(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0028362
(43) 공개일자 2024년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 39/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
*C07K 14/705* (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
*C12N 15/113* (2010.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 39/4634* (2023.05)
*A61K 39/4631* (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7045210
(22) 출원일자(국제) 2022년05월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/031356
(87) 국제공개번호 WO 2022/251644
국제공개일자 2022년12월01일
(30) 우선권주장
63/194,745 2021년05월28일 미국(US)
63/365,024 2022년05월19일 미국(US)

(71) 출원인
**라이엘 이뮤노파마, 인크.**
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 해스킨스 웨이 201
(72) 발명자
**램, 비올라**
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 해스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내
**린, 레이첼 크리스티나**
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 해스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내
(74) 대리인
**양영준, 이상남**

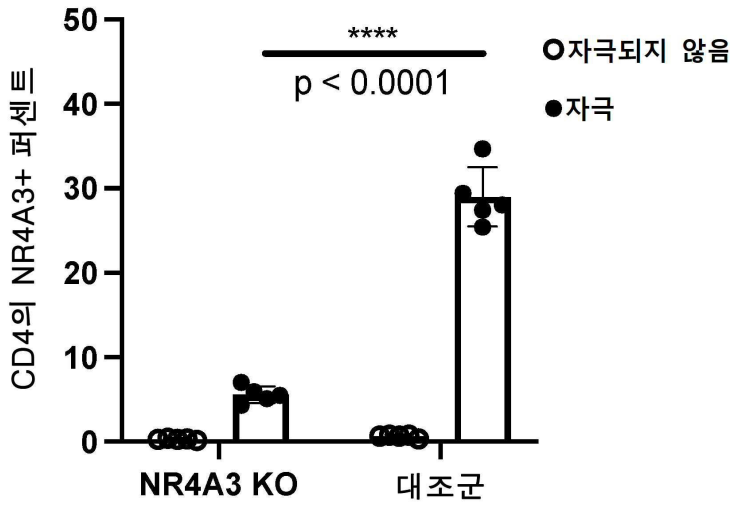
전체 청구항 수 : 총 98 항

(54) 발명의 명칭 **NR4A3-결핍 면역 세포 및 이의 용도**

## (57) 요 약

본 개시내용은 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 세포를 변형시키는 것을 포함하는, 면역 세포의 지속적인 이펙터 기능을 촉진하는 방법을 제공한다. 또한 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형된 변형된 세포, 예를 들어 면역 세포가 제공된다. *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 수준을 감소시키면 아폽토시스 저항성 및 면역 체크포인트 저항성인 탈진/기능장애 저항성 세포가 생성되고 종양 미세환경에서 항종양 기능이 유지된다.

*대 표 도* - 도1a



(52) CPC특허분류
***A61K 39/4635*** (2023.05)
***A61K 39/4644*** (2023.05)
***A61P 35/00*** (2018.01)
***C07K 14/7051*** (2013.01)
***C07K 14/70567*** (2013.01)
***C12N 15/1138*** (2013.01)
***C12N 5/0636*** (2023.05)
*A61K 2239/46* (2023.05)
*C12N 2310/20* (2017.05)

# *명 세 서*

## *청구범위*

### 청구항 1

감소된 수준의 핵 수용체 아계열 4 그룹 A 구성원 3("*NR4A3*") 유전자 및/또는 *NR4A3* 단백질 및 결합 분자를 발현하고 내인성 발현의 *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질을 갖는 변형된 면역 세포 집단을 포함하는 세포 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 종양을 치료하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 변형된 면역 세포 집단에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준이 기준 세포 조성물(예를 들어, 세포가 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포 조성물)과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 감소되는, 방법.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포가 림프구, 호중구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 및 이들의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 림프구가 T 세포, 종양-침윤 림프구(TIL), 림포카인 활성화-살해 세포, 자연 살해(NK) 세포 및 이들의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

### 청구항 5

제3항에 있어서, 상기 림프구가 T 세포인, 방법.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자가 키메라 항원 수용체(CAR) 및/또는 T 세포 수용체(TCR), 예를 들어 조작된 TCR을 포함하는, 방법.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자가 CAR을 포함하는, 방법.

### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포가 생체외 세포 또는 시험관내 세포인, 방법.

### 청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포가 생체내 세포인, 방법.

### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포가 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위해 유전자 편집 도구에 의해 변형되는, 방법.

### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 유전자 편집 도구가 shRNA, siRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, CRISPR, 징크

핑거 뉴클레아제, TALEN, 메가뉴클레아제, 제한 엔도뉴클레아제 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 상기 유전자 편집 도구가 CRISPR인, 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 면역 세포 집단이 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 활성 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 대상체에서 면역 세포의 하나 이상의 향상된 특성을 나타내는, 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포의 향상된 특성이 (i) 면역 세포의 향상된 확장, (ii) 면역 세포의 향상된 세포독성, (iii) 향상된 지속성, (iv) 면역 세포의 향상된 사이토카인 발현, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포가 향상된 사이토카인 발현을 나타내는, 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 사이토카인이 인터류킨-2(IL-2), 인터페론-γ(IFN-γ), 종양 괴사 인자-α(TNF-α) 또는 이들의 임의의 조합인, 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, IL-2의 발현 수준이 기준 면역 세포 집단에서 IL-2의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 증가되는, 방법.

**청구항 18**

제16항 또는 제17항에 있어서, IFN-γ의 발현 수준이 기준 면역 세포 집단에서 IL-γ의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 증가되는, 방법.

**청구항 19**

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, TNF-α의 발현 수준이 기준 면역 세포 집단에서 TNF-α의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 증가되는, 방법.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포가 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 활성 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 감소된 탈진 또는 기능장애를 나타내는, 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포가 순차적 자극 시 증가된 세포독성을 나타내는, 방법.

**청구항 22**

제20항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포가 만성 자극에서 증가된 세포독성을 나타내는, 방법.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 면역 세포가 종양 미세환경(TME)에서 항종양 기능을 유지하는, 방법.

**청구항 24**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자가 R12, R11, 2A2, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래된 scFv를 포함하는, 방법.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자가 서열번호: 17을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호: 21을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 방법.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 기준 종양 부피(예를 들어, 투여 전 대상체의 종양 부피 및/또는 투여받지 않은 대상체의 종양 부피)와 비교하여 대상체의 종양 부피를 감소시키는, 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 종양 부피가 기준 종양 부피(예를 들어, 투여 전 대상체의 종양 부피 및/또는 투여받지 않은 대상체의 종양 부피)와 비교하여 투여 후 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 감소되는, 방법.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 기준 종양 중량(예를 들어, 투여 전 대상체의 종양 중량 및/또는 투여받지 않은 대상체의 종양 중량)과 비교하여 대상체의 종양 중량을 감소시키는, 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 종양 중량이 기준 종양 중량(예를 들어, 투여 전 대상체의 종양 중량 및/또는 투여받지 않은 대상체의 종양 중량)과 비교하여 투여 후 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 감소하는, 방법.

**청구항 30**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 기준 생존 기간(예를 들어, 투여 전 대상체에서의 생존 기간 및/또는 투여받지 않은 대상체에서의 생존 기간)과 비교하여 대상체의 생존 기간을 증가시키는, 방법.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 기준 생존 기간과 비교하여, 생존 기간이 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 11개월, 또는 적어도 약 1년만큼 증가되는, 방법.

**청구항 32**

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 상기 면역 세포의 탈진 또는 기능장애를 감소시키거나 방지하는, 방법.

**청구항 33**

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포가 종양 미세환경(TME)에서 항종양 기능을 유지하는, 방법.

**청구항 34**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양이 유방암, 두경부암, 자궁암, 뇌암, 피부암, 신세포암, 폐암, 대장암, 전립선암, 간암, 방광암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 식도암, 눈암, 복부(위)암, 위장암, 난소암, 자궁경부암, 암종, 육종, 백혈병, 림프종, 골수종 또는 이의 조합을 포함하는 암으로부터 유래되는, 방법.

**청구항 35**

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 추가 치료제가 화학요법 약물, 표적 항암 치료법, 종양용해 약물, 세포독성제, 면역-기반 치료법, 사이토카인, 수술 절차, 방사선 절차, 공동자극 분자 활성화제, 면역 체크포인트 억제제, 백신, 세포 면역치료법 또는 이들의 임의의 조합를 포함하는, 방법.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 상기 추가 치료제가 면역 체크포인트 억제제인, 방법.

**청구항 38**

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제가 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-LAG-3 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-GITR 항체, 항-TIM3 항체 및 이들의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 39**

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 치료제 및 상기 세포 조성물이 동시에 투여되는, 방법.

**청구항 40**

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 치료제 및 상기 세포 조성물이 순차적으로 투여되는, 방법.

**청구항 41**

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 조성물이 비경구, 근육내, 피하, 안내, 정맥내, 복강내, 피내, 안와내, 뇌내, 두개내, 척수내, 뇌실내, 척수강내, 수조내, 피막내, 종양내, 또는 이들의 임의의 조합으로 투여되는, 방법.

**청구항 42**

제10항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 편집 도구가 서열 번호: 30, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 43**

유전자 편집 도구로 세포를 변형시키는 단계를 포함하는, 감소된 수준의 핵 수용체 아계열 4 그룹 A 구성원 3("*NR4A3*") 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 갖는 세포를 생성하는 방법으로서, 상기 유전자 편집 도구는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키고, 상기 유전자 편집 도구는 서열번호: 30, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61,

서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 44**

유전자 편집 도구로 면역 세포를 변형시키는 단계를 포함하는, 항원 자극에 반응하여 면역 세포에 의한 사이토카인 생산을 증가시키는 방법으로서, 상기 유전자 편집 도구는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키고, 상기 유전자 편집 도구는 서열번호: 30, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 45**

제44항에 있어서, 상기 사이토카인이 IFN-γ, IL-2, TNF-α, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 46**

제44항 또는 제45항에 있어서, 변형 후, 항원 자극에 대한 반응으로 사이토카인의 생산이 유전자 편집 도구로 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 또는 적어도 약 50배 증가되는, 방법.

**청구항 47**

유전자 편집 도구로 면역 세포를 변형시키는 단계를 포함하는, 지속적인 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 이펙터 기능을 증가시키는 방법으로서, 상기 유전자 편집 도구는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키고, 상기 유전자 편집 도구는 서열번호: 30, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 상기 면역 세포가 기준 면역 세포와 비교하여 항원 자극 검정의 적어도 1회, 적어도 2회, 또는 적어도 3회 추가 라운드 동안 이펙터 기능을 유지하는, 방법.

**청구항 49**

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 이펙터 기능이 (i) 표적 세포(예를 들어, 종양 세포)를 사멸시키는 능력, (ii) 추가 항원 자극 시 사이토카인을 생산하는 능력, 또는 (iii) (i)및 (ii)둘 모두의 능력을 포함하는, 방법.

**청구항 50**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 30에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 51**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 52에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 52**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 53**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 54에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 54**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 55에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 55**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 56에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 56**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 57에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 57**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 58에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 58**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 61에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 59**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 65에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 60**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 67에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 61**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 68에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 62**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 70에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 63**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 71에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 64**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 75에 제시된 서열을 포함하거나, 이

로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 65**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 76에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 66**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 82에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 67**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 83에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 68**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 86에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 69**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 94에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 70**

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 서열번호: 96에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 방법.

**청구항 71**

제43항의 방법에 의해 제조된 세포를 포함하는 조성물.

**청구항 72**

감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 세포를 포함하는 조성물로서, 여기서 상기 세포는 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형되었으며, 상기 gRNA는 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 73**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 30에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 74**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 52에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 75**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 76**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 54에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 77**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 55에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 78**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 56에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 79**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 57에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 80**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 58에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 81**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 61에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 82**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 65에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 83**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 67에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 84**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 68에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 85**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 70에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 86**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 71에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 87**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 75에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 88**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 76에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 89**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 82에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 90**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 83에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 91**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 86에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 92**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 94에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 93**

제72항에 있어서, 상기 gRNA가 서열번호: 96에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는, 조성물.

**청구항 94**

제71항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 생체내 세포를 포함하는, 조성물.

**청구항 95**

제71항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 생체외 세포 또는 시험관내 세포를 포함하는, 세포 조성물.

**청구항 96**

제71항 내지 제95항 중 어느 한 항의 세포 조성물을 포함하는 약제학 조성물.

**청구항 97**

(i) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위한 유전자 편집 도구, (ii) 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는 벡터, 및 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 방법에 따라 종양을 치료하기 위한 지침을 포함하는 키트.

**청구항 98**

(i) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위한 유전자 편집 도구, (ii) 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는 벡터, 및 제43항의 방법에 따라 제조되는 세포의 세포 집단을 포함하는 조성물을 제조하기 위한 지침을 포함하는 키트.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 PCT 출원은 2021년 5월 28일에 출원된 미국 가출원 번호 63/194,745; 및 2022년 5월 19일에 출원된 63/365,024의 우선권의 이익을 주장하며, 각각은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0003] EFS-WEB을 통해 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원에서 제출된 전자적으로 제출된 서열 목록(명칭: 4385_075PC02_Seqlisting_ST25.txt, 크기: 97,201 바이트; 및 생성 날짜: 2022년 5월 27일)의 내용은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0005] 개시내용의 분야

[0006] 본 개시내용은 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 감소된 수준의 NR4A3 단백질 발현을 갖도록 변형된 면역 세포의 투여를 포함하는 세포-기반(예를 들어, T-세포) 암 면역치료법에 관한 것이다.

## *배 경 기 술*

[0007] 암 면역치료법은 감염되고 병든 세포에 대한 면역계의 주요 사멸자인 T 세포가 종양 세포를 공격하고 사멸시키도록 하는 데 의존한다. 그러나 면역치료법에는 중요한 걸림돌이 있다: T 세포의 살상 능력이 약해질 수 있으며, 이러한 현상을 흔히 탈진(exhaustion)이라고 한다. 면역 체크포인트 차단제, 키메라 항원수용체(CAR) T 세포 치료제, 및 T 세포 수용체-조작된(TCR) T 세포 치료법은 환자로부터 분리한 기능적으로 활성인 T 세포를 활용하는 치료이고, 효과를 보려면 고기능성 T 세포가 필요하다. 이러한 T 세포는 표적 암세포의 특정 항원을 인식하기 위해 생체외에서 조작되고 확장된다.

[0008] 면역계가 지속적인 바이러스 감염이나 진행성 암 발생과 같이 장기간 동안 활성화되어야 하는 경우, 이펙터 T 세포가 탈진될 수 있다. 탈진된 T 세포의 특징 중 하나는 PD-1 및 CTLA-4와 같은 면역 체크포인트 단백질의 발현이 증가한다는 것이며, 이로 인해 T 세포가 정지(즉, 비-기능성이 된다)될 수 있다. 면역 체크포인트 억제제는 이러한 체크포인트 단백질을 차단하여 종양에 대한 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 일부 연구에서는 탈진된 T 세포에서 체크포인트 단백질의 활동을 차단하는 것이 그 목적을 달성하는 데 실패한다고 제안했다. 이는 높은 수준의 면역 세포를 포함하여 면역치료법에 반응하는 이상적인 후보가 되어야 하는 소위 뜨거운 종양이 종종 대부분 탈진된 T 세포로 구성된 집단을 보유하고 있기 때문에 중요한다. 더욱이, 종양 미세환경은 노화와 탈진된 세포 표현형을 유도할 수 있다. 따라서 이러한 탈진 상태를 역전 및/또는 예방하는 전략을 고안하는 것은 면역치료 효능을 향상시키는 데 중요하다.

## *발명의 내용*

[0009] 일부 측면에서, 본 개시내용은 감소된 수준의 핵 수용체 아계열 4 그룹 A 구성원 3("*NR4A3*", Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 3) 유전자 및/또는 *NR4A3* 단백질 및 결합 분자(예를 들어, ROR1에 특이적으로 결합하는)를 발현하고 내인성 발현의 *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질을 갖는 변형된 면역 세포 집단을 포함하는 세포 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 종양을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포 집단에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준은 기준 세포 조성물(예를 들어, 세포가 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질를 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포 조성물)과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 감소된다. 한 측면에서, NR4A3 유전자 및/또는 단백질의 발현 수준은 약 90% 내지 약 99% 감소된다. 한 측면에서, NR4A3 유전자 및/또는 단백질의 발현 수준은 검출 수준 미만으로 감소된다.

[0010] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 림프구, 호중구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 림프구는 T 세포, 종양-침윤 림프구(TIL), 림포카인-활성화 살해 세포, 자연 살해(NK) 세포, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 림프구는 T 세포이다.

[0011] 일부 측면에서, 결합 분자는 키메라 항원 수용체(CAR) 및/또는 T 세포 수용체(TCR), 예를 들어 조작된 TCR을 포함한다. 일부 측면에서, 결합 분자는 CAR을 포함한다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 생체외 세포 또는 시험관내 세포이다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 생체내 세포이다.

[0012] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위해 유전자 편집 도구에 의해 변형된다. 한 측면에서, 세포는 *NR4A3* 유전자를 녹아웃시키도록 변형된다. 또 다른 측면에서, 세포는 기능성 NR4A3 단백질 발현이 중단되도록 NR4A3 유전자를 돌연변이시키도록 변형된다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구는 shRNA, siRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, CRISPR, 징크 핑거 뉴클레아제, TALEN, 메가뉴클레아제, 제한 엔도뉴클레아제 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 어떤 측면에서 유전자 편집 도구는 CRISPR이다.

[0013] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포 집단은 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 활성 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 대상체에서 면역 세포의 하나 이상의 향상된 특성을 나타낸다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포의 향상된 특성은 (i) 면역 세포의 향상된 확장, (ii) 면역 세포의 향상된 세포독성, (iii) 향상된 지속성, (iv) 면역 세포의 향상된 사이토카인 발현, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0014] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 향상된 사이토카인 발현을 나타낸다. 일부 측면에서, 사이토카인은 인터루킨-2(IL-2), 인터페론-γ(IFN-γ), 종양 괴사 인자-α(TNF-α) 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 측면에서, IL-2의 발현 수준은기준 면역 세포 집단에서 IL-2의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 증가된다. 일부 측면에서, IFN-γ의 발현 수준은 기준 면역 세포 집단에서 IFN-γ의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 증가된다. 일부 측면에서, TNF-α의 발현 수준은 기준 면역 세포 집단에서 TNF-α의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 증가된다.

[0015] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 활성 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 감소된 탈진 또는 기능장애를 나타낸다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 순차적 자극 시 증가된 세포독성을 나타낸다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 만성 자극에서 증가된 세포독성을 나타낸다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 종양 미세환경(TME)에서 항종양 기능을 유지한다.

[0016] 일부 측면에서, 결합 분자는 R12, R11, 2A2 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래된 scFv를 포함한다. 일부 측면에서, 결합 분자는 서열번호: 17을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호: 21을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 투여는 기준 종양 부피(예를 들어, 투여 전 대상체의 종양 부피 및/또는 투여를 받지 않은 대상체의 종양 부피)와 비교하여 대상체에서 종양 부피를 감소시킨다. 일부 측면에서, 종양 부피는 기준 종양 부피(예를 들어, 투여 전 대상체의 종양 부피 및/또는 투여를 받지 않은 대상체의 종양 부피)와 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 100% 감소한다. 일부 측면에서, 투여는 기준 종양 중량(예를 들어, 투여 전 대상체의 종양 중량 및/또는 투여를 받지 않은 대상체의 종양 중량)과 비교하여 대상체의 종양 중량를 감소시킨다. 일부 측면에서, 종양 중량은 기준 종양 중량(예를 들어, 투여 전 대상체의 종양 중량 및/또는 투여를 받지 않은 대상체의 종양 중량)과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 100% 감소시킨다.

[0017] 일부 측면에서, 투여는 기준 생존 기간(예를 들어, 투여 전 대상체의 생존 기간 및/또는 투여를 받지 않은 대상체의 생존 기간)과 비교하여 대상체의 생존 기간을 증가시킨다. 일부 측면에서, 기준 생존 기간과 비교하여, 생존 기간은 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 11개월, 즉 적어도 1년 증가한다.

[0018] 일부 측면에서, 투여는 면역 세포의 탈진 또는 기능장애를 감소시키거나 예방한다. 일부 측면에서, 면역 세포는 종양 미세환경(TME)에서 항종양 기능을 유지한다. 일부 측면에서, 종양은 유방암, 두경부암, 자궁암, 뇌암, 피부암, 신세포암, 폐암, 대장암, 전립선암, 간암, 방광암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 식도암, 눈암, 복부(위)암, 위장암, 난소암, 자궁경부암, 암종, 육종, 백혈병, 림프종, 골수종, 또는 이들의 조합을 포함하는 암으로부터 유래된다.

[0019] 일부 측면에서, 방법은 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 추가 치료제는 화학치료법제, 표적 항암 치료법, 종양용해제, 세포독성제, 면역-기반 치료법, 사이토카인, 수술 절차, 방사

선 절차, 공동자극 분자 활성화제, 면역 체크포인트 억제제, 백신, 세포 면역치료법, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 추가 치료제는 면역 체크포인트 억제제이다. 일부 측면에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-LAG-3 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-GITR 항체, 항-PD-L1 항체, 항-TIM3 항체 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 추가 치료제 및 세포 조성물은 동시에 투여된다. 일부 측면에서, 추가 치료제 및 세포 조성물은 순차적으로 투여된다.

[0020] 일부 측면에서, 세포 조성물은 비경구, 근육내, 피하, 안내, 정맥내, 복강내, 피내, 안와내, 뇌내, 두개내, 척수내, 심실내, 척추강내, 수조내, 피막내, 종양내, 또는 이들의 임의의 조합으로 투여된다.

[0021] 임의의 상기 방법에 대해, 일부 측면에서, 유전자 편집 도구는 서열번호: 30, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 구성하거나, 본질적으로 구성하는 가이드 RNA를 포함한다.

[0022] 일부 측면에서, 본 개시내용은 유전자 편집으로 세포를 변형시키는 것을 포함하는, 감소된 수준의 핵 수용체 아계열 4 그룹 A 구성원 3("*NR4A3*") 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 갖는 세포를 생성하는 방법을 제공하며, 여기서 유전자 편집 도구는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키고, 여기서 유전자 편집 도구는 서열번호: 30, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 구성하거나, 본질적으로 구성하는 가이드 RNA를 포함한다.

[0023] 일부 측면에서, 본 개시내용은 또한 유전자 편집 도구로 면역 세포를 변형시키는 것을 포함하는, 항원 자극에 반응하여 면역 세포에 의한 사이토카인의 생산을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기서 유전자 편집 도구는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키고, 여기서 유전자 편집 도구는 서열번호: 30, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 구성하거나, 본질적으로 구성하는 가이드 RNA를 포함한다. 일부 측면에서, 사이토카인은 IFN-γ, IL-2, TNF-α, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 변형 후, 항원 자극에 대한 반응으로 사이토카인의 생산은 유전자 편집 도구로 변형되지 않은 상응하는 면역 세포와 비교하여 적어도 약 1배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배, 적어도 약 12배, 적어도 약 13배, 적어도 약 14배, 적어도 약 15배, 적어도 약 16배, 적어도 약 17배, 적어도 약 18배, 적어도 약 19배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 35배, 적어도 약 40배, 적어도 약 45배, 또는 적어도 약 50배 증가한다.

[0024] 일부 측면에서, 본 출원은 유전자 편집 도구로 면역 세포를 변형시키는 것을 포함하는, 지속적인 항원 자극에 반응하여 면역 세포의 이펙터 기능을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기서 유전자 편집 도구는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키고, 여기서 유전자 편집 도구는 서열번호: 30, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 구성하거나, 본질적으로 구성하는 가이드 RNA를 포함한다. 일부 측면에서, 면역 세포는 기준 면역 세포와 비교하여 항원 자극 검정의 적어도 1회, 적어도 2회, 또는 적어도 3회의 추가 라운드 동안 이펙터 기능을 유지한다. 일부 측면에서, 이펙터 기능은 (i) 표적 세포(예를 들어, 종양 세포)를 사멸시키는 능력, (ii) 추가 항원 자극 시 사이토카인을 생산하는 능력, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두의 능력을 포함한다.

[0025] 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 30에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 52에 제시된 서열을 포함하거나, 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함하거나, 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 54에 제시된 서열을 포함하거나, 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 55에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 또는 서열번호: 56에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본

질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 57에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 58에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 61에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 65에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 67에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 68에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 70에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 71에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 75에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 76에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 82에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 83에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 86에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 94에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 96에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다.

[0026] 일부 측면에서, 본 개시내용은 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 청구항 제43항의 방법에 의해 제조되었다. 일부 측면에서, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 세포를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 세포는 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형되었으며, 여기서 gRNA는 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 61, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 86, 서열번호: 94, 및 서열번호: 96 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 구성되거나, 본질적으로 구성된다.

[0027] 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 30에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 52에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 54에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 55에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 또는 서열번호: 56에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 57에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 58에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 61에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 65에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 67에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 68에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 70에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 71에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 75에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 76에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 82에 제시된 서열의 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 83에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 86에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 94에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 가이드 RNA는 서열번호: 96에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다.

[0028] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 세포를 제공한다. 일부 측면에서, 세포는 생체내 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 생체외 또는 시험관내 세포이다.

[0029] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 세포를 포함하는 약제학 조성물을 제공한다.

[0030] 일부 측면에서, 본 개시내용은 (i) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위한 유전자 편집

도구, (ii) 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는 벡터, 및 본원에 기재된 방법에 따라 종양을 치료하기 위한 지침을 포함하는 키트를 제공한다.

[0031] 일부 측면에서, 본 개시내용은 (i) *NR4A*3 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위한 유전자 편집 도구, (ii) 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는 벡터, 및 본원에 기재된 방법에 따라 세포 조성물을 제조하기 위한 지침을 포함하는 키트를 제공한다.

## *도면의 간단한 설명*

[0032] **도 1a** 및 **1b**는 5명의 독립 기증자(자극, 검은색 원)에서 2시간 동안 CD3/CD28 다이나비드(Dynabead) 자극을 받은 후, CAR T 세포 생산 7일에 NR4A3-편집된("NR4A3 KO") 및 대조군 비-편집된 $CD4^+$(**도 1a**) 및 $CD8^+$(**도 1b**) 항-ROR1 CAR T 세포에서 NR4A3 발현의 백분율을 보여준다. 자극되지 않은 세포(Dynabeads가 없는 흰색 원)를 음성 대조군으로 사용했다. 자극된 조건의 독립표본 t-검정(unpaired t-test)이 통계 분석에 사용되었다. *p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

**도 2**는 CAR T 세포 생산 7일에 5명의 기증자로부터 얻은 NR4A1-("NR4A1 KO"), NR4A2-("NR4A2 KO"), NR4A3-편집된("NR4A3 KO") 및 대조군 비-편집된 $CD4^+$(흰색 원)및 $CD8^+$(검은색 원) 항-ROR1 CAR T 세포에서 $EGFR^+R12^+$ ROR1 CAR 발현의 백분율을 보여준다.

**도 3**은 순차적 자극 검정에서 5명의 독립적 기증자에서 NR4A-편집된 또는 대조 비-편집된 항-ROR1 CAR T 세포("x" 기호), 및 모의 비형질도입 T 세포(사각형)에 의한 H1975-NLR NSCLC 세포의 연속적인 항-ROR1 용해를 보여준다. 표시된 NR4A-편집된 세포에는 NR4A1 녹아웃(삼각형), NR4A2 녹아웃(별) 및 NR4A3 녹아웃(원)이 포함된다. H1975-NLR 표적 세포의 용해는 총 NLR 강도를 측정하여 정량화되었다. NLR 강도는 각 자극 라운드에 대해 재플레이팅한 후 시작 강도를 기준으로 정규화되었다. NLR - 누크라이트 레드(NucLight Red).

**도 4a-4c**는 도 3에 상응하는 H1975 순차 자극 검정 동안 NR4A-편집된, 대조군 비-편집된 항-ROR1 CAR("x" 기호) 및 모의 비형질도입 T 세포(사각형)로부터 생성된 분비된 인터페론-감마(IFN-ɣ)(**도 4a**), 인터루킨-2(IL-2)(**도 4b**) 및 종양괴사인자-알파(TNF-α)(**도 4c**)를 보여준다. 표시된 NR4A-편집된 세포에는 NR4A1 녹아웃(삼각형), NR4A2 녹아웃(별) 및 NR4A3 녹아웃(원)이 포함된다. 각 재플레이팅 후 24시간 동안 상등액을 수집하고 사이토카인을 MSD로 정량화했다. 열에는 5명의 독립 기증자의 데이터가 표시된다. 오차 막대는 삼중 웰의 평균 +/- SD를 나타낸다. 독립표본 t-검정(unpaired t-test)이 통계 분석에 사용되었다. *p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

**도 5a**는 도 3에 상응하는 H1975 순차 자극 검정 동안 각 재플레이팅 후 NR4A-편집된, 대조군 비-편집된 ROR1 CAR("x" 기호) 및 모의 비형질도입(사각형) T 세포로부터의 $CD4^+$(상부) 및 $CD8^+$(하부) T 세포 상에서의 항-ROR1 CAR 발현을 보여준다. 표시된 NR4A-편집된 세포에는 NR4A1 녹아웃(삼각형), NR4A2 녹아웃(별) 및 NR4A3 녹아웃(원)이 포함된다. D0은 검정 시작 시 CAR 발현 빈도를 보여준다. **도 5b**는 도 3에 상응하는 H1975 순차 자극 검정 동안 NR4A-편집된 및 대조군 비-편집된 항-ROR1 CAR T 세포로부터 예상된 $CD3^+$ 항-ROR1 $CAR^+$ T 세포 수의 배수 변화를 보여준다. 다음 자극으로의 세포 이동 25%를 포함하도록 예상 세포 수를 계산했다. 변화 배수는 (자극에서 예상된 세포 수/이전 자극에서 예상된 세포 수)로 계산되었다. 도 5b에서, 자극1, 자극2 및 자극3 각각의 막대는 다음에 상응한다: (i) NR4A1 녹아웃(삼각형; 첫 번째 막대); (ii) NR4A2 녹아웃(별; 두 번째 막대); (iii) NR4A3 녹아웃(원; 세 번째 막대); (iv) 대조군 비-편집된 ROR1 CAR(x 기호; 네 번째 막대). 각 그래프는 독립적인 기증자를 나타낸다.

**도 6**은 도 3에 상응하는 H1975 순차 자극 검정 동안 NR4A-편집된("NR4A3 KO") 및 대조군 비-편집된 항-ROR1 CAR T 세포로부터의 ROR1 $CAR^+$ $CD4^+$(상부) 및 $CD8^+$(하부) T 세포에 대한 억제 수용체(LAG3, TIM3, CD39 및 PD-1)의 발현을 보여준다. 대응표본 t-검정(paired t-test)이 통계분석에 사용되었다. **p<0.005. n = 5명의 독립적인 기증자.

**도 7a-7c**는 H1975 만성 자극 검정에서 7일 간의 ROR1 항원 자극 후 5명의 독립적 기증자에서 A549(윗줄) 또는 H1975(아래줄) 종양 세포와 공동 배양된 NR4A-편집된 및 대조군 비편집 항-ROR1 CAR T 세포에서 생산된 분비된 인터페론-감마(IFN-ɣ)(**도 7a**), 인터루킨-2(IL-2)(**도 7b**) 및 종양괴사인자-알파(TNF-α)(**도 7c**)를 보여준다. 7일에 새로운 공동 배양을 설정한 후 24시간 후에 상층액을 수집하고 사이토카인을 MSD로 정량화했다. 각 그래프는 독립적인 기증자를 나타낸다. 각 그래프에서 막대는 다음에 상응한다: (i) NR4A1 녹아웃(삼각형; 첫 번째 막

대); (ii) NR4A2 녹아웃(별; 두 번째 막대); (iii) NR4A3 녹아웃(원; 세 번째 막대); 및 (iv) 대조군 비-편집된 항-ROR1 CAR(x 기호; 네 번째 막대). 열에는 5명의 독립적인 기증자의 데이터가 표시된다. 오차 막대는 삼중 웰의 평균 +/- SD를 나타낸다. 독립표본 t-검정(unpaired t-test)이 통계 분석에 사용되었다. *p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

**도 8a**는 도 7에 상응하는 H1975 만성 자극 검정 동안 NR4A-편집된 및 대조 비-편집된 ROR1 CAR T 세포로부터의 $CD4^+$(상부) 및 $CD8^+$(하부) T 세포 상에서의 ROR1 CAR 발현을 보여준다. 표시된 NR4A-편집된 세포에는 NR4A1 녹아웃(삼각형), NR4A2 녹아웃(별표) 및 NR4A3 녹아웃(원)이 포함된다. **도 8b**는 도 7에 상응하는 7일 H1975 만성 자극 검정 동안 NR4A-편집된 및 대조군 비-편집된 ROR1 CAR T 세포로부터의 $CD3^+$ 항-ROR1 $CAR^+$ T 세포 수의 변화 배수를 보여준다. 배수 변화는 (현재 E:T 재설정의 세포 수/이전 E:T 재설정 세포 수)로 계산되었다. 각 그래프는 독립적인 기증자를 나타낸다. 도 8b에서, 2일, 4일 및 7일 각각에 대해 표시된 막대는 다음에 상응한다: (i) NR4A1 녹아웃(삼각형; 첫 번째 막대); (ii) NR4A2 녹아웃(별; 두 번째 막대); (iii) NR4A3 녹아웃(원; 세 번째 막대); (iv) 대조군 비-편집된 ROR1 CAR(x 기호; 네 번째 막대). 열에는 5명의 독립작인 기증자의 데이터가 표시된다.

**도 9**는 도 7에 상응하는 7일 H1975 만성 자극 검정에서 NR4A3-편집된("NR4A3 KO") 및 대조군 비-편집된 항-ROR1 CAR 세포로부터 항-ROR1 $CAR^+$ $CD4^+$(상부) 및 $CD8^+$(하부) T 세포에 대한 억제 수용체(LAG3, TIM3, CD39 및 PD-1)의 발현을 보여준다. n = 5명의 독립적인 기증자.

**도 10a** 및 **10b**는 NR4A3-편집된 항-ROR1 CAR T 세포의 향상된 생체내 효능을 보여준다. **도 10a**는 종양 부피를 나타내고, **도 10b**는 피하 옆구리 H1975 이종이식 종양이 이식된 NSG 마우스의 생존을 보여준다. 마우스를 평균 종양 부피가 80-120 $mm^3$에 도달했을 때 NR4A-편집된 또는 대조군 비-편집된 항-ROR1 CAR T 세포를 마우스당 $0.6x10^6$(상부 패널, 저용량) 또는 $2x10^6$(하부 패널, 고용량) $CAR^+$ T 세포로 i.v. 처리했다. n = 군당 5마리의 마우스. 오차 막대는 평균 +/- SEM을 나타낸다. 로그 순위(Manel-Cox) 테스트를 통해 계산된 생존 곡선 통계이다. *** p < 0.001 및 *** p < 0.0001. 표시된 다양한 군에는 (i) NR4A1 녹아웃(삼각형), (ii) NR4A2 녹아웃(별), (iii) NR4A3 녹아웃(원), (iv) 대조군 비-편집된 항-ROR1 CAR(x 기호), 및 모의 비형질도입된 T 세포(사각형).

**도 11a** 및 **11b**는 NR4A 계열의 다음 다중 구성원의 수준이 감소되도록 변형된 항-ROR1 CAR T 세포에 의한 각각 A549-NLR 및 H1975-NLR 세포의 연속적인 용해를 보여준다: (1) NR4A1 및 NR4A2 모두("NR4A 1+2 DKO")(열린 원), (2) NR4A1 및 NR4A3 모두("NR4A 1+3 DKO")(삼각형), (3) NR4A2 및 NR4A3 모두("NR4A 2+3 DKO")(별) 및 (4) NR4A1, NR4A2 및 NR4A3("NR4A TKO")(별표). NR4A3(닫힌 원)만 수준이 감소된 항-ROR1 CAR T 세포도 비교 목적으로 표시된다. 모의(ROR1 CAR 또는 NR4A 편집 없이 비형질도입된 T 세포)(사각형)가 대조군으로 표시된다. H1975-NLR 표적 세포의 용해는 총 NLR 강도를 측정하여 정량화되었다. NLR 강도는 각 자극 라운드에 대해 재플레이팅한 후 시작 강도를 기준으로 정규화되었다. NLR - 누크라이트 레드(NucLight Red).

**도 12a-12c**는 A549 표적 세포를 사용한 순차적 자극 검정 동안(도 11a 참조) NR4A 계열의 다수 구성원의 수준이 감소된 항-ROR1 CAR T 세포에 의해 생성된 IFN-γ(**도 12a**), IL-2(**도 12b**) 및 TNF-α(**도 12c**) 수준을 보여준다. NR4A-편집된 항-ROR1 CAR T 세포 및 대조군은 도 11a 및 11b에서 기재된 것과 동일하다. 각 재플레이팅(즉, 자극 1, 자극 2, 자극 3, 자극 4 및 자극 5) 후 24시간 후에 상층액을 수집하고 사이토카인을 MSD로 정량화했다.

**도 13a-13c**는 H1975 표적 세포를 사용한 순차적 자극 검정 동안(도 11b 참조) NR4A 계열의 다수 구성원의 수준이 감소된 항-ROR1 CAR T 세포에 의해 생성된 IFN-γ(**도 13a**), IL-2(**도 13b**) 및 TNF-α(**도 13c**) 수준을 보여준다. NR4A-편집된 항-ROR1 CAR T 세포 및 대조군은 도 11a 및 11b에서 기재된 것과 동일하다. 각 재플레이팅(즉, 자극 1, 자극 2, 자극 3, 자극 4 및 자극 5) 후 24시간 후에 상층액을 수집하고 사이토카인을 MSD로 정량화했다.

**도 14**는 순차적 자극 검정에서 3명의 독립적 기증자에서 NR4A-편집(KO), 대조군 비-편집 NY-ESO-1 TCR T 세포 및 모의 비형질도입 T 세포에 의한 NY-ESO-1+ A375-NLR 흑색종 세포의 연속적인 용해를 보여준다. A375-NLR 표적 세포의 용해는 총 NLR 수를 측정하여 정량화되었다. NLR 수는 각 자극 라운드에 대해 재플레이팅후 시작 수를 기준으로 정규화되었다. NLR - 누크라이트 레드(NucLight Red). 각 그래프는 3명의 독립적인 기증자의 데이터를 보여준다.

**도 15a-15c**는 도 14에 상응하는 A375 순차 자극 검정 동안 NR4A-편집된, 대조군 비-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포, 및 모의 비형질도입된 T 세포로부터 생성된 분비된 인터페론-감마(IFN-γ)(**도 15a**), 인터루킨-2(IL-2)(**도**

15b) 및 종양괴사인자-알파(TNF-α)(도 15c)를 보여준다. 각 리플레이팅 후 24시간 후에 상등액을 수집하고 사이토카인을 MSD로 정량화했다. 그래프는 3명의 독립적인 기증자의 데이터를 보여준다. 도 15a-15c에서, 각 자극(즉, 자극1, 자극2, 자극3 및 자극4)에 대해 첫 번째 막대(왼쪽부터)는 NR4A1-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포(NR4A1 KO; 삼각형)이고; 두 번째 막대는 NR4A2-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포(NR4A2 KO; 별)이고; 세 번째 막대는 NR4A3-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포(NR4A3 KO; 닫힌 원)이고; 네 번째 막대는 비-편집된 대조군 NY-ESO-1 TCR T 세포(대조군, x 기호)이고; 다섯 번째 막대는 비형질도입된 T 세포(모의; 정사각형)이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0033] 본 개시내용은 감소된 수준의 핵 수용체 아계열 4 그룹 A 구성원 3(*NR4A3*)유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하고 *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질의 내인성 발현을 갖는 변형된 면역 세포 집단을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다. *NR4A3* 유전자 수준의 감소는 유전자 편집 기술, 예를 들어 CRISPR과 같은 유전자 편집 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 본 개시내용으로부터 명백해지고 본원에서 입증되는 바와 같이, 일부 측면에서, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 갖는 변형된 면역 세포는 또한 감소된 수준의 NR4A 계열의 다른 구성원을 발현할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 변형된 면역 세포는 (i) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 및 (ii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 갖는다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 변형된 면역 세포는 (i) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 및 (ii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 갖는다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 변형된 면역 세포는 (i) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, 및 (iii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 갖는다.

[0034] *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 발현 수준의 감소(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 수준 감소와 조합하여)는 하나 이상의 지속적인 이펙터 기능을 초래할 수 있다. 지속적인 이펙터 기능의 한 측면은 향상된 T 세포 활성화(예를 들어, 향상된 확장, 향상된 세포독성, 향상된 사이토카인 발현)이다. *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 수준 감소(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 수준 감소와 조합하여)는 탈진/기능장애 저항성 세포를 초래할 수 있다. 더욱이, *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 수준 감소(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 수준 감소와 조합하여)는 TME 환경에서 항종양 기능 유지를 초래할 수 있다.

[0035] 본 개시내용은 또한 예를 들어, 감소된 수준의 핵 수용체 아계열 4 그룹 A 구성원 3(*NR4A3*) 유전자 및/또는 NR4A3 단백질, 및 내인성 수준의 *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질를 발현하는 변형된 면역 세포를 생성하는 방법, 변형된 면역 세포를 사용하는 방법, 약제학 조성물 또는 키트를 제공한다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 이러한 방법, 약제학 조성물 또는 키트에 유용한 변형된 면역 세포는 (i) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질 또는 (iii) (i) 및 (ii) 모두을 갖도록 추가로 변형되었다.

[0036] 본 개시내용을 더 자세히 설명하기 전에, 본 개시내용은 설명된 특정 조성물 또는 공정 단계에 제한되지 않고, 물론 다양할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 본 개시내용을 읽을 때 당업자에게 명백한 바와 같이, 본원에 설명되고 예시된 개별 측면 각각은 본 개시내용의 범위 또는 정신으로부터 벗어나지 않고 다른 여러 측면 중 임의의 특징과 쉽게 분리되거나 조합될 수 있는 별개의 구성 요소 및 특징을 갖는다. 언급된 방법은 언급된 사건의 순서나 논리적으로 가능한 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0037] 본원에 제공된 표제는 전체로서 본 명세서를 참조하여 정의될 수 있는 본 개시내용의 다양한 측면의 제한이 아니다. 또한, 본원에 사용된 용어는 특정 측면을 기술하기 위한 목적일 뿐 제한하려는 의도가 아닌 것으로 이해되어야 하는데, 이는 본 개시내용의 범위가 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문이다.

[0038] I. 용어

[0039] 본 개시내용을 보다 쉽게 이해할 수 있도록, 먼저 특정 용어를 정의한다. 본 출원에 사용된 대로, 본원에 달리 명시적으로 제공된 경우를 제외하고 다음 각 용어는 아래에 설명된 의미를 갖는다. 추가적인 정의는 명세서 전반에 걸쳐 제시되어 있다.

[0040] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 용어 "하나"는 해당 엔터티 중 하나 이상을 의미하며; 예를 들어, "하나의 면역 세포"는 하나 이상의 면역 세포를 나타내는 것으로 이해된다. 따라서, 용어 "하나", "하나 이상" 및 "적어도 하

나"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0041] 더욱이, 본원에 사용된 "및/또는"은 다른 하나가 있거나 없는 두 개의 지정된 특징 또는 구성요소 각각의 특정 개시로서 간주되어야 한다. 따라서, 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 문구에 사용된 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독) 및 "B"(단독)를 포함하도록 의도된다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 문구에 사용된 용어 "및/또는"은 다음 측면 각각을 포함하도록 의도된다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0042] 본원에서 측면이 "포함하는"이라는 표현으로 설명되는 경우에는 "구성되는" 및/또는 "본질적으로 구성되는"이라는 용어로 설명되는 유사한 측면도 제공된다는 것이 이해된다.

[0043] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시와 관련된 기술 분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌은 본 개시내용에 사용된 많은 용어의 일반 사전을 숙련자에게 제공한다: the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 및 the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press.

[0044] 단위, 접두사 및 기호는 SI(Systeme International de Unites) 승인 형식으로 표시된다. 숫자 범위에는 범위를 정의하는 숫자가 포함된다. 달리 명시하지 않는 한, 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기록된다. 본원에 제공된 제목은 명세서 전체를 참조하여 가질 수 있는 본 개시의 다양한 측면을 제한하는 것이 아니다. 따라서, 바로 아래에 정의된 용어들은 본 명세서 전체를 참조함으로써 보다 완전하게 정의된다.

[0045] 본원에 사용된 약어는 본 개시내용 전반에 걸쳐 정의된다. 본 개시의 다양한 측면은 다음 하위섹션에서 더 자세히 설명된다.

[0046] "약" 또는 "본질적으로 포함하는"이라는 용어는 당업자에 의해 결정된 특정 값 또는 조성에 대해 허용가능한 오차 범위 내에 있는 값 또는 조성을 지칭하며, 이는 부분적으로 값이나 구성이 어떻게 측정되거나 결정되는지, 즉 측정 시스템의 한계에 따라 달라진다. 예를 들어, "약" 또는 "본질적으로 구성하는"은 당업계의 관행에 따라 1 또는 1 초과의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약" 또는 "본질적으로 구성하는"은 최대 10%의 범위를 의미할 수 있다. 더욱이, 특히 생물학적 시스템이나 과정과 관련하여, 이 용어는 최대 10배 또는 최대 5배의 값을 의미할 수 있다. 출원 및 청구범위에 특정 값 또는 조성이 제공되는 경우, 달리 명시되지 않는 한, "약" 또는 "을 본질적으로 포함하는"의 의미는 해당 특정 값 또는 구성에 대해 허용가능한 오차 범위 내에 있는 것으로 가정되어야 한다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 관심 값에 적용되는 용어 "대략"은 언급된 기준 값과 유사한 값을 지칭한다. 일부 측면에서, "대략"이라는 용어는 달리 명시되지 않거나 문맥에서 명백히 드러나지 않는 한(해당 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우 제외) 명시된 참조 값의 어느 방향(보다 크거나 작은)으로 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하에 속하는 값의 범위를 의미한다.

[0048] 본원에 기재된 바와 같이, 달리 명시하지 않는 한, 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비율 범위 또는 정수 범위는 언급된 범위 내의 임의의 정수 값 및 적절한 경우 그의 분수(예를 들어, 정수의 1/10 및 100분의 1)를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0049] 본원에 사용된 "투여하는"은 당업자에게 공지된 임의의 다양한 방법 및 전달 시스템을 사용하여 대상체에게 치료제 또는 치료제를 포함하는 조성물을 물리적으로 도입하는 것을 의미한다. 본원에 기재된 치료제에 대한 다양한 투여 경로에는 정맥내, 복강내, 근육내, 피하, 척수 또는 기타 비경구 투여 경로, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 투여 경로가 포함된다. 본원에 사용된 "비경구 투여"라는 문구는 일반적으로 주사에 의한 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 제한없이 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 림프내, 병변내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 경기관, 기관내, 폐, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 거미막하, 뇌실내, 유리체강내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입뿐만 아니라 생체내 전기천공법을 포함한다. 대안적으로, 본원에 기재된 치료제는 비경구 경로, 예를 들어 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어 비강내, 경구, 질내, 직장, 설하 또는 국소 투여를 통해 투여될 수 있다. 투여는 또한, 예를 들어 1회, 다수회 및/또는 1회 이상의 연장된 기간에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0050] 본원에 사용된 용어 "항원"은 단백질, 펩티드 또는 합텐과 같은 임의의 천연 또는 합성 면역원성 물질을 지칭한

다. 본원에 사용된 용어 "동족 항원"은 면역 세포(예를 들어, T 세포)가 인식하여 면역 세포의 활성화(예를 들어, 사이토카인 생성 및/또는 세포의 증식과 같은 이펙터 기능을 유도하는 세포내 신호를 유발하는)를 유도하는 항원을 의미한다.

[0051] 뉴클레오티드는 일반적으로 허용되는 단일 문자 코드로 지칭된다. 달리 명시하지 않는 한, 핵산은 5'에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기록된다. 뉴클레오티드는 IUPAC-IUB 생화학적 명칭 위원회(Biochemical Nomenclature Commission)에서 권장하는 일반적으로 알려진 한 글자 기호로 본원에서 지칭된다. 따라서 A는 아데닌, C는 시토신, G는 구아닌, T는 티민, U는 우라실을 나타낸다.

[0052] 개시된 서열에서 T 및 U는 서열이 DNA인지 RNA인지에 따라 상호교환 가능하다는 것이 이해되어야 한다. 예를 들어, 본 개시내용에서는 gRNA 스페이서 서열이 DNA(A/T/C/G)로 제시되는 반면, gRNA 키메라 프레임은 RNA(A/U/C/G)로 제시된다.

[0053] 아미노산은 일반적으로 알려진 세 글자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에서 권장하는 한 글자 기호로 본원에서 지칭된다. 달리 명시하지 않는 한, 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기록된다.

[0054] "폴리펩티드"는 적어도 2개의 연속적으로 연결된 아미노산 잔기를 포함하는 사슬을 의미하며, 사슬 길이에 대한 상한선은 없다. 단백질에서 하나 이상의 아미노산 잔기는 글리코실화, 인산화 또는 이황화 결합 형성과 같은 변형을 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. "단백질"은 하나 이상의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 달리 명시하지 않는 한, "단백질" 및 "폴리펩티드"라는 용어는 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0055] 본원에서 사용된 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하도록 의도된다. 핵산 분자는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있으며 cDNA일 수 있다.

[0056] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 이들의 유사체, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 임의의 길이의 뉴클레오티드 중합체를 지칭한다. 이 용어는 분자의 1차 구조를 나타낸다. 따라서, 이 용어에는 삼중, 이중 및 단일 가닥의 데옥시리보핵산("DNA")뿐만 아니라 삼중, 이중 및 단일 가닥의 리보핵산("RNA")도 포함된다. 이는 또한 예를 들어 알킬화 및/또는 캡핑에 의해 변형된 형태와 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 보다 구체적으로, 용어 "폴리뉴클레오티드"에는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(2-데옥시-D-리보스 함유), 폴리리보뉴클레오티드(D-리보스 함유), 스플라이싱 여부에 관계없이 mRNA 및 gRNA 포함하고, 퓨린 또는 피리미딘 염기의 N- 또는 C-글리코시드인 기타 유형의 폴리뉴클레오티드, 및 정상 핵산 백본을 함유하는 기타 중합체, 예를 들어 폴리아미드(예를 들어, 펩티드 핵산 "PNA") 및 폴리모르폴리노 중합체, 및 중합체가 DNA 및 RNA에서 발견되는 것과 같은 염기쌍 형성 및 염기 스태킹을 허용하는 구성의 핵염기를 함유하는 다른 합성 서열-특이적 핵산 중합체를 포함한다. 달리 명시하지 않는 한, 용어 "폴리뉴클레오티드", "핵산", "유전자", "cDNA" 및 "mRNA"는 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0057] "유전자"라는 용어는 폴리펩티드 사슬을 생성하는 데 관여하는 DNA 세그먼트를 의미한다. 여기에는 코딩 영역 앞과 뒤의 영역(리더 및 트레일러)뿐만 아니라 개별 코딩 세그먼트(엑손) 사이의 중간 서열(인트론)도 포함될 수 있다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미하는 것으로 의도된다. 벡터의 한 유형은 추가 DNA 세그먼트가 결찰될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 의미하는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기서 추가적인 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈에 결찰될 수 있다. 특정 벡터는 그것이 도입되는 숙주 세포에서 자율 복제가 가능하다(예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있으며, 이로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 벡터 형태이므로, "플라스미드"와 "벡터"는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나 동등한 기능을 수행하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터도 포함된다.

[0059] "암"은 신체 내 비정상 세포의 통제되지 않는 성장을 특징으로 하는 다양한 질병의 광범위한 군을 의미한다. 조절되지 않은 세포 분열과 성장으로 인해 주변 조직을 침범하는 악성 종양이 형성되고 림프계나 혈류를 통해 신체의 먼 부위로 전이될 수도 있다. 본원에 사용된 "암"은 원발성, 전이성 및 재발성 암을 의미한다.

[0060] 본원에 사용된 용어 "면역 반응"은 외래 물질에 대한 척추동물 내의 생물학적 반응을 의미하며, 이 반응은 이러한 물질 및 이들에 의해 유발되는 질병으로부터 유기체를 보호한다. 면역 반응은 면역계의 세포(예를 들어, T 림프구, B 림프구, 자연살해(NK) 세포, 대식세포, 호산구, 비만세포, 수지상 세포 또는 호중구) 및 임의의 이러한 세포 또는 침입한 병원체, 병원체에 감염된 세포 또는 조직, 암성 또는 기타 비정상 세포, 또는 자가면역 또는 병리학적 염증의 경우 정상적인 인간 세포 또는 조직을 척추동물의 몸에 선택적으로 표적화, 결합, 손상, 파괴 및/또는 제거하는 간(항체, 사이토카인 및 보체 포함)에 의해 생성된 가용성 거대분자의 작용에 의해 매개된다. 면역 반응에는, 예를 들어 T 세포, $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포와 같은 이펙터 T 세포 또는 Th 세포의 활성화 또는 억제, 또는 $T_{reg}$ 세포의 억제가 포함된다. 본원에 사용된 용어 "T 세포" 및 "T 림프구"는 상호교환가능하며 흉선에 의해 생산되거나 처리되는 임의의 림프구를 의미한다. 일부 측면에서, T 세포는 $CD4^+$ T 세포이다. 일부 측면에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다. 일부 측면에서, T 세포는 NKT 세포이다.

[0061] 본원에 사용된 용어 "항종양 면역 반응"은 종양 항원에 대한 면역 반응을 의미한다. 면역 반응 또는 면역계를 자극하는 능력의 증가는 T 세포 공동자극 수용체의 향상된 작용제 활성 및/또는 억제 수용체의 향상된 길항제 활성으로부터 발생할 수 있다. 면역 반응 또는 면역계를 자극하는 능력 증가는 면역 반응을 측정하는 검정, 예를 들어 사이토카인 또는 케모카인 방출, 세포용해 활성(표적 세포에서 직접 결정되거나 CD107a 또는 그랜자임 검출을 통해 간접적으로 결정) 및 증식의 변화를 측정하는 검정에서 $EC_{50}$의 배수 증가 또는 최대 활성 수준으로 반영될 수 있다. 일부 측면에서, 면역 반응 또는 면역계 활성을 자극하는 능력은, 예를 들어 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 100% 향상될 수 있다. 일부 측면에서, 면역 반응 또는 면역계 활성을 자극하는 능력은, 예를 들어 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 향상될 수 있다.

[0062] "대상체"에는 인간 또는 비인간 동물이 포함된다. "비인간 동물"이라는 용어는 비인간 영장류, 양, 개와 같은 척추동물, 및 마우스, 래트 및 기니아 피그와 같은 설치류를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 어떤 측면에서 대상체는 인간이다. "대상체" 및 "환자"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0063] 용어 "치료 유효량" 또는 "치료 유효 투여량"은 원하는 생물학적, 치료적 및/또는 예방적 결과를 제공하는 제제(예를 들어, 본원에 개시된 변형된 면역 세포)의 양을 의미한다. 그 결과는 질병의 징후, 증상 또는 원인 중 하나 이상의 감소, 개선, 경감, 약화, 지연 및/또는 완화, 또는 생물학적 시스템의 임의의 다른 원하는 변경일 수 있다. 고형 종양과 관련하여, 유효량은 종양을 수축시키고/시키거나 종양의 성장 속도를 감소시키거나(종양 성장을 억제하는 것과 같이) 다른 원치 않는 세포 증식을 예방하거나 지연시키기에 충분한 양을 포함한다. 일부 측면에서, 유효량은 종양 발달을 지연시키기에 충분한 양이다. 일부 측면에서, 유효량은 종양 재발을 예방하거나 지연시키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 조성물의 유효량은 예를 들어 (i) 암세포의 수를 감소시키고; (ii) 종양 크기를 감소시키고; (iii) 암세포가 말초 기관으로 침윤하는 것을 어느 정도 억제하고, 지연시키고, 느리게 하고, 중단시키고; (iv) 종양 전이를 억제시키고(즉, 어느 정도 늦추고), 정지시킬 수 있고, (v) 종양 성장을 억제시키고, (vi) 종양의 발생 및/또는 재발을 방지 또는 지연시키고; 및/또는 (vii) 암과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 완화시킨다.

[0064] 일부 측면에서, "치료 유효량"은 암의 상당한 감소 또는 진행성 고형 종양과 같은 암의 진행을 지연(퇴행)시키는 것으로 임상적으로 입증된 변형된 세포의 양이다. 질병 퇴행을 촉진하는 치료제의 능력은 숙련된 의사에게 공지된 다양한 방법, 예를 들어 임상 시험 동안의 인간 대상체에서, 인간에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서, 또는 시험관내 검정에서 치료제의 활성을 검정함으로써 평가될 수 있다.

[0065] 본원에서 사용되는 용어 "표준 치료"는 의료 전문가가 특정 유형의 질병에 대한 적절한 치료법으로 인정하고 의료 전문가가 널리 사용하는 치료법을 의미한다. 이 용어는 "모범 사례", "표준 의료" 및 "표준 치료법"과 같은 용어와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0066] 예를 들어, "항암제"는 대상체의 암 퇴행을 촉진하거나 추가 종양 성장을 예방한다. 일부 측면에서, 치료 유효량의 약물은 암을 제거하는 지점까지 암 퇴행을 촉진한다.

[0067] "암 퇴행 촉진"은 유효량의 약물을 단독으로 또는 항종양제와 함께 투여하여 종양 성장 또는 크기 감소, 종양

괴사, 적어도 하나의 질병 증상의 중증도 감소, 질병 증상이 없는 기간의 빈도 및 기간 증가, 질병으로 인한 손상이나 장애의 예방을 초래하는 것을 의미한다.

[0068] 치료와 관련하여 용어 "유효한" 및 "유효성"에는 약리학적 효과 및 생리학적 안전성이 모두 포함된다. 약리학적 효과는 환자에서 암 퇴행을 촉진하는 약물의 능력을 의미한다. 생리학적 안전성은 약물 투여로 인해 발생하는 독성 수준 또는 세포, 기관 및/또는 유기체 수준의 기타 불리한 생리학적 효과(부작용)를 의미한다.

[0069] 본원에 사용된 용어 "면역 체크포인트 억제제"는 하나 이상의 체크포인트 단백질을 전체적으로 또는 부분적으로 감소, 억제, 방해 또는 조절하는 분자를 의미한다. 체크포인트 단백질은 T 세포 활성화 또는 기능을 조절한다. CTLA-4과 그 리간드 CD80 및 CD86; 및 PD-1과 그 리간드 PD-L1 및 PD-L2와 같은 수많은 체크포인트 단백질이 알려져 있다. Pardoll, D.M., *Nat Rev Cancer* 12(4):252-64 (2012). 이들 단백질은 T-세포 반응의 공동자극 또는 억제 상호작용을 담당한다. 면역 체크포인트 단백질은 자가-관용과 생리적 면역 반응의 지속 기간 및 진폭을 조절하고 유지한다. 면역 체크포인트 억제제에는 항체가 포함되거나 항체에서 유래된다.

[0070] 본원에 사용된 용어 "산화 스트레스"는 과량의 산화제 및/또는 항산화제 수준의 감소를 특징으로 하는 상태를 의미한다. 세포 산화제는 산소 라디칼(초산화물 음이온, 하이드록실 라디칼 및/또는 퍼옥시 라디칼); 예를 들어 과산화수소 및 일중항 산소와 같은 반응성 비-라디칼 산소종; 탄소 라디칼; 질소 라디칼; 황 라디칼; 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 측면에서, 산화 스트레스의 상태는, 예를 들어 세포 손상, 세포 성능 손상 및/또는 세포 사멸을 초래할 수 있다.

[0071] 본원에 사용된 용어 "변형된 세포"는 비-자연 발생적 조작을 거쳐 세포의 표현형(즉, NR4A3 유전자 및/또는 또는 NR4A3 단백질의 발현 수준)이 변형되지 않은 세포(즉, 기준 세포)와 상이한 세포, 예를 들어 T 세포를 의미한다. 본 개시내용으로부터 명백해지는 바와 같이, 본원에 개시된 변형된 세포는 기준 세포(예를 들어, 변형되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현한다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 변형된 세포는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 정상 수준으로 발현할 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 변형된 세포는: (i) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 및 (ii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 발현할 수 있다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 세포는: (i) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 및 (ii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 발현할 수 있다. 일부 측면에서, 변형된 세포는: (i) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및 (iii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 발현할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "상응하는 세포"는 변형된 세포와 동일한 면역세포 분류에 속하는 세포를 의미한다. 예를 들어, 변형된 세포가 T 세포라면, 상응하는 세포도 T 세포일 것이다. 달리 표시되지 않는 한, "감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 갖는(발현) 변형된 세포"(이의 변이체 포함)는 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 및 (i) 내인성 수준의 *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질; (ii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질; (iii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질; 또는 (iv) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질과 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질 모두를 갖도록 변형된 세포(예를 들어, T 세포)를 포함한다.

[0072] 본원에 사용된 용어 "내인성 발현" 또는 "내인성 발현 수준" 또는 "내인성 수준"(또는 이의 변이체)은 자연적으로 발생하는(예를 들어, 유전자 및/또는 단백질이 비자연 발생 조작에 의해 직접적으로 조작되지 않은 유전자 및/또는 단백질)유전자 및/또는 단백질 발현(예를 들어, 양, 동역학 등)을 의미한다. 본 개시내용으로부터 명백해지는 바와 같이, 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 세포(예를 들어, NR4A3이 녹다운된 ROR1 CAR T 세포)는 내인성 수준의 *NR4A3* 유전자 또는 NR4A3 단백질을 발현하지 않지만, *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자는 녹다운되지 않았기 않기 때문에(예를 들어, CRISPR, 예를 들어 비자연 발생 조작에 의해), 변형된 세포는 *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A1 및 NR4A2 단백질을 내인적으로 발현한다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 또는 NR4A3 단백질을 발현하는 변형된 세포는 (i) *NR4A1* 유전자 또는 NR4A1 단백질, (ii) *NR4A2* 유전자 또는 NR4A2 단백질, 또는 (iii) (i)와 (ii) 모두의 감소된 수준을 발현하도록 추가로 변형될 수 있다.

[0073] 일부 측면에서, 변형된 세포는 외래 또는 외인성 핵산을 세포에 도입함으로써 생산된다. 일부 측면에서, 외래 또는 외인성 핵산은 본원에 개시된 유전자 편집 도구를 코딩할 수 있다. 핵산은, 예를 들어 전기천공(Heiser W. C. *Transcription Factor Protocols: Methods in Molecular Biology*™ 2000; 130: 117-134), 화학적(예를 들어, 인산칼슘 또는 지질) 형질감염(Lewis W. H., *et al.*, *Somatic Cell Genet.* 1980 May; 6(3): 333-47;

Chen C., *et al.*, *Mol Cell Biol.* 1987 August; 7(8): 2745-2752), 재조합 플라스미드를 함유하는 박테리아 원형질체와의 융합(Schaffner W. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980 April; 77(4): 2163-7), 또는 정제된 DNA의 세포의 핵으로 직접 미세주입(Capecchi M. R. *Cell.* 1980 November; 22(2 Pt 2): 479-88)에 의해 당업계에 공지된 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있다.

[0074] "변형된 세포" 또는 "세포"를 언급하는 개시내용은 해당 세포의 집단, 즉 다수의 해당 세포에 동일하게 적용가능하다는 것이 이해되어야 한다.

[0075] 본원에 사용된 용어 "상승된 농도" 또는 "상승된 수준" 및 그의 문법적 변형은 적절한 대조군(예를 들어, 건강한 조직 또는 세포)과 비교하여 물질(예를 들어, 반응성 산소종, ROS)의 정상 수준을 초과하는 것을 의미한다.

[0076] 본원에 사용된 용어 "활성 산소종" 및 "ROS"는 산소를 함유하고 다른 분자와 쉽게 반응하여 잠재적으로 손상을 주는 변형을 초래하는 반응성이 높은 화학 물질을 의미한다. 반응성 산소 종에는, 예를 들어 산소 이온, 자유 라디칼 및 과산화수소, 과산화물, 하이드록실 라디칼, 지질 하이드로퍼옥시다제 및 일중항 산소와 같은 무기 및 유기 과산화물이 포함된다. 이들은 일반적으로 매우 작은 분자이며 짝을 이루지 않은 원자가 껍질 전자의 존재로 인해 반응성이 높다. 거의 모든 암은 상승된 농도의 활성 산소종과 관련이 있다. Liou, G., *et al.*, *Free Radic Res* 44(5): 1-31 (2010).

[0077] 본원에 사용된 용어 "키메라 항원 수용체" 및 "CAR"은 항원이 세포외 도메인에 결합하면 세포가 특정 기능을 수행하도록 지시하는 세포내 도메인에 커플링된 항원-특이적 세포외 도메인을 갖는 재조합 융합 단백질을 의미한다. 용어 "인공 T 세포 수용체", "키메라 T 세포 수용체" 및 "키메라 면역수용체"는 각각 본원에서 용어 "키메라 항원 수용체"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 키메라 항원 수용체는 MHC-독립적인 항원에 결합하고 세포내 도메인을 통해 활성화 신호를 변환하는 능력으로 인해 다른 항원 결합제와 구별된다.

[0078] 키메라 항원 수용체의 항원-특이적 세포외 도메인은 항원, 일반적으로 악성 종양의 표면-발현 항원을 인식하고 특이적으로 결합한다. 항원-특이적 세포외 도메인은, 예를 들어 약 0.1 pM 내지 약 10 μM, 예를 들어 약 0.1 pM 내지 약 1 μM 또는 약 0.1 pM 내지 약 100 nM사이의 친화도 상수 또는 상호작용 친화도($K_D$)로 항원에 결합할 때 항원에 특이적으로 결합한다. 상호작용의 친화도를 결정하는 방법은 해당 분야에 알려져 있다. 본 개시내용의 CAR에 사용하기에 적합한 항원-특이적 세포외 도메인은 임의의 항원-결합 폴리펩티드일 수 있으며, 이들 중 매우 다양한 것이 당업계에 공지되어 있다. 일부 측면에서, 항원-결합 도메인은 단일 사슬 Fv(scFv)이다. 기타 항체-기반 인식 도메인(cAb VHH(낙타 항체 가변 도메인) 및 이의 인간화 버전, IgNAR VH(상어 항체 가변 도메인) 및 이의 인간화 버전, sdAb VH(단일 도메인 항체 가변 도메인) 및 "낙타화" 항체 가변 도메인은 사용하기에 또한 적합하다. 일부 측면에서, 단일 사슬 TCR(scTv, V.alpha.V.beta.를 함유하는 단일 사슬 2-도메인 TCR)과 같은 T 세포 수용체(TCR) 기반 인식 도메인도 사용하기에 적합하다.

[0079] 본원에 개시된 키메라 항원 수용체는 항원 특이적 세포외 도메인에 대한 항원 결합 시 세포에 세포내 신호를 제공하는(CAR을 발현하는) 세포내 도메인을 또한 포함할 수 있다. 일부 측면에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 키메라 수용체가 발현되는 T 세포의 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다.

[0080] "세포내 도메인"이라는 용어는 항원이 세포외 도메인에 결합할 때 이펙터 기능 신호를 변환하고 T 세포가 특수화된 기능을 수행하도록 지시하는 CAR의 부분을 의미한다. 적합한 세포내 도메인의 비-제한적 예에는 T-세포 수용체의 제타 사슬 또는 이의 상동체(예를 들어, 에타, 델타, 감마 또는 엡실론), MB 1 사슬, 829, Fc RIII, Fc RI 및 CD3.제타 및 CD28, CD27, 4-1BB, DAP-10, OX40와 같은 신호전달 분자의 조합 및 이들의 조합뿐만 아니라 기타 유사한 분자 및 단편이 포함된다. FcγRIII 및 FcεRI와 같은 활성화 단백질 계열의 다른 구성원의 세포내 신호전달 부분이 사용될 수 있다. 일반적으로 전체 세포내 도메인이 사용되지만, 많은 경우 전체 세포내 폴리펩티드를 사용할 필요는 없다. 이러한 절단된 부분은 여전히 이펙터 기능 신호를 변환하는 한, 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용될 수 있는 정도까지 온전한 사슬 대신에 사용될 수 있다. 따라서 세포내 도메인이라는 용어는 이펙터 기능 신호를 변환하기에 충분한 세포내 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다. 전형적으로, 항원-특이적 세포외 도메인은 막횡단 도메인에 의해 키메라 항원 수용체의 세포내 도메인에 연결된다. 막횡단 도메인은 세포막을 가로질러 CAR을 T 세포 표면에 고정시키고, 세포외 도메인을 세포내 신호전달 도메인에 연결하여 T 세포 표면에서 CAR의 발현에 영향을 준다. 키메라 항원 수용체는 또한 하나 이상의 공동자극 도메인 및/또는 하나 이상의 스페이서를 추가로 포함할 수 있다. 공동자극 도메인은 생체내에서 사이토카인 생산, 증식, 세포독성 및/또는 지속성을 향상시키는 공동자극 단백질의 세포내 신호전달 도메인으로부터 유래된다.

[0081] "펩티드 힌지" 또는 "스페이서"는 항원-특이적 세포외 도메인을 막횡단 도메인에 연결한다. 막횡단 도메인은 공동자극 도메인에 융합되고, 임의로 공동자극 도메인은 제2 공동자극 도메인에 융합되고, 공동자극 도메인은 CD3ζ에 제한되지 않는 신호전달 도메인에 융합된다. 예를 들어, 항원-특이적 세포외 도메인과 막횡단 도메인 사이, 및 직렬 CAR의 경우 다중 scFv 사이에 스페이서 도메인을 포함하면 항원-결합 도메인(들)의 유연성에 영향을 주어 CAR 기능에 영향을 미칠 수 있다. 적합한 막횡단 도메인, 공동자극 도메인 및 스페이서는 해당 분야에 알려져 있다.

[0082] 본원에 사용된 용어 "ug" 및 "uM"은 각각 "μg" 및 "μM"과 상호교환적으로 사용된다.

[0083] 본원에서 사용된 용어 "유전자-편집"은 세포의 게놈에 존재하는 유전 정보를 변경하는 과정을 의미한다. 이러한 유전자-편집은 게놈 DNA를 조작함으로써 수행될 수 있으며, 그 결과 유전 정보가 수정된다. 일부 측면에서, 이러한 유전자-편집은 편집된 DNA의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 일부 측면에서, 이러한 유전자-편집은 편집된 DNA의 발현에 영향을 미치지 않는다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 세포의 유전자-편집은 본원에 기재된 유전자 편집 도구를 사용하여 수행될 수 있다. 유전자 편집 도구의 비-제한적인 예에는 RNA 간섭 분자(예를 들어, shRNA, siRNA, miRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드, CRISPR, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화 제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제, 제한 엔도뉴클레아제 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0084] 본원에 사용된 용어 "뉴클레아제"는 DNA 절단에 대한 촉매 활성을 보유하는 효소를 의미한다. 원하는 인식 부위에 닉(nick) 또는 이중-가닥 파손을 유도하는 임의의 뉴클레아제 제제가 본원에 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 뉴클레아제 제제가 원하는 인식 부위에 닉 또는 이중-가닥 파손을 유도하는 한, 자연 발생적 또는 천연 뉴클레아제 제제가 사용될 수 있다. 대안적으로, 변형되거나 조작된 뉴클레아제 제제를 사용할 수 있다. "조작된 뉴클레아제 제제"는 원하는 인식 부위에서 닉 또는 이중-가닥 파손을 특이적으로 인식하고 유도하도록 천연 형태로부터 조작(변형 또는 유래)된 뉴클레아제를 포함한다. 따라서, 조작된 뉴클레아제 제제는 천연, 자연-발생 뉴클레아제 제제로부터 유래될 수 있거나 인공적으로 생성되거나 합성될 수 있다. 뉴클레아제 제제의 변형은 단백질 절단제에서 하나의 아미노산 또는 핵산 절단제에서 하나의 뉴클레오티드만큼 적을 수 있다. 일부 측면에서, 조작된 뉴클레아제는 인식 부위에서 닉 또는 이중 가닥 파손을 유도하는데, 여기서 인식 부위는 천연(조작되지 않은 또는 변형되지 않은) 뉴클레아제 제제에 의해 인식되었을 서열이 아니었다. 인식 부위 또는 다른 DNA에 닉 또는 이중-가닥 파손을 생성하는 것은 본원에서 인식 부위 또는 다른 DNA를 "자르거나" 또는 "절단하는" 것으로 지칭될 수 있다.

[0085] 본원에 사용된 "코딩 서열" 또는 "코딩 핵산"은 단백질, 예를 들어 Cas9 단백질, CAR 또는 TCR, 또는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 gRNA을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산(RNA 또는 DNA 분자)을 의미한다. 코딩 서열은 핵산이 투여되는 개체 또는 포유동물의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 추가로 포함할 수 있다. 코딩 서열은 코돈 최적화될 수 있다.

[0086] 본원에 사용된 "보체" 또는 "상보적인"은 왓슨-크릭(예를 들어, A-T/U 및 C-G) 또는 핵산 분자의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체 사이의 후그스틴 염기 쌍을 의미한다. "상보성"은 두 핵산 서열이 서로 역평행하게 정렬될 때 각 위치의 뉴클레오티드 염기가 상보적이 되도록 두 핵산 서열 사이에 공유되는 특성을 의미한다.

[0087] 본원에 기재된 다양한 측면은 다음 하위섹션에서 더 자세히 기재된다.

[0088] **II. 변형된 면역 세포**

[0089] 고형 종양에 대한 세포 면역치료법의 성공은 종양 미세환경에서 종양-침윤 림프구(TIL)의 탈진으로 인해 제한되어 왔다. 종양 항원에 대한 지속적인 노출은 세포 독성 및 사이토카인 생산의 점진적인 손실과 PD-1과 같은 억제 마커의 발현 증가를 특징으로 하는 T 세포 탈진을 초래한다(Wherry et al., *Nat. Rev. Immunol.* 15, 486-499 (2015)). 또한, 탈진된 TIL은 전사 인자, 특히 NR4A 계열을 상향조절하고 대안적으로 사용한다(Chen et al., *Nature* 567, 530-534 (2019)).

[0090] 본 개시내용은 변형된 면역 세포, 즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하고 결과적으로 향상된 기능, 예를 들어 지속적인 이펙터 기능 및/또는 감소된 탈진을 나타내는, 유전자 편집에 의해 변형된 세포를 제공한다(예를 들어, 감소된 수준의 NR4A3을 발현하지만 내인성 수준의 NR4A1 및 NR4A2를 발현하는 CAR T 세포, 예를 들어 감소된 수준의 NR4A3을 발현하지만 내인성 수준의 NR4A1 및 NR4A2를 발현하는 항-ROR1-CAR T 세포, 예를 들어 감소된 수준의 NR4A3을 발현하지만 내인성 수준의 NR4A1 및 NR4A2를 발현하는 면역 세포를 발현하는 TCR). 일부 측면에서, 이러한 변형된 면역 세포는 NR4A 계열의 다른 구성원의 감소된 수준도 발현하도록

추가로 변형되었다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 변형된 면역 세포는 또한 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 발현하도록 변형되었다. 일부 측면에서, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 변형된 면역 세포는 또한 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 발현하도록 변형되었다. 일부 측면에서, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 변형된 면역 세포는 또한 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질과 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질 둘 모두를 발현하도록 변형되었다.

[0091] **II.A. NR4A3**

[0092] 일반적으로 NR4A3으로 약칭되고 MINOR, CSMF, NOR1, CHN, 미토겐-유도 핵 고아 수용체, 뉴런-유래 고아 수용체, 핵 호르몬 수용체 NOR-1, "연골육종, EWS에 융합된 골격외 점액양", 및 TEC로도 알려진 핵 수용체 아계열 4 그룹 A 구성원 3은 인간에서 *NR4A3* 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. 고아 핵 수용체의 NR4A 계열에는 NR4A1(Nur77), NR4A2(Nurr1) 및 NR4A3(Nor-1)이 포함된다. 그들은 리간드-독립적인 방식으로 전사 인자로 작용한다. 이들의 기능은 대부분 다양한 세포외 신호에 의한 발현의 신속하고 일시적인 유도에 의해 제어되므로 즉시-초기 유전자로 간주된다. NR4A는 아폽토시스, 생존, 증식, 혈관신생, 염증, DNA 복구 및 지방산 대사를 포함하는 다양한 세포 기능에 관여한다.

[0093] *NR4A3* 유전자는 염색체 9(염기 99,821,885 내지 99,866,893; 45,039 염기; 플러스 가닥 방향; NCBI 참조 서열: NC_000009.12) 상에 위치한다. NR4A3은 세포- 및 반응 요소(표적)-특이적 방식으로 프로모터 영역의 조절 요소에 결합하는 전사 활성인자이다. NR4A3은 NR4A1 반응 요소(NBRE) 5'-AAAAGGTCA-3' 부위에 단량체로 결합하고 조절된 표적 유전자의 프로모터에 있는 Nur 반응 요소(NurRE) 부위에 동종이량체로 결합하여(유사성에 따라) 유전자 발현을 유도하고 다양한 세포 유형의 증식, 생존 및 분화를 조절하는 역할을 한다.

[0094] NR4A3 단백질은 대체 스플라이싱에 의해 생성된 3개의 이소폼을 갖는다. 서열은 아래 표 1에 나타나 있다.

[0095] **표 1. NR4A3 단백질 이소폼**

| | |
|---|---|
| NR4A3 이소폼 알파 (식별자: Q92570-1) (서열번호: 1) | MPCVQAQYSPSPPGSSYAAQTYSSEYTTEIMNPDYTKLTMDLGSTEITATATTSLPSIST<br>FVEGYSSNYELKPSCVYQMQRPLIKVEEGRAPSYHHHHHHHHHHHHHHQQQHQQPSIPPA<br>SSPEDEVLPSTSMYFKQSPPSTPTTPAFPPQAGALWDEALPSAPGCIAPGPLLDPPMKAV<br>PTVAGARFPLFHFKPSPPHPPAPSPAGGHHLGYDPTAAAALSLPLGAAAAAGSQAAALES<br>HPYGLPLAKRAAPLAFPPLGLTPSPTASSLLGESPSLPSPPSRSSSSGEGTCAVCGDNAA<br>CQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLSVGMVKE<br>VVRTDSLKGRRGRLPSKPKSPLQQEPSQPSPPSPPICMMNALVRALTDSTPRDLDYSRYC<br>PTDQAAAGTDAEHVQQFYNLLTASIDVSRSWAEKIPGFTDLPKEDQTLLIESAFLELFVL<br>RLSIRSNTAEDKFVFCNGLVLHRLQCLRGFGEWLDSIKDFSLNLQSLNLDIQALACLSAL<br>SMITERHGLKEPKRVEELCNKITSSLKDHQSKGQALEPTESKVLGALVELRKICTLGLQR<br>IFYLKLEDLVSPPSIIDKLFLDTLPF |
| NR4A3 이소폼 베타 (식별자: Q92570-2) (서열번호: 2) | MPCVQAQYSPSPPGSSYAAQTYSSEYTTEIMNPDYTKLTMDLGSTEITATATTSLPSIST<br>FVEGYSSNYELKPSCVYQMQRPLIKVEEGRAPSYHHHHHHHHHHHHHHQQQHQQPSIPPA<br>SSPEDEVLPSTSMYFKQSPPSTPTTPAFPPQAGALWDEALPSAPGCIAPGPLLDPPMKAV<br>PTVAGARFPLFHFKPSPPHPPAPSPAGGHHLGYDPTAAAALSLPLGAAAAAGSQAAALES<br>HPYGLPLAKRAAPLAFPPLGLTPSPTASSLLGESPSLPSPPSRSSSSGEGTCAVCGDNAA<br>CQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLSVGMVKE<br>VVRTDSLKGRRGRLPSKPKSPLQQEPSQPSPPSPPICMMNALVRALTDSTPRDLDYSRVS<br>FMISCFQMNDQGLYLWLLVIRVD |
| NR4A3 이소폼 3 (식별자: Q92570-3) (서열번호: 3) | MHDSIRFGNVDMPCVQAQYSPSPPGSSYAAQTYSSEYTTEIMNPDYTKLTMDLGSTEITA<br>TATTSLPSISTFVEGYSSNYELKPSCVYQMQRPLIKVEEGRAPSYHHHHHHHHHHHHHHQ<br>QQHQQPSIPPASSPEDEVLPSTSMYFKQSPPSTPTTPAFPPQAGALWDEALPSAPGCIAP<br>GPLLDPPMKAVPTVAGARFPLFHFKPSPPHPPAPSPAGGHHLGYDPTAAAALSLPLGAAA<br>AAGSQAAALESHPYGLPLAKRAAPLAFPPLGLTPSPTASSLLGESPSLPSPPSRSSSSGE<br>GTCAVCGDNAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRF<br>QKCLSVGMVKEVVRTDSLKGRRGRLPSKPKSPLQQEPSQPSPPSPPICMMNALVRALTDS<br>TPRDLDYSRYCPTDQAAAGTDAEHVQQFYNLLTASIDVSRSWAEKIPGFTDLPKEDQTLL<br>IESAFLELFVLRLSIRSNTAEDKFVFCNGLVLHRLQCLRGFGEWLDSIKDFSLNLQSLNL<br>DIQALACLSALSMITERHGLKEPKRVEELCNKITSSLKDHQSKGQALEPTESKVLGALVE<br>LRKICTLGLQRIFYLKLEDLVSPPSIIDKLFLDTLPF |

[0096]

[0097] **II.B. NR4A2**

[0098] 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질에 더하여, 일부 측면에서, 본원에 기재된 변형된 세포는 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 갖도록 추가로 변형될 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 본원에 기재된 변형된 세포에서 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 수준을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 수준은 본원에 설명된 유전자 편집

도구(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템) 중 임의의 것을 사용하여 감소될 수 있다.

[0099] 일반적으로 NR4A2로 약칭되며 NOT, RNR1, HZF-3, NURR1, TINUR로도 알려져 있는 핵 수용체 아계열 4 그룹 A 구성원 2는 인간에서 *NR4A2* 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. *NR4A2* 유전자는 염색체 2(염기 156,324,432 내지 156,332,724, NCBI 참조 서열: NC_000002.12) 상에 위치한다. 달리 명시하지 않는 한, 본원에서 사용되는 "***NR4A2* 유전자**"라는 용어는 NR4A2 단백질(또는 이의 변이체)을 코딩하는 임의의 핵산 서열을 의미한다.

[0100] NR4A2 단백질은 대체 스플라이싱에 의해 생산된 두 개의 이소폼을 갖는다. 서열은 아래 표 2에 나타나 있다. 달리 지시되지 않는 한, 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역 세포는 임의의 공지된 NR4A2 단백질(이의 임의의 이소폼 및 변이체 포함)의 감소된 수준을 갖도록 추가로 변형되었다. *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 수준을 감소시키는 적합한 방법은 본 개시내용의 다른 곳에 기재되어 있으며 또한 당업계에 공지되어 있다.

[0101] **표 2. NR4A2 단백질 이소폼**

| | |
|---|---|
| NR4A2 이소폼 1 (식별자: P43354-1) (서열번호: 43) | MPCVQAQYGSSPQGASPASQSYSYHSSGEYSSDFLTPEFVKFSMDLTNTEITATTSLPSFSTFMD<br>NYSTGYDVKPPCLYQMPLSGQQSSIKVEDIQMHNYQQHSHLPPQSEEMMPHSGSVYYKPSSPPTP<br>TTPGFQVQHSPMWDDPGSLHNFHQNYVATTHMIEQRKTPVSRLSLFSFKQSPPGTPVSSCQMRFD<br>GPLHVPMNPEPAGSHHVVDGQTFAVPNPIRKPASMGFPGLQIGHASQLLDTQVPSPPSRGSPSNE<br>GLCAVCGDNAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLA<br>VGMVKEVVRTDSLKGRRGRLPSKPKSPQEPSPPSPPVSLISALVRAHVDSNPAMTSLDYSRFQAN<br>PDYQMSGDDTQHIQQFYDLLTGSMEIIRGWAEKIPGFADLPKADQDLLFESAFLELFVLRLAYRS<br>NPVEGKLIFCNGVVLHRLQCVRGFGEWIDSIVEFSSNLQNMNIDISAFSCIAALAMVTERHGLKE<br>PKRVEELQNKIVNCLKDHVTFNNGGLNRPNYLSKLLGKLPELRTLCTQGLQRIFYLKLEDLVPPP<br>AIIDKLFLDTLPF |
| NR4A2 이소폼 2 (식별자: P43354-2) (서열번호: 44) | MDNYSTGYDVKPPCLYQMPLSGQQSSIKVEDIQMHNYQQHSHLPPQSEEMMPHSGSVYYKPSSPP<br>TPTTPGFQVQHSPMWDDPGSLHNFHQNYVATTHMIEQRKTPVSRLSLFSFKQSPPGTPVSSCQMR<br>FDGPLHVPMNPEPAGSHHVVDGQTFAVPNPIRKPASMGFPGLQIGHASQLLDTQVPSPPSRGSPS<br>NEGLCAVCGDNAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKC<br>LAVGMVKEVVRTDSLKGRRGRLPSKPKSPQEPSPPSPPVSLISALVRAHVDSNPAMTSLDYSRFQ<br>ANPDYQMSGDDTQHIQQFYDLLTGSMEIIRGWAEKIPGFADLPKADQDLLFESAFLELFVLRLAY<br>RSNPVEGKLIFCNGVVLHRLQCVRGFGEWIDSIVEFSSNLQNMNIDISAFSCIAALAMVTERHGL<br>KEPKRVEELQNKIVNCLKDHVTFNNGGLNRPNYLSKLLGKLPELRTLCTQGLQRIFYLKLEDLVP<br>PPAIIDKLFLDTLPF |

[0102]

[0103] II.C. NR4A1

[0104] 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질에 더하여, 일부 측면에서, 본원에 기재된 변형된 세포는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 갖도록 추가로 변형될 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 본원에 기재된 변형된 세포에서 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질의 수준을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질의 수준은 본원에 설명된 유전자 편집 도구(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템) 중 임의의 것을 사용하여 감소될 수 있다.

[0105] 일반적으로 NR4A1로 약칭되고 HMR, N10, TR3, NP10, GFRP1, NAK-1, NGFIB 및 NUR77로도 알려진 핵 수용체 아계열 4 그룹 A 구성원 1은 인간에서 *NR4A1* 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. *NR4A1* 유전자는 염색체 12(염기 52022832 내지 52059507, NCBI 참조 서열 NC_000012.12) 상에 위치한다. 달리 명시하지 않는 한, 본원에서 "***NR4A1* 유전자**"라는 용어는 NR4A1 단백질(또는 이의 변이체)을 코딩하는 임의의 핵산 서열을 의미한다.

[0106] NR4A1 단백질은 대체 스플라이싱에 의해 생산된 3개의 이소폼을 갖는다. 서열은 아래 표 3에 나타나 있다.

[0107] **표 3. NR4A1 단백질 이소폼**

| | |
|---|---|
| NR4A1 이소폼 1 (식별자: P22736-1) (서열번호: 45) | MPCIQAQYGTPAPSPGPRDHLASDPLTPEFIKPTMDLASPEAAPAAPTALPSFSTFMDGYTGEFD TFLYQLPGTVQPCSSASSSASSTSSSSATSPASASFKFEDFQVYGCYPGPLSGPVDEALSSSGSD YYGSPCSAPSPSTPSFQPPQLSPWDGSFGHFSPSQTYEGLRAWTEQLPKASGPPQPPAFFSFSPP TGPSPSLAQSPLKLFPSQATHQLGEGESYSMPTAFPGLAPTSPHLEGSGILDTPVTSTKARSGAP GGSEGRCAVCGDNASCQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYICLANKDCPVDKRRRNRCQFCRFQ KCLAVGMVKEVVRTDSLKGRRGRLPSKPKQPPDASPANLLTSLVRAHLDSGPSTAKLDYSKFQEL VLPHFGKEDAGDVQQFYDLLSGSLEVIRKWAEKIPGFAELSPADQDLLLESAFLELFILRLAYRS KPGEGKLIFCSGLVLHRLQCARGFGDWIDSILAFSRSLHSLLVDVPAFACLSALVLITDRHGLQE PRRVEELQNRIASCLKEHVAAVAGEPQPASCLSRLLGKLPELRTLCTQGLQRIFYLKLEDLVPPP PIIDKIFMDTLPF |
| NR4A1 이소폼 2 (식별자: P22736-2) (서열번호: 46) | MWLAKACWSIQSEMPCIQAQYGTPAPSPGPRDHLASDPLTPEFIKPTMDLASPEAAPAAPTALPS FSTFMDGYTGEFDTFLYQLPGTVQPCSSASSSASSTSSSSATSPASASFKFEDFQVYGCYPGPLS GPVDEALSSSGSDYYGSPCSAPSPSTPSFQPPQLSPWDGSFGHFSPSQTYEGLRAWTEQLPKASG PPQPPAFFSFSPPTGPSPSLAQSPLKLFPSQATHQLGEGESYSMPTAFPGLAPTSPHLEGSGILD TPVTSTKARSGAPGGSEGRCAVCGDNASCQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYICLANKDCPVD KRRRNRCQFCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSLKGRRGRLPSKPKQPPDASPANLLTSLVRAHLDSGP STAKLDYSKFQELVLPHFGKEDAGDVQQFYDLLSGSLEVIRKWAEKIPGFAELSPADQDLLLESA FLELFILRLAYRSKPGEGKLIFCSGLVLHRLQCARGFGDWIDSILAFSRSLHSLLVDVPAFACLS ALVLITDRHGLQEPRRVEELQNRIASCLKEHVAAVAGEPQPASCLSRLLGKLPELRTLCTQGLQR IFYLKLEDLVPPPPIIDKIFMDTLPF |
| NR4A1 이소폼 3 (식별자: P22736-3) (서열번호: 47) | MPCIQAQYGTPAPSPGPRDHLASDPLTPEFIKPTMDLASPEAAPAAPTALPSFSTFMDGYTGEFD TFLYQLPGTVQPCSSASSSASSTSSSSATSPASASFKFEDFQVYGCYPGPLSGPVDEALSSSGSD YYGSPCSAPSPSTPSFQPPQLSPWDGSFGHFSPSQTYEGLRAWTEQLPKASGPPQPPAFFSFSPP TGPSPSLAQSPLKLFPSQATHQLGEGESYSMPTAFPGLAPTSPHLEGSGILDTPVTSTKARSGAP GGSEGRCAVCGDNASCQHYGVRTCEGCKGFFKVPRSPRWGLLLEMERGWPHPIGTCGLPLGSPPS |

[0108]

[0109] 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 세포 조성물은 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 감소된 수준의 NR4A3 단백질 및 ROR1에 특이적으로 결합하는 결합 분자를 발현하고 (i) *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질의 내인성 발현을 갖는 변형된 면역 세포 집단을 포함한다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 (i) ROR1에 특이적으로 결합하는 결합 분자를 발현하고; (ii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 가지며; (iii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 갖는다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 (i) ROR1에 특이적으로 결합하는 결합 분자를 발현하고; (ii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 가지며; (iii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 갖는다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 (i) ROR1에 특이적으로 결합하는 결합 분자를 발현하고; (ii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 가지며; (iii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 가지며; (iv)감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 갖는다. 본원에서 사용된 용어 "*NR4A3* 유전자"는 임의의 전사체, 게놈 DNA, pre-mRNA 또는 mRNA를 의미한다. 본원에 사용된 용어 "NR4A3 단백질"은 상기 개시된 이소폼 알파, 이소폼 베타 또는 이소폼 3뿐만 아니라 이들의 변이체 및 돌연변이체를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 NR4A3 단백질은 또한 야생형 NR4A3 단백질의 적어도 하나의 기능을 갖는 본원에 개시된 임의의 이소폼의 임의의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0110] 본원에 사용된 용어 "수준 감소"(또는 이의 변이체)는 물리적 수준의 감소(예를 들어, 게놈으로부터의 편집으로 인해 유전자 서열이 적거나, 단백질 발현의 감소로 인해 단백질이 적은) 및 기능상 감소를 모두 의미한다. 예를 들어, *NR4A3* 유전자 수준의 감소는, 예를 들어 정지 코돈 또는 프레임 이동을 도입하는 돌연변이의 도입, 전사를 변경하는 후성적 변형, 또는 돌연변이 또는 프로모터 유전자 또는 NR4A3 발현을 조절하는 다른 유전자 상의 다른 변화로 인한 유전자 기능의 감소를 의미할 수 있다. 일부 측면에서, 변형된 세포에서 *NR4A3* 유전자 수준의 감소는 기준 세포와 비교하여 기능성 NR4A3 단백질, 예를 들어 야생형 NR4A3 단백질을 코딩할 수 있는 게놈 DNA, pre-mRNA 및/또는 mRNA의 양(예를 들어 농도)의 감소를 의미한다. 유사하게, NR4A3 단백질의 감소는 기능성 NR4A3 단백질, 예를 들어 야생형 NR4A3 단백질의 발현을 초래하는 변화를 의미할 수 있으며, 여기에는 기능 손실(부분 또는 전체)을 초래하는 변화(예를 들어, 돌연변이 또는 번역 후 변형) 또는 NR4A3의 기능적 부위에 결합하여 다른 세포 신호전달 파트너와의 상호 작용을 변경하는 분자의 활성의 변화를 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0111] *NR4A3* 유전자 수준(예를 들어, 전체 유전자 또는 이의 일부, 또는 유전자 기능의 존재/부재)은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다. NR4A3 단백질 수준(예를 들어, NR4A3 단백질 또는 이의 단편, 또는 정량화 또는 단백질 기능의 존재/부재)은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 측정할 수 있다.

[0112] 일부 측면에서, 면역 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR-발현 세포) 집단에서 *NR4A3* 유전자의 발현 수준 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준은 기준 면역 세포, 예를 들어 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포의 집단과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적

어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 감소된다. 일부 측면에서, 면역 세포 집단(예를 들어, CAR-발현 세포 집단 또는 TCR-발현 세포 집단)에서 단백질 내 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현은 변형 후에 완전히 억제된다.

[0113] 일부 측면에서, 면역 세포 집단에서 *NR4A3* 유전자의 발현 수준은 기준 면역 세포, 예를 들어 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자를 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포의 집단과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 감소한다.

[0114] 일부 측면에서, 면역 세포 집단에서 NR4A3 단백질의 발현 수준은 기준 면역 세포, 예를 들어 더 낮은 수준의 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포의 집단과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 감소한다.

[0115] 일부 측면에서, 면역 세포 집단에서 *NR4A3* 유전자 및 NR4A3 단백질의 발현 수준은 기준 면역 세포, 예를 들어 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포의 집단과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 감소된다.

[0116] 유사하게, 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 세포)는 또한 기준 면역 세포 (예를 들어 더 낮은 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포) 집단과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 감소된 *NR4A1*유전자 및/또는 NR4A1 단백질 수준을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 세포)는 또한 기준 면역 세포(예를 들어 더 낮은 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포) 집단과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 감소된 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 수준을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 세포)는 또한 (i) 기준 면역 세포(예를 들어 더 낮은 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포) 집단과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 감소된 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질의 수준을 갖고; 및 (ii) 기준 면역 세포(예를 들어 더 낮은 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포) 집단과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 감소된 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 수준을 갖는다.

[0117] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 세포)는 림프구, 호중구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 세포 집단)는 림프구를 포함한다. 본원에 사용된 "변형된 면역 세포"에는 원래 변형된 면역 세포의 자손 세포가 포함되며, 자손 세포는 또한 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현한다(단독으로 또는 감소된 수

준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여).

[0118] 일부 측면에서, 면역 세포 집단은 순수 집단이다. 일부 측면에서, 순수 집단은 동일한 면역 세포 유형에 속하는 세포(예를 들어, 면역 세포의 99%가 림프구)를 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 99% 포함한다. 일부 측면에서, 면역 세포 집단은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 상이한 세포 유형을 포함하며, 예를 들어 2가지 세포 유형을 포함하는 면역 세포 집단은 림프구 및 수지상 세포를 포함할 수 있다.

[0119] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포 집단은 림프구를 포함하거나, 구성하거나, 본질적으로 구성한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포의 집단은 림프구를 포함하며, 여기서 림프구는 T 세포, 종양-침윤 림프구(TIL), 림포카인-활성화 살해 세포, 자연 살해(NK) T 세포, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 특정 측면에서, 림프구는 T 세포이다. 일부 특정 측면에서 림프구는 NK 세포이다.

[0120] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포는 T 세포이다. 일부 측면에서, T 세포는 CAR을 포함한다. 일부 측면에서, CAR을 발현하도록 제조될 수 있는 변형된 T 세포(CAR T 세포)는 예를 들어 $CD8^+$ T 세포 또는 $CD4^+$ T 세포이다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 CAR-발현 세포는 CAR T 세포, 예를 들어 모노 CAR T 세포, 게놈-편집된 CAR T 세포, 이중 CAR T 세포, 또는 직렬 CAR T 세포이다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형 세포는 NK 세포이다. 일부 측면에서, NK 세포는 CAR을 포함한다. 일부 측면에서, CAR NK 세포는 모노 CAR NK 세포, 이중 CAR NK 세포, 또는 직렬 CAR NKT 세포이다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 변형된 세포는 T 세포 및 NK 세포를 모두 포함한다. 일부 측면에서, T 세포 및 NK 세포는 둘 다 CAR을 포함한다. 이러한 CAR T 세포 및 CAR NK 세포의 예는 국제 출원 번호 PCT/US2019/044195(WO2020028400A1로 공개됨)에 제공되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0121] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 임의의 면역 세포 유형일 수 있다. 일부 측면에서, 세포는 임의의 입양 세포 전달(ACT) 치료법(또한 입양 세포 치료법으로도 알려진)을 위해 변형된 면역 세포이다. ACT 치료법은 자가유래 치료법 또는 동종이계 치료법일 수 있다. 일부 측면에서, ACT 치료법은 CAR T 치료법, 종양-침윤 림프구(TIL) 치료법, NK 세포 치료법, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0122] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 TIL 치료법을 위한 TIL이다. 암을 치료하기 위한 입양 세포 전달 치료법으로 TIL을 사용하는 것은 흑색종에 대한 TIL 입양 세포 치료법을 사용하여 20년 이상 연구되어 왔다. Rosenberg SA *et al.*, (July 2011). *Clinical Cancer Research* 17 (13): 4550-7 (July 2011). 입양 T 세포 전달 치료법에서 TIL은 작은 조각으로 절단된 외과적으로 절제된 종양이나 종양 조각에서 분리된 단일 세포 현탁액으로부터 생체외에서 확장된다. 다수의 개별 배양물을 확립하고 별도로 성장시키며 특정 종양 인식에 대해 검정한다. TIL은 몇 주에 걸쳐 확장된다. 최고의 종양 반응성을 나타내는 선택된 TIL 계통은 일반적인 2주 동안 항-CD3 활성화를 사용하는 "신속 확장 프로토콜"(REP)에서 추가로 확장된다. 배양에서 성장한 TIL은 생체외 과정 중 언제든지 변형될 수 있으므로 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질(단독으로 또는 NR4A 계열의 다른 구성원, 예를 들어 NR4A1 및/또는 NR4A2와 조합하여)의 발현이 감소된다. 최종 REP 이후 TIL은 환자에게 다시 주입된다. 이 과정에는 종양 부위를 둘러쌀 수 있는 충분한 접근을 입양 전달된 TIL에 제공하기 위해 내인성 림프구를 고갈시키는 예비 화학치료법 요법이 포함될 수도 있다.

[0123] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포, 예를 들어 T 세포는 T 세포 수용체(TCR), 예를 들어 조작된 T 세포 수용체를 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포, 예를 들어 T 세포는 종양 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포, 예를 들어 림프구는 T 세포 수용체, 예를 들어 조작된 TCR을 갖는 T 세포이다. 본원에 사용된 용어 "조작된 TCR" 또는 "조작된 T 세포 수용체"는 선택되고, 클로닝되고 및/또는 이후 T 세포 집단에 도입되는 주요 조직적합성 복합체(MHC)/펩티드 표적 항원에 원하는 친화도로 특이적으로 결합하도록 조작된 T 세포 수용체(TCR)를 의미한다.

[0124] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 세포에서 발현될 수 있는 CAR 또는 TCR은 종양 세포, 예를 들어 악성 B 세포, 악성 T 세포, 또는 악성 형질 세포 상에서 발현된 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합(즉, 표적화)한다.

[0125] 일부 측면에서, CAR은 CD19, TRAC, TCRβ, BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL- 13Ra2, 메조텔린, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-베타, SSEA-4, CD20, 엽산 수용체 알파, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, 프로스타아제, PAP, ELF2M, 에프린(Ephrin) B2, IGF-I 수용체, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, 티로시나제, EphA2, 푸코실 GM1, sLe, GM3, TGS5,

HMWMAA, o-아세틸-GD2, 엽산 수용체 베타, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, 폴리시알산, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, 레구마인, HPV E6, E7, MAGE A1, ETV6-AML, 정자 단백질 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-관련 항원 1, p53, p53 돌연변이, 프로스테인, 생존(surviving), 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이(예를 들어, KRAS, HRAS, NRAS 돌연변이 단백질 포함), hTERT, 육종 전위 중단점, ML-IAP, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 장내 카복실 에스테라제, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, APRIL 단백질의 세포외 일부 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합(즉, 표적화)한다.

[0126] 일부 측면에서, 본 개시내용의 변형된 세포는 항원을 표적화하는 T 세포 수용체(TCR)를 발현할 수 있다. T 세포 수용체는 2개의 상이한 막횡단 폴리펩티드 사슬, 즉 α 사슬과 β 사슬로 구성된 이종이량체이고, 각각은 T 세포 표면 막 내부에 사슬을 고정하는 불변 영역과 MHC가 제시하는 항원을 인식하고 결합하는 가변 영역으로 구성된다. TCR 복합체는 2개의 이종이량체, CD3γε 및 CD3δε와 1개의 동종이량체 CD3 ζ를 형성하는 6개의 폴리펩티드와 연관되어 있으며, 이들은 함께 CD3 복합체를 형성한다. T 세포 수용체-조작된 T 세포 치료법은 특정 종양 세포에서 발현되는 항원을 특이적으로 표적화하기 위해 이러한 복합체를 유지하는 T 세포의 변형을 활용한다.

[0127] 일부 측면에서, 변형된 TCR 조작된 세포는 주요 유형, 즉 공유 종양-관련 항원(공유 TAA) 및 독특한 종양-관련 항원(고유 TAA), 또는 종양-특이적 항원을 표적화할 수 있다. 전자에는 암-고환(CT) 항원, 과발현된 항원 및 분화 항원이 제한 없이 포함될 수 있는 반면, 후자에는 신생항원 및 종양바이러스 항원이 제한 없이 포함될 수 있다. 인유두종바이러스(HPV) E6 단백질과 HPV E7 단백질은 종양바이러스 항원의 범주에 속한다.

[0128] 일부 측면에서, 변형된 TCR 조작된 세포는 CT 항원, 예를 들어 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9.23, MAGE-A10 및 MAGE-A12를 포함하지만 이로 제한되지 않는 흑색종-관련 항원(MAGE)을 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, 변형된 TCR 조작된 세포는 흑색종 및 정상 멜라닌세포에서 주로 발견되는 당단백질(gp100), T 세포에 의해 인식되는 흑색종 항원(MART-1) 및/또는 티로시나제를 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, 변형된 TCR 조작된 세포는 윌름스 종양 1(WT1), 즉 대부분의 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프성 백혈병, 거의 모든 유형의 고형 종양 및 심장 조직과 같은 여러 중요한 조직에서 고도로 발현되는 한 종류의 과발현 항원을 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, 변형된 TCR 조작된 세포는 중피종에서 고도로 발현되지만 기관을 포함한 여러 조직의 중피 세포에도 존재하는 또 다른 종류의 과발현 항원인 메조텔린을 표적화할 수 있다.

[0129] 일부 측면에서, 변형된 TCR 조작된 세포는 개별 종양에 특이적인 무작위 체세포 돌연변이에 의해 형성될 수 있는 임의의 신생항원을 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, TCR은 AFP, CD19, TRAC, TCRβ, BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL- 13Ra2, 메조텔린, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-베타, SSEA-4, CD20, 엽산 수용체 알파, ERBB2(Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, 프로스타제, PAP, ELF2M, 에프린 B2, IGF -I 수용체, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, 티로시나제, EphA2, 푸코실 GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-아세틸-GD2, 엽산 수용체 베타, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, 폴리시알산, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, 레구마인, HPV E6, E7, MAGE A1, ETV6-AML, 정자 단백질 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-관련 항원 1, p53, p53 돌연변이, 프로스테인, 생존(surviving), 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이(예를 들어, KRAS, HRAS, NRAS 돌연변이 단백질 포함), hTERT, 육종 전위 중단점, ML-IAP, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 장 카복실 에스테라제, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, APRIL 단백질의 세포외 부분 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 암 항원에 특이적으로 결합(즉, 표적화)한다.

[0130] 일부 측면에서, 본 개시내용의 변형된 면역 세포, 예를 들어 CAR T 또는 NK 세포 또는 TCR-조작된 T 세포는 위에 개시된 종양 항원 중 어느 하나 또는 이들의 조합을 표적화할 수 있다. 수용체 티로신 키나제-유사 고아 수용체 1(ROR1)은 삼중 음성 유방암(TNBC) 환자의 약 57%, 비소세포폐암종(NSCLC) 선암종 환자의 42%에서 과발현

되며(Balakrishnan 2017) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포에 대한 매우 매력적인 표적이다. 수용체 티로신 키나제-유사 고아 수용체 1-양성(ROR1$^{+}$) 고형 종양은 항-ROR1 CAR T 세포로 안전하게 표적화할 수 있다(Specht 2020); 그러나 CAR T 세포는 고형-종양 악성 종양 환자에게 주입 후 탈진이나 기능장애를 보이기 때문에 부분적으로 효능이 제한되었다. 또한 고형 종양에는 CAR T 세포와 같은 면역치료법의 항종양 활성을 제한하는 면역-억제 장벽이 있다(Newick 2016, Srivastava 2018, Martinez 2019). 어느 하나의 이론에 얽매이기를 바라지 않고, 본원에 기재된 항-ROR1 키메라 결합 단백질을 발현하는 세포는 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하고, *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질의 내인성 발현을 갖도록 변형되었다. 그리고, 본원에 기재되고 입증된 바와 같이, 일부 측면에서, 항-ROR1 키메라 결합 단백질을 발현하고 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는 이러한 세포는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 발현하도록 추가로 변형되었다. 일부 측면에서, 이러한 세포(즉, 항-ROR1 키메라 결합 단백질을 발현하고 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는)는 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 발현하도록 추가로 변형되었다. 일부 측면에서, 이러한 세포(즉, 항-ROR1 키메라 결합 단백질을 발현하고 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하는)는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질과 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 모두 발현하도록 추가로 변형되었다. 이러한 변형된 세포는 당업계에서 이용가능한 다른 항-ROR1 세포와 비교하여 탈진에 대한 저항력이 더 강하고 향상된 이펙터 기능을 나타낸다.

[0131] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포는 ROR1 결합 키메라 항원 수용체를 포함한다. 예시적인 항-ROR1 CAR은 그 전체 내용이 참고로 본원에 포함되는 문헌에 기술되어 있다: Hudecek, et al. Clin. Cancer Res. 19.12(2013):3153-64. 일부 측면에서, 항-ROR1 CAR을 포함하는 본 개시내용의 CAR T 세포는 그 전체 내용이 참고로 본원에 포함되는 문헌에 기술되어 있다: Hudecek et al. 페이지 3155, 첫번째 전체 단락. 일부 측면에서, 본 개시내용의 항-ROR1 CAR은 그 전체 내용이 참고로 본원에 포함되는 문헌에 기재된 2A2, R11 및 R12 항-ROR1 모노클로날 항체의 VH 및/또는 VL 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 포함한다: Hudecek et al. 단락 연결 페이지 3154-55; Baskar et al. MAbs 4(2012):349-61; 및 Yang et al. PLoS ONE 6(2011):e21018.

[0132] 일부 측면에서, 본 개시내용의 항원-결합 도메인은 항-ROR1 항체, 예를 들어 R12 항체와 교차-경쟁할 수 있다. R12 항체 서열은 표 2에 제시되어 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 항원-결합 도메인은 R12 항체의 동일한 에피토프에 결합한다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 당업계에 공지된 임의의 항-ROR1 항체가 본 개시내용과 함께 사용될 수 있다. 이러한 항체의 비-제한적인 예는 Hudecek, et al. Clin. Cancer Res. 19.12(2013):3153-64; Baskar et al. MAbs 4(2012):349-61; 및 Yang et al. PLoS ONE 6(2011):e21018; US 9,316,646 B2; 및 US 9,758,586 B2에 기재된 2A2 및 R11 항체를 포함하며; 이들 각각은 그 전체 내용이 참고로 본원에 포함된다.

[0133] **표 2.** R12 항체 CDR 및 중쇄 가변 영역/경쇄 가변 영역

| | |
|---|---|
| R12 VH<br>(서열번호: 17) | QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMSWVRQAPGKGLEWIATIYPSSGKTYYAT<br>WVNGRFTISSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADDGALFNIWGPGTLVTISS |
| R12 VH CDR1<br>(서열번호: 18) | AYYMS |
| R12 VH CDR2<br>(서열번호: 19) | TIYPSSGKTYYATWVNG |
| R12 VH CDR3<br>(서열번호: 20) | DSYADDGALFNI |
| R12 VL<br>(서열번호: 21) | ELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTDTIDWYQQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGV<br>PDRFSGSSSGADRYLIIPSVQADDEADYYCGADYIGGYVFGGGTQLTVTG |
| R12 VL CDR1<br>(서열번호: 22) | TLSSAHKTDTID |
| R12 VL CDR2<br>(서열번호: 23) | GSYTKRP |
| R12 VL CDR3<br>(서열번호: 24) | GADYIGGYV |

[0134]

[0135] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포의 CAR의 항원-결합 도메인은 R12 항체의 VH CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 항원-결합 도메인은 R12 항체의 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 항원-결합 도메인은 R12 항체의 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 항원-결합 도메인, 예를 들어 R12 scFv는 R12 항체의 VH 및 VL

을 포함한다.

[0136] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포의 키메라 결합 단백질(예를 들어, ROR1 CAR)의 세포내 도메인은, 예를 들어 CD3제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 또는 CD66d로부터 유래된 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은, 예를 들어 2B4, HVEM, ICOS, LAG3, DAP10, DAP12, CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), CD30, CD40, ICOS(CD278), 글루코코르티코이드-유도된 종양 괴사 인자 수용체(GITR), 림프구 기능-연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 또는 B7-H3으로부터 유래된 공동자극 도메인을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 4-1BB 공동자극 도메인을 포함한다.

[0137] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포의 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)의 막횡단 도메인은 적어도 막횡단 영역(들), 예를 들어 KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (촉각(Tactile)), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C, 또는 CD19을 포함할 수 있다.

[0138] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포의 키메라 결합 단백질(예를 들어, CAR)은 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 공동자극 도메인은 인터루킨-2 수용체(IL-2R), 인터루킨-12 수용체(IL-12R), IL-7, IL-21, IL-23, IL-15, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD27, CD28, CD30, CD40, 4-1BB/CD137, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-1(LFA-1), LIGHT, NKG2C, OX40, DAP10, B7-H3, Lck 결합(ICA)이 결실된 CD28, BTLA, GITR, HVEM, LFA-1, LIGHT, NKG2C, PD-1, TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, Fc 수용체 감마 사슬, Fc 수용체 ε 사슬, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다.

[0139] 일부 측면에서, 면역 세포는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소(단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)시키기 위해 유전자 편집 도구에 의해 변형된다. *NR4A3* 유전자의 감소된 발현은, 예를 들어 전체 *NR4A3* 유전자를 편집함으로써, *NR4A3* 유전자의 일부를 편집함으로써, *NR4A3* 유전자의 발현을 제어하는 조절 영역을 편집함으로써 수행될 수 있다. 따라서, CAR 발현 세포 또는 TCR-발현 세포에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위해, 세포에서 유전자 및/또는 단백질의 발현을 감소시키기 위한 당업계에 공지된 임의의 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, CAR-발현 세포 또는 TCR-발현 세포의 *NR4A3* 유전자 및 이에 의해 코딩된 NR4A3 단백질의 발현은 세포를 *NR4A3* 유전자 및 이를 코딩하는 NR4A3 단백질의 발현 수준을 감소시킬 수 있는 유전자 편집 도구와 접촉시킴으로써 감소될 수 있다. 유전자 편집 도구의 비-제한적인 예가 아래에 나와 있다. 일부 특정 측면에서, 유전자 편집 도구는, 예를 들어 shRNA, siRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, CRISPR, 징크 핑거 뉴클레아제, TALEN, 메가뉴클레아제, 제한 엔도뉴클레아제 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 특정 측면에서 유전자 편집 도구는 CRISPR이다. *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 발현 및/또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질의 발현도 감소되는 경우, 일부 측면에서 이러한 유전자 편집 도구도 사용될 수 있다(예를 들어, 구체적으로 *NR4A2* 유전자 및/또는 *NR4A1* 유전자를 표적화).

[0140] 일부 측면에서, 면역세포(본원에 개시된 방법, 즉 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 발현하거나 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 발현하는 방법으로 생성된, 예를 들어, CAR 또는 TCR-발현 세포)의 집단은 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 활성 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 대상체에서 면역 세포의 하나 이상의 향상된 또는 개선된 특성을 나타낸다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 면역 세포의 하나 이상의 특성을 개선하는 것은 종양을 치료하는 데 도움이 될 수 있다(예를 들어, 종양 부피 및/또는 종양 중량을 감소시키데). 본 개시내용으로 개선될 수 있는 하나 이상의 특성에는 암 치료에 유용할 수 있는 본원에 개시된 면역 세포의 임의의 특성이 포함된다. 예를 들어, 일부 측면에서, 면역세포(본원에 개시된 방법, 즉 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 발현하거나 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 발현하는 방법으로 생성된, 예를 들어 CAR 또는 TCR-발현 세포)의 집단은 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 CAR 또는 TCR-발현 세포)와 비교하여 더 큰 이펙터 활성을 나타

낼 수 있다.

[0141] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포의 향상된 특성은 기준 세포와 관련하여 다음을 포함한다:

[0142] (i) 면역 세포의 증가된 확장 및/또는 증식,

[0143] (ii) 면역 세포의 증가된 세포독성,

[0144] (iii) 면역 세포의 증가된 사이토카인 발현, 또는

[0145] (iv) 이들의 조합.

[0146] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(예를 들어, 본원에 기재된 CAR 또는 TCR-발현 세포)는 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 탈진-저항성 및/또는 기능장애-저항성이다.

[0147] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(예를 들어, 본원에 개시된 CAR 또는 TCR-발현 세포)는 아폽토시스-저항성이다. 즉, 이들은 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 감소된 아폽토시스를 나타내거나 전혀 나타내지 않는다.

[0148] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(예를 들어, 본원에 개시된 CAR 또는 TCR-발현 세포)는 면역 체크포인트-저항성이다. 즉, 이들은 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 감소된 면역 체크포인트 활성을 나타내거나 전혀 나타내지 않는다.

[0149] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(예를 들어, 본원에 설명된 CAR 또는 TCR-발현 세포)는 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 향상된 T 세포 활성화를 나타낸다. 일부 측면에서, 이러한 향상된 T 세포 활성화는 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 향상된 확장, 향상된 세포독성, 향상된 사이토카인 발현 또는 이들의 임의의 조합을 나타내는 변형된 면역 세포에 의해 입증될 수 있다.

[0150] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(예를 들어, 본원에 개시된 CAR 또는 TCR-발현 세포)는 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 종양 미세환경(TME)에서 항종양 기능을 유지한다.

[0151] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 변형된 면역 세포 집단 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학 조성물을 제공한다.

[0152] **III. 치료 방법**

[0153] 본 개시내용의 세포 조성물, 예를 들어 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 이에 의해 코당되는 단백질, 즉 NR4A3 단백질 및 ROR1에 특이적으로 결합하는 결합분자를 발현하고, (i) *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질의 내인성 발현, (ii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (iii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 또는 (iv) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질과 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 갖는 세포 조성물, 또는 본 개시내용의 약제학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 종양(또는 암)을 치료하는 방법이 제공된다.

[0154] 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자의 발현 수준은 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자를 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 100% 감소한다. 일부 측면에서, NR4A3 단백질의 발현 수준은 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 100% 감소한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자 및 NR4A3 단백질 둘 다의 발현 수준은 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포)와 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 100% 감소한다. *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준을 감소시키는 방법은 본 개시내용의 다른 곳에서 제공된다.

[0155] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물을 투여하는 것은 기준 종양 부피와 비교하여 대상체에서 종양 부피를 감소시킨다. 일부 측면에서, 기준 종양 부피는 변형된 세포의 투여 전 대상체에서의 종양 부피이다. 일부 측면에서, 기준 종양 부피는 투여를 받지 않은 상응하는 대상체에서의 종양 부피이다. 일부 측면에서, 대상체의 종양 부피는 기준 종양 부피와 비교하여 투여 후에 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 감소한다.

[0156] 일부 측면에서, 종양을 치료하는 것은 대상체에서 종양 중량을 감소시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 세포는 대상체에게 투여될 때 대상체의 종양 중량을 감소시킬 수 있다. 일부 측면에서, 종양 중량은 기준 종양 중량과 비교하여 투여 후 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 감소한다. 일부 측면에서, 기준 종양 중량은 변형된 세포의 투여 전 대상체에서의 종양 중량이다. 일부 측면에서, 기준 종양 중량은 투여를 받지 않은 상응하는 대상체에서의 종양 중량이다.

[0157] 일부 측면에서, 예를 들어 종양을 앓고 있는 대상체에게 본 개시내용의 세포 조성물을 투여하는 것은 대상체의 종양 및/또는 TME에서 TIL(예를 들어, $CD4^+$ 또는 $CD8^+$)의 수 및/또는 백분율을 증가시킬 수 있다. 일부 측면에서, 종양 및/또는 TME에서 TIL의 수 및/또는 백분율은 기준(예를 들어, 변형된 세포를 투여받지 않은 대상체 또는 변형된 세포의 투여 전 동일한 대상체에서의 상응하는 값)와 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 100%, 적어도 약 110%, 적어도 약 120%, 적어도 약 130%, 적어도 약 140%, 적어도 약 150%, 적어도 약 160%, 적어도 약 170%, 적어도 약 180%, 적어도 약 190%, 적어도 약 200%, 적어도 약 210%, 적어도 220%, 적어도 약 230%, 적어도 약 240%, 적어도 약 250%, 적어도 약 260%, 적어도 약 270%, 적어도 약 280%, 적어도 약 290%, 또는 적어도 약 300% 또는 그 이상 증가된다.

[0158] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물을 투여하면 대상체의 종양 및/또는 TME에서 조절 T 세포의 수 및/또는 백분율을 감소시킬 수 있다. 일부 측면에서, 종양 및/또는 TME에서 조절 T 세포의 수 및/또는 백분율은 기준(예를 들어, 변형된 세포를 투여받지 않은 대상체에서 상응하는 수 및/또는 백분율)과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 감소한다.

[0159] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물을 투여하면 대상체의 종양 및/또는 TME에서 골수-유래 억제 세포(MDSC)의 수 및/또는 백분율을 감소시킬 수 있다. 일부 측면에서, MDSC는 단핵구 MDSC(M-MDSC)이다. 일부 측면에서, MDSC는 다형핵 MDSC(PMN-MDSC)이다. 일부 측면에서, MDSC는 M-MDSC와 PMN-MDSC를 모두 포함한다. 일부 측면에서, 종양 및/또는 TME에서 MDSC의 수 및/또는 백분율은 기준(예를 들어, 변형된 세포를 투여받지 않은 상응하는 대상체에서 값)과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 감소한다.

[0160] 상기에 더하여, 본 개시내용의 세포 조성물을 투여하는 것은 종양 치료에 도움이 되는 다른 효과를 가질 수 있다. 이러한 효과는 아래에서 더 설명된다.

[0161] 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 세포 조성물(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 및 ROR1에 특이적으로 결합하는 결합분자를 발현하고 (i) *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질의 내인성 발현, (ii)감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (iii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 또는 (iv) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질 둘 모두를 갖는)은 다양한 암 유형, 예를 들어 유방암, 두경부암, 자궁암, 뇌암, 피부암, 신세포암, 폐암, 대장암, 전립선암, 간암, 방광암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 식도암, 안구암, 복부(위)암, 위장암, 난소암, 자궁경부암, 암종, 육종, 백혈병, 림프종, 골수종, 또는 이들의 조합을 포함하는 암으로부터 유래된 종양을 치료하는 데 사용될 수 있다. 암 적응증의 포괄적이고 비제한적인 목록이 본 출원의 적응증 섹션에 제공된다.

[0162] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 다른 치료제(예를 들어, 항암제 및/또는 면역조절제)와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본원에 개시된 종양을 치료하는 방법은 본 개시내용의 세포 조성물을

하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 면역 경로의 다중 요소가 표적화될 수 있도록 하나 이상의 항암제와 조합하여 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 항암제는 면역 체크포인트 억제제(즉, 특정 면역 체크포인트 경로를 통한 신호전달을 차단)를 포함한다. 본 방법에 사용될 수 있는 면역 체크포인트 억제제의 비-제한적인 예는 CTLA-4 길항제(예를 들어, 항-CTLA-4 항체), PD-1 길항제(예를 들어, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체), TIM-3 길항제(예를 들어, 항-TIM-3 항체), 또는 이들의 조합을 포함한다. 조합 치료의 포괄적이고 비-제한적인 목록은 본 출원의 조합 치료 섹션에 자세히 개시되어 있다.

[0163] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 추가 치료제의 투여 전 또는 후에 대상체에게 투여된다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 추가 치료제와 동시에 대상체에게 투여된다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물 및 추가 치료제는 약제학적으로 허용되는 담체 중의 단일 조성물로서 동시에 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물 및 추가 치료제는 별도의 조성물로서 동시에 투여된다.

[0164] 일부 측면에서, 본 개시내용으로 치료될 수 있는 대상체는 인간이 아닌 동물, 예를 들어 래트 또는 마우스이다. 일부 측면에서, 치료될 수 있는 대상체는 인간이다.

[0165] 일부 측면에서, 예를 들어 본원에 개시된 방법으로 종양을 치료하는 것은 T 세포(예를 들어, 종양-특이적 T 세포)의 활성화를 향상시키는 것을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "T 세포의 활성화를 향상하는 것"은 T 세포 기억의 보유를 촉진하기 위해 활성화 동안 세포 신호전달을 변경하는 것을 의미한다.

[0166] 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준을 감소시킴으로써(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 감소된 수준과 조합하여) T 세포의 활성화를 향상시키는 방법에 관한 것이다. 세포의 활성화 상태는 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 세포의 하나 이상의 기능적 특성(예를 들어 증식, 세포독성, 사이토카인 생산)을 분석하거나 세포의 표현형 발현을 분석함으로써 결정될 수 있다. 일부 측면에서, T 세포(예를 들어, 종양-특이적 T 세포)의 활성화를 향상시키면 세포에서 다음과 같은 개선된 특성 중 하나 이상이 나타날 수 있다: (i) 향상된 확장, (ii) 향상된 세포독성, (iii) 향상된 사이토카인 발현, 또는 (iv) 이들의 조합.

[0167] 일부 측면에서, T 세포(예를 들어, 종양-특이적 T 세포)의 활성화를 향상되면 향상된 세포의 확장을 초래한다. 일부 측면에서, T 세포의 확장은 기준(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 T 세포의 확장)과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 100%, 적어도 약 110%, 적어도 약 120%, 적어도 약 130%, 적어도 약 140%, 적어도 약 150%, 적어도 약 160%, 적어도 약 170%, 적어도 약 180%, 적어도 약 190%, 적어도 약 200%, 적어도 약 210%, 적어도 220%, 적어도 약 230%, 적어도 약 240%, 적어도 약 250%, 적어도 약 260%, 적어도 약 270%, 적어도 약 280%, 적어도 약 290% 또는 적어도 약 300% 또는 그이상 향상된다. 일부 측면에서, T 세포의 확장은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 약 100 배 증가했다. 일부 측면에서, T 세포의 확장은 약 2배에서 약 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500배 이상까지 증가된다. 일부 측면에서, 면역 세포의 T 확장은 약 10배 내지 약 500배, 약 20배 내지 약 400배, 약 25배 내지 약 250배, 약 10배 내지 약 50배, 약 20배 내지 약 300배 증가된다. 일부 측면에서, 향상된 확장은, 예를 들어 대상체에서 변형된 T 세포의 수의 증가(즉, *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현)를 초래할 수 있다. 일부 측면에서, 변형된 T 세포의 수는 기준(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 T 세포의 수)과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 100%, 적어도 약 110%, 적어도 약 120%, 적어도 약 130%, 적어도 약 140%, 적어도 약 150%, 적어도 약 160%, 적어도 약 170%, 적어도 약 180%, 적어도 약 190%, 적어도 약 200%, 적어도 약 210%, 적어도 220%, 적어도 약 230%, 적어도 약 240%, 적어도 약 250%, 적어도 약 260%, 적어도 약 270%, 적어도 약 280%, 적어도 약 290% 또는 적어도 약 300% 또는 그 이상 증가된다.

[0168] 일부 측면에서, T 세포(예를 들어, 종양-특이적 T 세포)의 활성화를 향상시키면 세포의 세포독성이 향상된다. 본원에 사용된 용어 "세포독성"은 종양 세포를 공격하고 손상을 유도하는 본 개시내용의 세포 조성물(예를 들어, 종양 특이적 T 세포)의 능력을 지칭한다. 본 개시내용의 세포 조성물(예를 들어, 종양 특이적 T 세포)은

당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 세포독성 분자(예를 들어, 퍼포린, 그랜자임 및 그래뉼라이신)의 방출을 통해 또는 Fas-Fas 리간드 상호작용을 통해 종양 세포에서 아폽토시스를 유도함으로써 종양 세포를 공격하고 손상을 유도할 수 있다. 일부 측면에서, T 세포의 세포독성은 기준(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 T 세포의 세포독성)과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 100%, 적어도 약 110%, 적어도 약 120%, 적어도 약 130%, 적어도 약 140%, 적어도 약 150%, 적어도 약 160%, 적어도 약 170%, 적어도 약 180%, 적어도 약 190%, 적어도 약 200%, 적어도 약 210%, 적어도 220%, 적어도 약 230%, 적어도 약 240%, 적어도 약 250%, 적어도 약 260%, 적어도 약 270%, 적어도 약 280%, 적어도 약 290% 또는 적어도 약 300% 또는 그 이상 향상(즉, 증가)된다. 일부 측면에서, T 세포의 세포독성(또는 사멸 활성)은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 약 100 배 증가한다. 일부 측면에서, T 세포의 세포독성은 약 2배에서 약 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500배 이상 증가된다. 일부 측면에서, T 세포의 세포독성은 기준(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 T 세포의 세포독성)과 비교하여 약 10배 내지 약 500배, 약 20배 내지 약 400배, 약 25배 내지 약 250배, 약 10배 내지 약 50배, 약 20배 내지 약 300배 또는 그 이상 증가된다.

[0169] 일부 측면에서, T 세포(예를 들어, 종양 특이적 T 세포)의 활성화를 향상시키면 세포에서 사이토카인 발현이 향상된다. 일부 측면에서, 사이토카인 발현은 기준(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 T 세포에서의 사이토카인 발현)과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 향상(즉, 증가)된다. 일부 측면에서, T 세포에서의 사이토카인 발현은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 약 100배 증가된다. 일부 측면에서, T 세포에서의 사이토카인 발현은 약 2배 내지 약 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500배 이상 증가된다. 일부 측면에서, T 세포에서의 사이토카인 발현은 기준(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 T 세포에서의 사이토카인 발현)과 비교하여 약 10배 내지 약 500배, 약 20배 내지 약 400배, 약 25배 내지 약 250배, 약 10배 내지 약 50배, 약 20배 내지 약 300배 이상 증가된다. 본원에 사용된 용어 "사이토카인"은 암 치료에 유용할 수 있는 임의의 사이토카인을 의미한다. 이러한 사이토카인의 비-제한적인 예에는 IFN-γ, TNF-α, IL-2 및 이들의 조합이 포함된다.

[0170] 일부 측면에서, T 세포의 확장 및/또는 증식 및/또는 세포독성(또는 사멸 활성) 및/또는 사이토카인 발현은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 약 100배 증가된다. 일부 측면에서, T 세포의 확장 및/또는 증식 및/또는 세포독성(또는 사멸 활성) 및/또는 사이토카인 발현은 약 2배 내지 약 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500배 이상 증가된다. 일부 측면에서, T 세포의 확장 및/또는 증식 및/또는 세포독성(또는 사멸 활성) 및/또는 사이토카인 발현은 기준(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 T 세포에서의 확장 및/또는 증식 및/또는 세포독성(또는 사멸 활성))과 비교하여 약 10배 내지 약 500배, 약 20배 내지 약 400배, 약 25배 내지 약 250배, 약 10배 내지 약 50배, 약 20배 내지 약 300배, 또는 그 이상 증가된다. 일부 측면에서, 면역 세포의 확장 및/또는 증식, 면역 세포의 세포독성, 또는 면역 세포의 사이토카인 발현은 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 면역 세포)과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0171] 일부 측면에서, 본 개시내용에 따른 변형된 면역 세포는 기준 세포에 비해 증가된 사이토카인 발현을 나타낸다. 일부 측면에서, 사이토카인은 인터루킨-2(IL-2), 인터페론-γ(IFN-γ), 종양 괴사 인자-α(TNF-α), 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0172] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포에서 IL-2의 발현 수준은 기준 면역 세포에서의 IL-2의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적

어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0173] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포에서 IFN-γ의 발현 수준은 기준 면역 세포에서의 IFN-γ의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0174] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포에서 TNF-α의 발현 수준은 기준 면역 세포에서의 TNF-α의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0175] 일부 측면에서, 본원에 개시된 CAR 또는 TCR-발현 세포(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 발현하는)은 동족 항원(예를 들어, 종양 항원)과 같은 항원으로 자극, 예를 들어 순차적 자극 및/또는 만성 자극 시 증가된 양의 IL-2를 생성한다. 일부 측면에서, CAR 또는 TCR-발현 세포에서 생성된 IL-2의 양은 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 CAR 또는 TCR-발현 세포)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0176] 일부 측면에서, 본원에 개시된 CAR 또는 TCR-발현 세포(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 발현하는)은 동족 항원(예를 들어, 종양 항원)과 같은 항원으로 자극, 예를 들어 순차적 자극 및/또는 만성 자극 시 증가된 양의 IFN-γ를 생성한다. 일부 측면에서, CAR 또는 TCR-발현 세포에서 생성된 IFN-γ의 양은 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 CAR 또는 TCR-발현 세포)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0177] 일부 측면에서, 본원에 개시된 CAR 또는 TCR-발현 세포(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 발현하는)은 동족 항원(예를 들어, 종양 항원)과 같은 항원으로 자극, 예를 들어 순차적 자극 및/또는 만성 자극 시 증가된 양의 TNF-α를 생성한다. 일부 측면에서, CAR 또는 TCR-발현 세포에서 생성된 TNF-α의 양은 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 CAR 또는 TCR-발현 세포)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0178] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(예를 들어, 본원에 설명된 CAR 또는 TCR-발현 세포)는 기준 면역 세포(즉, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 증가된 세포 확장 및/또는 세포 증식을 나타낸다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포의 세포 확장 및/또는 세포 증식은 기준 세포(즉, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 CAR 또는 TCR-발현 세포)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0179] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(예를 들어, 본원에 개시된 CAR 또는 TCR-발현 세포)는 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 활성 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖하도록 변형되지 않은 CAR 또는 TCR-발현 세포)와 비교하여 증가된 지속성 및/또는 생존을 나타낸다. 일부 측면에서, T 세포의 지속성은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100배 증가된다. 일부 측면에서, T 세포의 지속성은 약 2배에서 약 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500배 이상으로 증가된다. 일부 측면에서, T 세포의 지속성은 기준(즉, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 T 세포의 지속성)과 비교하여 약 10배 내지 약 500배, 약 20배 내지 약 400배, 약 25배 내지 약 250배, 약 10배 내지 약 50배, 약 20배 내지 약 300배 이상 증가된다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포의 지속성 및/또는 생존은 기준 세포(즉, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 CAR 또는 TCR-발현 세포)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0180] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(예를 들어, 본원에 설명된 CAR 또는 TCR-발현 세포)는 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖하도록 변형되지 않은 면역 세포)에 비해 증가된 항종양 활성을 나타낸다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포의 항종양 활성은 기준 세포(즉, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 CAR 또는 TCR-발현 세포)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 또는 그 이상 증가된다.

[0181] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 면역 세포(예를 들어, 본원에 설명된 CAR 또는 TCR-발현 세포)는 기준 면역 세포(즉, 감소된 *NR4A3* 유전자 수준 및/또는 감소된 NR4A3 단백질 발현 수준을 갖도록 변형되지 않은 면역 세포)와 비교하여 감소된 탈진 또는 기능장애를 나타낸다. 일부 측면에서, 변형된 면역 세포의 탈진 또는 기능장애는 기준 세포(즉, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 CAR 또는 TCR-발현 세포)와 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 100% 감소한다.

[0182] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 세포는 다른 치료제(예를 들어, 항암제 및/또는 면역조절제)와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본원에 개시된 종양을 치료하는 방법은 본 개시내용의 변형된 세포를 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 이러한 제제에는, 예를 들어 화학요법 약물, 표적 항암 치료법, 종양 용해 약물, 세포독성제, 면역-기반 치료법, 사이토카인, 수술 절차, 방사선 절차, 공동자극 분자 활성화제, 면역 체크포인트 억제제, 백신, 세포 면역치료법 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 세포(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 발현하는)는 표준 치료(예를 들어, 수술, 방사선, 화학요법)와 조합하여 사용할 수 있다. 본원에 기재된 방법은 또한 유지 요법, 예를 들어 종양의 발생 또는 재발을 예방하기 위한 요법으로 사용될 수 있다.

[0183] 일부 측면에서, 본 개시내용의 변형된 세포는 면역 경로의 다중 요소가 표적화될 수 있도록 하나 이상의 항암제와 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 조합의 비-제한적인 예로는 종양 항원 제시를 향상시키는 치료법(예를 들어, 수지상 세포 백신, GM-CSF 분비 세포 백신, CpG 올리고뉴클레오티드, 이미퀴모드); 예를 들어 CTLA-4 및/또는 PD1/PD-L1/PD-L2 경로를 억제하고/하거나 $T_{reg}$ 또는 다른 면역 억제 세포(예를 들어 골수-유래 억제 세포)를 고갈 또는 차단함으로써 음성 면역 조절을 억제하는 치료법; 예를 들어, CD-137, OX-40 및/또는 CD40 또는 GITR 경로를 자극하고/하거나 T 세포 이펙터 기능을 자극하는 작용제로 양성 면역 조절을 자극하는 치료법; 항종양 T 세포의 빈도를 전신적으로 증가시키는 치료법; 예를 들어, CD25의 길항제(예를 들어, 다클리주맙)를 사용하거나 생체외 항-CD25 비드 고갈에 의해 종양 내 $T_{reg}$와 같은 $T_{reg}$를 고갈시키거나 억제하는 치료법; 종양 내 억제 골수 세포의 기능에 영향을 미치는 치료법; 종양 세포의 면역원성을 향상시키는 치료법(예를 들어, 안트라사이클린); 유전자 변형된 세포, 예를 들어 키메라 항원 수용체에 의해 변형된 세포(CAR-T 요법)를 포함하는 입양 T 세포

또는 NK 세포 전달; 인돌아민 디옥시게나제(IDO), 디옥시게나제, 아르기나제 또는 산화질소 합성효소와 같은 대사 효소를 억제하는 치료법; T 세포 무반응 또는 탈진을 역전/예방하는 치료법; 종양 부위에서 선천적 면역 활성화 및/또는 염증을 유발하는 치료법; 면역 자극 사이토카인의 투여; 면역억제성 사이토카인의 차단; 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0184] 일부 측면에서, 항암제는 면역 체크포인트 억제제(즉, 특정 면역 체크포인트 경로를 통한 신호전달을 차단)를 포함한다. 본 방법에 사용될 수 있는 면역 체크포인트 억제제의 비-제한적인 예는 CTLA-4 길항제(예를 들어, 항-CTLA-4 항체), PD-1 길항제(예를 들어, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체), TIM-3 길항제(예를 들어, 항-TIM-3 항체), 또는 이들의 조합을 포함한다. 이러한 면역 체크포인트 억제제의 비-제한적 예에는 다음이 포함된다: 항-PD1 항체(예를 들어, 니볼루맙(OPDIVO®), 펨브롤리주맙(KEYTRUDA®; MK-3475), 피딜리주맙(CT-011), PDR001, MEDI0680 (AMP-514), TSR-042, REGN2810, JS001, AMP-224 (GSK-2661380), PF-06801591, BGB-A317, BI 754091, SHR-1210, 및 이들의 조합); 항-PD-L1 항체(예를 들어, 아테졸리주맙(TECENTRIQ®; RG7446; MPDL3280A; RO5541267), 두르발루맙(MEDI4736, IMFINZI®), BMS-936559, 아벨루맙(BAVENCIO®), LY3300054, CX-072(프로클레임-CX-072), FAZ053, KN035, MDX-1105 및 이들의 조합); 및 항-CTLA-4 항체(예를 들어, 이필리무맙(YERVOY®), 트레멜리무맙(티실리무맙; CP-675,206), AGEN-1884, ATOR-1015 및 이들의 조합).

[0185] 일부 측면에서, 항암제는 면역 체크포인트 활성화제(즉, 특정 면역 체크포인트 경로를 통한 신호전달을 촉진)를 포함한다. 일부 측면에서, 면역 체크포인트 활성화제는 OX40 작용제(예를 들어, 항-OX40 항체), LAG-3 작용제(예를 들어, 항-LAG-3 항체), 4-1BB(CD137) 작용제(예를 들어, 항-CD137 항체), GITR 작용제(예를 들어, 항-GITR 항체), TIM3 작용제(예를 들어, 항-TIM3 항체), 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0186] 일부 측면에서, 본원에 개시된 변형된 세포는 추가 치료제의 투여 전 또는 후에 대상체에게 투여된다. 일부 측면에서, 변형된 세포는 추가 치료제와 동시에 대상체에게 투여된다. 일부 측면에서, 변형된 세포 및 추가 치료제는 약제학적으로 허용되는 담체 중의 단일 조성물로서 동시에 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 변형된 세포 및 추가 치료제는 별도의 조성물로서 동시에 투여된다. 일부 측면에서, 추가 치료제 및 변형된 면역 세포는 순차적으로 투여된다.

[0187] **IV. 변형된 면역 세포를 제조하는 방법**

[0188] 본 개시내용은, 예를 들어 유전자 편집 도구로 세포를 변형시키는 것을 포함하는, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 갖는 세포를 생성 또는 제조하는 방법을 제공하며, 여기서 유전자 편집 도구는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 발현은 세포의 탈진을 감소시키거나 억제한다. 일부 측면에서, 변형된 세포는 또한 (i) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 또는 (iii) (i)및 (ii) 모두 갖도록 추가로 변형될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준을 감소시키기 위해(단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여) 세포를 변형시키는 것을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 세포의 탈진을 감소 또는 억제하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 세포는 면역 세포이다. 또한, 본 개시내용은 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현시키기 위해(단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여) 세포를 변형시키는 것을 포함하는, 면역 세포에서 지속적인 이펙터 기능을 촉진시키는 방법을 제공한다.

[0189] 유전자 편집, 예를 들어 염기 편집은 당업계에 공지된 임의의 편집 도구를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)는 CRISPR/Cas, TALEN, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 메가뉴클레아제, 제한 엔도뉴클레아제, 간섭 RNA(RNAi) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드와 같은 기술을 사용하여 변형될 수 있다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자 및/또는 발현은 또한 shRNA, siRNA 또는 miRNA를 사용하여 변형될 수 있다. 이러한 모든 기술은 아래에서 더 자세히 설명된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위해 사용되는 방법은 하나 이상의 유전자 편집 도구(예를 들어, 2개, 3개 또는 그 이상의 도구)를 사용하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위해 사용되는 방법은 NR4A3 DNA(예를 들어, CRISPR) 또는 RNA(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 작용하는 적어도 하나의 방법 및 NR4A3 단백질에 작용하는(예를 들어, 세포 신호전달 파트너에 대한 결합 억제 또는 번역 후 변형)하는 적어도 하나의 방법을 포함한다.

[0190] 일부 측면에서, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 수준을 감소시키거나 없애기 위해 유전자 편집 도구를 사용함으로써 본원에 개시된 바와 같이 변형된 세포(예를 들어 면역 세포)는 CAR 또는 TCR을 발현하도록 추가로 변형될 수 있다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 유전자 편집 방법에 따라 변형되고 CAR 또는 TCR을 발현하는 면역 세포는 개선된 항암 특성을 가질 수 있다.

[0191] *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키는 방법, 예를 들어 유전자 편집이 CAR- 또는 TCR-발현 세포와 관련하여 제공되지만, 당업자는 본원에 개시된 방법이 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 감소가 필요한 임의의 세포에 사용할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 일부 측면에서, 본원에 개시된 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키는 방법은 면역 세포에 적용될 수 있다. 일부 측면에서, 면역 세포는 림프구, 호중구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 림프구는 T 세포, 종양-침윤 림프구(TIL), 림포카인-활성화된 살해 세포, 천연(NK) 세포 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 림프구는 T 세포, 예를 들어 $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포이다. 일부 측면에서, 림프구는 종양 침윤 림프구(TIL)이다. 일부 측면에서, TIL은 $CD8^+$ TIL이다. 일부 측면에서, TIL은 $CD4^+$ TIL이다. 따라서, 본 개시내용은 본원에 개시된 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키는 방법에 따라 제조된 변형된 세포(예를 들어, 변형된 면역 세포, 여기서 모 세포는 예를 들어 위에 개시된 임의의 세포이다)를 포함하는 세포 조성물을 제공하며, 여기서 변형된 세포는 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포)에 비해 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 측면에서, 이들 변형된 세포는 약제학 조성물을 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0192] 일부 측면에서, 세포를 변형시키는 것은 세포에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준을 감소시킬 수 있는 유전자 편집 도구와 세포를 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구(또는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시킬 수 있는 임의의 다른 도구)와 변형될 세포의 접촉은 생체내, 시험관내, 생체외, 또는 이들의 조합에서 일어날 수 있다. 일부 측면에서, 접촉은 생체내에서 발생한다(예를 들어, 유전자 요법). 일부 측면에서, 접촉은 시험관내에서 발생한다. 일부 측면에서, 접촉은 생체외에서 발생한다. 일부 측면에서, 세포는 자가 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 이종 세포이다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구(또는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시킬 수 있는 임의의 다른 도구)의 접촉은 세포에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준을 기준 세포(예를 들어, 더 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 상응하는 세포)에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 감소시킨다.

[0193] 일부 측면에서, 세포를 유전자 편집 도구와 접촉시키는 것은 다양한 전달 경로를 포함한다. 일반적으로, 세포에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키기 위해 본원에 개시된 유전자 편집 도구의 경우, 유전자 편집 도구는 세포에 들어가 관심 유전자에 결합할 수 있어야 한다. 일부 측면에서, 관심 분자를 세포에 전달하기 위해 당업계에 공지된 임의의 전달 비히클이 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 그 전체 내용이 참조로 포함되는 미국 특허 10,047,355 B2 참조. 사용될 수 있는 벡터에 관한 추가 개시는 본 개시내용의 다른 곳에서 제공된다.

[0194] 일부 측면에서, 유전자 편집 도구는 NR4A3 단백질을 코딩하는 전체 유전자를 제거할 수 있다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구는 NR4A3 단백질을 코딩하는 게놈의 일부(예를 들어, 하나 이상의 엑손)를 제거한다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구, 예를 들어 염기 편집기는 인델을 생성하지 않고 특정 뉴클레오티드 염기를 변형한다. 본원에 사용된 용어 "인델(indel)"은 유전자의 코딩 영역 내에서 프레임 이동 돌연변이를 유발할 수 있는 핵산 내 뉴클레오티드 염기의 삽입 또는 결실을 의미한다. 염기 편집기의 비-제한적인 예는 2017년 5월 4일에 공개된 미국 공개 번호 2017/0121693에 개시되어 있으며, 이는 그 전체 내용이 참조로 본원에 포함된다.

[0195] 일부 측면에서, 변형된 면역 세포를 제조하는 방법은 CAR 또는 TCR을 발현하도록 세포를 변형시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, CAR 또는 TCR을 발현하도록 세포를 변형시키는 것은 세포를 CAR을 코딩하는 핵산 서열과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, CAR을 코딩하는 핵산 서열은 벡터(예를 들어, 발현 벡터)로부터 발현된다.

[0196] 일부 측면에서, 본원에 개시된 유전자 편집 도구는 유전자 편집 도구를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터로

부터 발현된다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구를 코딩하는 핵산 서열과 CAR 또는 TCR을 코딩하는 핵산 서열은 별도의 벡터 상에 있다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구를 코딩하는 핵산 서열과 CAR 또는 TCR을 코딩하는 핵산 서열은 동일한 벡터 상에 있다.

[0197] **V.A. 유전자 편집 도구**

[0198] 하나 이상의 유전자 편집 도구를 사용하여 본 개시내용의 세포를 변형시킬 수 있다. 유전자 편집 도구의 비-제한적인 예는 아래에 개시되어 있다:

[0199] ***V.A.1. CRISPR/Cas 시스템***

[0200] 일부 측면에서, 본 개시내용에 사용될 수 있는 유전자 편집 도구는 CRISPR/Cas 시스템을 포함한다. 이러한 시스템은, 예를 들어 Cas9 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 분자를 사용할 수 있으며, 이는 일부 경우에 이것이 발현될 원하는 세포 유형(예를 들어 T 세포, 예를 들어 CAR-발현 T 세포)에 대해 코돈-최적화된다. 본원에 추가로 설명된 바와 같이, 일부 측면에서, 이러한 시스템은 Cas9 뉴클레아제 단백질을 포함할 수 있다.

[0201] CRISPR/Cas 시스템은 Cas 뉴클레아제, 예를 들어 Cas9에 의해 인식되는 NGG 모티프 바로 앞의 표적 DNA 서열에 혼성화하는 가이드 RNA(예를 들어, 합성 가이드 RNA)(gRNA)와 복합체를 형성하여 게놈 부위를 표적화하는 Cas 뉴클레아제, 예를 들어 Cas9 뉴클레아제를 사용한다. 이로 인해 NGG 모티프 업스트림의 3개 뉴클레오티드 이중-가닥 파손이 발생한다. CRISPR/Cas9 시스템의 고유한 기능은 단일 Cas9 단백질을 2개 이상의 gRNA(예를 들어, 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 gRNA)와 함께 공동 발현하여 여러 개의 별개의 게놈 유전자좌를 동시에 표적화하는 능력이다. 이러한 시스템은 또한 두 개의 별도 분자를 포함하는 가이드 RNA를 사용할 수 있다. 일부 측면에서, 2-분자 gRNA는 crRNA-유사("CRISPR RNA" 또는 "표적자-RNA" 또는 "crRNA" 또는 "crRNA 반복") 분자 및 상응하는 tracrRNA-유사("트랜스-작용 CRISPR RNA" 또는 "활성화제-RNA" 또는 "tracrRNA" 또는 "스캐폴드") 분자를 포함한다.

[0202] crRNA는 gRNA의 DNA-표적화 세그먼트(단일 가닥)와 gRNA의 단백질-결합 세그먼트의 이중 가닥 RNA(dsRNA) 이중체의 절반을 형성하는 뉴클레오티드의 스트레치를 모두 포함한다. 상응하는 tracrRNA(활성화제-RNA)는 gRNA의 단백질-결합 세그먼트의 dsRNA 이중체의 나머지 절반을 형성하는 뉴클레오티드의 스트레치를 포함한다. 따라서, crRNA의 뉴클레오티드의 스트레치는 tracrRNA의 뉴클레오티드의 스트레치에 상보적이고 이와 혼성화하여 gRNA의 단백질-결합 도메인의 dsRNA 이중체를 형성한다. 이처럼 각 crRNA는 상응하는 tracrRNA를 갖고 있다고 할 수 있다. crRNA는 추가로 단일 가닥 DNA-표적화 세그먼트를 제공한다. 따라서, gRNA는 표적 서열(예를 들어, *NR4A3* mRNA)에 혼성화하는 서열, 및 tracrRNA를 포함한다. 따라서, crRNA와 tracrRNA(상응하는 쌍으로서)는 혼성화하여 gRNA를 형성한다. 세포내 변형을 위해 사용되는 경우, 주어진 crRNA 또는 tracrRNA 분자의 정확한 서열 및/또는 길이는 RNA 분자가 사용될 종(예를 들어, 인간)에 특이적이도록 설계될 수 있다.

[0203] 3개의 요소(Cas9, tracrRNA 및 crRNA)를 코딩하는 자연-발생 유전자는 일반적으로 오페론(들)으로 구성된다. 자연-발생 CRISPR RNA는 Cas9 시스템과 유기체에 따라 다르지만 종종 21-72개 뉴클레오티드 길이의 표적 세그먼트를 포함하고 21-46개 뉴클레오티드 길이의 2개 직접 반복부(DR)가 측면에 있다(예를 들어, WO2014/131833 참조) S. 파이오게네스(pyogenes)의 경우, DR의 길이는 36개 뉴클레오티드이고 표적 세그먼트의 길이는 30개 뉴클레오티드이다. 3' 위치의 DR은 상응하는 tracrRNA에 상보적이고 이와 혼성화되며, 이는 차례로 Cas9 단백질에 결합한다.

[0204] 대안적으로, 본원에 사용된 CRISPR 시스템은 코돈-최적화된 Cas9와 기능하는 융합된 crRNA-tracrRNA 구성물(즉, 단일 전사체)을 추가로 사용할 수 있다. 이 단일 RNA를 종종 가이드 RNA 또는 gRNA라고 한다. gRNA 내에서 crRNA 부분은 주어진 인식 부위에 대한 "표적 서열"로 식별되며 tracrRNA는 종종 "스캐폴드"라고 한다. 간략하게, 표적 서열을 함유하는 짧은 DNA 단편이 가이드 RNA 발현 플라스미드에 삽입된다. gRNA 발현 플라스미드는 표적 서열(일부 측면에서 약 20개의 뉴클레오티드), tracrRNA 서열의 형태(스캐폴드)뿐만 아니라 세포에서 활성인 적합한 프로모터 및 진핵 세포에서 적절한 처리를 위해 필요한 요소를 포함한다. 많은 시스템은 어닐링되어 이중 가닥 DNA를 형성한 다음 gRNA 발현 플라스미드로 클로닝되는 맞춤형 상보성 올리고에 의존한다.

[0205] 이어서, gRNA 발현 카세트 및 Cas9 발현 카세트가 세포 내로 도입된다. 예를 들어, Mali P *et al.*, (2013) *Science* 2013 Feb. 15; 339(6121):823-6; Jinek M *et al.*, *Science* 2012 Aug. 17; 337(6096):816-21; Hwang W Y *et al.*, *Nat Biotechnol* 2013 March; 31(3):227-9; Jiang W *et al.*, *Nat Biotechnol* 2013 March; 31(3):233-9; 및 Cong L *et al.*, *Science* 2013 Feb. 15; 339(6121):819-23을 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다. 또한 예를 들어, WO/2013/176772 A1, WO/2014/065596 A1, WO/2014/089290 A1,

WO/2014/093622 A2, WO/2014/099750 A2, 및 WO/2013142578 A1을 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0206] 일부 측면에서, Cas9 뉴클레아제는 단백질 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR 발현 면역 세포)는 Cas9 뉴클레아제 단백질 및 gRNA를 포함하는 핵산 분자를 도입함으로써 변형될 수 있다(예를 들어, 감소된 수준의 *NR4A* 유전자 및/또는 NR4A 단백질의 수준을 갖도록). 일부 측면에서, Cas9 뉴클레아제 단백질 및 gRNA를 포함하는 핵산 분자는 순차적으로 세포내로 도입될 수 있다. 일부 측면에서, Cas9 뉴클레아제 단백질과 gRNA를 포함하는 핵산 분자는 동시에 세포내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 동시 투여는 Cas9 뉴클레아제 단백질과 gRNA를 포함하는 핵산 분자를 동시에 그러나 별도의 조성물로 도입하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, Cas9 단백질은 gRNA를 포함하는 핵산 분자와의 복합체 형태로(즉, 단일 조성물로서) 제공될 수 있다.

[0207] 일부 측면에서, Cas9 뉴클레아제는 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 제공될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR 발현 면역 세포)는 Cas9 뉴클레아제 단백질을 코딩하는 제1 핵산 분자 및 gRNA를 포함하는 제2 핵산 분자를 도입함으로써 변형될 수 있다(예를 들어, 감소된 수준의 *NR4A* 유전자 및/또는 NR4A 단백질의 수준을 갖도록). 일부 측면에서, 제1 및 제2 핵산 분자는 세포내로 순차적으로 도입될 수 있다. 일부 측면에서, 제1 및 제2 핵산 분자는 세포내로 동시에 도입될 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 제1 및 제2 핵산 분자는 동시에 별도의 조성물로 세포내로 도입될 수 있다. 일부 측면에서, 제1 및 제2 핵산 분자는 단일 폴리뉴클레오티드의 일부일 수 있으며, 세포는 단일 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 변형된다.

[0208] Cas9 뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 RNA(예를 들어, 메신저 RNA(mRNA)) 또는 DNA일 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는 RNA 형태로 제공될 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는 RNA를 코딩하는 DNA의 형태로 제공될 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는 별도의 crRNA 및 tracrRNA 분자, 또는 crRNA 및 tracrRNA를 각각 코딩하는 별도의 DNA 분자의 형태로 제공될 수 있다.

[0209] 일부 측면에서, gRNA는 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)를 코딩하는 제3 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서 Cas 단백질은 유형 I Cas 단백질이다. 일부 측면에서 Cas 단백질은 유형 II Cas 단백질이다. 일부 측면에서, 유형 II Cas 단백질은 Cas9이다. 일부 측면에서, 유형 II Cas, 예를 들어 Cas9는 인간 코돈-최적화된 Cas이다.

[0210] 일부 측면에서, Cas 단백질은 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 두 가닥을 절단하지 않고 표적 핵산 서열내에서 단일 가닥 파손(즉, "닉")을 생성할 수 있는 "닉카제(nickase)"이다. 예를 들어, Cas9는 반대편 DNA 가닥의 절단을 담당하는 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인과 HNH-유사 뉴클레아제 도메인이라는 두 개의 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 이들 도메인 중 하나에서 돌연변이가 닉카제를 생성할 수 있다. 니카제를 생성하는 돌연변이의 예는, 예를 들어 WO/2013/176772 A1 및 WO/2013/142578 A1에서 찾아볼 수 있으며, 이들 각각은 본원에 참고로 포함된다.

[0211] 일부 측면에서, dsDNA의 각 가닥의 표적 부위에 특이적인 2개의 개별 Cas 단백질(예를 들어, 닉카제)은 다른 핵산, 또는 동일한 핵산의 별도 영역의 돌출 서열에 상보적인 돌출 서열을 생성할 수 있다. dsDNA의 두 가닥에 있는 표적 부위에 특이적인 2개의 닉카제와 핵산을 접촉시켜 생성된 돌출 단부는 5' 또는 3' 돌출 단부일 수 있다. 예를 들어, 첫 번째 닉카제는 dsDNA의 첫 번째 가닥에 단일 가닥 파손을 생성할 수 있는 반면, 두 번째 닉카제는 dsDNA의 두 번째 가닥에 단일 가닥 파손을 생성하여 돌출 서열이 생성될 수 있다. 단일 가닥 파손을 생성하는 각 닉카제의 표적 부위는 생성된 돌출 단부 서열이 상이한 핵산 분자의 돌출 단부 서열에 상보적이도록 선택될 수 있다. 두 개의 상이한 핵산 분자의 상보적인 돌출 단부는 본원에 개시된 방법에 의해 어닐링될 수 있다. 일부 측면에서, 첫 번째 가닥 상의 닉카제의 표적 부위는 두 번째 가닥 상의 닉카제의 표적 부위와 상이하다.

[0212] 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자 및 이에 의해 코딩된 NR4A3 단백질의 발현은, 예를 들어 *NR4A3* 유전자에 특이적인 CRISPR(예를 들어, CRISPR-Cas9 시스템)과 세포를 접촉시킴으로써 감소된다. 일부 측면에서 CRISPR은 *NR4A1* 유전자에 특이적이다. 따라서, 일부 측면에서, CRISPR과의 접촉 후, 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR 발현 면역 세포)는 (i) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 단백질, (ii) 내인성 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 단백질, 및 (iii) 내인성 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 단백질을 갖는다. 일부 측면에서 CRISPR은 *NR4A2* 유전자에 특이적이다. 따라서, 일부 측면에서, CRISPR과의 접촉 후, 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR 발현 면역 세포)는 (i) 내인성 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 단백질, 및 (iii) 내인성 수준

의 *NR4A3* 유전자 및/또는 단백질을 갖는다. 일부 측면에서 CRISPR은 *NR4A3* 유전자에 특이적이다. 따라서, 일부 측면에서, CRISPR과의 접촉 후, 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR 발현 면역 세포)는 (i) 내인성 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 단백질, (ii) 내인성 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 단백질, 및 (iii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 단백질을 갖는다.

[0213] 본원에 설명된 바와 같이, 일부 측면에서, CRISPR은 다중 NR4A 유전자를 표적화한다. 예를 들어, 일부 측면에서 CRISPR은 *NR4A1* 유전자와 *NR4A2* 유전자를 모두 표적화할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, CRISPR과의 접촉 후, 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR 발현 면역 세포)는 (i) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 단백질, 및 (iii) 내인성 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 단백질을 갖는다. 일부 측면에서, CRISPR은 *NR4A1* 유전자와 *NR4A3* 유전자를 모두 표적화할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, CRISPR과의 접촉 후, 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR 발현 면역 세포)는 (i) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 단백질, (ii) 내인성 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 단백질, 및 (iii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 단백질을 갖는다. 일부 측면에서, CRISPR은 *NR4A2* 유전자 및/또는 *NR4A3* 유전자를 모두 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, CRISPR과의 접촉 후, 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR 발현 면역 세포)는 (i) 내인성 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 단백질, 및 (iii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 단백질을 갖는다. 일부 측면에서, CRISPR은 *NR4A1* 유전자, *NR4A2* 유전자 및 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, CRISPR과의 접촉 후, 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR 발현 면역 세포)는 (i) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 단백질, 및 (iii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 단백질을 갖는다.

[0214] 일부 측면에서, CRISPR를 사용한 유전자 편집은 기준 세포(예를 들어, CRISPR를 사용하여 유전자 편집을 거치지 않은 상응하는 세포)에서 관찰된 *NR4A3* 유전자 수준에 대해 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% *NR4A3* 유전자 수준을 감소시킨다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자 수준은 당업계에 공지된 임의의 기술, 예를 들어 디지털 액적 PCR을 사용하여 측정될 수 있다.

[0215] 일부 측면에서, 본원에 개시된 gRNA 및/또는 Cas9를 코딩하는 핵산은 RNA 또는 DNA이다. 다른 측면에서, 본원에 개시된 gRNA 및/또는 Cas9를 코딩하는 RNA 또는 DNA는 각각 합성 RNA 또는 합성 DNA이다. 일부 측면에서, 합성 RNA 또는 DNA는 적어도 하나의 비천연 핵염기를 포함한다. 일부 측면에서, 특정 부류의 모든 핵염기는 비천연 핵염기로 대체되었다(예를 들어, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드에서 모든 우리딘은 비천연 핵염기, 예를 들어 5-메톡시우리딘 또는 슈도유리딘으로 대체될 수 있다). 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 합성 RNA 또는 합성 DNA)는 천연 핵염기, 즉 합성 DNA의 경우 A, C, T 및 U, 또는 합성 RNA나 합성 DNA의 경우, A, C, T 및 U를 포함한다.

[0216] 일반적으로, 본원에 개시된 CRISPR 유전자 편집 방법은 세포, 예를 들어 면역 세포를 생체내, 시험관내 또는 생체외에서:

[0217] (i) Cas9 또는 Cas9를 코딩하는 핵산; 및

[0218] (ii) 적어도 하나의 *NR4A3* 유전자 가이드 RNA(gRNA) 또는 gRNA를 코딩하는 핵산과 접촉시키는 것을 포함하며,

[0219] 여기서 gRNA는 *NR4A3* 유전자의 서열(예를 들어, 인트론 및/또는 엑손 서열)을 표적화하고, 세포를 Cas9 및 적어도 하나의 gRNA와 접촉시키는 것은 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현의 감소를 초래한다.

[0220] 일부 측면에서, 세포(예를 들어, 면역 세포)의 *NR4A3* 유전자의 수준을 감소시키는 데 사용될 수 있는 gRNA는 표 B 및 C에 제공된 gRNA 중 임의의 것을 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 30, 52-57, 58, 61, 65, 67, 68, 70, 71, 75, 76, 82, 83, 86, 94 및 96에 제시된 서열 중 임의의 하나 이상을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 30에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 30에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 30에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 30에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 52에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자

를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 52에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 52에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 52에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 53에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 53에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 54에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 54에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 54에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 54에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 55에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 55에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 55에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 55에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 56에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 56에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 56에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 57에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 57에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 57에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 57에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 58에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 58에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 58에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 58에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 59에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 59에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 59에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 59에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 60에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 60에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 60에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 60에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 61에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 61에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 61에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 61에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 62에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 62에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 62에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 62에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 63에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 63에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는

데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 63에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 63에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 64에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 64에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 64에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 64에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 65에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 65에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 65에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 65에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 66에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 66에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 66에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 66에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 67에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 67에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 67에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 67에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 68에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 68에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 68에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 68에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 69에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 69에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 69에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 69에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 70에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 70에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 70에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 70에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 71에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 71에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 71에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 71에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 72에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 72에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 72에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 72에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 73에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 73에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 73에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 73에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 74에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 74에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 74에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 74에 제시된 서열로

본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 75에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 75에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 75에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 75에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 76에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 76에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 76에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 76에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 77에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 77에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 77에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 77에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 78에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 78에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 78에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 78에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 79에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 79에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 79에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 79에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 80에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 80에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 80에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 80에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 81에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 81에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 81에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 81에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 82에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 82에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 82에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 82에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 83에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 83에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 83에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 83에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 84에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 84에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 84에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 84에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 85에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 85에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 85에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 85에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 86에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로

구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 86에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 86에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 86에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 87에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 87에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 87에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 87에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 88에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 88에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 88에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 88에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 89에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 89에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 89에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 89에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 90에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 90에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 90에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 90에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 91에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 91에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 91에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 91에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 92에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 92에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 92에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 92에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 93에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 93에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 93에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 93에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 94에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 94에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 94에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 94에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 95에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 95에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 95에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 95에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 96에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 96에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 96에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 96에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 97에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 97에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는

데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 97에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 97에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 98에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 98에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 98에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 98에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 99에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 99에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 99에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 99에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다.

[0221] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 유전자 편집 방법은 (i) *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (ii) *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 또는 (iii)(i) 및 (ii) 둘 모두의 수준을 감소시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 25에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA 서열번호: 25에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 25에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 25에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 26에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA 서열번호: 26에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 26에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 26에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A2* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 27에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A2* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA 서열번호: 27에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 27에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 27에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A2* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 28에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A2* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA 서열번호: 28에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 28에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 28에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A2* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 29에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A2* 유전자를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA 서열번호: 29에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 29에 제시된 서열로 구성된다. 일부 측면에서, *NR4A1* 유전자를 표적화하는데 사용될 수 있는 gRNA는 서열번호: 29에 제시된 서열로 본질적으로 구성된다.

[0222] 본원에 사용된 용어 "접촉"(예를 들어, 세포, 예를 들어 면역 세포를 적어도 하나의 gRNA 및 적어도 하나의 Cas9와 접촉시키는 것)은 적어도 하나의 gRNA 및 적어도 하나의 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9를 시험관내에서 세포에서 인큐베이션(예를 들어, gRNA 및/또는 Cas 단백질, 또는 gRNA(들) 및/또는 Cas9 단백질(들)을 코딩하는 핵산(들)을 배양 중인 세포에 첨가하는)하는 것 또는 생체내 또는 생체외에서 세포를 접촉시키는 것을 포함하도록 의도된다.

[0223] *NR4A3* 유전자 표적 서열을 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 gRNA 및 적어도 하나의 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9(또는 이를 코딩하는 적어도 하나의 핵산)와 접촉시키는 단계는 임의의 적합한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 세포, 예를 들어 면역 세포는 세포 배양 조건에서 처리될 수 있다. 본원에 개시된 적어도 하나의 gRNA 및 적어도 하나의 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9 단백질(또는 이를 코딩하는 적어도 하나의 핵산)과 접촉된 세포는 또한 동시에 또는 후속적으로 또 다른 작용제, 예를 들어 CAR 또는 TCR을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 벡터와 접촉될 수 있는 것으로 이해된다. 일부 측면에서, 세포가 시험관내 또는 생체외에서 접촉된 후, 방법은 세포를 대상체에 도입하여 질병 또는 상태, 예를 들어 암의 증상을 치료 또는 완화시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0224] 생체외 방법의 경우, 세포는 자가 세포, 즉 면역 세포 또는 세포 또는 세포들에서 표적 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, *NR4A3* 유전자)의 변경이 필요한 대상체로부터 채취한 세포를 포함할 수 있다(즉, 기증자와 수용자는 동일한 개체이다). 자가 세포는 세포의 면역학적으로 인한 거부 반응을 피할 수 있다는 장점이 있다. 대안적으로, 세포는 이종성일 수 있으며, 예를 들어 기증자로부터 채취될 수 있다. 전형적으로, 세포가 기증자로부터 유래하는 경우, 이는 수용자와 충분히 면역학적으로 적합할 수 있는, 즉 면역억제의 필요성을 줄이거나 제거하기 위해 이식 거부 대상이 되지 않는 기증자로부터 유래될 것이다. 일부 측면에서, 세포는 이종 발생원, 즉 수용자 또는 수용자의 종과 충분히 면역학적으로 적합하도록 유전적으로 조작된 비-인간 포유동물로부터 채취된다. 면역학적 적합성을 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, HLA 및 ABO 결정인자에 대한 기증자-수용자 적합성을 평가하기 위한 조직 분류를 포함한다. 예를 들어, Transplantation Immunology, Bach and Auchincloss, Eds. (Wiley, John & Sons, Incorporated 1994) 참조.

[0225] 일부 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 *NR4A3* 유전자 서열을 Cas9 단백질(또는 이러한 Cas9 단백질을 코딩하는 핵산) 및 하나의 gRNA을 접촉시킴으로써 세포, 예를 들어 면역 세포(예컨대 T 세포)에서 *NR4A3* 유전자 서열을 생체외에서 변경시키는 것을 포함하는 변형된 면역 세포를 생성하는 방법을 제공하며, 이는 *NR4A3* 유전자에서 모티프를 표적화한다(예를 들어 모티프는 gRNA가 Cas9 단백질을 표적 유전자로 지시하고 표적 모티프에 혼성화하고, 여기서 *NR4A3* 유전자는 부분적으로 또는 완전히 절단되고, 절단 효율은 약 10% 내지 약 100%이다). 이러한 gRNA의 비-제한적인 예가 본원에 제공된다(예를 들어, 표 A, C 및 D 참조). 본원에 기재된 일부 측면에서, 본원에 기재된 변형된 면역 세포를 생성하는 방법은 세포를 Cas9 단백질을 코딩하는 제1 핵산 분자 및 *NR4A* 유전자 계열의 하나 이상의 구성원을 표적화하는 gRNA를 포함하는 제2 핵산 분자와 접촉시킴으로써 *NR4A* 유전자 서열을 변경하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 제1 분자와 핵산 분자는 순차적으로 세포와 접촉된다. 일부 측면에서, 제1 분자와 핵산 분자는 동시에 세포와 접촉된다. 예를 들어, 일부 측면에서, 세포는 Cas9 단백질을 코딩하는 제1 핵산 분자 및 gRNA를 포함하는 제2 핵산 분자를 포함하는 단일 폴리뉴클레오티드와 접촉된다.

[0226] 일부 측면에서, 세포는 상기 기재된 변경 단계 이전에, 이후에 또는 동시에 CAR 또는 TCR을 코딩하는 핵산(예를 들어, 벡터)으로 변형(예를 들어, 형질감염)되었다.

[0227] 일부 측면에서, 절단 효율은 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%이다.

[0228] 본 개시내용의 CRISPR/Cas 시스템은 사용된 Cas, 예를 들어 Cas9에 따라 다양한 길이의 gRNA 스페이서 서열을 사용할 수 있다. 상이한 종으로부터의 Cas9는 기능성 리보핵단백질(RNP) 복합체를 형성하기 위해 상응하는 gRNA와 쌍을 이루어야 하며, 즉 상이한 박테리아 종에서 조작된 키메라 gRNA 프레임은 스페이서 서열과 키메라 프레임 서열의 차이로 인해 상이한 길이를 가질 수 있다.

[0229] 일부 측면에서, gRNA 스페이서 서열은 길이가 적어도 18개 뉴클레오티드(예를 들어, 18, 19, 20, 21 또는 22개 뉴클레오티드)일 수 있다. 예를 들어, *S. 피오게네스(S. pyogenes)* Cas9에 결합하는 gRNA의 *S. 피오게네스(S. pyogenes)* gRNA 스페이서 서열의 길이는 20개 뉴클레오티드인 반면, *S. 아우레우스(S. aureus)* Cas9에 결합하는 gRNA의 *S. 아우레우스(S. aureus)* gRNA 스페이서 서열의 길이는 21개 뉴클레오티드이다. 일부 측면에서, gRNA 스페이서 서열은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 특정 측면에서, gRNA는 *NR4A3* 유전자의 엑손 3의 하위서열에 상응하는 18개 내지 22개의 연속 뉴클레오티드(예를 들어, 20개)로 구성된 스페이서 서열을 포함한다. 일부 측면에서, gRNA는 *NR4A3* 유전자의 엑손 4의 하위서열에 상응하는 18개 내지 22개의 연속 뉴클레오티드(예를 들어, 20개)로 구성된 스페이서 서열을 포함한다. 일부 측면에서, gRNA는 *NR4A3* 유전자의 엑손 3 또는 엑손 4의 하위서열에 상응하는 18 내지 22개의 연속 뉴클레오티드(예를 들어, 20개)로 구성된 스페이서 서열을 포함한다.

[0230] gRNA 스페이서 서열과 이것이 *NR4A3* 유전자 상에서 결합하는 DNA 가닥 사이의 완벽한 일치가 바람직하지만, *NR4A3* 유전자 수준 감소 또는 *NR4A3* 유전자 기능 감소를 초래하는 한, gRNA 스페이서 서열과 *NR4A3* 표적 서열 사이의 불일치도 허용된다. 표적 *NR4A3* 유전자에 대한 표적 서열의 적절한 인식을 위해서는 표적 *NR4A3* 서열에 완벽하게 상보적인 gRNA 상의 8-12개 연속 뉴클레오티드의 "시드" 서열이 바람직하다. gRNA 스페이서 서열의 나머지 부분은 하나 이상의 불일치를 포함할 수 있다.

[0231] 일반적으로, gRNA 활성은 불일치 수와 역상관관계가 있다. 바람직하게는, 본 개시내용의 gRNA 스페이서 서열은

7개 미만의 불일치를 포함한다. 일부 측면에서, gRNA 스페이서 서열은 상응하는 *NR4A3* 유전자 표적 서열과 7개의 불일치, 6개의 불일치, 5개의 불일치, 4개의 불일치, 3개의 불일치, 보다 바람직하게는 2개 이하의 불일치, 보다 더 바람직하게는 불일치 없음을 포함한다. gRNA의 뉴클레오티드 수가 적을수록 허용되는 불일치 수가 적어진다. 결합 친화도는 일치하는 gRNA-DNA 조합의 합에 따라 달라지는 것으로 생각된다.

[0232] 본 개시내용의 gRNA 스페이서 서열은 CRISPR/Cas 편집 시스템의 표적외 효과를 최소화하도록 선택될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, gRNA 스페이서 서열은 세포 내의 다른 모든 게놈 뉴클레오티드 서열과 비교할 때 적어도 2개의 불일치를 함유하도록 선택된다. 일부 측면에서, gRNA 스페이서 서열은 세포 내의 다른 모든 게놈 뉴클레오티드 서열과 비교할 때 적어도 하나의 불일치를 함유하도록 선택된다. 당업자는 표적외 효과를 최소화하기 위해 적합한 gRNA 스페이서 서열을 선택하기 위해 다양한 기술(예를 들어, 생물정보학 분석)이 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0233] 일부 측면에서, gRNA 스페이서 서열은 서열번호: 31-42의 스페이서 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다.

[0234] 일부 측면에서, gRNA 스페이서 서열은 서열번호: 31-42 중 어느 하나의 DNA 서열과 비교하여 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 뉴클레오티드 불일치를 포함하는 스페이서 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다.

[0235] 일부 측면에서, 편집 효능은 여러 위치를 표적화함으로써 증가될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본원에 개시된 방법은 *NR4A3* 유전자의 엑손 1로부터 업스트림 위치를 표적화하는 하나의 gRNA를 사용하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 방법은 *NR4A3* 유전자의 엑손 1로부터 업스트림 위치를 표적화하는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 gRNA를 사용하는 것을 포함한다. 또한, 일부 측면에서, 본원에 개시된 방법은 *NR4A3* 유전자의 엑손 4 다운스트림 위치를 표적화하는 하나의 gRNA를 사용하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 방법은 *NR4A3* 유전자의 엑손 4로부터 다운스트림 위치를 표적화하는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 gRNA를 사용하는 것을 포함한다.

[0236] 일부 측면에서, 2개의 gRNA는 *NR4A3* 유전자의 동일한 가닥 상의 서열에 상보적이고/거나 이에 혼성화된다. 일부 측면에서, 2개의 gRNA는 *NR4A3* 유전자의 반대 가닥 상의 서열에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다. 일부 측면에서, 2개의 gRNA는 *NR4A3* 유전자의 반대 가닥 상의 서열에 상보적이지 않고/않거나 이에 혼성화하지 않는다. 일부 측면에서, 2개의 gRNA는 *NR4A3* 유전자의 중첩 표적 모티프에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다. 일부 측면에서, 2개의 gRNA는 *NR4A3* 유전자의 표적외 모티프에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다.

[0237] 일반적으로, 본 개시내용의 gRNA는 상응하는 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9 단백질의 표적 서열에의 결합 및 *NR4A3* 유전자의 후속적인 절제(전체 또는 부분)를 허용하는 한, 이의 서열의 임의의 변이체 또는 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[0238] 본원에 개시된 방법에 사용되는 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9는 핵산을 절단하고 수많은 박테리아 게놈의 CRISPR 유전자좌에 의해 코딩되며 유형 II CRISPR 시스템에 관여하는 엔도뉴클레아제이다. Cas9 단백질은 *화농성 연쇄상구균(Streptococcus pyogenes), 연쇄상구균 아우레우스(Staphylococcus aureus), 연쇄구균 서모필루스(Streptococcus thermophilus), 나이세리아 수막염(Neisseria meningitidis)* 등을 포함하는 수많은 박테리아 종에 의해 생산된다. 따라서, 본 개시내용에 유용한 Cas9 단백질은 당업계에 공지된 임의의 적합한 박테리아로부터 유래될 수 있다. 이러한 박테리아의 비-제한적 예에는 *화농성 연쇄상구균(Streptococcus pyogenes), 뮤탄스 연쇄상구균(Streptococcus mutans), 연쇄상구균 폐렴(Streptococcus pneumonia), 연쇄상구균 아우레우스(Streptococcus aureus), 연쇄상구균 써모필루스(Streptococcus thermophilus), 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni), 네이세리아 수막염균(Neisseria meningitidis), 파스퇴렐라 물토시다(Pasteurella multocida), 리스테리아 이노쿠아(Listeria innocua)* 및 *프란시셀라 노비시다(Francisella novicida)*가 포함된다. 본원에 개시된 방법은 당업계에 공지된 임의의 Cas9를 사용하여 실행될 수 있다. 일부 측면에서 Cas9는 야생형 Cas9이다. 일부 측면에서, Cas9는 향상된 효소 활성을 갖는 돌연변이된 Cas9 또는 Cas9 모이어티를 포함하는 융합 단백질이다. 일부 측면에서, Cas9 뉴클레아제 단백질은 *화농성 연쇄상구균(Streptococcus pyogenes)* Cas9 단백질이다.

[0239] Cas9 뉴클레아제 단백질은 일반적으로 박테리아에서 발현되기 때문에, Cas9 재조합 단백질을 설계하고 제조할 때 진핵 세포(예를 들어, 포유류 세포)에서 최적의 발현을 위해 핵산 서열을 변형하는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본원에 개시된 방법에 사용되는 Cas9를 코딩하는 핵산은 진핵 세포에서의 발현, 예를 들

어 이를 필요로 하는 인간 대상체의 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화되었다.

[0240] 일부 측면에서, 본원에 개시된 방법에 사용되는 Cas9 단백질은 하나 이상의 아미노산 치환 또는 변형을 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 일부 예에서, 치환 및/또는 변형은 단백질 분해를 방지하거나 감소시키고/시키거나 세포내 폴리펩티드의 반감기를 연장시킬 수 있다. 일부 측면에서, Cas9 단백질은 펩티드 결합 대체(예를 들어, 우레아, 티오우레아, 카바메이트, 설포닐 우레아 등)를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, Cas9 단백질은 자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, Cas9 단백질은 대체 아미노산(예를 들어, D-아미노산, 베타-아미노산, 호모시스테인, 포스포세린 등)을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, Cas9 단백질은 이종 모이어티(예를 들어, PEG화, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 단부-캡핑 등)를 포함하는 변형을 포함할 수 있다.

[0241] 본원에 개시된 방법은 일반적으로 Cas9 단백질을 사용하여 실시되지만, 일부 측면에서 Cas 단백질은 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7 또는 Cas8일 수 있는 것으로 구상된다. 일부 측면에서, Cas 단백질은 임의의 박테리아 종 또는 이의 기능적 부분으로부터의 Cas9 단백질이다. 일부 구체적인 측면에서, 본원에 개시된 방법에 사용되는 Cas9 단백질은 *화농성 연쇄상구균(Streptococcus pyogenes)* 또는 *포도상구균 아우레우스(Staphylococcus aureus)* Cas9 단백질 또는 이의 기능적 부분, 또는 이러한 Cas9 또는 이의 기능적 부분을 코딩하는 핵산이다. 사용될 수 있는 다른 Cas 뉴클레아제의 비-제한적 예는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어 US 9,970,001 B2; US 10,221,398 B2; 및 US 2020/0190487 A1, 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 Cas 뉴클레아제는 유형 I Cas 단백질을 포함한다. 유형 I Cas 단백질의 비-제한적 예에는 Cas3, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas10d, Cse1, Cse2, Csy1, Csy2, Csy3 및 이의 변이체가 포함된다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 Cas 뉴클레아제는 유형 II Cas 단백질을 포함한다. 유형 II Cas 단백질의 비-제한적인 예에는 Cas9, Csn2, Cas4 및 이의 변이체가 포함된다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 Cas 뉴클레아제는 유형 III Cas 단백질을 포함한다. 비-제한적인 예에는 Cas10, Csm2, Cmr5, Csx10, Csx11 및 이의 변이체가 포함된다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 Cas 뉴클레아제는 유형 IV Cas 단백질을 포함한다. 이러한 Cas 단백질의 비-제한적인 예에는 Csf1이 포함된다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 Cas 뉴클레아제는 유형 V Cas 단백질을 포함한다. 비-제한적인 예에는 Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(Cas14, C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), C2c4, C2c8, C2c9 및 이의 변이체가 포함된다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 Cas 뉴클레아제는 유형 VI Cas 단백질을 포함한다. 유형 VI Cas 단백질의 비-제한적인 예에는 Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d 및 이의 변이체가 포함된다.

[0242] 일부 경우에, 본 개시내용에 유용한 Cas 단백질은 상기에서 언급된 Cas 단백질의 오솔로그 또는 상동체를 포함한다. 용어 "오솔로그"(본원에서는 "오솔로그"라고도 함) 및 "상동체"(본원에서는 "상동체"라고도 함)는 해당 분야에 잘 알려져 있다. 추가 안내에 따르면, 본원에 사용된 단백질의 "상동체"는 그것이 상동체인 단백질과 동일하거나 유사한 기능을 수행하는 동일한 종의 단백질이다. 상동 단백질은 구조적으로 관련될 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없거나 부분적으로만 구조적으로 관련되어 있다. 본원에 사용된 단백질의 "오솔로그"는 그것이 오솔로그인 단백질과 동일하거나 유사한 기능을 수행하는 다른 종의 단백질이다. 오솔로그 단백질은 구조적으로 관련될 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없거나 부분적으로만 구조적으로 관련되어 있다.

[0243] 본원에 사용된 "기능적 부분"은 적어도 하나의 gRNA와 복합체를 형성하고 표적 서열을 절단하여 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키는 능력을 유지하는 펩티드, 예를 들어 Cas9의 부분을 의미한다. 일부 측면에서, 기능적 부분은 DNA 결합 도메인, 적어도 하나의 RNA 결합 도메인, 헬리카제 도메인 및 엔도뉴클레아제 도메인으로 구성된 군으로부터 선택되는 작동가능하게 연결된 Cas9 단백질 기능적 도메인의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 기능성 도메인은 비-공유 복합체를 형성한다. 일부 측면에서, 기능성 도메인은 융합 복합체(예를 들어, 융합 단백질)를 형성한다. 일부 측면에서, 기능성 도메인은 화학적으로 연결된다(예를 들어, 하나 이상의 스페이서 또는 링커를 통해). 일부 측면에서, 기능성 도메인은 접합된다.

[0244] 본 개시내용은 *NR4A3* 유전자를 적어도 하나의 gRNA 및 적어도 하나의 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9와 접촉시키는 다양한 방식을 고려한다는 것이 이해되어야 한다. 일부 측면에서, 외인성 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9는 폴리펩티드 형태로 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 측면에서, Cas 단백질, 예를 들어 Cas9는 세포-투과 폴리펩티드 또는 세포-투과 펩티드에 접합되거나 융합될 수 있다. 본원에서 사용되는 "세포-투과 폴리펩티드" 및 "세포-투과 펩티드"는 각각 분자의 세포내 흡수를 촉진하는 폴리펩티드 또는 펩티드를 의미한다. 세포-투과 폴리펩티드는 검출가능한 표지를 함유할 수 있다.

[0245] 일부 측면에서, Cas 단백질, 예를 들어 Cas9는 하전된 단백질, 예를 들어 양전하, 음전하 또는 전체 중성 전하를 운반하는 단백질에 접합되거나 융합될 수 있다. 이러한 연결은 공유적일 수 있다. 일부 측면에서, Cas 단백질, 예를 들어 Cas9는 초양하로 하전된 펩티드에 융합되어 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9의 세포 침투 능력을 상당히 증가시킬 수 있다. Cronican et al. ACS Chem. Biol. 5(8):747-52 (2010) 참조. 일부 측면에서, Cas 단백질, 예를 들어 Cas9는 단백질 형질도입 도메인(PTD)에 융합되어 세포 내로의 진입을 촉진할 수 있다. 예시적인 PTD에는 Tat, 올리고아르기닌 및 페네트라틴이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 일부 특정 측면에서, 본원에 개시된 방법은 Cas 단백질, 예를 들어 세포-투과 펩티드에 융합된 Cas 단백질, PTD에 융합된 Cas 단백질, tat 도메인에 융합된 Cas 단백질, 올리고아르기닌 도메인에 융합된 Cas 단백질, 페네트라틴 도메인에 융합된 Cas 단백질, 또는 이들의 조합을 포함하는 Cas9 단백질을 사용하여 실행될 수 있다.

[0246] 일부 측면에서, Cas 단백질, 예를 들어 Cas9는 세포, 예를 들어 본원에 개시된 면역 세포, 예를 들어 표적 폴리뉴클레오티드 서열, 즉 *NR4A3* 유전자를 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9를 코딩하는 핵산 형태로 함유하는 CAR 또는 TCR을 발현하는 면역 세포 내로 도입될 수 있다. 핵산을 세포에 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술에는 인산칼슘 또는 지질-매개 형질감염, 전기천공, 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염이 포함된다. 일부 측면에서, 핵산은 DNA를 포함한다. 일부 측면에서, 핵산은 본원에 기재된 변형된 DNA를 포함한다. 일부 측면에서, 핵산은 mRNA를 포함한다. 일부 측면에서, 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 변형된 mRNA(예를 들어, 합성, 변형된 mRNA)를 포함한다.

[0247] 본원에 개시된 방법에 사용되는 gRNA 서열 및/또는 Cas9를 코딩하는 핵산 서열은 화학적으로 변형되어 예를 들어 안정성을 향상시킬 수 있다(예를 들어, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여한 후 혈장 반감기를 증가시키기 위해). 본원에 개시된 gRNA 및/또는 예를 들어 Cas9를 코딩하는 핵산 서열에 대한 가능한 화학적 변형은 본 명세서에서 아래에 상세히 논의된다.

[0248] 일부 측면에서, 전체 gRNA는 화학적으로 변형된다. 일부 측면에서는 gRNA 스페이서만 화학적으로 변형된다. 일부 측면에서, gRNA 스페이서 및 gRNA 프레임 서열이 화학적으로 변형된다. 특정 화학적 변형의 비-제한적인 예는 하기에 자세히 개시되어 있다.

[0249] 따라서, 본원에 개시된 방법의 일부 측면에서, Cas 단백질(예를 들어, Cas9) 및 하나 이상의 gRNA는 이를 코딩하는 하나 이상의 전달 벡터로부터의 발현을 통해 표적 세포에 제공된다. 일부 측면에서, 표적 세포에 gRNA 또는 gRNA 및 Cas9를 도입하기 위한 상기 언급된 벡터 또는 벡터들은 바이러스 벡터이다. 일부 측면에서, gRNA 또는 gRNA 및 Cas9를 표적 세포에 도입하기 위한 상기 언급된 벡터 또는 벡터들은 비-바이러스성 벡터이다. 일부 측면에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 벡터(AAV), 렌티바이러스 벡터(LV), 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 또는 이들의 조합이다. AAV 벡터 또는 벡터들은 AAVI, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8 및 AAV9를 포함하는 여러 캡시드 유형 중 하나 이상을 기반으로 할 수 있다. 일부 측면에서, AAV 벡터는 AAVDJ-8, AAV2DJ9, 또는 이들의 조합이다.

[0250] 상기에 개시된 방법에 더하여, 본 개시내용은 개시된 방법을 실시하기 위한 조성물을 추가로 제공한다. 따라서, 본 개시내용은 상기 언급된 gRNA 중 적어도 하나를 코딩하는 핵산을 제공한다.

[0251] 또한 조성물 및/또는 적어도 하나의 Cas9가 제공된다. 일부 측면에서, Cas9를 코딩하는 핵산은 (i) *S. 아우레우스* 유래 Cas9, (ii) *S. 파이오게네스* 유래 Cas9, (iii) *S. 아우레우스* 유래 Cas9 또는 *S. 파이오게네스* 유래 Cas9 돌연변이 Cas9, 여기서 돌연변이 단백질은 Cas9 활성을 보유하며, (iv) Cas9 모이어티를 포함하는 융합 단백질, 또는 (v) 이들의 조합을 코딩한다.

[0252] 일부 측면에서, 하나 이상의 유전자 편집 도구(예를 들어, 본원에 개시된 도구)를 사용하여 본 개시내용의 세포를 변형시킬 수 있다.

[0253] V.A.2. *TALEN*

[0254] 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 편집(예를 들어, 감소 또는 억제)하는 데 사용될 수 있는 유전자 편집 도구는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)와 같은 뉴클레아제 제제이다. TAL 이펙터 뉴클레아제는 원핵생물 또는 진핵생물 유기체 게놈의 특정 표적 서열에서 이중-가닥 파손을 만드는 데 사용할 수 있는 서열-특이적 뉴클레아제 부류이다. TAL 이펙터 뉴클레아제는 천연 또는 조작된 전사 활성화제-유사(TAL) 이펙터 또는 이의 기능적 부분을 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인, 예를 들어 FokI에 융합시켜 생성된다.

[0255] 독특한 모듈식 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인은 잠재적으로 임의의 주어진 DNA 인식 특이성을 갖는 단백질의 설계를 허용한다. 따라서, TAL 이펙터 뉴클레아제의 DNA 결합 도메인은 특정 DNA 표적 부위를 인식하도록 조작될 수 있으며, 따라서 원하는 표적 서열에서 이중-가닥 파손을 만드는 데 사용될 수 있다. WO 2010/079430; Morbitzer *et al.*, (2010) *PNAS* 10.1073/pnas.1013133107; Scholze & Boch (2010) *Virulence* 1:428-432; Christian *et al.*, *Genetics* (2010) 186:757-761; Li *et al.*, (2010) *Nuc. Acids Res.* (2010) doi:10.1093/nar/gkq704; 및 Miller *et al.*, (2011) *Nature Biotechnology* 29:143-148; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0256] 적합한 TAL 뉴클레아제의 비-제한적 예, 및 적합한 TAL 뉴클레아제를 제조하는 방법은 문헌에 개시되어 있다: 미국 특허 출원 번호 2011/0239315 A1, 2011/0269234 A1, 2011/0145940 A1, 2003/0232410 A1, 2005/0208489 A1, 2005/0026157 A1, 2005/0064474 A1, 2006/0188987 A1, 및 2006/0063231 A1; 각각은 참조로 포함된다.

[0257] 다양한 측면에서, TAL 이펙터 뉴클레아제는, 예를 들어 관심 게놈 유전자좌에서 또는 그 부근에서 표적 핵산 서열을 절단하도록 조작되며, 여기서 표적 핵산 서열은 표적화 벡터에 의해 변형될 서열 또는 그 부근에 있다. 본원에 제공된 다양한 방법 및 조성물과 함께 사용하기에 적합한 TAL 뉴클레아제에는 본원에 기재된 바와 같은 표적화 벡터에 의해 변형될 표적 핵산 서열에 또는 그 근처에 결합하도록 특이적으로 설계된 것들이 포함된다.

[0258] 일부 측면에서, TALEN의 각 단량체는 12-25개의 TAL 반복을 포함하며, 여기서 각 TAL 반복은 1 bp 하위부위에 결합한다. 일부 측면에서, 뉴클레아제 제제는 독립적인 뉴클레아제에 작동가능하게 연결된 TAL 반복-기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질이다. 일부 측면에서, 독립 뉴클레아제는 FokI 엔도뉴클레아제이다. 일부 측면에서, 뉴클레아제 제제는 제1 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인 및 제2 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인을 포함하며, 여기서 각각의 제1 및 제2 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인은 FokI 뉴클레아제에 작동가능하게 연결되며, 여기서 제1 및 제2 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인은 약 6 bp 내지 약 40 bp 절단 부위로 분리된 표적 DNA 서열의 각 가닥에서 2개의 연속 표적 DNA 서열을 인식하고, 여기서 FokI 뉴클레아제는 이량체화하고 표적 서열에서 이중 가닥 파손을 만든다.

[0259] 일부 측면에서, 뉴클레아제 제제는 제1 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인 및 제2 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인을 포함하며, 여기서 각각의 제1 및 제2 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인은 FokI 뉴클레아제에 작동가능하게 연결되며, 여기서 제1 및 제2 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인은 약 5 bp 또는 약 6 bp 절단 부위로 분리된 표적 DNA 서열의 각 가닥에서 2개의 연속 표적 DNA 서열을 인식하고, 여기서 FokI 뉴클레아제는 이량체화하고 표적 서열에서 이중 가닥 파손을 만든다.

[0260] ***V.A.3. 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)***

[0261] 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 유전자 편집 도구는 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN) 시스템과 같은 뉴클레아제 제제를 포함한다. 징크 핑거-기반 시스템은 2개의 단백질 도메인, 즉 징크 핑거 DNA 결합 도메인과 효소 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. "징크 핑거 DNA 결합 도메인", "징크 핑거 단백질" 또는 "ZFP"는 징크 이온의 배위를 통해 구조가 안정화된 결합 도메인 내의 아미노산 서열의 영역인 하나 이상의 징크 핑거를 통해 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합하는 단백질 또는 더 큰 단백질 내의 도메인이다. 징크 핑거 도메인은 표적 DNA 서열(예를 들어, *NR4A3*)에 결합함으로써 효소 도메인의 활성을 서열 부근으로 지시하고, 이에 따라 표적 서열 부근에서 내인성 표적 유전자의 변형을 유도한다. 징크 핑거 도메인은 사실상 원하는 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 일부 측면에서, 징크 핑거 도메인은 NR4A3 단백질을 코딩하는 DNA 서열에 결합한다. 따라서, 절단 또는 재조합이 요구되는 표적 DNA 서열을 함유하는 표적 유전자좌(예를 들어, 표 1에 언급된 표적 유전자의 표적 유전자좌)를 확인한 후, 하나 이상의 징크 핑거 결합 도메인을 조작하여 표적 유전자좌에 있는 하나 이상의 표적 DNA 서열에 결합할 수 있다. 세포 내 징크핑거 결합 도메인과 효소 도메인을 포함하는 융합 단백질의 발현은 표적 유전자좌의 변형을 초래한다.

[0262] 일부 측면에서, 징크 핑거 결합 도메인은 하나 이상의 징크 핑거를 포함한다. Miller *et al.*, (1985) EMBO J. 4:1609-1614; Rhodes (1993) Scientific American February:56-65; 미국 특허 번호 6,453,242. 일반적으로 단일 징크 핑거 도메인의 길이는 약 30개 아미노산이다. 개별 징크 핑거는 3-뉴클레오티드(즉, 삼중항) 서열(또는 인접한 징크 핑거의 4-뉴클레오티드 결합 부위와 하나의 뉴클레오티드가 겹칠 수 있는 4-뉴클레오티드 서열)에 결합한다. 따라서, 징크 핑거 결합 도메인이 결합되도록 조작된 서열(예를 들어, 표적 서열)의 길이는 조작된 징크 핑거 결합 도메인 내 징크 핑거의 수를 결정할 것이다. 예를 들어, 핑거 모티프가 중첩된 하위부위에 결합하지 않는 ZFP의 경우, 6-뉴클레오티드 표적 서열은 2-핑거 결합 도메인에 의해 결합되고; 9-뉴클레오티드 표적 서열은 3-핑거 결합 도메인에 의해 결합된다. 표적 부위에서 개별 징크 핑거(즉, 하위 부위)에 대한 결합 부위는 연속적일 필요는 없지만, 다중-핑거 결합 도메인에서 징크 핑거(즉, 핑거간 링커) 사이의 아미노산 서열의

길이와 성질에 따라 하나 또는 여러 개의 뉴클레오티드로 분리될 수 있다. 일부 측면에서, 개별 ZFN의 DNA-결합 도메인은 3 내지 6개의 개별 징크 핑거 반복을 포함하고 각각 9 내지 18개의 염기쌍을 인식할 수 있다.

[0263] 징크 핑거 결합 도메인은 선택된 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, Beerli *et al.*, (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo *et al.*, (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan *et al.*, (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal *et al.*, (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo *et al.*, (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416 참조. 조작된 징크 핑거 결합 도메인은 자연-발생 징크 핑거 단백질과 비교하여 새로운 결합 특이성을 가질 수 있다. 조작 방법에는 합리적인 설계와 다양한 유형의 선택이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0264] 징크 핑거 도메인에 의한 결합을 위한 표적 DNA 서열의 선택은, 예를 들어 미국 특허 6,453,242에 개시된 방법에 따라 달성될 수 있다. 뉴클레오티드 서열의 단순한 육안 검사가 표적 DNA 서열의 선택에도 사용될 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 표적 DNA 서열 선택을 위한 임의의 수단이 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 표적 부위는 일반적으로 적어도 9개 뉴클레오티드 길이를 가지며, 따라서 적어도 3개 징크 핑거를 포함하는 징크 핑거 결합 도메인에 의해 결합된다. 그러나, 예를 들어 12-뉴클레오티드 표적 부위에 4-핑거 결합 도메인, 15-뉴클레오티드 표적 부위에 5-핑거 결합 도메인 또는 18-뉴클레오티드 표적 부위에 6-핑거 결합 도메인의 결합이 또한 가능한다. 명백해지듯이, 더 긴 표적 부위에 더 큰 결합 도메인(예를 들어, 7-, 8-, 9-핑거 등)을 결합하는 것도 가능하다.

[0265] 징크 핑거 융합 단백질의 효소 도메인 부분은 임의의 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 얻을 수 있다. 효소 도메인이 유래될 수 있는 예시적인 엔도뉴클레아제에는 제한 엔도뉴클레아제 및 귀소 엔도뉴클레아제가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, Mass.; 및 Belfort *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388. DNA를 절단하는 추가 효소가 알려져 있다(예를 들어, S1 Nuclease; mung bean nuclease; pancreatic DNaseI; micrococcal nuclease; yeast HO endonuclease; see also Linn *et al.*, (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). 이들 효소(또는 이의 기능적 단편) 중 하나 이상이 절단 도메인의 공급원으로 사용될 수 있다. 본원에 기재된 ZFP의 효소 도메인으로 사용하기에 적합한 예시적인 제한 엔도뉴클레아제(제한 효소)는 많은 종에 존재하며 (인식 부위에서) DNA에 서열-특이적 결합이 가능하고, 결합 부위 또는 근처에서 DNA를 절단할 수 있다. 특정 제한 효소(예를 들어, 유형 IIS)는 인식 부위에서 제거된 부위에서 DNA를 절단하고 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 갖는다. 예를 들어, 유형 IIS 효소 FokI는 한 가닥의 인식 부위에서 9개의 뉴클레오티드, 다른 가닥의 인식 부위에서 13개의 뉴클레오티드에서 DNA의 이중-가닥 절단을 촉매한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,356,802; 5,436,150 및 5,487,994; 및 Li *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim *et al.*, (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim *et al.*, (1994b) *J. Biol. Chem.* 269: 31,978-31,982 참조. 따라서, 일부 측면에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 유형 IIS 제한 효소로부터의 효소 도메인 및 하나 이상의 징크 핑거 결합 도메인을 포함한다.

[0266] 절단 도메인이 결합 도메인으로부터 분리가능한 예시적인 유형 IIS 제한 효소는 FokI이다. 이 특정 효소는 이량체로 활성을 갖는다. Bitinaite *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10,570-10,575. 따라서, 징크 핑거-FokI 융합을 사용한 표적화된 이중-가닥 DNA 절단의 경우, 각각 FokI 효소 도메인을 포함하는 2개의 융합 단백질을 사용하여 촉매 활성 절단 도메인을 재구성할 수 있다. 대안적으로, 징크 핑거 결합 도메인 및 2개의 FokI 효소 도메인을 함유하는 단일 폴리펩티드 분자도 사용될 수 있다. FokI 효소 도메인을 포함하는 예시적인 ZFP는 미국 특허 번호 9,782,437에 기술되어 있다.

[0267] ***V.A.3. 메가뉴클레아제***

[0268] 일부 측면에서, 세포에서 NR4A3 발현을 조절하는 데 사용되는 유전자 편집 도구에는 메가뉴클레아제 시스템과 같은 뉴클레아제 제제가 포함된다. 메가뉴클레아제는 보존된 서열 모티프를 기반으로 4개의 계열로 분류되었으며, 해당 계열은"LAGLIDADG," "GIY-YIG, " "H-N-H, " 및 "His-Cys box" 계열이다. 이러한 모티프는 금속 이온의 배위 및 포스포디에스테르 결합의 가수분해에 참여한다.

[0269] HEase는 긴 인식 부위와 DNA 기질에서 일부 서열 다형성을 허용하는 것으로 유명한다. 메가뉴클레아제 도메인, 구조 및 기능은 알려져 있다. 예를 들어, Guhan and Muniyappa (2003) Crit Rev Biochem Mol Biol 38:199-248; Lucas *et al.*, (2001) *Nucleic Acids Res* 29:960-9; Jurica and Stoddard, (1999) *Cell Mol Life Sci* 55:1304-26; Stoddard, (2006) *Q Rev Biophys* 38:49-95; 및 Moure *et al.*, (2002) *Nat Struct Biol* 9:764 참조.

[0270] 일부 예에서는 자연 발생 변이체 및/또는 조작된 유도체 메가뉴클레아제가 사용된다. 동역학, 보조인자 상호작용, 발현, 최적 조건 및/또는 인식 부위 특이성을 변형하고 활성을 스크리닝하는 방법은 공지되어 있다. 예를 들어 Epinat *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:2952-62; Chevalier *et al.*, (2002) *Mol Cell* 10:895-905; Gimble *et al.*, (2003) *Mol Biol* 334:993-1008; Seligman *et al.*, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:3870-9; Sussman *et al.*, (2004) *J Mol Biol* 342:31-41; Rosen *et al.*, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:4791-800; Chames *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e178; Smith *et al.*, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:e149; Gruen *et al.*, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:e29; Chen 및 Zhao, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e154; WO2005105989; WO2003078619; WO2006097854; WO2006097853; WO2006097784; 및 WO2004031346; 이들 각각은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0271] I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SecVI, I-SceVII, I-CeuI, I-CeuAIIP, I-CreI, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIVP, I-TliI, I-PpoI, PI-PspI, F-SceI, F-SceII, F-SuvI, F-TevI, F-TevII, I-AmaI, I-AniI, I-ChuI, I-CmoeI, I-CpaI, I-CpaII, I-CsmI, I-CvuI, I-CvuAIP, I-DdiI, I-DdiII, I-DirI, I-DmoI, I-HmuI, I-HmuII, I-HsNIP, I-LlaI, I-MsoI, I-NaaI, I-NanI, I-NcIIP, I-NgrIP, I-NitI, I-NjaI, I-Nsp236IP, I-PakI, I-PboIP, I-PcuIP, I-PcuAI, I-PcuVI, I-PgrIP, I-PobIP, I-PorIIP, I-PbpIP, I-SpBetaIP, I-ScaI, I-SexIP, I-SneIP, I-SpomI, I-SpomCP, I-SpomIP, I-SpomIIP, I-SquIP, I-Ssp6803I, I-SthPhiJP, I-SthPhiST3P, I-SthPhiSTe3bP, I-TdeIP, I-TevI, I-TevII, I-TevIII, I-UarAP, I-UarHGPAIP, I-UarHGPA13P, I-VinIP, I-ZbiIP, PI-MtuI, PI-MtuHIP, PI-MtuHIIP, PI-PfuI, PI-PfuII, PI-PkoI, PI-PkoII, PI-Rma43812IP, PI-SpBetaIP, PI-SceI, PI-TfuI, PI-TfuII, PI-ThyI, PI-TliI, PI-TliII, 또는 이들의 임의의 활성 변이체 또는 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 메가뉴클레아제가 본원에서 사용될 수 있다.

[0272] 일부 측면에서, 메가뉴클레아제는 12-40개 염기쌍의 이중-가닥 DNA 서열을 인식한다. 일부 측면에서, 메가뉴클레아제는 게놈에서 완벽하게 일치하는 하나의 표적 서열을 인식한다. 일부 측면에서, 메가뉴클레아제는 귀소 뉴클레아제이다. 일부 측면에서, 귀소 뉴클레아제는 귀소 뉴클레아제의 "LAGLIDADG" 계열이다. 일부 측면에서, 귀소 뉴클레아제의 "LAGLIDADG" 계열은 I-SceI, I-CreI, I-Dmol 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0273] ***V.A.4. 제한 엔도뉴클레아제***

[0274] 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 유전자 편집 도구는 유형 I, 유형 II, 유형 III 및 유형 IV 엔도뉴클레아제를 포함하는 제한 엔도뉴클레아제와 같은 뉴클레아제 제제를 포함한다. 유형 I 및 유형 III 제한 엔도뉴클레아제는 특정 인식 부위를 인식하지만, 일반적으로 절단 부위(인식 부위)에서 수백 염기쌍 떨어져 있을 수 있는 뉴클레아제 결합 부위의 가변 위치에서 절단된다. 유형 II 시스템에서 제한 활성은 메틸라제 활성과 무관하며, 절단은 일반적으로 결합 부위 내부 또는 근처의 특정 부위에서 발생한다. 대부분의 유형 II 효소는 회문식 서열을 절단하지만, 유형 IIa 효소는 비-회문식 인식 부위를 인식하여 인식 부위 외부를 절단하고, 유형 IIb 효소는 인식 부위 외부의 두 부위 모두에서 서열을 두 번 절단하며, 유형 IIs 효소는 비대칭 인식 부위를 인식하고 인식 부위로부터 약 1-20개 뉴클레오티드의 정의된 거리와 한쪽 면에서 절단된다. 유형 IV 제한 효소는 메틸화된 DNA를 표적화한다. 제한 효소는 예를 들어 REBASE 데이터베이스에 추가로 설명되고 분류된다(웹페이지 rebase.neb.com; Roberts *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:418-20), Roberts *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:1805-12, 및 Belfort *et al.*, (2002) in Mobile DNA II, pp. 761-783, Eds. Craigie *et al.*, (ASM Press, Washington, D.C.).

[0275] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 유전자 편집 도구(예를 들어, CRISPR, TALEN, 메가뉴클레아제, 제한 엔도뉴클레아제, RNAi, 안티센스 올리고뉴클레오티드)는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 세포내로 도입될 수 있다. 일부 측면에서, 특정 유전자 편집 도구를 코딩하는 폴리펩티드가 세포내로 직접 도입될 수 있다. 대안적으로, 유전자 편집 도구를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 세포내로 도입될 수 있다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 세포내로 도입되는 경우, 유전자 편집 도구는 세포내에서 일시적으로, 조건적으로 또는 구성적으로 발현될 수 있다. 따라서, 유전자 편집 도구를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 발현 카세트에 함유될 수 있고 조건부 프로모터, 유도성 프로모터, 구성적 프로모터 또는 조직-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, 유전자 편집 도구는 유전자 편집 도구를 코딩하거나 포함하는 mRNA로서 세포 내로 도입된다.

[0276] 뉴클레아제 제제(즉, 조작된 뉴클레아제 제제)의 활성 변이체 및 단편도 제공된다. 이러한 활성 변이체는 천연 뉴클레아제 제제에 대해 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 포함할 수 있고, 여기서 활성 변이체는 원하는 인식 부위에서 절단하는 능력을 보유하고,

따라서 닉 또는 이중-가닥 파손-유도 활성을 보유한다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 뉴클레아제 제제는 천연 엔도뉴클레아제 서열로부터 변형될 수 있고 천연 뉴클레아제 제제에 의해 인식되지 않은 인식 부위에서 닉 또는 이중-가닥 파손을 인식하고 유도하도록 설계될 수 있다. 따라서 일부 측면에서, 조작된 뉴클레아제는 상응하는 천연 뉴클레아제 제제 인식 부위와 상이한 인식 부위에서 닉 또는 이중-가닥 파손을 유도하는 특이성을 갖는다. 닉 또는 이중-가닥-파손-유도 활성에 대한 검정은 알려져 있으며 일반적으로 인식 부위를 함유하는 DNA 기질에 대한 엔도뉴클레아제의 전체 활성 및 특이성을 측정한다.

[0277] 뉴클레아제 제제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 도입을 통해 뉴클레아제 제제가 세포에 제공되는 경우, 뉴클레아제 제제를 코딩하는 이러한 폴리뉴클레오티드는 변형되어 관심 세포에서 뉴클레아제 제제를 코딩하는 자연 발생 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여 사용 빈도가 더 높은 코돈으로 대체될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제 제제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 주어진 관심 세포에서 사용 빈도가 더 높은 코돈을 대체하도록 변형될 수 있다.

[0278] ***V.A.5. 간섭 RNA(RNAi)***

[0279] 일부 측면에서, 세포에서 NR4A3의 발현을 감소시키는 데 사용될 수 있는 유전자 편집 도구에는 RNA 간섭 분자("RNAi")가 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이, RNAi는 내인성 유전자 침묵 경로(예를 들어, Dicer 및 RNA-유도 침묵 복합체(RISC))를 통해 표적 mRNA의 분해에 의해 내인성 표적 유전자 생성물의 발현 감소를 매개하는 RNA 폴리뉴클레오티드이다. RNAi 제제의 비-제한적인 예에는 마이크로 RNA(본원에서는 "miRNA"라고도 한다), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), RNA 앱타머 또는 이들의 조합이 포함된다.

[0280] 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 유전자 편집 도구는 하나 이상의 miRNA를 포함한다. "miRNA"는 약 21-25개 뉴클레오티드 길이의 자연 발생 작은 비-코딩 RNA 분자를 의미한다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 miRNA는 *NR4A3* mRNA 분자에 적어도 부분적으로 상보적이다. miRNA는 번역 억제, mRNA 절단 및/또는 데아데닐화를 통해 내인성 표적 유전자 생성물(즉, NR4A3 단백질)의 발현을 하향조절(예를 들어, 감소)할 수 있다.

[0281] 일부 측면에서, 본 개시내용과 함께 사용될 수 있는 유전자 편집 도구는 하나 이상의 shRNA를 포함한다. "shRNA"(또는 "짧은 헤어핀 RNA" 분자)는 이중-가닥 영역과 한쪽 단부에 헤어핀 루프를 형성하는 루프 영역을 포함하는 RNA 서열을 의미하며, 이는 유전자 발현을 감소 및/또는 침묵시키는 데 사용될 수 있다. 이중-가닥 영역은 일반적으로 줄기의 각 측면에서 길이가 약 19개 뉴클레오티드 내지 약 29개 뉴클레오티드이고, 루프 영역은 일반적으로 길이가 약 3 내지 약 10개 뉴클레오티드(및 3'- 또는 5'-말단 단일-가닥 돌출된 뉴클레오티드는 선택사항이다)이다. shRNA는 플라스미드 또는 비-복제 재조합 바이러스 벡터에 클로닝되어 세포내로 도입될 수 있으며 결과적으로 shRNA-코딩 서열이 게놈에 통합될 수 있다. 따라서 shRNA는 내인성 표적 유전자(즉, *NR4A3*) 번역 및 발현의 안정적이고 일관된 억제를 제공할 수 있다.

[0282] 일부 측면에서, 본원에 개시된 유전자 편집 도구는 하나 이상의 siRNA를 포함한다. "siRNA"는 일반적으로 길이가 약 21-23개 뉴클레오티드인 이중 가닥 RNA 분자를 의미한다. siRNA는 RNA-유도 침묵 복합체(RISC)라는 다중 단백질 복합체와 연관되며, 이 동안 "승객" 센스 가닥이 효소적으로 절단된다. 활성화된 RISC에 함유된 안티센스 "가이드" 가닥은 서열 상동성으로 인해 RISC를 상응하는 mRNA로 안내하고 동일한 뉴클레아제가 표적 mRNA(즉, *NR4A3* mRNA)를 절단하여 특정 유전자 침묵을 초래한다. 일부 측면에서, siRNA의 길이는 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개 뉴클레오티드이고 3' 단부에 2개의 염기 돌출부가 있다. siRNA는 개별 세포 및/또는 배양 시스템에 도입되어 표적 mRNA 서열(즉, *NR4A3* mRNA)이 분해될 수 있다. siRNA 및 shRNA는 Fire et al., *Nature* 391:19, 1998 및 US Patent Nos.7,732,417; 8,202,846; 및 8,383,599에 추가로 기술되어 있으며; 이들 각각은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0283] ***V.A.6. 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)***

[0284] 일부 측면에서, 세포에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키는 데 사용될 수 있는 유전자 편집 도구에는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이, "안티센스 올리고뉴클레오티드" 또는 "ASO"는 표적 핵산, 특히 표적 핵산 상의 인접 서열에 혼성화함으로써 표적 유전자(즉, *NR4A3*)의 발현을 조절할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 본질적으로 이중 가닥이 아니므로 siRNA 또는 shRNA가 아니다.

[0285] 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 ASO는 단일 가닥이다. 본 개시내용의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 내부 또는 상호 자기-상보성 정도가 올리고뉴클레오티드의 전체 길이의 대략 50% 미만인 한, 헤어핀 또는 분자간 이중체 구조(동일한 올리고뉴클레오티드의 두 분자 사이의 이중체)를 형성할 수 있는 것으로 이해된다. 일부 측

면에서, 본 개시내용에 유용한 ASO는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 예컨대 2' 당 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. ASO에 이루어질 수 있는 추가 변형(예를 들어, *NR4A3* 유전자 발현을 억제하거나 감소시키는 데 사용될 수 있는 변형)은, 예를 들어 US Publ. 2019/0275148 A1에 제공되어 있다.

[0286] 일부 측면에서, ASO는 *NR4A3* 전사체(예를 들어, mRNA)의 뉴클레아제 매개 분해를 통해 NR4A3 단백질의 발현을 감소시킬 수 있으며, 여기서 ASO는 뉴클레아제, 예를 들어 RNase H, 예컨대 RNaseH1을 모집할 수 있다. RNase H는 RNA/DNA 이중체의 RNA 가닥을 가수분해하는 유비쿼터스 효소이다. 따라서, 일부 측면에서, 일단 표적 서열(예를 들어, *NR4A3* mRNA)에 결합되면, ASO는 *NR4A3* mRNA의 분해를 유도하여 NR4A3 단백질의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0287] 본원에 개시된 바와 같이, 유전자 편집 도구의 상기 예는 제한하려는 것이 아니며, 당업계에서 이용가능한 임의의 유전자 편집 도구는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소시키거나 억제하는 데 사용될 수 있다. 추가적으로, 본원에 기재된 바와 같이, (i) *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (ii) *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두의 수준도 감소되며, 일부 측면에서, *NR4A1* 및/또는 *NR4A2* 유전자를 특이적으로 표적화하는 임의의 전술한 유전자 편집 도구도 사용될 수 있다.

[0288] ***IV.A.7. 억제인자***

[0289] 일부 측면에서, 본 개시내용과 함께 사용될 수 있는 유전자 편집 도구(예를 들어, *NR4A1*, *NR4A2* 및/또는 *NR4A3* 유전자 및/또는 단백질의 발현을 감소시키기 위해)는 억제인자를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "억제인자"는 전사를 활성화하지 않고 다음 NR4A 반응 요소에 결합할 수 있는 임의의 제제를 의미한다: (i) NGFI-B 반응 요소(NBRE), (ii) Nur-반응 요소(NurRE) 또는 (iii) (i) 및 (ii) 모두. 따라서, NBRE 및/또는 NurRE에 결합함으로써, 본원에 기재된 억제인자는 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR을 발현하는 면역 세포)에서 하나 이상의 *NR4A* 계열 구성원의 수준을 억압(또는 감소 또는 억제)할 수 있다. 일부 측면에서, NBRE 및/또는 NurRE에 대한 억제인자의 결합은 세포가 억제인자와 접촉될 때 세포에서 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질의 수준을 감소시킨다. 일부 측면에서, NBRE 및/또는 NurRE에 대한 억제인자의 결합은 세포가 억제인자와 접촉될 때 세포에서 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 수준을 감소시킨다. 일부 측면에서, NBRE 및/또는 NurRE에 대한 억제인자의 결합은 세포가 억제인자와 접촉될 때 세포에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 수준을 감소시킨다. 일부 측면에서, NBRE 및/또는 NurRE에 대한 억제인자의 결합은 (i) *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및 (ii) *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질 둘 모두의 수준을 감소시킨다. 일부 측면에서, NBRE 및/또는 NurRE에 대한 억제인자의 결합은 (i) *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및 (ii) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 둘 모두 수준을 감소시킨다. 일부 측면에서, NBRE 및/또는 NurRE에 대한 억제인자의 결합은 (i) *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질 및 (ii) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 둘 모두의 수준을 감소시킨다. 일부 측면에서, NBRE 및/또는 NurRE에 대한 억제인자의 결합은 다음 각각의 수준을 감소시킨다: (i) *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (ii) *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 및 (iii) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질. NR4A 계열의 모든 구성원(즉, NR4A1, NR4A2 및 NR4A3)의 수준을 감소시킬 수 있는 억제인자는 "NR4A 수퍼-억제인자"라고도 알려져 있다. 예를 들어, 전체 내용이 참고로 본원에 포함된 WO2020237040A1을 참조.

[0290] 적어도 상기 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, 본 개시내용에 유용한 억제인자는 NBRE 및/또는 NurRE 반응 요소에 결합할 수 있는 DNA-결합 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 이러한 억제인자는 추가적인 도메인을 포함한다. 이러한 추가 도메인의 비-제한적인 예에는 NR4A 리간드-결합 도메인, FLAG 도메인, 크루펠(Kruppel)-연관 상자(KRAB) 도메인, NCOR 도메인, T2A 도메인, 자가-절단 도메인, 핵 국소화 신호, 이량체화 도메인(예를 들어, diZIP 이량체화 도메인), 전사 억제 도메인, 염색질 압축 도메인, 에피토프 태그 또는 이들의 임의의 조합이 포함된다. 이러한 추가 도메인과 관련된 추가 개시는, 예를 들어 WO2020237040A1에서 찾아볼 수 있으며, 이는 그 전체가 참조로 본원에 포함된다. 일부 측면에서, 추가 도메인은 전사 활성화 도메인을 포함하지 않는다.

[0291] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, NR4A 계열 중 하나 이상의 구성원의 수준을 감소시키는 데 있어서, 세포는 본원에 기재된 NR4A 억제 단백질과 접촉될 수 있다. 일부 측면에서, 세포는 NR4A 억제인자를 코딩하는 핵산 서열과 접촉된다.

[0292] **V.B. 탈진/기능장애를 줄이는 방법**

[0293] 본 개시내용은 *NR4A1*과 *NR4A2* 유전자 및 NR4A1과 NR4A2 단백질의 내인성 발현을 가지면서 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 세포를 변형시키는 것을 포함하는, 세포의 탈진 또는 기능장애를 감소, 개선 또는 억제하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 이러한 세포(즉, *NR4A3* 유

전자 및/또는 NR4A3 단백질의 수준이 감소되도록 변형된)는 감소된 수준의 (i) *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (ii) *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 모두를 갖도록 추가로 변형될 수 있다.

[0294] 종양 세포가 숙주 면역 반응을 회피할 수 있는 다양한 방법 중 하나는 종양- 특이적 면역 세포, 예를 들어 T 세포를 탈진시키는 것이다. 본원에 사용된 용어 "탈진", 또는 보다 구체적으로 "T 세포 탈진"은 감염 또는 질병(예를 들어, 암)의 결과로 발생할 수 있는 T 세포 기능의 상실을 의미한다. T 세포 탈진은 본 개시내용에서 "T 세포 기능장애" 또는 "T 세포 무반응"과 상호교환적으로 사용될 수 있다. 일부 측면에서, T 세포 탈진은 다양한 면역 체크포인트 억제 분자(예를 들어, PD-1, TIM-3 및 LAG-3)의 발현 증가, 아폽토시스, 및 이펙터 기능 감소(예를 들어, 사이토카인 생산 및 퍼포린 및 그랜자임과 같은 세포독성 분자의 발현)와 연관된다. 따라서, 용어 "T 세포 탈진을 감소시키다", "T 세포 탈진을 개선하다", "T 세포 탈진을 억제하다" 등은 다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 T 세포의 기능이 회복된 상태를 의미한다: (i) 하나 이상의 면역 체크포인트 억제 분자(예를 들어, PD-1, TIM-3 및 LAG-3)의 발현 감소, (ii) 기억 형성 증가 및/또는 기억 마커(예를 들어, CD45RO, CD62L 및/또는 또는 CCR7) 유지, (iii) 아폽토시스 방지, (iv) 사이토카인 생성 증가(예를 들어, IL-2, IFN-γ 및/또는 TNF-α), (v) 사멸 능력 향상, (vi) 낮은 표면 항원으로 종양 표적의 인식 증가, (vii) 항원에 대한 반응으로 증식 향상, (viii) 이들의 임의의 조합.

[0295] 일부 측면에서, 예를 들어 본원에 개시된 방법에서 세포를 변형시키는 것은 탈진에 대한 저항성 또는 내성을 갖도록 면역 세포, 예를 들어 T 세포를 변형시키는 것을 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용은 세포 내에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현 수준을(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질의 감소된 수준과의 조합하여) 감소시킴으로써 면역 세포, 예를 들어 T 세포(예를 들어, 종양-특이적 T 세포)의 탈진을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 탈진을 감소시키는 것은 면역 세포, 예를 들어 T 세포에서 이미 발생한 기능장애를 역전시키는 것을 포함한다(즉, 탈진된 T 세포를 덜 탈진하게 만드는 것). 일부 측면에서, 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 탈진을 감소시키는 것은 새로 활성화된 면역 세포, 예를 들어 T 세포가 탈진되는 것을 방지하는 것을 포함한다. 본 개시내용으로부터 명백한 바와 같이, 일부 측면에서, 면역 세포는, 예를 들어 리간드 결합 단백질(예를 들어 CAR 또는 TCR)을 발현하기 위해 이전에, 동시에 또는 후속적으로 변형된다.

[0296] 일부 측면에서, 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 탈진을 감소시키는 것은 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 탈진을 역전시키고 예방하는 것을 모두 포함한다.

[0297] 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 탈진 상태는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 측면에서, 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 탈진 상태는 아폽토시스에 대한 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 저항성을 평가함으로써 측정될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 (즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 및 (i) 내인성 수준의 *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자와 NR4A1 및 NR4A2 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (iii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 또는 (iv) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질과 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질 둘 다를 발현하는)은 아폽토시스에 대한 증가된 저항성을 나타낸다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물에서 아폽토시스에 대한 저항성은 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어, 낮은 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포의 아폽토시스)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 또는 그 이상 증가된다. 일부 측면에서, 아폽토시스에 대한 증가된 저항성은 T 세포의 장기간 지속성 또는 생존을 촉진할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 발현하는)은 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 향상된 지속성 또는 생존을 나타낸다.

[0298] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물의 지속성 또는 생존은 적어도 약 2배 내지 약 100배 증가된다. 특정 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물의 지속성 또는 생존은 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약

1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 또는 그 이상 증가된다.

[0299] 일부 측면에서, 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 탈진 상태는 면역 체크포인트 분자에 대한 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 저항성을 평가함으로써 측정될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물에서 면역 체크포인트 분자에 대한 저항성은 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 또는 그 이상 증가된다.

[0300] 어느 한 이론에 얽매이지 않고, 일부 측면에서, 면역 체크포인트 분자에 대한 저항성 증가는 면역 세포, 예를 들어 T 세포에서 하나 이상의 면역 체크포인트 분자의 발현 감소로 인한 것이다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 하나 이상의 면역 체크포인트 분자의 감소된 수준을 발현한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물에서 면역 체크포인트 분자의 발현 수준은 기준 세포와 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 감소된다. 면역 체크포인트 분자의 예는 당업계에 공지되어 있으며 PD-1, TIM-3, LAG-3, BTLA, SIGLEC7, CD200R, TIGIT, VISTA, 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0301] 일부 측면에서, 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 탈진 상태는 자극 시, 예를 들어 T 세포 수용체(TCR) 자극 시 사이토카인을 생성하는 면역 세포, T 세포의 능력을 평가함으로써 측정될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 발현하는)은 기준(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 증가된 사이토카인 생산을 나타낸다.

[0302] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물에서 사이토카인 생산은 적어도 약 2배, 8배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 100배 이상 증가한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물에서 사이토카인 생산은 기준(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포에서 사이토카인 생산)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 또는 그 이상 증가된다. 사이토카인의 비-제한적인 예에는 IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF, IL-6, IL-10, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17, IL-22, CCL2, CCL3, 및 이들의 임의의 조합이 포함된다.

[0303] 일부 측면에서, 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 탈진 상태는 반복된 종양 챌린지 후에 종양 세포를 사멸시키는 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 능력을 평가함으로써 측정될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 2회의 종양 챌린지 후 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 증가된 종양 세포 사멸을 나타낸다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 3회의 종양 챌린지 후 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포 예를 들어, *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 증가된 종양 세포 사멸을 나타낸다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 4회의 종양 챌린지 후 기준 세포(예를 들어 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 증가된 종양 세포 사멸을 나타낸다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 5회의 종양 챌린지 후 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 증가된 종양 세포 사멸을 나타낸다. 일부 측면에서, 종양 세포의 사멸은 종양 세포의 증식을 예방하는 것을 포함한다.

[0304] 일부 측면에서, 각각의 종양 챌린지 후에, 본 개시내용의 세포 조성물의 종양 세포 사멸 능력은 약 2배, 8배,

10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 100배 이상 증가한다. 일부 측면에서, 종양 세포를 사멸시키는 능력은 기준(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포에서 종양 세포 사멸)과 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 또는 그 이상 증가된다.

[0305] **V.C. 종양 미세환경에서 항종양 기능을 유지하는 방법**

[0306] 종양형성(즉, 종양의 생성 또는 형성)은 개시, 진행 및 전이의 3단계로 구성된 복잡하고 역동적인 과정이다. 이러한 각 단계는 종양미세환경(TME)에 의해 엄격하게 규제된다. Wang, M., *et al.*, *J Cancer* 8(5):761-773 (2017) 참조. 본원에 사용된 용어 "종양 미세환경" 또는 "TME"는 주변 혈관, 면역 세포, 섬유아세포, 신호 전달 분자 및 세포외 기질을 포함하는 종양 주변 환경을 의미한다. 아래에 추가로 설명된 바와 같이, 종양은 세포외 신호를 방출하고, 종양 혈관신생을 촉진하고, 말초 면역 관용을 유도함으로써 미세환경에 영향을 줄 수 있는 반면, 미세환경에서 면역 세포는 종양 세포의 성장과 진화에 영향을 미칠 수 있다.

[0307] 종양 세포는 일반적으로 매우 빠른 속도로 성장하여 종양 미세환경에 혈액 공급이 불충분하게 된다. Gouirand, V., *et al.*, *Front Oncol* 8:117 (2018) 참조. 이로 인해 종양 미세환경이 저산소증 상태가 되고 활성 산소종(ROS)의 생성이 증가하게 된다. 저산소증과 ROS는 면역 세포 기능에 부정적인 영향을 미칠 수 있으며, 이에 따라 대상체에서 항종양 면역 반응을 억제한다.

[0308] 일부 측면에서, 예를 들어 본원에 개시된 방법에서 세포를 변형하면 종양 미세환경에서 발견되는 것과 같은 저산소 환경에서 면역 세포(예를 들어, 종양-특이적 T 세포)의 항종양 기능이 향상되는 결과를 낳는다. 본원에 사용된 용어 "항종양 기능"은 종양 세포의 근절 및/또는 제어를 초래하는 면역 반응을 일으키는 면역 세포(예를 들어, 종양-특이적 T 세포)의 능력을 의미한다. 항종양 기능의 비-제한적인 예에는 사이토카인 생산, 증식, 탈진 감소, 장기 생존, 세포독성(예를 들어, 종양 세포를 사멸하는 능력) 또는 이들의 조합이 포함된다.

[0309] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 포함하는 변형된 세포를 포함하는)의 항종양 기능은 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)에 비해 저산소 환경에서 향상된다(즉, 증가한다).

[0310] 종양 세포의 급속한 증식은 또한 종양 미세환경 내의 다양한 영양소(예를 들어, 글루코스)의 고갈을 초래할 수 있다. Gouirand, 상기 참조. 본원에 논의된 바와 같이, 글루코스와 같은 영양소는 정상적인 면역 세포 기능 및 발달에 필수적이다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물의 항종양 기능은 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 낮은 영양분 환경에서 향상(즉, 증가)된다.

[0311] 본원에 기재된 바와 같이, 종양 세포가 숙주 면역 반응을 억제하는 메카니즘 중 하나는 다양한 면역억제 대사산물 및/또는 사이토카인을 종양 미세환경으로 방출하는 것이다. 종양 미세환경 내 이러한 대사산물 및/또는 사이토카인의 축적은 면역 세포(예를 들어, 종양-침윤 림프구)의 정상적인 기능을 억제할 수 있다. 이러한 면역억제 대사산물 및/또는 사이토카인의 비-제한적인 예에는 인돌아민-2-3-디옥시게나제(IDO), 아르기나제, 유도성 산화질소 합성효소(iNOS), 락테이트 탈수소효소(LDH)-A, TGF-β, IL-10, VEGF, 활성산소종(ROS), 아데노신, 아르기나제, 프로스타글란딘 E2 및 이들의 조합이 포함된다.

[0312] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 포함하는 변형된 세포를 포함하는)의 항종양 기능은 면역억제 대사물질 및/또는 사이토카인의 존재 하에 적어도 약 2배, 8배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 100배 이상 향상(즉, 증가)된다. 일부 측면에서, 항종양 기능은 기준 세포(예를 들어 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 적어도 약 1.1배, 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.3배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.6배, 적어도 약 1.7배, 적어도 약 1.8배, 적어도 약 1.9배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 또는 그 이상 증가된다.

[0313] 종양 미세환경이 항종양 면역 반응을 억제할 수 있는 또 다른 메커니즘은 골수-유래 억제 세포(MDSC) 및 조절 T($T_{reg}$) 세포와 같은 면역 억제 세포를 통한 것이다.

[0314] 본원에 사용된 용어 "골수-유래 억제 세포" 또는 "MDSC"는 골수 기원, 미성숙 상태 및 T 세포 반응을 강력하게 억제하는 능력에 의해 정의되는 면역 세포의 이종 집단을 의미한다. MDSC는 골수에서 생성되며, 종양-보유 숙주에서는 말초 림프기관과 종양으로 이동하여 종양 미세환경 형성에 기여한다. 일부 측면에서, MDSC는 단핵구 MDSC(M-MDSC)이며, 이는 형태학적 및 표현형적으로 단핵구와 유사한다. 일부 측면에서, MDSC는 형태학적 및 표현형적으로 호중구와 유사한 다형핵 MDSC(PMN-MDSC)이다. 일부 측면에서, MDSC는 M-MDSC와 PMN-MDSC를 모두 포함한다. 종양 미세환경 내에 존재하는 MDSC는 일반적으로 낮은 식세포 활성, 활성산소종(ROS), 산화질소(NO)의 지속적인 생산, 및 주로 항-염증성 사이토카인(예를 들어, IL-10 및 TGF-β)을 나타낸다.

[0315] 본원에 사용된 용어 "조절 T 세포" 또는 "$T_{reg}$ 세포"는 다른 T 세포(예를 들어, 종양-침윤 림프구)의 증식 및/또는 기능을 억제하는 능력을 갖는 특정 T 세포 집단을 의미한다. 일부 측면에서, 조절 T 세포는 $CD4^+$ 조절 T 세포이다. 일부 측면에서 조절 T 세포는 $Foxp3^+$이다. 조절 T 세포는 다양한 접촉-의존적 메커니즘과 독립적 메커니즘을 통해 면역억제 활성을 발휘할 수 있다. 이러한 메커니즘의 비-제한적인 예에는 다음이 포함된다: (i) 억제성 사이토카인(예를 들어, TGF-β, IL-10 및 IL-35)의 생성; (ii) 면역 체크포인트 및 억제 수용체(예를 들어, CTLA-4, PD-L1, 아르기나제, LAG-3, TIM-3, ICOS, TIGIT, IDO)의 발현; (iii) 직접적인 세포독성(퍼포린/그랜자임-매개 또는 FasL-매개); (iv) 이펙터 T 세포 활성의 대사 파괴(예를 들어, IL-2 소비); (v) T 세포 탈진을 촉진할 수 있는 관용원성 수지상 세포의 유도; (vi) 아데노신 생산, 및 (vii) 이들의 조합.

[0316] 일부 측면에서, 본 개시내용의 세포 조성물(즉, 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여 포함하는 변형된 세포를 포함하는)의 항종양 기능은 기준 세포(예를 들어, 상응하는 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 수준을 발현하도록 변형되지 않은 T 세포와 같은 면역 세포)와 비교하여 억제 세포의 존재 하에서 향상(즉, 증가)된다. 일부 측면에서, 억제 세포는 MDSC이다. 일부 측면에서, 억제 세포는 $T_{reg}$ 세포이다. 일부 측면에서, 억제 세포는 MDSC 및 $T_{reg}$ 세포를 모두 포함한다.

[0317] 상기 개시내용은 주로 T 세포(예를 들어, 종양-침윤 림프구)와 관련하여 제공되지만, 당업자는 상기 개시내용이 다른 유형의 면역 세포에도 적용될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 일부 측면에서, 본원에 개시된 방법은 종양 치료에 유용한 임의의 면역 세포의 활성화를 향상하거나, 탈진/기능장애를 감소시키거나, 항종양 기능을 유지하는 데 사용될 수 있다. 이러한 면역 세포의 비-제한적인 예에는 림프구, 호중구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 또는 이들의 조합이 포함된다. 일부 측면에서, 림프구는 T 세포, 종양-침윤 림프구(TIL), 림포카인-활성화 살해 세포, 천연(NK) 세포 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 림프구는 T 세포, 예를 들어 $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포이다. 일부 측면에서, 림프구는 종양 침윤 림프구(TIL)이다. 일부 측면에서, TIL은 $CD8^+$ TIL이다. 일부 측면에서, TIL은 $CD4^+$ TIL이다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 본 개시내용의 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 예컨대 CAR T 세포 또는 CAR NK 세포를 포함한다.

[0318] **VI. 핵산 및 벡터**

[0319] 본 개시내용은 또한 세포에서 및/또는 본 개시내용의 변형된 세포에서 발현될 수 있는 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체(예를 들어, 항-ROR1 CAR 또는 항-ROR1 TCR)를 코딩하는 세포에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소(단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)시키기 위한 유전자 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 핵산 분자(예를 들어, 폴리뉴클레오티드)를 제공한다.

[0320] 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 일부 측면은 *NR4A3* 유전자 내의 표적 서열(즉, *NR4A3*-표적화 폴리뉴클레오티드)에 특이적으로 결합할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 분리된 폴리뉴클레오티드)에 관한 것이다. 어느 한 이론에 얽매이지 않고, 일부 측면에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드는 *NR4A3* 유전자 내의 표적 서열에 결합함으로써 세포(예를 들어, 면역 세포)에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 코딩된 단백질의 수준을 감소시킬 수 있다.

[0321] 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 *NR4A3* 유전자 내의 핵산 서열에 특이적으로 결합할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이러한 뉴클레오티드 서열은 또한 본원에서 **"결합 서열" 또는 "가이**

**드 서열" 또는 "가이드 RNA"(gRNA)**로서 지칭된다. 따라서, 본원에서 용어 "가이드 RNA"(gRNA)는 *NR4A3* 유전자가 있는 핵산 서열과 특이적으로 결합하여 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 수준을 감소시키는 한, 특별히 제한되지 않는다. 이러한 gRNA의 비-제한적인 예는 본 개시내용 전반에 걸쳐 제공된다(예를 들어, 표 A-D 참조).

[0322] 일부 측면에서, gRNA의 길이는 약 5 내지 약 100개 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 gRNA는 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 60, 약 70, 약 80, 약 90, 또는 약 100개의 뉴클레오티드 길이 이다. 일부 측면에서, gRNA의 길이는 약 10 내지 약 30개 뉴클레오티드(예를 들어, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 또는 약 30개의 뉴클레오티드)이다. 일부 측면에서, gRNA의 길이는 약 20개 뉴클레오티드이다. 본 개시내용에 유용한 gRNA에 관한 추가 개시내용은 본 출원의 다른 곳에서 제공된다(예를 들어 섹션 IV.A.1. CRISPR/Cas 시스템 참조).

[0323] 일부 측면에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 gRNA는 *NR4A3* 유전자 내의 핵산 서열(본원에서는 "**표적 서열**"이라고도 함)을 상보적이거나 실질적으로 상보적이도록 설계된다. 일부 측면에서, gRNA는 동요염기(wobble base) 또는 축퇴성 염기를 통합하여 다중 서열(예를 들어, *NR4A3* 유전자 내의 다중 표적 서열; 또는 *NR4A3* 유전자 내의 표적 서열 및 NR4A 계열의 다른 구성원 내의 표적 서열)에 결합할 수 있다. 어떤 경우에는, gRNA를 변경하여 안정성을 높일 수 있다. 예를 들어, 비-천연 뉴클레오티드를 통합하여 분해에 대한 RNA 저항성을 증가시킬 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는 gRNA에서 2차 구조 형성을 피하거나 감소시키도록 변경되거나 설계될 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는 G-C 함량을 최적화하도록 설계될 수 있다. 일부 측면에서, G-C 함량은 약 40% 내지 약 60%(예를 들어, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%)이다. 일부 측면에서, gRNA는 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어 제한 없이 메틸화 또는 인산화된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 특성을 변형하여 개선시키는 추가적인 방법은 당업계에 공지되어 있다. 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 첨가될 수 있는 이러한 변형의 비-제한적 예에는 5' 캡, 3' 폴리아데닐화된 꼬리, 리보스위치 서열, 안정성 제어 서열, 헤어핀, 세포하 국소화 서열, 검출 또는 표지 서열, 하나 이상의 단백질에 대한 결합 부위, 비-천연 뉴클레오티드, 또는 이들의 조합이 포함된다. 예를 들어, 그 전체가 참조로서 본원에 포함되는 미국 공개 번호 20210123046A1을 참조. 그러한 변형과 관련된 추가적인 개시는 본 개시의 다른 곳에서 제공된다.

[0324] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 유전자 편집 도구를 포함하는 핵산 분자 및 가이드 RNA를 포함하는 핵산 분자는 별도의 핵산 분자로서(동시에 또는 순차적으로) 세포내로 도입될 수 있다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구 및 가이드 RNA는 단일 핵산 분자의 일부일 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 유전자 편집 도구를 포함하는 핵산 분자는 가이드 RNA(예를 들어, 본원에 개시된 합성 가이드 RNA)를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 유전자 편집 도구를 포함하는 핵산 분자는 가이드 RNA(예를 들어, 본원에 개시된 합성 가이드 RNA) 및 Cas 뉴클레아제, 예를 들어 Cas9 뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다.

[0325] 본원에 제공된 임의의 핵산은 전체 세포, 세포 용해물, 또는 부분적으로 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다.

[0326] 핵산은 다른 세포 성분 또는 다른 오염물질, 예를 들어 다른 세포 핵산(예를 들어 다른 염색체 DNA, 예를 들어 자연에서 분리된 DNA와 연결되어 있는 염색체 DNA) 또는 단백질이 알칼리성/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 제한 효소, 아가로스 겔 전기영동 및 당업계에 잘 알려진 기타 기술을 포함한 표준 기술에 의해 정제될 때 "분리"되거나 "실질적으로 순수한 것으로 된다". F. Ausubel, *et al*., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. 참조. 본원에 기재된 핵산은, 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있으며 인트론 서열을 함유할 수도 있고 함유하지 않을 수도 있다. 일부 측면에서, 핵산은 cDNA 분자이다. 본원에 기재된 핵산은 당업계에 공지된 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 얻을 수 있다.

[0327] 일부 측면에서, 본 개시내용은 세포내 및/또는 본 개시내용의 변형된 세포에서 발현될 수 있는 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체를 코딩하는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질(단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)의 발현을 감소시키기 위한 유전자 편집 도구를 포함하는 분리된 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0328] 본원에 기재된 바와 같이, 이러한 벡터는 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질(단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)을 발현하도록 세포(예를 들어, CAR-발현 세포)를 변형하는 데 사용될 수 있고, 여기서 이러한 변형된 세포는 암과 같은 질병 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0329] 본 개시내용에 적합한 벡터에는 발현 벡터, 바이러스 벡터 및 플라스미드 벡터가 포함된다. 일부 측면에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.

[0330] 본원에 사용된 용어 "벡터" 및 "발현 벡터"는 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소, RNA 바이러스 벡터의 경우에는 적절한 숙주 세포에 도입될 때 복제 및 번역에 필요한 요소를 함유하는 임의의 핵산 구성물을 의미한다. 발현 벡터에는 플라스미드, 파지미드, 바이러스 및 이의 유도체가 포함될 수 있다.

[0331] 본원에 사용된 바와 같이, 바이러스 벡터는 다음 바이러스로부터의 핵산 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 레트로바이러스, 예를 들어, 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스, 하비(Harvey) 뮤린육종 바이러스, 뮤린 유방 종양 바이러스 및 루스(Rous) 육종 바이러스; 렌티바이러스; 아데노바이러스; 아데노-연관 바이러스; SV40-유형 바이러스; 폴리오마바이러스; 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스; 유두종 바이러스; 헤르페스 바이러스; 백시니아 바이러스; 소아마비 바이러스; 및 레트로바이러스와 같은 RNA 바이러스. 당업계에 잘 알려진 다른 벡터를 쉽게 사용할 수 있다. 특정 바이러스 벡터는 비-필수 유전자가 관심 유전자로 대체된 비-세포변성 진핵 바이러스를 기반으로 한다. 비-세포변성 바이러스에는 레트로바이러스가 포함되며, 이 바이러스의 생활주기에는 게놈 바이러스 RNA가 DNA로 역전사되고 이어서 숙주 세포 DNA로 프로바이러스의 통합이 포함된다.

[0332] 일부 측면에서, 벡터는 아데노-연관 바이러스로부터 유래된다. 일부 측면에서, 벡터는 렌티바이러스로부터 유래된다. 렌티바이러스 벡터의 예는 WO9931251, WO9712622, WO9817815, WO9817816, 및 WO9818934에 개시되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0333] 다른 벡터에는 플라스미드 벡터가 포함된다. 플라스미드 벡터는 당업계에 광범위하게 기술되어 있으며 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 참조. 지난 몇 년 동안, 플라스미드 벡터는 숙주 게놈 내에서 복제하고 통합할 수 없기 때문에, 플라스미드 벡터는 생체 내에서 세포에 유전자를 전달하는 데 특히 유리한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 숙주 세포와 호환가능한 프로모터를 갖는 이들 플라스미드는 플라스미드 내에 작동가능하게 코딩된 유전자로부터 펩티드를 발현할 수 있다. 상업용 공급업체에서 일반적으로 사용되는 플라스미드에는 pBR322, pUC18, pUC19, 다양한 pcDNA 플라스미드, pRC/CMV, 다양한 pCMV 플라스미드, pSV40 및 pBlueScript가 포함된다. 특정 플라스미드의 추가 예에는 pcDNA3.1, 카탈로그 번호 V79020; pcDNA3.1/hygro, 카탈로그 번호 V87020; pcDNA4/myc-His, 카탈로그 번호 V86320; 및 pBudCE4.1, 카탈로그 번호 V53220를 포함하며, 모두 인비트로젠(Invitrogen, Carlsbad, CA) 제품이다. 다른 플라스미드는 당업자에게 잘 알려져 있다. 또한 플라스미드는 표준 분자생물학 기술을 사용하여 DNA의 특정 단편을 제거 및/또는 첨가하도록 맞춤 설계할 수 있다.

[0334] 본 개시내용은 본원에 개시된 핵산, 예를 들어 gRNA 및 gRNA를 코딩하는 핵산, Cas9를 코딩하는 핵산, 적어도 하나의 gRNA 또는 적어도 하나의 gRNA 및 Cas9를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, CAR 또는 TCR을 코딩하는 핵산, 본원에 개시된 임의의 게놈 편집 도구를 코딩하는 핵산, RNAi, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 코딩하는 핵산를 변형시키기 위해 당업자에게 이용가능한 임의의 핵산 변형의 사용을 고려한다.

[0335] 본원에 사용된 "변형되지 않은" 또는 "천연" 뉴클레오시드 또는 핵염기는 퓨린 염기인 아데닌(A) 및 구아닌(G), 피리미딘 염기인 티민(T), 시토신(C) 및 우라실(U)을 포함한다. 일부 측면에서, 합성, 변형된 gRNA는 적어도 하나의 뉴클레오시드("염기") 변형 또는 치환을 포함한다.

[0336] 본 출원에 개시된 핵산(예를 들어, gRNA 및 이러한 gRNA를 코딩하는 핵산뿐만 아니라 Cas9를 코딩하는 핵산)은 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 뉴클레오티드 유사체를 포함한다. 일부 측면에서, 시험관내 번역(IVT) 또는 화학적 합성을 사용하여 도입된 적어도 하나의 뉴클레오티드 유사체는 2'-O-메톡시에틸-RNA(2'-MOE-RNA) 단량체, 2'-플루오로-DNA 단량체, 2'-O-알킬-RNA 단량체, 2'-아미노-DNA 단량체, 잠긴 핵산(LNA) 단량체, cEt 단량체, cMOE 단량체, 5'-Me-LNA 단량체, 2'-(3-하이드록시)프로필-RNA 단량체, 아라비노 핵산(ANA) 단량체, 2'-플루오로-ANA 단량체, 안하이드로헥시톨 핵산(HNA) 단량체, 삽입 핵산(intercalating nucleic acid, INA) 단량체, 및 상기 뉴클레오티드 유사체 중 둘 이상의 조합으로 구성된 군으로부터 서택된다. 일부 측면에서, 최적화된 핵산 분자, 예를 들어 gRNA는 적어도 하나의 백본 변형, 예를 들어 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 포함한다.

[0337] 일부 측면에서, 본 출원에 개시된 핵산(예를 들어, gRNA 및 이러한 gRNA를 코딩하는 핵산뿐만 아니라 Cas9를 코딩하는 핵산)은 5' 및/또는 3' 말단에 대해 위치 1, 2, 3에서, 예를 들어 M(2'-O-메틸), MS(2'-O-메틸 3' 포스포로티오에이트), 또는 MSP(2'-O-메틸 3'티오PACE, 포스포노아세테이트) 변형, 또는 이들의 조합을 도입함으로써 말단 위치에서 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 본 개시내용의 gRNA는 3개의 5' 뉴클레

오티드에서 3개의 M 변형 및 3개의 3' 뉴클레오티드에서 3개의 M 변형을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 gRNA는 3개의 5' 뉴클레오티드에서 3개의 MS 변형 및 3개의 3' 뉴클레오티드에서 3개의 MS 변형을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 gRNA는 3개의 5' 뉴클레오티드에서 3개의 MSP 변형 및 3개의 3' 뉴클레오티드에서 3개의 MSP 변형을 포함할 수 있다.

[0338] 일부 측면에서, 본원에 개시된 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 gRNA에서 우리딘, 아데노신, 구아노신, 시티딘 뉴클레오시드의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%가 뉴클레오시드로 대체되었다.

[0339] 일부 측면에서, 본 출원에 개시된 핵산(예를 들어, gRNA)은 IVT 또는 화학적 합성에 의해 생성된 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서

[0340] (i) 야생형 뉴클레오티드 서열에서 적어도 하나의 우리딘이 대체되었고; 및/또는

[0341] (ii) 야생형 뉴클레오티드 서열에서 적어도 하나의 아데노신이 대체되었고; 및/또는

[0342] (iii) 야생형 뉴클레오티드 서열에서 적어도 하나의 구아노신이 대체되었고; 및/또는

[0343] (iv) 야생형 뉴클레오티드 서열에서 적어도 하나의 시티딘이 대체되었다.

[0344] 본 개시내용의 변형된 핵산(예를 들어, gRNA)은 분자의 전체 길이를 따라 균일하게 변형될 필요는 없다. 상이한 뉴클레오티드 변형 및/또는 백본 구조가 핵산의 다양한 위치에 존재할 수 있다. 당업자는 뉴클레오티드 유사체 또는 다른 변형(들)이 핵산의 기능이 실질적으로 감소되지 않도록 핵산의 임의의 위치(들)에 위치할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 변형은 5' 또는 3' 말단 변형일 수도 있다. 핵산은 최소 1 및 최대 100%의 변형된 뉴클레오티드, 또는 임의의 사이의 백분율, 예를 들어 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99% 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.

[0345] 일부 측면에서, 본원에 제공된 핵산은 RNA(예를 들어, gRNA) 및/또는 폴리펩티드(예를 들어, Cas9)를 코딩하는 합성, 변형된 DNA 분자이고, 여기서 합성, 변형된 DNA 분자는 하나 이상의 변형을 포함한다.

[0346] 본원에 기재된 합성, 변형된 핵산(예를 들어, gRNA)에는 엔도뉴클레아제 및 엑소뉴클레아제에 의한 빠른 분해를 방지하기 위한 변형이 포함된다. 변형은, 예를 들어 (a) 단부 변형, 예를 들어 5' 단부 변형(인산화 탈인산화, 접합, 역전된 연결 등), 3' 단부 변형(접합, DNA 뉴클레오티드, 역전된 연결, 등), (b) 염기 변형, 예를 들어 변형된 염기, 안정화 염기, 불안정화 염기 또는 파트너의 확장된 레퍼토리와 염기쌍을 이루는 염기 또는 공액 염기로의 대체, (c) 당 변형(예를 들어, 2' 위치 또는 4' 위치에서) 또는 당의 대체, 및 (d) 포스포디에스테르 연결의 변형 또는 대체를 포함하는 뉴클레오시드간 연결 변형을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0347] 본원에 기재된 방법에 유용한 합성, 변형된 핵산(예를 들어, gRNA) 조성물의 특정 예는 변형된 또는 비-천연 뉴클레오시드간 연결을 함유하는 변형된 핵산(예를 들어, gRNA)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 변형된 뉴클레오시드간 연결을 갖는 합성, 변형된 핵산(예를 들어, gRNA)에는 특히 뉴클레오시드간 연결에 인 원자를 갖지 않는 것들이 포함된다. 일부 측면에서, 합성, 변형된 핵산(예를 들어, gRNA)은 뉴클레오시드간 연결(들)에 인 원자를 갖는다.

[0348] 변형된 뉴클레오시드간 연결의 비-제한적인 예에는 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트 포함하는 기타 알킬 포스포네이트, 포스피네이트, 3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트 포함하는 포스포라미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르 및 정상적인 3'-5' 결합을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 T-5' 연결된 유사체, 및 역 극성을 갖는 것이 포함되고, 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍은 3'-5'에서 5'-3' 또는 T-5'에서 5'-T로 연결된다. 다양한 염, 혼합 염 및 유리산 형태도 포함된다.

[0349] 인 원자를 포함하지 않는 변형된 뉴클레오시드간 연결은 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오시드간 연결, 혼합 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오시드간 연결, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오시드간 연결에 의해 형성되는 뉴클레오시드간 연결을 갖는다. 여기에는 모르폴리노 연결(부분적으로 뉴클레오사이드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성되는); 실록산 백본; 설파이드, 설폭사이드 및 설폰 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 설

파메이트 백본; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 백본; 설포네이트 및 설폰아미드 백본; 아미드 백본; 및 혼합된 N, O, S 및 CH2 구성 요소를 갖는 다른 것들이 포함된다.

[0350] 본원에 기재된 합성, 변형된 핵산(예를 들어, gRNA)의 일부 측면에는 US 5,489,677의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 갖는 핵산 및 헤테로원자 뉴클레오시드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오시드, 및 특히 $-CH_2-NH-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$[메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI로 알려짐], $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 및 $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$[여기서 천연 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결은 $-O-P-O-CH_2-$로 표시됨], 및 미국 특허 번호 5,602,240의 이미드 백본을 갖는 핵산이 포함되며, 두 특허는 모두 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 측면에서, 본원에서 특징으로 하는 핵산 서열은 미국 특허 5,034,506의 모르폴리노 백본 구조를 갖으며, 이는 본원에 그 전체 내용이 참조로 포함된다.

[0351] 본원에 기재된 합성, 변형된 핵산(예를 들어, gRNA)은 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 본원에서 특징으로 하는 핵산은 2' 위치에 다음 중 하나를 포함할 수 있다: H(데옥시리보스); OH(리보스); F; O-, S- 또는 N- 알킬; O-, S- 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; 또는 O-알킬-O-알킬, 여기서 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 비치환된 $C_1$ 내지 $C_{10}$ 알킬 또는 $C_2$ 내지 $C_{10}$ 알케닐 및 알키닐일 수 있다. 예시적인 변형에는 $O[(CH_2)nO]mCH_3$, $O(CH_2)nOCH_3$, $O(CH_2)nNH_2$, $O(CH_2)nCH_3$, $O(CH_2)nONH_2$, 및 $O(CH_2)nON[(CH_2)nCH_3)]_2$가 포함되며, 여기서 n과 m은 1 내지 약 10이다. 일부 측면에서, 합성, 변형된 RNA는 2' 위치에 다음 중 하나를 포함한다: $C_1-C_{10}$ 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴 또는 O-아르알킬, SH, $SCH_3$, OCN, Cl, Br, CN, $CF_3$, $OCF_3$, $SOCH_3$, $SO_2CH_3$, $ONO_2$, $NO_2$, $N_3$, $NH_2$, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, 리포터 기, 인터칼레이터, 특정 핵산(예를 들어, gRNA)의 약동학적 특성을 개선하기 위한 기, 또는 합성, 변형된 핵산(예를 들어, gRNA)의 약력학적 특성을 개선하기 위한 기, 및 유사한 특성을 갖는 기타 치환기. 일부 측면에서, 변형은 2' 메톡시에톡시(2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$, 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 -MOE로도 알려져 있는)(Martin et al, Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), 즉 알콕시-알콕시 기를 포함한다. 또 다른 예시적인 변형은 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉 2'-DMAOE로도 알려진 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 기, 및 2'-디메틸아미노에톡시에톡시(당업계에서는 2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE 알려져 있는), 즉 2'-O-$CH_2$-O-$CH_2$-$N(CH_2)_2$이다.

[0352] 다른 변형에는 2'-메톡시(2'-$OCH_3$), 2'-아미노프로폭시(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$) 및 2'-플루오로(2'-F)가 포함된다. 유사한 변형이 또한 핵산 서열의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오티드 또는 2'-5' 연결된 뉴클레오티드의 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오티드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다. 합성, 변형된 gRNA는 펜토푸라노실 당 대신 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 가질 수도 있다.

[0353] 비-제한적인 예로서, 본원에 기재된 합성, 변형된 gRNA는 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오시드, 5' 포스포로티오에이트 기를 포함하는 뉴클레오시드, 2'-아미노-변형된 뉴클레오시드, 2'-알킬-변형된 뉴클레오시드, 모르폴리노 뉴클레오시드, 포스포라미데이트 또는 비천연 염기를 포함하는 뉴클레오시드, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다.

[0354] 일부 측면에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드는 5-메틸시티딘(5mC), N6-메틸아데노신(m6A), 3,2'-O-디메틸우리딘(m4U), 2-티오우리딘(s2U), 2' 플루오로우리딘, 슈도우리딘, 2'-O-메틸우리딘(Um), 2' 데옥시우리딘(2'dU), 4-티오우리딘(s4U), 5-메틸우리딘(m5U), 2'-O-메틸아데노신(m6A), N6,2'-O-디메틸아데노신(m6Am), N6,N6,2'-O-트리메틸아데노신(m62Am), 2'-O-메틸시티딘(Cm), 7-메틸구아노신(m7G), 2'-O-메틸구아노신(Gm), N2,7-디메틸구아노신(m2,7G), N2,N2,7-트리메틸구아노신(m2,2,7G) 및 이노신(I)으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0355] 대안적으로, 합성, 변형된 gRNA는 적어도 2개의 변형된 뉴클레오시드, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 15개 이상, 적어도 20개, 최대 뉴클레오티드 전체 길이까지를 포함할 수 있다. 최소한, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 합성, 변형된 gRNA 분자는 본원에 기재된 바와 같은 변형을 갖는 단일 뉴클레오시드를 포함한다. 주어진 합성, 변형된 gRNA의 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없으며, 실제로 앞서 언급한 변형 중 하나 이상이 단일 합성, 변형된 gRNA에 통합될 수 있거나 심지어 합성, 변형된 gRNA 내의 단일 뉴클레오시드에도 포함될 수 있다. 그러나, 분자 내 주어진 뉴클레오시드의 각 발생이 변형되는 것이 바람직하지만 반드시 필요한 것은 아니다(예를 들어, 각 시토

신은 변형된 시토신, 예를 들어 5mC이다). 그러나, 동일한 뉴클레오시드의 상이한 발생은 주어진 합성, 변형된 gRNA 분자에서 다른 방식으로 변형될 수 있다는 것도 고려된다(예를 들어, 5mC로 변형된 일부 시토신, 2'-O-메틸시티딘 또는 다른 시토신 유사체로 변형된 다른 것). 변형은 합성, 변형된 gRNA에서 다수의 변형 뉴클레오시드 각각에 대해 동일할 필요는 없다. 또한, 본원에 기재된 측면의 일부 측면에서, 합성, 변형된 gRNA는 적어도 2개의 상이한 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 본원에 기재된 일부 측면에서, 적어도 2개의 상이한 변형된 뉴클레오시드는 5-메틸시티딘 및 슈도우리딘이다. 합성, 변형된 gRNA에는 변형된 뉴클레오시드와 변형되지 않은 뉴클레오시드의 혼합물이 포함될 수도 있다.

[0356] 본원에 개시된 gRNA 및 기타 핵산, 예를 들어 CRISPR 유전자 편집에 사용되는 핵산, 또는 CAR 또는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 세트는 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하는 화학적 합성, 숙주 세포 발현, 시험관내 번역(IVT), 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 자연 발생 뉴클레오시드, 전체 또는 부분적으로 자연 발생 뉴클레오시드를 대체하는, 비-자연 발생 뉴클레오시드, 또는 이들의 조합. 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 합성 반응은 중합효소를 활용하는 효소적 방법으로 수행할 수 있다. 중합효소는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 사슬의 뉴클레오티드 사이의 포스포디에스테르 결합 생성을 촉매한다.

[0357] 유전공학의 다양한 도구는 주형으로 작용하는 표적 핵산의 효소적 증폭을 기반으로 한다. 개별 유전자 또는 특정 관심 영역의 서열 연구 및 기타 연구 요구 사항을 위해서는 소량의 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 샘플에서 표적 핵산의 다중 카피를 생성해야 한다. 이러한 방법은 본원에 개시된 gRNA 및 다른 핵산(예를 들어, RNAi, ASO, Cas를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 CAR 또는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 세트)의 제조에 적용될 수 있다.

[0358] 중합효소 연쇄 반응(PCR)은 표적 유전자의 신속한 증폭뿐만 아니라 게놈 매핑 및 서열분석에 폭넓게 적용된다. DNA 합성을 위한 주요 구성요소는 주형인 표적 DNA 분자, 표적 DNA 가닥의 단부에 상보적인 프라이머, 빌딩 블록인 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트(dNTP) 및 DNA 중합효소로 구성된다. 변성, 어닐링 및 확장 단계를 통해 PCR이 진행됨에 따라 새로 생성된 DNA 분자는 다음 복제 주기의 주형 역할을 하여 표적 DNA를 기하급수적으로 증폭시킬 수 있다. PCR은 변성 및 어닐링을 위해 가열 및 냉각 주기가 필요한다. 기본 PCR의 변형에는 비대칭 PCR(Innis et al., PNAS 85, 9436-9440 (1988)), 역 PCR(Ochman et al., Genetics 120(3), 621-623, (1988)) 및 역방향 전사 PCR(RT-PCR)(Freeman et al., BioTechniques 26(1), 112-22, 124-5(1999))이 포함되며, 그 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. RT-PCR에서는 단일 가닥 RNA가 원하는 표적이며 먼저 역전사 효소에 의해 이중 가닥 DNA로 변환된다. 임의의 전술한 방법은 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, gRNA, Cas를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 CAR 또는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 세트)의 하나 이상의 영역의 제조에 활용될 수 있다.

[0359] 리가제에 의해 폴리뉴클레오티드 또는 핵산을 조립하는 것도 널리 사용된다. DNA 또는 RNA 리가아제는 포스포디에스테르 결합 형성을 통해 폴리뉴클레오티드 사슬의 5' 및 3' 단부의 분자간 결찰을 촉진한다. 따라서, RNA 리가제는, 예를 들어 gRNA 스페이서 서열과 gRNA 프레임 서열의 3'에서 5'로의 분자간 결찰에 의해 gRNA를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0360] 분리된 관심 폴리펩티드를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 합성하기 위해 표준 방법을 적용할 수 있다. 예를 들어, 특정 분리된 폴리펩티드를 코딩하는 코돈-최적화된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 단일 DNA 또는 RNA 올리고머가 합성될 수 있다. 일부 측면에서, 원하는 폴리펩티드의 부분을 코딩하는 여러 개의 작은 올리고뉴클레오티드가 합성된 후 결찰될 수 있다. 일부 측면에서, 개별 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 상보적 조립을 위해 5' 또는 3' 돌출을 함유한다.

[0361] 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, gRNA, Cas를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 CAR 또는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 세트)는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법 및 잠재적인 핵염기 치환을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 국제 공개 번호 WO2014093924, WO2013052523; WO2013039857, WO2012135805, WO2013151671; 미국 공개 번호 US20130115272; 또는 미국 특허 번호 US8999380, US8710200; 이들 모두는 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0362] **Ⅶ. 약제학 조성물**

[0363] 본 개시내용은 (a) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 발현하도록 변형되고 (i) 내인성 발현의 *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자 및 NR4A1 및 NR4A2 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1

단백질, (iii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 또는 (iv) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질과 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질 둘 모두를 갖는 세포(예를 들어, 본원에 기재된 세포)를 포함하는 약제학 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 (a) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질 및 결합 분자를 발현하도록 변형되고 (i) 내인성 발현의 *NR4A1* 및 *NR4A2* 유전자 및 NR4A1 및 NR4A2 단백질, (ii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질, (iii) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질, 또는 (iv) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질과 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질 둘 모두를 갖는 세포(예를 들어, 본원에 기재된 세포)를 포함하는 약제학 조성물을 제공한다. 보다 구체적으로, 일부 측면에서, (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고, (ii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 갖고, (iii) 내인성 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 갖고, (iv) 내인성 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 갖는 변형된 세포(예를 들어, 변형된 면역 세포)를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고, (ii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 갖고, (iii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 갖고, (iv) 내인성 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 갖는 변형된 세포(예를 들어, 변형된 면역 세포)를 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고, (ii) 감소된 수준의 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질을 갖고, (iii) 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질을 갖고, (iv) 감소된 수준의 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질을 갖는 변형된 세포(예를 들어, 변형된 면역 세포)를 포함한다.

[0364] 일부 측면에서, 상기 기재된 임의의 조성물에 대해, *NR4A3* 유전자의 수준은 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 도구를 사용하여 감소될 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 본원에 기재된 임의의 gRNA는 *NR4A3* 유전자의 수준을 감소시키는 데(따라서 코딩된 NR4A3 단백질의 수준을 감소시킨다) 사용될 수 있다.

[0365] 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 조성물은 (i) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 30 및 52-99 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 30 및 52-99 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 30에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 52에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 54에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 55에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 56에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 57에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 58에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 59에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 60에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 61에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적

화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 62에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 63에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 64에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 65에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 66에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 67에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 68에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 69에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 70에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 71에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 72에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 73에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 74에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 75에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 76에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 77에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 78에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 79에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 80에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 81에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 82에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 83에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 84에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 85에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를

포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 86에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 87에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 88에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 89에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 90에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 91에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 92에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 93에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 94에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 95에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 96에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 97에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 98에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하며, 여기서 gRNA는 서열번호: 99에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다.

[0366] 일부 측면에서, 본 개시내용에 유용한 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 30 및 52-99 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 30에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 52에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 54에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 55에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 56에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 57에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되

거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본 원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 58에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 59에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 60에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 61에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 62에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 63에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 64에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 65에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 66에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 67에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 68에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본 원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 69에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 70에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 71에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 72에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 73에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 74에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 75에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 76에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현

하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 77에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 78에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 79에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본 원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 80에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 81에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 82에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 83에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 84에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 85에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 86에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 87에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 88에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 89에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 90에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본 원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 91에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 92에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 93에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 94에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 95에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열

번호: 96에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 97에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 98에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 (i) 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 발현하고 (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화할 수 있는 gRNA로 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하고, 여기서 gRNA는 서열번호: 99에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성된다.

[0367] 일부 측면에서, 상기 기재된 임의의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 추가로 포함한다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 달리 표시되지 않는 한, 용어 "조성물" 및 "약제학 조성물"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 따라서, 약제학 조성물과 관련된 임의의 적합한 개시내용은 조성물에도 동일하게 적용될 수 있다. 유사하게, 조성물과 관련된 임의의 적합한 개시내용은 약제학 조성물에도 동일하게 적용될 수 있다.

[0368] 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 임의의 약제학 조성물은 암을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 측면에서, 본원에 개시된 약제학 조성물에 존재하는 변형된 세포는 면역 세포, 예를 들어 T 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR-발현 T 세포) 또는 NK 세포(예를 들어, CAR 또는 TCR-발현 NK 세포)이다.

[0369] 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이며, 인산염, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예: 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜탄올 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈 등의 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 라이신 등의 아미노산; 단당류, 이당류 및 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 포함하는 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스, 또는 소르비톨 등의 당류; 나트륨과 같은 염-형성 반대 이온; 금속 복합체(예: Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEEN®, PLURONICS® 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

[0370] 약제학 조성물은 대상체에 대한 임의의 투여 경로를 위해 제형화될 수 있다. 투여 경로의 구체적인 예에는 근육내, 피하, 안내, 정맥내, 복강내, 피내, 안와내, 뇌내, 두개내, 척수내, 뇌실내, 척수강내, 수막내, 피막내 또는 종양내가 포함된다. 피하, 근육내 또는 정맥내 주사를 특징으로 하는 비경구 투여도 본원에서 고려된다. 주사제는 액체 용액 또는 현탁액, 주사 전 액체 중의 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태, 또는 에멀젼과 같은 전통적인 형태로 제조될 수 있다. 주사제, 용액 및 에멀젼에는 하나 이상의 부형제도 함유되어 있다. 적합한 부형제는, 예를 들어 물, 식염수, 덱스트로스, 글리세롤 또는 에탄올이다. 또한, 원하는 경우, 투여될 약제학 조성물은 또한 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해도 증진제, 및 나트륨 아세테이트, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 및 사이클로덱스트린과 같은 기타 제제와 같은 소량의 무-독성 보조 물질을 함유할 수 있다.

[0371] 비경구 제제에 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체에는 수성 비히클, 비수성 비히클, 항미생물제, 등장성 제제, 완충제, 항산화제, 국소 마취제, 현탁화제 및 분산제, 유화제, 격리제 또는 킬레이트화제 및 기타 약제학적으로 허용되는 물질이 포함된다. 수성 비히클의 예로는 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 등장성 덱스트로스 주사액, 멸균수 주사액, 덱스트로스 및 락테이트 링거 주사액이 있다. 비수성 비경구 비히클에는 식물성 기원의 고정유, 면실유, 옥수수유, 참기름 및 땅콩유가 포함된다. 정균 또는 정진균 농도의 항균제를 페놀 또는 크레졸, 수은, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-하이드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤잘코늄 클로라이드 및 벤제토늄 클로라이드를 포함하는 다회 용량 용기에 포장된 비경구 제제에 첨가할 수 있다. 등장성 제제에는 염화나트륨과 덱스트로스가 포함된다. 완충액에는 인산염과 시트레이트가 포함된다. 항산화제에는 황산수소나트륨이 포함된다. 국소마취제에는 프로카인 염산염이 포함된다. 현탁제 및 분산제에는 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 및 폴리비닐피롤리돈이 포함된다. 유화제에는 폴리소르베이트 80(TWEEN® 80)이 포함된다. 금속 이온의 격리제 또는 킬레이트제에는 EDTA가 포함된다. 약제학 담체에는 수혼화

성 비히클용 에틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜도 포함되고; pH 조정을 위한 수산화나트륨, 염산, 시트르산 또는 락트산이 포함된다.

[0372] 비경구 투여를 위한 제제에는 바로 주사용 멸균 용액, 동결건조 분말과 같은 멸균 건조 용해성 생성물이 포함되며 사용 직전에 용매와 결합할 수 있으며 피하 정제, 즉시 주사가능 멸균 현탁액, 사용 직전에 비히클과 배합할 수 있는 멸균 건조 불용성 생성물 및 멸균 에멀젼이 포함된다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0373] 정맥내로 투여되는 경우, 적합한 담체에는 생리 식염수 또는 인산염 완충 식염수(PBS), 및 글루코스, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 및 이들의 혼합물과 같은 증점제 및 가용화제를 함유하는 용액이 포함된다.

[0374] 본원에 제공된 약제학 조성물은 또한 치료할 대상체의 특정 조직, 수용체, 또는 기타 신체 부위를 표적화하도록 제형화될 수 있다. 이러한 많은 표적화 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 이러한 모든 표적화 방법은 본 발명에서 본 발명의 조성물에 사용하기 위해 고려된다. 표적화 방법의 비제한적 예에 대해서는, 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함되는 미국 특허 번호 6,316,652, 6,274,552, 6,271,359, 6,253,872, 6,139,865, 6,131,570, 6,120,751, 6,071,495, 6,060,082, 6,048,736, 6,039,975, 6,004,534, 5,985,307, 5,972,366, 5,900,252, 5,840,674, 5,759,542 및 5,709,874를 참조한다.

[0375] 생체내 투여에 사용되는 조성물은 멸균될 수 있다. 이는 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 수행된다.

[0376] 본 개시내용은 또한, 예를 들어 면역 세포 집단에서 지속적인 기억 및/또는 이펙터 기능을 촉진하는 본원에 기재된 하나 이상의 방법을 위한 수단을 포함하는 세포 조성물을 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 면역 세포 집단의 탈진 및/또는 기능장애를 감소, 개선 또는 억제하기 위한 수단을 포함하는 세포 조성물을 제공한다. 일부 측면에서, 상기 수단은 면역 세포 집단에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)의 발현을 변형하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 수단은 면역 세포 집단에서 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 변형하는 것을 포함한다.

[0377] **Ⅷ. 키트**

[0378] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 방법 중 임의의 것을 실시하기 위한 키트를 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 (i) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)의 발현을 감소시키기 위한 유전자 편집 도구(예를 들어, 서열번호: 30 및 52-99 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 gRNA를 포함하는), 또는 (ii) 이들의 조합, 및 임의로 본원에 개시된 방법 중 임의의 방법에 따라 종양을 치료하기 위한 지침을 포함하는 키트를 제공한다. 또한 (i) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)의 발현을 감소시키기 위한 유전자 편집 도구(예를 들어, 서열번호: 30 및 52-99 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 gRNA를 포함하는), 또는 (ii) 이들의 조합, 및 임의로 본원에 개시된 방법 중 임의의 방법에 따라 세포 조성물을 제조하기 위한 지침을 포함하는 키트를 제공한다.

[0379] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 임의의 방법을 실시하기 위한 키트를 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 (i) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)의 발현을 감소시키기 위한 유전자 편집 도구(예를 들어, 서열번호: 30 및 52-99 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 gRNA를 포함하는), (ii) 리간드 결합 단백질(예를 들어, 키메라 항원 수용체(CAR)(예를 들어, ROR1 CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR))을 포함하는 벡터, 또는 (iii) 이들의 조합, 및 임의로 본원에 개시된 임의의 방법에 따라 종양을 치료하기 위한 지침를 포함하는 키트를 제공한다. 또한 (i) *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)의 발현을 감소시키기 위한 유전자 편집 도구(예를 들어, 서열번호: 30 및 52-99 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 gRNA를 포함하는), (ii) 리간드 결합 단백질(예를 들어, 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR))을 포함하는 벡터, 또는 (iii) 이들의 조합, 및 임의로 본원에 개시된 임의의 방법에 따라 세포 조성물을 제조하기 위한 지침를 포함하는 키트를 제공한다.

[0380] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 조성물, 예를 들어 (i) 세포, 예를 들어 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질(단독으로 또는 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과

조합하여)의 감소된 발현을 나타내는 면역 세포, (ii) *NR4A3* 유전자를 표적화하는 적어도 하나의 gRNA, (iii) 적어도 하나의 gRNA를 코딩하는 핵산(예를 들어, 벡터), (iv) 적어도 하나의 gRNA 및 Cas 단백질(예를 들어, Cas9), (v) gRNA를 코딩하는 적어도 하나의 핵산(예를 들어, 벡터) 및 Cas 단백질(예를 들어, Cas9), (vi) gRNA를 코딩하는 적어도 하나의 핵산(예를 들어, 제1 벡터) 및 Cas9와 같은 Cas 단백질을 코딩하는 핵산(예를 들어, 제2 벡터), (vii) 적어도 하나의 gRNA 및 적어도 하나의 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9를 코딩하는 핵산을 포함하는 단일 벡터, (vii) CAR 또는 TCR을 코딩하는 벡터 또는 벡터 세트를 포함하는 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 측면에서, 키트는 NR4A3을 표적화하는 Cas9 RNP(예를 들어, sgRNA GCUCGAGUAGCCCUCCACGA(서열번호: 30)를 포함하는 Cas9 RNP)를 포함한다. *NR4A3* 유전자를 표적화하는 다른 Cas9 RNP뿐만 아니라 *NR4A1* 및/또는 *NR4A2* 유전자를 표적화하는 것의 비-제한적인 예는 본 개시내용의 다른 곳에서 제공된다(예를 들어, 표 A, C 및 D 참조). 일부 측면에서, 키트는 이의 사용을 위한 지침을 추가로 포함한다.

[0381] 본 개시내용은 본원에 개시된 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하는 암 치료용 키트를 제공하며, 여기서 세포는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 발현(단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)을 나타낸다. 본 개시내용은 본원에 개시된 변형된 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하는 암 치료용 키트를 제공하며, 여기서 세포는 *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 감소된 발현(단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)을 나타내고, 여기서 세포는 CAR 및/또는 TCR을 발현한다.

[0382] 일부 측면에서, 키트는 본원에 개시된 적어도 하나의 gRNA(예를 들어, 서열번호: 30 및 52-99 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 gRNA를 포함하는), 본원에 개시된 gRNA를 코딩하는 적어도 하나의 분리된 폴리뉴클레오티드, 본원에 개시된 gRNA를 코딩하는 적어도 하나의 벡터, 본원에 개시된 gRNA를 코딩하는 적어도 하나의 벡터를 포함하는 세포, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 키트는 Cas9 단백질, Cas9 단백질을 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드, 또는 Cas9 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 추가로 포함한다.

[0383] 본 개시내용은 상기 언급된 gRNA, Cas9; *NR4A3* 유전자 및/또는 NR4A3 단백질의 발현을 감소(단독으로 또는 감소된 수준의 *NR4A1* 유전자 및/또는 NR4A1 단백질 및/또는 *NR4A2* 유전자 및/또는 NR4A2 단백질과 조합하여)시키기 위한 지침과 함께 벡터, 세포 또는 이들의 조합 중 적어도 하나가 내부에 배치된 적어도 하나의 용기 수단을 포함하는 키트 또는 패키지를 추가로 제공한다.

[0384] 일부 측면에서, 키트는 적어도 하나의 업스트림 gRNA 및 다운스트림 gRNA를 포함한다. 따라서, 일부에서 키트는 (i) 서열번호: 31-38 중 어느 하나의 스페이서 서열을 포함하는 적어도 하나의 gRNA, 및 (ii) 서열번호: 41-42 중 어느 하나의 스페이서 서열을 포함하는 적어도 하나의 gRNA를 포함한다.

[0385] 특정 측면에서, 키트는 *S. 아우레우스* 키메라 프레임, 예를 들어 서열번호: 39의 서열에 작동가능하게 연결된 서열번호: 31-38의 *S. 피오게네스* 스페이서 서열을 포함하는 gRNA를 포함한다.

[0386] 일부 측면에서, 특정 박테리아 종 Cas9(예를 들어, *S. 피오게네스* Cas9)을 위한 gRNA를 포함하는 각 키트는 이러한 Cas9를 추가로 포함한다.

[0387] 일부 측면에서, 키트는 암 항원을 표적화하는 CAR 및/또는 TCR을 발현하는 하나 이상의 세포, 배양물, 또는 세포 집단을 포함한다.

[0388] 실시예

[0389] **실시예 1 - 가이드 RNA 스크리닝 및 변형된 T 세포의 생성**

[0390] 인간 T 세포 탈진에 대응하는 각 NR4A 구성원의 역할을 조사하기 위해, ROR1-R12 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 및 NY-ESO-1 T 세포 수용체(TCR) T 세포 모델을 사용했다. CRISPR-Cas9 가이드 RNA(gRNA)는 ROR1 CAR 또는 NY-ESO-1 TCR로 형질도입된 인간 T 세포에서 각 NR4A 계열 구성원의 단백질 발현을 특이적으로 감소시키는 것으로 확인되었다.

[0391] NR4A1 및 NR4A2에 대한 CRISPR-Cas9 가이드 RNA는 표 A에 나와 있다. 실시예 2-7에 기재된 실험에서는 NR4A1 sgRNA 5 및 6을 조합하여 사용했고 NR4A2 sgRNA 1, 2 및 3을 조합하여 사용했다.

| 표 A: NR4A1 및 NR4A2 가이드 RNA | |
|---|---|
| NR4A1 sgRNA 5 (서열번호: 25) | GAAGUCCUCGAACUUGAAGG |
| NR4A1 sgRNA 6 (서열번호: 26) | ACCUUCAUGGACGGCUACAC |
| NR4A2 sgRNA 1 (서열번호: 27) | UUGGGAUGGUCAAAGAAGGU |
| NR4A2 sgRNA 2 (서열번호: 28) | CAGCCAGGCACUUCUGAAAU |
| NR4A2 sgRNA 3 (서열번호: 29) | UCCGGCGACGCUUGUCCACU |

[0392]

[0393] NR4A3에 특이적인 단일 gRNA는 3개의 독립적인 실험(v0, v1 및 v2)에서 최대 편집 효율 및 최대 단백질 감소를 갖는 gRNA를 확인하기 위해 설계되고 스크리닝되었다. 모든 gRNA 스크리닝을 위해, 분리된 기증자 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 올셀스(AllCells)에서 구입했다. CD4+ 및 CD8+ T 세포를 해동하고 활성화를 위해 1%(v/v) 트랜스액트(TransAct, Miltenyi)와 24시간 동안 1:1 비율로 혼합했다. 활성화된 T 세포는 24시간 후에 항-ROR1 CAR을 코딩하는 바이-시스트론(v0) 또는 트리-시스트론(v2) 렌티바이러스 벡터로 형질도입되거나 형질도입되지 않은 채로 남겨졌다(v1). 그런 다음 변형된 가이드 RNA(Synthego; v0 - 표 B, v1 - 표 C 및 v2 - 표 D) 및 론자(Lonza) 4D 뉴클레오펙터(Nucleofector) 유닛을 활용하여 인간 NR4A3을 표적화하는 Cas9 RNP로 T 세포를 전기천공했다. 7일에 크라이오스토어(CryoStor) 배지에서 냉동보존하기 전기천공된 T 세포를 확장을 위해 G-Rex 배양 플레이트로 옮겼다. 실험 v0 및 v1에서는 한 명의 기증자를 사용한 반면, 실험 v2에서는 두 명의 독립적인 기증자를 사용했다. 7일에 유세포분석에 의한 단백질 감소 효율을 평가하기 위해 $3x10^5$ NR4A3-편집 또는 대조군(RNP 없이 전기천공) T 세포를 CD3/CD28 다이나비즈(Dynabeads)(v0 및 v1에서) 또는 PMA+이오노마이신(v2에서)으로 최대 NR4A3 발현을 유도하기 위해 37C에서 96웰 둥근 바닥 플레이트(Corning)에 200 μL의 RPMI-1640(Gibco) + 10% 소 태아 혈청(Gibco) + 1% 페니실린/스트렙토마이신 중에서 2시간 동안 자극했다. 자극 후, 위에서 설명한 대로 세포를 표면 마커로 염색했다. 그런 다음 제조업체의 지침에 따라 FoxP3 전사 인자 염색 완충액 키트(eBiosciences)를 사용하여 세포를 고정하고 투과화시켰으며 맞춤형 형광색소 접합 NR4A3 항체(R&D Systems)를 사용하여 세포내 염색을 수행했다.

[0394] v0에서 gRNA 중 어느 것도 대조군 비-편집 세포에 비해 NR4A3 단백질 발현을 감소시키지 않았다(표 B). NGS에 의한 확증적인 게놈 편집 효율성은 수행되지 않았다. v1에서는 모든 7개 gRNA가 비-편집 대조군에 비해 NR4A3 단백질 발현을 감소시켰으며 NGS 편집 효율성이 수행되었다. 두 가이드(g4 및 g8)는 가장 높은 게놈 편집을 보였다(T 세포 분산 총 백분율로 측정). 높은 편집 효율성에도 불구하고, 게놈 변이체의 인델 특성화는 g8이 바람직하지 않은 인-프레임 결실의 높은 빈도를 초래한다는 것을 보여주었다(표 C). v2에서는 비-편집 대조군에 비해 NR4A3 단백질 발현이 감소하고/하거나 두 기증자 모두에 대해 벤치마크 g4와 유사/더 나은 KO 조건을 기반으로 상위 14개 gRNA가 선택되었다(표 D). NGS 분석을 통해 게놈 편집 효율성을 확인하기 위해 선택된 조건을 추가로 평가한다.

표 B: 한 기증자에서 실험 v0 의 NR4A3 가이드 서열. NR4A3 단백질은 편집되지 않은 대조군에 비해 감소하지 않았으며 생산 7 일차에 벌크 T 세포에서 차세대 서열분석(NGS)에 의해 결정된 편집 효율성이 수행되지 않았다. N/A =해당 사항 없음.

| | 5' – 3' 서열 | 단백질 감소 (기준 충족) | T 세포 변이 (%) | 인델 유형 |
|---|---|---|---|---|
| g1(서열번호: 48) | CAAUAUAGCCCUUCCCCUCC | 아니요 | N/A | N/A |
| g2(서열번호: 49) | AACUGGAACCUGGAGGGGAA | 아니요 | N/A | N/A |
| g3 (서열번호: 50) | UAACUGGAACCUGGAGGGGA | 아니요 | N/A | N/A |

[0395]

표 C: 한 기증자에 대한 실험 v1 의 NR4A3 가이드 서열. 생산 7 일차에 벌크 T 세포의 NGS(T 세포 분산 백분율로 측정) 및 인델 특성화(T 세포 분산 백분율)에 의한 게놈 편집 효율성이 표시된다.

| | 5′ – 3′ 서열 | 단백질 감소 (기준 충족) | T 세포 변이 (%) | 인델 유형 |
|---|---|---|---|---|
| g4 (서열번호: 30) | GCUCGAGUAGCCCUCCACGA | 예 | 70.3 | 결실 – 42.3%<br>삽입 – 23.2%<br>치환 – 11.2% |
| g5 (서열번호: 52) | CCGCUGCAUUUGGUACACGC | 예 | 43.7 | 결실 – 20.8%<br>삽입 – 18.9%<br>치환 – 7.4% |
| g6 (서열번호: 53) | UGCGGCGCAGACAUACAGCU | 예 | 48.8 | 결실 – 17.9%<br>삽입 – 25.9%<br>치환 – 6.8% |
| g7 (서열번호: 54) | GCAGCGGCCCUUGAUCAAAG | 예 | 3.6 | 결실 – 0.5%<br>삽입 – 3%<br>치환 – 0% |
| g8 (서열번호: 55) | AUACAGCUCGGAAUACACCA | 예 | 71.7 | 결실 – 58.7%<br>삽입 – 11.5%<br>치환 – 2.7% |
| g9 (서열번호: 56) | CCUGCGUGUACCAAAUGCAG | 예 | 36.5 | 결실 – 32.9%<br>삽입 – 1.9%<br>치환 – 2.3% |
| g10 (서열번호: 57) | GCGGCCCUUGAUCAAAGUGG | 예 | 28 | 결실 – 25.9%<br>삽입 – 1.1%<br>치환 – 1.7% |

[0396]

표 D: 두 기증자에 대한 실험 v2 의 NR4A3 가이드 서열. 생산 7 일차에 벌크 T 세포의 NGS(T 세포 분산 백분율로 측정) 및 인델 특성화(T 세포 분산 백분율)에 의한 게놈 편집 효율성이 표시된다 N/A = 해당 없음; TBD = 미정.

| | 5' – 3' 서열 | 단백질 감소 (기준 충족) | T 세포 변이 (%) | 인델 유형 |
|---|---|---|---|---|
| g11 (서열번호: 58) | GGACUGCUUGAAGUACAUGG | 예 | TBD | TBD |
| g12 (서열번호: 59) | CGGGUGGCUCUCAAGCGCGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g13 (서열번호: 60) | GACGACGAGCUCCUGCUGGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g14 (서열번호: 61) | GUCGGGGUUCAUGAUCUCCG | 예 | TBD | TBD |
| g15 (서열번호: 62) | GAGGGCUUGAAGUGGAAGAG | 아니오 | N/A | N/A |
| g16 (서열번호: 63) | GAUGAAGGCGGUCCCCACGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g17 (서열번호: 64) | GAAGGUACUGAUGCUGGGCA | 아니오 | N/A | N/A |
| g18 (서열번호: 65) | UCCUCCAGCCUCCAGCCCGG | 예 | TBD | TBD |
| g19 (서열번호: 66) | AGCAUCAGUACCUUCGUGGA | 아니오 | N/A | N/A |
| g20 (서열번호: 67) | CGACUACACCAAGCUGACCA | 예 | TBD | TBD |
| g21 (서열번 | UGGUCAGCUUGGUGUAGUCG | 예 | TBD | TBD |

[0397]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 호: 68) | | | | |
| g22 (서열번호: 69) | GCUGGACCCGCCGAUGAAGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g23 (서열번호: 70) | UUGAAGUACAUGGAGGUGCU | 예 | TBD | TBD |
| g24 (서열번호: 71) | GUACGGGUGGCUCUCAAGCG | 예 | TBD | TBD |
| g25 (서열번호: 72) | CCGCAUAACUGGAACCUGGA | 아니오 | N/A | N/A |
| g26 (서열번호: 73) | GGGCACGUGUGCCGUGUGCG | 아니오 | N/A | N/A |
| g27 (서열번호: 74) | UACGGCGUGCGAACCUGCGA | 아니오 | N/A | N/A |
| g28 (서열번호: 75) | UGGGGACUGCUUGAAGUACA | 예 | TBD | TBD |
| g29 (서열번호: 76) | CCUUGGCAGCACUGAGAUCA | 예 | TBD | TBD |
| g30 (서열번호: 77) | CCUUGAUCAAAGUGGAGGAG | 아니오 | N/A | N/A |
| g31 (서열번호: 78) | UGCAUUUGGUACACGCAGGA | 아니오 | N/A | N/A |
| g32 (서열번호: 79) | UGAUCAAAGUGGAGGAGGGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g33 (서열번호: 80) | GUGGGGACCGCCUUCAUCGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g34 (서열번 | AGGAGCUCGUCGUCUGGCGA | 아니오 | N/A | N/A |

[0398]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 호: 81) | | | | |
| g35 (서열번호: 82) | CCACCUCGGCUACGACCCGA | 예 | TBD | TBD |
| g36 (서열번호: 83) | GCGGCGGCGAGGGCUUGAAG | 예 | TBD | TBD |
| g37 (서열번호: 84) | CAGCAUCAGUACCUUCGUGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g38 (서열번호: 85) | GCCGAUGAAGGCGGUCCCCA | 아니오 | N/A | N/A |
| g39 (서열번호: 86) | CCGUCGGGUCGUAGCCGAGG | 예 | TBD | TBD |
| g40 (서열번호: 87) | CUACGGCGUGCGAACCUGCG | 아니오 | N/A | N/A |
| g41 (서열번호: 88) | CCAUAACGCCCCCGCCUGCG | 아니오 | N/A | N/A |
| g42 (서열번호: 89) | AUAACGCCCCCGCCUGCGGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g43 (서열번호: 90) | GCCGCAUAACUGGAACCUGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g44 (서열번호: 91) | GAAAUCGACAGUACUGACAU | 아니오 | N/A | N/A |
| g45 (서열번호: 92) | UUUCAGAAGUGUCUCAGUGU | 아니오 | N/A | N/A |
| g46 (서열번호: 93) | GAAGUGUCUCAGUGUUGGAA | 아니오 | N/A | N/A |
| g47 (서열번 | AGUGUUGGAAUGGUAAAAGA | 예 | TBD | TBD |

[0399]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 호: 94) | | | | |
| g48 (서열번호: 95) | GUACAGAUAGUCUGAAAGGG | 아니오 | N/A | N/A |
| g49 (서열번호: 96) | GUGUUGAGUCUGUUAAAGCU | 예 | TBD | TBD |
| g50 (서열번호: 97) | GAUAGUCUGAAAGGGAGGAG | 아니오 | N/A | N/A |
| g51 (서열번호: 98) | AGUCUGUUAAAGCUCGGACA | 아니오 | N/A | N/A |
| g52 (서열번호: 99) | GUCCGUACAGAUAGUCUGAA | 아니오 | N/A | N/A |

[0400]

[0401] 아래 실시예에 더 자세히 기재된 바와 같이, NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포(NR4A3 gRNA g4 서열번호: 30을 사용하여 편집)는 가장 큰 기능적 이점을 나타내어 대조군 ROR1 CAR T 세포와 비교하여 지속적인 ROR1 항원 노출 후 상당히 연장된 세포 독성, 사이토카인 생산, T 세포 지속성, 표현형 개선을 입증했다. NR4A3-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포는 또한 대조군 NY-ESO-1 TCR T 세포와 비교하여 지속적인 NY-ESO-1 항원 노출 후 연장된 세포독성 및 사이토카인 생산을 입증하는 가장 큰 기능적 이점을 나타냈다.

[0402] **실시예 2 - 감소된 NR4A3 발현**

[0403] NR4A 단백질 발현의 감소는 NR4A-편집된 ROR1 CAR T 세포(NR4A3 sgRNA g4, 서열번호: 30를 사용하여 편집)에서 유세포 분석에 의해 검증되었다. CD3/CD28 다이나비즈(Dynabeads)를 사용한 자극을 사용하여 최대 NR4A 발현을 유도했다. 유세포 분석을 위해 NR4A-편집된 ROR1 CAR T 세포를 실온(RT)에서 10분간 생사 염료(live dead dye)로 염색하고, 트루스테인(TruStain) FcX(Biolegend)로 실온에서 5분간 차단하고, CCR7로 37C에서 15분간 염색하고, 표면 마커 항체로 RT에서 10분간 염색했다. 모든 염색은 바이오레전드(Biolegend) 세포 염색 완충액에서 수행되었다.

[0404] $3x10^5$ NR4A-편집된 또는 대조군 ROR1 CAR T 세포를 최대 NR4A 발현을 유도하기 위해 200 uL의 RPMI-1640(Gibco) + 10% 태아 소 혈청(Gibco) + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 3:1 비드 대 세포 비율로 CD3/CD28 다이나비즈(Dynabeads)(Thermo Fisher)로 2시간 동안 37℃에서 96웰 둥근 바닥 플레이트(Corning)에서 자극했다. 자극 후, 다이나비즈(Dynabeads)를 제거하고 상기에서 설명한 대로 세포를 표면 마커로 염색했다. 그런 다음 제조업체의 지침에 따라 FoxP3 전사 인자 염색 완충 키트(eBiosciences)를 사용하여 세포를 고정하고 투과화시켰다. 맞춤형 형광색소 접합 NR4A 항체(R&D Systems)를 염색에 사용했다.

[0405] NR4A3 단백질 발현은 편집되지 않은 대조군에 비해 NR4A3-편집된 ROR1 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ CAR T 세포에서 유의하게 감소되었다(**도 1a 및 1b**). 마찬가지로, NR4A1 및 NR4A2 유전자에 특이적인 CRISPR-Cas9 gRNA를 사용하여 고효율 NR4A1 및 NR4A2 단백질 감소가 달성되었다(데이터는 표시되지 않음). ROR1 CAR($EGFR^+R12^+$로 식별됨)의 발현은 테스트된 5명의 기증자에서 유사했으며 NR4A 편집에 의해 영향을 받지 않았다(**도 2**).

[0406] **실시예 3 - 순차적 자극에서 지속적인 세포 독성 및 사이토카인 생산**

[0407] NR4A-편집된 ROR1 CAR T 세포의 기능은 CAR T 세포가 항원에 순차적으로 또는 만성적으로 노출되는 2가지 시험관내 탈진 검정에서 평가되었다.

[0408] 순차적 자극 검정에서, NR4A-편집된 ROR1 CAR T 세포는 H1975 NSCLC ROR1-발현 종양 세포주를 사용하여 5회 연속 자극을 받았다. 특히, 냉동보존된 NR4A-편집 또는 대조군 ROR1 CAR T 세포를 해동하고 RPMI-1640(Gibco) + 10% 태아 소 혈청(Gibco) + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 H1975-NLR 종양 세포와 1:1 E:T 비율로 편평한 24웰 검정 플레이트(Eppendorf)에 3중으로 즉시 배양했다. 3일간의 공동 배양 후, 웰을 재현탁시키고, 배양물의 25%를 웰당 동일한 초기 수의 신선한 종양 세포가 있는 새로운 플레이트로 옮겼다. 이는 총 5번의 자극에 대해 반복되었다. 세포독성은 검정 동안 Incucyte에서 지속적으로 측정되었으며 사이토카인 수준을 측정하기 위해 각각의 새로운 자극을 설정한 후 24시간 후에 상층액을 수집했다. 상기에서 설명한 대로 표현형 흐름 분석을 위해 3중 공동 배양 웰의 나머지 세포를 합했다. NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포는 H1975 종양 세포에 대해 더 많은 세포독성을 유지하여 NR4A1, NR4A2 또는 대조군 비-편집 ROR1 CAR T 세포와 비교하여 3-5라운드 자극 후 표적 세포를 용해시키는 지속적인 능력을 입증했다(**도 3**).

[0409] 지속적인 세포독성 외에도, NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포는 H1975 NSCLC ROR1-발현 종양 세포로 자극한 경우 NR4A1, NR4A2 또는 대조군 비-편집 ROR1 CAR T 세포에 비해 더 높은 수준의 IFN-γ, IL-2 및 TNF-α를 생성했다(**도 4a, 4b, 4c**). 사이토카인 수준은 제조업체의 지침에 따라 메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery) V-Plex 친염증성 패널 1 인간 키트 또는 맞춤형 인간 IFN-g, IL-2 및 TNF-a 사이토카인 키트를 사용하여 측정되었다.

[0410] 사이토카인 생산의 차이는 이후 자극 라운드에서 가장 두드러졌으며, 이는 NR4A3 녹아웃이 연장된 항원 자극 후 지속적인 기능적 활성 및/또는 개선된 CAR T 세포 생존에 기여한다는 것을 시사한다. 실제로, 순차적 자극 검정으로부터의 NR4A3-편집된 T 세포는 여러 라운드의 자극 후에 NR4A1, NR4A2 또는 대조군 비-편집된 T 세포보다 더 높은 빈도의 ROR1 CAR-발현 T 세포를 유지했다(**도 5a**). 결과적으로, 이는 자극 라운드 2-3에서 전체 NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포 수의 증가된 지속성과 상관관계가 있었다(**도 5b**). NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포는 또한 H1975 종양 세포에 대한 두 번째 순차적 자극 후 NR4A1, NR4A2 또는 대조군 비-편집 CAR T 세포보다 LAG3 및

CD39의 발현이 상당히 낮았다(**도 6**).

[0411] T 세포 탈진의 시험관내 순차 자극 모델은 NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포가 5명의 독립적 기증자에서 ROR1-발현 H1975 종양 세포에 대해 향상되고 지속적인 세포독성 및 사이토카인 생산을 나타냄을 보여주었다. 이후 자극 라운드에서 증가된 기능적 활성은 적어도 부분적으로 검정 전반에 걸쳐 NR4A3-편집된 T 세포의 지속성 증가로 인한 것 같다.

[0412] 이들 결과는 두 번째 ROR1$^{+}$ 종양 세포주인 A549를 사용하여 확인되었으며, 여기서 NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포는 이후의 자극에서 지속적인 세포독성 및 사이토카인 생산을 입증했다(데이터는 표시되지 않음). A549-NucLight Red(NLR) 및 H1975-NLR 종양 세포주를 RPMI-1640(Gibco) + 10% 소 태아 혈청(Gibco) + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 2-3 계대 동안 배양한 후 검정을 설정했다. 세포를 TrypLE 발현 효소(Gibco)로 트립신화했다.

[0413] **실시예 4 - 만성 자극에서 지속적인 세포독성 및 사이토카인 생성**

[0414] 세포-고유 기능 능력에 대한 NR4A3 녹아웃의 영향을 보다 직접적으로 측정하기 위해, 탈진에 대응하는 NR4A-편집된 ROR1 CAR T 세포의 능력을 조사하기 위한 7일 만성 자극 검정을 개발했다. 이 검정에서 E:T 비율은 기능 판독에 대한 CAR T 세포 수의 차이의 영향을 제거하기 위해 각 재설정 시점 및 기능 검정 전에 모든 군에 걸쳐 다시 정규화되었다.

[0415] 냉동보존된 NR4A-편집된 또는 대조군 ROR1 CAR T 세포를 해동하고 TCM에서 3일 동안 휴지시킨 후 RPMI-1640(Gibco) + 10% 소 태아 혈청(Gibco) + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 H1975-NLR 종양 세포와 1:1 이펙터-대-표적(E:T) 비율로 배양했다. 생존 CAR T 세포를 회수하고, 회수된 활성-Caspase3$^{-}$CD3$^{+}$EGFR$^{+}$R12$^{+}$ 세포의 수를 유세포측정법으로 정량화하고, 총 7일 동안 2-3일마다 1:1 E:T 비율로 신선한 종양 세포로 다시 플레이팅했다. NR4A-편집된 ROR1 CAR T 세포를 실온(RT)에서 10분 동안 생사 염료로 염색하고, RT에서 5분 동안 트루스테인(TruStain) FcX(Biolegend)로 차단하고, 37℃에서 15분 동안 CCR7로 염색한 다음, RT에서 10분 동안 표면 마커 항체로 염색하였다. NR4A-편집된 ROR1 CAR T 세포를 제조업체의 지침에 따라 BD Cytofix/CytoPerm 키트로 추가로 고정 및 투과화하고 활성-Caspase3으로 염색했다. 모든 염색은 바이오레전드(Biolegend) 세포 염색 완충액에서 수행되었다.

[0416] 기능적 세포독성 및 사이토카인 생산은 만성 자극이 시작된 0일과 만성 자극이 끝나는 7일에 평가되었다. A549-NLR 종양 세포의 경우 1:1 E:T 비율, H1975-NLR 종양 세포의 경우 1:5 E:T 비율로 72시간 동안 평평한 96웰 검정 플레이트(Eppendorf)에서 Incucyte를 사용하여 세포독성을 측정했다. 사이토카인 수준을 측정하기 위해 Incucyte 분석 플레이트를 설정한 후 24시간 후에 상층액을 수집했다.

[0417] 순차 자극 검정과 유사하게, NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포는 NR4A1, NR4A2또는 대조군 비-편집된 CAR T 세포와 비교하여 H1975 종양 세포로부터 7일간의 만성 ROR1 항원 노출 후 더 높은 수준의 IFN-γ, IL-2 및 TNF-α를 생성했다(**도 7**). NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포가 NR4A1, NR4A2 또는 대조군 비-편집된 CAR T 세포와 비교하여 증가된 사이토카인 생산을 유지한 A549 종양 세포를 사용한 7일간의 만성 자극 검정에서도 유사한 결과가 관찰되었다(데이터는 표시되지 않음). H1975 만성 자극 동안 다른 CAR T 세포와 비교하여 NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포 중에서 EGFR$^{+}$R12$^{+}$ CAR-발현 세포의 백분율의 작은 증가가 관찰되었으며(**도 8a**) 총 NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포 수는 7일차에 대부분의 기증자에서 약간 개선되었다(**도 8b**). 더욱이, NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포는 7일간의 만성 ROR1 항원 노출 후에 대조군 비-편집된 ROR1 CAR T 세포보다 더 낮은 억제 마커 발현을 갖는 경향이 있었다(통계적으로 유의하지 않음)(**도 9**).

[0418] **실시예 5 - 항종양 효능**

[0419] 마지막으로, 생체내 H1975 이종이식 모델을 사용하여 시험관내 검정으로부터 NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포의 표현형 및 개선된 기능이 재현되는지 여부를 결정했다.

[0420] 모체 H1975 종양 세포를 RPMI-1640(Gibco) + 10% 소 태아 혈청(Gibco)에서 3회 계대 배양한 후 6-8주령의 NSG HLA 이중-녹아웃 마우스(Jackson Labs)에 이식했다. 세포를 TrypLE 선택 효소로 트립신화하고 HBSS(Gibco)에 재현탁한 다음 마트리겔(Matrigel, Corning)과 1:1 비율로 혼합했다. 5백만 개의 H1975 종양 세포를 각 마우스의 옆구리에 이식했다. 종양 크기가 80-120 $mm^{3}$에 도달하면 T 세포를 무작위 배정된 종양-보유 마우스에 입양 전달했다.

[0421] 종양 부피가 > 2000 $mm^3$, 체중 감소가 > 20% 될 때까지, 또는 T 세포 전달 후 60일에 도달하는 종말점까지 종양 부피, 체중, 궤양 발생, 호흡곤란, 심각하게 제한된 이동성 또는 직립 불능이 매주 2회 측정되었다.

[0422] 입양 전달을 위한 T 세포를 제조하기 위해, 동결보존된 NR4A-편집된 또는 대조군 ROR1 CAR T 세포를 해동하고 종양 보유 마우스로의 입양 전달 전에 RPMI-1640(Gibco) + 25 mM HEPES(Gibco)로 세척했다. 마우스에게 60만(저용량) 또는 200만(고용량) 활성-Caspase3$^-$CD3$^+$EGFR$^+$R12$^+$ T 세포 100 uL를 꼬리 정맥을 통해 i.v. 주사하였다. n = 치료군당 5마리의 마우스.

[0423] 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 대응표본 t-검정(unpaired t-test), 독립표본 t-검정(paired t-test) 및 로그-순위(log-rank) (Mantel-Cox) 테스트를 통계 분석에 사용했다. *p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

[0424] NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포는 ROR1 CAR T 세포의 두 가지 상이한 용량 수준에서 강력하고 개선된 항종양 효능을 나타냈다(**도 10a**). 더욱이, NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포를 입양 전달한 마우스는 다른 T 세포 군에 비해 T 세포 주입 후 60일 생존이 증가했다(**도 10b**).

[0425] NR4A3-편집된 ROR1 CAR T 세포는 강력한 세포독성 및 사이토카인 생산, ROR1 CAR T 세포의 더 나은 유지 및 지속성을 나타냈고, 2개의 시험관내 검정(예를 들어, 순차적 및 만성 자극) 및 생체 내 H1975 이종이식 모델에서 입증된 바와 같이 감소된 탈진 경향이 있는 표현형을 표시했다. 따라서 ROR1-R12 CAR T 세포의 맥락에서 NR4A3을 편집하면 ROR1-발현 고형 종양에 대한 세포 면역치료법을 향상시킬 수 있다.

[0426] **실시예 6 - 순차적 자극에서 지속적인 세포독성 및 사이토카인 생산**

[0427] 감소된 NR4A 수준이 CAR T 세포 기능(특히 만성 항원 자극과 관련하여)에 미치는 영향을 추가로 평가하기 위해, NR4A 계열의 여러 구성원의 수준이 감소된 항-ROR1 CAR T 세포가 실시예 1에 제공된 방법 및 sgRNA를 사용하여 생성되었다. 구체적으로, 다음 NR4A 계열 구성원의 수준이 감소된 항-ROR1 CAR T 세포가 생성되었다: (1) NR4A1 및 NR4A2 둘 모두(NR4A 1+2 이중 녹아웃), (2) NR4A1 및 NR4A3 둘 모두(NR4A 1+3 더블 녹아웃), (3) NR4A2 및 NR4A3 둘 모두(NR4A 2+3 더블 녹아웃), (4) NR4A1, NR4A2 및 NR4A3(NR4A 삼중 녹아웃). 비-NR4A-편집된 항-ROR1 CAR T 세포 및 NR4A1 단독, NR4A2 단독, 및 NR4A3 단독의 수준이 감소된 항-ROR1 CAR T 세포(실시예 1 및 2 참조)도 비교 목적으로 사용되었다. 실시예 3에 기재된 대로 순차적 자극 검정에서 상이한 항-ROR1 CAR T 세포를 항원(A549-NLR 또는 H1975-NLR 세포)으로 자극했다. 세포독성은 검정 동안 Incucyte에서 연속적으로 측정되었으며 사이토카인 수준을 측정하기 위해 각각의 새로운 자극을 설정한 후 24 시간에 상층액을 수집하였다.

[0428] 도 11a 및 도 11b에 도시된 바와 같이, 반복된 항원 자극 후에도 상이한 항-ROR1 NR4A 이중 및 삼중 녹아웃 CAR T 세포는 모의 항-ROR1 CAR T 세포와 비교하여ROR1$^+$ 종양 세포를 효과적으로 용해하는 능력을 유지할 수 있었다. 지속적인 세포 독성 외에도 NR4A 이중 및 삼중 KO 항-ROR1 CAR T 세포는 반복된 항원 자극 후에도 상이한 사이토카인(IFN-ɣ, IL-2 및 TNF-α)을 생산하는 능력을 유지했다. 특히, NR4A3 KO를 함유하는 KO 조합(NR4A1/NR4A3 DKO, NR4A2/NR4A3 DKO 및 TKO)이 가장 큰 영향을 보여 변형된 세포의 향상된 활성에서 NR4A3 KO의 중요성을 확인했다.

[0429] 이들 결과는 특히 만성 항원 자극과 관련하여 면역 세포(예를 들어, CAR T 세포)에서 NR4A 수준을 감소시키는 치료 이점을 추가로 입증한다.

[0430] **실시예 7 - 순차적 자극에서 조작된 TCR T 세포의 지속적인 세포독성 및 사이토카인 생산**

[0431] 단일 NR4A-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포(TCR T 세포가 NR4A1, NR4A2 또는 NR4A3에서 편집됨)의 기능은 TCR T 세포가 순차적으로 항원에 노출되는 시험관내 탈진 검정에서 평가되었다. 검정을 설정하기 전에 A375-NucLight Red(NLR) 종양 세포주를 RPMI-1640(Gibco) + 10% 소 태아 혈청(Gibco) + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 2-3회 계대 배양했다. 세포를 아큐타제(Accutase) 효소(StemCell Technologies)로 트립신화했다.

[0432] 순차적 자극 검정에서, 대조군 및 NR4A-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포에 A375 흑색종 NY-ESO-1/LAGE-1a-발현 종양 세포주를 사용하여 4회 연속 자극을 가했다. 특히, 냉동보존된 NY-ESO-1 TCR T 세포를 해동하고 즉시 RPMI-1640(Gibco) + 10% 소 태아 혈청(Gibco) + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 cParp$^-$CD3$^+$TCRvβ13.1$^+$ TCR T 세포와 A375-NLR 종양 세포의 1:1 E:T 비율로 편평한 96웰 검정 플레이트(Eppendorf)에서 삼중으로 배양했다. 3 또는 4일의 공동-배양 후, 웰을 재현탁시키고, 배양물의 25%를 웰당 동일한 초기 수의 신선한 종양 세포가 있는 새로운 플레이트로 옮겼다. 이는 총 4번의 자극에 대해 반복되었다. 세포 독성은 검정 동안 Incucyte에서 지속

적으로 측정되었으며 사이토카인 수준을 측정하기 위해 각각의 새로운 자극을 설정한 후 24시간 후에 상층액을 수집했다. ROR1-CAR-T 세포 설정과 유사하게, NR4A3 KO NY-ESO-1 TCR T 세포는 A375 종양 세포에 대해 가장 큰 세포독성을 유지하여 3명의 다른 기증자에서 대조군에 비해 2 또는 3 라운드 자극 후 표적 세포를 용해시키는 능력이 더 지속됨을 입증했다(**도 14**).

[0433] 지속적인 세포독성 외에도, NR4A3 KO NY-ESO-1 TCR T 세포는 대부분의 기증자에서 A375 흑색종 NY-ESO-1/LAGE-1a-발현 종양 세포로 자극했을 때 대부분의 시점에서 측정되었을 때 또한 비-편집 대조군 NY-ESO-1 TCR T 세포와 비교하여 더 높은 IFN-γ, IL-2 및 TNF-α를 생산했다(**도 15 및 표 3-5**). 두 번째 NY-ESO-1/LAGE-1a-발현 종양 세포주 H1703을 사용하여 T 세포를 연속적으로 자극한 경우 유사한 결과가 관찰되었다(데이터는 표시되지 않음). 사이토카인 수준은 제조업체의 지침에 따라 메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery) V-Plex 친염증성 패널 1 인간 키트 또는 맞춤형 인간 IFN-γ, IL-2 및 TNF-α 사이토카인 키트를 사용하여 측정되었다. 사이토카인 생산의 차이는 이후 자극 라운드에서 가장 두드러졌다.

[0434] **표 3.** 도 15에 상응하는 A375 순차 자극 검정 동안 NR4A-편집된 및 대조군 비-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포로부터 생성된 분비된 인터페론-감마(IFN-γ)의 독립표본 t-검정(Unpaired t-test) 통계 분석. ns - 중요하지 않음, *p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

| **D33018 IFN-γ Stim 1** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
|---|---|---|---|---|---|
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ns | ns | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D33018 IFN-γ Stim 2** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ** | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ns | ns | X | X |
| 모의 | **** | **** | *** | ** | X |
| **D33018 IFN-γ** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |

[0435]

| **Stim 3** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | * | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ns | ns | X | X |
| 모의 | *** | **** | *** | ** | X |
| **D33018 IFN-γ Stim 4** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | * | X | X | X |
| 대조군 TCR | * | ns | ns | X | X |
| 모의 | **** | **** | ** | ** | X |
| **D35108 IFN-γ Stim 1** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ** | X | X | X |
| 대조군 TCR | ** | ns | ** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D35108 IFN-γ Stim 2** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | *** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | **** | X | X | X |
| 대조군 TCR | *** | ns | *** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D35108 IFN-γ Stim 3** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |

[0436]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NR4A3 KO | ns | *** | X | X | X |
| 대조군 TCR | ** | ** | **** | X | X |
| 모의 | *** | **** | **** | **** | X |
| **D35108 IFN-γ Stim 4** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | *** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | *** | X | X | X |
| 대조군 TCR | *** | * | *** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D37244 IFN-γ Stim 1** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | * | X | X | X |
| 대조군 TCR | ** | ** | * | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D37244 IFN-γ Stim 2** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | * | X | X | X |
| 대조군 TCR | *** | *** | **** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D37244 IFN-γ Stim 3** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | * | *** | *** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D37244 IFN-γ Stim 4** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |

[0437]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | ** | *** | ** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |

[0438]

[0439] **표 4.** 도 15에 상응하는 A375 순차 자극 검정 동안 NR4A-편집된 및 대조군 비-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포로부터 생성된 분비된 인터류킨-2(IL-2)의 독립표본 t-검정 (Unpaired t-test) 통계 분석. ns - 중요하지 않음, *p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

[0440]

| **D33018 IL-2 Stim 1** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
|---|---|---|---|---|---|
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | * | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | * | X | X | X |
| 대조군 TCR | * | ns | * | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D33018 IL-2 Stim 2** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | ** | ns | ns | X | X |
| 모의 | *** | *** | ** | ** | X |
| **D33018 IL-2 Stim 3** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ns | * | X | X |

| 모의 | ns | ns | * | ns | X |
|---|---|---|---|---|---|
| **D33018 IL-2 Stim 4** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | * | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | * | ns | X | X |
| 모의 | ns | * | ns | ns | X |
| **D35108 IL-2 Stim 1** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | * | ns | ns | X | X |
| 모의 | *** | **** | **** | **** | X |
| **D35108 IL-2 Stim 2** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | ** | X | X | X |
| 대조군 TCR | ** | ** | *** | X | X |
| 모의 | *** | **** | **** | **** | X |
| **D35108 IL-2 Stim 3** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | **** | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ** | **** | X | X |
| 모의 | ns | ** | **** | ns | X |
| **D35108 IL-2 Stim 4** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |

[0441]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | ** | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | * | ** | X | X |
| 모의 | * | ** | ** | * | X |
| **D37244 IL-2 Stim 1** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ** | ** | X | X |
| 모의 | ** | **** | **** | **** | X |
| **D37244 IL-2 Stim 2** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | * | * | ns | X | X |
| 모의 | *** | *** | ** | *** | X |
| **D37244 IL-2 Stim 3** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | * | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | * | *** | *** | X | X |
| 모의 | * | ** | ** | ** | X |
| **D37244 IL-2 Stim 4** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | ** | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ** | ** | X | X |
| 모의 | ns | ** | *** | ns | X |

[0442]

[0443] **표 5.** 도 15에 상응하는 A375 순차 자극 검정 동안 NR4A-편집된 및 대조군 비-편집된 NY-ESO-1 TCR T 세포로부터 생성된 분비된 종양 괴사 인자 알파(TNF-α)의 독립표본 t-검정(Unpaired t-test) 통계 분석. ns - 중요하지 않음, *p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

| **D33018 TNF-α Stim 1** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
|---|---|---|---|---|---|
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ns | ** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D33018 TNF-α Stim 2** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ** | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ns | ** | X | X |
| 모의 | *** | *** | *** | ** | X |
| **D33018 TNF-α Stim 3** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | * | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ns | * | X | X |
| 모의 | ** | *** | ** | ** | X |
| **D33018 TNF-α Stim 4** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |

[0444]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ns | ns | X | X |
| 모의 | *** | ** | * | ** | X |
| **D35108 TNF-α Stim 1** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | * | X | X | X |
| 대조군 TCR | ns | ** | *** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D35108 TNF-α Stim 2** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | **** | X | X | X |
| 대조군 TCR | *** | *** | **** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D35108 TNF-α Stim 3** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | *** | ** | *** | X | X |
| 모의 | **** | *** | **** | *** | X |
| **D35108 TNF-α Stim 4** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ns | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ns | ns | X | X | X |

[0445]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 대조군 TCR | * | ns | * | X | X |
| 모의 | * | * | * | * | X |
| **D37244 TNF-α Stim 1** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | * | X | X | X |
| 대조군 TCR | * | *** | *** | X | X |
| 모의 | *** | **** | **** | **** | X |
| **D37244 TNF-α Stim 2** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | * | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | *** | ** | ** | X | X |
| 모의 | **** | **** | **** | **** | X |
| **D37244 TNF-α Stim 3** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | ** | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | * | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | ** | *** | ** | X | X |
| 모의 | **** | *** | ** | *** | X |
| **D37244 TNF-α Stim 4** | NR4A1 KO | NR4A2 KO | NR4A3 KO | 대조군 TCR | 모의 |
| NR4A1 KO | X | X | X | X | X |
| NR4A2 KO | * | X | X | X | X |
| NR4A3 KO | ** | ns | X | X | X |
| 대조군 TCR | * | ** | ** | X | X |
| 모의 | ** | ** | *** | * | X |

[0446]

[0447] 요약 및 초록 부분이 아닌 상세한 설명 부분이 청구범위를 해석하는데 사용되도록 의도된 것임을 이해해야 한다. 요약 및 초록 섹션은 본 발명자(들)가 고려한 본 개시의 하나 이상의 예시적인 측면을 설명할 수 있지만, 모든 예시적인 측면은 아니며, 따라서 어떤 방식으로든 본 개시내용 및 첨부된 청구범위를 제한하려는 의도는 없다.

[0448] 본 개시내용은 지정된 기능 및 그 관계의 구현을 설명하는 기능적 구성 블록의 도움으로 위에서 설명되었다. 이러한 기능적 구성 블록의 경계는 설명의 편의를 위해 본원에서 임의로 정의되었다. 지정된 기능과 그 관계가 적절하게 수행되는 한 대체 경계를 정의할 수 있다.

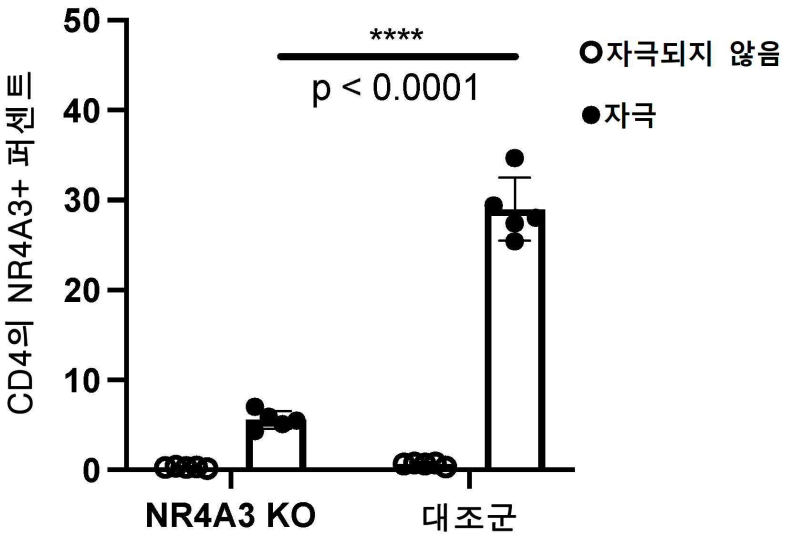
[0449] 특정 측면에 대한 전술한 설명은 다른 사람들이 해당 기술 분야의 지식을 적용함으로써 과도한 실험 없이, 본 개시의 일반적인 개념에서 벗어나지 않고 이러한 특정 측면을 다양한 응용 분야에 대해 쉽게 수정 및/또는 적응할 수 있도록 개시 내용의 일반적인 성격을 완전히 드러낼 것이다. 따라서, 그러한 수정 및 변형은 여기에 제시된 교시 및 지침에 기초하여 개시된 측면의 등가물의 의미 및 범위 내에 있도록 의도된다. 본원의 어법 또는 용어는 설명을 위한 것이지 제한을 위한 것이 아니므로, 본원의 용어 또는 어법은 교시 및 안내에 비추어 당업자에 의해 해석되어야 한다는 것이 이해되어야 한다.

[0450] 본 개시내용의 폭과 범위는 위에 설명된 예시적인 측면 중 임의의 것에 의해 제한되어서는 안 되며, 다음의 청구범위 및 그 등가물에 따라서만 정의되어야 한다.

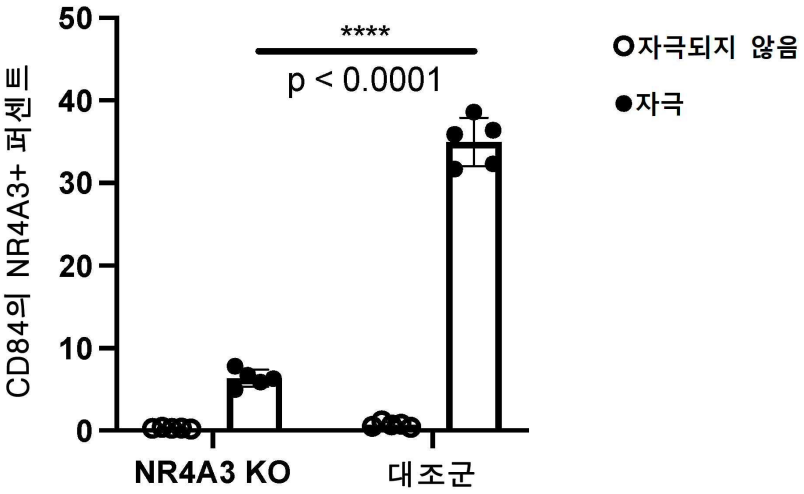
[0451] 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 인용 참고문헌(문헌 참고문헌, 미국 또는 외국 특허 또는 특허 출원 및 웹사이트 포함)의 내용은 마치 그 전체가 어떤 목적으로든 거기에 인용된 참고문헌에 기록된 것처럼 명시적으로 참고문헌으로 포함된다. 불일치가 발생하는 경우 문자 그대로 본원에 공개된 자료가 통제한다.

## 도면

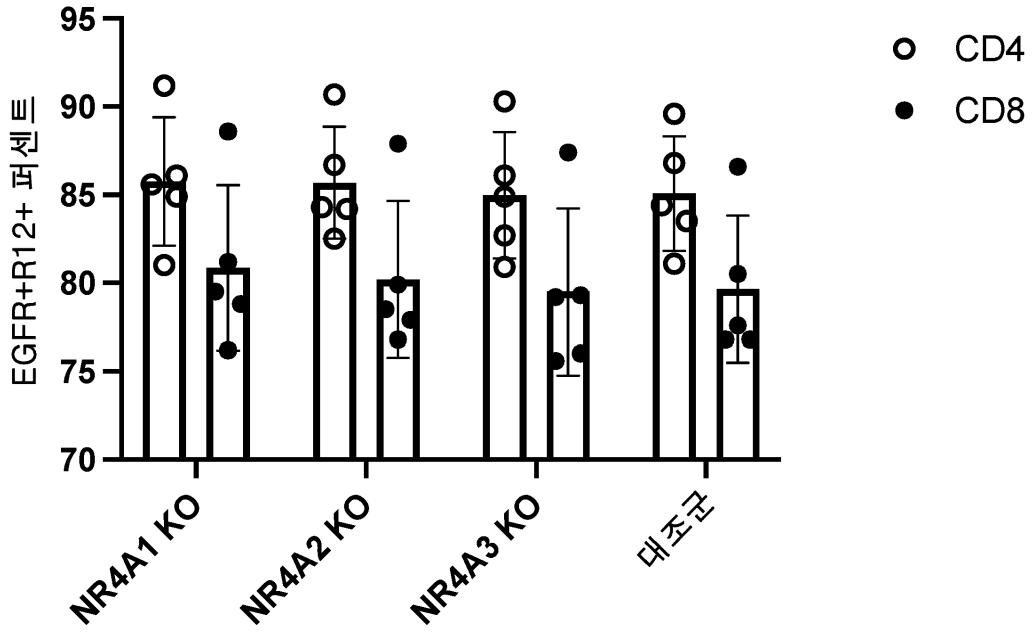
### 도면1a



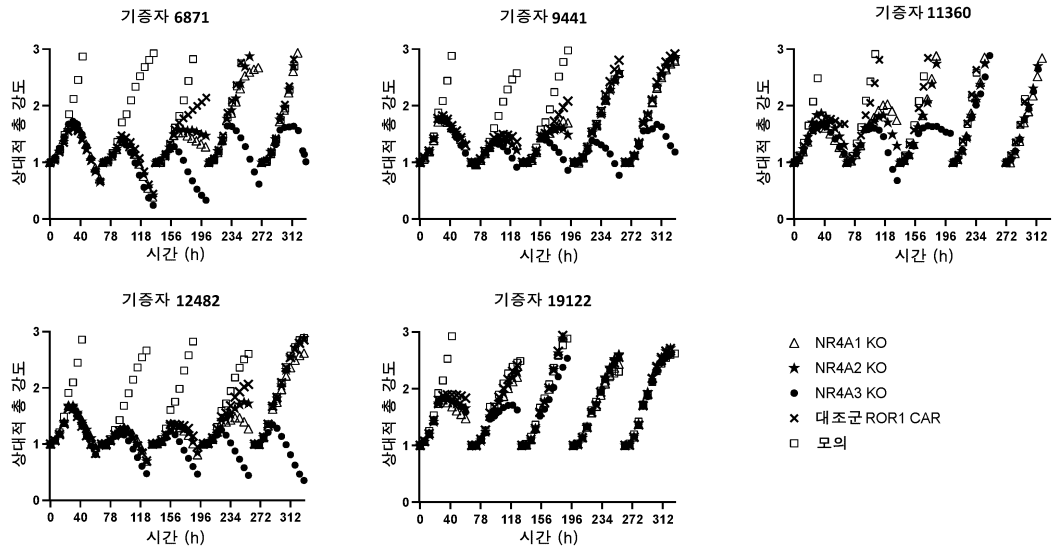

### 도면1b



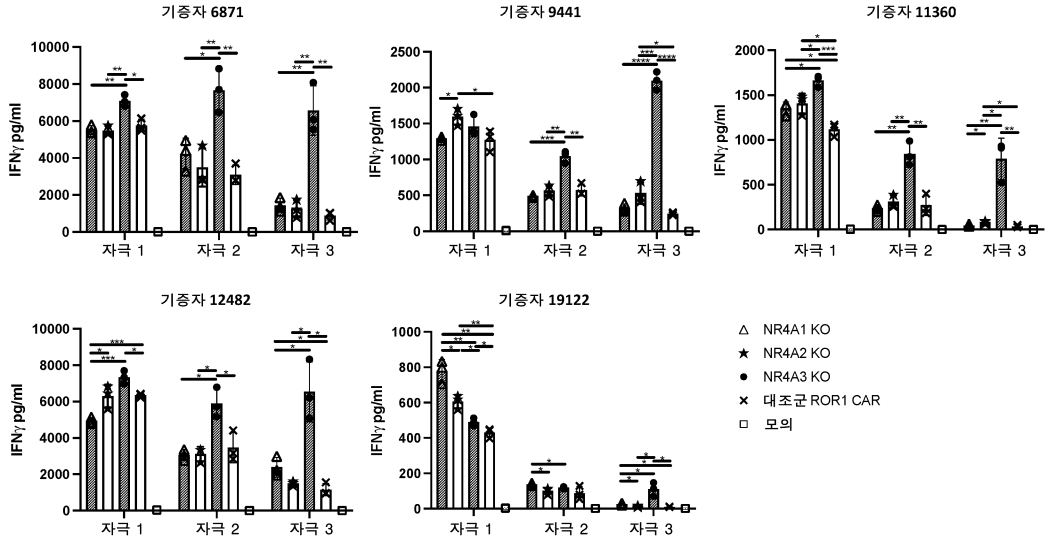
도면2


95
90
85
80
75
70
EGFR+R12+ 퍼센트
CD4
CD8
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군

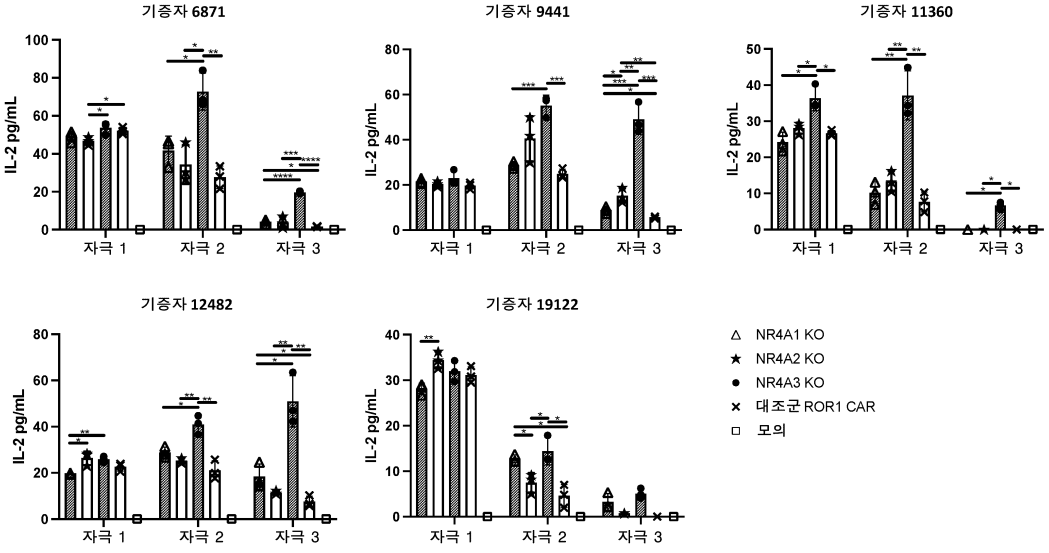
도면3


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
기증자 12482
기증자 19122
상대적 총 강도
시간 (h)
0 40 78 118 156 196 234 272 312
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR
모의

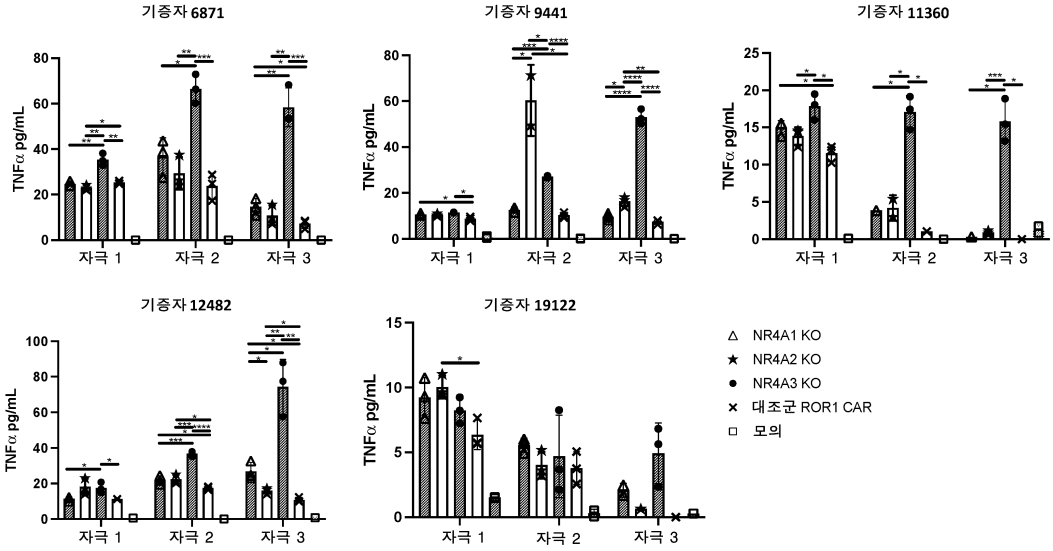
도면4a


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
기증자 12482
기증자 19122
IFNγ pg/ml
자극 1
자극 2
자극 3
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR
모의

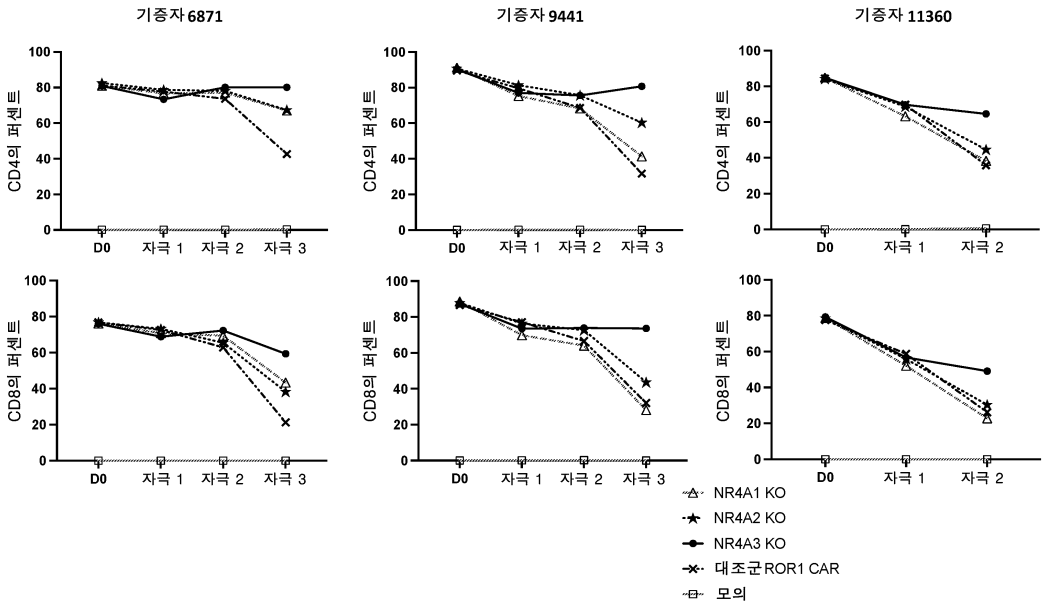
도면4b


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
기증자 12482
기증자 19122
IL-2 pg/mL
자극 1
자극 2
자극 3
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR
모의

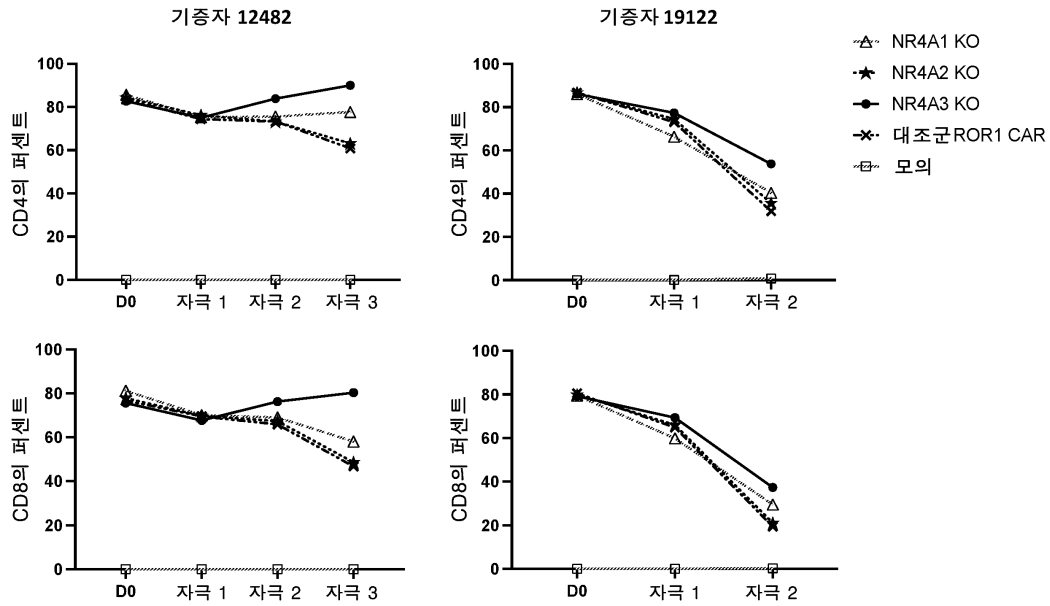
도면4c


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
기증자 12482
기증자 19122
TNFα pg/mL
자극 1
자극 2
자극 3
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR
모의

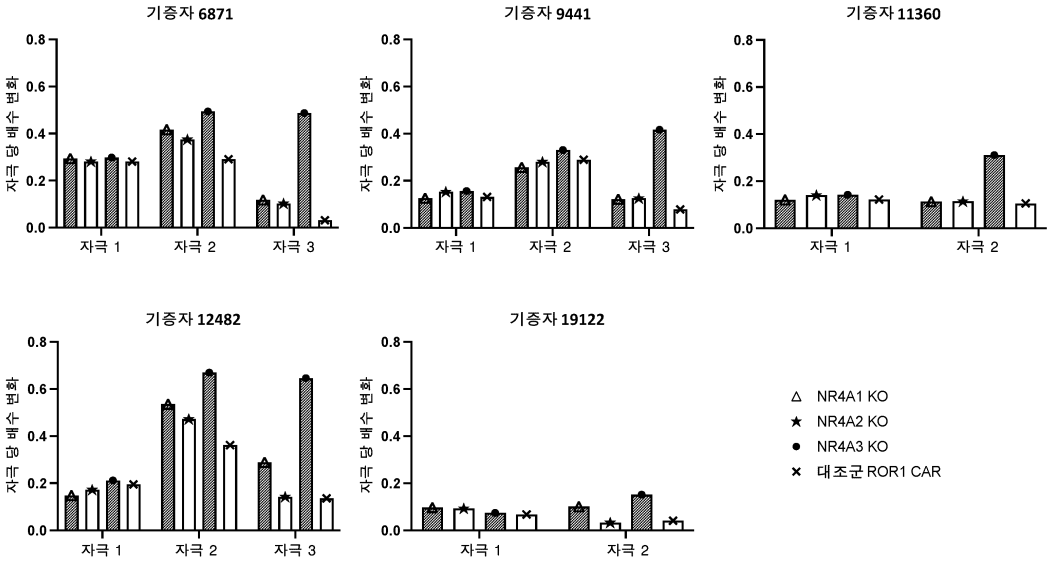
도면5aa


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
CD4의 퍼센트
CD8의 퍼센트
D0
자극 1
자극 2
자극 3
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR
모의

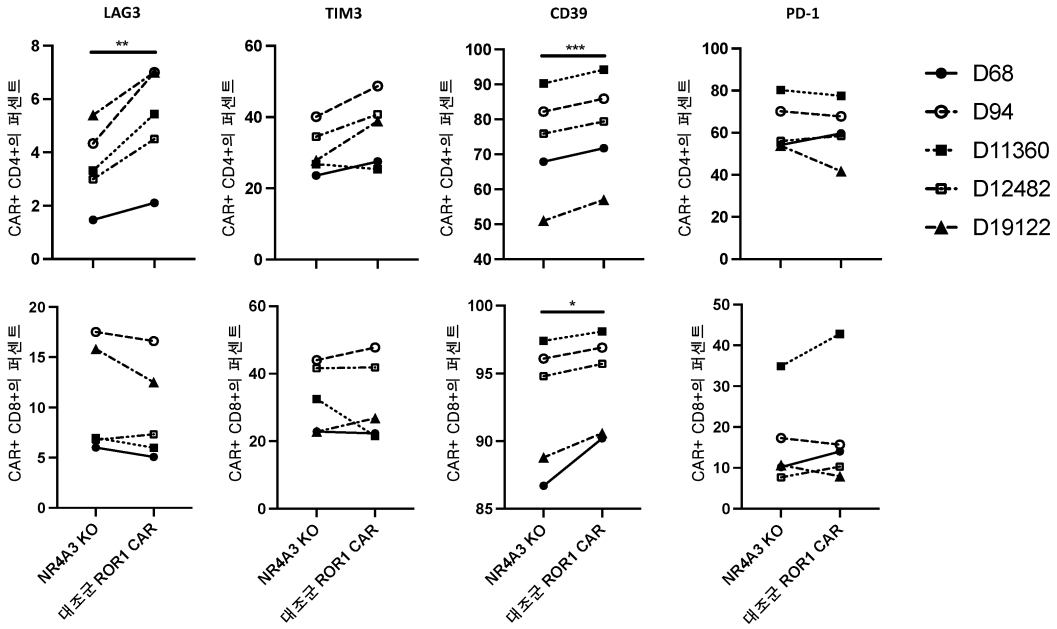
도면5ab


기증자 12482
기증자 19122
CD4의 퍼센트
CD8의 퍼센트
D0
자극 1
자극 2
자극 3
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군ROR1 CAR
모의

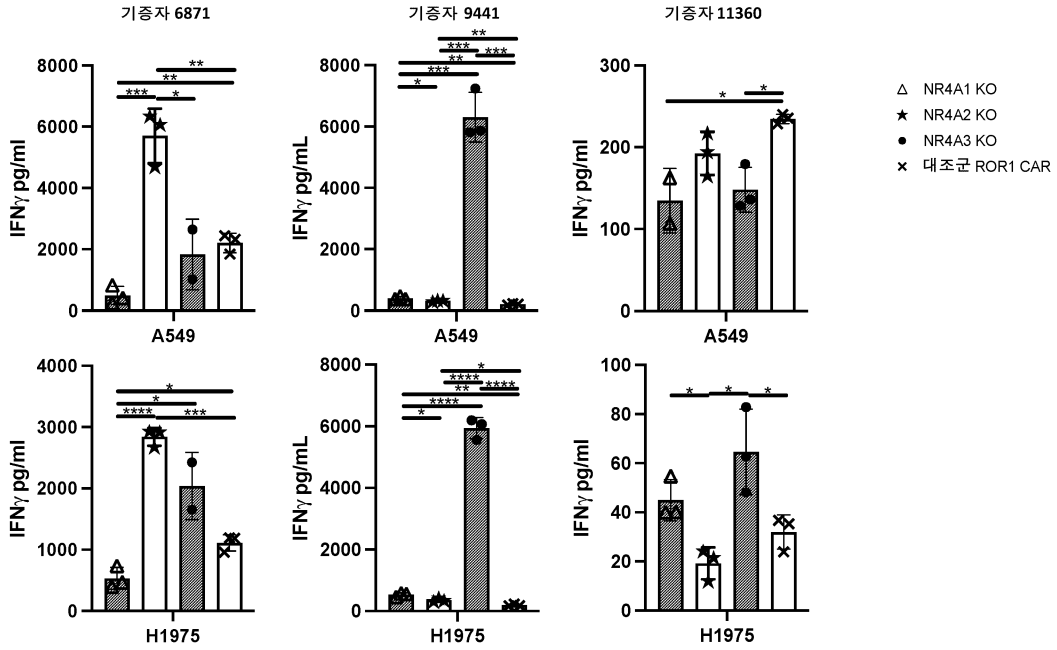
도면5b


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
기증자 12482
기증자 19122
자극 당 배수 변화
자극 1
자극 2
자극 3
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR

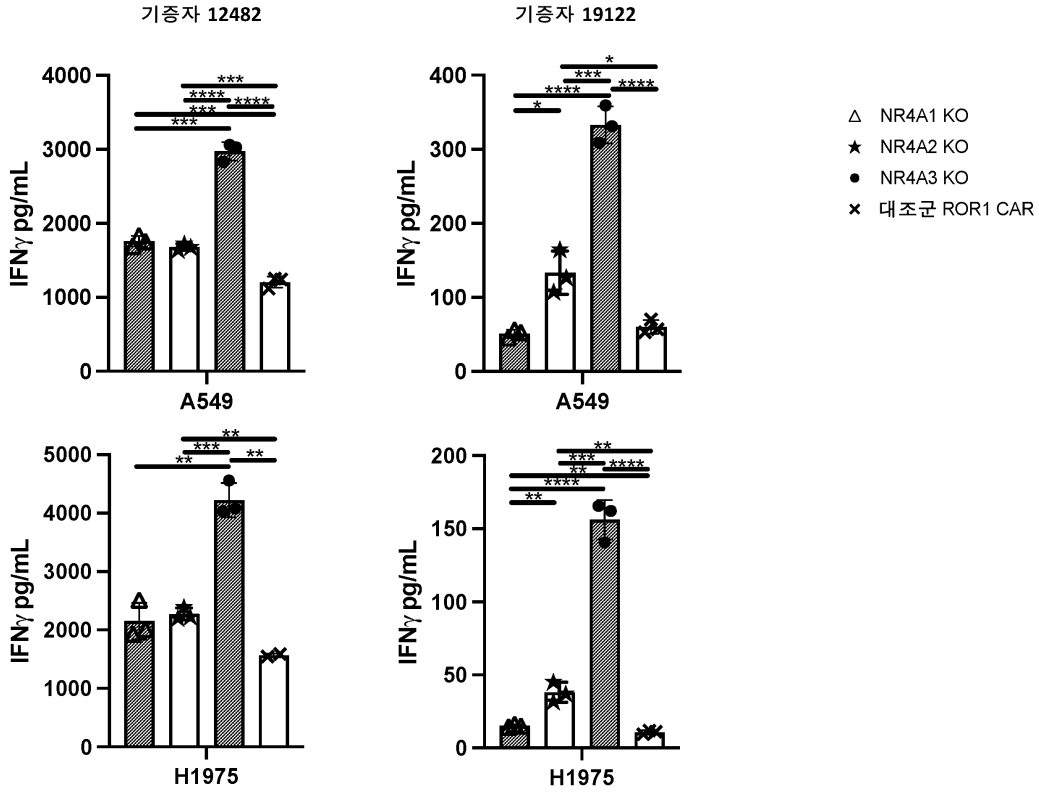
도면6


LAG3
TIM3
CD39
PD-1
CAR+ CD4+의 퍼센트
CAR+ CD8+의 퍼센트
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR
D68
D94
D11360
D12482
D19122

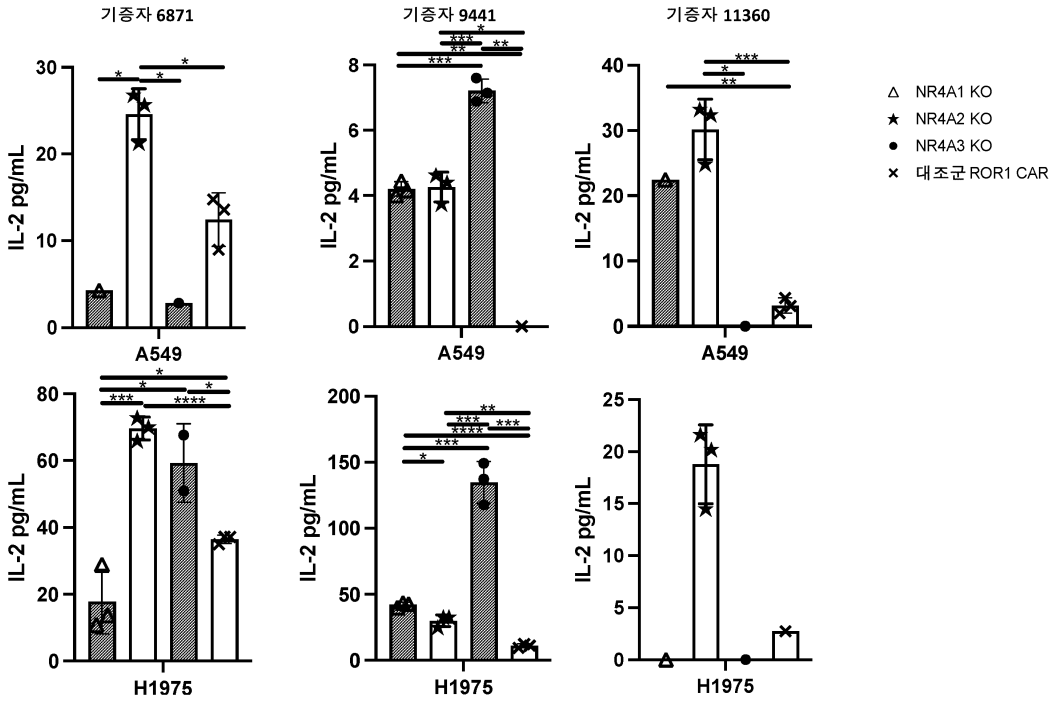
도면7aa


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
IFNγ pg/ml
A549
H1975
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR

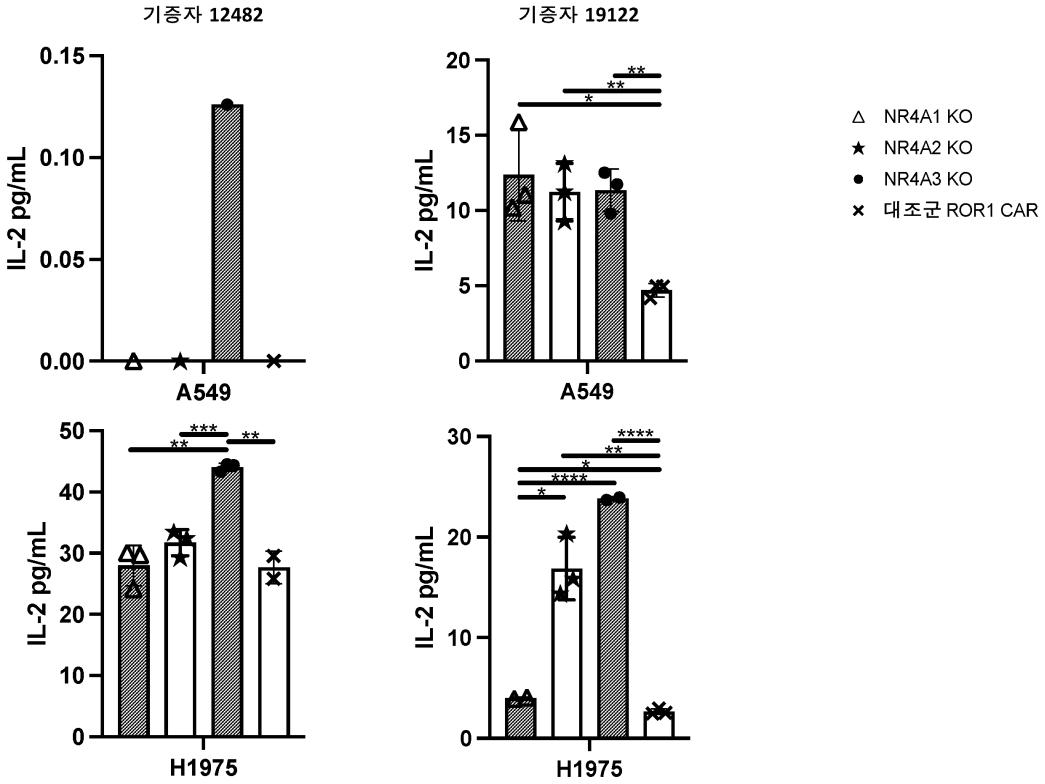
도면7ab


기증자 12482
기증자 19122
IFNγ pg/mL
A549
H1975
△ NR4A1 KO
★ NR4A2 KO
● NR4A3 KO
× 대조군 ROR1 CAR

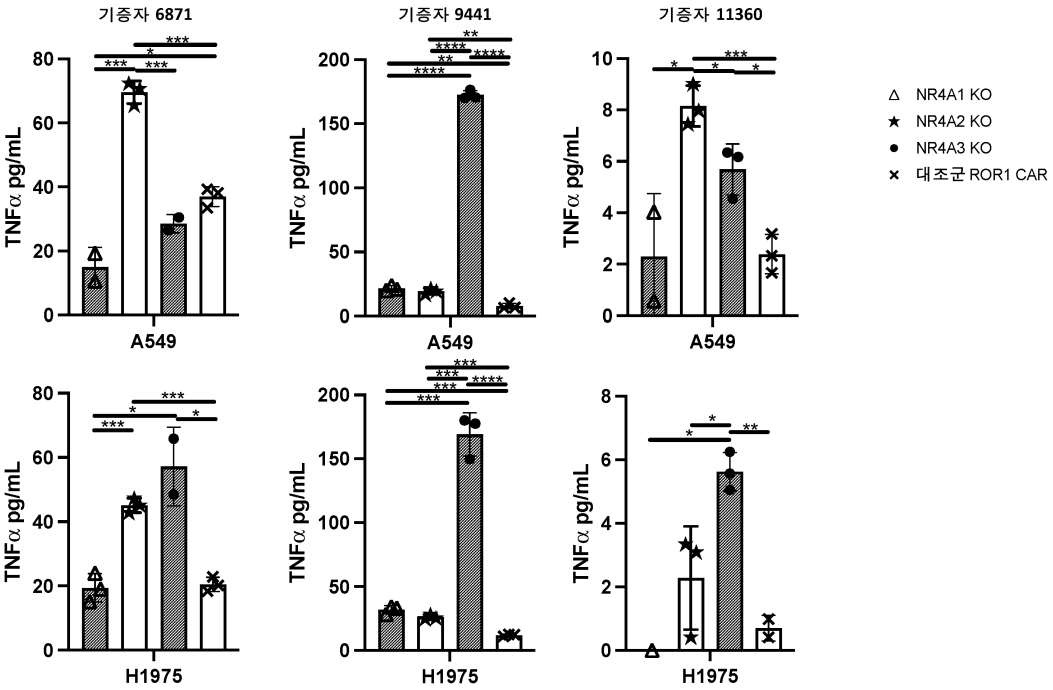
도면7ba


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
IL-2 pg/mL
A549
H1975
△ NR4A1 KO
★ NR4A2 KO
● NR4A3 KO
× 대조군 ROR1 CAR

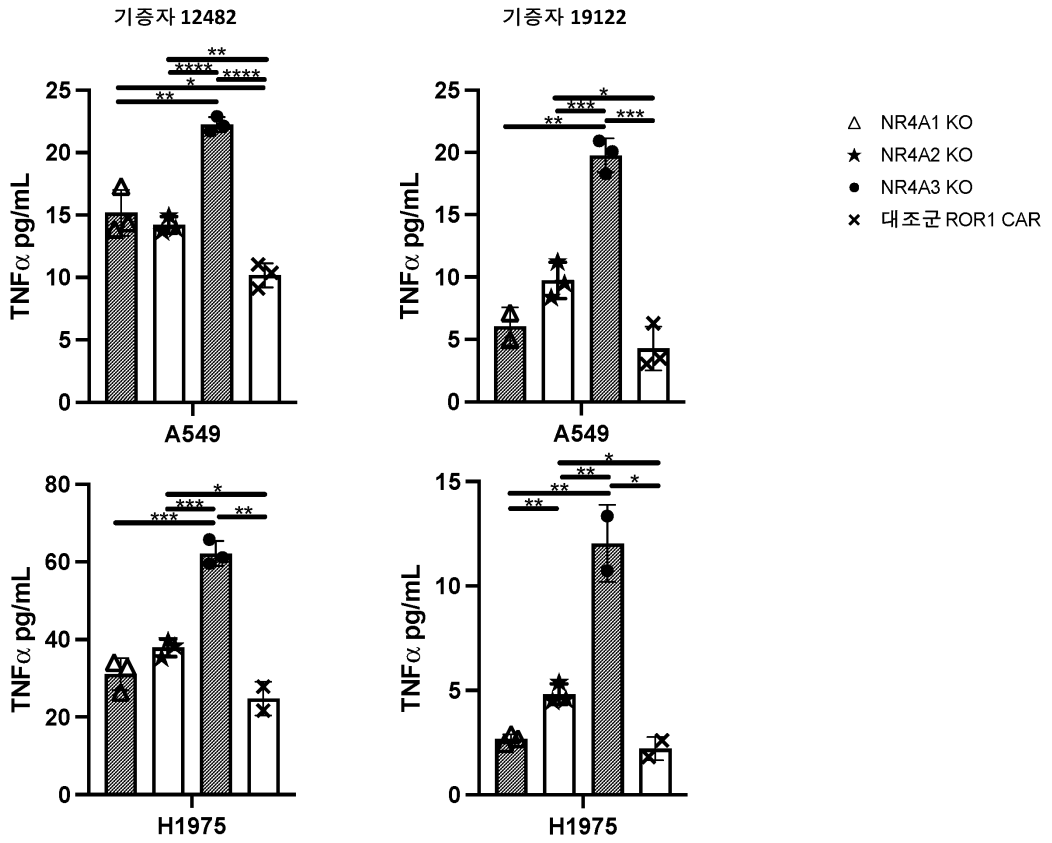
도면7bb


기증자 12482
기증자 19122
IL-2 pg/mL
A549
H1975
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR

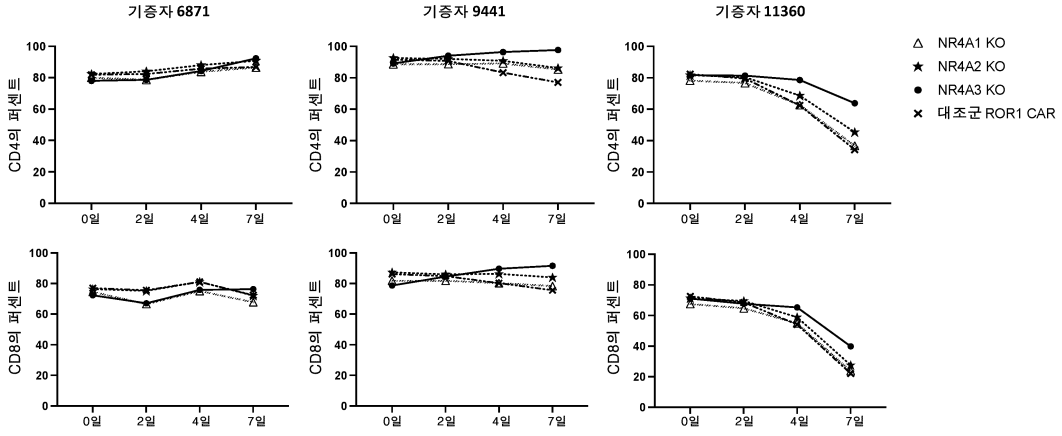
도면7ca


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
TNFα pg/mL
A549
H1975
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR

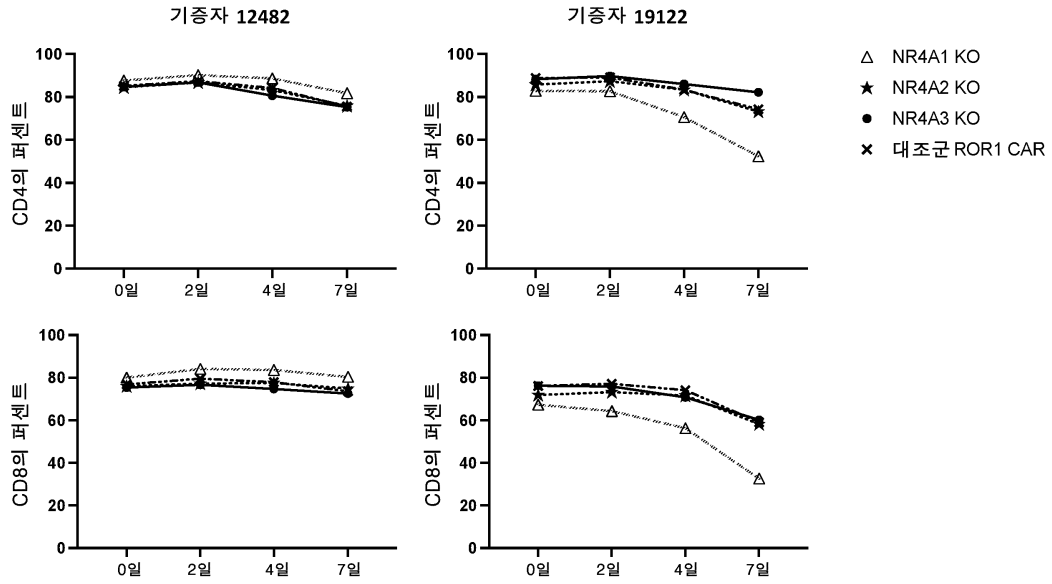
도면7cb


기증자 12482
기증자 19122
TNFα pg/mL
A549
H1975
△ NR4A1 KO
★ NR4A2 KO
● NR4A3 KO
× 대조군 ROR1 CAR

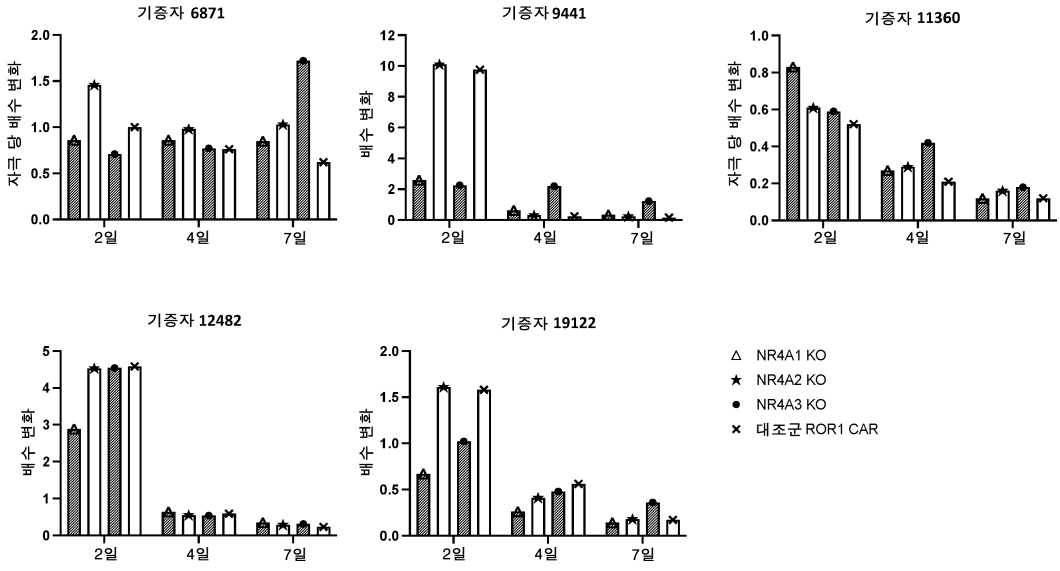
도면8aa


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
CD4의 퍼센트
CD8의 퍼센트
0일
2일
4일
7일
△ NR4A1 KO
★ NR4A2 KO
● NR4A3 KO
× 대조군 ROR1 CAR

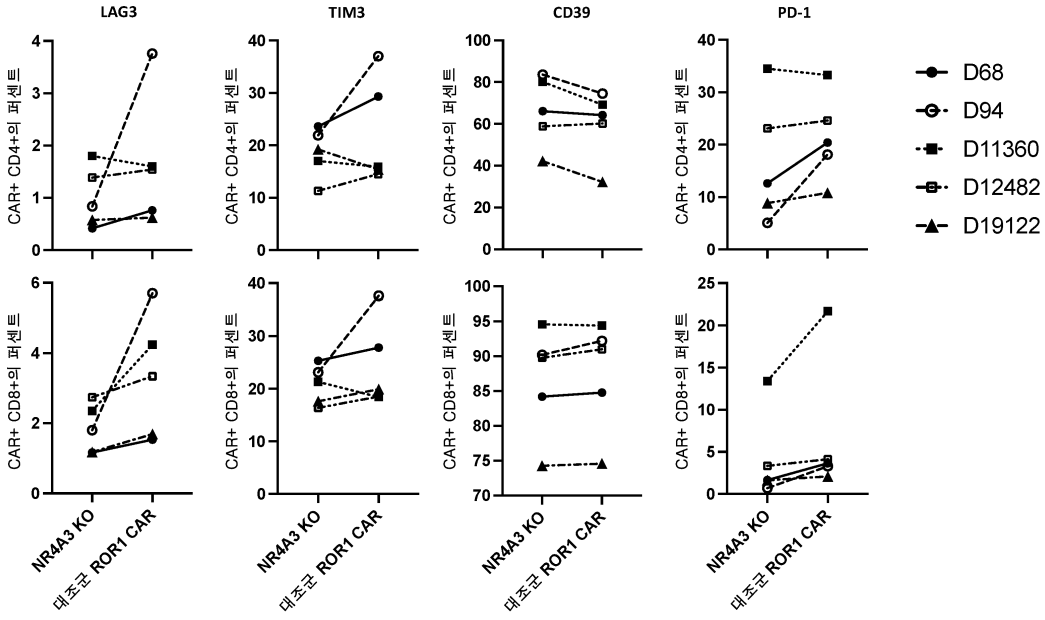
도면8ab


기증자 12482
기증자 19122
CD4의 퍼센트
CD8의 퍼센트
0일
2일
4일
7일
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR

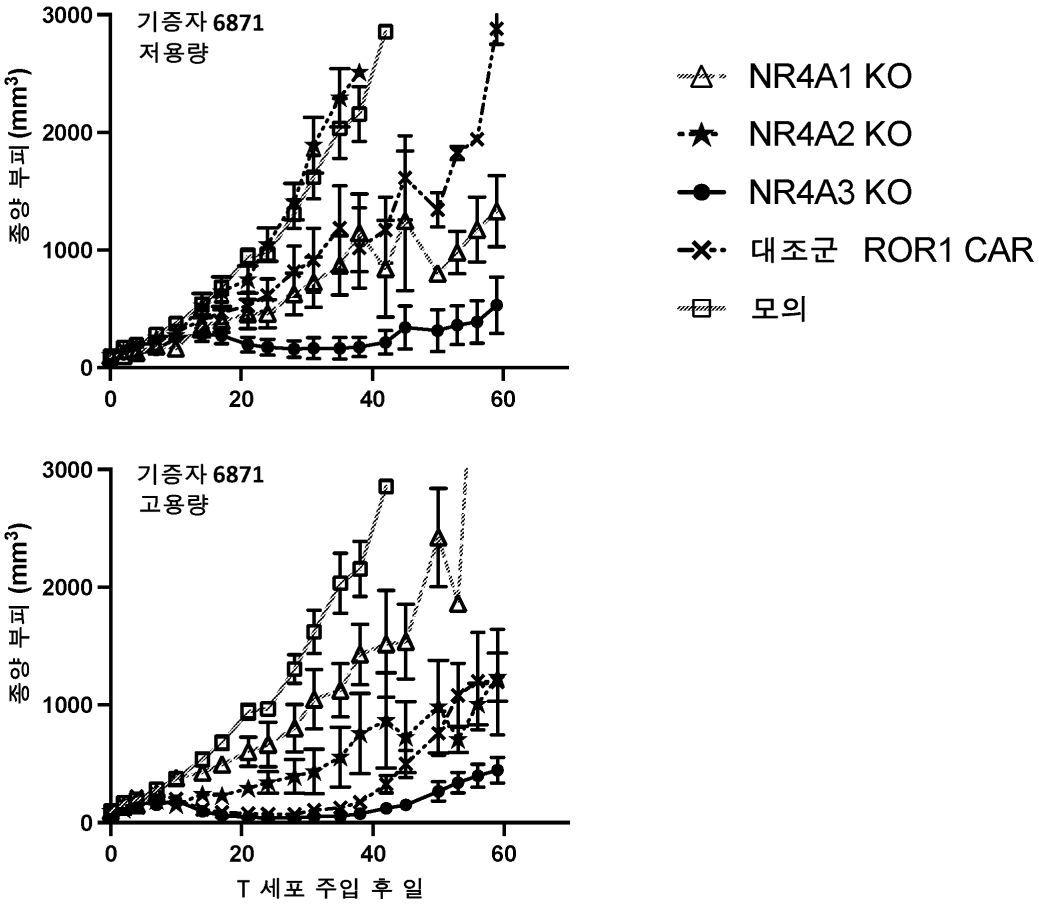
도면8b


기증자 6871
기증자 9441
기증자 11360
기증자 12482
기증자 19122
자극 당 배수 변화
배수 변화
2일
4일
7일
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR

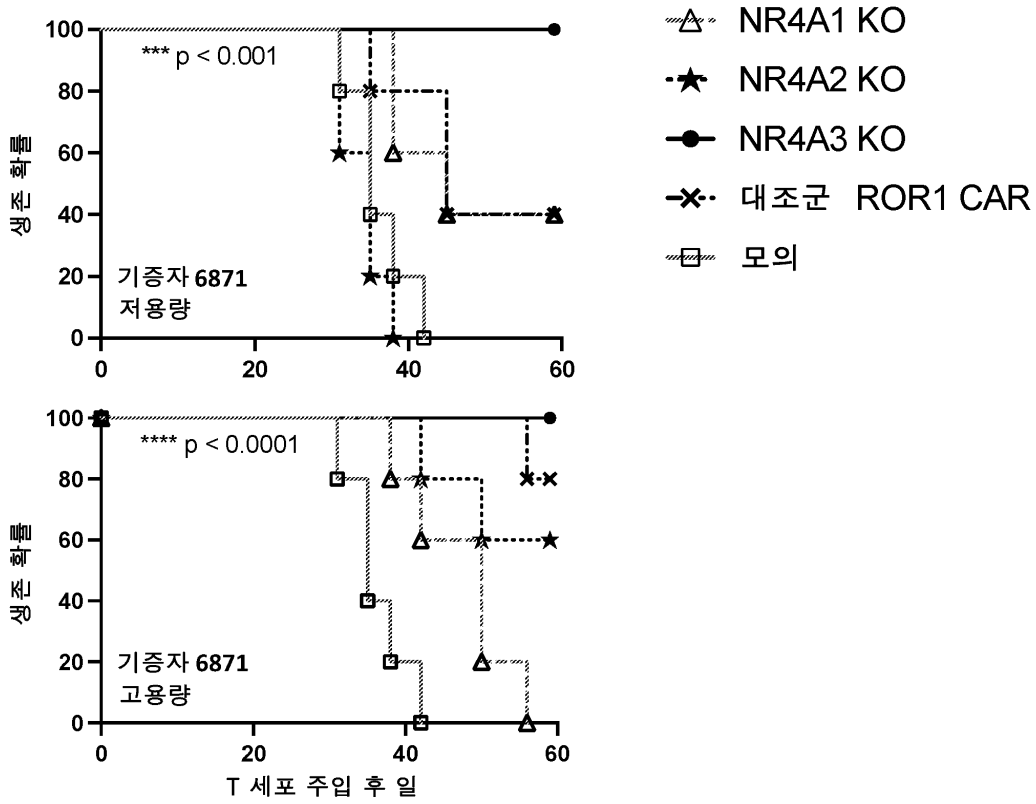
도면9


LAG3
TIM3
CD39
PD-1
CAR+ CD4+의 퍼센트
CAR+ CD8+의 퍼센트
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR
D68
D94
D11360
D12482
D19122

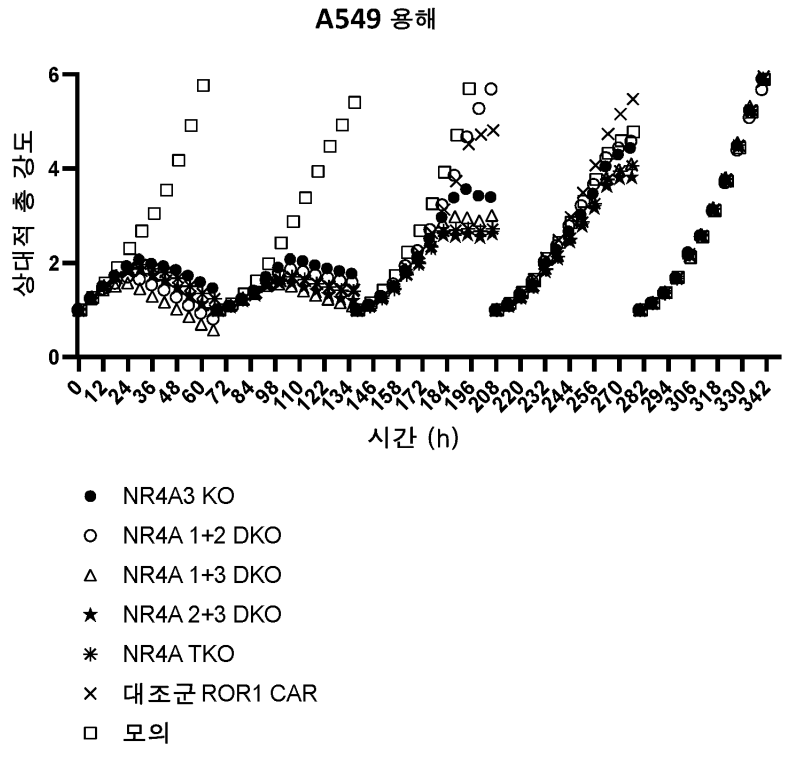
도면10a


기증자 6871
저용량
기증자 6871
고용량
종양 부피 (mm3)
T 세포 주입 후 일
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR
모의

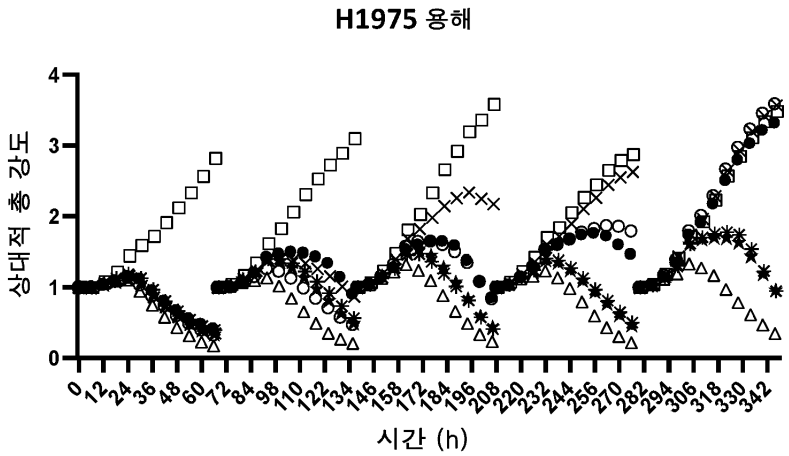
도면10b


*** p < 0.001
기증자 6871
저용량
**** p < 0.0001
기증자 6871
고용량
생존 확률
T 세포 주입 후 일
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 ROR1 CAR
모의

도면11a

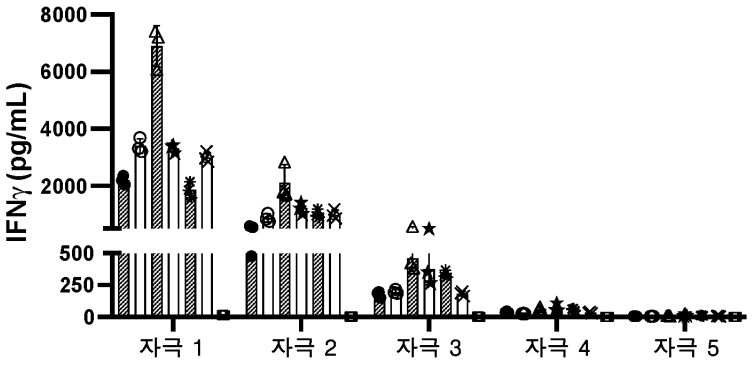

A549 용해
상대적 총 강도
시간 (h)
NR4A3 KO
NR4A 1+2 DKO
NR4A 1+3 DKO
NR4A 2+3 DKO
NR4A TKO
대조군 ROR1 CAR
모의

도면11b



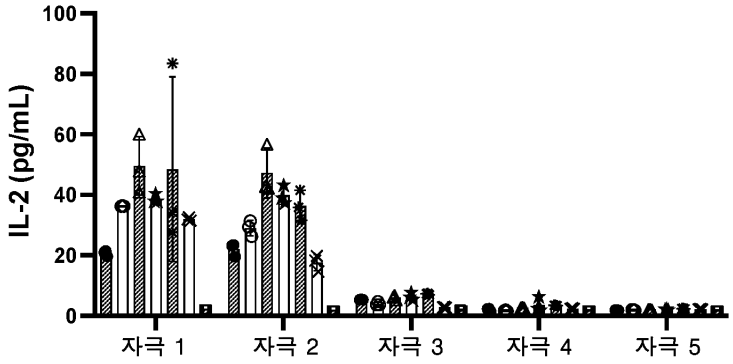

- NR4A3 KO
- NR4A 1+2 DKO
- NR4A 1+3 DKO
- NR4A 2+3 DKO
- NR4A TKO
- 대조군 ROR1 CAR
- 모의

도면12a



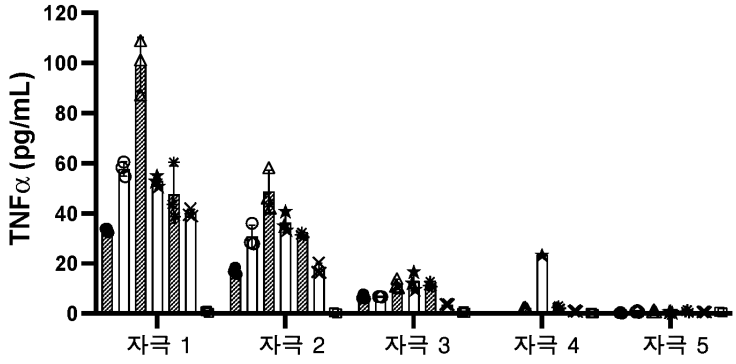

- NR4A3 KO
- NR4A 1+2 DKO
- NR4A 1+3 DKO
- NR4A 2+3 DKO
- TKO
- 대조군 ROR1 CAR
- 모의

도면12b



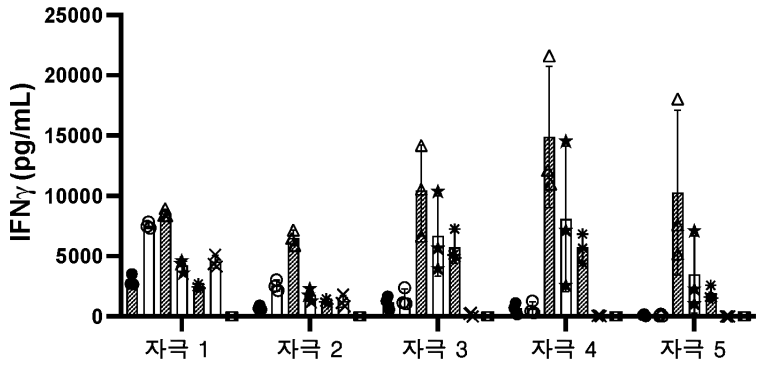

- ● NR4A3 KO
- ○ NR4A 1+2 DKO
- △ NR4A 1+3 DKO
- ★ NR4A 2+3 DKO
- ✳ TKO
- × 대조군 ROR1 CAR
- ▫ 모의

도면12c



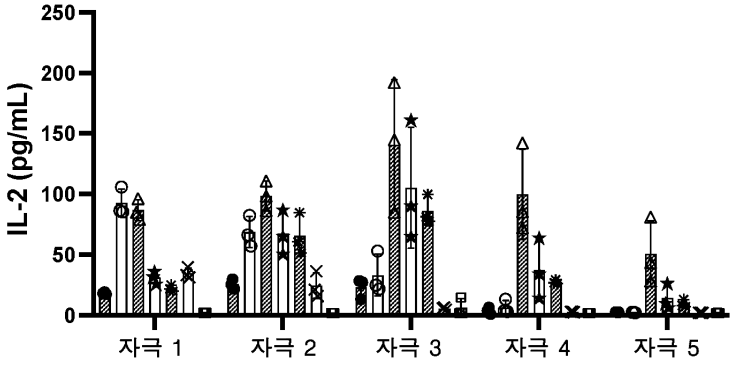

- ● NR4A3 KO
- ○ NR4A 1+2 DKO
- △ NR4A 1+3 DKO
- ★ NR4A 2+3 DKO
- ✳ TKO
- × 대조군 ROR1 CAR
- ▫ 모의

도면13a



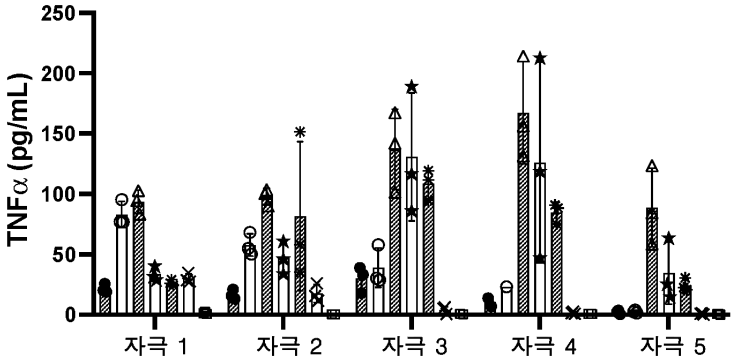

- ● NR4A3 KO
- ○ NR4A 1+2 DKO
- △ NR4A 1+3 DKO
- ★ NR4A 2+3 DKO
- ✳ TKO
- × 대조군 ROR1 CAR
- ▫ 모의

도면13b



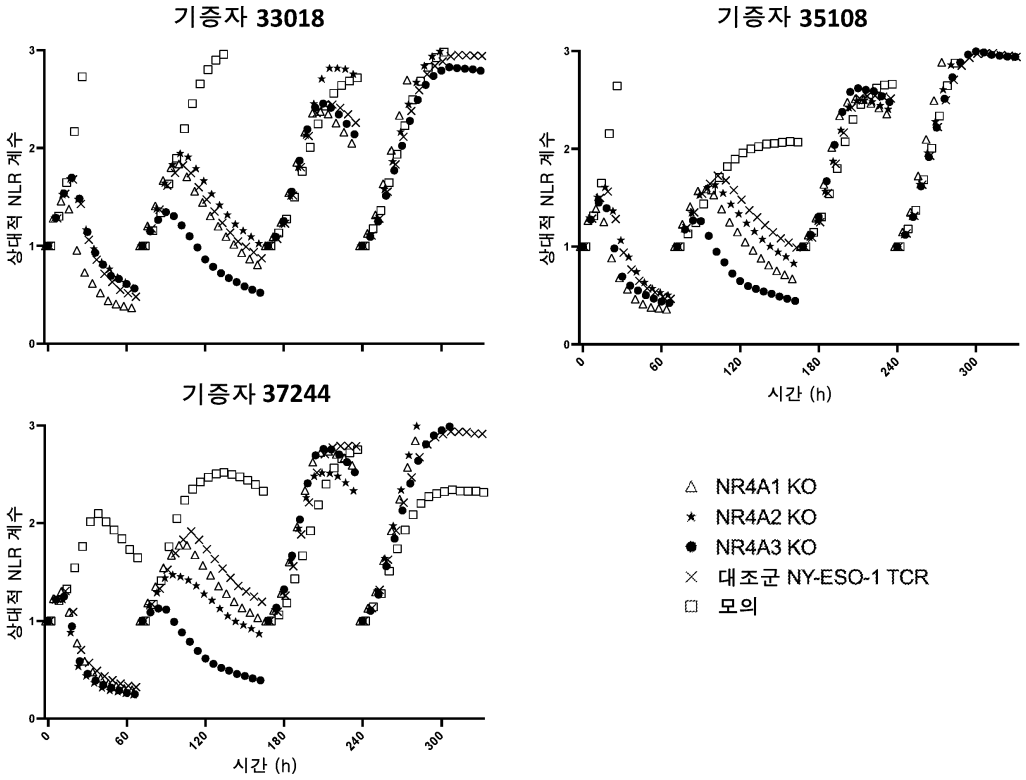

- ● NR4A3 KO
- ○ NR4A 1+2 DKO
- △ NR4A 1+3 DKO
- ★ NR4A 2+3 DKO
- ✳ TKO
- × 대조군 ROR1 CAR
- ▫ 모의

도면13c

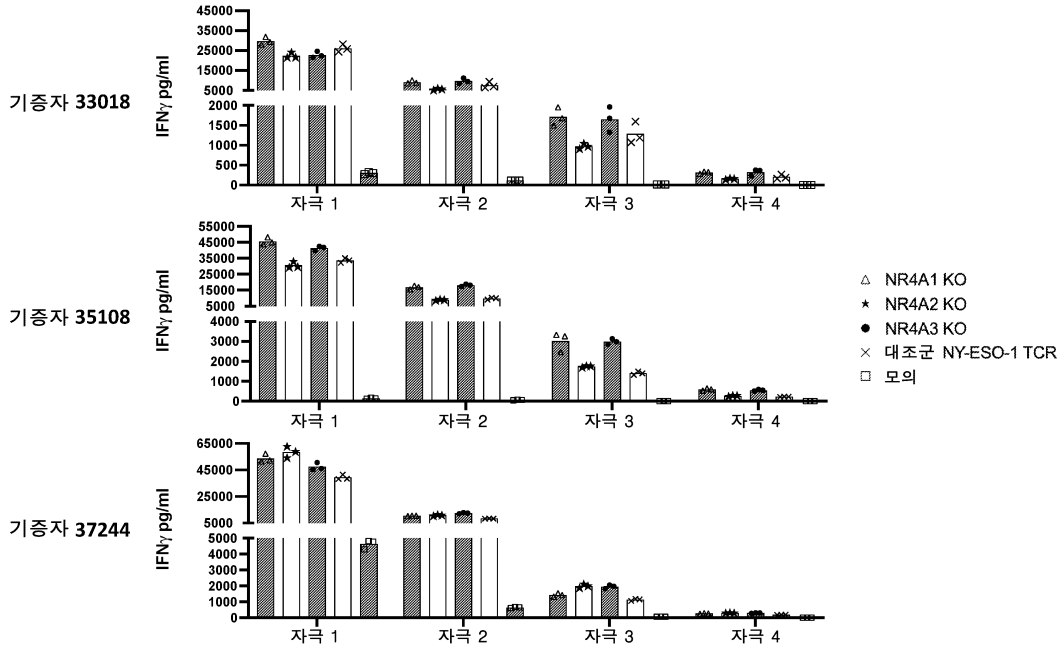



● NR4A3 KO
○ NR4A 1+2 DKO
△ NR4A 1+3 DKO
★ NR4A 2+3 DKO
✳ TKO
× 대조군 ROR1 CAR
▫ 모의

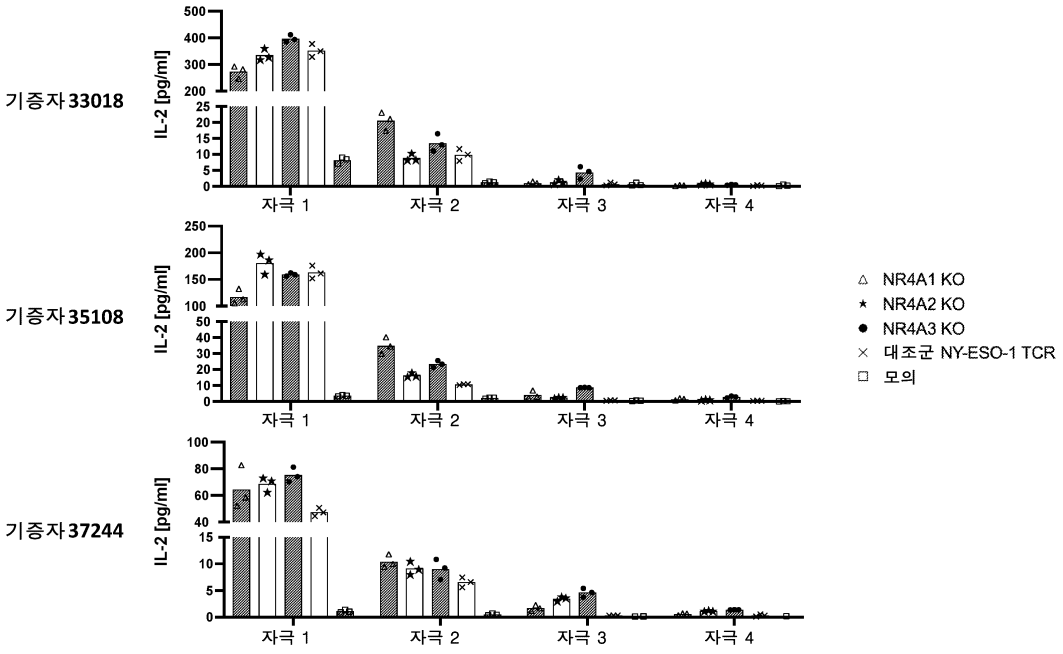
도면14



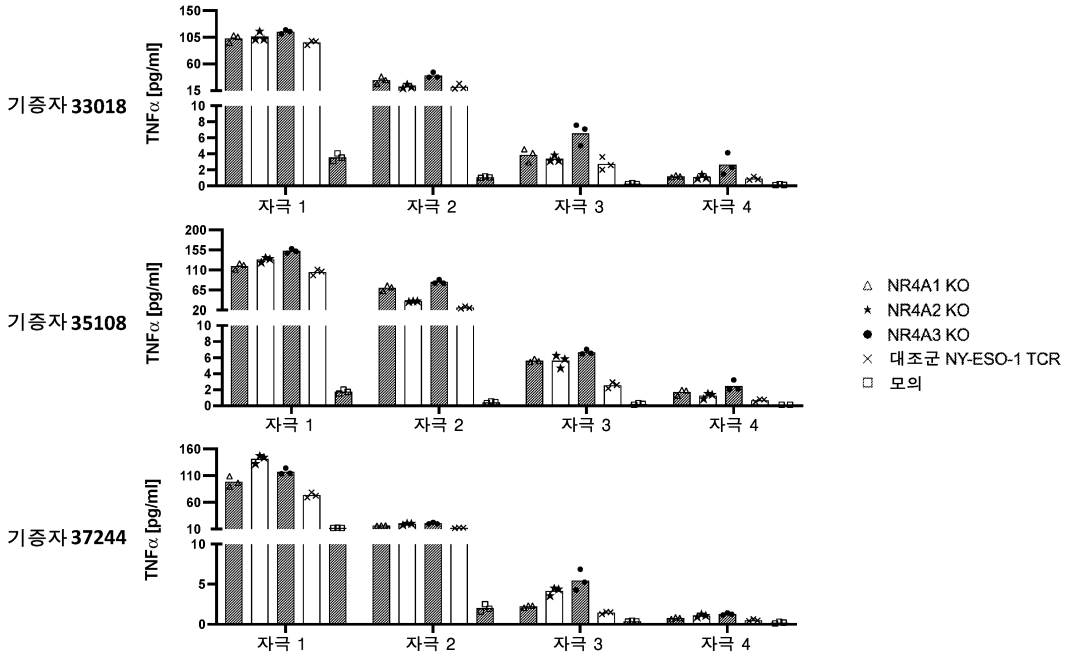
도면15a


기증자 33018
기증자 35108
기증자 37244
IFNγ pg/ml
자극 1
자극 2
자극 3
자극 4
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 NY-ESO-1 TCR
모의

도면15b


기증자33018
기증자35108
기증자37244
IL-2 [pg/ml]
자극 1
자극 2
자극 3
자극 4
NR4A1 KO
NR4A2 KO
NR4A3 KO
대조군 NY-ESO-1 TCR
모의

## 도면15c




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> LYELL IMMUNOPHARMA, INC.

<120> NR4A3-DEFICIENT CELLS AND USES THEREOF

<130> 4385.075PC02

<150> US 63/194,745

<151> 2021-05-28

<150> US 63/365,024

<151> 2022-05-19

<160> 123

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 626

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 Isoform Alpha

<400> 1

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Ser Pro Ser Pro Pro Gly Ser Ser

1 5 10 15

Tyr Ala Ala Gln Thr Tyr Ser Ser Glu Tyr Thr Thr Glu Ile Met Asn

20 25 30

Pro Asp Tyr Thr Lys Leu Thr Met Asp Leu Gly Ser Thr Glu Ile Thr

35 40 45

Ala Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Ile Ser Thr Phe Val Glu Gly

50 55 60

Tyr Ser Ser Asn Tyr Glu Leu Lys Pro Ser Cys Val Tyr Gln Met Gln

65 70 75 80

Arg Pro Leu Ile Lys Val Glu Glu Gly Arg Ala Pro Ser Tyr His His

85 90 95

His His His His His His His His His His His Gln Gln Gln His

100 105 110

Gln Gln Pro Ser Ile Pro Pro Ala Ser Ser Pro Glu Asp Glu Val Leu

115 120 125

Pro Ser Thr Ser Met Tyr Phe Lys Gln Ser Pro Pro Ser Thr Pro Thr

130 135 140

Thr Pro Ala Phe Pro Pro Gln Ala Gly Ala Leu Trp Asp Glu Ala Leu

145 150 155 160

Pro Ser Ala Pro Gly Cys Ile Ala Pro Gly Pro Leu Leu Asp Pro Pro

165 170 175

Met Lys Ala Val Pro Thr Val Ala Gly Ala Arg Phe Pro Leu Phe His

180 185 190

Phe Lys Pro Ser Pro Pro His Pro Pro Ala Pro Ser Pro Ala Gly Gly

195 200 205

His His Leu Gly Tyr Asp Pro Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ser Leu Pro

210 215 220

Leu Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gln Ala Ala Ala Leu Glu Ser

225 230 235 240

His Pro Tyr Gly Leu Pro Leu Ala Lys Arg Ala Ala Pro Leu Ala Phe

245 250 255

Pro Pro Leu Gly Leu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ser Ser Leu Leu Gly

260 265 270

Glu Ser Pro Ser Leu Pro Ser Pro Pro Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly

275 280 285

Glu Gly Thr Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln His Tyr

290 295 300

Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val

305 310 315 320

Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro Val

325 330 335

Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys Cys

340 345 350

Leu Ser Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu Lys

355 360 365

Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro Leu Gln Gln

370 375 380

Glu Pro Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Ile Cys Met Met Asn

385 390 395 400

Ala Leu Val Arg Ala Leu Thr Asp Ser Thr Pro Arg Asp Leu Asp Tyr

405 410 415

Ser Arg Tyr Cys Pro Thr Asp Gln Ala Ala Ala Gly Thr Asp Ala Glu

420 425 430

His Val Gln Gln Phe Tyr Asn Leu Leu Thr Ala Ser Ile Asp Val Ser

435 440 445

Arg Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Thr Asp Leu Pro Lys Glu

450 455 460

Asp Gln Thr Leu Leu Ile Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Val Leu

465 470 475 480

Arg Leu Ser Ile Arg Ser Asn Thr Ala Glu Asp Lys Phe Val Phe Cys

485 490 495

Asn Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Leu Arg Gly Phe Gly Glu

500 505 510

Trp Leu Asp Ser Ile Lys Asp Phe Ser Leu Asn Leu Gln Ser Leu Asn

515 520 525

Leu Asp Ile Gln Ala Leu Ala Cys Leu Ser Ala Leu Ser Met Ile Thr

530 535 540

Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Cys Asn

545 550 555 560

Lys Ile Thr Ser Ser Leu Lys Asp His Gln Ser Lys Gly Gln Ala Leu

565 570 575

Glu Pro Thr Glu Ser Lys Val Leu Gly Ala Leu Val Glu Leu Arg Lys

580 585 590

Ile Cys Thr Leu Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu Lys Leu Glu Asp

595 600 605

Leu Val Ser Pro Pro Ser Ile Ile Asp Lys Leu Phe Leu Asp Thr Leu

610 615 620

Pro Phe

625

<210> 2

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 Isoform Beta

<400> 2

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Ser Pro Ser Pro Pro Gly Ser Ser

1 5 10 15

Tyr Ala Ala Gln Thr Tyr Ser Ser Glu Tyr Thr Thr Glu Ile Met Asn

20 25 30

Pro Asp Tyr Thr Lys Leu Thr Met Asp Leu Gly Ser Thr Glu Ile Thr

35 40 45

Ala Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Ile Ser Thr Phe Val Glu Gly

50 55 60

Tyr Ser Ser Asn Tyr Glu Leu Lys Pro Ser Cys Val Tyr Gln Met Gln

65 70 75 80

Arg Pro Leu Ile Lys Val Glu Glu Gly Arg Ala Pro Ser Tyr His His

85 90 95

His His His His His His His His His His His Gln Gln Gln His

100 105 110

Gln Gln Pro Ser Ile Pro Pro Ala Ser Ser Pro Glu Asp Glu Val Leu

115 120 125

Pro Ser Thr Ser Met Tyr Phe Lys Gln Ser Pro Pro Ser Thr Pro Thr

130 135 140

Thr Pro Ala Phe Pro Pro Gln Ala Gly Ala Leu Trp Asp Glu Ala Leu

145 150 155 160

Pro Ser Ala Pro Gly Cys Ile Ala Pro Gly Pro Leu Leu Asp Pro Pro

165 170 175

Met Lys Ala Val Pro Thr Val Ala Gly Ala Arg Phe Pro Leu Phe His

180 185 190

Phe Lys Pro Ser Pro Pro His Pro Pro Ala Pro Ser Pro Ala Gly Gly

195 200 205

His His Leu Gly Tyr Asp Pro Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ser Leu Pro

210 215 220

Leu Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gln Ala Ala Ala Leu Glu Ser

225 230 235 240

His Pro Tyr Gly Leu Pro Leu Ala Lys Arg Ala Ala Pro Leu Ala Phe

245 250 255

Pro Pro Leu Gly Leu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ser Ser Leu Leu Gly

260 265 270

Glu Ser Pro Ser Leu Pro Ser Pro Pro Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly

275 280 285

Glu Gly Thr Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln His Tyr

290 295 300

Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val

305 310 315 320

Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro Val

325 330 335

Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys Cys

340 345 350

Leu Ser Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu Lys

355 360 365

Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro Leu Gln Gln

370 375 380

Glu Pro Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Ile Cys Met Met Asn

385 390 395 400

Ala Leu Val Arg Ala Leu Thr Asp Ser Thr Pro Arg Asp Leu Asp Tyr

405 410 415

Ser Arg Val Ser Phe Met Ile Ser Cys Phe Gln Met Asn Asp Gln Gly

420 425 430

Leu Tyr Leu Trp Leu Leu Val Ile Arg Val Asp

435 440

<210> 3

<211> 637

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 Isoform 3

<400> 3

Met His Asp Ser Ile Arg Phe Gly Asn Val Asp Met Pro Cys Val Gln

1 5 10 15

Ala Gln Tyr Ser Pro Ser Pro Pro Gly Ser Ser Tyr Ala Ala Gln Thr

20 25 30

Tyr Ser Ser Glu Tyr Thr Thr Glu Ile Met Asn Pro Asp Tyr Thr Lys

35 40 45

Leu Thr Met Asp Leu Gly Ser Thr Glu Ile Thr Ala Thr Ala Thr Thr

50 55 60

Ser Leu Pro Ser Ile Ser Thr Phe Val Glu Gly Tyr Ser Ser Asn Tyr

65 70 75 80

Glu Leu Lys Pro Ser Cys Val Tyr Gln Met Gln Arg Pro Leu Ile Lys
85 90 95
Val Glu Glu Gly Arg Ala Pro Ser Tyr His His His His His His His
100 105 110
His His His His His His His Gln Gln Gln His Gln Gln Pro Ser Ile
115 120 125
Pro Pro Ala Ser Ser Pro Glu Asp Glu Val Leu Pro Ser Thr Ser Met
130 135 140

Tyr Phe Lys Gln Ser Pro Pro Ser Thr Pro Thr Thr Pro Ala Phe Pro
145 150 155 160
Pro Gln Ala Gly Ala Leu Trp Asp Glu Ala Leu Pro Ser Ala Pro Gly
165 170 175
Cys Ile Ala Pro Gly Pro Leu Leu Asp Pro Pro Met Lys Ala Val Pro
180 185 190
Thr Val Ala Gly Ala Arg Phe Pro Leu Phe His Phe Lys Pro Ser Pro
195 200 205

Pro His Pro Pro Ala Pro Ser Pro Ala Gly Gly His His Leu Gly Tyr
210 215 220
Asp Pro Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ser Leu Pro Leu Gly Ala Ala Ala
225 230 235 240
Ala Ala Gly Ser Gln Ala Ala Ala Leu Glu Ser His Pro Tyr Gly Leu
245 250 255
Pro Leu Ala Lys Arg Ala Ala Pro Leu Ala Phe Pro Pro Leu Gly Leu
260 265 270

Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ser Ser Leu Leu Gly Glu Ser Pro Ser Leu
275 280 285
Pro Ser Pro Pro Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Glu Gly Thr Cys Ala
290 295 300
Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys
305 310 315 320
Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys

325 330 335

Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg
340 345 350
Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ser Val Gly Met
355 360 365
Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg
370 375 380
Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro Leu Gln Gln Glu Pro Ser Gln Pro
385 390 395 400

Ser Pro Pro Ser Pro Pro Ile Cys Met Met Asn Ala Leu Val Arg Ala
405 410 415
Leu Thr Asp Ser Thr Pro Arg Asp Leu Asp Tyr Ser Arg Tyr Cys Pro
420 425 430
Thr Asp Gln Ala Ala Ala Gly Thr Asp Ala Glu His Val Gln Gln Phe
435 440 445
Tyr Asn Leu Leu Thr Ala Ser Ile Asp Val Ser Arg Ser Trp Ala Glu
450 455 460

Lys Ile Pro Gly Phe Thr Asp Leu Pro Lys Glu Asp Gln Thr Leu Leu
465 470 475 480
Ile Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Val Leu Arg Leu Ser Ile Arg
485 490 495
Ser Asn Thr Ala Glu Asp Lys Phe Val Phe Cys Asn Gly Leu Val Leu
500 505 510
His Arg Leu Gln Cys Leu Arg Gly Phe Gly Glu Trp Leu Asp Ser Ile
515 520 525

Lys Asp Phe Ser Leu Asn Leu Gln Ser Leu Asn Leu Asp Ile Gln Ala
530 535 540
Leu Ala Cys Leu Ser Ala Leu Ser Met Ile Thr Glu Arg His Gly Leu
545 550 555 560
Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Cys Asn Lys Ile Thr Ser Ser
565 570 575

Leu Lys Asp His Gln Ser Lys Gly Gln Ala Leu Glu Pro Thr Glu Ser
580 585 590

Lys Val Leu Gly Ala Leu Val Glu Leu Arg Lys Ile Cys Thr Leu Gly
595 600 605
Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu Lys Leu Glu Asp Leu Val Ser Pro Pro
610 615 620
Ser Ile Ile Asp Lys Leu Phe Leu Asp Thr Leu Pro Phe
625 630 635

<210> 4
<211> 331
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Wild-type human c-Jun
<400> 4
Met Thr Ala Lys Met Glu Thr Thr Phe Tyr Asp Asp Ala Leu Asn Ala

1 5 10 15
Ser Phe Leu Pro Ser Glu Ser Gly Pro Tyr Gly Tyr Ser Asn Pro Lys
20 25 30
Ile Leu Lys Gln Ser Met Thr Leu Asn Leu Ala Asp Pro Val Gly Ser
35 40 45
Leu Lys Pro His Leu Arg Ala Lys Asn Ser Asp Leu Leu Thr Ser Pro
50 55 60
Asp Val Gly Leu Leu Lys Leu Ala Ser Pro Glu Leu Glu Arg Leu Ile

65 70 75 80
Ile Gln Ser Ser Asn Gly His Ile Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Gln
85 90 95
Phe Leu Cys Pro Lys Asn Val Thr Asp Glu Gln Glu Gly Phe Ala Glu
100 105 110
Gly Phe Val Arg Ala Leu Ala Glu Leu His Ser Gln Asn Thr Leu Pro
115 120 125
Ser Val Thr Ser Ala Ala Gln Pro Val Asn Gly Ala Gly Met Val Ala

130 135 140

Pro Ala Val Ala Ser Val Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Phe Ser

145 150 155 160

Ala Ser Leu His Ser Glu Pro Pro Val Tyr Ala Asn Leu Ser Asn Phe

165 170 175

Asn Pro Gly Ala Leu Ser Ser Gly Gly Gly Ala Pro Ser Tyr Gly Ala

180 185 190

Ala Gly Leu Ala Phe Pro Ala Gln Pro Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro

195 200 205

His His Leu Pro Gln Gln Met Pro Val Gln His Pro Arg Leu Gln Ala

210 215 220

Leu Lys Glu Glu Pro Gln Thr Val Pro Glu Met Pro Gly Glu Thr Pro

225 230 235 240

Pro Leu Ser Pro Ile Asp Met Glu Ser Gln Glu Arg Ile Lys Ala Glu

245 250 255

Arg Lys Arg Met Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ser Lys Cys Arg Lys Arg

260 265 270

Lys Leu Glu Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys

275 280 285

Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln

290 295 300

Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn His Val Asn Ser Gly Cys

305 310 315 320

Gln Leu Met Leu Thr Gln Gln Leu Gln Thr Phe

325 330

<210> 5

<211> 3257

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wild-type human c-Jun

<400> 5

gctcagagtt gcactgagtg tggctgaagc agcgaggcgg gagtggaggt gcgcggagtc 60

aggcagacag acagacacag ccagccagcc aggtcggcag tatagtccga actgcaaatc 120

ttattttctt ttcaccttct ctctaactgc ccagagctag cgcctgtggc tcccgggctg 180

gtgtttcggg agtgtccaga gagcctggtc tccagccgcc cccgggagga gagccctgct 240

gcccaggcgc tgttgacagc ggcggaaagc agcggtaccc acgcgcccgc cgggggaagt 300

cggcgagcgg ctgcagcagc aaagaacttt cccggctggg aggaccggag acaagtggca 360

gagtcccgga gccaactttt gcaagccttt cctgcgtctt aggcttctcc acggcggtaa 420

agaccagaag gcggcggaga gccacgcaag agaagaagga cgtgcgctca gcttcgctcg 480

caccggttgt tgaacttggg cgagcgcgag ccgcggctgc cgggcgcccc ctccccctag 540

cagcggagga ggggacaagt cgtcggagtc cgggcggcca agacccgccg ccggccggcc 600

actgcagggt ccgcactgat ccgctccgcg gggagagccg ctgctctggg aagtgagttc 660

gcctgcggac tccgaggaac cgctgcgcac gaagagcgct cagtgagtga ccgcgacttt 720

tcaaagccgg gtagcgcgcg cgagtcgaca agtaagagtg cgggaggcat cttaattaac 780

cctgcgctcc ctggagcgag ctggtgagga gggcgcagcg gggacgacag ccagcgggtg 840

cgtgcgctct tagagaaact ttccctgtca aaggctccgg ggggcgcggg tgtcccccgc 900

ttgccacagc cctgttgcgg ccccgaaact tgtgcgcgca gcccaaacta acctcacgtg 960

aagtgacgga ctgttctatg actgcaaaga tggaaacgac cttctatgac gatgccctca 1020

acgcctcgtt cctcccgtcc gagagcggac cttatggcta cagtaacccc aagatcctga 1080

aacagagcat gaccctgaac ctggccgacc cagtggggag cctgaagccg cacctccgcg 1140

ccaagaactc ggacctcctc acctcgcccg acgtggggct gctcaagctg gcgtcgcccg 1200

agctggagcg cctgataatc cagtccagca acgggcacat caccaccacg ccgaccccca 1260

cccagttcct gtgccccaag aacgtgacag atgagcagga gggcttcgcc gagggcttcg 1320

tgcgcgccct ggccgaactg cacagccaga acacgctgcc cagcgtcacg tcggcggcgc 1380

agccggtcaa cggggcaggc atggtggctc ccgcggtagc ctcggtggca gggggcagcg 1440

gcagcggcgg cttcagcgcc agcctgcaca gcgagccgcc ggtctacgca aacctcagca 1500

acttcaaccc aggcgcgctg agcagcggcg gcggggcgcc ctcctacggc gcggccggcc 1560

tggcctttcc cgcgcaaccc cagcagcagc agcagccgcc gcaccacctg ccccagcaga 1620

tgcccgtgca gcacccgcgg ctgcaggccc tgaaggagga gcctcagaca gtgcccgaga 1680

tgcccggcga gacaccgccc ctgtccccca tcgacatgga gtcccaggag cggatcaagg 1740

cggagaggaa gcgcatgagg aaccgcatcg ctgcctccaa gtgccgaaaa aggaagctgg 1800

agagaatcgc ccggctggag gaaaaagtga aaaccttgaa agctcagaac tcggagctgg 1860

cgtccacggc caacatgctc agggaacagg tggcacagct taaacagaaa gtcatgaacc 1920

acgttaacag tgggtgccaa ctcatgctaa cgcagcagtt gcaaacattt tgaagagaga 1980

ccgtcggggg ctgaggggca acgaagaaaa aaaataacac agagagacag acttgagaac 2040

ttgacaagtt gcgacggaga gaaaaaagaa gtgtccgaga actaaagcca agggtatcca 2100

agttggactg ggttgcgtcc tgacggcgcc cccagtgtgc acgagtggga aggacttggc 2160

gcgccctccc ttggcgtgga gccagggagc ggccgcctgc gggctgcccc gctttgcgga 2220

cgggctgtcc ccgcgcgaac ggaacgttgg acttttcgtt aacattgacc aagaactgca 2280

tggacctaac attcgatctc attcagtatt aaaggggggga gggggagggg gttacaaact 2340

gcaatagaga ctgtagattg cttctgtagt actccttaag aacacaaagc gggggggaggg 2400

ttggggaggg gcggcaggag ggaggtttgt gagagcgagg ctgagcctac agatgaactc 2460

tttctggcct gccttcgtta actgtgtatg tacatatata tatttttaa tttgatgaaa 2520

gctgattact gtcaataaac agcttcatgc ctttgtaagt tatttcttgt ttgtttgttt 2580

gggtatcctg cccagtgttg tttgtaaata agagatttgg agcactctga gtttaccatt 2640

tgtaataaag tatataattt ttttatgttt tgtttctgaa aattccagaa aggatattta 2700

agaaaataca ataaactatt ggaaagtact ccctaacct cttttctgca tcatctgtag 2760

atactagcta tctaggtgga gttgaaagag ttaagaatgt cgattaaaat cactctcagt 2820

gcttcttact attaagcagt aaaaactgtt ctctattaga ctttagaaat aaatgtacct 2880

gatgtacctg atgctatggt caggttatac tcctcctccc ccagctatct atatggaatt 2940

gcttaccaaa ggatagtgcg atgtttcagg aggctggagg aaggggggtt gcagtggaga 3000

gggacagccc actgagaagt caaacatttc aaagtttgga ttgtatcaag tggcatgtgc 3060

tgtgaccatt tataatgtta gtagaaattt tacaataggt gcttattctc aaagcaggaa 3120

ttggtggcag attttacaaa agatgtatcc ttccaatttg gaatcttctc tttgacaatt 3180

cctagataaa aagatggcct ttgcttatga atatttataa cagcattctt gtcacaataa 3240

atgtattcaa ataccaa 3257

<210> 6

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wild-type human c-Jun (coding region)

<400> 6

atgactgcaa agatggaaac gaccttctat gacgatgccc tcaacgcctc gttcctcccg 60

tccgagagcg gaccttatgg ctacagtaac cccaagatcc tgaaacagag catgaccctg 120

aacctggccg acccagtggg gagcctgaag ccgcacctcc gcgccaagaa ctcggacctc 180

ctcacctcgc ccgacgtggg gctgctcaag ctggcgtcgc ccgagctgga gcgcctgata 240

atccagtcca gcaacgggca catcaccacc acgccgaccc ccacccagtt cctgtgcccc 300

aagaacgtga cagatgagca ggagggcttc gccgagggct tcgtgcgcgc cctggccgaa 360

ctgcacagcc agaacacgct gcccagcgtc acgtcggcgg cgcagccggt caacggggca 420

ggcatggtgg ctcccgcggt agcctcggtg gcaggggggca gcggcagcgg cggcttcagc 480

gccagcctgc acagcgagcc gccggtctac gcaaacctca gcaacttcaa cccaggcgcg 540

ctgagcagcg gcggcggggc gccctcctac ggcgcggccg gcctggcctt tcccgcgcaa 600

ccccagcagc agcagcagcc gccgcaccac ctgccccagc agatgcccgt gcagcacccg 660

cggctgcagg ccctgaagga ggagcctcag acagtgcccg agatgcccgg cgagacaccg 720

cccctgtccc ccatcgacat ggagtcccag gagcggatca aggcggagag gaagcgcatg 780

aggaaccgca tcgctgcctc caagtgccga aaaaggaagc tggagagaat cgcccggctg 840

gaggaaaaag tgaaaacctt gaaagctcag aactcggagc tggcgtccac ggccaacatg 900

ctcagggaac aggtggcaca gcttaaacag aaagtcatga accacgttaa cagtgggtgc 960

caactcatgc taacgcagca gttgcaaaca ttt 993

<210> 7

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Jun codon optimized #1

<400> 7

atgacagcca agatggaaac cacattctac gacgacgccc tgaacgcctc attcctgcct 60

tctgagagcg gaccttacgg ctacagcaat cctaagatcc tgaaacagag catgaccctt 120

aacctggctg atcctgttgg aagcctgaaa cctcacctga gagccaaaaa cagcgacctg 180

ctcaccagcc ctgatgtggg cctgctgaag ctggcctctc cagagctgga acggctgatc 240

atccagagca gcaacggcca catcacaacc acccctaccc ctacacaatt cctgtgccct 300

aagaacgtga ccgacgagca ggagggcttc gccgaaggct ttgtgcgggc cctggcagaa 360

ctgcactctc agaacaccct gcctagcgtg acctccgccg cccagcctgt caacggcgcc 420

ggaatggtgg cccctgccgt ggcttctgtg gccggcggca gcggcagcgg cggattcagc 480

gcctctctgc actctgagcc tcctgtctac gccaatctgt ctaatttcaa ccccggagcc 540

ctgtccagcg gcggcggagc tcctagctac ggcgctgctg gactggcctt ccccgcccag 600

ccccagcaac agcagcagcc tccacaccac ctgccccagc agatgcccgt gcagcaccct 660

agactgcagg ccctgaagga agaaccccaa acagtgcctg agatgcctgg cgagacacct 720

ccactgagcc ccatcgacat ggaaagccag gagcggatca aggccgagag aaagagaatg 780

cggaacagaa tcgccgctag caagtgcaga aagcggaagc tggaaagaat cgccagactg 840

gaagagaagg tgaagaccct gaaagcccaa aatagcgagc tggccagcac cgccaacatg 900

ctgcgggaac aggtggccca gctgaagcag aaggtgatga accacgtgaa ctctggttgt 960

cagctgatgc tgacccagca gctccagacc ttc 993

<210> 8

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Jun codon optimized #2

<400> 8

atgacagcca agatggaaac caccttctac gacgacgccc tcaacgcctc cttcctgcct 60

tctgagagcg gtccttacgg ctacagcaac cccaagatcc tgaagcaaag catgaccctg 120

aacctggccg accccgttgg ctccctgaaa cctcacctga gagccaaaaa cagcgacctg 180

ctgaccagcc ctgatgtggg cctgctgaag ctggcctctc cagagctgga aagactgatt 240

atccagagca gcaacggcca catcaccaca acacctaccc ctacacagtt cctgtgccct 300

aagaacgtga ctgatgagca ggagggcttt gccgagggct tcgtgagagc cctggctgag 360

ctgcattctc agaacaccct gcctagcgtg acctctgccg cccagcctgt taatggcgcc 420

ggcatggtgg cccctgccgt ggcctctgtg gccggaggca gcggcagcgg cggattcagc 480

gcctctctgc acagcgagcc ccccgtctac gccaacctga gcaatttcaa ccctggcgcc 540

ctgtccagcg gcggcggcgc cccttcatat ggcgctgccg gcctggcctt ccccgctcag 600

ccccagcagc agcaacagcc tccacaccac ctgccccagc agatgcccgt gcagcacccc 660

agactgcagg ccctgaagga agaacctcag accgtgcccg agatgcctgg cgagacccct 720

cctctgagcc ctatcgacat ggaaagccag gagagaatca aggccgagag gaagcggatg 780

cggaacagaa tcgccgccag caagtgcaga aaaagaaagc tggaacggat cgccagactg 840

gaggagaagg tgaagacact gaaagcccaa aattctgaac tggcctctac cgccaatatg 900

ctgcgcgagc aggtggctca actgaagcag aaggtgatga accacgtgaa cagcggatgt 960

cagctgatgc tgacacagca gctgcagact ttt 993

<210> 9

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Jun codon optimized #3

<400> 9

atgaccgcca agatggaaac caccttctac gacgacgccc tgaacgccag ctttctgcct 60

tctgagtctg gcccctacgg ctacagcaac cccaagatcc tgaagcagag catgaccctg 120

aacctggccg atcctgtggg cagcctgaaa cctcacctga gagccaagaa cagcgacctg 180

ctgacaagcc ctgatgtggg cctgctgaaa ctggcctctc ctgagctgga acggctgatc 240

atccagagca gcaacggcca catcaccacc acacctacac caacacagtt tctgtgcccc 300

aagaacgtga ccgacgagca agagggattc gccgagggct ttgttagagc cctggccgaa 360

ctgcacagcc agaataccct gcctagcgtg acatctgccg ctcagcctgt taatggcgcc 420

ggaatggttg ctcctgccgt ggcttctgtt gctggcggat ctggatctgg cggctttagc 480

gcctctctgc actctgagcc tccagtgtac gccaacctga gcaacttcaa ccctggcgct 540

cttagctctg gtggcggagc accttcttat ggcgctgccg gattggcctt tcctgctcag 600

cctcagcagc agcaacagcc tcctcatcat ctgccccagc agatgcctgt gcagcaccct 660

agactgcagg ccctgaaaga ggaaccccag acagtccctg agatgcccgg cgaaacacct 720

cctctgagcc ccatcgacat ggaaagccaa gagcggatca aggccgagcg gaagcggatg 780

agaaatagaa tcgccgcctc caagtgccgg aagaggaagc tggaaagaat cgcccggctg 840

gaagagaaag tgaaaaccct gaaggcccag aactccgagc tggcctctac cgccaacatg 900

ctgagagaac aggtggccca gctgaaacag aaagtcatga accacgtgaa cagcggctgc 960

cagctgatgc tgacacagca gctgcagacc ttc 993

<210> 10

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Jun codon optimized #4

<400> 10

atgactgcca aaatggagac tacattctat gacgacgccc tcaatgccag ttttttgccg 60

agtgaatccg gcccctacgg ctattcaaac cctaagatcc tcaagcaatc aatgaccctc 120

aatcttgctg acccagttgg ctccctgaaa ccccatctca gagctaaaaa tagtgacctc 180

cttacttccc ctgatgttgg actcctcaaa cttgcttctc ccgaactcga acgcttgatc 240

attcaatctt ccaacggcca catcacaaca acacccacac ccacccagtt tctttgccca 300

aaaaatgtca ccgatgaaca ggaaggtttc gcggaaggat tcgtccgcgc gctggccgaa 360

ctgcactccc agaatacact tccttcagtt acgtcagccg cccagccagt gaatggtgcg 420

ggaatggttg ctcctgcggt cgcttctgtc gcagggggct ccggttctgg cggatttagc 480

gcctctctgc attccgagcc acctgtatat gctaatcttt ctaattttaa ccccggagcc 540

ttgtctagcg gcggtggtgc ccccagctac ggtgctgcag gactcgcctt cccagctcaa 600

cctcagcagc agcaacaacc cccccatcac cttccccaac agatgccagt acaacatcca 660

aggctccagg ccctcaaaga ggaaccacag acggtgcccg aaatgcctgg cgaaactcca 720

ccactttccc ctattgatat ggaatcccaa gagcgcatca aggccgaaag aaagcgaatg 780

cggaatagaa tagcagcttc aaaatgtaga aaacggaaat tggaacgaat cgcacggttg 840

gaagaaaagg tgaagacctt gaaagcccag aacagtgagc tcgcctctac cgctaacatg 900

ctgcgcgagc aagtcgcaca acttaagcag aaggtgatga accatgtgaa tagcggatgt 960

caacttatgc tgactcaaca gttgcaaacc ttt 993

<210> 11

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Jun codon optimized #5

<400> 11

atgaccgcga aaatggagac aacattttac gatgatgcac tgaacgcctc ttttctgcca 60

agtgaatccg gcccctacgg atactcaaac cctaagattc tgaaacagtc tatgactctc 120

aacctggccg acccagttgg cagtctgaag cctcatttgc gagccaagaa tagtgatctg 180

ctgacctccc cagacgtggg actgctgaaa ctcgcctcac ctgaacttga gcgcttgatt 240

atacagtcat ccaatgggca catcacaaca acacctactc ctacccagtt tctgtgcccc 300

aaaaacgtca ccgatgagca ggagggattc gcggaaggct ttgtgcgcgc cctggctgaa 360

ttgcatagtc agaacactct tcccagcgta accagcgccg cccaaccagt gaatggagcc 420

ggtatggtgg ctcccgcggt ggctagtgtt gcgggggggt caggctctgg tgggttcagt 480

gcttctcttc actctgaacc ccctgtgtat gccaatctgt ctaactttaa ccctggggcc 540

ctctcctctg gtgggggtgc ccccagctac ggagcggccg gcctggcctt tcctgcccag 600

cctcagcagc agcagcaacc ccctcatcat cttccgcagc agatgccagt acagcatcca 660

cgcctgcagg ctcttaagga ggagccccag acggtgcccg aaatgcccgg ggaaactcca 720

ccttgtccc ccattgacat ggagtcccag gagcggatca aggctgaaag aaagaggatg 780

cggaatcgca tcgcagcctc taaatgccgc aagcggaaac ttgagaggat cgcgcggttg 840
gaggaaaaag taaaaacctt gaaggcacag aactctgagc tggcgagtac tgccaacatg 900
ctcagagaac aagtcgcaca gctgaagcag aaagtgatga accatgtgaa cagcggttgt 960
cagctgatgc tgactcagca gctgcagacc ttc 993

<210> 12
<211> 993
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> c-Jun codon optimized #6
<400> 12

atgaccgcca agatggagac cacattctac gatgacgctc tgaacgcttc ctttctgcct 60
tccgagtccg gcccctacgg ctactccaat cccaagattc tgaagcagag catgacactg 120

aatctggctg atcccgtggg atctctgaag cctcatctga gagccaagaa ttccgatctg 180
ctgacaagcc ccgacgtggg actgctcaaa ctggccagcc ccgaactgga gaggctcatt 240
atccagagct ccaacggcca catcaccaca acacctaccc ctacccagtt tctctgtccc 300
aagaacgtga cagacgagca agagggattt gccgaaggct tcgtgagagc cctcgccgaa 360
ctgcatagcc agaacacact gccttccgtg accagcgctg ctcaacccgt gaacggcgct 420
ggcatggtcg ctcccgccgt cgccagcgtg gctggaggaa gcggatccgg aggcttcagc 480
gcttccctcc acagcgaacc tcccgtgtac gctaatctga gcaacttcaa ccccggcgct 540

ctgagcagcg gaggaggagc tcctagctat ggagctgccg gactggcttt tcccgcccag 600
ccccagcagc agcagcagcc cccccatcat ctgcctcagc agatgcccgt gcagcatccc 660
agactccaag ctctgaagga ggagcctcag accgtccccg agatgcccgg cgaaaccccc 720
cctctgtccc ccatcgacat ggaaagccaa gagaggatca aggccgagag gaagaggatg 780
aggaatagaa tcgccgccag caagtgtaga aagaggaagc tggagaggat cgccagactg 840
gaggagaagg tgaagaccct caaggctcag aattccgagc tggccagcac agccaacatg 900
ctgagagagc aagtggccca gctcaagcag aaggtgatga accacgtcaa cagcggatgc 960

cagctgatgc tcacccagca gctgcagacc ttc 993

<210> 13
<211> 993
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Jun codon optimized #7

<400> 13

atgaccgcta aaatggaaac cactttctat gacgatgccc tgaacgcctc cttccttccg 60

tccgagtccg gaccctacgg atactcaaat cctaagatcc tcaaacagtc gatgaccctc 120

aacctggccg accccgtggg atccctgaag ccgcacttgc gcgccaagaa ctccgacctc 180

ctgacgagcc cagacgtggg cctgctgaag ctcgcatcac ccgaacttga gcggttgatc 240

attcagtcct ccaacggaca tatcaccacc actcccaccc caactcagtt tctgtgtccg 300

aagaacgtga ccgatgagca agagggattc gccgagggat tcgtgcgggc cctggccgag 360

ctgcatagcc agaacaccct tccatccgtg acctcggcgg ctcagcctgt gaacggcgcg 420

ggaatggtcg cgcccgccgt ggcctcggtg gccgggggca gcggcagcgg gggattttcc 480

gcgtcgctgc actccgagcc gccggtgtac gccaacctgt caaacttcaa ccctggggcc 540

ctgagctccg gcggtggagc accttcgtac ggcgccgctg gcctggcgtt ccccgcgcaa 600

ccacagcagc aacagcagcc ccctcaccac ctcccccaac aaatgcctgt gcagcacccg 660

aggctgcagg ccctcaagga agaaccccag actgtgccgg aaatgccggg ggagactccg 720

ccgctgtccc ctatcgacat ggaatcacag gaacgcatta aggcagagcg gaagcgcatg 780

cggaaccgga ttgccgcctc caagtgccgc aagagaaagc tcgaaagaat cgccagattg 840

gaagaaaagg tcaagactct gaaggcccag aactctgagc tggcatccac cgctaatatg 900

ctgagggaac aagtggccca gctgaaacag aaggtcatga accacgtcaa cagcggttgc 960

cagctgatgc tgacccagca actccagaca ttc 993

<210> 14

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Jun codon optimized #8

<400> 14

atgaccgcca agatggagac caccttctac gacgacgccc tgaacgccag cttcctgccc 60

agcgagagcg gaccctacgg ctactctaac cccaagatcc tgaaacagag catgacactg 120

aatctggccg accccgtggg cagcctgaag cctcacctta gagccaagaa cagcgacctg 180

ctgaccagcc ccgacgtggg cctgctgaag ctcgcctctc cagagttaga gagactgatc 240

atccagtcca gcaacggcca catcacaacc accccaaccc ctacccagtt cctgtgcccc 300

aagaacgtga ccgacgagca ggagggcttc gccgagggct ttgtgagagc cctggccgag 360

ttgcactctc agaacaccct gccctccgtg accagcgccg ctcaacctgt gaacggcgca 420

ggaatggttg ctcctgccgt ggccagcgtt gcaggcggat ctggaagtgg aggcttctcc 480

gcctcccttc acagcgagcc tcccgtgtac gccaacctga gcaacttcaa ccccggcgcc 540

ctgagcagtg gaggaggcgc tcccagctat ggagcagctg gattagcctt ccccgcccag 600

ccacagcagc agcaacagcc tccccaccac ctgcctcagc aaatgcctgt gcagcaccct 660

cggctgcagg cccttaagga ggagccccag accgttcctg agatgcctgg cgagaccccc 720

cccctgagcc ctatcgacat ggagtcccag gagcggatca aggccgagcg gaagcggatg 780

cggaaccgga tcgctgcttc caagtgccgg aagagaaagc tggagagaat cgcccggctg 840

gaggagaagg tgaagaccct gaaggcccag aactccgagc tggcctccac cgccaacatg 900

ctgcgggagc aggttgcaca gctgaagcag aaggtcatga accacgtgaa cagcggctgc 960

cagctgatgc tgacccagca gctgcagacc ttc 993

<210> 15

<211> 1059

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Jun codon optimized #9

<400> 15

atgacagcga agatggagac aaccttctat gacgatgctc ttaacgcctc cttcctgcct 60

tccgaaagcg ggccctacgg gtactctaat cctaagatac ttaagcaatc gatgactctc 120

aacctcgctg acccggttgg ctcactgaaa ccacacctga gagctaagaa tagtgacctg 180

ctcactagtc ccgatgtcgg gcttctgaag ctggcctctc ccgagctgga gaggcttatc 240

atccaatcat caaatggcca catcaccact accccaacac caactcaatt cctttgccct 300

aaaaacgtga ccgacgaaca ggaaggcttc gccgagggtt ttgtccgggc cttggccgag 360

ctgcattctc aaaatacact gccaagcgtc acttctgcgg cgcagccggt taacggagca 420

gggatggtgg ctcccgccgt tgctagcgtg gccggcggtt ccggctccgg cggtttctct 480

gcctccttgc attctgagcc accagtctac gcgaacctgt ccaactttaa tccgggggcg 540

ctgagtagcg gaggcggcgc ccctagctat ggggcagctg gactggcctt cccggcacaa 600

ccccaacaac aacagcaacc gccacaccat cttcctcaac aaatgccagt gcaacatcca 660

cgcttacaag ccctcaagga ggaaccccag accgtgcctg agatgcccgg cgaaaccccg 720

ccattgagcc ctattgacat ggaaagtcaa gagagaatta aggcagagcg caagagaatg 780

aggaaccgga tcgcagcatc taagtgccgc aaacggaaat tggagcggat cgctcgcttg 840

gaggagaagg tcaagactct caaggcccag aactccgagc ttgcgagcac agctaatatg 900

ctgcgcgagc aggtggccca gttaaaacaa aaggtcatga accatgtgaa cagcggctgt 960

cagctgatgc ttacgcaaca gctgcaaacc tttggctccg gtgcaacgaa cttcagcctg 1020

ctgaagcagg ccggagatgt tgaggaaaat ccaggtccc 1059

<210> 16

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Jun codon optimized #10

<400> 16

atgacggcca aaatggagac tacgttctac gatgacgcac tcaacgcgtc cttcctgccc 60

tctgagagtg gaccctatgg ctactccaat ccaaagatcc tgaagcagtc tatgaccctc 120

aacctggcgg acccggtggg ctcccttaag ccgcacttgc gcgccaagaa ctccgacctg 180

ctgacctccc ctgatgtggg cctcctcaag ctcgctagcc ctgaattgga gaggctgatc 240

atccagagct caaatggcca catcaccacc acacctaccc caacccagtt cctgtgccca 300

aaaaacgtga ccgacgagca ggagggcttc gcggagggct tcgtcagagc tctggccgag 360

ctgcactcac agaacacgct cccttccgtg acctccgctg cccagccggt caatggcgct 420

ggaatggtgg ctccggctgt ggcctctgtt gccggcggct ccggctccgg aggcttttca 480

gcttctctgc attctgagcc cccagtgtac gctaacctga gcaacttcaa ccccggggcg 540

ctcagctccg gtggcggtgc cccgagctac ggcgcggctg ggctggcgtt ccccgctcag 600

cctcagcagc aacagcaacc tccccaccac ctgccacagc agatgcctgt gcagcaccca 660

cgcctgcagg ccttgaagga ggaacctcag actgtgccag agatgcccgg cgagacccca 720

cccctgtccc cgattgacat ggagagccag gagcgcatca aggcagagcg caagcgtatg 780

cgcaaccgca tcgcggcctc caagtgccga aagcgcaagc tggagcggat tgctcgcctg 840

gaggagaagg tgaagaccct gaaggcccag aattccgagc tggcctcgac cgccaacatg 900

ctacgagaac aggtcgcgca gctgaaacag aaggtcatga accatgtcaa cagcgggtgc 960

cagctgatgt tgacccagca gcttcagacc ttc 993

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R12 VH

<400> 17

Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val
50 55 60

Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Asp
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Arg Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala Leu Phe Asn Ile Trp Gly
100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R12 VH CDR1

<400> 18

Ala Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R12 VH CDR2

<400> 19

Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asn

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R12 VH CDR3

<400> 20

Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala Leu Phe Asn Ile

1 5 10

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R12 VL

<400> 21

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Ala Ala Leu Gly Ser

1 5 10 15

Pro Ala Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr

20 25 30

Ile Asp Trp Tyr Gln Gln Leu Gln Gly Glu Ala Pro Arg Tyr Leu Met

35 40 45

Gln Val Gln Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Pro

65 70 75 80

Ser Val Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Asp Tyr

85 90 95

Ile Gly Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly

100 105 110

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R12 VL CDR1

<400> 22

Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr Ile Asp

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R12 VL CDR2

<400> 23

Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R12 VL CDR3

<400> 24

Gly Ala Asp Tyr Ile Gly Gly Tyr Val

1 5

<210> 25

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A1 sgRNA 5

<400> 25

gaaguccucg aacuugaagg 20

<210> 26

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A1 sgRNA 6

<400> 26

accuucaugg acggcuacac 20

<210> 27

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A2 sgRNA 1

<400> 27

uugggauggu caaagaaggu 20

<210> 28

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A2 sgRNA 2

<400> 28

cagccaggca cuucugaaau 20

<210> 29

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A2 sgRNA 3

<400> 29

uccggcgacg cuuguccacu 20

<210> 30

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 4

<400> 30

gcucgaguag cccuccacga 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 4

<400> 31

ggggtcccgt cggccgggtt 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 5

<400> 32

cccgtcggcc gggttcggcg 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 6

<400> 33

ctttaggggt cccgtcggcc 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 7

<400> 34

cagaacttta ggggtcccgt 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 8

<400> 35

actttagggg tcccgtcggc 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 9

<400> 36

agcgagcggg gggctgcccc 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 10

<400> 37

cgcctccgcc gccggagccc 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 11

<400> 38

cccgtcggcc gggttcggcg 20

<210> 39

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S. aureus chimeric frame

<400> 39

taatacgact cactata 17

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 1

<400> 40

gtcaataccg ccagaatcca 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 2

<400> 41

caataccgcc agaatccatg 20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA 3

<400> 42

tcaataccgc cagaatccat 20

<210> 43

<211> 598

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A2 Isoform 1

<400> 43

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Gly Ala Ser

1 5 10 15

Pro Ala Ser Gln Ser Tyr Ser Tyr His Ser Ser Gly Glu Tyr Ser Ser

20 25 30

Asp Phe Leu Thr Pro Glu Phe Val Lys Phe Ser Met Asp Leu Thr Asn

35 40 45

Thr Glu Ile Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met

50 55 60

Asp Asn Tyr Ser Thr Gly Tyr Asp Val Lys Pro Pro Cys Leu Tyr Gln

65 70 75 80

Met Pro Leu Ser Gly Gln Gln Ser Ser Ile Lys Val Glu Asp Ile Gln

85 90 95

Met His Asn Tyr Gln Gln His Ser His Leu Pro Pro Gln Ser Glu Glu

100 105 110

Met Met Pro His Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Lys Pro Ser Ser Pro Pro

115 120 125

Thr Pro Thr Thr Pro Gly Phe Gln Val Gln His Ser Pro Met Trp Asp

130 135 140

Asp Pro Gly Ser Leu His Asn Phe His Gln Asn Tyr Val Ala Thr Thr

145 150 155 160

His Met Ile Glu Gln Arg Lys Thr Pro Val Ser Arg Leu Ser Leu Phe

165 170 175

Ser Phe Lys Gln Ser Pro Pro Gly Thr Pro Val Ser Ser Cys Gln Met

180 185 190

Arg Phe Asp Gly Pro Leu His Val Pro Met Asn Pro Glu Pro Ala Gly

195 200 205

Ser His His Val Val Asp Gly Gln Thr Phe Ala Val Pro Asn Pro Ile

210 215 220

Arg Lys Pro Ala Ser Met Gly Phe Pro Gly Leu Gln Ile Gly His Ala

225 230 235 240

Ser Gln Leu Leu Asp Thr Gln Val Pro Ser Pro Pro Ser Arg Gly Ser

245 250 255

Pro Ser Asn Glu Gly Leu Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys

260 265 270

Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys

275 280 285

Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn

290 295 300

Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe

305 310 315 320

Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp

325 330 335

Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro

340 345 350

Gln Glu Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Val Ser Leu Ile Ser Ala Leu

355 360 365

Val Arg Ala His Val Asp Ser Asn Pro Ala Met Thr Ser Leu Asp Tyr

370 375 380

Ser Arg Phe Gln Ala Asn Pro Asp Tyr Gln Met Ser Gly Asp Asp Thr

385 390 395 400

Gln His Ile Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Thr Gly Ser Met Glu Ile

405 410 415

Ile Arg Gly Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Asp Leu Pro Lys

420 425 430

Ala Asp Gln Asp Leu Leu Phe Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Val

435 440 445

Leu Arg Leu Ala Tyr Arg Ser Asn Pro Val Glu Gly Lys Leu Ile Phe

450 455 460

Cys Asn Gly Val Val Leu His Arg Leu Gln Cys Val Arg Gly Phe Gly

465 470 475 480

Glu Trp Ile Asp Ser Ile Val Glu Phe Ser Ser Asn Leu Gln Asn Met

485 490 495

Asn Ile Asp Ile Ser Ala Phe Ser Cys Ile Ala Ala Leu Ala Met Val

500 505 510

Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Gln

515 520 525

Asn Lys Ile Val Asn Cys Leu Lys Asp His Val Thr Phe Asn Asn Gly

530 535 540

Gly Leu Asn Arg Pro Asn Tyr Leu Ser Lys Leu Leu Gly Lys Leu Pro

545 550 555 560

Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu

565 570 575

Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Ala Ile Ile Asp Lys Leu Phe

580 585 590

Leu Asp Thr Leu Pro Phe

595

<210> 44

<211> 535

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A2 Isoform 2

<400> 44

Met Asp Asn Tyr Ser Thr Gly Tyr Asp Val Lys Pro Pro Cys Leu Tyr

1 5 10 15

Gln Met Pro Leu Ser Gly Gln Gln Ser Ser Ile Lys Val Glu Asp Ile

20 25 30

Gln Met His Asn Tyr Gln Gln His Ser His Leu Pro Pro Gln Ser Glu

35 40 45

Glu Met Met Pro His Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Lys Pro Ser Ser Pro

50 55 60

Pro Thr Pro Thr Thr Pro Gly Phe Gln Val Gln His Ser Pro Met Trp

65 70 75 80

Asp Asp Pro Gly Ser Leu His Asn Phe His Gln Asn Tyr Val Ala Thr

85 90 95

Thr His Met Ile Glu Gln Arg Lys Thr Pro Val Ser Arg Leu Ser Leu

100 105 110

Phe Ser Phe Lys Gln Ser Pro Pro Gly Thr Pro Val Ser Ser Cys Gln

115 120 125

Met Arg Phe Asp Gly Pro Leu His Val Pro Met Asn Pro Glu Pro Ala

130 135 140

Gly Ser His His Val Val Asp Gly Gln Thr Phe Ala Val Pro Asn Pro

145 150 155 160

Ile Arg Lys Pro Ala Ser Met Gly Phe Pro Gly Leu Gln Ile Gly His

165 170 175

Ala Ser Gln Leu Leu Asp Thr Gln Val Pro Ser Pro Pro Ser Arg Gly

180 185 190

Ser Pro Ser Asn Glu Gly Leu Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala

195 200 205

Cys Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe

210 215 220

Lys Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys

225 230 235 240

Asn Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg

245 250 255

Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr

260 265 270

Asp Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser

275 280 285

Pro Gln Glu Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Val Ser Leu Ile Ser Ala

290 295 300

Leu Val Arg Ala His Val Asp Ser Asn Pro Ala Met Thr Ser Leu Asp

305 310 315 320

Tyr Ser Arg Phe Gln Ala Asn Pro Asp Tyr Gln Met Ser Gly Asp Asp

325 330 335

Thr Gln His Ile Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Thr Gly Ser Met Glu

340 345 350

Ile Ile Arg Gly Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Asp Leu Pro

355 360 365

Lys Ala Asp Gln Asp Leu Leu Phe Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe

370 375 380

Val Leu Arg Leu Ala Tyr Arg Ser Asn Pro Val Glu Gly Lys Leu Ile

385 390 395 400

Phe Cys Asn Gly Val Val Leu His Arg Leu Gln Cys Val Arg Gly Phe

405 410 415

Gly Glu Trp Ile Asp Ser Ile Val Glu Phe Ser Ser Asn Leu Gln Asn

420 425 430

Met Asn Ile Asp Ile Ser Ala Phe Ser Cys Ile Ala Ala Leu Ala Met

435 440 445

Val Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu

450 455 460

Gln Asn Lys Ile Val Asn Cys Leu Lys Asp His Val Thr Phe Asn Asn

465 470 475 480

Gly Gly Leu Asn Arg Pro Asn Tyr Leu Ser Lys Leu Leu Gly Lys Leu

485 490 495

Pro Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr

500 505 510

Leu Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Ala Ile Ile Asp Lys Leu

515 520 525

Phe Leu Asp Thr Leu Pro Phe

530 535

<210> 45

<211> 598

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A1 Isoform 1

<400> 45

Met Pro Cys Ile Gln Ala Gln Tyr Gly Thr Pro Ala Pro Ser Pro Gly

1 5 10 15

Pro Arg Asp His Leu Ala Ser Asp Pro Leu Thr Pro Glu Phe Ile Lys

20 25 30

Pro Thr Met Asp Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Pro Ala Ala Pro Thr

35 40 45

Ala Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Phe

50 55 60

Asp Thr Phe Leu Tyr Gln Leu Pro Gly Thr Val Gln Pro Cys Ser Ser

65 70 75 80

Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Ser Pro

85 90 95

Ala Ser Ala Ser Phe Lys Phe Glu Asp Phe Gln Val Tyr Gly Cys Tyr
100 105 110
Pro Gly Pro Leu Ser Gly Pro Val Asp Glu Ala Leu Ser Ser Ser Gly
115 120 125
Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Pro Cys Ser Ala Pro Ser Pro Ser Thr Pro

130 135 140
Ser Phe Gln Pro Pro Gln Leu Ser Pro Trp Asp Gly Ser Phe Gly His
145 150 155 160
Phe Ser Pro Ser Gln Thr Tyr Glu Gly Leu Arg Ala Trp Thr Glu Gln
165 170 175
Leu Pro Lys Ala Ser Gly Pro Pro Gln Pro Pro Ala Phe Phe Ser Phe
180 185 190
Ser Pro Pro Thr Gly Pro Ser Pro Ser Leu Ala Gln Ser Pro Leu Lys

195 200 205
Leu Phe Pro Ser Gln Ala Thr His Gln Leu Gly Glu Gly Glu Ser Tyr
210 215 220
Ser Met Pro Thr Ala Phe Pro Gly Leu Ala Pro Thr Ser Pro His Leu
225 230 235 240
Glu Gly Ser Gly Ile Leu Asp Thr Pro Val Thr Ser Thr Lys Ala Arg
245 250 255
Ser Gly Ala Pro Gly Gly Ser Glu Gly Arg Cys Ala Val Cys Gly Asp

260 265 270
Asn Ala Ser Cys Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys
275 280 285
Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Ile Cys Leu
290 295 300
Ala Asn Lys Asp Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln
305 310 315 320
Phe Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val

325 330 335
Val Arg Thr Asp Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys

340 345 350

Pro Lys Gln Pro Pro Asp Ala Ser Pro Ala Asn Leu Leu Thr Ser Leu

355 360 365

Val Arg Ala His Leu Asp Ser Gly Pro Ser Thr Ala Lys Leu Asp Tyr

370 375 380

Ser Lys Phe Gln Glu Leu Val Leu Pro His Phe Gly Lys Glu Asp Ala

385 390 395 400

Gly Asp Val Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Ser Gly Ser Leu Glu Val

405 410 415

Ile Arg Lys Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Glu Leu Ser Pro

420 425 430

Ala Asp Gln Asp Leu Leu Leu Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Ile

435 440 445

Leu Arg Leu Ala Tyr Arg Ser Lys Pro Gly Glu Gly Lys Leu Ile Phe

450 455 460

Cys Ser Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Ala Arg Gly Phe Gly

465 470 475 480

Asp Trp Ile Asp Ser Ile Leu Ala Phe Ser Arg Ser Leu His Ser Leu

485 490 495

Leu Val Asp Val Pro Ala Phe Ala Cys Leu Ser Ala Leu Val Leu Ile

500 505 510

Thr Asp Arg His Gly Leu Gln Glu Pro Arg Arg Val Glu Glu Leu Gln

515 520 525

Asn Arg Ile Ala Ser Cys Leu Lys Glu His Val Ala Ala Val Ala Gly

530 535 540

Glu Pro Gln Pro Ala Ser Cys Leu Ser Arg Leu Leu Gly Lys Leu Pro

545 550 555 560

Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu

565 570 575

Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Pro Ile Ile Asp Lys Ile Phe

580 585 590

Met Asp Thr Leu Pro Phe

595

<210> 46

<211> 611

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A1 Isoform 2

<400> 46

Met Trp Leu Ala Lys Ala Cys Trp Ser Ile Gln Ser Glu Met Pro Cys

1 5 10 15

Ile Gln Ala Gln Tyr Gly Thr Pro Ala Pro Ser Pro Gly Pro Arg Asp

20 25 30

His Leu Ala Ser Asp Pro Leu Thr Pro Glu Phe Ile Lys Pro Thr Met

35 40 45

Asp Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Pro Ala Ala Pro Thr Ala Leu Pro

50 55 60

Ser Phe Ser Thr Phe Met Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Phe Asp Thr Phe

65 70 75 80

Leu Tyr Gln Leu Pro Gly Thr Val Gln Pro Cys Ser Ser Ala Ser Ser

85 90 95

Ser Ala Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Ser Pro Ala Ser Ala

100 105 110

Ser Phe Lys Phe Glu Asp Phe Gln Val Tyr Gly Cys Tyr Pro Gly Pro

115 120 125

Leu Ser Gly Pro Val Asp Glu Ala Leu Ser Ser Ser Gly Ser Asp Tyr

130 135 140

Tyr Gly Ser Pro Cys Ser Ala Pro Ser Pro Ser Thr Pro Ser Phe Gln

145 150 155 160

Pro Pro Gln Leu Ser Pro Trp Asp Gly Ser Phe Gly His Phe Ser Pro

165 170 175

Ser Gln Thr Tyr Glu Gly Leu Arg Ala Trp Thr Glu Gln Leu Pro Lys

180 185 190

Ala Ser Gly Pro Pro Gln Pro Pro Ala Phe Phe Ser Phe Ser Pro Pro
195 200 205
Thr Gly Pro Ser Pro Ser Leu Ala Gln Ser Pro Leu Lys Leu Phe Pro
210 215 220
Ser Gln Ala Thr His Gln Leu Gly Glu Gly Glu Ser Tyr Ser Met Pro

225 230 235 240
Thr Ala Phe Pro Gly Leu Ala Pro Thr Ser Pro His Leu Glu Gly Ser
245 250 255
Gly Ile Leu Asp Thr Pro Val Thr Ser Thr Lys Ala Arg Ser Gly Ala
260 265 270
Pro Gly Gly Ser Glu Gly Arg Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ser
275 280 285
Cys Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe

290 295 300
Lys Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Ile Cys Leu Ala Asn Lys
305 310 315 320
Asp Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Phe Cys Arg
325 330 335
Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr
340 345 350
Asp Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Gln

355 360 365
Pro Pro Asp Ala Ser Pro Ala Asn Leu Leu Thr Ser Leu Val Arg Ala
370 375 380
His Leu Asp Ser Gly Pro Ser Thr Ala Lys Leu Asp Tyr Ser Lys Phe
385 390 395 400
Gln Glu Leu Val Leu Pro His Phe Gly Lys Glu Asp Ala Gly Asp Val
405 410 415
Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Ser Gly Ser Leu Glu Val Ile Arg Lys

420 425 430
Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Glu Leu Ser Pro Ala Asp Gln

435 440 445

Asp Leu Leu Leu Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Ile Leu Arg Leu

450 455 460

Ala Tyr Arg Ser Lys Pro Gly Glu Gly Lys Leu Ile Phe Cys Ser Gly

465 470 475 480

Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Ala Arg Gly Phe Gly Asp Trp Ile

485 490 495

Asp Ser Ile Leu Ala Phe Ser Arg Ser Leu His Ser Leu Leu Val Asp

500 505 510

Val Pro Ala Phe Ala Cys Leu Ser Ala Leu Val Leu Ile Thr Asp Arg

515 520 525

His Gly Leu Gln Glu Pro Arg Arg Val Glu Glu Leu Gln Asn Arg Ile

530 535 540

Ala Ser Cys Leu Lys Glu His Val Ala Ala Val Ala Gly Glu Pro Gln

545 550 555 560

Pro Ala Ser Cys Leu Ser Arg Leu Leu Gly Lys Leu Pro Glu Leu Arg

565 570 575

Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu Lys Leu Glu

580 585 590

Asp Leu Val Pro Pro Pro Pro Ile Ile Asp Lys Ile Phe Met Asp Thr

595 600 605

Leu Pro Phe

610

<210> 47

<211> 325

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A1 Isoform 3

<400> 47

Met Pro Cys Ile Gln Ala Gln Tyr Gly Thr Pro Ala Pro Ser Pro Gly

1 5 10 15

Pro Arg Asp His Leu Ala Ser Asp Pro Leu Thr Pro Glu Phe Ile Lys

20 25 30

Pro Thr Met Asp Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Pro Ala Ala Pro Thr

35 40 45

Ala Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Phe

50 55 60

Asp Thr Phe Leu Tyr Gln Leu Pro Gly Thr Val Gln Pro Cys Ser Ser

65 70 75 80

Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Ser Pro

85 90 95

Ala Ser Ala Ser Phe Lys Phe Glu Asp Phe Gln Val Tyr Gly Cys Tyr

100 105 110

Pro Gly Pro Leu Ser Gly Pro Val Asp Glu Ala Leu Ser Ser Ser Gly

115 120 125

Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Pro Cys Ser Ala Pro Ser Pro Ser Thr Pro

130 135 140

Ser Phe Gln Pro Pro Gln Leu Ser Pro Trp Asp Gly Ser Phe Gly His

145 150 155 160

Phe Ser Pro Ser Gln Thr Tyr Glu Gly Leu Arg Ala Trp Thr Glu Gln

165 170 175

Leu Pro Lys Ala Ser Gly Pro Pro Gln Pro Pro Ala Phe Phe Ser Phe

180 185 190

Ser Pro Pro Thr Gly Pro Ser Pro Ser Leu Ala Gln Ser Pro Leu Lys

195 200 205

Leu Phe Pro Ser Gln Ala Thr His Gln Leu Gly Glu Gly Glu Ser Tyr

210 215 220

Ser Met Pro Thr Ala Phe Pro Gly Leu Ala Pro Thr Ser Pro His Leu

225 230 235 240

Glu Gly Ser Gly Ile Leu Asp Thr Pro Val Thr Ser Thr Lys Ala Arg

245 250 255

Ser Gly Ala Pro Gly Gly Ser Glu Gly Arg Cys Ala Val Cys Gly Asp

260 265 270

Asn Ala Ser Cys Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys

275 280 285

Gly Phe Phe Lys Val Pro Arg Ser Pro Arg Trp Gly Leu Leu Leu Glu

290 295 300

Met Glu Arg Gly Trp Pro His Pro Ile Gly Thr Cys Gly Leu Pro Leu

305 310 315 320

Gly Ser Pro Pro Ser

325

<210> 48

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 1

<400> 48

caauauagcc cuuccccucc 20

<210> 49

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 2

<400> 49

aacuggaacc uggaggggaa 20

<210> 50

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 3

<400> 50

uaacuggaac cuggaggggа 20

<210> 51

<400> 51

000

<210> 52

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 5

<400> 52

ccgcugcauu ugguacacgc 20

<210> 53

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 6

<400> 53

ugcggcgcag acauacagcu 20

<210> 54

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 7

<400> 54

gcagcggccc uugaucaaag 20

<210> 55

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 8

<400> 55

auacagcucg gaauacacca 20

<210> 56

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 9

<400> 56

ccugcgugua ccaaaugcag 20

<210> 57

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 10

<400> 57

gcggcccuug aucaaagugg 20

<210> 58

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 11

<400> 58

ggacugcuug aaguacaugg 20

<210> 59

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 12

<400> 59

cggguggcuc ucaagcgcgg 20

<210> 60

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 13

<400> 60

gacgacgagc uccugcuggg 20

<210> 61

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 14

<400> 61

gucgggguuc augaucuccg 20

<210> 62

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 15

<400> 62

gagggcuuga aguggaagag 20

<210> 63

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 16

<400> 63

gaugaaggcg gucccacgg 20

<210> 64

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 17

<400> 64

gaagguacug augcugggca 20

<210> 65

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 18

<400> 65

uccuccagcc uccagcccgg 20

<210> 66

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 19

<400> 66

agcaucagua ccuucgugga 20

<210> 67

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 20

<400> 67

cgacuacacc aagcugacca 20

<210> 68

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 21

<400> 68

uggucagcuu gguguagucg 20

<210> 69

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 22

<400> 69

gcuggacccg ccgaugaagg 20

<210> 70

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 23

<400> 70

uugaaguaca uggaggugcu 20

<210> 71

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 24

<400> 71

guacgggugg cucucaagcg 20

<210> 72

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 25

<400> 72

ccgcauaacu ggaaccugga 20

<210> 73

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 26

<400> 73

gggcacgugu gccgugugcg 20

<210> 74

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 27

<400> 74

uacggcgugc gaaccugcga 20

<210> 75

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 28

<400> 75

uggggacugc uugaaguaca 20

<210> 76

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 29

<400> 76

ccuuggcagc acugagauca 20

<210> 77

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 30

<400> 77

ccuugaucaa aguggaggag 20

<210> 78

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 31

<400> 78

ugcauuuggu acacgcagga 20

<210> 79

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 32

<400> 79

ugaucaaagu ggaggagggg 20

<210> 80

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 33

<400> 80

guggggaccg ccuucaucgg 20

<210> 81

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 34

<400> 81

aggagcucgu cgucuggcga 20

<210> 82

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 35

<400> 82

ccaccucggc uacgacccga 20

<210> 83

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 36

<400> 83

gcggcggcga gggcuugaag 20

<210> 84

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 37

<400> 84

cagcaucagu accuucgugg 20

<210> 85

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 38

<400> 85

gccgaugaag gcggucccca 20

<210> 86

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 39

<400> 86

ccgucggguc guagccgagg 20

<210> 87

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 40

<400> 87

cuacggcgug cgaaccugcg 20

<210> 88

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 41

<400> 88

ccauaacgcc cccgccugcg 20

<210> 89

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 42

<400> 89

auaacgcccc cgccugcggg 20

<210> 90

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 43

<400> 90

gccgcauaac uggaaccugg 20

<210> 91

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 44

<400> 91

gaaaucgaca guacugacau 20

<210> 92

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 45

<400> 92

uuucagaagu gucucagugu 20

<210> 93

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 46

<400> 93

gaagugucuc aguguuggaa 20

<210> 94

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 47

<400> 94

aguguuggaa ugguaaaaga 20

<210> 95

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 48

<400> 95

guacagauag ucugaaaggg 20

<210> 96

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 49

<400> 96

guguugaguc uguuaaagcu 20

<210> 97

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 50

<400> 97

gauagucuga aagggaggag 20

<210> 98

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 51

<400> 98

agucuguuaa agcucggaca 20

<210> 99

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 sgRNA 52

<400> 99

guccguacag auagucugaa 20

<210> 100

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NBRE

<400> 100

aaaaggtca 9

<210> 101

<400> 101

000

<210> 102

<400> 102

000

<210> 103

<400> 103

000

<210> 104

<400> 104

000

<210> 105

<400> 105

000

<210> 106

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A1 DBD #1

<400> 106

Ser Glu Gly Arg Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ser Cys Gln His
1 5 10 15

Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr
20 25 30

Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Ile Cys Leu Ala Asn Lys Asp Cys Pro
35 40 45
Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Phe Cys Arg Phe Gln Lys

50 55 60
Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu
65 70 75 80
Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys
85 90

<210> 107
<211> 93
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> NR4A1 DBD #2
<400> 107
Ser Glu Gly Arg Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ser Cys Gln His
1 5 10 15

Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr
20 25 30
Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Ile Cys Leu Ala Asn Lys Asp Cys Pro
35 40 45
Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Phe Cys Arg Phe Gln Lys
50 55 60
Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu
65 70 75 80

Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Gln
85 90

<210> 108
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> NR4A2 DBD #1
<400> 108

Asn Glu Gly Leu Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln His
1 5 10 15
Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr
20 25 30
Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro

35 40 45
Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys
50 55 60
Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu
65 70 75 80
Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys
85 90

<210> 109
<211> 93
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> NR4A2 DBD #2

<400> 109
Asn Glu Gly Leu Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln His
1 5 10 15
Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr
20 25 30
Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro
35 40 45
Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys
50 55 60

Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu
65 70 75 80
Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser
85 90

<210> 110
<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 DBD #1

<400> 110

Gly Glu Gly Thr Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln His
1 5 10 15

Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr
20 25 30

Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro
35 40 45

Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys
50 55 60

Cys Leu Ser Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu
65 70 75 80

Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys
85 90

<210> 111

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 DBD #2

<400> 111

Gly Glu Gly Thr Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln His
1 5 10 15

Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr
20 25 30

Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro
35 40 45

Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys
50 55 60

Cys Leu Ser Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu
65 70 75 80

Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser

85 90

<210> 112

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DBD with NBRE-binding TAL

<400> 112

Met Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn His Gly Gly

1 5 10 15

Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys Gln

50 55 60

Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly

65 70 75 80

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys

85 90 95

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

100 105 110

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

115 120 125

Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser

130 135 140

Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro

145 150 155 160

Val Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

165 170 175

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

180 185 190

Pro Val Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile

195 200 205

Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu

210 215 220

Leu Pro Val Cys Gln Ala His Gly

225 230

<210> 113

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DBD with NurRE-binding TAL #1

<400> 113

Met Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn His Gly Gly

1 5 10 15

Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys Gln

50 55 60

Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly

65 70 75 80

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys

85 90 95

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

100 105 110

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

115 120 125

Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser

130 135 140

Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro

145 150 155 160

Val Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

165 170 175

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

180 185 190

Pro Val Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile

195 200 205

Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu

210 215 220

Leu Pro Val Cys Gln Ala His Gly

225 230

<210> 114

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DBD with NurRE-binding TAL #2

<400> 114

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys Gln Ala His

20 25 30

Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly

35 40 45

Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys Gln Ala

50 55 60

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

65 70 75 80

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys Gln

85 90 95

Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly

100 105 110

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Cys

115 120 125

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

130 135 140

His Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

145 150 155 160

Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser

165 170 175

His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro

180 185 190

Val Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

195 200 205

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

210 215 220

Pro Val Cys Gln Ala His Gly

225 230

<210> 115

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZFP binding sequence #1

<400> 115

aaaggtcaa 9

<210> 116

<400> 116

000

<210> 117

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZFP binding sequence #3

<400> 117

gatatt 6

<210> 118

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZFP binding sequence #4

<400> 118

gccaat 6

<210> 119

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DBD with ZFP #1

<400> 119

Leu Glu Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser
1 5 10 15

Phe Ser Gln Ser Gly Asn Leu Thr Glu His Gln Arg Thr His Thr Gly
20 25 30

Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser
35 40 45

Gly His Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr
50 55 60

Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Arg Ala Asn Leu Arg
65 70 75 80

Ala His Gln Arg Thr His Thr Gly Lys Lys Thr Ser
85 90

<210> 120

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DBD with ZFP #2

<400> 120

Leu Glu Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser
1 5 10 15

Phe Ser His Lys Asn Ala Leu Gln Asn His Gln Arg Thr His Thr Gly

20 25 30

Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser

35 40 45

Gly Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Lys Lys Thr Ser

50 55 60

<210> 121

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DBD with ZFP #3

<400> 121

Leu Glu Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser

1 5 10 15

Phe Ser Asp Cys Arg Asp Leu Ala Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly

20 25 30

Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Thr

35 40 45

Gly Asn Leu Thr Val His Gln Arg Thr His Thr Gly Lys Lys Thr Ser

50 55 60

<210> 122

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A LBD #1

<400> 122

Pro Leu Gln Gln Glu Pro Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Ile

1 5 10 15

Cys Met Met Asn Ala Leu Val Arg Ala Leu Thr Asp Ser Thr Pro Arg

20 25 30

Asp Leu Asp Tyr Ser Arg Tyr Cys Pro Thr Asp Gln Ala Ala Ala Gly

35 40 45

Thr Asp Ala Glu His Val Gln Gln Phe Tyr Asn Leu Leu Thr Ala Ser
50 55 60
Ile Asp Val Ser Arg Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Thr Asp
65 70 75 80
Leu Pro Lys Glu Asp Gln Thr Leu Leu Ile Glu Ser Ala Phe Leu Glu
85 90 95
Leu Phe Val Leu Arg Leu Ser Ile Arg Ser Asn Thr Ala Glu Asp Lys

100 105 110
Phe Val Phe Cys Asn Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Leu Arg
115 120 125
Gly Phe Gly Glu Trp Leu Asp Ser Ile Lys Asp Phe Ser Leu Asn Leu
130 135 140
Gln Ser Leu Asn Leu Asp Ile Gln Ala Leu Ala Cys Leu Ser Ala Leu
145 150 155 160
Ser Met Ile Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu

165 170 175
Glu Leu Cys Asn Lys Ile Thr Ser Ser Leu Lys Asp His Gln Ser Lys
180 185 190
Gly Gln Ala Leu Glu Pro Thr Glu Ser Lys Val Leu Gly Ala Leu Val
195 200 205
Glu Leu Arg Lys Ile Cys Thr Leu Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu
210 215 220
Lys Leu Glu Asp Leu Val Ser Pro Pro Ser Ile Ile Asp Lys Leu Phe

225 230 235 240
Leu Asp Thr Leu Pro Phe
245

<210> 123
<211> 247
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> NR4A LBD #2
<400> 123

Ser Pro Leu Gln Gln Glu Pro Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro
1 5 10 15
Ile Cys Met Met Asn Ala Leu Val Arg Ala Leu Thr Asp Ser Thr Pro
20 25 30
Arg Asp Leu Asp Tyr Ser Arg Tyr Cys Pro Thr Asp Gln Ala Ala Ala

35 40 45
Gly Thr Asp Ala Glu His Val Gln Gln Phe Tyr Asn Leu Leu Thr Ala
50 55 60
Ser Ile Asp Val Ser Arg Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Thr
65 70 75 80
Asp Leu Pro Lys Glu Asp Gln Thr Leu Leu Ile Glu Ser Ala Phe Leu
85 90 95
Glu Leu Phe Val Leu Arg Leu Ser Ile Arg Ser Asn Thr Ala Glu Asp

100 105 110
Lys Phe Val Phe Cys Asn Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Leu
115 120 125
Arg Gly Phe Gly Glu Trp Leu Asp Ser Ile Lys Asp Phe Ser Leu Asn
130 135 140
Leu Gln Ser Leu Asn Leu Asp Ile Gln Ala Leu Ala Cys Leu Ser Ala
145 150 155 160
Leu Ser Met Ile Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val

165 170 175
Glu Glu Leu Cys Asn Lys Ile Thr Ser Ser Leu Lys Asp His Gln Ser
180 185 190
Lys Gly Gln Ala Leu Glu Pro Thr Glu Ser Lys Val Leu Gly Ala Leu
195 200 205
Val Glu Leu Arg Lys Ile Cys Thr Leu Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr
210 215 220
Leu Lys Leu Glu Asp Leu Val Ser Pro Pro Ser Ile Ile Asp Lys Leu

225 230 235 240
Phe Leu Asp Thr Leu Pro Phe

245