ヒトの不全の硬変した肝細胞における活性化AKT(Thr308)の低い発現レベルと、ヌクレオソームのDNAに結合する転写因子を増加させる固有のアセチル化活性を有する分子であるCREB結合タンパク質へのAKTの直接的な作用とに基づいて、硬変した不全の肝細胞において影響を受け得る。実際に、核のHNF4のアセチル化は、印象的なことに、硬変した肝臓からのヒト肝細胞で低減し、そのレベルは肝機能障害の程度と関連していた。これらの観察は、スレオニン308におけるAKTリン酸化は、CREB結合タンパク質を制御することによって、アセチル化を介してHNF4の核内保持を媒介することを示す(Soutoglou E et al., 2000)。

【0132】

まとめると、細胞質におけるHNF4の局在は、肝疾患の進行期の間核内でのHNF4を維持する分子経路の変更から生じる。cMETおよび活性化AKT(Thr308)は、ダウンレギュレートされ、HNF4のアセチル化および核内保持に影響を与える。これらのデータは、HNF4の核への局在を介した慢性肝疾患における肝細胞機能

の回復を示す。

【0133】

[実施例8]

転写因子のレンチウイルス(LV)構築物での初代ヒト肝細胞の形質導入。

転写因子LVでの初代ヒト肝細胞の形質導入。肝細胞は、肝細胞の脱分化を防止するために二重のコラーゲン(厚い層)系で培養される。それに続き、コラーゲンサンドイッチプロトコールが使用される。以下を調製する：WARM:dPBS、HMM(基礎+Single Quots)、HCM(HBM基礎+HCM Single Quots)；氷上：緑色蛍光タンパク質(GFP)LV*、転写因子(TF)LV*、Max Enhancer、TransDux；その他：1.5mLのチューブ、50mLのチューブ、チップ、ピペット。

10

【0134】

1. ウェル当たり5e5個の肝細胞を厚い層のコラーゲン上にプレーティングし、細胞をそのまま4時間附着させる。

【0135】

2. 温dPBSでウェルを2回洗浄して、死細胞を除去し、培地を500uLのHMM(FBSなし)で交換する。

【0136】

3. 5つのチューブを調製し、以下の通りラベルする：a. GFP LV - 2；b. GFP LV - 10；c. TF LV - 0；d. TF LV - 2；e. TF LV - 10。

20

【0137】

4. HMM/Max Enhancer/TransDux(HMT)溶液を、50mLのチューブ：12.323mLのHMM+3.100mLのMax Enhancer+77.5uLのTransDuxで調製する。

【0138】

5. LV溶液を、予めラベルしたチューブ：a. GFP LV - 2：618.3uLのHMM+1.7uLのGFP LV；b. GFP LV - 10：611.6uLのHMM+8.4uLのGFP LV；c. TF LV - 0：620uLのHMMのみ；d. TF LV - 2：618.6uLのHMM+1.44uLのTF LV；e. TF LV - 10：612.82uLのHMM+7.18uLのTF LVで調製する。

30

【0139】

6. ウェル中のHMM培地を500uLのHMT溶液で交換する。

【0140】

7. 100uLの各LV溶液をウェルに分配する。プレートを回転させて混合する。

【0141】

8. 次の日、温dPBSでウェルを2回洗浄して、死細胞と残存するLV溶液を除去する。

【0142】

9. 細胞に厚いコラーゲンを重ね、コラーゲンをそのまま2時間ゲル化させる。

【0143】

10. 500uLのHCMをウェルに添加し、新鮮なHCMで毎日交換する。

40

【0144】

11. 形質導入後72および96時間で試料を得る(72時間におけるプロトコールを参照)。

【0145】

12. 96時間で試料を得るために、温めたdPBSで細胞を洗浄し、培地を500uLのHCM(FBSなし)で交換する。

【0146】

注釈：*水浴中、37℃で、LVを迅速に融解させる。フードに移し、回転、倒置、または穏やかなボルテックス混合によって混合し、氷上で維持する。使用しないLVはアリ

50

コートにし、 -80°C で再凍結する。再凍結ごとにウイルス活性の $10\sim 20\%$ が失われる。

【0147】

転写因子(TF)LV構築物。

TF LV構築物は、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300、POM121CもしくはHNF4 をコードするポリヌクレオチド、またはDNAJB1/HSP40、ATF6、ATF4もしくはPERKに対応するRNAiをコードするポリヌクレオチド含有するレンチウイルスベクター(Systems Bioscience、カタログ番号CS970S-1)である。

【0148】

ELISAのために馴化培地を収集する(72および96時間)。各群につき2つのウェルから1200uLの馴化培地を収集し、1.5mLのチューブに移す。収集した培地を温めたHMMで交換する。馴化培地を、 $20,000\times g$ で2分遠心分離する。上清を新しいチューブに移し、 -20°C で貯蔵する。

【0149】

GFP発現および明視野の写真を撮り、トランスフェクション効率を決定する(72および96時間)。浮遊する細胞を温めたdPBSで洗浄する。温めたHCMで交換する。GFP発現にはフィルター2(グリーン励起)および明視野にはフィルター6を使用して写真を撮る。

【0150】

RNA抽出のためのQiazol中に細胞溶解産物を収集する(72および96時間)。温dPBSで細胞を2回洗浄する。600uLのQiazolでウェルをコーティングし、1分インキュベートする。P1000を使用してプレートから細胞を掻き取り、1.5mLのチューブに移す。RNA単離まで -20°C で貯蔵する。

【0151】

IFのためにウェルを固定する(72時間)。温dPBSで細胞を2回洗浄する。750uLの4%PFA溶液でウェルをコーティングし、40分インキュベートする。ウェルを、1mLのdPBSで3回、洗浄ごとに10分洗浄する。1mLのdPBSを添加する。HNF4Aについて染色するまで4 で貯蔵する。

【0152】

ウェスタンブロットのために細胞溶解産物を収集する(72および96時間)。以下を含有する氷冷した溶解溶液を調製する：

【0153】

【表3】

	1mL	2mL	3mL
a. NP40細胞溶解緩衝液 - 90%	900uL	1800uL	2700uL
b. Complete(1タブ/1.5mL) - 6%	60uL	120uL	180uL
c. Haltプロテアーゼ阻害剤 - 2%	20uL	40uL	60uL
d. エタノール中の0.1M PMSF - 2%	20uL	40uL	60uL

【0154】

細胞を温dPBSで2回洗浄する。200uLの氷冷した溶解溶液でウェルをコーティングし、ウォークイン型の冷蔵庫中で揺らしながら30分インキュベートする。ラバーポリスマンを使用して細胞を剥がし、沈殿物および固形物を含む溶解産物を収集し、予めラベルしたチューブに移す。 $20,000\times g$ で、4 10分回転させる。上清をきれいな予めラベルした1.5mLのチューブに移す。 -80°C の冷凍庫で溶解産物を貯蔵する。

【0155】

TF免疫蛍光共染色(厚いコラーゲンサンドイッチ層を有する12ウェルプレートの場合

10

20

30

40

50

合)。試料を、細胞の剥離を防止するために穏やかに吸引する。試料をそのまま乾燥させない。*最大速度で5分遠沈させる。*二次抗体は、実験に応じて他の好適な抗体で置き換えることができる。

【0156】

固定(細胞がすでに固定されている場合、ブロッキングおよび透過化工程に移行する)。試料を、pH7.4のPBS中の4%パラホルムアルデヒドを用いて、室温で40分固定する。試料を氷冷PBSで3回、各洗浄につき10分洗浄する。染色に進むか、または染色まで4で貯蔵する(最大2週)。

【0157】

ブロッキングおよび透過化。試料を、1mLのPBSで2回洗浄する。試料を、1mLの洗浄緩衝液(PBS、0.1%BSA、および0.1%Tween)で3回、各洗浄につき10分洗浄する。試料を、1mLのブロッキング緩衝液(PBS、10%正常口バ血清、1%BSA、0.1%Tween、および0.1%Triton X-100)と共に2時間インキュベートすることによってブロッキングおよび透過化する。

【0158】

抗体のインキュベーション:マウス抗TFストック1°Abをボルテックス混合および遠沈する*。1:500のマウス抗TF1°Ab希釈物をブロッキング緩衝液中で調製する。600μLの希釈した1°Abで試料をコーティングし、加湿したチャンバー中で、室温で6時間または4で一晩インキュベートする。1°Ab溶液を吸引し、細胞を洗浄緩衝液で3回、各洗浄につき10分洗浄する。ロバ抗マウスIgG-AF594(Invitrogen A21203)をボルテックス混合および遠沈する*。1:250の希釈した2°Abをブロッキング緩衝液中で調製する。600μLの希釈した2°Abで試料をコーティングし、加湿したチャンバー中で、室温で2時間インキュベートする。2°Ab溶液を吸引し、細胞を洗浄緩衝液で3回、各洗浄につき10分洗浄する。

【0159】

対比染色およびマウント:試料をPBSで3回洗浄する。細胞を、暗所で、PBS中の1mLの1μg/mlヘキスト33342中で、2分インキュベートする。試料をPBSで3回洗浄する。試料は、暗所で、4で貯蔵してもよい。REDチャンネルを使用してTFを試験する。

【0160】

[実施例9]

転写因子(TF)mRNA(50、100、500ng)での初代ヒト肝細胞のトランスフェクション

初代ヒト肝細胞のトランスフェクション。以下:温めておくもの:DPBS、HMM(HMM基礎培地+HMM Single Quots)、Opti-MEM RT;氷上:リポフェクトアミンメッセンジャーMax RT、mRNA RT;その他:1.5mLのチューブ、50mLのチューブ、チップ、ピペットを調製する。

【0161】

1.細胞を温DPBSで洗浄し、培地を500μLのHMM(FBSなし)で交換する。

【0162】

2.以下のようにラベルした2セットのチューブを調製する:a.GFP-50。b.GFP-100。c.GFP-500。d.TF-0。e.TF-50。f.TF-100。g.TF-500。TFは、PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SRBP1、EP300、POM121CおよびHNF4から選択される。

【0163】

3.第2の希釈したmRNAを、Opti-MEMで調製する:a.DilGFP:32.5μLのOptiMEM+3.61μLのGFP mRNA。b.DilHNF:40.3μLのOptiMEM+4.47μLのTF mRNA。

【0164】

10

20

30

40

50

4. 第1のセットの予めラベルしたチューブ中に、mRNA - OptiMEMミックスを調製する：a. GFP - 50 : 312 . 2 uLのOpti - MEM + 2 . 8 uLのDil GFP。b. GFP - 100 : 309 . 4 uLのOpti - MEM + 5 . 6 uLのDil GFP。c. GFP - 500 : 287 . 3 uLのOpti - MEM + 27 . 7 uLのDil GFP。d. HNF - 0 : 315 uLのOpti - MEM。e. TF - 50 : 311 . 5 uLのOpti - MEM + 3 . 5 uLのDil TF。f. TF - 100 : 308 . 1 uLのOpti - MEM + 6 . 9 uLのDil TF。g. TF - 500 : 280 . 7 uLのOpti - MEM + 34 . 3 uLのDil TF。

【0165】

5. 希釈したLipoミックスを調製する：a. 2 , 220 . 75 uLのOpti - MEM + 141 . 75 uLのLipo。 10

【0166】

6. 希釈したLipoミックスを2~3秒ボルテックス混合し、第2のセットの予めラベルしたチューブに310 uLを分配する。室温で10分インキュベートする。

【0167】

7. 310 uLの各mRNA - OptiMEMミックスを、希釈したLipoミックスを含有するチューブに移す。室温で5分インキュベートする。

【0168】

8. 100 uLの各ミックスを各ウェルに分配する。

【0169】

9. インキュベートし、翌朝、温dPBSで洗浄し、500 uLのHMM (FBSなし) で交換する。 20

【0170】

10. トランスフェクションの24*および48*時間後 (肝細胞をプレーティングするときに応じて決まる) に試料を得る。

【0171】

ELISAのために馴化培地を収集する (24および48時間) 。各群につき2つのウェルから1200 uLの馴化培地を収集し、1.5 mLのチューブに移す。収集した培地を温HMMで交換する。馴化培地を、20 , 000 x gで2分遠心分離する。上清を新しいチューブに移し、-20 で貯蔵する。 30

【0172】

GFP発現および明視野の写真を撮り、トランスフェクション効率を決定する (24および48時間) 。浮遊する細胞を温dPBSで洗浄する。温HMMで交換する。GFP発現にはフィルター2 (グリーン励起) および明視野にはフィルター6を使用して写真を撮る。

【0173】

RNA抽出のためにQiazol中に細胞溶解産物を収集する (24および48時間) 。細胞を温dPBSで2回洗浄する。600 uLのQiazolでウェルをコーティングし、1分インキュベートする。P1000を使用してプレートから細胞を掻き取り、1.5 mLのチューブに移す。RNA単離まで-20 で貯蔵する。 40

【0174】

IFのためにウェルを固定する (24時間) 。細胞を温めたdPBSで2回洗浄する。750 uLの4% PFA溶液でウェルをコーティングし、20分インキュベートする。ウェルを、1 mLのdPBSで3回、洗浄ごとに5分洗浄する。1 mLのdPBSを添加する。TFについて染色するまで4 で貯蔵する。

【0175】

ウェスタンブロットのために細胞溶解産物を収集する (24および48時間) 。以下を含有する氷冷した溶解溶液を調製する：

【0176】

【表 4】

	1mL	2mL	3mL
a. NP40細胞溶解緩衝液 -90%	900uL	1800uL	2700uL
b. Complete (1タブ/1.5mL) - 6%	60uL	120uL	180uL
c. Haltプロテアーゼ阻害剤 - 2%	20uL	40uL	60uL
d. エタノール中の0.1M PMSF - 2%	20uL	40uL	60uL

【0177】

10

細胞を温 d P B S で 2 回洗淨する。200 u L の氷冷した溶解溶液でウェルをコーティングし、ウォークイン型の冷蔵庫中で揺らしながら 30 分インキュベートする。ラバーポリスマンを使用して細胞を剥がし、沈殿物および固形物を含む溶解産物を収集し、予めラベルしたチューブに移す。20,000 × g で、4 で 10 分回転させる。上清をきれいな予めラベルした 1.5 mL のチューブに移す。-80 の冷凍庫で溶解産物を貯蔵する。

【0178】

免疫蛍光共染色（染色、固定、ブロッキングおよび透過化、抗体のインキュベーション、ならびに対比染色およびマウント）は、実施例 9 で上述した通りである。

【0179】

20

[実施例 10]

転写因子および調節因子 P R O X 1、N R 5 A 2、N R 0 B 2、M T F 1、S R E B P 1、E P 3 0 0 および P O M 1 2 1 C は、終末期肝不全を有する硬変した肝細胞における H N F 4 の核内発現を改善する。

肝臓に豊富な転写因子は、末期肝硬変を有するラットからの肝細胞において安定的にダウンレギュレートされること、およびそれらの 1 つの肝細胞核内因子 4 アルファ（H N F 4）を、培養物およびインビボの両方において強制的に再発現させることにより、機能障害性肝細胞が再プログラミングされ、機能が回復することが見出された。進行性肝疾患を有する患者の大コホートで、罹患した肝臓における H N F 4 の m R N A 発現のレベルは、肝機能障害の程度（チャイルド・ピュー分類）と相関していたこと、およびラット研究での場合のように、その発現は核内には局在していなかったことが示された。進行性肝硬変を有する患者の肝臓において、H N F 4 の R N A 発現レベルは、肝機能の低下に従って減少し、タンパク質発現は細胞質で見出される。これらの発見は、変性性の肝疾患を有する患者における損なわれた肝機能を説明することができる。さらに、R N A 配列分析は、核タンパク質の移行に關与する H N F 4 および他の転写因子 / 調節因子關連の経路は、終末期不全を有する患者からの硬変した肝細胞でダウンレギュレートされ、その場合、H N F 4 の核内レベルは有意に低減し、H N F 4 の細胞質内の発現は増加することが見出されたことを明らかにした。加えて、小胞体（E R）ストレスの 4 つの主要な転写調節因子が有意にアップレギュレートされたことが見出された。この研究は、翻訳後修飾に關わる H N F 4 および経路の操作は、終末期肝不全を有する患者において肝細胞機能を回復させることができることを示す。

30

40

【0180】

P R O X 1、N R 5 A 2、N R 0 B 2、M T F 1、S R E B P 1、E P 3 0 0 および P O M 1 2 1 C のタンパク質発現は、末期肝不全を有する患者における肝機能障害の程度と相関する。H N F 4 は、適切に機能するために核で発現されなければならない；それゆえに、H N F 4 の核内局在に關与するシグナル伝達経路を、非代償性の機能を有する外植したヒト肝臓から単離した肝細胞で分析した。R N A 配列分析で、転写因子および調節因子 P R O X 1、N R 5 A 2、N R 0 B 2、M T F 1、S R E B P 1、E P 3 0 0 および P O M 1 2 1 C が H N F 4 の重要なモジュレーターとして同定されたことから、これらの分子に対して、抗体ベースのアッセイを、N A S H またはアルコール誘導肝硬変のため

50

に肝移植を受けた患者の肝臓から単離した初代ヒト肝細胞（チャイルド・ピュー「B」および「C」）または正常な対照肝細胞で実行した。HNF4 発現は、ウェスタンブロットによって測定した場合（図8A）、単離された対照ヒト肝細胞と比較して、非代償性肝臓検体で著しく低減した。肝不全が進行するに伴いMTF1発現においても有意差があった。さらに、単純線形回帰を使用したところ、チャイルド・ピューでスコア付けしたヒト肝細胞は、HNF4 およびMTF1のタンパク質発現と相関していたことから、HNF4 およびMTF1の両方が、肝不全の程度と有意に相関することが見出された（ $p = 0.007$ ）（図8B～8F）。加えて、NR0B2のタンパク質発現（図9A～D）、NR5A2のタンパク質発現（図10A～D）、PROX1のタンパク質発現（図11A～D）が、チャイルド・ピューCの肝細胞においてより有意に低く、それらの発現は、肝細胞の機能障害の程度に相関していたことが見出された。

10

【0181】

HNF4 の核内発現および局在に対するこれらの同定された転写因子および調節因子の役割をさらに理解するために、ヒト肝細胞細胞株を、CRISPR/Cas9を使用して遺伝子編集して、PROX1またはNR5A2またはNR0B2またはMTF1またはSREBP1またはEP300およびPOM121Cのいずれかの発現をノックアウト（KO）した（図15A～B）。PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300またはPOM121CのKOによって、HNF4 の核内発現の有意な低減が起こったことが見出された（図15A）。PROX1またはSREBP1がKOされた場合、HNF4 の特に高い非核発現が観察された。終末期肝不全を有するヒト肝細胞での以前の研究において、細胞質におけるHNF4 の発現が同様に同定された。さらに、HNF4 の誘導された核内発現に対する、HNF4 単独の効果、またはPROX1もしくはNR5A2もしくはNR0B2もしくはMTF1もしくはSREBP1もしくはPOM121Cのいずれかと組み合わせたHNF4 の効果を試験するために、肝移植を受けたNASHによる終末期肝不全を有する患者の外植された肝臓から単離したヒト肝細胞への処理を実行した（図16）。いずれかのHNF4 - AAV単独での処理の96時間後に、HNF4 の核内発現において、対照と比較して約1倍の増加が見出された（GFP - AAV）。しかしながら、HNF4 - AAV処理をPROX1 - AAVまたはNR5A2 - AAVまたはNR0B2 - AAVまたはMTF1 - AAVまたはSREBP1 - AAVまたはPOM121C - AAVのいずれかと組み合わせた場合、すべての組合せが、特に組合せがHNF4 に加えてPROX1またはSREBP1を含む場合、HNF4 の核内発現を有意に誘導した（図16）。

20

30

【0182】

したがって、本研究は、転写因子および調節因子PROX1、NR5A2、NR0B2、MTF1、SREBP1、EP300およびPOM121Cは、終末期肝不全を有する硬変した肝細胞においてHNF4 の核内発現を改善することを実証する。さらに、この結果は、HNF4 を1つまたは1つより多くの転写因子および調節因子（PROX1またはNR5A2またはNR0B2またはMTF1またはSREBP1またはEP300およびPOM121C）と共に含むすべての組合せが、HNF4 の核内発現およびその再プログラミング能力を強化して、終末期肝不全を治療することを示す。

40

【0183】

参考文献:

【表 5 - 1】

Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014; 383:1749-1761.

Murphy SL, Xu J, Kochanek KD, Curtin SC, Arias E. Deaths: Final Data for 2015. In: *Prevention CfDCa, editor.: National Vital Statistics Reports*; 2017.

Goldman L, Schafer AI. *Goldman-Cecil medicine*. 25th edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2016: 2 volumes (x1, 2722, 12108 pages).

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

- Lopez PM, Martin P. Update on liver transplantation: indications, organ allocation, and long-term care. *Mt Sinai J Med* 2006;73:1056-1066.
- Archambeaud I, Auble H, Nahon P, Planche L, Fallot G, Faroux R, Gournay J, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with non-viral cirrhosis: the importance of prior obesity. *Liver Int* 2015;35:1872-1876.
- Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G. Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence, *Oncogene* 2006;25:3756-3770. 10
- Gelatti U, Covolo L, Talamini R, Tagger A, Barbone F, Martelli C, Cremaschini F, et al. N-Acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, cigarette smoking and hepatocellular carcinoma: a case-control study. *Int J Cancer* 2005;115:301-306.
- Kuper H, Tzonou A, Kaklamani E, Hsieh CC, Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D, et al. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2000;85:498-502.
- Guzman-Lepe J, Cervantes-Alvarez E, Collin de l'Hortet A, Wang Y, Mars WM, Oda Y, Bekki Y, et al. Liver-enriched transcription factor expression relates to chronic hepatic failure in humans. *Hepato Comm* 2018;2:582-594. 20
- Hernaez R, Sola E, Moreau R, Gines P. Acute-on-chronic liver failure: an update. *Gut* 2017;66:541-553.
- Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 2015;64:830-841.
- Pessayre D, Lebrech D, Descatoire V, Peignoux M, Benhamou JP. Mechanism for reduced drug clearance in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1978;74:566-571.
- Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2014;20:8082-8091. 30
- Simoes ICM, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2018;95:93-99.
- Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011;54:795-809.
- Zhang XQ, Xu CF, Yu CH, Chen WX, Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:1768-1776.
- Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death Dis* 2014;5:e996. 40

【表 5 - 3】

Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology* 2015;61:1066-1079.

Zhang BH, Weltman M, Farrell GC. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:133-137.

Michalopoulos GK, Khan Z. Liver Stem Cells: Experimental Findings and Implications for Human Liver Disease. *Gastroenterology* 2015;149:876-882.

Dubuquoy L, Louvet A, Lassailly G, Truant S, Boleslawski E, Artru F, Maggiotto F, et al. Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis. *Gut* 2015;64:1949-1960.

Nishikawa T, Bell A, Brooks JM, Setoyama K, Melis M, Han B, Fukumitsu K, et al. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. *J Clin Invest* 2015;125:1533-1544.

Babeu JP, Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J Gastroenterol* 2014;20:22-30.

Chellappa K, Jankova L, Schnabl JM, Pan S, Brelivet Y, Fung CL, Chan C, et al. Src tyrosine kinase phosphorylation of nuclear receptor HNF4alpha correlates with isoform-specific loss of HNF4alpha in human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2302-2307.

Guo H, Gao C, Mi Z, Wai PY, Kuo PC. Phosphorylation of Ser158 regulates inflammatory redox-dependent hepatocyte nuclear factor-4a transcriptional activity. *Biochem J* 2014;461:347.

Hong YH, Varanasi US, Yang W, Leff T. AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem* 2003;278:27495-27501.

Lu H. Crosstalk of HNF4alpha with extracellular and intracellular signaling pathways in the regulation of hepatic metabolism of drugs and lipids. *Acta Pharm Sin B* 2016;6:393-408.

Song Y, Zheng D, Zhao M, Qin Y, Wang T, Xing W, Gao L, et al. Thyroid-Stimulating Hormone Increases HNF-4alpha Phosphorylation via cAMP/PKA Pathway in the Liver. *Sci Rep* 2015;5:13409.

Soutoglou E, Katrakili N, Talianidis I. Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell* 2000;5:745-751.

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

- Sun K, Montana V, Chellappa K, Brelivet Y, Moras D, Maeda Y, Parpura V, et al. Phosphorylation of a conserved serine in the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol Endocrinol* 2007;21:1297-1311.
- Xu Z, Tavares-Sanchez OL, Li Q, Fernando J, Rodriguez CM, Studer EJ, Pandak WM, et al. Activation of bile acid biosynthesis by the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK): hepatocyte nuclear factor-4alpha phosphorylation by the p38 MAPK is required for cholesterol 7alpha-hydroxylase expression. *J Biol Chem* 2007;282:24607-24614. 10
- Yokoyama A, Katsura S, Ito R, Hashiba W, Sekine H, Fujiki R, Kato S. Multiple post-translational modifications in hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;410:749-753.
- Zhou W, Hannoun Z, Jaffray E, Medine CN, Black JR, Greenhough S, Zhu L, et al. SUMOylation of HNF4alpha regulates protein stability and hepatocyte function. *J Cell Sci* 2012;125:3630-3635.
- Gramignoli R, Green ML, Tahan V, Dorko K, Skvorak KJ, Marongiu F, Zao W, et al. Development and application of purified tissue dissociation enzyme mixtures for human hepatocyte isolation. *Cell Transplant* 2012;21:1245-1260. 20
- Bell AW, Michalopoulos GK. Phenobarbital regulates nuclear expression of HNF-4alpha in mouse and rat hepatocytes independent of CAR and PXR. *Hepatology* 2006;44:186-194.
- Natarajan A, Wagner B, Sibilica M. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17081-17086.
- Rasband WS. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA., In.
- Hainer SJ, Gu W, Carone BR, Landry BD, Rando OJ, Mello CC, Fazzio TG. Suppression of pervasive noncoding transcription in embryonic stem cells by esBAF. *Genes Dev* 2015;29:362-378. 30
- Kumar R, Ichihashi Y, Kimura S, Chitwood DH, Headland LR, Peng J, Maloof JN, et al. A High-Throughput Method for Illumina RNA-Seq Library Preparation. *Front Plant Sci* 2012;3:202.
- Morlan JD, Qu K, Sinicropi DV. Selective depletion of rRNA enables whole transcriptome profiling of archival fixed tissue. *PLoS One* 2012;7:e42882.
- Adiconis X, Borges-Rivera D, Satija R, DeLuca DS, Busby MA, Berlin AM, Sivachenko A, et al. Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low-input samples. *Nat Methods* 2013;10:623-629. 40

【表 5 - 5】

- de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics* 2004;20:1453-1454.
- Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 2004;20:3246-3248.
- Kritis AA, Argyrokastritis A, Moschonas NK, Power S, Katrakili N, Zannis VI, Cereghini S, et al. Isolation and characterization of a third isoform of human hepatocyte nuclear factor4. *Gene* 1996;173:275-280. 10
- Tanaka T, Jiang S, Hotta H, Takano K, Iwanari H, Sumi K, Daigo K, et al. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol* 2006;208:662-672.
- Walesky C, Apte U. Role of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) in cell proliferation and cancer. *Gene Expr* 2015;16:101-108.
- Liu L, Yannam GR, Nishikawa T, Yamamoto T, Basma H, Ito R, Nagaya M, et al. The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* 2012;55:1529-1539.
- Komposch K, Sibilina M. EGFR Signaling in Liver Diseases. *Int J Mol Sci* 2015;17. 20
- Paranjpe S, Bowen WC, Mars WM, Orr A, Haynes MM, DeFrances MC, Liu S, et al. Combined systemic elimination of MET and epidermal growth factor receptor signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation. *Hepatology* 2016;64:1711-1724.
- Tsagianni A, Mars WM, Bhushan B, Bowen WC, Orr A, Stoops J, Paranjpe S, et al. Combined Systemic Disruption of MET and Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Causes Liver Failure in Normal Mice. *Am J Pathol* 2018;188:2223-2235.
- Dekker FJ, Haisma HJ. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug Discov Today* 2009;14:942-948. 30
- Argemi J, Latasa MU, Atkinson SR, Blokhin IO, Massey V, Gue JP, Cabezas J, et al. Defective HNF4alpha-dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nat Commun* 2019;10:3126.
- Woods A, Williams JR, Muckett PJ, Mayer FV, Liljevald M, Bohlooly YM, Carling D. Liver-Specific Activation of AMPK Prevents Steatosis on a High-Fructose Diet. *Cell Rep* 2017;18:3043-3051.
- Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 2017;169:381-405. 40

【表 5 - 6】

- Morales-Ruiz M, Santel A, Ribera J, Jimenez W. The Role of Akt in Chronic Liver Disease and Liver Regeneration. *Semin Liver Dis* 2017;37:11-16.
- Alam A, Chun Suen K, Ma D. Acute-on-chronic liver failure: recent update. *J Biomed Res* 2017;31:283-300.
- B. Sosa-Pineda, J.T. Wigle, G. Oliver Hepatocyte migration during liver development requires Prox1 *Nat. Genet.*, 25 (2000), pp. 254-255.
- Song KH, Li T and Chiang JY (2006) A prospero-related homeodomain protein is a novel co-regulator of hepatocyte nuclear factor 4alpha that regulates the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. *J Biol Chem* 281, 10081–10088. 10
- Xu SZ. Prox1 Facilitates Transfected CHO Cell Proliferation through Activation of the AKT Signaling Pathway. *Int J Biomed Sci.* 2010 Mar;6(1):49-59.
- Rausa FM, Galameau L, Bélanger L, Costa RH. 1999. The nuclear receptor fetoprotein transcription factor is coexpressed with its target HNF-3b in the developing murine liver intestine and pancreas. *Mech Dev* 89: 185–188.
- Labelle-Dumais C, Jacob-Wagner M, Paré JF, Bélanger L, Dufort D. Nuclear receptor NR5A2 is required for proper primitive streak morphogenesis. *Dev Dyn.* 2006 Dec;235(12):3359-69. 20
- Kim DH, Kwon S, Byun S, Xiao Z, Park S, Wu SY, Chiang CM, Kemper B, Kemper JK. Critical role of RanBP2-mediated SUMOylation of Small Heterodimer Partner in maintaining bile acid homeostasis. *Nat Commun.* 2016 Jul 14;7:12179.
- Lindert U, Cramer M, Meuli M, Georgiev O, Schaffner W. Metal-responsive transcription factor 1 (MTF-1) activity is regulated by a nonconventional nuclear localization signal and a metal-responsive transactivation domain. *Mol Cell Biol.* 2009 Dec;29(23):6283-93. doi: 10.1128/MCB.00847-09.
- Rutherford JC, Bird AJ. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell.* 2004 Feb;3(1):1-13. 30
- Shi Q, Hoffman B, Liu Q, PI3K-Akt signaling pathway upregulates hepatitis C virus RNA translation through the activation of SREBPs. *Virology.* 2016 Mar; 490():99-108.
- Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 2008 Sep;8(3):224-36.
- Breaux M, Lewis K, Valanejad L, Iakova P, Chen F, Mo Q, Medrano E, Timchenko L, Timchenko N. p300 Regulates Liver Functions by Controlling p53 and C/EBP Family Proteins through Multiple Signaling Pathways. *Mol Cell Biol.* 2015 Sep 1;35(17):3005-16. 40

【表 5 - 7】

He L, Cao J, Meng S, Ma A, Radovick S, Wondisford FE, Activation of basal gluconeogenesis by coactivator p300 maintains hepatic glycogen storage. *Mol Endocrinol.* 2013 Aug; 27(8):1322-32.

Stavru F, Nautrup-Pedersen G, Cordes VC, Görlich D. Nuclear pore complex assembly and maintenance in POM121- and gp210-deficient cells. *J Cell Biol.* 2006 May 22;173(4):477-83.

Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJ, Adams CM, Anthony TG, Wek RC. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Mol Biol Cell.* 2016 May 1;27(9):1536-51.

Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol.* 2011 Apr;54(4):795-809.

Florentino RM, Fraunhoffer NA, Morita K, Takeishi K, Ostrowska A, Achreja A, Animasahun O, Haep N, Arazov S, Agarwal N, Collin de l'Hortet A, Guzman-Lepe J, Tafaleng EN, Mukherjee A, Troy K, Banerjee S, Paranjpe S, Michalopoulos GK, Bell A, Nagrath D, Hainer SJ, Fox IJ, Soto-Gutierrez A. Cellular Location of HNF4 α is Linked With Terminal Liver Failure in Humans. *Hepatol Commun.* 2020 Apr 21;4(6):859-875.

Guzman-Lepe J, Cervantes-Alvarez E, Collin de l'Hortet A, Wang Y, Mars WM, Oda Y, Bekki Y, Shimokawa M, Wang H, Yoshizumi T, Maehara Y, Bell A, Fox IJ, Takeishi K, Soto-Gutierrez A. *Hepatol Commun.* Liver-enriched transcription factor expression relates to chronic hepatic failure in humans. 2018 Mar 23;2(5):582-594.

Nishikawa T, Bellance N, Damm A, Bing H, Zhu Z, Handa K, Yovchev MI, Sehgal V, Moss TJ, Oertel M, Ram PT, Pipinos II, Soto-Gutierrez A, Fox IJ, Nagrath D. A switch in the source of ATP production and a loss in capacity to perform glycolysis are hallmarks of hepatocyte failure in advance liver disease. *J Hepatol.* 2014 Jun;60(6):1203-11.

Nishikawa T, Bell A, Brooks JM, Setoyama K, Melis M, Han B, Fukumitsu K, Handa K, Tian J, Kaestner KH, Vodovotz Y, Locker J, Soto-Gutierrez A, Fox IJ. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. *J Clin Invest.* 2015 Apr;125(4):1533-44.

10

20

30

40

50

【 図面 】

【 図 1 】

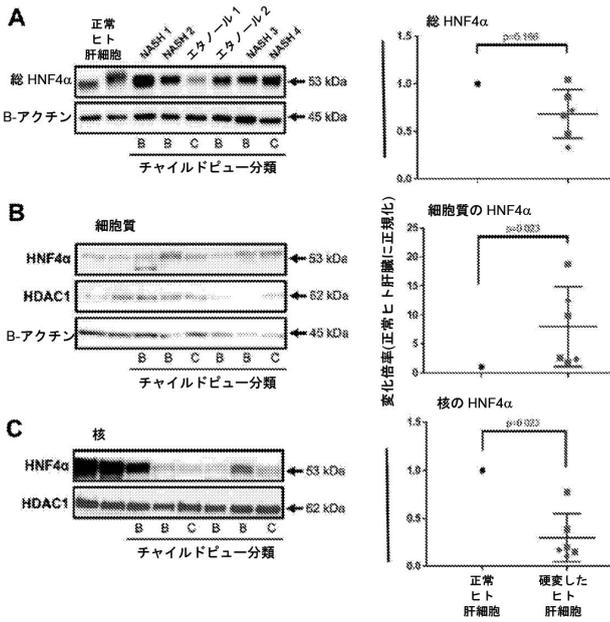


図 1A~1C

【 図 2 - 1 】

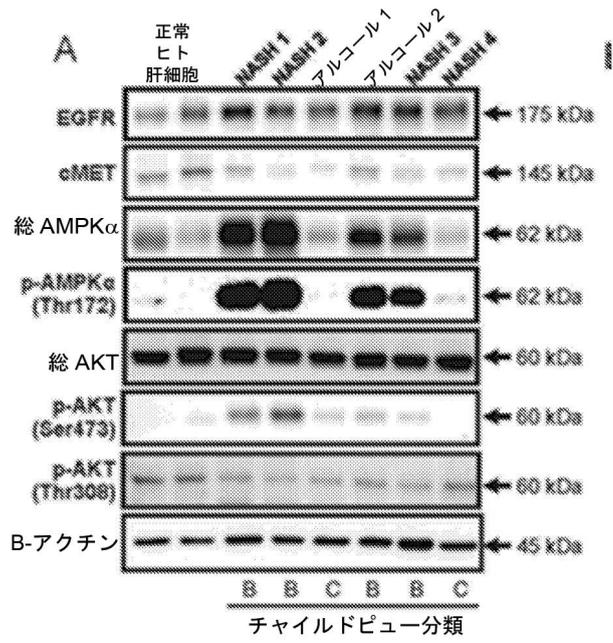


図 2A

【 図 2 - 2 】

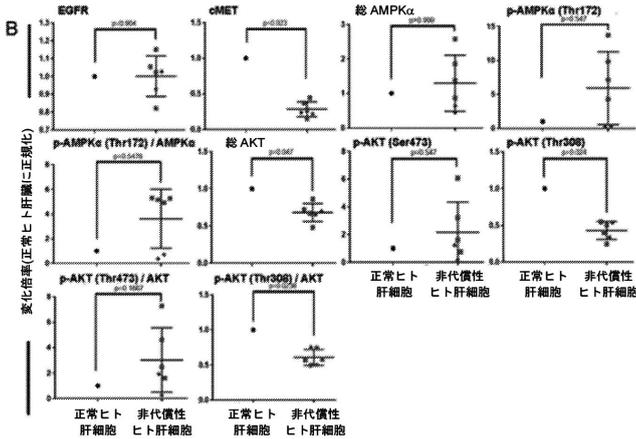


図 2B

【 図 2 - 3 】

表 2. HNF4α に対するスピアマンの相関。

遺伝子	HNF4α		細胞質の HNF4α		核の HNF4α	
	r	p 値	r	p 値	r	p 値
HNF4α						
細胞質の HNF4α	-0.67	0.059	-0.67	0.059	0.67	0.059
核の HNF4α	0.67	0.059	-0.62	0.086	-0.62	0.086
EGFR	0.43	0.250	-0.12	0.776	-0.27	0.493
cMET	0.76	0.021	-0.80	0.014	0.71	0.037
総 AMPKα	0.45	0.230	-0.18	0.644	0.25	0.521
p-AMPKα (Thr172)	0.25	0.521	0.22	0.581	0.22	0.744
総 AKT	0.88	0.003	-0.73	0.031	0.65	0.067
p-AKT (Ser473)	0.35	0.359	-0.13	0.744	-0.20	0.613
p-AKT (Ser473)/AKT	0.02	0.982	0.18	0.194	-0.38	0.644
p-AKT (Thr308)	0.78	0.031	-0.77	0.021	0.82	0.011
p-AKT (Thr308)/AKT	0.62	0.066	-0.72	0.037	0.73	0.031

図 2C

【 図 2 - 2 】

【 図 2 - 3 】

10

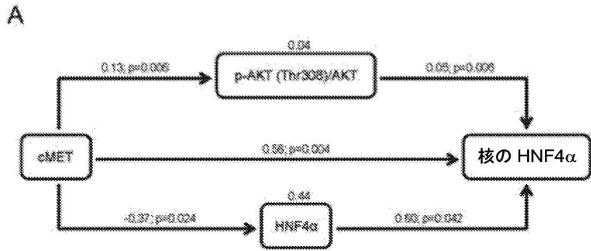
20

30

40

50

【 図 3 - 1 】



B

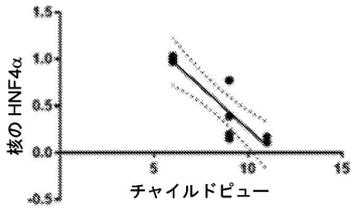


図 3A~3B

【 図 3 - 2 】

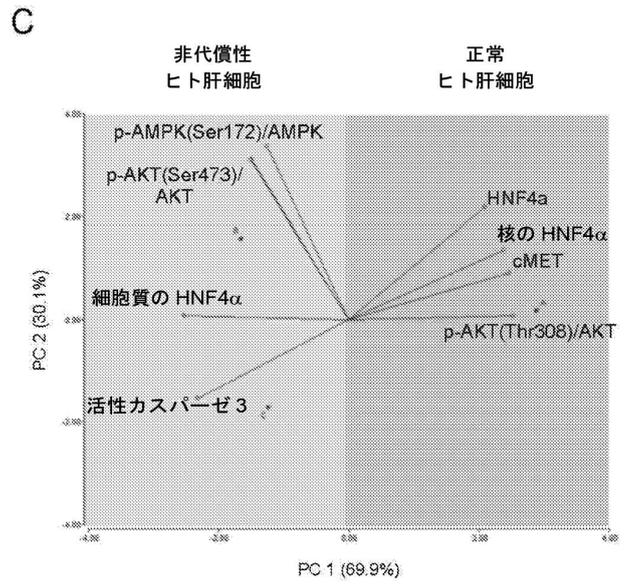


図 3C

【 図 3 - 3 】

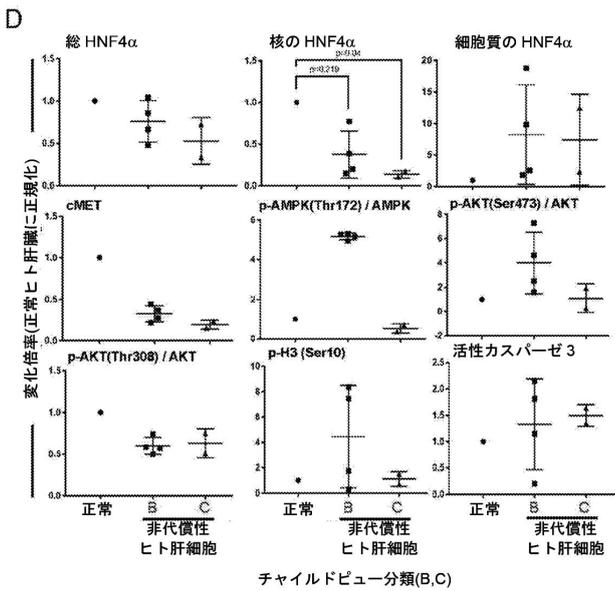


図 3D

【 図 4 】

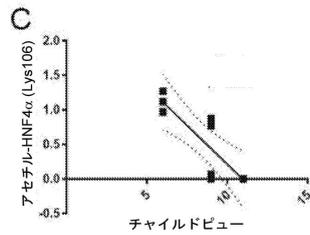
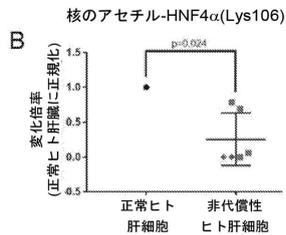
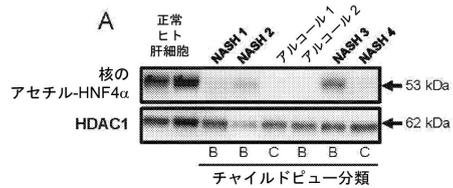


図 4 A~4C

10

20

30

40

50

【 図 5 】

PTM	配置	機能	参照番号
リン酸化	Y14	トランス活性化の低減	22308320
	S78	トランス活性化の低減	17389749
	S87	DNA 結合の減少	17389749
	S133	DNA 結合の減少	26302721
	S134	DNA 結合の減少	28196117
	S142	転写阻害	28196117
	S143	転写阻害	28196117
	S158	DNA 結合およびトランス活性化の安定化	16351573
	T166	トランス活性化	21708125
	S167	転写阻害	17603092
	Y277	DNA 結合の減少	22308320
	Y279	DNA 結合の減少	22308320
	Y286	転写阻害	27709008
	T288	転写阻害	22308320
S304	結合および二量体化の低減	12740371	
S313	転写阻害	12740371	
アセチル化	K106	DNA 結合の安定化	10882110
	K458	転写阻害	21708125
SUMO 化	K365	タンパク質の安定性	22505616
	D367	タンパク質の安定性	22505616
ユビキチン化	K234	タンパク質の分解	25700366
	K307	タンパク質の分解	25700366
	K309	タンパク質の分解	25700366

図 5

【 図 6 】

A 補足の表 2.P-AKT(Thr308)/AKT に対するスピアマンの相関。

遺伝子	p-AKT (Thr308)/AKT	
	r	p 値
EGFR	0.02	0.982
cMET	0.80	0.014
総 AMPK α	0.08	0.843
p-AMPK α (Thr172)	-0.20	0.613
p-AMPK α (Thr172)/AMPK	-0.20	0.613
総 AKT	0.71	0.037
p-AKT (Ser473)	-0.32	0.410
p-AKT (Ser473)/AKT	-0.41	0.086

10

B 補足の表 3.P-AKT(Ser473)/AKT に対するスピアマンの相関。

遺伝子	p-AKT (Ser473)/AKT	
	r	p 値
EGFR	0.23	0.56
cMET	-0.36	0.35
総 AMPK α	0.93	<0.0001
p-AMPK α (Thr172)	0.94	<0.0001
p-AMPK α (Thr172)/AMPK	0.71	0.032
総 AKT	-0.04	0.919
p-AKT (Thr308)	-0.32	0.394
p-AKT (Thr308)/AKT	-0.41	0.268

図 6A~6B

20

【 図 7 - 1 】

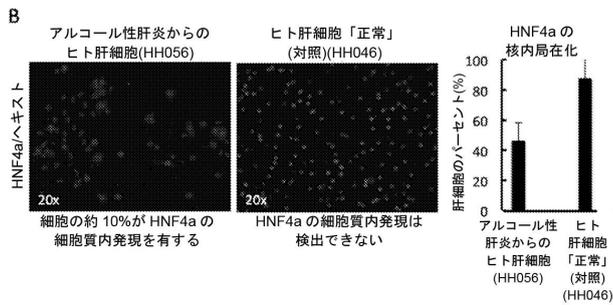
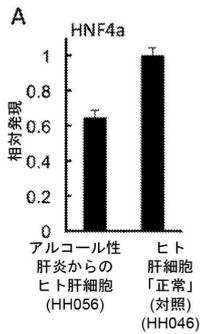


図 7A~7B

【 図 7 - 2 】

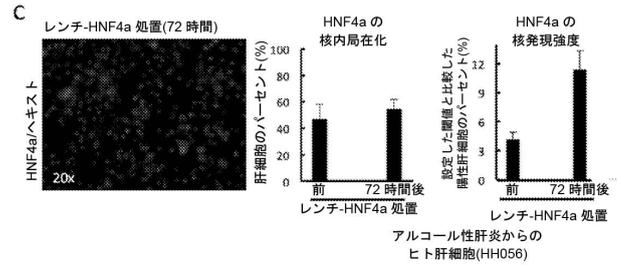


図 7C

30

40

50

【 图 8 - 1 】

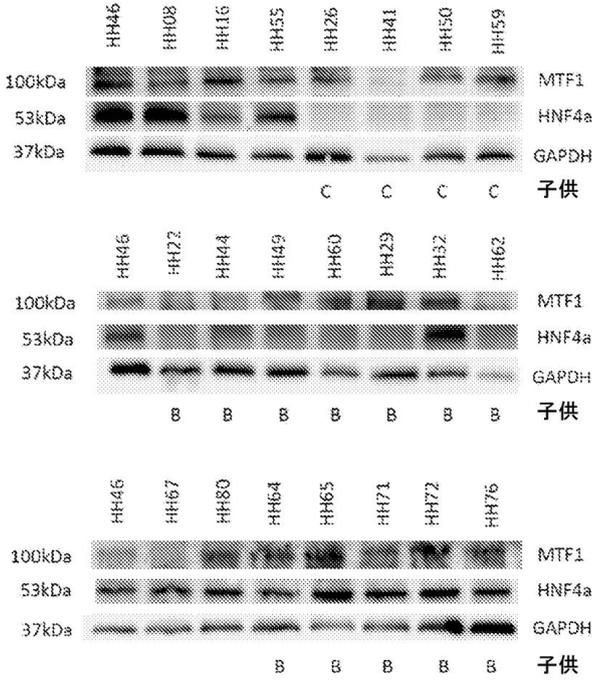


图 8A

【 图 8 - 2 】

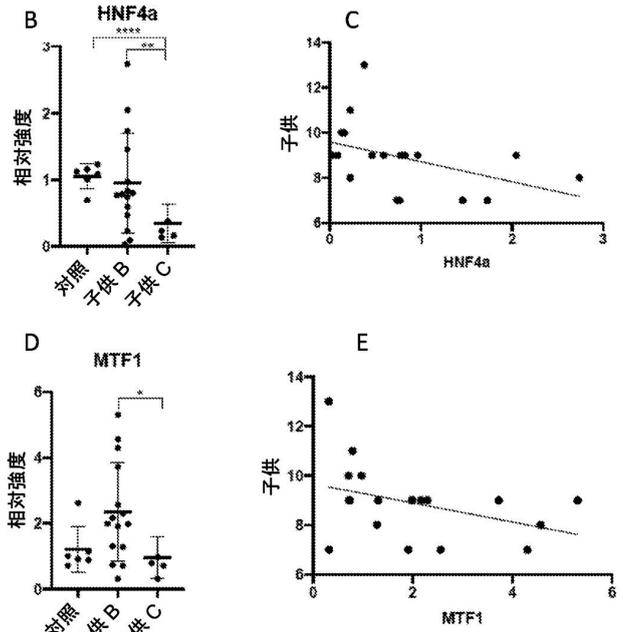


图 8B~8E

10

20

【 图 8 - 3 】

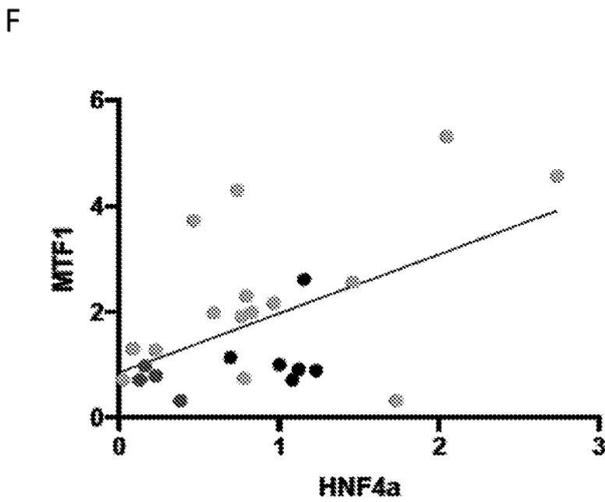


图 8F

【 图 9 - 1 】

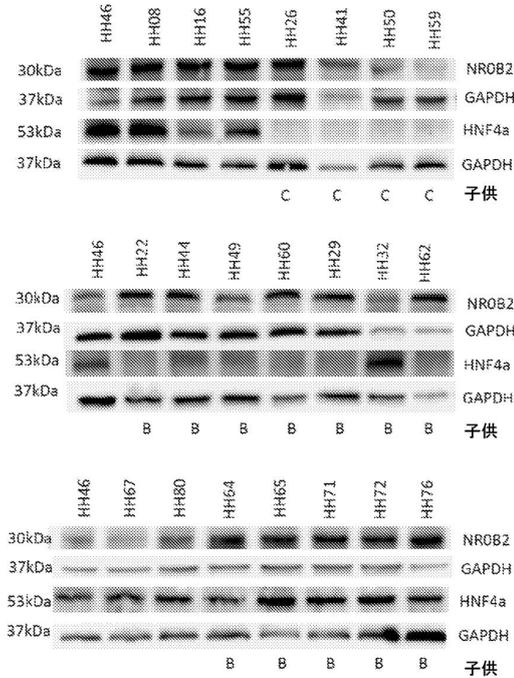


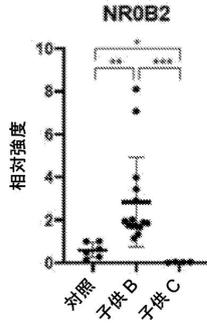
图 9A

30

40

50

【图 9 - 2】



【图 9 - 3】

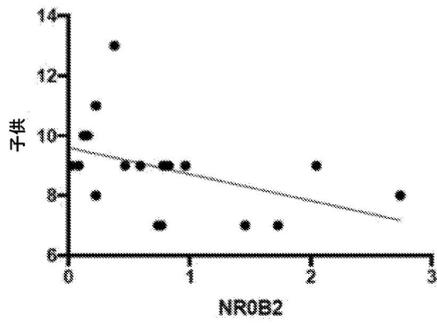
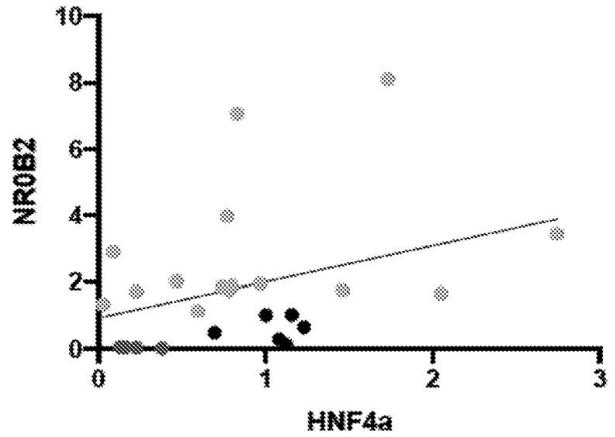


图 9B~9C

图 9D

10

20

【图 10 - 1】

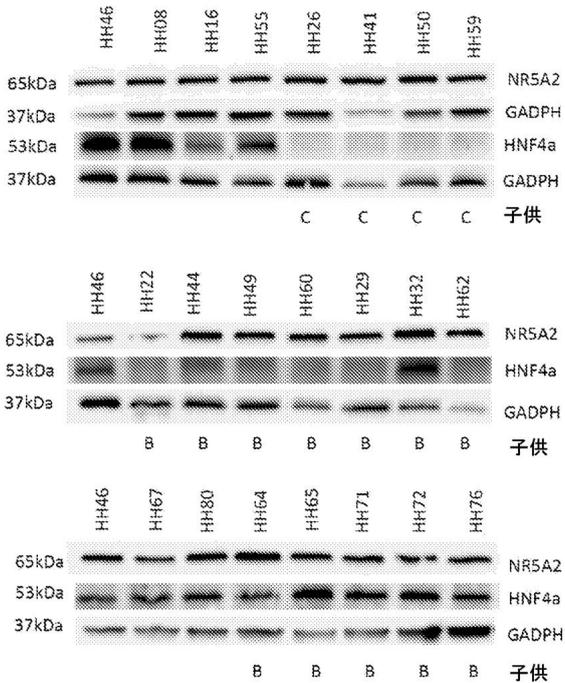


图 10A

【图 10 - 2】

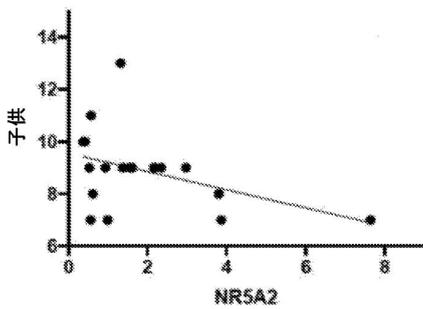
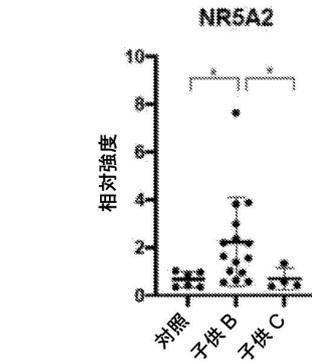


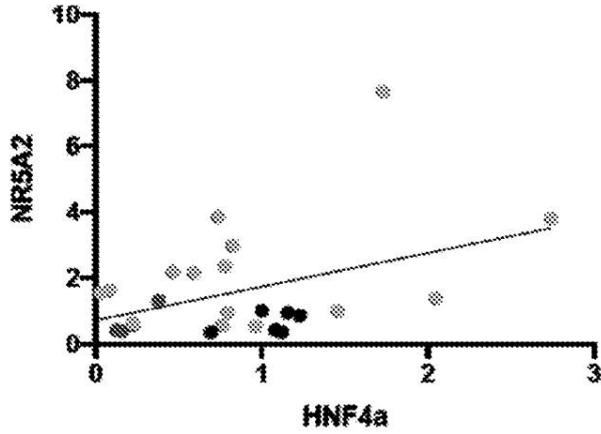
图 10B~10C

30

40

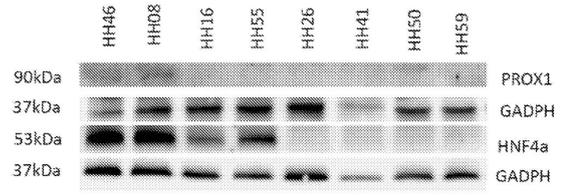
50

【 10 - 3 】

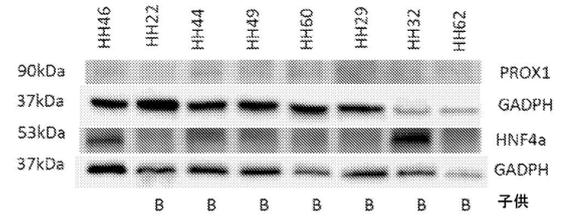


10D

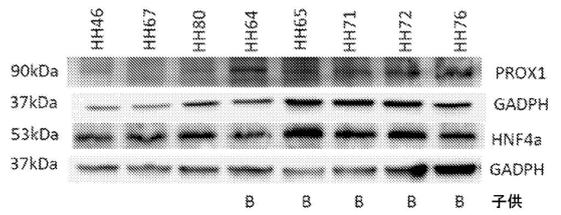
【 11 - 1 】



10

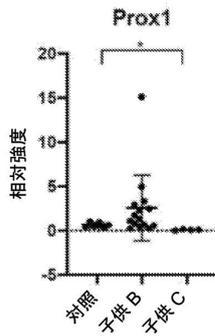


20



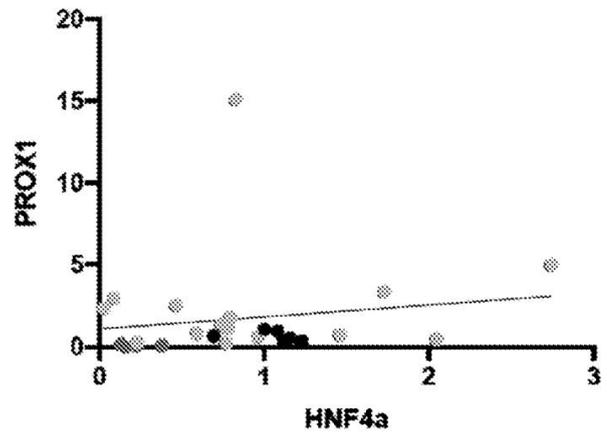
11A

【 11 - 2 】



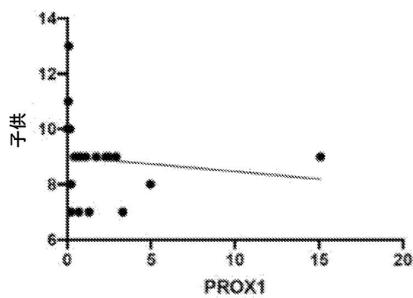
30

【 11 - 3 】



40

11D



11B~11C

50

【 図 1 2 - 1 】

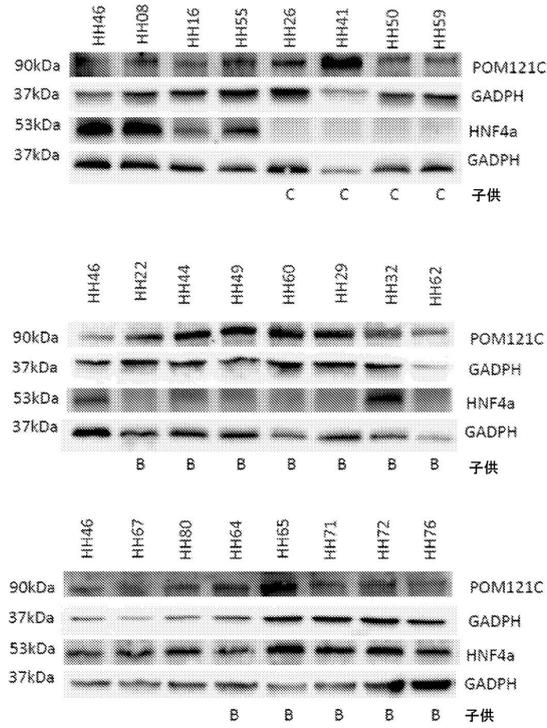


図 12A

【 図 1 2 - 2 】

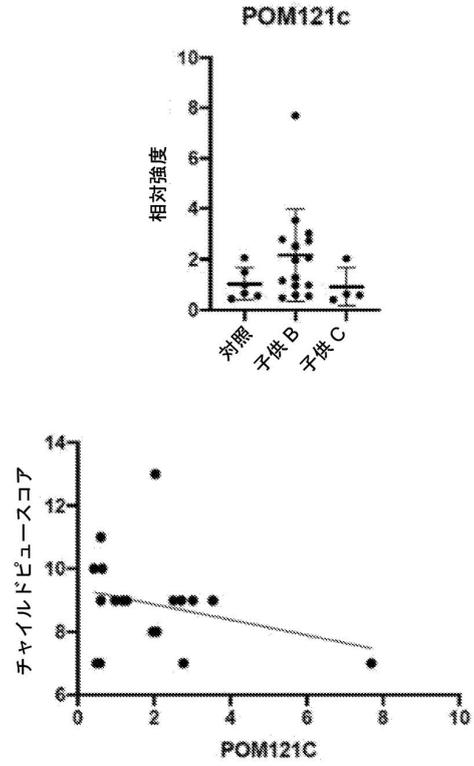


図 12B~12C

【 図 1 2 - 3 】

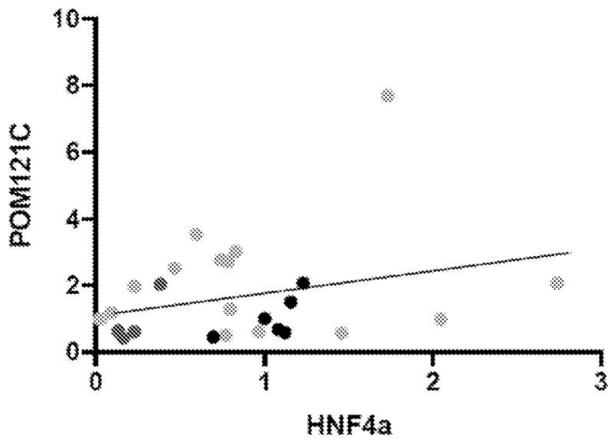


図 12D

【 図 1 3 - 1 】

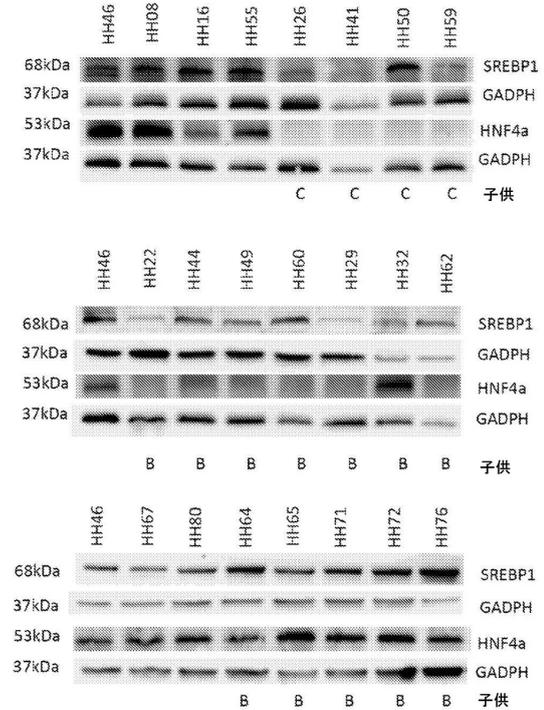


図 13A

10

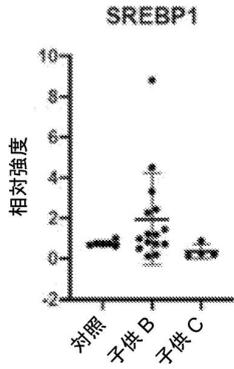
20

30

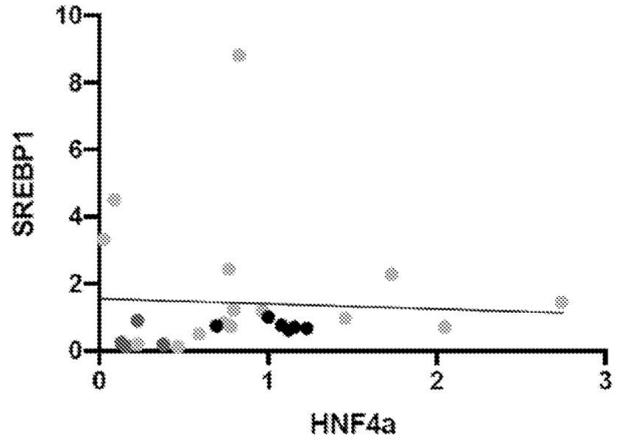
40

50

【 図 1 3 - 2 】



【 図 1 3 - 3 】



10

20

図 13D

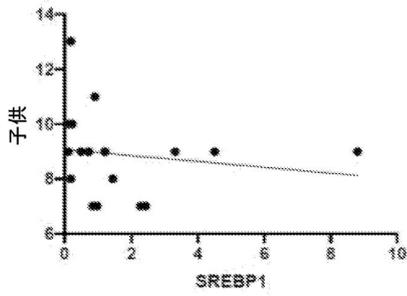


図 13B~13C

【 図 1 4 - 1 】

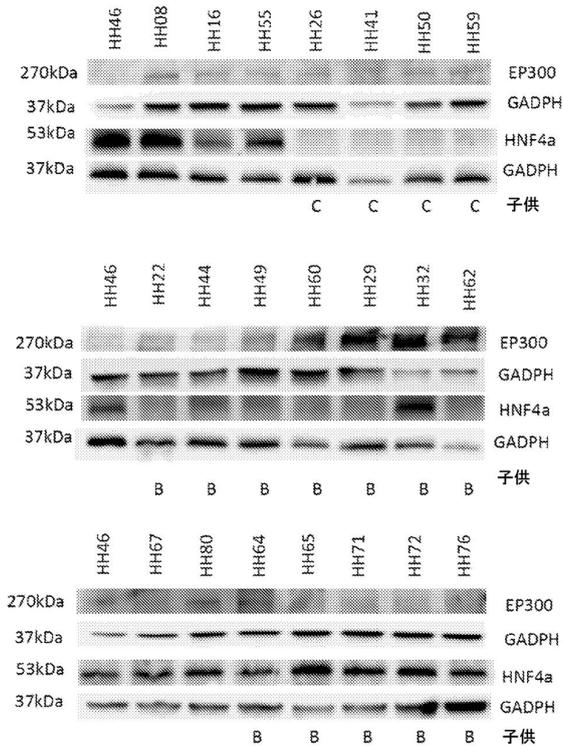
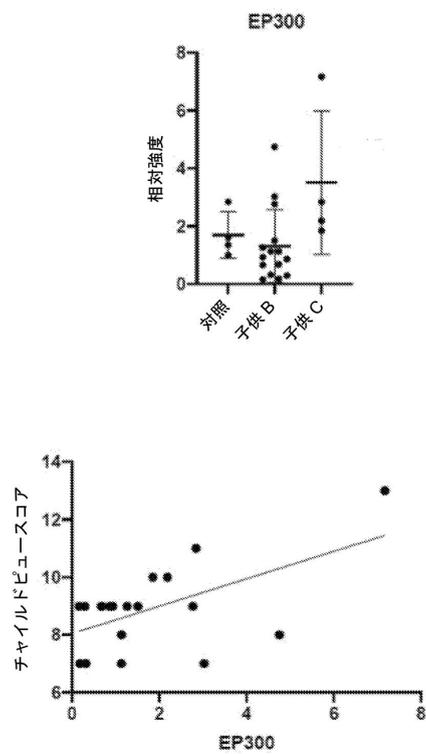


図 14A

【 図 1 4 - 2 】



30

40

図 14B~14C

50

【 図 1 4 - 3 】

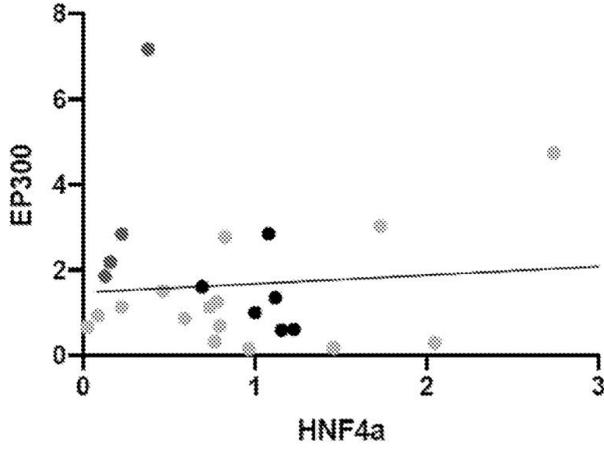


図 14D

【 図 1 5 】

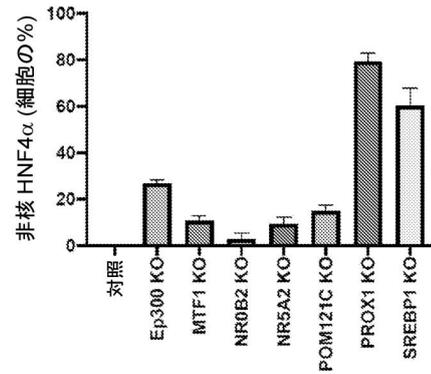
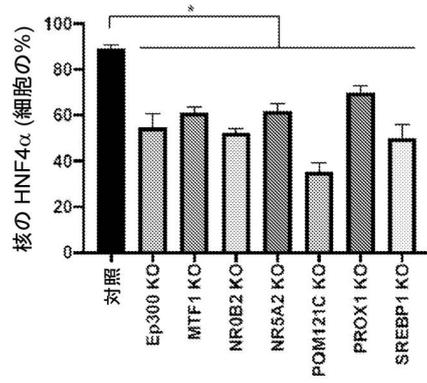


図 15A~15B

10

20

【 図 1 6 】

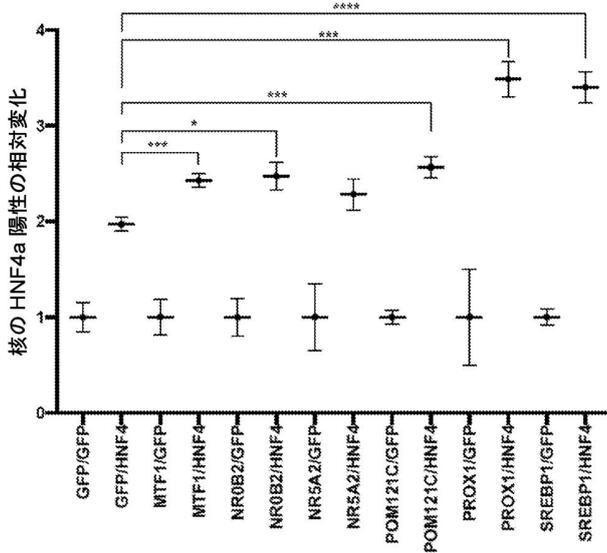


図 16

30

40

【 配列表 】

2022551987000001.app

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/55500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 48/00, C07K 14/47, C12N 15/79, C12N 15/86 (2021.01) CPC - A61K 39/23, C07K 14/4702, C12N 15/86, C12N 2750/14143		10
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018/0057839 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 01 March 2018 (01.03.2018) para [0005]-[0008]; [0017]; [0071]; [0099]	1-4
A	SONG et al., Direct reprogramming of hepatic myofibroblasts into hepatocytes in vivo attenuates liver fibrosis. Cell stem cell. 02 June 2016, Vol 18, No 6, pp 797-808. Entire document, especially p. 797, col 1, para 1 to col 2, para 1	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 February 2021		Date of mailing of the international search report MAR 17 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/55500

--continued from: Box No. III Observations where unity of invention is lacking--

Group I+, claims 1-4, 15-18, 30-33, directed to a method of treating a liver disease in a subject in need thereof comprising administering a composition that modulates an amount or function of one or more transcription factors, comprising or consisting of a transcription factor modulating agent. The method will be searched to the extent that the transcription factor modulation encompasses increasing an amount or function of PROX1, and the transcription factor modulating agent encompasses a vector comprising a nucleic acid that encodes PROX1. It is believed that claims 1-4 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the transcription factor modulation encompasses increasing an amount or function of PROX1, and the transcription factor modulating agent encompasses a vector comprising a nucleic acid that encodes PROX1. Additional transcription factor modulation(s) and/or modulating agent(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected transcription factor modulation(s) and/or modulating agent(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be increasing an amount or function of NR5A2, where the transcription factor modulating agent encompasses a vector comprising a nucleic acid that encodes NR5A2, (claims 1, 2, 4).

10

Group II, claims 27-29, directed to a composition comprising a vector.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I+ has the special technical feature of a method of treating a liver disease in a subject, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a composition comprising or consisting of a vector, that is not required by Group I+.

20

The inventions of Group I+ each include the special technical feature of different transcription factor modulation, and/or different transcription factor modulating agent, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

The inventions of Group I+ and Group II share the common technical feature of a composition comprising a vector, wherein the vector comprises one or more nucleic acids that encode one or more transcription factors selected from the group consisting of PROX1, NR5A2, NROB2, MTF1, SRESP1, EP300, and POM121C, and functional fragments thereof.

The inventions of Group I+ further share the common technical feature of a method of treating a liver disease in a subject in need thereof comprising administering to the subject a composition, wherein the composition modifies a function of one or more transcription factors.

The feature shared by Groups I+ and II and the feature shared by the inventions listed as Group I+ are taught by US 2018/0057839 A1 to the Regents of the University of California (hereinafter 'UC').

UC teaches a method of treating a liver disease in a subject in need thereof comprising administering to the subject a composition (para [0017] "a method of treating and/or preventing liver fibrosis in a subject in need thereof comprising: administering a therapeutic or prophylactically effective amount of the pharmaceutical composition"; [0099]), wherein the composition increases an amount or function of one or more transcription factors selected from the group consisting of PROX1, NR5A2, NROB2, MTF1, SREBP1, EP300, and POM121C (para [0005] "a viral vector comprising... a second nucleic acid sequence that encodes one or more transcription factors selected from the group consisting of thereof chosen from: FOXA1, FOXA2, FOXA3, HNF1.alpha., HNF6, GATA4, HLF, CEBPA, PROX1, ATF5A"; [0008] "pharmaceutical composition comprising one or a plurality of viral vectors comprising at least one or a plurality of nucleic acid sequences encoding one or a combination of any of the transcription factors disclosed herein"; [0099] "Genetic diseases which may be treated with vectors and/or methods of the present invention include those in which long-term expression of the therapeutic nucleic acid is desired. This includes chronic liver disease, cirrhosis, liver cancer, and liver fibrosis"), the composition comprising a vector, wherein the vector comprises one or more nucleic acids that encode one or more transcription factors selected from the group consisting of PROX1, NR5A2, NROB2, MTF1, SRESP1, EP300, and POM121C, and functional fragments thereof (para [0005] "a viral vector comprising...the one or more nucleic acid molecules comprise: a first nucleic acid sequence that encodes HNF4.alpha. or a functional fragment thereof; and a second nucleic acid sequence that encodes one or more transcription factors selected from the group consisting of thereof chosen from: FOXA1, FOXA2, FOXA3, HNF1.alpha., HNF6, GATA4, HLF, CEBPA, PROX1, ATF5A").

30

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ and II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

40

NOTE, continuation of number 4 above: claims 5-14, 19-26, 34 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/55500

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.: 5-14, 19-26, 34
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

--continued on extra sheet--

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, limited to increasing PROX1, and a vector with nucleic acid encoding PROX1

30

40

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 6 1 K 38/16	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
	C 1 2 N 15/63	Z

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . J A V A

2 . T R I T O N

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(72)発明者 ソト グティエレス, アレハンドロ

アメリカ合衆国 1 5 2 2 1 ペンシルベニア州, ピッツバーグ, ディネル ドライブ 1 1

(72)発明者 ベル, アーロン

アメリカ合衆国 1 5 1 2 2 ペンシルベニア州, ウェスト ミフリン, キャンベル サークル 2 6 0 6

(72)発明者 フラウンホーファー ナヴァッロ, ニコラス

アメリカ合衆国 1 5 2 1 3 ペンシルベニア州, ピッツバーグ, ケイトー ストリート 5 0 2

(72)発明者 グズマン レペ, ジョージ

アメリカ合衆国 1 5 2 2 1 ペンシルベニア州, ピッツバーグ, グリーン ストリート 2 3 0 ,
アパートメント 1

(72)発明者 ハイナー, サラ

アメリカ合衆国 1 5 2 0 7 ペンシルベニア州, ピッツバーグ, ウィンターバーン アベニュー
4 2 4 5

(72)発明者 ミハロプロス, ジョージ ケー .

アメリカ合衆国 1 5 2 2 8 ペンシルベニア州, ピッツバーグ, ランカスター アベニュー 1 7 2

(72)発明者 オストローシュカ, アリーナ

アメリカ合衆国 1 5 1 3 6 ペンシルベニア州, マッキーズ ロックス, バン ビューレン サークル
4

(72)発明者 フォックス, イラ

アメリカ合衆国 1 5 2 3 2 ペンシルベニア州, ピッツバーグ, フィフス アベニュー 5 2 3 7
, アpartment B 4

(72)発明者 テファレング, エドガー ナオエ

アメリカ合衆国 1 5 2 3 2 ペンシルベニア州, ピッツバーグ, カレッジ ストリート 6 3 0

(72)発明者 武石 一樹

福岡県福岡市早良区百道3 - 1 7 - 1 1

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA53 DC50 MA02 NA14

ZA751 ZB211 ZB261 ZC411