

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-530979

(P2020-530979A)

(43) 公表日 令和2年11月5日(2020.11.5)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00 (2006.01) C 1 2 M 1/00 A 4 B 0 2 9

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 91 頁)

(21) 出願番号 特願2019-571732 (P2019-571732)
 (86) (22) 出願日 平成30年6月30日 (2018. 6. 30)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年1月30日 (2020. 1. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/040519
 (87) 国際公開番号 W02019/006436
 (87) 国際公開日 平成31年1月3日 (2019. 1. 3)
 (31) 優先権主張番号 62/527, 339
 (32) 優先日 平成29年6月30日 (2017. 6. 30)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/551, 069
 (32) 優先日 平成29年8月28日 (2017. 8. 28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 518454564
 インスクリプタ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 コロラド 80301,
 ボールダー, セントラル アベニュー
 5500, スイート 220
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳
 (72) 発明者 マスケリエ、ドン
 アメリカ合衆国 80301 コロラド州
 ボールダー セントラル アベニュー
 5500 スイート 220

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自動細胞処理方法、モジュール、機器及びシステム

(57) 【要約】

例示的な実施形態において、1つ又は複数の細胞の内部の核酸配列への複数の編集を自動化する自動マルチモジュール細胞編集機器が提供される。

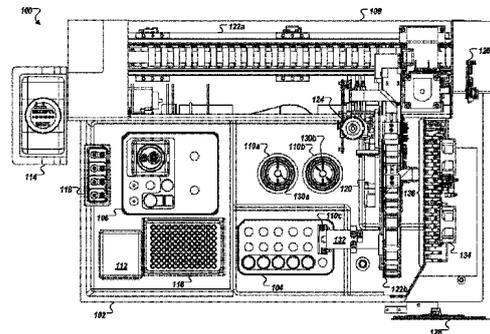


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

自動マルチモジュール細胞編集機器において、
モジュールの幾つかの全てを収容する筐体と、
細胞を受容するレセプタクルと、
核酸を受容する 1 つ又は複数のレセプタクルと、
前記核酸を前記細胞に導入する形質転換モジュールと、
前記形質転換モジュールにおける細胞の形質転換後、前記細胞が回復することを可能にする回復モジュールと、
前記導入された核酸が前記細胞内の核酸を編集することを可能にする編集モジュールと、
ユーザ入力及び予めプログラムされたスクリプトの選択のうち少なくとも一方に基づいて、前記自動マルチモジュール細胞編集機器を動作させるプロセッサと
を備える、自動マルチモジュール細胞編集機器。

10

【請求項 2】

前記 1 つ又は複数のレセプタクル内の前記核酸は、骨格及び編集カセットを有し、及び前記自動マルチモジュール細胞編集機器は、核酸アセンブリモジュールを更に備える、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 3】

前記核酸アセンブリモジュールは、磁石を有する、請求項 2 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

20

【請求項 4】

前記核酸アセンブリモジュールは等温核酸アセンブリを実行するように構成される、請求項 3 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 5】

前記編集モジュール及び前記回復モジュールは結合される、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 6】

前記細胞を成長させる成長モジュールを更に備える、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 7】

前記成長モジュールは前記成長する細胞の光学濃度を測定する、請求項 6 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

30

【請求項 8】

光学濃度は連続して測定される、請求項 7 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 9】

前記プロセッサは、前記細胞がユーザによって要求される時間に標的光学濃度に達するように、前記成長モジュール内の成長条件を調整するように構成される、請求項 6 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 10】

前記細胞を受容するレセプタクル及び前記核酸を受容する 1 つ又は複数のレセプタクルは、試薬カートリッジ内に収容される、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

40

【請求項 11】

細胞編集に必要な幾つか又は全ての試薬は、前記試薬カートリッジ内に収容される、請求項 10 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 12】

前記試薬カートリッジ内に収容される前記試薬は、前記プロセッサによって読み出されるスクリプトによって位置特定可能である、請求項 11 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 13】

50

前記試薬カートリッジは試薬を含み、且つキットにおいて提供される、請求項 1 2 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 1 4】

前記形質転換モジュールは電気穿孔デバイスを含む、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 1 5】

前記電気穿孔デバイスはフロースルー電気穿孔デバイスである、請求項 1 4 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 1 6】

前記細胞を濃縮させ、且つ前記細胞をエレクトロコンピテントにさせるように構成された濾過モジュールを更に備える、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

10

【請求項 1 7】

自動マルチモジュール細胞編集機器において、
モジュールの幾つか又は全てを収容する筐体と、
細胞を受容するレセプタクルと、
核酸を受容する少なくとも 1 つのレセプタクルと、
骨格及び編集カセットをアSEMBルする核酸アSEMBリモジュールと、
前記細胞を成長させる成長モジュールと、

20

アSEMBルされた核酸を前記細胞に導入するためのエレクトロポレータを含む形質転換モジュールと、

前記アSEMBルされた核酸が前記細胞内の核酸を編集することを可能にする編集モジュールと、

ユーザ入力及び予めプログラムされたスクリプトの選択のうちの少なくとも一方に基づいて、前記自動マルチモジュール細胞編集機器を動作させるプロセッサと
を備える、自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 1 8】

前記自動マルチモジュール細胞編集機器において細胞編集を実行するための試薬を収容する少なくとも 1 つの試薬カートリッジを更に備える、請求項 1 7 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 1 9】

前記細胞及び前記核酸のための前記レセプタクルは、前記試薬カートリッジ内に配置される、請求項 1 8 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

30

【請求項 2 0】

自動マルチモジュール細胞編集機器において、
モジュールの幾つか又は全てを収容する筐体と、
細胞を受容するレセプタクルと、
核酸を受容する少なくとも 1 つのレセプタクルと、

a) 骨格及び編集カセットをアSEMBルし、且つ b) アSEMBリ後、アSEMBルされた核酸を脱塩する核酸アSEMBリモジュールと、

前記細胞を成長させる成長モジュールと、
前記細胞を濃縮させ、且つ前記細胞をエレクトロコンピテントにさせる濾過モジュールと

40

、
前記アSEMBルされた核酸を前記細胞に導入するためのフロースルーエレクトロポレータを含む形質転換モジュールと、

前記形質転換モジュールにおける電気穿孔後、前記細胞が回復することを可能にし、且つ前記核酸が前記細胞を編集することを可能にする、回復及び編集結合モジュールと、

ユーザ入力に基づいて前記自動マルチモジュール細胞編集機器を動作させるプロセッサと
を備える、自動マルチモジュール細胞編集機器。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

以下の考察において、背景及び紹介目的で特定の物品及び方法について説明する。ここに含まれるものは、先行技術であることを「認める」ものとして解釈されるべきではない。適切な場合、本出願人は、適切な法律規定下において、ここで参照される物品及び方法が先行技術をなさないことを示す権利を明示的に留保する。

【背景技術】

【0002】

人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集は、核酸への変更が生体のゲノムにおいて行われる方法である。特定のヌクレアーゼは、ゲノムの標的領域において部位特異的二本鎖切断を生じさせ、この切断は、非相同末端結合又は相同組換えによって修復することができ、標的編集を生じさせる。しかしながら、これらの方法は、低効率性及び細胞形質転換に伴う問題、成長測定及び細胞選択に起因して自動化に対応していなかった。更に、従来のベンチトップデバイスは、必ずしも自動化されたモジュールシステムに良好にスケールアップ及び統合されるわけではない。したがって、編集された細胞集団を作成する方法及びシステムは、厄介なままであり、再帰的技法を用いて複数ラウンドの編集を導入するという問題により、作成することができる細胞集団の性質及び複雑性が制限される。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

したがって、編集された細胞が、自動化された機器外部での更なる実験に使用可能なである、アセンブルされた核酸及び他の生体分子を生体細胞に自動的に導入するための自動化機器、システム及び方法が必要とされている。

20

【課題を解決するための手段】

【0004】

特定の実施形態では、複数の細胞内の1つ又は複数の標的ゲノム領域のヌクレアーゼ特異的なゲノム編集の自動方法が使用され、方法は、自動マルチモジュール細胞編集機器において実行される。これらの方法は、所望のゲノム変更で関心がある生体細胞のライブラリの生成に使用することができる。本明細書に記載される自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて実行される自動方法は、多様なヌクレアーゼ特異的ゲノム編集技法と併用することができ、1つ又は複数の選択可能なマーカの使用あり又はなしで使用することができる。

30

【0005】

したがって、本開示は、選択された実施形態において、ヌクレアーゼ特異的ゲノム編集を含む自動マルチモジュール細胞編集のためのモジュール、機器及びシステムを提供する。本開示の自動マルチモジュール細胞編集機器の他の特定の実施形態は、再帰的ゲノム編集に向けて、例えば機器内の2つ以上の編集動作を通して細胞集団の1つ又は複数の細胞内部のゲノムに複数の編集を順次導入するように設計される。

【0006】

したがって、本明細書において、自動マルチモジュール細胞編集機器であって、モジュールの幾つか又は全てを収容するように構成された筐体と、細胞を受けるように構成されたレセプタクルと、核酸を受けるように構成された1つ又は複数のレセプタクルと、核酸を細胞に導入するように構成された形質転換モジュールと、形質転換モジュールにおける細胞の形質転換後、細胞が回復することを可能にするように構成された回復モジュールと、細胞に形質転換された核酸が細胞内の核酸を編集することを可能にするように構成された編集モジュールと、ユーザ入力及び/又は適切なコントローラスクリプトの選択に基づいて、自動マルチモジュール細胞編集機器を動作させるように構成されたプロセッサを含む自動マルチモジュール細胞編集機器の実施形態が提供される。

40

【0007】

幾つかの態様では、1つ又は複数のレセプタクル内の核酸は、骨格及び編集カセットを含み、及び自動マルチモジュール細胞編集機器は、核酸アセンブリモジュールを更に含む

50

。幾つかの態様では、核酸アセンブリモジュールは、磁石を含み、幾つかの態様では、核酸アセンブリモジュールは、1つの等温反応を用いてアセンブリを実行するように構成される。他の態様では、核酸アセンブリモジュールは、増幅及び/又はライゲーションを実行するように構成される。

【0008】

自動マルチモジュール細胞編集機器の幾つかの態様では、編集モジュール及び回復モジュールは、結合される。

幾つかの態様では、自動マルチモジュール細胞編集機器は、細胞を成長させるように構成された成長モジュールを更に含み得、幾つかの実装形態では、成長モジュールは、成長する細胞の光学濃度を連続して又は間隔を置いて測定する。幾つかの実装形態では、プロセッサは、細胞が、ユーザによって要求される時間に標的光学濃度に達するように、成長モジュール内の成長条件を調整するように構成される。更に、幾つかの実装形態では、ユーザは、成長プロセスに関して更新情報を提供され得る。

10

【0009】

幾つかの態様では、自動マルチモジュール細胞編集機器は、試薬カートリッジであって、細胞を受けるように構成されたレセプタクル及び核酸を受けるように構成された1つ又は複数のレセプタクルが試薬カートリッジ内に含まれる、試薬カートリッジを含む。更に、試薬カートリッジは、細胞編集に必要な幾つか又は全ての試薬を含むこともできる。幾つかの実装形態では、試薬カートリッジ内に含まれる試薬は、プロセッサによって読み出されるスクリプトによって位置特定可能であり、幾つかの実装形態では、試薬カートリッジは、試薬を含み、且つキットにおいて提供される。

20

【0010】

幾つかの態様では、自動マルチモジュール細胞編集機器の形質転換モジュールは、電気穿孔デバイスを含み、幾つかの実装形態では、電気穿孔デバイスは、フロースルー電気穿孔デバイスである。

【0011】

自動マルチモジュール細胞編集機器の幾つかの態様は、液体を交換し、且つ/又は細胞を濃縮させるように構成された濾過モジュールを更に含む。特定の態様では、濾過システムは、細胞をエレクトロコンピテントにさせるのにも使用され得る。

【0012】

他の実施形態では、自動マルチモジュール細胞編集機器であって、モジュールの幾つか又は全てを収容するように構成された筐体と、細胞を受けるように構成されたレセプタクルと、核酸骨格及び編集カセットを受けるように構成された少なくとも1つのレセプタクルと、a) 骨格及び編集カセットをアセンブルし、且つb) アセンブリ後、アセンブルされた核酸を脱塩するように構成された核酸アセンブリモジュールと、細胞を成長させ、且つ細胞の光学濃度(OD: optical density)を測定するように構成された成長モジュールと、細胞を濃縮させ、且つ細胞をエレクトロコンピテントにさせるように構成された濾過モジュールと、アセンブルされた核酸を細胞に導入するためのフロースルーエレクトロポレータを含む形質転換モジュールと、形質転換モジュールにおける電気穿孔後、細胞が回復することを可能にし、且つアセンブルされた核酸が細胞内の核酸を編集することを可能にするように構成された回復及び編集結合モジュールと、ユーザ入力及び/又は適切なコントローラスクリプトの選択に基づいて自動マルチモジュール細胞編集機器を動作させるように構成されたプロセッサとを含む自動マルチモジュール細胞編集機器が提供される。

30

40

【0013】

幾つかの実装形態では、自動マルチモジュール細胞編集機器は、複数の試薬リザーバと、フロースルー電気穿孔デバイスと、複数の試薬リザーバに配置された試薬を分注し、且つフロースルー電気穿孔デバイスを制御するためのプロセッサ可読のスクリプトとを含む試薬カートリッジを提供する。

【0014】

50

幾つかの態様では、成長モジュールは、温度被制御回転成長バイアルと、バイアルをスピンさせるモータアセンブリと、バイアル内の例えばODを測定する分光光度計と、ユーザから入力を受け入れ、且つ細胞の成長速度を制御するためのプロセッサとを含む。成長モジュールは、回転成長バイアル内の成長する細胞のODを連続して又は設定された間隔で自動的に測定し、且つユーザによって指定された標的OD及び標的時間に細胞の成長を制御し得る。すなわち、本明細書に記載される方法及びデバイスは、細胞の成長をリアルタイムでモニタし、ユーザによって指定された標的時間に標的ODに達するように回転成長バイアルの温度をリアルタイムで調整するフィードバックループを提供する。

【0015】

自動マルチモジュール細胞編集機器の幾つかの態様では、形質転換モジュールは、フロースルー電気穿孔デバイスを含み、フロースルー電気穿孔デバイスは、細胞試料及びアセンブルされた核酸をフロースルー電気穿孔デバイス内に導入する入口及び入口チャンネルと、電気穿孔された細胞試料がフロースルー電気穿孔デバイスから出るための出口及び出口チャンネルと、入口チャンネルと出口チャンネルとの間を横切り、且つ入口チャンネルと出口チャンネルとの間に位置するフローチャンネルと、2つ以上の電極であって、第1の入口チャンネルとのフローチャンネルの交点と出口チャンネルとのフローチャンネルの交点との間に位置し、フローチャンネル内の細胞試料と流体連通し、且つ細胞試料に1つ又は複数の電気パルスを印加するように構成された2つ以上の電極とを含む。特定の態様では、フロースルー電気穿孔デバイスは、平行な2つ以上のフローチャンネルを含むことができる。

【0016】

自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて、細胞内でゲノム編集動作を実行するシステムも提供される。これらのシステムは、任意選択的に、機器と、細胞準備、核酸準備、編集された細胞集団の選択、編集された細胞集団の機能分析、編集された細胞集団の貯蔵等の他のデバイス又はレセプタクルとの間の1つ又は複数の境界部分を含み得る。

【0017】

加えて、自動マルチモジュール細胞編集機器を用いる方法が提供される。幾つかの方法では、エレクトロコンピテント細胞は、好適には、所望の光学濃度で機器に直接提供され、且つ形質転換モジュールに移される。幾つかの方法では、細胞は、成長モジュールに移され、成長モジュールにおいて所望の光学濃度まで成長する。次に、細胞は、成長バイアルから濾過モジュールに移され、濾過モジュールにおいて、細胞は、濃縮され、任意選択的にエレクトロコンピテントにされる。次に、細胞は、形質転換モジュールに移される。

【0018】

幾つかの態様では、アセンブルされた核酸カセットは、本機器に直接提供され、且つ形質転換モジュールに移される。幾つかの態様では、ベクター骨格及び1つ又は複数のオリゴヌクレオチド編集カセット等の核酸は、細胞の導入若しくは準備と同時に又は細胞の導入若しくは準備に続けて核酸アセンブリモジュールに移される。この態様では、核酸は、アセンブルされ、脱塩され（例えば、液体交換又は浸透を通して）、且つ形質転換モジュールに移されて、電気穿孔されてエレクトロコンピテント細胞になる。形質転換モジュールにおいて電気穿孔又はトランスフェクションが行われ、次に、細胞は、任意選択的に1つ又は複数のゲノム編集を含む細胞の選択を含む回復/編集モジュールに移される。回復/編集/選択後、細胞は、回収され、研究に直接使用されるか若しくは更なる研究に向けて貯蔵され得るか、又は機器内で編集ステップを繰り返すことにより、ゲノム編集の更なる1つのラウンド（又は複数のラウンド）を実行することができる。

【0019】

ヌクレアーゼ特異的ゲノム編集のための、自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて作成される細胞ライブラリも提供され、機器は、筐体と、細胞及び細胞内でのヌクレアーゼ特異的ゲノム編集イベントを促進する配列を含む1つ又は複数の合理的に設計された核酸を受けよう構成されたレセプタクルと、核酸を細胞に導入する形質転換モジュールと、ヌクレアーゼ特異的ゲノム編集イベントを細胞内で発生させる編集モジュールと、ユーザ入力に基づいて自動マルチモジュール細胞編集機器を動作させるように構成されたプ

10

20

30

40

50

ロセッサとを含み、自動機器によって作成されたヌクレアーゼ特異的ゲノム編集イベントは、合理的に設計された編集を有する個々の細胞を含む細胞ライブラリを作成させる。

【0020】

幾つかの態様では、細胞ライブラリは、飽和突然変異誘発細胞ライブラリを含む。幾つかの態様では、細胞ライブラリは、プロモータスワップ細胞ライブラリを含む。他の態様では、細胞ライブラリは、ターミネータスワップ細胞ライブラリを含む。更に他の態様では、細胞ライブラリは、一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) スワップ細胞ライブラリを含む。更に他の態様では、細胞ライブラリは、プロモータスワップ細胞ライブラリを含む。

【0021】

幾つかの実装形態では、ライブラリは、少なくとも100,000個の編集された細胞を含み、更に他の実装形態では、ライブラリは、少なくとも1,000,000個の編集された細胞を含む。

【0022】

幾つかの実装形態では、ヌクレアーゼ特異的ゲノム編集は、RGN特異的ゲノム編集である。好適な態様では、機器は、誘導型ヌクレアーゼの使用に向けて構成される。ヌクレアーゼは、例えば、化学誘導、ウィルス誘導、光誘導、温度誘導又は熱誘導され得る。

【0023】

幾つかの実装形態では、本機器は、単一のサイクルでの複数の細胞の多重化ゲノム編集を提供する。幾つかの態様では、本機器は、少なくとも5つの細胞のゲノムを単一のサイクルで編集する能力を有する。他の態様では、本機器は、少なくとも100個の細胞のゲノムを単一のサイクルで編集する能力を有する。更に他の態様では、本機器は、少なくとも1000個の細胞のゲノムを単一のサイクルで編集する能力を有する。更に他の態様では、本機器は、少なくとも10,000個の細胞のゲノムを単一のサイクルで編集する能力を有する。特定の態様では、自動マルチモジュール細胞編集機器は、少なくとも 10^4 個、 10^5 個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、 10^{12} 個、 10^{13} 個、 10^{14} 個又はそれを越える細胞のゲノムを単一のサイクルで編集する能力を有する。

【0024】

単一のサイクルでの編集で標的とすることができる細胞集団内のゲノム部位の数は、2 ~ 10,000,000個であり得る。

再帰的編集が関わる幾つかの実施形態では、自動マルチモジュール細胞編集機器は、2つ以上のゲノム編集を細胞に導入することを提供し、1つのゲノム編集が各サイクルで細胞集団のゲノムに追加される。したがって、幾つかの態様では、本開示の自動マルチモジュール細胞編集機器は、1サイクル当たり細胞集団中の細胞ごとに2つ以上の編集、細胞集団中の1細胞当たり3つ以上の編集、集団中の細胞ごとに5つ以上の編集又は単一のサイクルで細胞集団の細胞ごとに10以上の編集を順次提供するのにも有用である。

【0025】

特定の実施形態では、自動マルチモジュール細胞編集機器は、1サイクル当たり編集モジュールに導入される細胞の少なくとも10%という編集効率、好適には1サイクル当たり編集モジュールに導入される細胞の少なくとも20%という編集効率、より好適には1サイクル当たり編集モジュールに導入される細胞の少なくとも25%という編集効率、更に好適には1サイクル当たり自動マルチモジュール細胞編集機器の編集モジュールに導入される細胞の少なくとも30%という編集効率、更に好適には1サイクル当たり編集モジュールに導入される細胞の少なくとも40%という編集効率、更に好適には1サイクル当たり編集モジュールに導入される細胞の50%、60%、70%、80%、90%又はそれを越える編集効率を提供することが可能である。

【0026】

他の特徴、利点及び態様について以下により詳細に説明する。

添付図面は、本明細書に組み込まれ、本明細書の一部をなし、1つ又は複数の実施形態

10

20

30

40

50

を示し、説明と一緒にこれらの実施形態を説明する。添付図面は、必ずしも一定の縮尺で描かれているわけではない。添付のグラフ及び図に示されている任意の値、寸法は、単に例示を目的とし、実際の又は好適な値又は寸法を表すこともあれば表さないこともある。妥当な場合、土台となる特徴の説明を支援するために、幾つか又は全ての特徴は、示されないことがある。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】機器の一部として交換式カートリッジを用いて複数の細胞の多重化ゲノム編集を行う自動マルチモジュール細胞処理機器の一例の実施形態を示す平面図。

【図1B】機器の一部として交換式カートリッジを用いて複数の細胞の多重化ゲノム編集を行う自動マルチモジュール細胞処理機器の一例の実施形態を示す斜視図。

【図2A】図1A及び図1Bの自動マルチモジュール細胞処理機器の側面図。

【図2B】図1A及び図1Bの自動マルチモジュール細胞処理機器の正面図。

【図2C】自動マルチモジュール細胞処理機器の第2の例のシャーシを示す斜視図。

【図2D】自動マルチモジュール細胞処理機器の第2の例のシャーシを示す斜視図。

【図3A】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の細胞洗浄又は濃縮モジュールの側面図。

【図3B】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の細胞洗浄又は濃縮モジュールの斜視図。

【図3C】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の細胞洗浄又は濃縮モジュールの切り欠き断面図。

【図4】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する核酸アセンブリモジュール及び精製モジュールの一例の組合せを示す斜視図。

【図5A】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例のインライン電子専攻モジュールを示す模式図。

【図5B】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の使い捨てのフロースロース電気穿孔モジュールを示す斜視図。

【図5C】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の使い捨てのフロースロース電気穿孔モジュールを示す斜視図。

【図6A】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の洗浄カートリッジを示す。

【図6B】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の洗浄カートリッジを示す。

【図6C】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の試薬カートリッジを示す。

【図6D】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の試薬カートリッジを示す。

【図6E】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の試薬カートリッジを示す。

【図7A】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の濾過モジュールの機能ブロック図。

【図7B】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の濾過モジュールの斜視図。

【図7C】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の濾過モジュールの斜視図。

【図7D】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例のフィルタカートリッジの斜視図。

【図8A】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する例としての細胞成長モジュールを示す。

【図8B】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する例としての細胞成長モジ

10

20

30

40

50

ユーラを示す。

【図 8 C】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する例としての細胞成長モジュールを示す。

【図 8 D】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する例としての細胞成長モジュールを示す。

【図 8 E】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する例としての細胞成長モジュールを示す。

【図 8 F】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する例としての細胞成長モジュールを示す。

【図 9】自動マルチモジュール細胞処理機器の一例の方法のフローチャート。

10

【図 10 A】自動マルチモジュール細胞処理機器による細菌細胞の自動処理の第 1 の例の作業フローの流れ図。

【図 10 B】自動マルチモジュール細胞処理機器による細菌細胞の自動処理の第 2 の例の作業フローの流れ図。

【図 10 C】自動マルチモジュール細胞処理機器による酵母細胞の自動細胞処理の一例の作業フローの流れ図。

【図 11】自動マルチモジュール細胞処理機器に命令を提供し、自動マルチモジュール細胞処理機器からフィードバックを受信する一例のグラフィカルユーザインターフェースを示す模式図。

【図 12 A】複数の細胞の多重化ゲノム編集の自動マルチモジュール細胞処理機器の別の例の実施形態の機能ブロックシステム図。

20

【図 12 B】複数の細胞の再帰的多重化ゲノム編集の自動マルチモジュール細胞処理機器の更に別の例の実施形態の機能ブロックシステム図。

【図 13】自動マルチモジュール細胞処理機器において使用する一例の制御システムを示すブロック図。

【発明を実施するための形態】

【0028】

添付図面と併せて以下に記載される説明は、開示される主題の種々の例示的な実施形態の説明であることが意図される。特定の特徴及び機能が例示的な各実施形態と併せて説明されるが、それらの特定の特徴及び機能のそれぞれなしに、開示される実施形態が実施可能であることが当業者に明白になるであろう。

30

【0029】

本明細書に記載される技法の実施は、グリーン (Green) ら編、(1999年)、ゲノム解析：ラボラトリーマニュアルシリーズ (Genome Analysis: A Laboratory Manual Series) (第 I - IV 巻); ウィーナー (Weiner)、ガブリエル (Gabriel)、ステファン (Stephens) 編、(2007年)、遺伝的変異：ラボラトリーマニュアル (Genetic Variation: A Laboratory Manual); ディーフエンバハ (Dieffenbach)、ドベクスラー (Dvokslar) 編、(2003年)、PCR プライマー：ラボラトリーマニュアル (PCR Primer: A Laboratory Manual); ボーテル (Bowtell) 及びサムブルック (Sambrook) 著、(2003年)、バイオインフォマティクス：配列及びゲノム解析 (Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis); サムブルック (Sambrook) 及びラッセル (Russell) 著、(2006年)、分子クローニングからの濃縮プロトコール：ラボラトリーマニュアル (Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual); 並びにグリーン (Green) 及びサムブルック (Sambrook) 著、(分子クローニング：ラボラトリーマニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第 4 版、コールドスプリングハーバ研究所プレス (Cold Spring Harbor Laboratory

40

50

Press)、ニューヨーク州コールドスプリングハーバ(Cold Spring Harbor, N. Y.)、2014年); ストライヤー, L (Stryer, L)、(1995年)、生化学(第4版)、W. H. フリーマン(W. H. Freeman)、ニューヨーク州ニューヨーク(New York, N. Y.); ゲイト(Gait)著、「オリゴヌクレオチド合成: 実用手法(Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach)」、1984年、IRLプレス(IRL Press)、ロンドン(London); ネルソン(Nelson)及びコックス(Cox)著、(2000年)、レーニンジャー(Lehninger)、生化学の原理(Principles of Biochemistry)、第3版、W. H. フリーマン出版(W. H. Freeman Pub.)、ニューヨーク州ニューヨーク(New York, N. Y.); 並びにバーグ(Berg)ら著、(2002年)、生化学、第5版、W. H. フリーマン出版(W. H. Freeman Pub.)、ニューヨーク州ニューヨーク(New York, N. Y.)に記載の技法を利用し得、これらの全ては、あらゆる目的のために全体的に参照により本明細書に援用される。

10

20

30

40

50

【0030】

なお、本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈により明らかに別段のことが示される場合を除き、複数の対象物を含む。したがって、例えば、「オリゴ」への言及は、同じ機能を果たす1つ又は複数のオリゴを指し、「方法」への言及は、当業者に既知の同等のステップ及び方法への言及を含む等である。すなわち、別段のことが明示的に指示されない限り、本明細書で使用される場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」、「その(the)」という言葉は、「1つ又は複数」の意味を有する。更に、本明細書で使用し得る「左」、「右」、「上」、「下」、「前」、「後」、「横」、「高さ」、「長さ」、「幅」、「上方」、「下方」、「内部」、「外部」、「内側」、「外側」等の用語は、単に視点を記述し、本開示の実施形態を任意の特定の向き又は構成に必ずしも限定するわけではないことを理解されたい。更に、「第1の」、「第2の」、「第3の」等の用語は、単に本明細書に開示される幾つかの部分、構成要素、ステップ、動作、機能及び/又は評価基準の1つを識別し、同様に本開示の実施形態を任意の特定の構成又は向きに必ずしも限定するわけではない。

【0031】

更に、「概ね」、「近く」、「少ない」という用語及び同様の用語は、一般に、特定の実施形態では、20%、10%又は好適には5%のマージン内の識別された値を含む範囲及びそれらの間の任意の値を指す。

【0032】

別段のことが定義される場合を除き、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。

【0033】

本明細書において言及された全ての公開物(特許、公開出願及び非特許文献を含む)は、限定ではなく、本明細書に記載される方法、モジュール、機器及びシステムと併せて使用又は変更され得るデバイス、システム及び方法を説明及び開示する目的を含め、あらゆる目的のために参照により援用される。

【0034】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限との間にある各介在値及びその言及された範囲内の任意の他の言及された値又は介在値が本開示内に包含されることが理解される。これらの小範囲の上限及び下限は、小範囲に独立して含まれ得、また言及された範囲内の任意の特に除外された限度を受けて、本開示内にも包含される。言及された範囲が限度の一方又は両方を含む場合、それらの包含される限度の両方のいずれかを除外した範囲も本開示に含まれる。

【0035】

本明細書全体を通じた「一実施形態」又は「実施形態」への言及は、実施形態と併せて説明された特定の特徴、構造又は特性が、開示される主題の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体を通して種々の箇所での句「一実施形態では」又は「実施形態では」の出現は、必ずしも同じ実施形態を指すわけではない。

【0036】

更に、特定の特徴、構造又は特性は、1つ又は複数の実施形態において任意の適した様式で組み合わせられ得る。更に、開示された主題の実施形態は、その変更形態及び変形形態を包含することが意図される。

前置き及び概説

選択された実施形態では、本明細書に記載される自動マルチモジュール細胞編集機器、システム及び方法は、生体細胞における多重化ゲノム編集及び編集された細胞集団のライブラリを構築する方法において使用することができる。本明細書に開示される自動マルチモジュール細胞編集機器は、多様なゲノム編集技法、特にヌクレアーゼ特異的ゲノム編集と併用することができる。本開示の自動マルチモジュール細胞編集機器は、コード領域、非コード領域又は両方への種々のクラスのゲノム編集を含むライブラリを構築する方法を含め、生体細胞のゲノムを編集するゲノム部位をターゲティングする核酸配列を導入する新規の方法を提供する。自動マルチモジュール細胞編集機器は、複数の細胞にゲノム編集を単一のサイクルで導入し、それにより1つ又は複数のゲノム編集を有する細胞のライブラリを自動的に多重化して生成するのに特に適する。自動マルチモジュール細胞編集機器は、2つ以上の編集、例えば細胞集団の個々の細胞内の異なる標的ゲノム部位への編集を導入するのにも適する。1つであれ多数であれ関係なく、これらのゲノム編集は、好適には、合理的に設計された編集、すなわち特定の編集を細胞のゲノム内の標的領域に導入するように設計及び作成された核酸である。ゲノム編集イベントの促進に使用される配列は、ヌクレアーゼ切断のガイド、関心領域へのゲノム編集の導入及び/又は両方を支援する配列を含む。これらの配列は、細胞のゲノム内の特定の合理的に設計された編集を追跡できるようにする細胞のゲノムの領域への編集を含むこともできる。編集を細胞に導入するそのような方法は、例えば、「CRISPR可能な多重化ゲノム工学 (CRISPR enabled multiplexed genome engineering)」という名称のギル (Gill) らによる米国特許第9,982,278号明細書、「バーコード付きコンビナトリアルライブラリを生成する方法 (Methods for generating barcoded combinatorial libraries)」という名称のギル (Gill) らによる米国特許第10,017,760号明細書、米国特許出願第15/632,222号明細書に教示されている。

【0037】

そのような核酸及びオリゴヌクレオチド (又は「オリゴ」) は、限定ではなく、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド又はそれらの類似体のいずれかを含め、種々の長さを有し得るヌクレオチドの重合形態を含むことが意図される。例示的な実施形態で使用される核酸及びオリゴヌクレオチドは、化学合成又は続く酵素的修飾又はポリメラーゼ複製中に導入される安定性を強化するように1つ又は複数の位置において修飾することができる。これらの修飾は、限定ではなく、オリゴマーへの1つ又は複数のアルキル化核酸、ロックド核酸 (LNA: locked nucleic acid)、ペプチド核酸 (PNA: peptide nucleic acid)、ホスホン酸、ホスホチオエートの包含を含む。修飾ヌクレオチドの例には、限定ではなく、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシ

アミノメチル - 2 - チオウラシル、 - D - マンノシルキユーオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - D 4 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キユーオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 カルボキシプロピル) ウラシル、(a c p 3) w 及び 2 , 6 - ジアミノプリンがある。核酸分子は、塩基部分、糖部分又はリン酸骨格において修飾することもできる。
ヌクレアーゼ特異的ゲノム編集

選択された実施形態では、本明細書に記載される自動マルチモジュール細胞編集機器は、ヌクレアーゼ特異的ゲノム編集システムを利用する。編集を有機体のゲノムに提供する多数の異なるヌクレアーゼベースのシステムが存在し、それぞれは、単一編集システム、順次編集システム（例えば、異なるヌクレアーゼ特異的システムを順次使用して、2つ以上のゲノム編集を細胞内に提供する）及び/又は再帰的編集システム（例えば、1つのヌクレアーゼ特異的システムを使用して、2つ以上のゲノム編集を細胞内に導入する）のいずれかで使用することができる。例示的なヌクレアーゼ特異的ゲノム編集システムが本明細書に記載されるが、本開示を読んだ上で、例示的な実施形態の自動マルチモジュール細胞編集機器において他の酵素特異的編集システムも有用であることを当業者は認識するであろう。

【0038】

本明細書に記載される自動システムは、本開示の機器を用いたゲノムの切断及び標的ゲノム領域への編集の導入にヌクレアーゼを使用できることに留意されたい。

例示的な実施形態の特定の態様では、ヌクレアーゼ編集システムは、編集のタイミングの制御が可能な誘導性システムである。誘導性システムは、ヌクレアーゼの誘導性発現、編集核酸の誘導性発現又は両方を含み得る。ヌクレアーゼ活性を調節する能力は、オフターゲット切断を低減し、精密なゲノム組換えを促進することができる。本開示を読んだ上で当業者に明かになるように、本開示の自動マルチモジュール細胞編集機器と併せて多くの異なる誘導性システムを使用することができる。

【0039】

特定の態様では、ヌクレアーゼによる切断は、標的領域におけるゲノム編集を用いる細胞を選択するために、例示的な実施形態の自動マルチモジュール細胞編集機器と併用することもできる。例えば、特定のヌクレアーゼ認識部位を除去する（例えば、相同組換えを介する）ゲノム編集を受けた細胞は、そのような編集に続き、細胞をヌクレアーゼに暴露することにより、例示的な実施形態の自動マルチモジュール細胞編集機器及びシステムを用いて選択することができる。ゲノム編集のない細胞内のDNAは、切断され、続けて限られた成長を有し、且つ/又は死ぬ一方、ヌクレアーゼ認識部位を除去するゲノム編集を受けた細胞は、続くヌクレアーゼへの暴露により影響を受けない。

【0040】

細胞又は細胞の集団が、インデューサ分子により誘導される核酸誘導ヌクレアーゼコードDNAを含む場合、ヌクレアーゼは、インデューサ分子の存在下でのみ発現する。代替的に、細胞又は細胞の集団が、リプレッサー分子により抑制される核酸誘導性ヌクレアーゼコードDNAを含む場合、ヌクレアーゼは、リプレッサー分子が不在のときのみ発現する。

【0041】

例えば、RNA誘導ヌクレアーゼを用いて編集する誘導性システムが記載されており、これは、化学誘導を用いて、RNA誘導ヌクレアーゼへの細胞の一時的な暴露を制限する。（2015年1月23日付けで出願された「誘導性DNA結合タンパク質、ゲノム摂動ツール及びその適用（Inducible DNA Binding Proteins and Genome Perturbation Tools and Applications Thereof）」という名称のジャン（Zhang）らに付与された

米国特許出願公開第2015/0291966 A1号明細書、コロラド州ラファイエット(Lafayette, CO)所在のホライゾン/ダーマコン(Horizon/Dharmacon)において入手可能な誘導性レンチウイルス発現ベクターも参照されたい)。更なる技法については、例えば、キャンベル(Campbell)著、ターゲティングタンパク質機能：条件付き破壊のための拡張ツールキット(Targeting protein function: the expanding toolkit for conditional disruption)、生化学ジャーナル(Biochem J.)、第473(17)巻、p.2573~2589、(2016年)を参照されたい。

【0042】

他の例では、ウイルス誘導ヌクレアーゼを使用して、細胞内の遺伝子編集を誘導することができる。例えば、ドン(Dong)著、昆虫細胞における高効率ウイルス誘導CRISPR/Cas9システムの確立(Establishment of a highly efficient virus-inducible CRISPR/Cas9 system in insect cells)、アンチウイルスリサーチ(Anti-viral Res.)、第130巻：p.50~7、(2016年)を参照されたい。

別の例では、核酸特異的ヌクレアーゼの誘導性発現の場合、バリエーションは、ヌクレアーゼをエストロゲン受容体(ERT2)のホルモン結合ドメインと融合させることにより、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-HT)を用いて哺乳類細胞においてオンオフを切り替えることができる。(リウ(Liu)ら著、ネイチャーケミカルバイオロジー(Nature Chemical Biology)、第12巻、p.980~987、(2016年)及び2016年11月7日付けで出願された「化学誘導性ゲノム組換え技術(Chemical-Inducible Genome Engineering Technology)」という名称のタン(Tan)に付与された国際公開第2017/078631 A1号パンフレットを参照されたい)。

【0043】

加えて、原核生物及び真核生物の両方で細胞内の遺伝子の被制御発現のための幾つかの遺伝子調節制御システムが開発されている。これらのシステムは、テトラサイクリン制御性トランス活性化システム(テトオン/テトオフ(Tet-On/Tet-Off)、クローンテック社(Clontech, Inc.) (カリフォルニア州パロアルト(Palo Alto, CA))、Lacスイッチ(Lac Switch)誘導性システム(「真核遺伝子発現の調節(Regulation of eucaryotic gene expression)」という名称のブレント(Brent)らに付与された米国特許第4,833,080号明細書)、エクジソン誘導性遺伝子発現システム(ノー(Nor)ら著、哺乳類災坊及びトランスジェニックマウスにおけるエクジソン誘導性遺伝子発現(Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice)、米国科学アカデミー紀要(PNAS)、第93(8)巻、p.3346~3351、(1996年))及びクメート(cumate)遺伝子スイッチシステム(ムリック(Mullick)ら著、クメート遺伝子スイッチ：哺乳類細胞における発現調節システム(The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells)、BMCバイオテクノロジー(BMC Biotechnology)、第6巻、p.43、(2006年))を含む。

【0044】

例示的な実施形態の自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて編集することができる細胞は、任意の原核細胞、古細菌細胞又は真核細胞を含む。例えば、本発明の例示的な実施形態と併用される原核細胞は、グラム陽性細菌細胞、例えば枯草菌(Bacillus subtilis)又はグラム陰性細菌細胞、例えば大腸菌(E. Coli)細胞であり得る。例示的な実施形態の自動マルチモジュール細胞編集機器と併用される真核細胞は

10

20

30

40

50

、任意の植物細胞及び任意の動物細胞、例えば真菌細胞、昆虫細胞、両生類細胞、線虫細胞又は哺乳類細胞を含む。

亜鉛フィンガーヌクレアーゼゲノム編集

選択された実施形態では、本明細書に記載される自動マルチモジュール細胞編集機器は、亜鉛フィンガーヌクレアーゼゲノム編集を実行する。亜鉛フィンガーヌクレアーゼ (ZFN: Zinc-finger nuclease) は、亜鉛フィンガーDNA切断ドメインをDNA結合ドメインに融合することにより生成される人工制限酵素である。亜鉛フィンガーDNAドメインは、有機体のゲノム内の標的的特異的領域に対して組み換えることができる。(ウルノフ (Urnov) ら著、ネイチャーレビュージェネティクス (Nature Reviews Genetics)、第11巻、p. 636~646、(2010年) ; 2003年1月22日付けで出願された「亜鉛フィンガーヌクレアーゼを用いる、標的化された染色体変異誘発 (Targeted Chromosomal Mutagenesis Using Zinc Finger Nucleases)」という名称のキャロル (Carroll) らに付与された国際公開第2003/087341 A2号パンフレット)。有機体の内因性DNA修復過程を用いて、ZFNを用いてゲノムの標的領域を精密に変更することができる。ZFNは、突然変異アレル内のDNAにおいて二本鎖切断 (「DSB: double-strand break」) を生成することにより、ヘテロ接合性個人での顕性突然変異をディセーブするのに使用することができる。DSBは、相同鋳型が不在の場合、非同源末端結合 (NHEJ: non-homologous end-joining) により修復される。NHEJは、2つの末端を一緒に結合することによりDSBを修復し、通常、カットがクリーンであり、複雑ではない場合、突然変異を生じない。(デュライ (Durai) ら著、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ: 植物細胞及び哺乳類細胞のゲノム組換えのためのカスタム設計分子バサミ (Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells)、ヌクレックアシッズリサーチ (Nucleic Acids Res.)、第33(18)巻、p. 5978~90、(2005年))。この修復メカニズムは、インデル又は染色体再編を介して、そのロケーションにおいてコードされる遺伝子産物を非機能化させることが多いエラーをゲノムに誘導するのに使用することができる。

【0045】

代替的に、DNAは、相同依存性修復 (HDR: homology dependent repair) を用いて外因性二本鎖DNA断片の存在下でゲノムに導入することができる。DSB修復での相同配列へのHDRの依存性は、DSBの隣接配列と相同の配列内に所望の配列を挿入することにより利用することができる。これにより、HDRシステムにより鋳型として用いられる際、ゲノム関心領域内に所望の変更を生み出す。

【0046】

複数対のZFNを使用して、ゲノム配列の大きいセグメント全体を完全に除去することもできる。(リー (Lee) ら著、ゲノムリサーチ (Genome Res.)、第20(1)巻、p. 81~9、(2009年) ; 及び2010年7月28日付けで出願された「トリヌクレオチドリピート病を治療する方法及び組成物 (Methods and Compositions for Treating Trinucleotide Repeat Disorders)」という名称のグレゴリー (Gregory) らに付与された米国特許出願公開第2011/0082093 A1号明細書)。伸長CAG/CTG反復トラクトは、ハンチントン舞踏病、筋緊張性ジストロフィーを含む、12を超える遺伝性神経疾患及び幾つかの脊髄小脳失調症の遺伝学的根拠である。ZFNがDSBをCAG反復に特異的にさせ、反復を長い病理的長さから、短く毒性のより低い長さに収縮させ得ることがヒト細胞で実証されている。(ミッテルマン (Mittelman) ら著、CAG反復トラクト内の亜鉛フィンガー特異的二本鎖切断は、ヒト細胞での反復不安定性を促進する (Zinc-finger directed double-strand

10

20

30

40

50

nd breaks within CAG repeat tracts promote repeat instability in human cells)、米国科学アカデミー紀要(PNAS USA)、第106(24)巻、p.9607~12、(2009年);及び2013年2月28日付けで出願された「ハンチントン舞蹈病を治療する方法及び組成物(Methods and Compositions for Treating Huntington's Disease)」という名称のミラー(Miller)らに付与された米国特許出願公開第2013/0253040 A1号明細書)。

メガヌクレアーゼゲノム編集

選択された実施形態では、本明細書に記載される自動マルチモジュール細胞編集モジュール、機器及びシステムは、メガヌクレアーゼゲノム編集を実行する。メガヌクレアーゼは、1990年代に発見され、続く研究により、効率的に相同組換えを誘導し、ゲノムのコード領域又は非コード領域に突然変異を生成し、ゲノムのコード領域の読み枠を変更することが可能であるため、ゲノム編集に特に有望なツールであることが示された。(例えば、エピナット(Epinat)ら著、新規の組換えメガヌクレアーゼは、真核細胞、例えば、酵母細胞及び哺乳類細胞において相同組換えを誘導する(A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in eukaryotic cells, e.g., yeast and mammalian cells)、ヌクレックアシズリサーチ(Nucleic Acids Research)、第31(11)巻、p.2952~2962;及び2014年12月30日付けで出願された「二本鎖DNA切断及び切断部位における相同組換えの誘導に関わる染色体修飾(Chromosomal Modification Involving the Induction of Double-stranded DNA Cleavage and Homologous Recombination at the Cleavage Site)」という名称のチュリカ(Choulika)らに付与された米国特許第8,921,332号明細書を参照されたい)。メガヌクレアーゼの高特異性により、高精度及び他の天然発生の制限酵素よりもはるかに低い細胞毒性が与えられる。

転写アクチベータ様エフェクターヌクレアーゼ編集

選択された実施形態では、本明細書に記載される自動マルチモジュール細胞編集モジュール、機器及びシステムは、転写アクチベータ様エフェクターヌクレアーゼ編集を実行する。転写アクチベータ様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN: transcription activator-like effector nuclease)は、DNAの特定の配列をカットするように組み換えることができる制限酵素である。TALENは、TALエフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメイン(DNA鎖をカットするヌクレアーゼ)に融合させることにより作られる。転写アクチベータ様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)は、略あらゆる所望のDNA配列に結合するように組み換えることができ、したがってヌクレアーゼと結合するとDNAを特定のロケーションでカットすることができる。(例えば、ミラー(Miller)ら著、効率的なゲノム編集のためのTALEヌクレアーゼアーキテクチャ(A TALE nuclease architecture for efficient genome editing)、ネイチャーバイオテクノロジー(Nature Biotechnology)、第29(2)巻、p.143~8、(2011年);ボッホ(Boch)著、ネイチャーバイオテクノロジー(Nature Biotech.)、ゲノムターゲティングのTALE(TALEs of genome targeting)、第29(2)巻、p.135~6、(2011年);2010年1月12日付けで出願された「モジュールDNA結合ドメイン及び使用方法(Modular DNA-binding Domains and Methods of Use)」という名称のボナス(Bonas)らに付与された国際公開第2010/079430 A1号パンフレット;2010年12月10日付けで出願された「TALエフェクター媒介DNA修飾(TAL Effector-Me

10

20

30

40

50

diated DNA Modification)」という名称のヴォイタス(Voytas)らに付与された国際公開第2011/072246 A2号パンフレットを参照されたい)。

【0047】

ZFNのように、TALENはDSBを誘導することによりゲノムを編集することができる。標的領域におけるTALEN作成部位特異的DSBは、NHEJ又はHDRを通して修復され、標的化ゲノム編集を生じさせる。TALENは、インデル、再編成の導入又は外因性二本鎖DNA断片の存在下でのNHEJを通じたゲノムへのDNAの導入に用いることができる。

RNAガイドヌクレアーゼ(RGN: RNA-guided Nuclease)編集

10

特定の態様では、例示的な実施形態の自動マルチモジュール細胞編集機器のゲノム編集は、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列(CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技法を利用し、この技法では、RNAガイドヌクレアーゼ(RGN)を使用して、有機体のゲノム内の特定の標的領域を編集する。合成ガイドRNA(gRNA: guide RNA)が複合化されたRGNを細胞に送達することにより、細胞のゲノムを所望のロケーションにおいてカットすることができ、それによりゲノムの標的領域への編集を可能にする。ガイドRNAは、RGNタンパク質が標的ゲノム領域のDNAを認識しカットすることを促進する。ガイドRNAのヌクレオチド配列を操作することにより、RGNシステムは、切断に向けて任意のDNA配列を標的化するようにプログラムすることができる。

20

【0048】

例示的な実施形態の自動マルチモジュール細胞編集機器と併用されるRGNシステムは、所望の標的ゲノム領域においてカット及びペーストの両方を行う能力を有する任意のRNAガイドヌクレアーゼシステムを用いてゲノム編集を実行することができる。特定の態様では、RNAガイドヌクレアーゼシステムは、2つの別個のRNA分子、例えばCRISPR RNA(crRNA)及びトランス活性化CRISPR RNA(tracrRNA)をgRNAとして用い得る。他の態様では、gRNAは、crRNA配列及びtracrRNA配列の両方を含む1つのgRNAであり得る。

【0049】

30

特定の態様では、ゲノム編集は、所望のDNA変更を標的領域に導入すると共に、標的領域からプロトスペースモチーフ(PAM: proto-spacer motif)領域を除去し、したがって例えば標的領域と相補的な合成gRNAが複合化されたRNAガイドヌクレアーゼに暴露したとき、その標的領域におけるいかなる追加編集も行われなようにする。この態様では、第1の編集イベントは、例えば、RGN特異的編集イベント又は相同組換えイベントであり得、所望の編集を有する細胞は、標的領域と相補的な合成gRNAが複合化されたRGNを用いて選択することができる。第1の編集イベントを受けなかった細胞は、カットされ、したがって適切な選択基準下で生存し続けない。所望の突然変異を含む細胞は、もはや必要なPAM部位を含まないため、カットされず、自動マルチモジュール細胞編集機器において成長し繁殖し続ける。

40

【0050】

RGNタンパク質システムが選択に用いられる場合、必要とされるのは主にカット活性であり、したがって、RNAガイドヌクレアーゼタンパク質システムは、編集に用いられるものと同じであり得るか、又は特定のPAM部位を用いたカットに有効であるが、必ずしもその部位における編集に有効であるわけではないRGNタンパク質システムであり得る。選択に用いられるヌクレアーゼの重要な一態様は、前のゲノム編集動作の編集手法を用いて置換されたPAM部位の認識である。

相同組換えによるゲノム編集

他の態様では、例示的な実施形態の自動マルチモジュール細胞編集機器のゲノム編集は、cre-lox技法及びFRET技法を含む相同組換え法を利用することができる。部

50

位特異的な相同組換えは、リコンビナーゼの認識に必要とされる短い特異的DNA配列のみが、組換えが行われる部位であるという点で一般的な相同組換えと異なる。部位特異的組換えは、部位を認識し、これらの部位における組換えを触媒するために専用のリコンビナーゼを必要とする。それぞれがリコンビナーゼ及び特定のコグネイト部位を含む幾つかのバクテリオファージ及び酵母由来部位特異的組換えシステムは、DNA組込み目的で真核細胞において機能することを示しており、したがって本発明での使用に適用可能であり、これらには、バクテリオファージP1 Cre/Lox、酵母FLP-FRTシステム及び部位特異的リコンビナーゼのチロシンファミリのDreシステムがある。有用なそのようなシステム及び方法は、例えば、米国特許第7,422,889号明細書、同第7,112,715号明細書、同第6,956,146号明細書、同第6,774,279号明細書、同第5,677,177号明細書、同第5,885,836号明細書、同第5,654,182号明細書及び同第4,959,317号明細書に記載されており、これらは、そのような組換えを用いる方法を教示するために参照により本明細書に援用される。バクテリオファージIntインテグラーゼ、HK2022インテグラーゼ等のチロシンファミリの他のシステム、加えてバクテリオファージphiC31、R4Tp901インテグラーゼ等の別個のセリンファミリの組換えに属するシステムも、各組換え部位を用いて哺乳類細胞で機能することが分かっており、これらも本発明での使用に適用可能である。相同組換えの例示的な方法論は、米国特許第6,689,610号明細書、同第6,204,061号明細書、同第5,631,153号明細書、同第5,627,059号明細書、同第5,487,992号明細書及び同第5,464,764号明細書に記載されており、これらは、全体的に参照により本明細書に援用される。

機器アーキテクチャ

図1A及び図1Bは、カートリッジベースの原料物質（例えば、試薬、酵素、核酸、洗浄液等）を利用する一例の自動マルチモジュール細胞処理機器100を示す。機器100は、例えば、実験環境内で使用される卓上機器として設計され得る。機器100は、細胞における自動ゲノム切断及び/又は編集を行うに当たり、種々の段階的動作を実行する再使用可能要素及び使い捨て要素が混合したものを組み込み得る。カートリッジベースの原料物質は、例えば、ロボットハンドリング機器108によるアクセスのために機器100のデッキ102上の指定エリアに位置し得る。図1Bに示されるように、デッキ102は、機器100の任意のモジュールからの汚染物のこぼれ、滴り又は溢れが保護シンクの蓋内に含まれるような保護シンクを含み得る。

【0051】

図1Aを参照すると、機器100は、幾つかの実装形態では、DNA試料及び他の原料物質を機器100に導入する試薬カートリッジ104と、溶離剤及び他の原料物質を機器100に導入する洗浄カートリッジ106と、材料を機器100のモジュール（例えば、モジュール110a、110b及び110c）、カートリッジレセプタクル（例えば、カートリッジ104及び106のレセプタクル）及び貯蔵ユニット（例えば、ユニット112、114、116及び118）間で移動させて、自動ゲノム切断及び/又は編集を実行するロボットハンドリングシステム108とを含む。細胞供給源106の処理が完了すると、幾つかの実装形態では、細胞出力は、一時的に貯蔵し、後に回収するために、ロボットハンドリング機器108により、例えば試薬カートリッジ104又は洗浄カートリッジ106に配置された貯蔵ユニット又はレセプタクルに移送され得る。

【0052】

ロボットハンドリングシステム108は、例えば、液体をカートリッジ104、106の種々の材料ソースから、試薬カートリッジ104又は洗浄カートリッジ106内のレセプタクルであり得る種々のモジュール110及び貯蔵ユニットに移送する空気容積型ポンプ120を含み得る。他の実施形態では、ロボットハンドリングシステム108は、原料物質の容器（例えば、管又はバイアル）を試薬カートリッジ104及び/又は洗浄カートリッジ106から種々のモジュール110に移送するピックアップブレースヘッド（図示せず）を含み得る。幾つかの実装形態では、1つ又は複数のカメラ又は他の光学センサ（

図示せず)は、ガントリ122に沿ったロボットハンドリング装置の適切な移動及び位置を確認する。

【0053】

幾つかの実施形態では、ロボットハンドリングシステム108は、移送先端部供給源116(例えば、ピベット先端部ラック)に提供される使い捨て移送先端部を用いて、機器100内で原料物質、試薬(例えば、核酸アセンブリ)及び細胞を移送する。例えば、使用済みの移送先端部116は、固体廃棄物ユニット112内に破棄され得る。幾つかの実装形態では、固体廃棄物ユニット112は、ロボットハンドリングシステム108のピックアッププレースヘッドから管、先端部、バイアル及び/又はフィルタを除去するキッカーを含む。例えば、示されるように、ロボットハンドリングシステム108は、フィルタ

10

【0054】

幾つかの実施形態では、機器100は、空気容積型ポンプ120に接続するシッパを有するエレクトロポレータキュベットを含む。幾つかの実装形態では、細胞及び試薬は、シッパを通して電気穿孔キュベットに吸引され、キュベットは、機器100の1つ又は複数のモジュール110に移動される。

【0055】

幾つかの実装形態では、機器100は、図13の処理システム1310等の処理システム126により制御される。処理システム126は、ユーザ入力に基づいて機器100を動作させるように構成され得る。例えば、ユーザ入力は、タッチスクリーン制御ディスプレイ128を通して機器100により受信され得る。処理システム126は、機器100の種々のモジュール110のタイミング、持続時間、温度及び他の動作を制御し得る。図1Bを参照すると、処理システム126は、機器100の動作のために電源150に接続され得る。

20

【0056】

図1Aに戻ると、示されるように、試薬カートリッジ104は、16個のリザーバ(5×3つのリザーバの行列に1つの追加リザーバを加えたもの)及びフロースルー形質転換モジュール(電気穿孔デバイス)110cを含む。洗浄カートリッジ106は、例えば、洗浄液又は反復プロセスを通して使用されることが多い溶液を貯蔵する大きい管又はリザーバを収容するように構成され得る。更に、幾つかの実施形態では、洗浄カートリッジ106は、例えば、より少量のソース培地を保持する幾つかのより小さい管、バイアル又はリザーバ及び編集済みの細胞のためのレセプタクル又はリポジトリを含み得る。例えば、洗浄カートリッジ106は、2つ以上の試薬カートリッジ104が順次使用され、交換される場合、定位置に留まるように構成され得る。試薬カートリッジ104及び洗浄カートリッジ106は、図1Aにおいて別個のカートリッジとして示されているが、他の実施形態では、洗浄カートリッジ106の内容物は、試薬カートリッジ104に組み込まれ得る。更なる実施形態では、3つ以上のカートリッジを自動マルチモジュール細胞処理機器100に装填し得る。特定の実施形態では、試薬カートリッジ104、洗浄カートリッジ106及び自動マルチモジュール細胞処理機器100のモジュール110の他の構成要素は、一緒にキットにパッケージングされる。

30

40

【0057】

幾つかの実装形態では、洗浄カートリッジ106及び試薬カートリッジ104は、自動マルチモジュール細胞処理機器100で使用するために提供される使い捨てキットである。例えば、ユーザは、細胞処理を起動させる前、試薬カートリッジ104及び洗浄カートリッジ106のそれぞれを開封し、自動マルチモジュール細胞処理機器のシャーシ内に位置決めし得る。シャーシの例について、図2A~図2Dに関連して以下に更に詳細に考察する。

【0058】

幾つかの実装形態では、カートリッジ104、106の構成要素には、ロボットハンドリングシステム108による認識のためにバーコード等の機械可読印が記される。例えば

50

、ロボットハンドリングシステム 108 は、カートリッジ 104、106 のそれぞれ内の容器をスキャンして、内容物を確認し得る。他の実装形態では、機械可読印は、各カートリッジ 104、106 に記され得、自動マルチモジュール細胞処理機器 100 の処理システムは、機械可読印に基づいて貯蔵材料マップを識別し得る。

【0059】

図 6 A 及び図 6 B を参照すると、幾つかの実施形態では、洗浄カートリッジ 106 は、カートリッジ本体 608 に保持された一対の大型ボトル 602、4 本 1 組の小管 604 及び大管 606 を含む洗浄カートリッジ 600 である。ボトル 602 及び管 604、606 のそれぞれは、幾つかの実施形態では、シッパー又はピペッター等の自動液体ハンドリングシステムによるアクセスのために穿孔可能なフィルムで封止される。他の実施形態では、ボトル 602 及び管 604、606 のそれぞれは、封止可能なアクセスガasket を含む。幾つかの実施形態では、ボトル 602 及び管 604、606 のそれぞれの上部には、内容物を自動的に識別するための機械可読印（図示せず）が記される。

10

【0060】

幾つかの実施形態では、大型ボトル 602 は、それぞれ洗浄液を含む。洗浄液は、同じ又は異なる洗浄液であり得る。幾つかの例では、洗浄液は、例えば、緩衝剤、緩衝剤及び 10% グリセリン、80% エタノールを含み得る。

【0061】

幾つかの実装形態では、カバー 610 は、ボトル 602 及び管 604、606 をカートリッジ本体 608 内に固定する。図 6 B を参照すると、カバー 610 は、ボトル 602 及び管 604、606 のそれぞれにアクセスするための開口部を含み得る。更に、カバー 610 は、カートリッジのタイプを識別する（例えば、カートリッジ内容物のマップにアクセスする）機械可読印 612 を含み得る。代替的に、各開口部に個々の内容物を別個に記し得る。

20

【0062】

図 6 C ~ 図 6 E を参照すると、幾つかの実装形態では、試薬カートリッジ 104 は、16 個 1 組の小管又はバイアル 626 と、カートリッジ本体 622 に保持されるフロースルー電気穿孔モジュール 624 とを含む試薬カートリッジ 620 である。小管又はバイアル 626 のそれぞれは、幾つかの実施形態では、シッパー又はピペッター等の自動液体ハンドリングシステムによりアクセスするために穿孔可能なフィルムで封止される。他の実施形態では、小管又はバイアル 626 のそれぞれは、封止可能なアクセスガasket を含む。小管又はバイアル 626 のそれぞれの上部には、幾つかの実施形態では、内容物を自動的に識別するための機械可読印（図示せず）が記される。機械可読印は、バーコード、QR コード（登録商標）又は他の機械可読符号化を含み得る。特定の容器を識別する他の自動手段は、配色、シンボル認識（例えば、テキスト、画像、アイコン等）及び / 又は形状認識（例えば、容器の相対形状）を含むことができる。容器自体に記されるのではなく、幾つかの実施形態では、カートリッジ本体及び / 又はカートリッジカバーの上面は、内容物を識別する機械可読印を含み得る。小管又はバイアルは、それぞれ同じサイズであり得る。代替的に、複数の容積の管又はバイアルを試薬カートリッジ 620 に提供し得る。例示のための例では、各管又はバイアルは、2 mL ~ 20 mL、4 mL ~ 10 mL 又は約 5 mL を保持するように設計され得る。

30

40

【0063】

例示のための例では、小管又はバイアル 626 は、それぞれ以下の材料の 1 つを保持し得る：ベクター骨格、オリゴヌクレオチド、等温核酸アセンブリの試薬、ユーザ供給の細胞試料、誘導剤、緩衝剤中の磁性ビーズ、エタノール、細胞選択のための抗生剤、細胞及び核酸を溶離する試薬、オイルオーバーレイ、他の試薬及び細胞成長及び / 又は回復培地。

【0064】

幾つかの実装形態では、カバー 628 は、小管又はバイアル 626 をカートリッジ本体 622 内で固定する。図 6 D を参照すると、カバー 628 は、小管又はバイアル 626 の

50

それぞれにアクセスするために開口部を含み得る。3つの大きい開口部632は、太字(例えば、青色)帯で輪郭が示されて、ユーザ供給材料を追加する。ユーザ供給材料は、例えば、ベクター骨格、オリゴヌクレオチド及び細胞試料を含み得る。更に、カバー610は、カートリッジのタイプを識別する(例えば、カートリッジ内容物のマップにアクセスする)機械可読印630を含み得る。代替的に、各開口部に個々の内容物を別個に記し得る。幾つかの実装形態では、ユーザ供給材料の位置を保証するために、実験環境での充填に提供されるバイアル又は管は、細胞試料バイアル又は管が細胞試料開口部のみに嵌まり、オリゴヌクレオチドバイアル又は管がオリゴヌクレオチド開口部のみに嵌まる等のような一意の形状又はサイズを有し得る。

【0065】

図1Aを再び参照すると、ガントリ122を含むロボットハンドリングシステム108も示されている。幾つかの例では、ロボットハンドリングシステム108は、スイスのメンネドルフ(Mannedorf)所在のテカングループ社(Tecan Group Ltd.)、ネバダ州リノ(Reno, NV)所在のハミルトン社(Hamilton Company)製(例えば、「流体処理システムを動作させるピペットデバイス、流体処理システム及び方法(Pipetting device, fluid processing system and method for operating a fluid processing system)」という名称のオット(Ott)に付与された国際公開第2018015544A1号パンフレットを参照されたい)又はコロラド州フォートコリンズ(Fort Collins, CO)所在のベックマンコールター社(Beckman Coulter, Inc.) (例えば、「管検査及び液体レベル検出の方法及びシステム(Methods and systems for tube inspection and liquid level detection)」という名称のストリーベル(Striebl)らに付与された米国特許出願公開第20160018427A1号明細書を参照されたい)等の自動液体ハンドリングシステムを含み得る。ロボットハンドリングシステム108は、空気容積型ピペッター120を含み得る。試薬カートリッジ104、106は、空気容積型ピペッター120等のロボットハンドリングシステム108の液体ハンドリング機器との特に容易な統合を可能にする。幾つかの実施形態では、空気容積型ピペッター120のみがガントリ122により移動され、種々のモジュール110及びカートリッジ104、106が静止したままである。ピペット先端部116は、空気容積型ピペッター120との併用に提供し得る。

【0066】

幾つかの実施形態では、自動機械的運動システム(アクチュエータ)(図示せず)は、XY軸運動制御又はXYZ軸運動制御を自動マルチモジュール細胞処理システム100の1つ又は複数のモジュール110及び/又はカートリッジ104、106に更に供給する。例えば、使用済みのピペット先端部116は、ロボットハンドリングシステムにより廃棄物リポジトリ112に配置され得る。例えば、アクティブモジュールは、ロボットハンドリングシステムと接触アクセス可能な位置まで上昇し得るか、又は逆に、ロボットハンドリングシステムが材料を自動マルチモジュール細胞処理機器100内の他のモジュール110に移動させているとき、ロボットハンドリングシステムとの衝突を回避するために使用後に降下し得る。

【0067】

自動マルチモジュール細胞処理機器100は、幾つかの実装形態では、試薬カートリッジ104に含まれるフロースルー電気穿孔モジュール110cを含む。例えば、フロースルー電気穿孔接続ブリッジ132は、細胞及び核酸が入力チャネルを介してデバイスに移送された後、フロースルー電気穿孔デバイスと係合する。ブリッジ132は、液密封止及び電気接続の両方を電極及び電気穿孔モジュール110c内で電気穿孔を行う制御機構に提供する。例えば、電気穿孔接続ブリッジ132は、自動マルチモジュール細胞処理機器100の電子回路ラック136内のフロースルー電気穿孔制御機構134に接続され得る。

。

10

20

30

40

50

【0068】

幾つかの実装形態では、自動マルチモジュール細胞処理機器100は、デュアル細胞成長モジュール110a、110bを含む。細胞成長モジュール110a、110bは、示されるように、回転細胞成長バイアル130a、130bをそれぞれ含む。細胞声調モジュール110a、110bの少なくとも一方は、統合された濾過モジュール（図示せず）を更に含み得る。代替の実装形態では、濾過モジュール又は細胞洗浄及び濃縮モジュールは、代わりに、細胞成長モジュール110a、110bとは別個であり得る（例えば、図12A及び図12Bの細胞成長モジュール1210a及び濾過モジュール1210bに関連して説明するように）。細胞成長モジュール110a、110bは、例えば、図8A～図8Fの細胞成長モジュール800に関連して考察する特徴及び機能をそれぞれ含み得る。

10

【0069】

細胞成長モジュール110a、110bの一方又は両方の濾過部は、幾つかの実装形態では、フィルタカセット118に格納される交換式フィルタを用いる。例えば、ロボットハンドリングシステムは、細胞成長モジュール110a、110bの一方又は両方と併用するフィルタをピックアップして係合するフィルタピックアップヘッド124を含み得る。フィルタピックアップヘッドは、フィルタを成長モジュールに移送し、成長モジュールから細胞を吸い上げ、次に細胞を洗浄してエレクトロコンピテントにする。細胞からの培地及び洗浄流体は、廃棄物モジュール114に配置される。

20

【0070】

幾つかの実装形態では、自動マルチモジュール細胞処理機器100は、細胞編集に向けてアセンブルされた核酸に対し、試薬カートリッジ104内に提供された材料を結合する核酸アセンブリ及び精製機能（例えば、核酸アセンブリモジュール）を含む。更に、脱塩又は精製動作は、核酸が細胞内により効率的に電気穿孔されるように、アセンブルされた核酸を精製し、緩衝剤を脱塩する。核酸アセンブリ及び精製特徴は、反応チャンバ又は管レセプタクル（図示せず）及び磁石（図示せず）を含み得る。

【0071】

一例の機器100は、特定の配置のモジュール110を含むものとして示されているが、この実装形態は、単に例示を目的とする。例えば、他の実施形態では、より多数又はより少数のモジュール110が機器100内に含まれ得、例えば細胞を融合して、ハイブリドーマを生成するモジュール及び/又はタンパク質生成モジュール等の異なるモジュールが含まれ得る。更に、図1Aの複製細胞成長モジュール110a、110b等の特定のモジュールは、特定の实装形態内で複製され得る。

30

【0072】

幾つかの実装形態では、細胞は、自動マルチモジュール細胞編集機器に導入される前に修飾される。例えば、細胞は、レッドシステムを用いて、通常、カナマイシン又はクロラムフェニコールへの抗生物質耐性遺伝子で標的遺伝子を置換する（ダトセンコ（Datzenko）及びワナー（Wanner）著、PCR産物を用いた大腸菌（*Escherichia coli*）K-12における染色体遺伝子の1ステップ非活性化（One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products）、米国科学アカデミー紀要（PNAS USA）、第97（12）巻、p.6640～5、（2000年）；2003年1月21日付けで出願された「大腸菌（*E. coli*）recE/recT組換えシステムに依拠したDNAクローニング法（DNA Cloning Method Relying on the *E. coli* recE/recT Recombination System）」という名称のステュアート（Stewart）らに付与された米国特許第6,509,156B1号明細書を参照されたい）。幾つかの実装形態では、細胞は、ヌクレアーゼの発現カセットを含むベクターを用いて既に形質転換又はトランスフェクトされていることがある。別の例では、所望の遺伝子編集は、自動マルチモジュール細胞編集機器（例えば、相同組換え修復を用いて）及

40

50

びヌクレアーゼを用いてこれらの編集を選択し、且つ/又は追加の編集を細胞集団に追加するのに使用されるシステムに導入される前に細胞集団に導入され得る。

【0073】

図2A～図2Dは、自動マルチモジュール細胞処理機器の卓上版で使用される一例のシャーシ200及び230を示す。例えば、シャーシ200及び230は、幅約61cm～約122cm（約24インチ～約48インチ）、高さ約61cm～約122cm（24インチ～約48インチ）及び奥行き約61cm～約122cm（約24インチ～約48インチ）を有し得る。シャーシ200及び230は、自動細胞処理で使用される複数のモジュール及び使い捨て供給品を保持するように設計され得る。更に、各シャーシ200及び250は、材料をモジュール間で移動させるようにロボットハンドリングシステムを搭載し得る。

10

【0074】

図2A及び図2Bは、自動マルチモジュール細胞処理機器の第1の例のシャーシ200を示す。示されるように、シャーシ200は、カバー202を持ち上げ、シャーシ200の内部にアクセスするためのハンドル204及びヒンジ206を有するカバー202を含む。冷却格子214は、内部ファン（図示せず）を介して空気を流せるようにし得る。更に、シャーシ200は、調節可能な脚部220により持ち上げられる。脚部220は、例えば、シャーシ200の下に追加の空気流を提供し得る。幾つかの実施形態では、制御ボタン216により、シャーシ200内の細胞処理の単一ボタン自動開始及び停止が可能である。

20

【0075】

シャーシ200の内部には、幾つかの実装形態では、ロボットハンドリングシステム208が材料カートリッジ212a、212b及びモジュールの上にガントリ210に沿って配置される。制御回路、液体ハンドリング管、空気ポンプ制御機構、弁、熱ユニット（例えば、加熱ユニット及び冷却ユニット）並びに他の制御機構は、幾つかの実施形態では、制御ボックス領域218内のシャーシ200のデッキ下に配置される。

【0076】

示されていないが、幾つかの実施形態では、表示画面をシャーシ200の正面に位置決めして、例えばカバー202の一部を覆い得る。表示画面は、自動マルチモジュール細胞処理機器の処理ステータスに関する情報をユーザに提供し得る。別の例では、表示画面は、細胞処理の実行についてのユーザからの入力を受け入れ得る。

30

【0077】

図2C及び図2Dは、自動マルチモジュール細胞処理機器の第2の例のシャーシ230を示す。シャーシ230は、示されるように、ヒンジ234を有する透明ドア232を含む。例えば、ドアは、ページの左側にスイングして、シャーシの作業エリアへのアクセスを提供し得る。ユーザは、例えば、透明ドア232を開けて、試薬カートリッジ及び洗浄カートリッジ等の供給品をシャーシ230に装填し得る。

【0078】

幾つかの実施形態では、シャーシ230の正面は、ドア232の右側に示されるディスプレイ（例えば、タッチスクリーンディスプレイデバイス）236を更に含む。ディスプレイ236は、自動マルチモジュール細胞処理機器の処理ステータスに関する情報をユーザに提供し得る。別の例では、ディスプレイ236は、細胞処理の実行に関するユーザからの入力を受け入れ得る。

40

【0079】

シャーシ230の右面の空気格子238は、シャーシ230の作業エリア（例えば、デッキの上）内に空気流を提供し得る。シャーシ230の左にある第2の空気格子240は、シャーシ230の制御ボックス領域242内（例えば、デッキの下）に空気流を提供し得る。示されていないが、幾つかの実施形態では、シャーシ200の脚部220等の脚部は、シャーシ230を作業面の上に上昇させ、更なる空気流を提供し得る。

【0080】

50

シャーシ 230 の内部において、幾つかの実装形態では、ロボットハンドリングシステム 248 は、カートリッジ 252 a、252 b、材料供給品 254 a、254 b（例えば、ピペット先端部及びフィルタ）及びモジュール 256（例えば、デュアル成長バイアル）の上にガントリ 250 に沿って配置される。制御回路、液体ハンドリング管、空気ポンプ制御機構、弁及び他の制御機構は、幾つかの実装形態では、制御ボックス領域 242 内のシャーシ 230 のデッキ下に配置される。

【0081】

幾つかの実装形態では、液体廃棄物ユニット 246 は、シャーシ 230 の左外壁に搭載される。液体廃棄物ユニット 246 は、例えば、シャーシ 230 の外側に搭載して、潜在的な汚染を回避し、液体廃棄物ユニット 246 を迅速に空にし、交換することを保証し得る。

10

核酸アセンブリモジュール

本開示の自動マルチモジュール細胞編集機器の特定の実装形態は、機器内に核酸アセンブリモジュールを含む。核酸アセンブリモジュールは、所望のゲノム編集イベントの促進に必要な核酸を受け入れるように構成される。核酸アセンブリモジュールは、ベクターアセンブリ及び関心細胞への続く形質転換に適切なベクター骨格を受け入れるように構成することもできる。

【0082】

一般に、「ベクター」という用語は、連結された別の核酸を輸送可能な核酸分子を指す。ベクターは、限定ではなく、1本鎖、2本鎖又は部分的に2本鎖である核酸分子；1つ又は複数の自由末端を含むか又は自由末端を含まない（例えば、環状）核酸分子；DNA、RNA 又は両方を含む核酸分子；及び当技術分野で既知の他の多様なポリヌクレオチドを含む。1つのタイプのベクターは、「プラスミド」であり、これは、標準分子クローニング技法等により追加の DNA セグメントを挿入することができる環状 2本鎖 DNA ループを指す。別のタイプのベクターは、ウィルスベクターであり、このベクターでは、ウィルス（例えば、レトロウィルス、複製欠損レトロウィルス、アデノウィルス、複製欠損アデノウィルス及びアデノ随伴ウィルス）にパッケージングするためのウィルス特異的 DNA 又は RNA 配列がベクターに存在する。ウィルスベクターは、宿主細胞にトランスフェクトする、ウィルスにより担持されるポリヌクレオチドも含む。特定のベクターは、導入された宿主細胞内で自律複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムと共に複製される。更に、特定のベクターは、操作可能に連結された遺伝子の発現を支配することが可能である。本明細書では、そのようなベクターは、「発現ベクター」と呼ばれる。組換え DNA 技法において有用な共発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。本明細書において、ベクターについての更なる考察が提供される。

20

30

【0083】

組換え発現ベクターは、形質転換及び幾つかの核酸配列について、宿主細胞における核酸の翻訳及び発現に適した形態の核酸を含むことができ、これは、組換え発現ベクターが、発現する核酸配列に操作可能に連結された1つ又は複数の調節エレメント - 発現に使用する宿主細胞に基づいて選択され得る - を含むことを意味する。組換え発現ベクター内では、「操作可能に連結される」は、関心のあるヌクレオチド配列が、転写並びに幾つかの核酸配列について、ヌクレオチド配列の翻訳及び発現が可能ないように（例えば、インビトロ転写/翻訳システム内又はベクターが宿主細胞内に導入される場合には宿主細胞内において）調節エレメントに連結されることを意味することが意図される。適切な組換え及びクローニング法は、米国特許出願公開第 2004-0171156 A1号明細書として2004年9月2日付けで公開された「組換え部位を有する核酸を用いた組換えクローニング (Recombinational Cloning Using Nucleic Acids Having Recombination Sites)」という名称の米国特許出願第 10/815,730号明細書に開示されており、この内容は

40

50

、全体的に参照により本明細書に援用される。

【0084】

幾つかの実施形態では、調節エレメントは、標的化可能なヌクレアーゼシステムの1つ又は複数の要素に操作可能に連結されて、転写を誘導し、幾つかの核酸配列について、標的化可能なヌクレアーゼシステムの1つ又は複数の構成要素の翻訳及び発現を誘導する。

【0085】

幾つかの実施形態では、ベクターは、核酸ガイドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列に操作可能に連結された調節エレメントを含み得る。核酸ガイドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、原核細胞又は真核細胞等の特定の細胞における発現に向けて最適化されたコドンであり得る。真核細胞は、酵母細胞、菌類細胞、藻類細胞、植物細胞、動物細胞又はヒト細胞であり得る。原核細胞は、限定ではなく、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ又は非ヒト霊長類を含む非ヒト哺乳類を含め、哺乳類等の特定の有機体のもの又は由来のものであり得る。追加又は代替として、ベクターは、転写されると、ガイドRNAを形成するポリヌクレオチド配列に操作可能に連結された調節エレメントを含み得る。

【0086】

核酸アセンブリモジュールは、多様な異なる核酸アセンブリ技法を自動的に実行するように構成することができる。開示される自動マルチモジュール細胞編集機器の核酸アセンブリモジュールにおいて実行することができる核酸アセンブリ技法には、限定ではなく、PCR、バイオブリック(BioBrick)アセンブリ(2016年6月7日付けで出願された「スカーレスマルチパートDNAアセンブリ設計(Scar-less Multi-part DNA Assembly Design)」という名称のヒルソン(Hillson)に付与された米国特許第9,361,427号明細書)、タイプIISクローニング(例えば、ゴールデンゲート(Golden Gate)アセンブリ;2010年7月6日付けで出願された「モジュールクローニングのシステム及び方法(System and Method of Modular Cloning)」という名称のウェーバ(Weber)らに付与された欧州特許出願公開第2,395,087 A1号明細書)及びリガーゼサイクル反応(ドゥコックス(de Kok S)著、リガーゼサイクル反応を介した高速且つ高信頼性のDNAアセンブリ(Rapid and Reliable DNA Assembly via Ligase Cycling Reaction)、ACS合成生物学(ACS Synth Biol.)、第3(2)巻、p.97~106、(2014年);エングラ(Engler)ら著、プロスワン(PLoS One)、高スループット性能を有する1ポット1ステップ精密クローニング法(A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability)、第3(11)巻、p.e3647、(2008年);2000年11月7日付けで発行された「ブリッジオリゴヌクレオチド及びDNAリガーゼを用いた連鎖反応クローニング(Chain Reaction Cloning Using a Bridging Oligonucleotide and DNA Ligase)」という名称のパチュク(Pachuk)らに付与された米国特許第6,143,527号明細書)を含め、制限エンドヌクレアーゼを用いるアセンブリ方法がある。他の実施形態では、開示される自動マルチモジュール細胞編集機器により実行される核酸アセンブリ技法は、ギブソンアセンブリ(Gibson Assembly)(登録商標)、CPEC、SLIC、リガーゼサイクル等の核酸の隣接部分間の重複に基づく。追加のアセンブリ法は、酵母でのギャップ修復(ベッサ(Bessa)著、酵母における改善されたギャップ修復:Taq DNAポリメラーゼを用いたギャップベクターの処理は、ベクターセルフライゲーションを回避する(Improved gap repair cloning in yeast: treatment of the gapped vector with Taq DNA polymerase avoids vector self-ligation)、イースト(Yeast)、第29(10)巻、p.419~23、(2012

10

20

30

40

50

年))、ゲートウェイクロニング(オオツカ(Ohtsuka)著、ランチビオティクス:作用機序、生合成及び生体工学(Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering)、カレントファーマシューティカルバイオテクノロジー(Curr Pharm Biotechnol)、第10(2)巻、p.244~51、(2009年);1999年3月30日付けで発行された「操作された組換え部位を使用する組換えクロニング(Recombinational Cloning Using Engineered Recombination Sites)」という名称のハートレイ(Hartley)らに付与された米国特許第5,888,732号明細書;2001年8月21日付けで発行された「組換え部位を有する核酸を使用する組換えクロニング(Recombinational Cloning Using Nucleic Acids Having Recombination Sites)」という名称のハートレイ(Hartley)らに付与された米国特許第6,277,608号明細書及びトポイソメラーゼ媒介クロニング(ウド(Udo)著、ワクシニアトポイソメラーゼI媒介組換えへのポジティブブルーホワイトセレクションの導入による哺乳動物細胞での発現研究についてcDNAクロニングを促進する代替方法(An Alternative Method to Facilitate cDNA Cloning for Expression Studies in Mammalian Cells by Introducing Positive Blue White Selection in Vaccinia Topoisomerase I-Mediated Recombination) 20
、プロスワン(PLoS One)、第10(9)巻、p.e0139349(2015年);2005年7月12日付けで発行された「分子クロニングの方法及び試薬(Methods and Reagents for Molecular Cloning)」という名称のチェストナット(Chestnut)らに付与された米国特許第6,916,632 B2号明細書)を含む。これら及び他の核酸アセンブリ技法は、例えば、サンズ(Sands)及びブレント(Brent)著、シングルセグメントクロニング及びマルチセグメントDNAアセンブリのコーヘン-ボイヤー後の方法の概説(Overview of Post Cohen Boyer Methods for Single Segment Cloning and for Multisegment DNA Assembly)、カレントプロトコールインモレキュラーバイオロジー(Curr Protoc Mol Biol.)、第113巻、p.3.26.1~3.26.20、(2016年);カジーニ(Casini)ら著、基本及びブループリント:DNAアセンブリの方法及び基準(Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly)、ネイチャーレビューモレキュラーセルバイオロジー(Nat Rev Mol Cell Biol.)、第(9)巻、p.568~76、(2015年);パトロン(Patron)著、植物生物学のDNAアセンブリ:技法及びツール(DNA assembly for plant biology: techniques and tools)、カレントオピニオンインプラントバイオロジー(Curr Opinion Plant Biol.)、第19巻、p.14~9、(2014年)に記載されている。 40

【0087】

核酸アセンブリは、自動マルチモジュール細胞編集機器において使用される核酸アセンブリのタイプに応じて温度制御される。例えば、PCRが核酸アセンブリモジュールで利用される場合、モジュールは、温度を変性、アニーリング及び伸長間で循環させる熱サイクル機能を有する。単一温度アセンブリ方法が核酸アセンブリモジュールで使用される場合、モジュールは、実行中の特定のアセンブリプロセスを最適化する温度に達し、その温度を維持する能力を有する。これらの温度及びこれらの温度を維持する持続時間は、スク립トにより実行される予めプログラムされるパラメータの組によって決定され得るか、又は自動マルチモジュール細胞処理機器の処理システムを使用してユーザにより手動で制御され得る。

【0088】

一実施形態では、核酸アセンブリモジュールは、図4に示される等の1つの等温反応を使用してアセンブリを実行するモジュールである。等温アセンブリモジュールは、1つの等温反応を使用して分子クロニング法を実行するように構成される。特定の等温アセンブリ方法は、配列同一性に基づいて最高で15個までの核酸断片を同時に結合することができる。アセンブリ方法は、幾つかの実施形態では、隣接する核酸断片と約20~40個の塩基重複を含む、アセンブルされる核酸を提供する。断片は、緩衝成分と共に3つの酵素 - エキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼ及びリガーゼ - の混合物と混合される。プロセスは、等温であり、1つの反応容器を用いて1ステップ又は2ステップ方法で実行することができるため、等温アセンブリ反応は、自動マルチモジュール細胞処理機器での使用に理想的である。1ステップ方法により、1ステップ等温プロセスを用いて5つまでの異なる断片のアセンブリが可能である。断片及び酵素のマスターミックスは、結合され、50において最長で1時間にわたり培養される。最高で15個までの断片を有するより複雑な構造物を作成する場合又は100bp~10kbまでの断片を組み込む場合、通常、2ステップが用いられ、2ステップ反応には、マスターミックスの2つの別個の添加が必要とされる：一方は、エキソヌクレアーゼ及びアニーリングステップのためのものであり、2番目は、ポリメラーゼ及びライゲーションステップのためのものである。

10

【0089】

図4は、精製が統合された一例の等温核酸アセンブリモジュール400を示す。等温核酸アセンブリモジュール400は、液体を等温核酸アセンブリモジュール400内外に移送する（例えば、ピペット又はシッパーを介して）ためのアクセスガセット404を有するチャンバ402を含む。幾つかの実施形態では、アクセスガセット404は、交換式バイアルに接続され、交換式バイアルは、チャンバ402内に位置決めされる。例えば、ユーザ又はロボット操作システムは、処理のためにバイアルを等温核酸アセンブリモジュール400内に配置され得る。

20

【0090】

チャンバ402は、抵抗性ヒータ408と筐体406を共有する。試料が等温核酸アセンブリモジュール400のチャンバ402に導入されると、抵抗性ヒータ408を用いて、チャンバ402の内容物を所望の温度まで加熱し得る。温度上昇は、チャンバ402の内容物（例えば、ロボット操作システムのピペッター又はシッパーを介してアクセスガセット404を通して供給される材料）に基づいて設定され得る。自動マルチモジュール細胞処理システムの処理システムは、目標温度及び熱上昇プランを決定し得る。熱上昇及び目標温度は、筐体406内に含まれるサーミスタ410等の熱センサをモニタすることを通して制御され得る。特定の実施形態では、抵抗性ヒータ408は、筐体406内の温度を200~800C、250~750C、370~650C、400~600C、450~550C又は好適には約500Cに維持するように設計される。

30

精製モジュール

幾つかの実施形態では、核酸アセンブリモジュールが自動マルチモジュール細胞編集機器に含まれる場合、機器は、核酸アセンブリ混合物の不要成分（例えば、塩、鉍物）を除去し、特定の実施形態では、アセンブルされた核酸を濃縮する精製モジュールを含むこともできる。核酸アセンブリに続き液体を交換する方法の例には、磁性ビーズ（例えば、SPRI又はカリフォルニア州カールスバッド（Carlsbad, CA）所在のインビトロゲン社（Invitrogen Corp.）によるダイナル（Dyna1）（ダイナビーズ（Dyna bead））、シリカビーズ、シリカスピナラム、ガラスビーズ、沈殿（例えば、エタノール又はイソプロパノールを用いる）、アルカリ溶解、浸透精製、ブタノールを用いた抽出、膜ベースの分離技法、濾過等がある。

40

【0091】

一態様では、精製モジュールは、濾過、例えば限外濾過を提供する。例えば、多孔性が様々な異方性の親水性生成セルロース膜が装着された種々のマイクロ濃縮器が利用可能である。（例えば、ジュアン（Juan）、リ-ジュン（Li-Jung）ら著、「ヒスト

50

ンデアセチラーゼは、p53依存性遺伝子活性を特異的にダウンレギュレートする(Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation)、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、第275.27巻(2000年): p.20436~20443において用いられるミリポア(Millipore)SCXマイクロ濃縮器を参照されたい)。別の例では、精製及び濃縮は、不溶性リン酸塩を含むイオン交換器を用いて、アセンブルされた核酸及びイオン性塩を含む液体試料に接触し、液体を除去し、イオン交換基から核酸を溶出させることを含む。

【0092】

精製モジュールの特定の態様では、SPRIビーズが使用可能であり、 $0.6 \times \sim 2.0 \times$ の容積のSPRIビーズを核酸アセンブリに追加することができる。核酸アセンブリ産物は、SPRIビーズに結合し、SPRIビーズは、小粒をハーピングする管、容器又はチャンバの近くに磁石を自動的に位置決めすることにより小粒化される。例えば、 $0.6 \times \sim 2.0 \times$ の容積のSPRIビーズを核酸アセンブリに追加することができる。SPRIビーズは、例えば、エタノールで洗浄され得、結合した核酸アセンブリ産物は、例えば、水、トリス(Tris)緩衝剤又は10%グリセリン中に溶出する。

【0093】

特定の態様では、磁石は、磁石を位置決めする線形アクチュエータに結合される。幾つかの実装形態では、核酸アセンブリモジュールは、アセンブリ及び精製を統合するように設計されたアセンブリ及び精製結合モジュールである。例えば、等温核酸アセンブリモジュールに関連して上述したように、等温核酸アセンブリ反応が行われるのに十分な時間が経過すると、幾つかの実装形態では、チャンバ402の内容物(例えば、等温核酸アセンブリ試薬及び核酸)は、磁性ビーズ(図示せず)と結合されて、精製プロセスを活性化する。緩衝剤中のSPRIビーズは、例えば、ロボットハンドリングシステムにより等温核酸アセンブリモジュールの内容物に送られる。その後、幾つかの実装形態では、ソレノイド412は、磁石により作動して、チャンバ402内に含まれる磁性ビーズを励起させる。特定の例では、ソレノイドは、チャンバ402内の磁性ビーズに約0.9kg(2ポンド)磁気引張力~約2.26kg(5ポンド)磁気引張力又は約1.8kg(約4ポンド)磁気引張力を付与し得る。チャンバ402の内容物は、アセンブルされたベクター及びオリゴヌクレオチドが磁性ビーズに結合するのに十分な時間にわたり培養され得る。

【0094】

幾つかの実装形態では、結合後、結合した等温核酸アセンブリ混合物(例えば、等温核酸アセンブリ試薬+アセンブルされたベクター及びオリゴヌクレオチド)は、等温核酸アセンブリモジュールから取り出され、ビーズに付着した核酸は、80%エタノールで1回~数回洗浄される。洗浄されると、ビーズに付着した核酸は、緩衝剤中に溶出し、形質転換モジュールに移送される。

【0095】

幾つかの実装形態では、バイアルは、処理のためにチャンバ402内の定位置にロックされる。例えば、ユーザは、ピペッター又はシッパーとの係合時、バイアルを保持するように設計された、チャンバ402内の戻り止めを超えてバイアルを押し得る。別の例では、ユーザは、バイアルを定位置に捻り得、それにより突起部を対応するチャンネルに係合させ、上向きの運動を阻止する。位置センサ(図示せず)は、バイアルの退避を保証し得る。特定の例では、位置センサは、チャンバ402の一部とバイアルとの係合を検出する磁気センサである。他の実施形態では、位置センサは、退避位置におけるバイアルの存在を検出する光学センサである。チャンネル及び突起部を使用する実施形態では、突起物により押下された機械的スイッチはバイアルの係合を検出し得る。

成長モジュール

核酸がアセンブルされているとき、編集への準備として細胞を成長させ得る。細胞成長は、成長モジュールにおいて測定される光学濃度(例えば、OD600nm)によりモニ

10

20

30

40

50

タすることができ、フィードバックループを用いて、標的時間に目標ODに達するように細胞成長を調節する。測定することができる細胞濃度及び生理学的状態の他の尺度には、限定ではなく、pH、溶解酸素、放出酵素、音響特性及び電気特性がある。

【0096】

幾つかの態様では、成長モジュールは、分光光度計又は蛍光光度計により問い合わせられるシェーカ又はボルテクサ内に培養管を含む。シェーカ又はボルテクサは、細胞を加熱又は冷却することができ、細胞成長は、リアルタイム吸光度又は蛍光測定によりモニタされる。一態様では、細胞は、25 ~ 40 で1OD ~ 10ODのOD600吸光度まで成長する。細胞は、25 ~ 35、25 ~ 30、30 ~ 40、30 ~ 35、35 ~ 40、40 ~ 50、40 ~ 45 又は44 ~ 50 の温度範囲で成長することもできる。別の態様では、細胞は、42 ~ 50 に加熱されることにより又は誘導剤を添加することにより誘導される。細胞は、42 ~ 46、42 ~ 44、44 ~ 46、44 ~ 48、46 ~ 48、46 ~ 50 又は48 ~ 50 の範囲で加熱することにより誘導することもできる。幾つかの態様では、細胞は、誘導後、0 ~ 10 に冷却される。細胞は、誘導後、0 ~ 5、0 ~ 2、2 ~ 4、4 ~ 6、6 ~ 8、8 ~ 10 又は5 ~ 10 の温度範囲まで冷却することもできる。

10

【0097】

図8Aは、図8B及び図8Cに示される細胞成長デバイス850等の細胞成長デバイスと併用する回転成長バイアル800の一実施形態を示す。幾つかの実装形態では、回転成長バイアル800は、液体培地及び細胞を受け取る開放端部804と、細胞を成長させる主容器を画定する中央バイアル領域806と、少なくとも1つの光路808、810を画定するテーパ-狭窄領域818と、閉鎖端部816と、駆動係合機構812とを有する透明容器である。回転成長バイアル800は、長手方向中心軸820を有し得、バイアル800は、長手方向中心軸820の周りを回転し、光路808、810は、概してバイアルの長手軸に直交し得る。幾つかの例では、第1の光路810は、テーパ-狭窄領域818の下狭窄部に位置し得る。幾つかの実装形態では、駆動係合機構812は、駆動機構(例えば、アクチュエータ、モータ(図示せず))と係合して、バイアル800を回転させる。アクチュエータは、駆動モータ864(図8D)のための駆動シャフト874を含み得る。

20

30

【0098】

幾つかの実装形態では、回転成長バイアル800は、例えば、テーパ-狭窄領域818の上部テーパ領域に第2の光路808を含む。幾つかの例では、第2の光路808のためにテーパ-狭窄領域818の上部テーパ領域を画定する壁は、第1の光路810のためのテーパ-狭窄領域810の下部狭窄部を画定する壁よりも長手軸820に対してより広い角度で配置され得る。例えば、光路808、810の両方は、細胞培養物(細胞+成長培地)が常に充填される回転成長バイアル800の領域に位置し得、成長バイアル800の回転速度による影響を受けない。示されるように、第2の光路808は、第1の光路810よりも短く、バイアル内の細胞培養物のOD値が高レベル(例えば、細胞成長プロセスの後期)である場合、光学濃度(OD)値の高感度測定を可能にする一方、第1の光路810は、バイアル内の細胞培養物のOD値がより低レベル(例えば、細胞成長プロセスの初期)である場合、OD値の高感度測定を可能にする。

40

【0099】

回転成長バイアル800は、再使用可能であり得るか、又は好適には、回転成長バイアルは、消耗品である。幾つかの実装形態では、回転成長バイアル800は、消耗品であり、成長培地が予め充填されてユーザに提示することができ、バイアル800は、フィルムシールで開放端部804において封止される。そのようにパッケージされた培地充填回転成長バイアルは、スタンドアロン細胞成長デバイスと併用するか、又は自動マルチモジュール細胞処理システムの一部である細胞成長モジュールと併用するキットの一部であり得る。細胞をバイアル内に導入するために、ユーザは、所望の容積の細胞をピペットで採取

50

し、ピペット先端部を用いてバイアル 800 のフォイルシールを突き破るのみでよい。代替的に、当然ながら、自動機器は、例えば、試薬カートリッジから成長バイアルに細胞を移送し得る。成長培地は、成長バイアル内に提供され得るか、又は細胞の添加前、試薬カートリッジから成長バイアルに移送され得る。開放端部 804 は、細胞成長デバイス 850 (図 8 B 及び図 8 C) と重なり係合する延長リップ 802 を含み得る。自動機器では、回転成長バイアル 800 には、図 13 に示される処理システム 1310 の一部であるスキャナ又はカメラにより読み取り可能なバーコード又は他の識別手段をタグ付けし得る。

【0100】

幾つかの実装形態では、回転成長バイアル 800 の容積及び細胞培養物 (成長培地を含む) の容積は、広く様々であり得るが、回転成長バイアル 800 の容積は、バイアル 800 が回転している間、成長バイアル 800 内の細胞培養物が適切なエアレーションを受けるのに十分に大きいものであるべきである。実際には、回転成長バイアル 800 の容積は、1 ml ~ 250 ml、2 ml ~ 100 ml、5 ml ~ 80 ml、10 ml ~ 50 ml 又は 12 ml ~ 35 ml の範囲であり得る。同様に、細胞培養物 (細胞 + 成長培地) の容積は、回転成長バイアル 800 内で適切にエアレーションできるようにするのに適切であるべきである。したがって、細胞培養物の容積は、成長バイアル 800 の容積の約 10% ~ 85%、成長バイアルの容積の 15% ~ 80%、成長バイアルの容積の 20% ~ 70%、30% ~ 60% 又は 40% ~ 50% であるべきである。一例では、35 ml の成長バイアル 800 の場合、細胞培養物の容積は、約 4 ml ~ 約 27 ml である。

【0101】

幾つかの実装形態では、回転成長バイアル 800 は、生体適合性透明材料から製作されるか、又はバイアル 800 の少なくとも光路を含む部分は、透明である。更に、回転成長バイアル 800 が製作される材料は、温度ベースの細胞アッセイ及び低温での長期貯蔵の両方に対応するために、約 0 以下まで冷却可能であり、約 75 以上まで加熱可能であるべきであり、例えば約 2 まで冷却若しくは約 70 まで加熱、約 4 まで冷却若しくは約 60 まで加熱又は約 4 まで冷却若しくは約 55 まで加熱可能であるべきである。更に、バイアルの製作に用いられる材料は、好適には、スピン中、変形なしで 55 までの温度に耐えることが可能である。適した材料には、ガラス、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリ(メタクリル酸メチル) (PMMA)、ポリスルホン、ポリウレタン及びこれら及び他のポリマーのコポリマーがある。好適な材料には、ポリプロピレン、ポリカーボネート又はポリスチレンがある。幾つかの実装形態では、回転成長バイアル 800 は、例えば、射出成形又は押し出しにより安価に製作される。

【0102】

図 8 B は、回転成長バイアル 800 の代替の実装形態である回転成長バイアル 800 b の上面図を示す。幾つかの例では、バイアル 800 b は、バイアル 800 b の中心に向かって突出する、内面に固定された 1 つ又は複数のパドル 822 を含み得る。図 8 B に示されるバイアル 800 b は、バイアル 800 b の周囲で略等間隔に離間される 3 つのパドル 822 を含むが、他の例では、バイアル 800 b は、2 つ、4 つ又はそれを超えるパドル 822 を含み得る。幾つかの実装形態では、パドルは、細胞成長デバイス内で回転するバイアル 800 b 内で高度の混合及びエアレーションを提供し、微生物の成長を促進する。

【0103】

図 8 C 及び図 8 D は、回転成長バイアル 800 を受ける一例の細胞成長デバイス 850 の図を示す。幾つかの実装形態では、細胞成長デバイス 850 は、回転して、バイアル内の細胞又は細胞成長を所定の温度範囲に加熱又は冷却する。幾つかの実装形態では、回転成長バイアル 800 は、バイアル 800 の延長リップ 802 が主筐体 852 の上面を超えて延びた状態で主筐体 852 内部に位置することができる。幾つかの態様では、延長リップ 802 は、ユーザがバイアル 800 を挿入又はデバイス 850 の主筐体 852 からバイアル 800 を退避させるための把持表面を提供する。更に、主筐体 852 内に完全に挿入された場合、延長リップ 802 の下面は、主筐体 852 の上面に当接する。幾つかの例で

10

20

30

40

50

は、細胞成長デバイス 850 の主筐体 852 は、回転成長バイアル 800 の外面が主筐体 852 の内面に当接し、それによりバイアル 800 を主筐体 852 内に固定するようなサイズである。幾つかの実装形態では、細胞成長デバイス 850 は、主筐体 854 及び主筐体 852 の下端部に配置された下部筐体 856 の各側に配置された端部筐体 854 を含むことができる。幾つかの例では、下部筐体 856 は、細胞成長デバイス 850 を温度制御（例えば、加熱 / 冷却）機構又は自動細胞処理システムのシャーシ等の他の構造体に取り付けるのに使用することができるフランジ 858 を含み得る。

【0104】

図 8D に示されるように、幾つかの実装形態では、細胞成長デバイス 850 は、主筐体 852 内に挿入された回転成長バイアル 800 の垂直負荷を支持する、主筐体 852 内に位置する上部軸受 860 及び下部軸受 862 を含むことができる。幾つかの例では、細胞成長デバイス 850 は、主筐体 852 に挿入されたとき、バイアル 800 の第 1 の光路 810 及び第 2 の光路 808 と位置合わせされる主光学ポート 866 及び補助光学ポート 868 を含むこともできる。幾つかの例では、主光学ポート 866 及び補助光学ポート 868 は、主筐体のギャップ、開口部又は光をバイアル 800 に通して、細胞成長 OD 測定を実行できるようにする透明材料から構築された主筐体の部分である。光学ポート 866、868 に加えて、細胞成長デバイス 850 は、光路の 1 つ又は複数の照明源を提供する発光ボード 870 と、光が回転成長バイアル 800 内の細胞培養液を通った後、光を検出する検出器ボード 872 とを含み得る。一例では、発光ボード 870 に配置された照明源は、細胞培養物（例えば、哺乳動物細胞であるか、細菌細胞であるか、動物細胞であるか、酵母細胞であるか）で通常使用される成長培地に見合った 1 つ又は複数の標的波長の照明を提供する発光ダイオード（LED: light emission diode）又はフォトダイオードを含み得る。

【0105】

幾つかの実装形態では、発光ボード 870 及び / 又は検出器ボード 872 は、有線又は無線接続を通して、発光ボード 870 により出力された光の波長を制御し、検出器ボード 872 において検知された照明を受信して処理する処理システム（例えば、処理システム 126、1220、1310）に通信可能に結合される。幾つかの態様では、遠隔制御可能な発光ボード 870 及び検出器ボード 872 は、細胞成長の過程中、自動 OD 測定の実行を提供する。例えば、処理システム 126、1220 は、OD 測定が実行される周期を制御し得、これは、所定の間隔であり得るか又はユーザ要求に回答し得る。更に、処理システム 126、1220 は、検出器ボード 872 から受信したセンサデータを用いて、リアルタイム OD 測定を実行し、細胞成長条件（例えば、温度、回転の速度 / 方向）を調節することができる。

【0106】

幾つかの実装形態では、下部筐体 856 は、回転成長バイアル 800 を細胞成長デバイス 850 内で回転させる回転運動を生成する駆動モータ 864 を含み得る。幾つかの実装形態では、モータ 864 は、回転成長バイアル 800 の下端部に結合する駆動シャフト 874 を含み得る。幾つかの実装形態では、回転成長バイアル 800 の回転運動を生成するモータ 864 は、0 ~ 約 3000 RPM で一定の毎分回転数（RPM: revolution per minute）を維持するように構成することができる内蔵駆動制御を有するブラシレス DC 型駆動モータである。代替的に、ステップ、サーボ又はブラシ DC モータ等の他のモータタイプを用いることができる。任意選択的に、モータ 864 は、回転方向を逆にできるようにする方向制御と、実際の RPM を検知し報告するタコメータとを有することもできる。他の例では、モータ 864 は、所定の頻度で回転方向を逆にするにより振動運動を生成することができる。一例では、バイアル 800 は、350 RPM の速度で 1 秒間、各方向に回転する。幾つかの実装形態では、モータ 864 は、有線又は無線通信ネットワークを通して、モータ 864 の動作を制御するように構成された処理システム（例えば、処理システム 126、1220）に通信可能に結合され、これは、例えば、図 13 のモジュールコントローラ 1330 に関連して説明するように、プロセッサに

10

20

30

40

50

プログラムされ、且つ / 又はユーザ入力により提供されるプロトコールを実行することを含むことができる。例えば、及びモータ 864 は、バイアル 800 の速度及び / 又は回転方向を変えて、細胞培養物の軸方向歳差運動を生じさせ、それにより細胞の凝集を回避し、エアレーションを上げるために混合を強化するように構成することができる。幾つかの例では、モータ 864 の速度又は方向は、検出器ボード 872 から受信される光学濃度センサデータに基づいて変更され得る。

【0107】

幾つかの実施形態では、細胞成長デバイス 850 の主筐体 852、端部筐体 854 及び下部筐体 856 は、アルミニウム、ステンレス鋼及びプラスチックを含む他の熱伝導性材料を含め、頑丈な材料から製作し得る。これらの構造体又はその部分は、種々の技法、例えば金属製作、射出成形、融合される構造層の作成等を通して作成することができる。幾つかの例では、回転成長バイアル 800 は、再使用可能であるが、他の実施形態では、バイアル 800 は、好適には、消耗品である。幾つかの態様では、細胞成長デバイス 850 の他の構成要素は、好適には、再使用可能であり、スタンドアロンベンチトップデバイス又は自動マルチモジュール細胞処理システム内のモジュールとして機能することができる。

10

【0108】

幾つかの実装形態では、細胞成長モジュールに通信可能に結合される処理システムは、成長細胞培養物の「ブランク」又は制御として用いられる情報をプログラムされ得る。幾つかの例では、「ブランク」又は制御は、細胞成長培地のみを含む容器であり、これは、100%透過率及びODを生じる一方、細胞試料は、光線を偏向させ、低い割合の透過率及び高いODを有する。細胞が培地で成長し、濃度が高くなるにつれて、透過率が下がり、ODが上がる。幾つかの実装形態では、細胞成長モジュールのプロセッサは、細胞培養物（例えば、哺乳動物細胞であるか、細菌細胞であるか、動物細胞であるか、酵母細胞であるか）で通常使用される成長培地に見合った波長値をブランクに用いるようにプログラムされ得る。代替的に、第2の分光光度計及び容器を細胞成長モジュールに含めることができ、その場合、第2の分光光度計は、指定された間隔でブランクを読み取るのに用いられる。

20

【0109】

図8Eは、回転ではなく振動を用いて温度を制御し、細胞成長バイアル890（図8F）内で混合及びエアレーションを促進する別のタイプの細胞成長デバイス880を示す。幾つかの例では、細胞成長デバイス880のサイズは、自動マルチモジュール細胞処理システムに統合するために従来のベンチトップシェーカーよりも小さい。幾つかの実装形態では、細胞成長デバイス880は、細胞成長バイアル890を受ける筐体884を含む。幾つかの例では、細胞成長デバイス880は、モータの速度に基づいてバイアル890の軌道運動を生成する、バイアル890の下に位置するモータアセンブリを含むことができる。一例では、バイアル890は、約250RPMで軌道を回るより大きいベンチトップシェーカーよりもはるかに高速である、750RPM等の600RPM~900RPMで水平面において軌道を移動する。幾つかの態様では、振動運動は、少なくとも1つの水平面において生成される。幾つかの例では、振動細胞成長デバイス880と併用される細胞成長バイアル890は、従来のベンチシェーカーで用いられるフラスコと略同様の形状の円錐形下部管である。回転細胞成長デバイス850と同様に、細胞成長デバイス880は、細胞成長の過程にわたり自動OD測定を行うために照明ボード870及び検出器ボード872を含み得る。幾つかの例では、光源882を細胞成長デバイス880に結合し得、光源882は、検出器ボードにより測定される照明を生成し、幾つかの例では、検出器ボードは、バイアル890の下又は光源882からバイアル890の逆側に配置される。

30

40

【0110】

ゲノム編集を受けなかった細胞の背景を低減するために、成長モジュールは、選択プロセスにより編集細胞を富化することもできる。例えば、誘導された核酸は、抗生物質耐性又は別の選択可能なマーカを付与する遺伝子を含むことができる。編集の続くラウンドで

50

選択可能なマーカの導入を交互にすることで、非編集細胞の背景をなくし、自動マルチモジュール細胞編集機器の複数のサイクルを可能にして、一連のゲノム編集を有する細胞を選択できるようにすることもできる。

【0111】

適した抗生物質耐性遺伝子には、限定ではなく、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナバニン耐性遺伝子、プラストサイジン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピュロマイシン耐性遺伝子又はクロラムフェニコール耐性遺伝子等の遺伝子がある。幾つかの実施形態では、死んだ細胞背景の除去は、洗浄剤、浸透ストレス、温度、酵素、プロテアーゼ、バクテリオファージ、還元剤又はカオトロープ等の溶解性エンハンサーを用いて支援される。他の実施形態では、細胞除去及び/又は培地交換は、死んだ細胞背景の低減に用いられる。細胞洗浄及び/又は濃縮モジュール

細胞洗浄及び/又は濃縮モジュールは、細胞環境において液体を交換する任意の方法を利用することができ、細胞を濃縮し得るか、又は核酸アセンブリモジュールにおいて用いられるものと基本的に同じ容積の液体若しくはより大きい容積の液体のままにさせることができる。更に、幾つかの態様では、細胞洗浄モジュールで実行されるプロセスは、例えば、洗浄にグリセリンを用いることにより細胞をエレクトロコンピテントにもする。

【0112】

密度勾配精製、透析、イオン交換カラム、濾過、遠心分離、希釈及び精製へのビーズの使用を含め、細胞の洗浄に多くの異なる方法が使用可能である。

幾つかの態様では、細胞洗浄及び/又は濃縮モジュールは、遠心分離デバイスを利用する。他の態様では、細胞洗浄及び/又は濃縮モジュールは濾過モジュールを利用する。更に他の態様では、細胞表面に結合する部分にビーズが結合される。これらの部分は、限定ではなく、抗体、レクチン、小麦胚芽凝集素、突然変異リゾチーム及びリガンドを含む。

【0113】

他の態様では、細胞は、磁化するように組み換えられ、洗浄ステップ後、磁石が細胞を小粒状にできるようにする。細胞磁化のメカニズムは、限定ではなく、フェリチンタンパク質発現を含むことができる。

【0114】

幾つかの実装形態では、細胞洗浄及び/又は濃縮モジュールは、遠心分離アセンブリモジュールである。幾つかの実装形態では、図3A~図3Cを参照すると、遠心分離アセンブリモジュール300は、ロボットハンドリングシステム(図示せず)により作動して、核酸アセンブリ材料(例えば、オリゴ、ベクター骨格、酵素等)を、ロータ308に接続されたバイアルパケツ306a、b内に配置された1つ又は複数のバイアル304a、bに送るように設計された上部ドア302を含む。幾つかの実施形態では、ロボットハンドリングシステムは、バイアル304a、bを遠心分離アセンブリモジュール300に送る。他の実施形態では、ユーザは、バイアル304a、bをバイアルパケツ306、b内に配置する。幾つかの実施形態では、バイアルパケツ306a、bは、回転中、バイアルパケツ306a、bが外側に振れ得るように、ヒンジ接続を介してロータ308に接続される。他の実施形態では、パケツ306a、bの位置は、固定される。

【0115】

幾つかの実施形態では、遠心分離アセンブリモジュール300は、気象制御される。例えば、内部温度は、冷却コイル310及び断熱材312により管理され得る。冷却材供給及びリターンライン314は、冷却材を冷却コイル310にポンピングし得、それにより遠心分離アセンブリモジュール300のチャンバ316を冷却し得る。幾つかの例では、遠心分離アセンブリモジュール300は、0~10、2~8、最適には約4にチャンバ316を冷却するように設計され得る。更に、濃縮制御を提供して、チャンバ316内の湿度を制限し得る。幾つかの実施形態では、気象制御は、自動マルチモジュール細胞処理機器の処理システムを通して設定される。例えば、処理システムは、信号を回路320のインターフェースに向け得る。

10

20

30

40

50

【0116】

幾つかの実施形態では、モータ318は、ロータ308を回転駆動する。モータ318、したがってロータ308の加減速は、自動マルチモジュール細胞処理機器の処理システムにより制御され得る。示されるように、運動センサ322（例えば、加速度計又はジャイロスコープ）は、モータ318のベースに位置決めされて、回転パラメータをモニタする。代替的に、加速度計又はジャイロスコープ等の運動センサ（図示せず）は、チャンバ316内に配置されて、回転パラメータをモニタし得る。例えば、処理システムは、運動センサからの信号をモニタし、状況を分析して、回転が外部パラメータである場合、安全遮断を行い得る。説明のための実施形態では、ロータアームは、最高で10000毎分回転数（RPM）、最高で8000RPM又は最高で約6500RPMで回転するように設計され得る。処理システムは、遠心分離アセンブリモジュール300に供給される材料に基づいて回転速度を変更し得る。

10

【0117】

幾つかの実装形態では、細胞洗浄及び/又は濃縮モジュールは、濾過モジュールである。図7Aを参照すると、ブロック図は、濾過モジュール700の一例の機能ユニットを示す。幾つかの実装形態では、濾過モジュール700の主制御機構702は、洗浄流体706を取り込むための第1の液体ポンプ704aと、液体廃棄物を液体廃棄物ユニット708（例えば、図1Aの液体廃棄物ユニット114又は図12A及び図12Bの液体廃棄物ユニット1228等）に除去するための第2の液体ポンプ704bとを含む。フローセンサ712を液体廃棄物ユニット708へのコネクタ714に配置されて、濾過モジュールからの液体廃棄物のリリースをモニタし得る。弁716（示されるような三方弁）を洗浄流体716へのコネクタ718に配置して、洗浄流体716及び濾過モジュール700を選択的に接続し得る。

20

【0118】

幾つかの実装形態では、濾過モジュール700は、細胞試料を濾過及び濃縮するフィルタマニホールド720を含む。フィルタマニホールド720は、1つ又は複数の温度センサ722及び圧力センサ724を含み、洗浄流体及び/又は液体廃棄物のフロー及び温度をモニタし得る。幾つかの実施形態では、センサ722、724は、図13の処理システム1310等の自動マルチモード細胞処理システムの処理システムによりモニタ及び分析される。フィルタマニホールド720は、洗浄流体及び/又は液体廃棄物のフローを向ける1つ又は複数の弁726を含み得る。例えば、自動マルチモード細胞処理機器の処理システムは、濾過モジュール700により濾過を指示する命令の組に従って弁を作動させ得る。

30

【0119】

濾過モジュール700は、少なくとも1つのフィルタ730を含む。濾過モジュール700での使用に適したフィルタの例には、メンブレンフィルタ、セラミックフィルタ及び金属フィルタがある。フィルタは、任意の形状で使用され得、例えば、フィルタは、円筒形又は基本的に平坦であり得る。幾つかの実施形態では、所与の動作又は所与の作業フローに選択されるフィルタは、作業フローのタイプ（例えば、細菌、酵母、ウイルス等）又は処理中の材料の容積に依存する。例えば、平坦フィルタは、比較的 low コストであり、一般的に使用されるが、円筒形フィルタ等の表面積が大きいフィルタほど、より高い流量を受け入れ得る。別の例では、中空フィルタは、少量の試料（例えば、約10ml未満）を処理する場合、より低い回収率を示し得る。例えば、細菌と併用する場合、使用されるフィルタがメンブレンフィルタ、特に中空繊維フィルタであることが好適なことがある。「中空繊維」という用語は、管状膜を意味する。幾つかの例では、管の内径は、少なくとも0.1mm、より好適には少なくとも0.5mm、最適には少なくとも0.75mmであり、好適には、管の内径は、最大で10mm、より好適には最大で6mm、最適には最大で1mmである。中空繊維を有するフィルタモジュールは、G.E.ライフサイエンス（G.E. Life Sciences）（マサチューセッツ州マールボロ（Marlborough, MA））及びイノバプレップ（InnovaPrep）（ミズーリ州ドレクセル（Drexel, MO））（例えば、ページ（Page）らに付与された「使い捨て

40

50

流路を用いた液体 - 液体生物学的粒子濃縮器 (Liquid to Liquid Biological Particle Concentrator with Disposable Fluid Path)」という名称の米国特許出願公開第20110061474A1号明細書を参照されたい)を含め、種々の企業から市販されている。

【0120】

幾つかの実装形態では、濾過モジュール700は、使用後、フィルタ730を排出するフィルタ排出手段728(例えば、アクチュエータ)を含む。例えば、ユーザ又はロボットハンドリングシステムは、使用するために、濾過中、フィルタがフィルタマニホールド720により保持されるような位置にフィルタ730を押し得る。濾過後、使用済みフィルタ730を取り外すために、フィルタ排出アクチュエータ728は、フィルタ730を排出し、ユーザ又はロボットハンドリングシステムが使用済みフィルタ730を濾過モジュール700から取り外され得るようにフィルタ730をリリースし得る。幾つかの例では、使用済みフィルタ730は、図1A及び図1Bの固体廃棄物ユニット112、図12A及び図12Bの固体廃棄物ユニット1218内に配置され得るか、又は図7Dに示されるようにフィルタカートリッジ740に返され得る。

10

【0121】

幾つかの実装形態では、図7Dを参照すると、自動マルチモジュール細胞処理機器のシャーシ内に配置されるフィルタカートリッジ740に提供されるフィルタ730は、使用前、ロボットハンドリングシステム(例えば、図1A及び図1Bに関連して説明したロボットハンドリングシステム108又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム1218)により濾過モジュール700に輸送され、濾過モジュール700内に位置決めされる。

20

【0122】

幾つかの実装形態では、濾過モジュール700は、定期的な清掃を必要とする。例えば、処理システムは、清掃が必要である場合、自動マルチモジュール細胞処理機器のユーザインターフェースを通して及び/又は無線メッセージング手段(例えば、テキストメッセージ、電子メール及び/又は個人計算デバイスアプリケーション)を通してユーザに警告し得る。例えば、汚染除去フィルタは、濾過モジュール700に装填され得、濾過モジュール700は、洗浄液及び/又はアルコール混合物を用いて清掃され得る。

30

【0123】

幾つかの実装形態では、濾過モジュール700は、コネクタ718を介して、洗浄流体716を含む洗浄カートリッジ710(図6Aの洗浄カートリッジ600等)と流体接続される。例えば、ユーザが洗浄カートリッジ710を自動マルチモジュール細胞処理機器のシャーシ内に位置決めされると、コネクタ718は、洗浄カートリッジ710の下部流入口と嵌合して、洗浄流体716と濾過モジュール700との間に液体通路を作り得る。

【0124】

幾つかの実装形態では、図7B及び図7Cを参照すると、デュアルフィルタ濾過モジュール750は、デュアル洗浄リザーバ754上に配置されるデュアルフィルタ752、754を含む。一例では、各フィルタは、 $0.45\mu\text{m}$ の孔を有し、 85cm^2 よりも大きい面積を有する中空芯繊維フィルタであり得る。幾つかの例では、洗浄リザーバ754の容積は、 50mL 、 100mL 又は 200mL 超であり得る。幾つかの実装形態では、洗浄リザーバ754は、図6Aの洗浄又は試薬カートリッジ600等の洗浄カートリッジ756に配置される。

40

【0125】

幾つかの実装形態では、自動マルチモジュール細胞処理機器の処理システムは、X(水平)及びZ(垂直)方向においてデュアルフィルタ752の作動を制御して、フィルタ752a、752bを洗浄リザーバ754に位置決めする。特定の例では、デュアルフィルタ752は、X軸に沿って協調して移動し得るが、独立したZ軸移動範囲を有し得る。

【0126】

示されるように、濾過モジュール750のデュアルフィルタ752は、細アーム本体7

50

58に接続される。幾つかの実施形態では、濾過モジュール750の任意のポンプ及び弁は、本体758から離れて（例えば、自動マルチモジュール細胞処理機器のシャーシのフロア内）配置され得る。このようにして、濾過モジュール750は、はるかに嵩張る従来の市販の濾過モジュールを置換し得る。

【0127】

更に、幾つかの実施形態では、濾過モジュール750は、図7Aの貯蔵ユニット708又は図1Aの液体廃棄物格納ユニット114若しくは図12A及び図12Bの1228等の液体廃棄物格納ユニットに液体廃棄物をリリースするように設計された破棄物パージシステムと液体連通する。

形質転換モジュール

形質転換モジュールは、トランスフェクション、形質転換及び微量流体技術の分野の当業者により日常的に用いられる任意の細胞形質転換又はトランスフェクション技法を実施し得る。形質転換は、マイクロ管、試験管、キュベット、マルチウェルプレート、微小繊維及びフロー機器で行うことができる。形質転換モジュールの温度及び制御は、ユーザにより及び/又は処理システムに提供されるスクリプトを通して設定される制御を用いて、図13の処理システム1310等の処理システムを用いて制御することができる。

【0128】

形質転換は、外因性核酸配列（例えば、DNA）を標的細胞に導入する、分野で認識されている種々の技法の包含が意図され、本明細書で使用される場合、「形質転換」という用語は、全ての形質転換技法及びトランスフェクション技法を包含する。そのような方法には、限定ではなく、電気穿孔、リポフェクション、光穿孔、注入、マイクロ沈殿、マイクロ注入、リポソーム、微粒子銃、ソノポレーション、レーザー誘起穿孔、ビーズトランスフェクション、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈又はDEAE-デキストラン-媒介トランスフェクションがある。細胞は、例えば、スクロース又はグリセリン洗浄を用いてベクター取り込みに向けて準備することもできる。更に、化学的トランスフェクションを機械的方法と組み合わせるトランスフェクション方法論であるマグネトフェクション等の機械的及び化学的トランスフェクション方法の機能を利用するハイブリッド技法を用いることができる。別の例では、陽イオン脂質を遺伝子銃又はエレクトロポレータと組み合わせることで展開し得る。標的細胞の形質転換又はトランスフェクションに適した材料及び方法は、例えば、グリーン（Green）及びサムブルック（Sambrook）著、（分子クローニング：ラボラトリーマニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）、第4版、コールドスプリングハーバ研究所プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、ニューヨーク州コールドスプリングハーバ（Cold Spring Harbor, N.Y.）、2014年）において見出すことができる。

【0129】

細胞及び電気穿孔プロセスに向けて細胞中に電気穿孔される材料（試薬）の懸濁に用いられる培地又は緩衝剤は、限定ではなく、MEM、DMEM、IMDM、RPMI、ハンクス、PBS又はリンガー液を含めた培地又は緩衝剤であり得、培地は、キットの一部として試薬カートリッジで提供され得る。大半の真核細胞の電気穿孔では、培地又は緩衝剤は、通常、適切な浸透圧を維持するために塩を含む。培地又は緩衝剤中の塩は、培地を導電性にもする。細菌等の非常に小さい真核細胞の電気穿孔では、水又は10%グリセリンは、低導電培地として用いられて、非常に高い電場強度を可能にすることがある。その場合、送られる荷電分子は、なおも水系培地の導電性を脂質系細胞膜より高くし、培地は、なおも特に細胞膜と比較して導電性として大まかに見なされ得る。

【0130】

選択した細胞中に電気穿孔する化合物は、核酸、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質、ホルモンのような小分子、サイトカイン、ケモカイン、薬剤又は薬剤前駆体等の電気穿孔に有用であることが当技術分野で既知の任意の化合物であり得る。

10

20

30

40

50

【0131】

細胞への材料の電気穿孔を達成するのに十分であるが、大きすぎない電圧を使用することが重要であり、その理由は、大きすぎる電圧は、細胞生存能力を下げるためである。例えば、ヒト細胞株の懸濁液を電気穿孔するために、200ボルトが、約1000 μ Fのキャパシタからの指数的放電を用いた4mmギャップキュベットでの0.2ml試料に必要である。しかしながら、同じ0.2ml細胞懸濁液が、2cm電極距離（キュベットギャップ距離の5倍）を有するより長い容器内に配置される場合、必要とされる電圧は、1000ボルトであるが、キャパシタからの電気エネルギーは、

$$E = 0.5 U^2 C$$

の式に従うため、40 μ F（1000 μ Fの1/25）のみのキャパシタが必要であり、式中、Eは、電気エネルギーであり、Uは、電圧であり、Cは、キャパシタンスである。したがって、高電圧パルス生成器は、同様の量のエネルギーの貯蔵に必要なキャパシタがはるかに小さいため、実際に製造が容易である。同様に、高電圧の他の波形を生成することは難しくない。

10

【0132】

本開示の電気穿孔デバイスは、高率の細胞形質転換を比較的短い時間量で可能にすることができる。細胞形質転換率は、形質転換されている細胞のタイプ及び数に依存する。例えば、大腸菌（E. coli）の場合、電気穿孔デバイスは、毎秒1~10¹⁰細胞、毎秒10⁴~10⁷細胞、毎秒10⁵~10⁸細胞又は毎秒10⁶~10⁹細胞という細胞形質転換率を提供することができる。電気穿孔デバイスは、デバイスを用いて1つの形質転換手順で1細胞~10¹⁰細胞の範囲の細胞のバッチの形質転換を可能にすることもできる。

20

【0133】

本開示の電気穿孔デバイスを用いた形質転換の効率は、細胞の少なくとも10%を生体分子の送達を可能にするのに十分に穿孔させることができる。好適には、本開示の電気穿孔デバイスを使用する形質転換の効率は、細胞の少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%又は95%超を生体分子の送達を可能にするのに十分に穿孔させることができる。

【0134】

幾つかの実施形態では、電気穿孔は、キュベット、ウェル、管、チャンバ、フローセル、チャンネル又はピペット先端部において実行される。他の実施形態では、キュベット、ウェル、管又はチャンバは、下部から充填され、空にされる。幾つかの実施形態では、キュベットは、下部に接続されたシッパを含む。

30

【0135】

図5Aは、上から下に、自動空気容積型ピペット（図示せず）等のピペットと係合するように構成された係合部材504及びフィルタ506を囲む筐体502を含む一例の単一ユニット電気穿孔デバイス500（電気穿孔モジュール）を示す。筐体502に加えて、電気穿孔チャンバ516の電極512及び壁514を含む電気穿孔デバイス500の電気穿孔キュベット510部分がある。幾つかの例では、チャンバは、幅0.01mm~100mm、高さ1mm~5,000mm及び容積1 μ l~20,000 μ lの範囲；幅0.03mm~50mm、高さ50mm~2,000mm及び容積500 μ l~10,000 μ lの範囲；又は幅0.05mm~30mm、高さ2mm~500mm及び容積25 μ l~4,500 μ lの範囲であり得る。

40

【0136】

幾つかの実施形態では、第1のリザーバ508は、フィルタ506と電気穿孔チャンバ516との間に配置され得、第1のリザーバは、電気穿孔チャンバ516と流体連通し、電気穿孔チャンバ516を超えて取り込まれ得る任意の細胞試料の空のリポジトリを提供する。幾つかの例では、第1のリザーバ508は、幅0.1mm~150mm、高さ0.1mm~250mm及び容積0.5 μ l~10,000 μ lの範囲；幅0.3mm~10

50

0 mm、高さ30 mm～150 mm及び容積20 μ l～4,000 μ lの範囲；又は幅0.5 mm～100 mm、高さ0.5 mm～100 mm及び容積5 μ l～2,000 μ lの範囲であり得る。

【0137】

幾つかの実装形態では、電気穿孔デバイス500は、第1のリザーバ508と流体連通する（フィルタ506を通して）別のリザーバ524を更に含み得る。第2のリザーバ524は、フィルタ506と係合部材504との間に配置されて、フィルタ506を超えさせ得る任意の液体による汚染からピペットを保護し得る。幾つかの例では、第2のリザーバ524は、幅0.1 mm～250 mm、高さ0.2 mm～1000 mm及び容積0.1 μ l～2,500 μ lの範囲；幅0.1 mm～150 mm、高さ50 mm～400 mm及び容積1 μ l～1,000 μ lの範囲；又は幅0.2 mm～100 mm、高さ0.5 mm～200 mm及び容積2 μ l～600 μ lの範囲であり得る。

10

【0138】

幾つかの実施形態では、シッパー518は、電気穿孔チャンバ516と流体連通し、電気穿孔チャンバ516に結合され、シッパー518は、電気穿孔チャンバ516に近い端部520と、電気穿孔チャンバ516から遠い端部522とを有する。シッパー518の先端部522は、電気穿孔デバイス500からの細胞試料の取り込み及び分注を可能にし得る。幾つかの実施形態では、シッパー518は、ロボット操作システムの一部である。幾つかの例では、シッパー518は、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリロニトリル-ブタジエン、ポリカーボネート、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）、ポリスルホン及びポリウレタン、これら及び他のポリマーのコポリマー等のプラスチック、ガラス（ガラス毛管等）及びアルミニウム、ステンレス鋼又は銅等の金属管から作られ得る。例示的な材料には、結晶スチレン及び環状オレフィンコポリマーがある。PEEKは、低価格及び製造が容易であるため、好適なプラスチックである。幾つかの例では、シッパー518は、幅0.02 mm～2,000 mm、高さ0.25 mm～2,000 mm及び容積1 μ l～2,000 μ lの範囲；幅0.02 mm～1,250 mm、高さ250 mm～1,500 mm及び容積1.5 μ l～1,500 μ lの範囲；又は幅0.02 mm～10 mm、高さ4.0 mm～1,000 mm及び容積2.5 μ l～1,000 μ lの範囲であり得る。

20

【0139】

幾つかの例では、電気穿孔デバイス500の筐体502及び係合部材504は、シリコーン、樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリロニトリル-ブタジエン、ポリカーボネート、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）、ポリスルホン及びポリウレタン、これら及び他のポリマーのコポリマーから作ることができる。同様に、幾つかの例では、電気穿孔チャンバの壁512は、シリコーン、樹脂、ガラス繊維、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリロニトリル-ブタジエン、ポリカーボネート、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）、ポリスルホン及びポリウレタン、これら及び他のポリマーのコポリマーで作成される。例示的な材料には、結晶スチレン及び環状オレフィンコポリマーがある。これらの構造体又はそれらの部分は、種々の技法、例えば射出成形、融合される構造層の作成等を通して作成することができる。ポリカーボネート及び環状オレフィンポリマーが好適な材料である。

30

40

【0140】

幾つかの実施形態では、電気穿孔チャンバ516は、概して円筒形の形状である。他の実施形態では、電気穿孔チャンバ516は、矩形、円錐形又は正方形であり得る。

フィルタ506は、幾つかの例では、多孔性プラスチック、疎水性ポリエチレン、綿又はガラス繊維から作ることができる。好適には、フィルタ506は、多孔性プラスチック等の低コスト材料で構成される。フィルタは、幅0.2 mm～500 mm、高さ0.2 mm～500 mm及び容積1 μ l～3,000 μ lの範囲；幅0.3 mm～250 mm、高さ20 mm～200 mm及び容積50 μ l～2,500 μ lの範囲；又は幅0.5 mm～

50

150 mm、高さ0.2 mm ~ 80 mm及び容積10 μ l ~ 2,000 μ lの範囲であり得る。

【0141】

係合部材504は、電気穿孔機器で用いられる液体ハンドリングデバイスに対応する寸法を有するように構成される。

電気穿孔デバイスの構成要素は、別個に製造され、次にアSEMBルされ得るか、又は電気穿孔デバイスの特定の構成要素は、一体として製造又は成形され得、他の構成要素は、成形後に追加される。例えば、シッパー、電気穿孔壁及び筐体は、一体として製造又は成形され得、電極、フィルタ、係合部材は、後に一体に追加されて、電気穿孔モジュールを形成する。同様に、電気穿孔壁及び筐体は、一体として製造され得、シッパー、電極、フィルタ、係合部材は、成形後、電気穿孔モジュールに追加される。統合される構成要素及び統合されない構成要素の他の組合せも可能である。

10

【0142】

電極512は、電場の印加に耐えることが可能な銅、チタン、アルミニウム、真鍮、銀、ロジウム、金又は白金等の金属又はグラファイトから形成することができる。例えば、印加された電場は、アルミニウムのような金属から作られた電極を破壊することができる。複数回使用される電気穿孔デバイスが望ましい場合、電極板は、電気化学的腐食に耐性がある金属で被覆することができる。貴金属、例えば、金のような電導性被覆材を用いて電極板を保護することができる。特定の例では、電気穿孔キュベットは、金の層で覆われたチタンから作られる第1の金属電極及び第2の金属電極を含み得る。逆に、電気穿孔デバイス500が1回の使用(例えば、使い捨て)に向けて設計される場合、アルミニウム等のより安価な金属を用い得る。

20

【0143】

一実施形態では、電極間の距離は、0.3 mm ~ 10 mmであり得る。別の実施形態では、電極間の距離は、1 mm ~ 20 mm、1 mm ~ 10 mm又は2 mm ~ 5 mmであり得る。電気穿孔チャンバの内径は、0.1 mm ~ 10 mmであり得る。電極間で異なる場強度を回避するため、電極は、電極の全面にわたり互いに対して一定の距離を有して平行に配置されるべきである。好適には、第1の金属電極及び第2の金属電極は、+ / - 20 μ m未満の距離変動で平行構成において2 mm ~ 4 mmの距離で隔てられる。更に、電極の表面は、ピン穴又はピークなしで可能な限り平滑であるべきである。1 μ m ~ 10 μ mの粗さRzを有する電極が好適である。他の実施形態では、電気穿孔デバイスは、例えば、電気穿孔デバイスのシッパー部分に接地電位を印加する少なくとも1つの追加の電極を含む。

30

【0144】

単一ユニットデバイス500として示されているが、他の実施形態では、電気穿孔モジュールは、複数の電気穿孔ユニットを含む。各電気穿孔ユニットは、1 μ l ~ 20 mlの細胞試料容積を電気穿孔するように構成され得る。例えば、マルチユニット電気穿孔デバイスにおいて、異なる容積容量の電気穿孔ユニットが利用可能であり得る。

【0145】

幾つかの実施形態において、マルチユニット電気穿孔モジュールでは、電極は、独立したスタンドアロン要素である。他の実施形態では、マルチユニット電気穿孔デバイスは、隣接する電気穿孔ユニット内の電気穿孔キュベットが電極を共有するように構成された電極を含み得る。そのようなマルチユニット電気穿孔デバイスは、好適には、自動デバイスにおいて、例えば2つ以上の電気穿孔ユニット、4つ以上の電気穿孔ユニット、8つ以上の電気穿孔ユニット、16以上の電気穿孔ユニット、32以上の電気穿孔ユニット、48以上の電気穿孔ユニット、64以上の電気穿孔ユニット又は更に96以上の電気穿孔ユニットを含み得る。複数の平行デバイスが利用される場合、通常、同様の容積が各ユニットに用いられる。

40

【0146】

寸法例が提供されるが、当然ながら、寸法は、細胞試料及び電気穿孔する細胞及び/又

50

は材料を含むのに用いられる容器の容積に応じて様々である。

好適な実施形態では、形質転換モジュールは、電気穿孔チャンバを有する筐体、電気パルス生成器と係合するように構成された第1の電極及び第2の電極を有する少なくとも1つのフロースルー電気穿孔デバイスを含む。幾つかの実装形態では、フロースルー電気穿孔デバイスは、図1Aのカートリッジ104、106等の置換可能なカートリッジ（例えば、形質転換モジュール110c）と嵌合するように構成され、それにより、電気接点は、電気穿孔デバイスの電極と係合する。特定の実施形態では、電気穿孔デバイスは、オートクレーブ可能及び/又は使い捨てであり、試薬カートリッジ内の試薬と共にパッケージされ、且つ/又は試薬カートリッジから取り外し可能であり得る。電気穿孔デバイスは、 $1\mu\text{l} \sim 2\text{ml}$ 、 $10\mu\text{l} \sim 1\text{ml}$ 、 $25\mu\text{l} \sim 750\mu\text{l}$ 又は $50\mu\text{l} \sim 500\mu\text{l}$ の細胞試料容積を電気穿孔するように構成され得る。開示される電気穿孔デバイスを用いて電気穿孔し得る細胞には、哺乳動物細胞（ヒト細胞を含む）、植物細胞、酵母、他の真核細胞、細菌、古細菌及び他の細胞タイプがある。

10

20

30

40

50

【0147】

自動マルチモジュール細胞処理システムで使用される試薬カートリッジ（例えば、図1Aのカートリッジ104）は、幾つかの実施形態では、1つ又は複数の電気穿孔デバイス（例えば、図1Aの電気穿孔モジュール110c）、好適にはフロースルー電気穿孔デバイスを含む。図5Bは、試薬カートリッジの一部であり得る6つ1組530のフロースルー電気穿孔デバイス（例えば、ユニット又はモジュール）532a~fの下部斜視図であり、図5Cは、同じフロースルー電気穿孔デバイスの上部斜視図である。カートリッジは、1つの基板534に配置された1~6つ又はそれを超えるフロースルー電気穿孔ユニット532a~fを含み得る。6つの結合されたフロースルー電気穿孔ユニット532a~fのそれぞれは、細胞試料入口を画定する対応するウェル536a~f及び細胞試料出口を画定するウェル538a~f（図5Cを参照されたい）を有する。更に、図5Bに見られるように、各電気穿孔ユニット532a~fは、各入口540a~f、各出口542a~f、各フローチャンネル544a~f及び各フロースルー電気穿孔ユニット532a~fの各フローチャンネル544a~f内の構築物の両側に2つの電極546a~fを含む。

【0148】

6つのフロースルー電気穿孔ユニット532a~fが製作されると、幾つかの実施形態では、隣接するユニットから各ユニットを分離する（すなわち「折って切り離す」）スコア線に沿って互いから分離し、一度に1つずつ用いることができるか、又は代替的に、他の実施形態では、2つ以上のフロースルー電気穿孔ユニット532a~fを並行して用いることができ、その場合、それらの2つ以上のユニットは、好適には、スコア線に沿って接続されたままである。

【0149】

一般的に言えば、マイクロ流体電気穿孔 - 約 10ml 未満且つ $1\mu\text{l}$ まで下がる細胞懸濁容積を用いる - は、トランスフェクション又は形質転換プロセスに対してより精密な制御可能であり、ベンチスケール電気穿孔デバイスと比較して、他の細胞処理ツールとの柔軟な統合を可能にする。したがって、マイクロ流体電気穿孔は、例えば、単一細胞形質転換、処理及び解析；マルチユニット電気穿孔デバイス構成；及び統合された自動マルチモジュール細胞処理及び解析という独自の利点を提供する。

【0150】

試薬カートリッジに含まれるフロースルー電気穿孔デバイスは、低毒性で高効率の細胞電気穿孔を達成することができる。本開示のフロースルー電気穿孔デバイスの特定の実施形態では、形質転換の毒性レベルは、電気穿孔後、10%よりも高い生存細胞になり、好適には細胞タイプ及び細胞に導入されている核酸に応じて形質転換に続いて15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%又は更に95%超の生存細胞になる。

【0151】

形質転換後、細胞は、細胞に導入された核酸の形質転換及び発現の結果として行われる

ゲノム編集プロセスを促進する条件下で回復される。

自動マルチモジュール細胞処理の方法

図9は、図1A、図1B、図12A及び図12Bに示されるシステム等の自動マルチモジュール細胞処理システムを用いる一例の方法900のフローチャートである。図13の処理システムは、例えば、方法900の処理段階を指示し得る。例えば、ソフトウェアスクリプトは、各処理段階の設定及びロボットハンドリングシステムを移動させて、方法900の動作を実行する命令を識別し得る。幾つかの実施形態では、ソフトウェア命令スクリプトは、自動マルチモジュール細胞処理機器に供給されるカートリッジにより識別され得る。例えば、カートリッジは、自動マルチモジュール細胞処理機器のメモリ（例えば、図13のメモリ1302等）に記憶されたスクリプトの識別情報を含む、バーコード又はQRコード（登録商標）等の機械可読印を含み得る。別の例では、カートリッジは、無線周波数（RF）タグ等の機械可読印に埋め込まれたダウンロード可能なスクリプトを含み得る。他の実施形態では、ユーザは、例えば、自動マルチモジュール細胞処理機器の処理システムへの有線若しくは無線接続を介したスクリプトのダウンロードを通して又は自動マルチモジュール細胞処理機器のユーザインターフェースを通じた、記憶されたスクリプトの選択を通してスクリプトを識別し得る。特定の例では、自動マルチモジュール細胞処理機器は、ユーザ設定を提出し、細胞処理をアクティブ化するタッチスクリーンインターフェースを含み得る。

10

【0152】

幾つかの実装形態では、方法900は、細胞を成長モジュールに移送すること（902）で開始される。成長モジュールは、例えば、図8A～図8Fに関連して説明した成長モジュール800であり得る。特定の例では、処理システム120は、図12A及び図12Bに関連して説明するように、細胞106を成長モジュール110aに移送するようにロボットハンドリングシステム108に指示し得る。別の例では、図1Aに関連して説明したように、細胞は、ロボットハンドリングシステム108によりカートリッジ104、106の一方から成長モジュール110a、110bに移送され得る。幾つかの実装形態では、成長バイアルは、成長培地を含み得、例えばキットの一部として供給され得る。他の実施形態では、例えば、液体ハンドリングデバイスを介して、試薬容器から移送された培地を成長バイアルに充填し得る。

20

【0153】

幾つかの実装形態では、細胞を移送する（例えば、試薬カートリッジ104から又は機器に追加されたバイアルから）前、細胞に指定された位置に配置されたバイアル又は他の容器の機械可読印をスキャンして、バイアル又は容器が細胞を含むものとして記されていることを確認し得る。更に、機械可読印は、機器に提供された細胞のタイプを示し得る。幾つかの実装形態では、細胞のタイプは、機器に特定の処理スクリプト（例えば、ロボットハンドリングシステムの一連の命令並びに種々のモジュールの設定及びアクティブ化）を選択させ得る。

30

【0154】

幾つかの実装形態では、細胞は、所望の光学濃度まで成長モジュール内で成長する（904）。例えば、図1A及び図1Bの処理システム126又は図12A及び図12Bの処理システム1220は、成長サイクル中、細胞を培養する成長モジュール110aの温度設定を管理し得る。処理システム126、1220は、成長モジュール110a、110bから光学濃度を示すセンサ信号を更に受信し、センサ信号を解析して、細胞の成長をモニタし得る。幾つかの実装形態では、ユーザは、細胞の成長を管理する成長パラメータを設定し得る。例えば、温度及び細胞の攪拌の程度である。更に、幾つかの実装形態では、ユーザは、成長プロセスに関して更新情報を提供され得る。幾つかの例では、更新は、自動マルチモジュール細胞処理システムのユーザインターフェースに提示されるメッセージ、ユーザの携帯電話番号へのテキストメッセージ、電子メールアカウントへの電子メールメッセージ又はポータブル電子デバイス（例えば、携帯電話、タブレット等）で実行中のアプリに送信されるメッセージを含み得る。幾つかの実装形態では、メッセージに回答し

40

50

て、ユーザは、温度等のパラメータを変更して、細胞成長を調整し得る。例えば、ユーザは、自動マルチモジュール細胞処理システムのユーザインターフェースを通して又は図11のユーザインターフェース1100等の自動マルチモジュール細胞処理システムと通信するポータブル計算デバイスアプリケーションを通して、更新されたパラメータを提出し得る。

【0155】

光学濃度に関連して説明するが、他の実装形態では、成長モジュール内の細胞成長は、幾つかの例では、pH、溶解酸素、放出酵素、音響特性及び電気特性等の異なる細胞濃度尺度及び生理学的状態を用いてモニタされ得る。

【0156】

幾つかの実装形態では、所望の光学濃度に達する(904)と、細胞は、成長モジュールから濾過モジュール又は細胞洗浄及び濃縮モジュールに移送される(906)。図1A及び図1Bのロボットハンドリングシステム108又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム1208は、例えば、細胞を成長モジュール1210aから濾過モジュール1210bに移送し得る。濾過モジュールは、例えば、細胞をエレクトロコンピテントにさせるように設計され得る。更に、濾過モジュールは、電気穿孔に適切な容積に細胞試料の容積を低減するように構成され得る。別の例では、濾過モジュールは、塩等の不要成分を細胞試料から除去するように構成され得る。幾つかの実施形態では、ロボットハンドリングシステム108は、細胞を洗浄するために、洗浄液を濾過モジュール1210bに移送する。

【0157】

幾つかの実装形態では、細胞は、濾過モジュール又は細胞洗浄及び濃縮モジュールにおいてエレクトロコンピテントにされ、溶出される(908)。細胞は、洗浄液を用いて溶出し得る。例えば、細胞は、試薬供給源からの試薬を用いて溶出し得る。濾過モジュール又は細胞洗浄及び濃縮モジュールは、例えば、図7A及び図7Bに示される濾過モジュール700と同様であり得る。上述したように、密度勾配精製、透析、イオン交換カラム、濾過、遠心分離、希釈及び精製へのビーズの使用を含めた多くの異なる方法を用いて細胞を洗浄することができる。幾つかの態様では、細胞洗浄及び濃縮モジュールは、遠心分離デバイスを利用する。他の態様では、濾過モジュールは、濾過機器を利用する。更に他の態様では、ビーズは、細胞表面に結合する部分に結合する。これらの部分は、限定ではなく、抗体、レクチン、小麦胚芽凝集素、突然変異リゾチーム及びリガンドを含む。他の態様では、細胞は、磁化するよう組み換えられ、洗浄ステップ後、磁石が細胞を小粒状にできるようにする。細胞磁化のメカニズムは、限定ではなく、フェリチンタンパク質発現を含むことができる。

【0158】

幾つかの実施形態では、洗浄液は、溶出前、濾過モジュールに移送される。図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、例えば、洗浄液に指定された位置に配置されたバイアル又は容器から洗浄液を移送し得る。洗浄液を移送する前、洗浄液に指定された位置に配置されたバイアル又は他の容器若しくはリザーバの機械可読印をスキャンして、バイアル、容器、リザーバの内容物を確認し得る。更に、機械可読印は、機器に提供された洗浄液のタイプを示し得る。幾つかの実施形態では、洗浄液のタイプは、システムに特定の処理スクリプト(例えば、特定の洗浄液に適切な濾過モジュールの設定及びアクティブ化)を選択させ得る。

【0159】

他の実施形態では、細胞は、洗浄カートリッジの細胞洗浄モジュールにおいて溶出される。例えば、溶出した細胞は、図1Aに示される洗浄カートリッジ106の空容器に集められ得、ロボットハンドリングシステム108は、培地を試薬カートリッジ104(又は洗浄カートリッジ106の試薬ウェル)から溶出細胞に移送し得る。

【0160】

細胞がエレクトロコンピテントにされ、50µL~10mL、又は100µL~80m

10

20

30

40

50

L、又は150 µL ~ 8 mL、又は250 µL ~ 7 mL、又は500 µL ~ 6 mL、又は750 µL ~ 5 mL等の濾過モジュールによる形質転換(906)に適切な容積中に懸濁されると、幾つかの実装形態では、細胞は、形質転換モジュールに移送される(918)。例えば、図1A及び図1Bのロボットハンドリングシステム108は、細胞を濾過モジュールから形質転換モジュール110cに移送し得る。濾過モジュールは、形質転換モジュールに物理的に結合され得るか、又はこれらのモジュールは、別個であり得る。カートリッジベースの供給品を有する図1Aの機器100等の実施形態では、細胞は、形質転換モジュールに移送される前、試薬カートリッジ104等のカートリッジ内のリザーバに溶出し得る。

【0161】

幾つかの実装形態では、核酸は、自動マルチモジュール細胞処理機器外部で準備される。例えば、アセンブルされたベクター又は他の核酸アセンブリは、方法900における形質転換プロセス及び他のプロセスを実行する前、ユーザにより試薬として含め得る。

【0162】

しかしながら、他の実装形態では、核酸は、自動マルチモジュール細胞処理機器により準備される。続くステップ910~916の一部は、幾つかの実装形態では、ステップ902~908の一部と平行して実行される。幾つかの実装形態では、続くステップの少なくとも一部は、ステップ902~908前及び/又は後に実行される。

【0163】

幾つかの実装形態では、編集オリゴヌクレオチド及びベクター骨格等の核酸並びに幾つかの例では酵素及び他の反応成分は、核酸アセンブリモジュールに移送される(910)。核酸アセンブリモジュールは、多様な異なる核酸アセンブリ技法の1つ又は複数を実行的に実行するように構成され得る。核酸アセンブリモジュールにおいて実行することができる核酸アセンブリ技法には、限定ではなく、PCR、バイオブリック(BioBrick)アセンブリ、タイプIISクローニング(例えば、ゴールドゲート(Golden Gate)アセンブリ)及びリガーゼサイクル反応を含めた、制限エンドヌクレアーゼを用いるアセンブリ方法があり得る。他の例では、核酸アセンブリモジュールは、ギブソンアセンブリ(Gibson Assembly)(登録商標)、CPEC、SLIC、リガーゼサイクル等の核酸の隣接部分間の重複に基づくアセンブリ技法を実行し得る。核酸アセンブリモジュールにより実行し得る追加の例としてのアセンブリ方法には、酵母でのギャップ修復、ゲートウェイクローニング及びトポイソメラーゼ媒介クローニングがある。核酸アセンブリモジュールは、例えば、図4に関連して説明した核酸アセンブリモジュール400であり得る。特定の例では、処理システム120は、図12Bに関連して説明するように、核酸1206を核酸アセンブリモジュール1210eに移送するようにロボットハンドリングシステム1208に指示し得る。別の例では、図1Aに関連して説明したように、核酸は、ロボットハンドリングシステム108によりカートリッジ104、106の一方から核酸アセンブリモジュールに移送され得る。

【0164】

幾つかの実装形態では、
- 核酸試料、酵素及び他の反応成分のそれぞれの移送前に
- これらの材料に指定された位置に配置されたバイアル又は他の容器の機械可読印をスキャンして、バイアル又は容器が予期される材料を含むものとして記されていることを確認し得る。更に、機械可読印は、機器に提供された核酸試料、酵素及び他の反応成分の1つ又は複数のタイプを示し得る。幾つかの実装形態では、材料のタイプは、機器に特定の処理スクリプト(例えば、更なる材料を識別させるロボットハンドリングシステムへの一連の命令及び/又は核酸アセンブリモジュールの設定及びアクティブ化)を選択させ得る。

【0165】

幾つかの実装形態では、核酸アセンブリモジュールは、用いられる核酸アセンブリのタイプに応じて温度制御される。例えば、PCRが核酸アセンブリモジュールで利用される場合、モジュールは、温度を変性、アニーリング及び伸長間で循環させる熱サイクル機能

10

20

30

40

50

を有することができる。単一温度アセンブリ方法が核酸アセンブリモジュールで使用される場合、モジュールは、実行中の特定のアセンブリプロセスを最適化する温度に達し、その温度を維持する能力を有することができる。

【0166】

幾つかの実施形態では、温度制御は、図13の処理システム1310等の自動マルチモジュール細胞処理機器の処理システムにより管理される。これらの温度及び温度を維持する持続時間は、予めプログラムされるパラメータの組（例えば、処理スクリプト内で識別されるか、若しくは処理システムがアクセス可能な別のメモリ空間内で識別される）によって決定され得るか、又は処理システムとのインターフェースを通してユーザにより手動で制御され得る。

10

【0167】

アセンブリ反応が行われるのに十分な時間が経過すると、幾つかの実装形態では、核酸アセンブリは、精製モジュールに移送される（914）。例えば、処理システムは、反応のタイプ、材料のタイプ及び自動マルチモジュール細胞処理機器に提供されるユーザ設定の1つ又は複数に基づいてアセンブリ反応のタイミングをモニタし得る。例えば、図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、シッパー又はピペッター境界物を通して核酸アセンブリを精製モジュールに移送し得る。別の例では、図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、核酸アセンブリを含むバイアルを核酸アセンブリモジュールのチャンバから脱塩/精製モジュールのチャンバに移送し得る。

20

【0168】

幾つかの実装形態では、核酸アセンブリは、精製モジュールにおいて脱塩され溶出する（916）。例えば、精製モジュールは、核酸アセンブリ混合物の不要成分（例えば、塩、鉱物等）を除去し得る。幾つかの実施形態では、精製モジュールは、核酸アセンブリ容積より小さい容積にアセンブルされた核酸を濃縮する。核酸アセンブリ後に続く液体交換の方法例には、磁性ビーズ（例えば、SPRI又はカリフォルニア州カールスバッド（Carlsbad, CA）所在のインビトロゲン社（Invitrogen Corp.）によるダイナル（Dyna1）（ダイナビーズ（Dynabeads））、シリカビーズ、シリカスピナラム、ガラスビーズ、沈殿（例えば、エタノール又はイソプロパノールを用いる）、アルカリ溶解、浸透精製、ブタノールを用いた抽出、膜ベースの分離技法、濾過等がある。例えば、多孔性が様々な異方性の親水性生成セルロース膜が装着された1つ又は複数のマイクロ濃縮器が使用可能である。別の例では、脱塩/生成モジュールは、不溶性リン酸塩を含むイオン交換器で混合物に接触し、液体を除去し、核酸をイオン交換器から溶出させることにより、核酸及びイオン性塩を含む液体試料を処理し得る。

30

【0169】

例示的な実施形態では、核酸アセンブリは、精製モジュールのチャンバにおいてSPRIビーズ等の磁性ビーズと結合し得る。核酸アセンブリは、核酸アセンブリが磁性ビーズに結合するのに十分な時間にわたり、設定された温度で培養され得る。培養後、核酸アセンブリを洗浄し溶出させることができるように、磁石をチャンバの近傍に係合させ得る。このプロセスの説明のための例は、図4の等温核酸アセンブリ及び精製結合モジュールに関連して考察されている。

40

【0170】

核酸アセンブリが溶出すると、幾つかの実装形態では、核酸アセンブリは、形質転換モジュールに移送される（918）。例えば、図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、例えば、上述したように、キュベットベースのエレクトロポレータモジュール又はフロースルーエレクトロポレータモジュールへのシッパー又はピペッター境界物を通して核酸アセンブリを形質転換モジュールに移送し得る。例えば、アセンブルされた脱塩された核酸は、移送中、ステップ908からのエレクトロコンピテント細胞と結合し得る。他の実施形態では、形質転換モジュールは、エレクトロコンピテント細胞及び核酸アセンブリのそれぞれを別個に受け入れ、混合を可能にし得

50

る（例えば、1つ又は複数のチャンネルを開き、共有チャンバ内で材料を結合する）。

【0171】

細胞は、形質転換モジュールに移送され得る（920）。形質転換は、幾つかの例では、電気穿孔、リポフェクション、光穿孔、注入、マイクロ沈殿、マイクロ注入、リポソーム、微粒子銃、ソノレーション、レーザ誘起穿孔、ビーズトランスフェクション、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈又はDEAE-デキストラン-媒介トランスフェクションを含め、外因性核酸配列（例えば、DNA）を標的細胞に導入する（形質転換又はトランスフェクション）任意の分野で認識された技法を含み得る。幾つかの実施形態では、化学的トランスフェクションを機械的方法と組み合わせるトランスフェクション方法論であるマグネトフェクション等の機械的及び化学的トランスフェクション方法の機能を利用するハイブリッド技法を用いることができる。別の例では、陽イオン脂質を遺伝子銃又はエレクトロポレータと組み合わせて展開し得る。

10

【0172】

幾つかの実装形態では、形質転換モジュールは、電気穿孔を用いて、DNA材料の取り込みをトリガーする。電気穿孔中、細胞の生き残りに有利な緩衝剤又は培地中に細胞を懸濁し得るように、緩衝剤又は培地を形質転換モジュールに移送し、細胞に添加する。緩衝剤又は培地を移送する前、緩衝剤又は培地に指定された位置に配置されたバイアル、他の容器又はリザーバの機械可読印をスキャンして、バイアル、容器又はリザーバの内容物を確認し得る。更に、機械可読印は、機器に提供された緩衝剤又は培地のタイプを示し得る。幾つかの実装形態では、緩衝剤又は培地のタイプは、機器に特定の処理スクリプト（例えば、特定の緩衝剤又は培地に適切な形質転換モジュールの設定及びアクティブ化）を選択させ得る。細菌細胞電気穿孔の場合、水溶液又はグリセリン溶液等の低濃度培地を用いて、過渡的な高電流による熱生成を低減し得る。酵母細胞の場合、ソルビトール溶液を用い得る。哺乳動物細胞の電気穿孔の場合、細胞は、MEM、DMEM、IMDM、RPMI、ハンクス、PBS、HBSS、HeBS及びリンガー溶液等の高濃度培地又は緩衝剤中に懸濁し得る。特定の例では、ロボットハンドリングシステム108は、カートリッジ104、106の一方から形質転換モジュール110cに緩衝液を移送し得る。例えば、形質転換モジュールは、図5A及び図5Bに関連して説明した電気穿孔モジュール等のフロースルー電気穿孔モジュールであり得る。図1A及び図5Bに関連して説明したように、形質転換モジュールは、図1Aのカートリッジ104と共に提供される使い捨てフロースルー電気穿孔モジュール110cであり得る。

20

30

【0173】

幾つかの実装形態では、形質転換モジュールは、核酸取り込みに向けて細胞を更に準備する。例えば、細菌細胞は、核酸の添加前、スクロース又はグリセリン洗浄を用いて処理され得、酵母細胞は、酢酸リチウム、ジチオスレイトール（DTT）及びTE緩衝剤の溶液を用いて処理され得る。核酸取り込みに向けた細胞の準備を含む他の実装形態では、濾過モジュール又は他の別個のモジュール（例えば、細胞洗浄モジュール）は、核酸取り込みに向けて細胞を準備し得る。

【0174】

形質転換されると、細胞は、第2の成長/回復/編集モジュールに移送される（922）。例えば、図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、シッパー又はピペッター境界物を通して、形質転換された細胞を第2の成長モジュールに移送し得る。別の例では、図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、形質転換された細胞を含むバイアルを形質転換モジュールのチャンバから第2の成長モジュールのチャンバに移送し得る。

40

【0175】

幾つかの実装形態では、第2の成長モジュールは、回復モジュールとして機能し、細胞が形質転換プロセスから回復できるようにする。他の実施形態では、細胞は、第2の成長モジュールに輸送される前、別個の回復モジュールに提供し得る。回復中、第2の成長モジュールは、形質転換された細胞に、導入された核酸を取り込ませ、特定の態様では、導

50

入された核酸を細胞のゲノムに統合させる。第2の成長モジュールは、細胞成長に最適な任意のユーザ定義温度、好適には25、30又は37で細胞を培養するように構成され得る。

【0176】

幾つかの実施形態では、第2の成長モジュールは、選択モジュールとして挙動し、抗生物質又は他の試薬に基づいて、形質転換された細胞を選択する。一例では、RNAガイドヌクレアーゼ(RGN)タンパク質システムは、所望の編集を受け取らなかった細胞のゲノムを切断するための選択に用いられる。選択に用いられるRGNタンパク質システムは、編集に用いられるRGNと同じであるか又は異なり得る。抗生物質選択剤の例では、抗生物質を第2の成長モジュールに添加して、選択を実行し得る。適する抗生物質耐性遺伝子には、限定ではなく、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナバニン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピュロマイシン耐性遺伝子又はクロラムフェニコール耐性遺伝子等の遺伝子がある。例えば、図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、シッパー又はピペッター境界物を通して第2の成長モジュールに抗生物質を移送し得る。幾つかの実施形態では、死んだ細胞背景の除去は、洗浄剤、ヒプノティックウォッシュ(hypnotic wash)による浸透ストレス、温度、酵素、プロテアーゼ、バクテリオファージ、還元剤又はカオトロップ等の溶解性エンハンサーを用いて支援される。図13の処理システム1310は、図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108が追加の材料(例えば、洗浄剤、酵素、還元剤等)を送達し得る間、例えば、選択を誘導するように温度等の環境変数を変更し得る。他の実施形態では、濾過による細胞の除去及び/又は培地の交換は、死んだ細胞背景の低減に用いられる。

10

20

【0177】

更なる実施形態では、選択の適用に加えて又は代えて、第2の成長モジュールは、編集モジュールとして機能し、形質転換された細胞でのゲノム編集を可能にする。代替的に、他の実施形態では、回復及び選択(実行される場合)後の細胞は、別個の編集モジュールに移送される。編集モジュールとして、第2の成長モジュールは、例えば、導入された核酸の発現を通じた細胞のゲノムの編集を誘導する。ヌクレアーゼの発現には、化学的、光、ウイルス又は温度誘導の1つ又は複数が関わり得る。例えば、第2の成長モジュールは、温度誘導プロセス中、細胞を加熱又は冷却するように構成され得る。特定の例示では、細胞は、42~50での加熱により誘導し得る。例示に付け加えて、誘導後、細胞は、次に、0~10に冷却され得る。化学的誘導又はウイルス誘導の例では、誘導剤を第2の成長モジュールに移送して、編集を誘導し得る。誘導性ヌクレアーゼが細胞に導入された場合、編集中、誘導性ヌクレアーゼは、図12Aに関連して説明されるインデューサ分子1224等のインデューサ分子の導入を通して誘導される。幾つかの実装形態では、誘導剤又はインデューサ分子は、図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108により(例えば、ピペッター又はシッパー境界物を通して)第2の成長モジュールに移送される。

30

【0178】

幾つかの実装形態では、追加の細胞編集が望まれない場合(924)、細胞は、後に自動マルチモジュール細胞処理システムから取り出すために、細胞成長モジュールから貯蔵ユニットに移送され得る(926)。貯蔵ユニットは、例えば、図12A及び図12Bの貯蔵ユニット114を含み得る。図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、例えば、シッパー又はピペッター境界物を通して細胞を貯蔵ユニット114に移送し得る。別の例では、図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、細胞を含むバイアルを第2の成長モジュールのチャンバから貯蔵ユニット内のバイアル又は管に移送し得る。

40

【0179】

幾つかの実装形態では、追加の細胞編集が望まれる場合(924)、細胞は、同じ又は

50

異なる濾過モジュールに移送され、エレクトロコンピテントにされ得る(908)。更に、幾つかの実施形態では、新しくアセンブルされた核酸試料は、このとき、核酸アセンブリモジュールにより準備され得る。再帰的編集前、幾つかの実施形態では、自動マルチモジュール細胞処理機器は、追加の材料(例えば、置換カートリッジ)をユーザにより供給する必要があり得る。

【0180】

ステップは、編集の第2ラウンド中、同じであるか又は異なり得る。例えば、幾つかの実施形態では、ステップ904の続く実行時、選択的成長培地は、成長モジュールに移送されて、編集の第1ラウンドから編集された細胞を選択できるようにする。図1A及び図1B又は図12A及び図12Bのロボットハンドリングシステム108は、例えば、選択的成長培地に指定された位置に配置された試薬カートリッジ内のバイアル又は容器から選択的成長培地を移送し得る。選択的成長培地の移送前、選択的成長培地に指定された位置に配置されたバイアル、他の容器又はリザーバの機械可読印をスキャンして、バイアル、容器又はリザーバの内容物を確認し得る。更に、機械可読印は、機器に提供された選択的成長培地のタイプを示し得る。幾つかの実施形態では、選択的成長培地のタイプは、機器に特定の処理スクリプト(例えば、特定の選択的成長培地に適切な成長モジュールの設定及びアクティブ化)を選択させ得る。再帰的編集作業フローの特定の例について、図10A~図10Cに関連して説明する。

10

【0181】

幾つかの実装形態では、方法900は、ユーザのスケジュールと連携して材料を要求し、且つ/又は編集サイクルを完了するタイミングをとることができる。例えば、自動マルチモジュール細胞処理機器は、方法900がユーザの好適な時間で完了する目標で行われるように、1つ又は複数の細胞処理サイクル(例えば、1つ又は複数の再帰的編集)の完了をスケジュールする能力をユーザに提供し得る。例えば、時間スケジューリングは、図13のユーザインターフェース1316等のユーザインターフェースを通して設定され得る。特定の例示では、ユーザは、追加の材料カートリッジを自動マルチモジュール細胞処理機器に供給して、細胞編集の別のラウンドの一晚での処理を可能にするように、最初のサイクルの完了を午後4:00に設定し得る。

20

【0182】

幾つかの実装形態では、方法900全体を通して、自動マルチモジュール細胞処理機器は、現在のステータスをユーザに警告し得る。例えば、図13のユーザインターフェース1316は、処理の現在段階のグラフィカル指示を提示し得る。特定の例では、自動マルチモジュール細胞処理機器の正面に、細胞処理の現在ステータスを示すアニメ化グラフィックを提示するユーザインターフェース(例えば、タッチスクリーン)を重ね得る。ユーザインターフェースは、現在の処理段階に関連付けられた任意のユーザ設定及び/又はデフォルト設定(例えば、温度設定、時間設定等)を更に提示し得る。

30

【0183】

特定の一連の動作として示されているが、他の実施形態では、より多数又はより少数のステップが方法900に含まれ得る。例えば、幾つかの実施形態では、編集の各ラウンドに従事する前、リザーバ、カートリッジ及び/又はバイアルの内容物を画面表示して、処理の進行に適切な材料が利用可能であることを確認し得る。例えば、幾つかの実施形態では、1つ又は複数の撮像センサ(例えば、バーコードスキャナ、カメラ等)は、自動マルチモジュール細胞処理機器の筐体内の種々のロケーションにおける内容物を確認し得る。一例では、複数の撮像センサを自動マルチモジュール細胞処理機器の筐体内に配置し得、各撮像センサは、1つ又は複数の材料(例えば、バーコード又はQRコード(登録商標)等の機械可読印、材料の形状/サイズ等)を検出するように構成される。別の例では、少なくとも1つの撮像センサは、ロボットハンドリングシステムにより複数のロケーションに移動されて、1つ又は複数の材料を検出し得る。更なる実施形態では、1つ又は複数の重量センサは、使い捨て又は交換式材料の有無を検出し得る。説明のための例では、移送先端部供給ホルダ116は、先端部が領域に装填されたか否かを検出するための重量セン

40

50

サを含み得る。別の説明のための例では、光学センサは、液体廃棄物のレベルが閾値レベルに達し、細胞処理を継続する前に廃棄する必要があることを検出し得る。材料追加、廃棄物供給物の除去又は他のユーザ介入（例えば、1つ又は複数の要素の手動清掃等）の要求は、幾つかの実装形態では、自動マルチモジュール細胞処理機器のグラフィカルユーザインターフェースに提示される。幾つかの実装形態では、自動マルチモジュール細胞処理機器は、例えば、ソフトウェアアプリ、電子メール又はテキストメッセージを通して新しい材料又は他の手動介入の要求をユーザに交信する。

自動マルチモジュール細胞処理機器での細胞処理の作業フロー

自動マルチモジュール細胞処理機器は、同じモジュールを用いて多様な細胞処理作業フローを実行するように設計される。例えば、個々の容器内又はカートリッジ形態の原料物質は、異なり得、対応する命令（例えば、ソフトウェアスクリプト）は、それに従って同じ基本機器及びロボットハンドリングシステムを用いて選択され得、すなわち、マルチモジュール細胞処理システムは、細胞試料及び異なるタイプの細胞試料の処理に幾つかの異なる作業フローを実行するように構成することができる。実施形態では、同じ作業フローを繰り返し実行して、細胞試料を再帰的に編集し得る。他の実施形態では、細胞試料は、再帰的に編集されるが、作業フローは、反復ごとに変更し得る。

【0184】

図10A～図10Cは、2つの細胞成長モジュール1002、1008、2つの濾過モジュール1004及び1010並びにフロースルー電気穿孔モジュール1006を含む自動マルチモジュール細胞処理機器を用いて実行され得る例としての作業フローを示す。別個の成長モジュール1002、1008及び濾過モジュール1004、1010として説明されるが、それぞれは、代わりに、デュアルモジュールとして設計することもできる。例えば、成長モジュール1002及び1008を含むデュアル成長モジュールは、幾つかの回路、制御機構及び電源を共有し、同じ筐体内に配置されるデュアル回転成長バイアルを含み得る。同様に、デュアル濾過モジュールは、別個であるが、回路、制御機構、電源及び筐体を共有する2つのフィルタ及び液体供給管を含む濾過モジュール1004及び1010を含み得る。モジュール1002、1004、1006、1008及び1010は、例えば、図1A及び図1Bに関連して説明した機器100の一部であり得る。

【0185】

図10Aを参照すると、流れ図は、細胞ストック1012への2つの編集を生成する、同一の処理ステップを有する2つの処理段階を含む第1の細菌ゲノム編集作業フロー1000を示す。各段階は、原料物質の異なるカートリッジに基づいて動作し得る。例えば、第1のカートリッジは、第1のオリゴライブラリ1014a及び第1のsgRNA骨格1016aを含み得る。第2のカートリッジは、処理段階間又は処理前に自動マルチモジュール細胞処理機器内であるが、第1のカートリッジと異なる位置に導入され、第2のオリゴライブラリ1014b及び第2のsgRNA骨格1016bを含み得る。各カートリッジは、編集細胞のライブラリを構築するための「ライブラリカートリッジ」として見なされ得る。幾つかの実施形態では、細胞ストック1012は、第1のライブラリカートリッジに含まれる。細胞ストック1012は、2つのカートリッジを含むキット内で供給され得る。代替的に、ユーザは、細胞ストック1012の容器（例えば、バイアル又は管）を購入されたカートリッジに追加し得る。

【0186】

幾つかの実施形態では、作業フロー1000は、図13の処理システム1310等の自動マルチモジュール細胞処理機器の処理システムにより実行されるスクリプトに基づいて実行される。第1の例では、スクリプトは、第1のカートリッジに追加された機械可読マーカ又はタグを介してアクセスされ得る。幾つかの実施形態では、各処理段階は、別個のスクリプトを用いて実行される。例えば、各カートリッジは、カートリッジの内容物を処理するスクリプトの指示又はスクリプト自体を含み得る。

【0187】

幾つかの実装形態では、第1の段階は、植菌、成長及びモニタリングのために細胞スト

10

20

30

40

50

ック1012を第1の成長モジュール1002に導入する(1018a)ことで開始される。一例では、ロボットハンドリングシステムは、第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルに含まれる培地に細胞ストック1012のバイアルを追加する。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、第1のカートリッジから細胞ストック1012をピペットで移送し、回転成長バイアルに含まれる培地に細胞ストック1012を追加する。細胞は、この時点で4の温度に維持されていることがある。特定の例では、20mlの細胞ストックを30の温度で第1の成長モジュール1002の回転成長バイアル内で0.50のODまで成長させ得る。第1の成長モジュール1002に追加された細胞ストック1012は、0.50のODが成長バイアルの自動モニタリングを介して検知されるまで、時間の経過に伴ってモニタされ得る。モニタリングは、定期的であるか又は連続であり得る。これには、例えば、約900分(推定)かかり得るが、厳密な時間は、所望のODの検出に依存する。

10

【0188】

幾つかの実装形態では、細胞を所望のODまで成長させた後、細胞を誘導するために、インデューサを第1の成長モジュール1002に追加する。特定の例では、100 μ lのインデューサを追加し得、成長モジュール1002は、混合物の温度を42にし、15分間維持され得る。

【0189】

細胞ストック1012は、成長及び誘導後、幾つかの実装形態では、細胞をエレクトロコンピテントにさせ(1020a)、形質転換に向けて細胞の容積を低減するために、第1の濾過モジュール1004に移送される。一例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1012のバイアルを第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルから第1の濾過モジュール1004のバイアルホルダに移動させる。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルから細胞ストック1012をピペットで移送し、第1の濾過モジュール1004に送る。例えば、細胞ストック1012を第1の成長モジュール1002に移送するのに用いられた使い捨てピペット先端部を用いて、細胞ストック1012を第1の成長モジュール1002から第1の濾過モジュール1004に移送し得る。幾つかの実装形態では、細胞ストック1012を第1の成長モジュール1002から第1の濾過モジュール1004に移送する前、第1の成長モジュール1002は、4に冷却され、それにより、細胞ストック1012も同様にこの温度に冷却される。特定の例では、第1の成長モジュール1002の温度は、約8分のスパンで約4に冷却され得、成長モジュール1002は、温度を4に約15分間維持して、細胞ストック1012の温度低減を保証し得る。

20

30

【0190】

細胞ストックを移送する前、幾つかの実装形態では、第1の濾過モジュール1004のフィルタは、洗浄液を用いて予め洗浄される。洗浄液は、例えば、図1Aに関連して説明したカートリッジ1006等の洗浄カートリッジで供給され得る。第1の濾過モジュール1004は、例えば、図7Aに関連して説明したように、洗浄カートリッジの洗浄液に流体接続され得る。

【0191】

第1の濾過モジュール1004は、例えば、図7B及び図7Cに関連して説明した濾過モジュール750等のデュアル濾過モジュールの一部であり得る。特定の例では、第1の濾過モジュール1004は、溶出バイアルと第1の濾過モジュール1004との間で細胞材料を移送している間、洗浄及び溶出プロセス中に4に維持され得る。

40

【0192】

幾つかの実装形態では、濾過モジュール1004において細胞をエレクトロコンピテントにすると、細胞ストック1012は、形質転換のために形質転換モジュール1006(例えば、フロースルー電気穿孔モジュール)に移送される。一例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1012のバイアルを第1の濾過モジュール1004のバイアルホルダからフロースルー電気穿孔モジュール1006のリザーバに移動させる。別

50

の例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1012を第1の濾過モジュール1002又は一時的なリザーバからピペットで移送し、第1の濾過モジュール1004に送る。特定の例では、第1の濾過モジュール1004からの400 μ lの濃縮細胞ストック1012は、形質転換モジュール1006に移送される前、混合リザーバに移送される。例えば、細胞ストック1012は、アセンブルされた核酸と混合するためにカートリッジ内のリザーバに移送され、次にピペット先端部を用いてロボットハンドリングシステムにより移送され得る。特定の例では、形質転換モジュールは、4に維持される。細胞ストック1012は、説明のための例では、約4分で移送され得る。

【0193】

幾つかの実装形態では、細胞が成長中及び/又はエレクトロコンピテントになっている間、第1のオリゴライブラリ1014a及びsgRNA骨格1016aは、等温核酸アセンブリプロセスを用いてアセンブルされ、等温核酸アセンブリマスターミックス(1022a)においてアセンブルされた核酸を作成する。アセンブルされた核酸は、作業フロー1000の第1の段階の第1の処理ステップ1018a、1020a中、幾つかのポイントで作成され得る。代替的に、アセンブルされた核酸は、第1の処理ステップ1018の開始前に作成され得る。

10

【0194】

幾つかの実装形態では、核酸は、自動マルチモジュール細胞処理機器の等温核酸アセンブリモジュールを用いてアセンブルされる。例えば、ロボットハンドリングシステムは、第1のオリゴライブラリ1014a及びsgRNA骨格1016aを、自動マルチモジュール細胞処理機器の試薬カートリッジ内のライブラリ容器から、図12Bに関連して説明する核酸アセンブリモジュール1210g等の等温核酸アセンブリモジュール(図示せず)に追加し得る。核酸アセンブリ混合物は、例えば、特定の例では、50 μ lのギブソンアセンブリ(Gibson Assembly)(登録商標)マスターミックス(Master Mix)、25 μ lのベクター骨格1016a及び25 μ lのオリゴ1014aを含み得る。等温核酸アセンブリモジュールは、室温に維持され得る。アセンブリプロセスは、約30分かかり得る。

20

【0195】

他の実施形態では、核酸は、マルチモジュール細胞処理機器外部でアセンブルされ、原料物質として追加される。例えば、細胞処理の第1のステップ1018aをアクティブ化する前、アセンブルされた核酸のバイアル又は管は、試薬カートリッジに追加され得る。特定の例では、100 μ lのアセンブルされた核酸が提供される。

30

【0196】

幾つかの実装形態では、アセンブルされた核酸は、精製される(1024a)。アセンブルされた核酸は、例えば、ロボットハンドリングシステムにより等温核酸アセンブリモジュールから図12Bの精製モジュール1210h等の精製モジュール(図示せず)に移送され得る。他の実施形態では、等温核酸アセンブリモジュールは、精製特徴(例えば、等温核酸アセンブリ及び精製結合モジュール)を含み得る。更なる実施形態では、アセンブルされた核酸は、マルチモジュール細胞処理機器外部で精製され、原料物質として追加される。例えば、アセンブルされ精製された核酸のバイアル又は管は、細胞処理の第1のステップ1018aのアクティブ化前、細胞ストック1012と共に試薬カートリッジに追加され得る。

40

【0197】

特定の例では、等温核酸アセンブリ混合物中の100 μ lのアセンブルされた核酸は、精製される。幾つかの実装形態では、磁性ビーズを等温核酸アセンブリモジュールに追加し、例えば、ロボットハンドリングシステムにより、180 μ lの液体懸濁磁性ビーズを等温核酸アセンブリモジュールに追加し得る。等温核酸アセンブリモジュールに機能的に結合された磁石は、活性化され得、試料は、200 μ lエタノール中で洗浄され得る(例えば、ロボットハンドリングシステムはエタノールを等温核酸アセンブリモジュールに移送し得る)。幾つかの実装形態では、この動作からの液体廃棄物は、カートリッジの廃棄

50

物レセプタクルに移送される（例えば、エタノール移送に用いられるものと同じピペット先端部を用いてロボットハンドリングシステムにより）。この時点で、アSEMBルされた脱塩された核酸は、カートリッジのリザーバ等の保持容器に移送され得る。アSEMBルされた脱塩された核酸は、細胞が形質転換可能な状態になるまで例えば4の温度に維持され得る。特定の例では、100 μ lのアSEMBルされた核酸は、形質転換モジュール1006に移送される前、混合リザーバにおいて400 μ lの濃縮細胞ストック1012に追加され得る。幾つかの実施形態では、生成プロセスには約16分かかり得る。

【0198】

幾つかの実装形態では、アSEMBルされた核酸及び細胞ストック1012は、フロースルー電気穿孔モジュール1006に追加され、細胞ストック1012は、形質転換される（1026a）。例えば、ロボットハンドリングシステムは、例えば、ピペット先端部を用いて又はバイアル若しくは管の移動を通して、細胞ストック1012とアSEMBルされた核酸との混合物を混合物リザーバからフロースルー電気穿孔モジュール1006に移送し得る。幾つかの実施形態では、図5Aのフロースルー電気穿孔モジュール500等の内蔵フロースルー電気穿孔モジュールは、細胞ストック1012の移送に用いられる。他の実施形態では、図5Bのフロースルー電気穿孔モジュール530等のカートリッジベースの電気穿孔モジュールは、細胞ストック1012の移送に用いられる。例えば、電気穿孔モジュール1006は、4の温度に保持され得る。説明のための例では、電気穿孔プロセスには約4分かかり得る。

10

【0199】

幾つかの実装形態では、形質転換された細胞ストック1012は、回復のために第2の成長モジュール1008に移送される（1028a）。特定の例では、形質転換された細胞は、温度30で第2の成長モジュール1008において回復プロセスを経る。例えば、形質転換された細胞は、回復のために、第2の成長モジュール1008内に約1時間維持され得る。

20

【0200】

幾つかの実装形態では、選択的培地は、第2の成長バイアル（図示せず）に移送され、細胞は、残されて、選択プロセスにおいて更なる時間期間にわたり培養される。説明のための例では、抗生物質は、第2の成長バイアルに移送され得、細胞は、温度30で更に2時間にわたり培養され得る。

30

【0201】

回復後、細胞は、編集の別のラウンド又は例えば自動細胞処理環境外部で行われる更なる実験のための容器内での貯蔵への準備ができ得る。代替的に、細胞の一部は、細胞ライブラリ出力として貯蔵ユニットに移送され得る一方、細胞の別の一部は、編集の第2のラウンドに向けて準備され得る。

【0202】

幾つかの実装形態では、編集の第2のラウンドへの準備において、形質転換された細胞は、培地交換及び濾過のために、第2の濾過モジュール1010に移送される（1030a）。幾つかの実装形態では、形質転換された細胞ストックを移送する前、第2の濾過モジュール1004のフィルタは、洗浄液を用いて予め洗浄される。洗浄液は、例えば、図1Aに関連して説明したカートリッジ1006等の洗浄カートリッジで供給され得る。第2の濾過モジュール1010は、例えば、図7Aに関連して説明したように、洗浄カートリッジの洗浄液に流体接続され得る。

40

【0203】

第2の濾過モジュール1010は、例えば、図7B及び図7Cに関連して説明した濾過モジュール750等のデュアル濾過モジュールの一部であり得る。特定の例では、第2の濾過モジュール1010は、溶出バイアルと第2の濾過モジュール1010との間で細胞材料を移送している間、洗浄及び溶出プロセス中に4に維持され得る。特定の例では、この濾過プロセスの出力は、バイアル又は管に配置され、更なる処理、例えば形質転換モジュールへの移送を待つ。バイアル又は管は、温度4に貯蔵ユニットを維持され得る。

50

明したように、ステップ1018、1020、1022、1024、1026、1028及び1030の適用を通して、細胞ストック1042、オリゴライブラリ1044及びsgRNA骨格1046を用いて編集されていることがある。例えば、第1の編集細胞ストック1042は、ロボットハンドリングシステムにより第1の成長モジュール1002に移送され得る。一例では、ロボットハンドリングシステムは、第1の編集細胞ストック1042のバイアルを第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルに追加する。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、第1の編集細胞ストック1042を貯蔵ユニットのレセプタクルからピペットで移送し、細胞ストック1042を回転成長バイアルに追加する。細胞は、この時点で4の温度に維持されていることがある。

【0208】

幾つかの実装形態では、第1の編集細胞は、第1の成長モジュール1002において培養され、成長し、モニタされる(1018d)。特定の例では、第1の編集細胞ストック1042のアリコートは、例えば、20mLの成長培地を含む回転成長バイアルに温度30で0.50のODまで移送され得る。第1の成長モジュール1002に追加された細胞ストック1042は、0.50のODが自動モニタリングを介して検知されるまで経過モニタされ得る。モニタリングは、定期的であるか又は連続であり得る。これには、例えば、約900分(推定)かかり得るが、厳密な時間は、所望のODの検出に依存する。

【0209】

幾つかの実装形態では、所望のODまで成長した後、インデューサは、細胞を誘導するために第1の成長モジュール1002に追加される。特定の例では、100µlのインデューサを追加し得、成長モジュール1002は、混合物の温度を最高42にし、15分間維持され得る。

【0210】

第1の編集細胞ストック1042は、成長及び誘導後、幾つかの実装形態では、第1の編集細胞をエレクトロコンピテントにするために第1の濾過モジュール1004に移送される(1020d)。一例では、ロボットハンドリングシステムは、第1の編集細胞ストック1042のバイアルを第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルから第1の濾過モジュール1004のバイアルホルダに移動させる。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、第1の編集細胞ストック1042を第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルからピペット移送し、第1の濾過モジュール1004に送る。例えば、第1の編集細胞ストック1042を第1の成長モジュール1002に移送するのに用いられた使い捨てピペット先端部は、細胞ストック1042を第1の成長モジュール1002から第1の濾過モジュール1004に移送するのに用いられ得る。幾つかの実装形態では、細胞ストック1042を第1の成長モジュール1002から第1の濾過モジュール1004に移送する前、第1の成長モジュール1002は、4に冷却され、それにより、細胞ストック1042も同様にこの温度まで下がる。特定の例では、第1の成長モジュール1002の温度は、約8分のスパンで約4に冷却され得、成長モジュール1002は、温度を4に約15分間維持して、細胞ストック1012の温度低減を保証し得る。

【0211】

第1の編集細胞ストック1042を濾過モジュールに移送する前、幾つかの実装形態では、第1の濾過モジュール1004のフィルタは、洗浄液を用いて予め洗浄される。洗浄液は、例えば、図1Aに関連して説明したカートリッジ1006等の洗浄カートリッジで供給され得る。第1の濾過モジュール1004は、例えば、図7Aに関連して説明したように、洗浄カートリッジの洗浄液に流体接続され得る。

【0212】

第1の濾過モジュール1004は、例えば、図7B及び図7Cに関連して説明した濾過モジュール750等のデュアル濾過モジュールの一部であり得る。特定の例では、第1の濾過モジュール1004は、溶出バイアルと第1の濾過モジュール1004との間で細胞材料を移送している間、洗浄及び溶出プロセス中に4に維持され得る。

【0213】

10

20

30

40

50

幾つかの実装形態では、濾過モジュール1004において第1の編集細胞をエレクトロコンピテントにすると(1020d)、第1の編集細胞ストック1042は、形質転換のために形質転換モジュール1006(例えば、フロースルー電気穿孔モジュール)に移送される。一例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1042のバイアルを第1の濾過モジュール1004のバイアルホルダからフロースルー電気穿孔モジュール1006のリザーバに移動させる。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1042を第1の濾過モジュール1002又は一時的なリザーバからピペットで移送し、第1の濾過モジュール1004に送る。特定の例では、第1の濾過モジュール1004からの400 μ lの濃縮細胞ストック1042は、形質転換モジュール1006に移送される前、混合リザーバに移送される。例えば、細胞ストック1042は、キュアリングプラスミド1050と混合するためにカートリッジ内のリザーバに移送され、次に混合され、ピペット先端部を用いてロボットハンドリングシステムにより移送され得る。特定の例では、形質転換モジュール1006は、4に維持される。細胞ストック1042は、説明のための例では、約4分で形質転換され得る。

10

20

30

40

50

【0214】

幾つかの実装形態では、形質転換された細胞ストック1042は、回復/キュアリングのために第2の成長モジュール1008に移送される(1028d)。特定の例では、20mlの形質転換された細胞は、温度30で第2の成長モジュール1008において回復プロセスを経る。例えば、形質転換された細胞は、回復のために、第2の成長モジュール1008内に約1時間維持され得る。編集の別のラウンドが望まれる場合、第1の編集プラスミド又はベクターは、キュアリングされる。編集の別のラウンドが望まれない場合、第1の編集プラスミド及びエンジンプラスミドは、キュアリングされ得る。

【0215】

回復及びキュアリング後、細胞は、編集の別のラウンドに向けて準備ができ得るか、又は自動細胞処理機器外部での更なる研究で用いるために貯蔵する準備ができ得る。例えば、細胞の一部は、細胞ライブラリ出力として貯蔵ユニットに移送され得る一方、細胞の別の部分は、編集の第2のラウンドに向けて準備され得る。

【0216】

幾つかの実装形態では、編集の第2のラウンドに向けての準備において、形質転換された細胞は、細胞をエレクトロコンピテントにするためのグリセリンを含む培地交換及び濾過(1030d)のために第2の濾過モジュール1010に移送される。幾つかの実装形態では、形質転換された細胞ストックを移送する前、第2の濾過モジュール1004のフィルタは、洗浄液を用いて予め洗浄される。洗浄液は、例えば、図1Aに関連して説明したカートリッジ1006等の洗浄カートリッジで供給され得る。第2の濾過モジュール1010は、例えば、図7Aに関連して説明したように、洗浄カートリッジの洗浄液に流体接続され得る。

【0217】

第2の濾過モジュール1010は、例えば、図7B及び図7Cに関連して説明した濾過モジュール750等のデュアル濾過モジュールの一部であり得る。特定の例では、第2の濾過モジュール1010は、溶出バイアルと第2の濾過モジュール1010との間で細胞材料を移送している間、洗浄及び溶出プロセス中に4に維持され得る。特定の例では、この濾過プロセスの出力は、バイアル又は管に配置され、更なる処理を待つエレクトロコンピテント細胞である。バイアル又は管は、温度4に貯蔵ユニットを維持し得る。

【0218】

図10Cを参照すると、流れ図は、細胞ストック1062の2つの編集をもたらす、同一の処理ステップを有する処理の2つの段階を含む酵母作業フロー1060を示す。各段階は、原料物質の異なるカートリッジに基づいて動作し得る。例えば、第1のカートリッジは、第1のオリゴライブラリ1070a及び第1のsgRNA骨格1072aを含み得る。第2のカートリッジは、処理段階間又は処理前であるが、第1のカートリッジと異なる位置において自動マルチモジュール細胞処理機器に導入され、第2のオリゴライブラリ

1070b及び第2のsgRNA骨格1072bを含み得る。各カートリッジは、編集細胞のライブラリを構築するための「ライブラリカートリッジ」として見なされ得る。代替的に、ユーザは、細胞ストック1062aの容器（例えば、バイアル又は管）を酵母細胞キットに含まれる購入されたカートリッジのそれぞれに追加し得る。

【0219】

幾つかの実施形態では、作業フロー1060は、図13の処理システム1310等の自動マルチモジュール細胞処理システムの処理システムにより実行されるスクリプトに基づいて実行される。第1の例では、スクリプトは、第1のカートリッジに追加された機械可読マーカ又はタグを介してアクセスされ得る。幾つかの実施形態では、各処理段階は、別個のスクリプトを用いて実行される。例えば、各カートリッジは、カートリッジの内容物を処理するスクリプトの指示又はスクリプト自体を含み得る。

10

【0220】

幾つかの実装形態では、第1の段階は、植菌、成長及びモニタリングのために細胞ストック1062を第1の成長モジュール1002に導入する（1018e）ことで開始される。一例では、ロボットハンドリングシステムは、第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルに細胞ストック1062のバイアルを追加する。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、第1のカートリッジから細胞ストック1062をピペットで移送し、細胞ストック1062を回転成長バイアルに追加する。細胞は、この時点で4の温度に維持されていることがある。特定の例では、20mlの細胞ストックを30の温度で第1の成長モジュール1002の回転成長バイアル内で0.75のODまで成長させ得る。第1の成長モジュール1002に追加された細胞ストック1062は、0.75のODが自動モニタリングを介して検知されるまで、成長モジュール1002内において時間の経過に伴って自動的にモニタされ得る。モニタリングは、定期的であるか又は連続であり得る。

20

【0221】

幾つかの実装形態では、誘導性発現システムを用い得る。したがって、所望のODまで成長させた後、細胞を誘導するために、インデューサを第1の成長モジュール1002に追加する。インデューサは、小分子又はガラクトースのような異なる糖を有する培地への培地交換であり得る。

【0222】

幾つかの実装形態では、細胞ストック1062は、成長及び誘導後、培地を交換するために、第1の濾過モジュール1004に移送される（1064a）。一例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1062のバイアルを第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルから第1の濾過モジュール1004のバイアルホルダに移動させる。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルから細胞ストック1062をピペットで移送し、第1の濾過モジュール1004に送る。例えば、細胞ストック1062aを第1の成長モジュール1002に移送するのに用いられた使い捨てピペット先端部を用いて、細胞ストック1062を第1の成長モジュール1002から第1の濾過モジュール1004に移送し得る。幾つかの実施形態では、細胞ストック1062を第1の成長モジュール1002から第1の濾過モジュール1004に移送する前、第1の成長モジュール1002は、4に冷却され、それにより、細胞ストック1062も同様にこの温度に冷却される。特定の例では、第1の成長モジュール1002の温度は、約8分のスパンで約4に冷却され得、成長モジュール1002は、温度を4に約15分間維持して、細胞ストック1062の温度低減を保証し得る。培地交換中、説明のための例では、0.4mlの1Mソルビトールを細胞ストック1062に追加し得る。

30

40

【0223】

細胞ストック1062を移送する前、幾つかの実装形態では、第1の濾過モジュール1004のフィルタは、洗浄液を用いて予め洗浄される。洗浄液は、例えば、図1Aに関連して説明したカートリッジ1006等の洗浄カートリッジで供給され得る。第1の濾過モ

50

ジュール1004は、例えば、図7Aに関連して説明したように、洗浄カートリッジの洗浄液に流体接続され得る。

【0224】

第1の濾過モジュール1004は、例えば、図7B及び図7Cに関連して説明した濾過モジュール750等のデュアル濾過モジュールの一部であり得る。特定の例では、第1の濾過モジュール1004は、溶出バイアルと第1の濾過モジュール1004との間で細胞材料を移送している間、洗浄及び溶出プロセス中に4に維持され得る。

【0225】

培地交換動作後、幾つかの実装形態では、細胞ストック1062は、調整のために再び第1の成長モジュール1002に移送される(1066a)。一例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1062のバイアルを第1の濾過モジュール1004から第1の成長モジュール1002に移動させる。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1062を第1の濾過モジュール1004からピペットで移送し、第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルに送る。調整中、例えば、5mlのDTT/LIAC及び80mMのソルビトールを細胞ストック1062に追加し得る。例えば、ロボットハンドリングシステムは、DTT/LIAC及びソルビトールを第1の成長モジュール1002に個々に又は同時に移送し得る。細胞ストック1062は、例えば、第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルの回転を介してDTT/LIAC及びソルビトールを混合し得る。調整中、細胞ストック1062は、4の温度に維持され得る。

10

20

【0226】

幾つかの実装形態では、調整後、細胞ストック1062は、細胞の洗浄及び準備のために第1の濾過モジュール1004に移送される(1068)。例えば、細胞は、このステップにおいてエレクトロコンピテントにされ得る。一例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1062のバイアルを第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルから第1の濾過モジュール1004のバイアルホルダに移動させる。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1062を第1の成長モジュール1002の回転成長バイアルからピペットで移送し、第1の濾過モジュール1004に送る。

【0227】

細胞ストックを移送する前、幾つかの実装形態では、第1の濾過モジュール1004のフィルタは、洗浄液を用いて予め洗浄される。洗浄液は、例えば、図1Aに関連して説明したカートリッジ1006等の洗浄カートリッジで供給され得る。第1の濾過モジュール1004は、例えば、図7Aに関連して説明したように、洗浄カートリッジの洗浄液に流体接続され得る。他の実施形態では、ステップ1064aにおける培地交換に用いられたフィルタと同じフィルタがエレクトロコンピテントにするのに用いられる。幾つかの実施形態では、1Mソルビトールを用いて、酵母細胞をエレクトロコンピテントにする。

30

【0228】

幾つかの実装形態では、濾過モジュール1004においてエレクトロコンピテントになると、細胞ストック1062は、形質転換のために形質転換モジュール1006(例えば、フロースルー電気穿孔モジュール)に移送される。一例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1062のバイアルを第1の濾過モジュール1004のバイアルホルダからフロースルー電気穿孔モジュール1006のリザーバに移動させる。別の例では、ロボットハンドリングシステムは、細胞ストック1062を濾過モジュール1004又は一時的なリザーバからピペットで移送し、第1の濾過モジュール1004に送る。特定の例では、第1の濾過モジュール1004からの400µlの濃縮細胞ストック1062は、形質転換モジュール1006に移送される前、混合リザーバに移送される。例えば、細胞ストック1062は、核酸成分(骨格及び編集オリゴヌクレオチド)と混合するためにカートリッジ内のリザーバに移送され、次に混合され、ロボットハンドリングシステムによりピペット先端部を用いて移送され得る。骨格(ベクター)及び編集オリゴヌクレオチドは細胞にアセンブルされている(インピボ)ため、核酸アセンブリモジュールは、

40

50

酵母編集に必要な構成要素ではない。特定の例では、形質転換モジュールは、4 に維持される。

【0229】

幾つかの実装形態では、アセンブルされる核酸及び細胞ストック1062は、フロースルー電気穿孔モジュール1006に追加され、細胞ストック1062は、形質転換される(1026e)。例えば、ロボットハンドリングシステムは、例えば、ピペット先端部を用いて又はバイアル若しくは管に移動を通して、細胞ストック1062eと核酸アセンブリとの混合物を混合リザーバからフロースルー電気穿孔モジュール1006に移送し得る。幾つかの実装形態では、図5Aのフロースルー電気穿孔モジュール500等の内蔵フロースルー電気穿孔モジュールを用いて、細胞ストック1062eを形質転換する。他の実施形態では、図5Bのフロースルー電気穿孔モジュール530等のカートリッジベースの電気穿孔モジュールを用いて、細胞ストック1062eを形質転換する。電気穿孔モジュール1006は、例えば、4 の温度に維持され得る。

10

【0230】

幾つかの実装形態では、形質転換された細胞ストック1062eは、回復のために第2の成長モジュール1008に移送される(1028a)。特定の例では、20mlの形質転換された細胞は、第2の成長モジュール1008において回復プロセスを受ける。

【0231】

幾つかの実装形態では、選択的培地、例えば栄養要求性成長培地又は薬剤を含む培地が第2の成長バイアル(図示せず)に移送され、細胞は、残され、選択プロセスにおいて更なる時間期間にわたり培養される。説明のための例では、抗生物質を第2の成長バイアルに移送し得、細胞は、温度30°で更に2時間にわたり培養され得る。

20

【0232】

回復後、細胞は、編集の別のラウンド又は細胞ライブラリへの貯蔵に使用可能な状態になり得る。例えば、細胞の一部は、細胞ライブラリ出力として貯蔵ユニットに移送され得る(1076a)一方、細胞の別の部分は、編集の第2のラウンドに向けて準備され得る(1078a)。細胞は、例えば、温度4 で貯蔵し得る。

【0233】

幾つかの実装形態では、編集の第2のラウンドへの準備において、形質転換された細胞は、培地交換のために第2の濾過モジュール1010に移送される(1078a)。形質転換された細胞ストック1062aを移送する前、幾つかの実装形態では、第2の濾過モジュール1004のフィルタは、洗浄液を用いて予め洗浄される。洗浄液は、例えば、図1Aに関連して説明したカートリッジ1006等の洗浄カートリッジで供給され得る。第2の濾過モジュール1010は、例えば、図7Aに関連して説明したように、洗浄カートリッジの洗浄液に流体接続され得る。

30

【0234】

例えば、第2の濾過モジュール1010は、図7B及び図7Cに関連して説明した濾過モジュール750等のデュアル濾過モジュールの一部であり得る。特定の例では、第2の濾過モジュール1010は、溶出バイアルと第2の濾過モジュール1010との間で細胞材料を移送している間、洗浄及び溶出プロセス中に4 に維持され得る。

40

【0235】

濾過プロセス中、幾つかの実装形態では、細胞ストック1062aの細胞壁を溶解させるために、酵素製剤が追加される。例えば、ザイロマース(Zylo-mase)(登録商標)等の酵母溶解酵素を追加して、細胞壁を溶解し得る。酵母溶解酵素は、特定の例では、細胞ストック1026a中において温度30 で5分~60分にわたり培養され得る。特定の例では、この濾過プロセスの出力は、バイアル又は管内に配置されて、更なる処理を待つ。バイアル又は管は、温度4 に貯蔵ユニットを維持し得る。

【0236】

処理の第1の段階は、1日で行われ得る。作業フロー1060のこの時点で、幾つかの実装形態では、新しい材料が自動マルチモジュール細胞処理機器に手動で追加される。例

50

えば、新しい細胞ストック1062b及び新しい試薬カートリッジを追加し得る。更に、この時点で、新しい洗浄カートリッジ、置換フィルタ及び/又は置換ピペット先端部を自動マルチモジュール細胞処理システムに追加し得る。更に、幾つかの実施形態では、フィルタモジュールは、清掃プロセスを受け得、且つ/又は固体及び液体廃棄物ユニットは、処理の次のラウンドへの準備として空にされ得る。

【0237】

幾つかの実装形態では、編集の第2のラウンドは、上述した第1の処理段階と同じモジュール1002、1004、1006、1008及び1010、同じ処理ステップ1018、1064、1066、1026、1028及び1076及び/又は1078並びに同じ条件(例えば、温度、時間範囲等)を含む。例えば、第2のオリゴライブラリ1070b及び第2のsgRNA骨格1072bは、上述したのと略同じように、形質転換された細胞の組合せの編集に用い得る。2段階プロセスとして示されているが、他の実施形態では、2つまで、3つまで、4つまで、6つまで、8つまで又はそれを超える再帰を行い、細胞ストック1062の編集を続け得る。

【実施例】

【0238】

実施例I：完全自動シングルプレックスRGN特異的編集実行

本開示の自動マルチモジュール機器を用いて、MAD7ヌクレアーゼを用いたシングルプレックス自動ゲノム編集が問題なく実行された。米国特許第9,982,279号明細書を参照されたい。

【0239】

ギブソンアセンブリ(Gibson Assembly)(登録商標)を介してampRプラスミド骨格及びlacZ__F172*編集カセットを自動機器に含まれる等温核酸アセンブリモジュール内の「編集ベクター」中にアセンブルした。lacZ__F172は、機能的にlacZ遺伝子をノックアウトする。「lacZ__F172*」は、編集がlacZアミノ酸配列の172番目の残基で行われることを示す。アセンブリに続き、アンピュア(AMPure)ビーズを用いて等温核酸アセンブリモジュールにおいて産物を脱塩し、80%エタノールを用いて洗浄し、緩衝剤中に溶出した。アセンブルされた編集ベクター及びリコンビニアリング可能状態のエレクトロコンピテント大腸菌(E. coli)細胞を電気穿孔のために形質転換モジュールに移送した。形質転換モジュールは、ADP-EPCキュベットを含んだ。例えば、米国特許出願第62/551069号明細書を参照されたい。細胞及び核酸を結合し、1分間混合し、電気穿孔を30秒間、実行した。穿孔パルスのパラメータは、電圧2400V、長さ5ms、間隔50ms、パルス数1、極性+であった。移送パルスのパラメータは、電圧150V、長さ50ms、間隔50ms、パルス数20、極性+/-であった。電気穿孔に続き、細胞を回復モジュール(もう一つの成長モジュール)に移送し、クロラムフェニコールを含むSOC培地において回復させた。1時間後、カルベニシリンを培地に追加し、細胞を更に2時間、回復させた。回復後、ユーザによる回収まで細胞を4に維持した。

【0240】

自動プロセス及び回復後、ラクトース(糖基材として)、クロラムフェニコール及びカルベニシリンが補足されたマッコンキー(MacConkey)寒天ベースに細胞のアリコートを設置し、コロニーが現れるまで成長させた。白色コロニーは、機能編集された細胞を表し、紫色コロニーは、非編集細胞を表した。全ての液体移送は、自動マルチモジュール細胞処理機器の自動液体ハンドリングデバイスにより実行した。

【0241】

自動処理の結果は、合計で約 1.0×10^{-3} の細胞が形質転換し(従来のベンチトップ結果に匹敵する)、編集効率は、83.5%であった。白色コロニーにおけるlacZ__172編集は、細胞のゲノムの編集領域のシーケンシングにより確認された。更に、自動細胞処理のステップをウェブカムにより遠隔から観測し、テキストメッセージを送信して、自動処理手順のステータスを更新した。

実施例 I I : 完全自動再帰的編集実行

自動マルチモジュール細胞処理システムを用いて再帰的編集が問題なく達成された。 Gibson Assembly (登録商標) を介して amp R プラスミド骨格及び lac Z__V 1 0 * 編集カセットを自動システムに含まれる等温核酸アセンブリモジュール内の「編集ベクター」中にアセンブルした。 lac Z__F 1 7 2 編集と同様に、 lac Z__V 1 0 編集も機能的に lac Z 遺伝子をノックアウトする。「 lac Z__V 1 0 」は、編集が lac Z アミノ酸配列のアミノ酸位置 1 0 で行われることを示す。アセンブリに続き、産物は、アンピュア (AMPure) ビーズを用いて等温核酸アセンブリモジュールにおいて脱塩され、80%エタノールを用いて洗浄され、緩衝剤中に溶出した。第1のアセンブルされた編集ベクター及びリコンビニアリング可能状態の
10
レクトロコンピテント大腸菌 (E. coli) 細胞を電気穿孔のために形質転換モジュールに移送した。形質転換モジュールは、ADP-EPC キュベットを含んだ。細胞及び核酸を結合し、1分間混合し、電気穿孔を30秒間、実行した。穿孔パルスのパラメータは、電圧2400V、長さ5ms、間隔50ms、パルス数1、極性+であった。移送パルスのパラメータは、電圧150V、長さ50ms、間隔50ms、パルス数20、極性+/-であった。電気穿孔に続き、細胞を回復モジュール(もう一つの成長モジュール)に移送し、クロラムフェニコールを含むSOC培地において回復させた。1時間後、カルベニシリンを培地に追加し、細胞を更に2時間、成長させた。次に、細胞を遠心分離モジュールに移送し、次に培地交換を実行した。クロラムフェニコール及びカルベニシリンを含む
20
TB中に細胞を再懸濁させ、TB中で細胞を2.7のOD600まで成長させ、次に濃縮し且つレクトロコンピテントにさせた。

【0242】

細胞成長中、等温核酸アセンブリモジュールにおいて第2の編集ベクターを準備した。第2の編集ベクターは、カナマイシン耐性遺伝子を含み、編集カセットは、 gal K Y 1 4 5 * 編集を含んだ。成功の場合、 gal K Y 1 4 5 * 編集は、ガラクトースを取り込み代謝する能力を細胞に付与する。 gal K Y 1 5 4 * カセットにより生成された編集は、154番目のアミノ酸残基に停止コドンを導入し、チロシンアミノ酸を停止コドンに変える。この編集は、 gal K 遺伝子産物を非機能的にし、細胞がガラクトースを代謝できないようにする。アセンブリに続き、アンピュア (AMPure) ビーズを用いて等温核酸アセンブリモジュールにおいて第2の編集ベクター産物を脱塩し、80%エタノールを用いて洗浄し、緩衝剤中に溶出した。上記において詳述したものと同一パラメータを用いて、アセンブルされた第2の編集ベクター及びレクトロコンピテント大腸菌 (E. coli) 細胞(形質転換され、第1の編集ベクターに選択された)を電気穿孔のために形質転換モジュールに移送した。電気穿孔に続き、細胞を回復モジュール(もう一つの成長モジュール)に移送し、カルベニシリンを含むSOC培地において回復させた。回復後、回収されるまで細胞を4に維持し、回収後、クロラムフェニコール及びカナマイシンが補足されたLB寒天に細胞のアリコートを設置した。 lac Z 編集及び gal K 編集の両方を定量化するために、2つの培地タイプ上にレプリカパッチプレートを生成した：1)ラクトース(糖基材として)、クロラムフェニコール及びカナマイシンが補足されたマ
30
ッコンキー (MacConkey) 寒天ベース、並びに2)ガラクトース(糖基材として)
40
)、クロラムフェニコール及びカナマイシンが補足されたマッコンキー (MacConkey) 寒天ベース。全ての液体移送は、自動マルチモジュール細胞処理システムの自動液体ハンドリングデバイスにより実行した。

【0243】

この再帰的編集実験では、スクリーニングされたコロニーの41%は、 lac Z 編集及び gal K 編集の両方を有し、その結果は、「ベンチトップ」又は手動手法を用いて得られた編集効率の2倍に匹敵した。

機器アーキテクチャの代替の実施形態

図12A及び図12Bは、自動細胞処理、例えば複数の細胞における編集を単一のサイクルで実行する自動マルチモジュール細胞編集機器の例の代替の実施形態を示す。自動マ
50

マルチモジュール細胞編集機器は、例えば、研究所環境内で使用するよう設計されたデスクトップ機器であり得る。自動マルチモジュール細胞編集機器は、自動ゲノム切断及び/又は編集を細胞で行うに当たり種々の段階的動作を実行するために、再使用可能な要素と使い捨て要素とを混合したものを組み込み得る。

【0244】

図12Aは、本開示の一実施形態による、複数の細胞における自動細胞処理、例えば編集を単一のサイクルで実行する第1の例の機器1200のブロック図である。幾つかの実装形態では、機器1200は、デッキ1202、DNA試料成分を機器1200に導入する試薬供給レセプタクル1204、細胞を機器1200に導入する細胞供給レセプタクル1206並びに自動細胞処理を実行するために、材料を機器1200のモジュール(例えば、モジュール1210a、1210b、1210c、1210d)、レセプタクル(例えば、レセプタクル1204、1206、1212、1222、1224及び1226)並びに貯蔵ユニット(例えば、ユニット1216、1218、1228及び1214)間で移動させるロボットハンドリングシステム1208を含む。幾つかの実装形態では、細胞供給1206の処理が完了すると、細胞出力1212は、一時的に貯蔵し、後に回収するために、ロボットハンドリングシステム1208により貯蔵ユニット1214に移送され得る。

10

【0245】

ロボットハンドリングシステム1208は、例えば、液体を種々の材料源から種々のモジュール1210及び貯蔵ユニット1214に移送する空気容積型ポンプを含み得る。他の実施形態では、ロボットハンドリングシステム1208は、原料物質の容器(例えば、管)を供給カートリッジ(図示せず、図1Aに関連して考察された)から種々のモジュール1210に移送するピックアンドプレースヘッドを含み得る。幾つかの実装形態では、1つ又は複数のカメラ又は他の光学センサ(図示せず)は、適切なガントリの移動及び位置を確認する。

20

【0246】

幾つかの実装形態では、ロボットハンドリングシステム1208は、移送先端部供給源1216に提供される使い捨て移送先端部を用いて、機器1200内で原料物質、試薬1204(例えば、核酸アセンブリ)及び細胞1206を移送する。例えば、使用済みの移送先端部1216は、固体廃棄物ユニット1218内に破棄され得る。幾つかの実装形態では、固体廃棄物ユニット1218は、ロボットハンドリングシステム1208のピックアンドプレースヘッドから管を除去するキッカーを含む。

30

【0247】

幾つかの実装形態では、機器1200は、空気容積型ポンプに接続するシッパーを有するエレクトロポレータキュベットを含む。幾つかの実装形態では、細胞1206及び試薬1204は、シッパーを通して電気穿孔キュベットに吸引され、キュベットは、機器1200の1つ又は複数のモジュール1210に移される。

【0248】

幾つかの実装形態では、機器1200は、図13の処理システム1310等の処理システム1220により制御される。処理システム1220は、ユーザ入力に基づいて機器1200を動作させるように構成され得る。処理システム1220は、機器1200の種々のモジュール1210のタイミング、持続時間、温度及び他の動作を制御し得る。処理システム1220は、機器1200の動作のために電源(図示せず)に接続され得る。

40

【0249】

幾つかの実装形態では、機器1200は、例えば、編集に関連して、核酸を細胞1206に導入する形質転換モジュール1210cを含む。例えば、ロボットハンドリングシステム1208は、試薬1204及び細胞1206を形質転換モジュール1210cに移送し得る。形質転換モジュール1210は、トランスフェクション、形質転換及びマイクロ流体の当業者により慣習的に用いられる任意の細胞形質転換又はトランスフェクション技法を行い得る。形質転換は、それらの形質転換技法及びトランスフェクション技法を含め

50

た、外因性核酸配列（例えば、DNA）を標的細胞に導入する種々の当技術分野で認識されている技法の包含を意図する。そのような方法には、限定ではなく、電気穿孔、リポフェクション、光穿孔、注入、マイクロ沈殿、マイクロ注入、リボソーム、微粒子銃、ソノレーション、レーザ誘起穿孔、ビーズトランスフェクション、リン酸カルシウム若しくは塩化カルシウム共沈又はDEAE-デキストラン-媒介トランスフェクションがある。形質転換は、マイクロ管、試験管、キュベット、マルチウェルプレート、微小繊維又はフロー機器において行うことができる。処理システム1220は、形質転換モジュール1210cの温度及び動作を制御し得る。幾つかの実装形態では、処理システム1200は、ユーザにより設定された1つ又は複数の様々な制御に従って形質転換モジュール1210cの動作に影響を及ぼす。

10

【0250】

幾つかの実装形態では、形質転換モジュール1210cは、前処理液1222を用いて細胞コンピテンスを上げること、例えばスクロース又はグリセリン洗浄により、ベクター取り込みに向けて細胞を準備するように構成される。更に、機械的及び化学的トランスフェクション方法、例えば化学的トランスフェクションを機械的方法と組み合わせるトランスフェクション方法論であるマグネトフェクションの機能を利用するハイブリッド技法を用いることができる。別の例では、陽イオン脂質を遺伝子銃又はエレクトロポレータと組み合わせて展開し得る。標的細胞の形質転換又はトランスフェクションに適した材料及び方法は、例えば、グリーン（Green）及びサムブルック（Sambrook）著、「分子クローニング：ラボラトリーマニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第4版、コールドスプリングハーバ研究所プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、ニューヨーク州コールドスプリングハーバ（Cold Spring Harbor, N.Y.）、2014年及び他のラボラトリーマニュアルに見出すことができる。

20

【0251】

形質転換に続き、幾つかの実装形態では、細胞は、回復モジュール1210dに移送され得る。幾つかの実装形態では、回復モジュール1210dは、回復及び編集モジュールの誘導の組合せである。回復モジュール1210dにおいて、細胞は、回復し、核酸を発現し得、誘導性ヌクレアーゼシステムでは、ヌクレアーゼが、例えば、幾つかの例ではヌクレアーゼ発現のための化学的、光、ウイルス若しくは温度誘導又はインデューサ分子1224の導入等の一時的に制御される誘導により細胞に導入される。

30

【0252】

編集に続き、幾つかの実装形態では、細胞は、貯蔵ユニット1214に移送され、貯蔵ユニット1214において、細胞は、細胞が更なる研究又は編集細胞集団、例えば編集細胞ライブラリの回収のために取り出されるまで細胞出力1212として貯蔵することができる。

【0253】

幾つかの実装形態では、機器1200は、再帰的ゲノム編集に向けて設計され、再帰的ゲノム編集では、複数の編集が細胞集団の細胞内部のゲノムに順次導入される。幾つかの実装形態では、試薬供給源1204は、再帰的処理のために貯蔵ユニットから細胞出力1212にアクセスする前に補充される。他の実装形態では、続く処理サイクル前にユーザ介入が必ずしも必要ないように、複数の試薬供給源1204及び/又は大容積の試薬供給源1204を機器1200に導入し得る。

40

【0254】

幾つかの実装形態では、細胞出力1212aの一部は、自動細胞成長モジュール1210aに移送される。例えば、細胞出力1212aの全てを移送し得るか、又は機器が増分的に変更された試料を保持するようにアリコートのみを移送し得る。細胞成長モジュール1210aは、幾つかの実装形態では、成長中、細胞のODを測定して、編集の誘導前に細胞が所望の濃度であることを保証する。使用することができる細胞濃度及び生理学的状態の他の尺度には、限定ではなく、pH、溶解酸素、放出酵素、音響特性及び電気特性が

50

ある。

【0255】

幾つかの実施形態では、ゲノム編集を受けない細胞の背景を低減するために、成長モジュール1210aは、選択的成長培地1226を用いて選択プロセスを実行して、編集細胞を富化する。例えば、導入された核酸は、抗生物質耐性又は別の選択可能なマーカを受け取る遺伝子を含むことができる。幾つかの実装形態では、複数の選択的遺伝子又はマーカ1226は、再帰的編集中、細胞に導入され得る。例えば、編集の順次ラウンドで選択可能なマーカの導入を交互にすることにより、非編集細胞の背景をなくし、機器1200の複数のサイクルが順次ゲノム編集を有する細胞を選択できるようにし得る。適した抗生物質耐性遺伝子には、限定ではなく、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナニン耐性遺伝子、プラストサイジン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピュロマイシン耐性遺伝子及びクロラムフェニコール耐性遺伝子等の遺伝子がある。

10

【0256】

成長モジュール1210aから、細胞は、濾過モジュール110bに移送され得る。濾過モジュール1210b又は代替的に細胞洗浄及び濃縮モジュールは、培地交換を可能にし得る。幾つかの実施形態では、死んだ細胞背景の除去は、洗浄剤、浸透ストレス、温度、酵素、プロテアーゼ、バクテリオファージ、還元剤又はカオトロープ等の溶解性エンハンサーを用いて支援される。他の実施形態では、細胞除去及び/又は培地交換を用いて、死んだ細胞背景を除去する。幾つかの実施形態では、濾過モジュール1210bからの廃棄産物は、液体廃棄物ユニット1228に集められる。

20

【0257】

濾過後、詳細に上述したように、細胞は、形質転換モジュール1210cに提示され得、次に回復モジュール1210d及び最後に貯蔵ユニット1214に提示され得る。

図12Bを参照すると、図12Aと同様に、複数の細胞において自動ゲノム切断及び/又は編集を単一のサイクルで実行する第2の例の機器1240は、デッキ1202と、1つ又は複数の核酸成分を機器1240に導入する試薬供給レセプタクル1204と、細胞を機器1240に導入する細胞供給レセプタクル1206と、自動細胞処理を実行するために、材料を機器1240のモジュール(例えば、モジュール1210a、1210b、1210c、1210f、1210g、1210m及び1210h)、レセプタクル(例えば、レセプタクル1204、1206、1212、1214、1224、1242、1244及び1246)並びに貯蔵ユニット(例えば、ユニット1214、1216、1218及び1228)間で移動させるロボットハンドリングシステム1208とを含む。細胞供給1206の処理が完了すると、幾つかの実施形態では、細胞出力1212は、一時的に貯蔵し、後に回収するために、ロボットハンドリングシステム1208により貯蔵ユニット1214に移送され得る。

30

【0258】

幾つかの実施形態では、ロボットハンドリングシステム1208は、図12Aに関連して説明したように、移送先端部供給源1216に提供される使い捨て移送先端部を用いて、機器1240内で原料物質、ベクター骨格1242、編集オリゴ1244、試薬1204(例えば、核酸アセンブリ、核酸精製のため、細胞をエレクトロコンピテントにするため等)及び細胞1206を移送する。

40

【0259】

他の実施形態では、機器1240は、空気容積型ポンプに接続するシッパを有するエレクトロポレータキュベットを含む。幾つかの実装形態では、細胞1206及び試薬1204は、シッパを通して電気穿孔キュベットに吸引され、キュベットは、機器1240の1つ又は複数のモジュール1210に移される。

【0260】

図12Aに関連して説明したように、幾つかの実装形態では、機器1240は、図13の処理システム1310等の処理システム1220により制御される。

50

幾つかの実施形態では、機器 1240 は、核酸アセンブリモジュール 1210 g、特定の例では自動マルチモジュール細胞処理機器を含み、核酸アセンブリモジュール 1210 g は、幾つかの実施形態では、等温核酸アセンブリを含み得る。上述したように、等温核酸アセンブリモジュールは、ギブソンアセンブリ (Gibson Assembly) (登録商標) 分子クローニング法を実行するように構成される。

【0261】

幾つかの実施形態では、核酸をアセンブルした後、核酸 (例えば、等温核酸アセンブリの例では等温核酸アセンブリ混合物 (核酸 + 等温核酸アセンブリ試薬)) は、精製モジュール 1210 h に移送される。ここで、核酸アセンブリ混合物の不要成分は、除去され (例えば、塩、鉱物)、特定の実施形態では、アセンブルされた核酸は、濃縮される。例えば、例示的な実施形態では、精製モジュール 1210 h において、等温核酸アセンブリ混合物は、無塩緩衝剤及び固相可逆的固定化 (SPRI: Solid Phase Reversible Immobilization) 磁性ビーズ又はアンピュア (AMPure) ビーズ等の磁性ビーズと組み合わせられ得る。等温核酸アセンブリ混合物は、アセンブルされた核酸を磁性ビーズに結合するのに十分な時間 (例えば、30 秒 ~ 10 分) にわたり培養され得る。幾つかの実施形態では、精製モジュールは、磁性ビーズと係合するように構成された磁石を含む。磁石は、アセンブルされ結合した核酸から上澄みを除去し、例えば 80% エタノールでアセンブルされ結合した核酸を洗浄することができるように係合し得る。ここでも、磁石は、係合し得、80% エタノール洗浄液を除去し得る。磁性ビーズ / アセンブルされた核酸は、乾燥され得、次にアセンブルされた核酸を溶出させ得、磁石を再び係合して、それにより今回はビーズを隔離し、溶出した、アセンブルされた核酸を含む上澄みを除去し得る。次に、アセンブルされた核酸は、形質転換モジュール (例えば、好適な実施形態ではエレクトロポレータ) に移送され得る。形質転換モジュールは、移送時、エレクトロコンピテント細胞を既に含み得る。

10

20

【0262】

幾つかの実施形態では、機器 1240 は、図 12A に関連して説明したように、核酸を細胞 1206 に導入する形質転換モジュール 1210 c を含む。しかしながら、これに関連して、精製モジュール 1210 h から出力されたアセンブルされた核酸 1204 は、細胞 1206 との結合のために形質転換モジュール 1210 c に移送される。

【0263】

形質転換モジュール 1210 c における形質転換に続き、幾つかの実装形態では、細胞は、回復モジュール 1210 m に移送され得る。回復モジュール 1210 e において、細胞は、回復され、核酸を発現し得、誘導性ヌクレアーゼシステムでは、ヌクレアーゼが、例えば、幾つかの例ではヌクレアーゼ発現のための化学的、光、ウイルス若しくは温度誘導又はインデューサ分子の導入等の一時的に制御される誘導により導入される。

30

【0264】

回復に続き、幾つかの実装形態では、細胞は、編集モジュール 1210 f に移送される。編集モジュール 1210 f は、例えば、誘導された核酸の発現及び誘導性ヌクレアーゼの誘導を通して細胞のゲノムの編集を誘導するのに適切な状況を供給する。細胞は、誘導性ヌクレアーゼを含み得る。幾つかの例では、ヌクレアーゼは、編集モジュール 1210 f 内で化学的に誘導、生物学的に誘導 (例えば、誘導性プロモータを介する)、ウイルス的に誘導、光誘導、温度誘導及び / 又は熱誘導され得る。

40

【0265】

幾つかの実装形態では、図 12A に関連して説明したように、編集に続き、細胞は、貯蔵ユニット 1214 に移送される。

幾つかの実装形態では、機器 1240 は、再帰的ゲノム編集に向けて設計され、再帰的ゲノム編集では、複数の編集は、細胞集団の細胞内部のゲノムに順次導入される。幾つかの実装形態では、試薬供給源 1204 は、再帰的処理のために貯蔵ユニットから細胞出力 1212 にアクセスする前に補充される。例えば、核酸アセンブリモジュール 1210 g 及び精製モジュール 1210 h を介したアセンブリ及び準備のために、追加のベクター骨

50

格 1 2 4 2 及び / 又は編集オリゴ 1 2 4 4 を機器 1 2 4 0 に導入し得る。他の実装形態では、続く処理サイクル前にユーザ介入が必ずしも必要ないように、複数のベクター骨格容積 1 2 4 2 及び / 又は編集オリゴ 1 2 4 4 を機器 2 1 4 0 に導入し得る。各後続サイクルにおいて、ベクター骨格 1 2 4 2 及び / 又は編集オリゴ 1 2 4 4 は、変更し得る。核酸アセンブリが準備されるとき、核酸アセンブリは、試薬供給源 1 2 0 4 又は別の貯蔵領域に提供され得る。

【 0 2 6 6 】

幾つかの実装形態では、図 1 2 A に関連して考察したように、細胞出力 1 2 1 2 a の一部は、自動細胞成長モジュール 1 2 1 0 a に移送される。

幾つかの実装形態では、ゲノム編集を受けない細胞の背景を低減するために、図 1 2 A に関連して考察したように、成長モジュール 1 2 1 0 a は、選択的成長培地 1 2 2 6 を用いて選択プロセスを実行して、編集細胞を富化する。

【 0 2 6 7 】

図 1 2 A に関連して考察したように、成長モジュール 1 2 1 0 a から、細胞は、濾過モジュール 1 2 1 0 b に移送され得る。示されるように、溶離剤供給源 1 2 4 6 からの溶離剤（例えば、緩衝剤、グリセリン）は、培地交換のために濾過モジュール 1 2 1 0 b に移送され得る。

【 0 2 6 8 】

濾過後、上述したように、細胞は、形質転換のために形質転換モジュール 1 2 1 0 c に提示され得、次に回復モジュール 1 2 1 0 m 及び編集モジュール 1 2 1 0 f 及び最後に貯蔵ユニット 1 2 1 4 に提示され得る。

【 0 2 6 9 】

幾つかの実装形態では、図 1 2 A 及び / 又は図 1 2 B の自動マルチモジュール細胞処理機器は、図 1 A 及び図 1 B に関連して考察したように、1 つ又は複数の交換式供給カートリッジ及びロボットハンドリングシステムを含む。各カートリッジは、核酸アセンブリ混合物、オリゴヌクレオチド、ベクター、成長培地、選択剤（例えば、抗生物質）、誘導剤、固相可逆的固定化（S P R I）ビーズ等の核酸精製試薬、エタノール及び 1 0 % グリセリンの 1 つ又は複数を含み得る。

【 0 2 7 0 】

一例の機器 1 2 0 0、1 2 4 0 は、特定の構成のモジュール 1 2 1 0 を含むものとして示されているが、これらの構成は、単なる例示を目的とする。例えば、他の実装形態では、より多数又はより少数のモジュール 1 2 1 0 を各機器 1 2 0 0、1 2 4 0 内に含め得る。また、例えば、例としてハイブリドーマを提供する細胞融合を促進するモジュール、アセンブリ前に核酸を増幅するモジュール並びに / 又はタンパク質発現及び / 若しくは分泌を促進するモジュール等の異なるモジュールを機器に含めることもできる。更に、図 1 A の複製細胞成長モジュール 1 1 0 a、1 1 0 b 等の特定のモジュール 1 2 1 0 は、特定の实装形態内で複製され得る。各機器 1 2 0 0 及び 1 2 4 0 は、別の例では、図 1 A のカートリッジ 1 0 4 及び 1 0 6 等の培地カートリッジを受け入れるように設計され得る。更なる変更も可能である。

自動マルチモジュール細胞処理機器の制御システム

図 1 1 を参照すると、スクリーンショットは、自動マルチモジュール細胞処理機器とインターフェースする一例のグラフィカルユーザインターフェース（GUI : graphical user interface）1 1 0 0 を示す。インターフェースは、例えば、図 1 C 及び図 2 D のディスプレイ 2 3 6 に提示され得る。一例では、GUI 1 1 0 0 は、図 1 3 の処理システム 1 3 1 0 によりタッチスクリーン 1 3 1 6 に提示され得る。

【 0 2 7 1 】

幾つかの実装形態では、GUI 1 1 0 0 は、プロトコールペイン 1 1 0 2、温度ペイン 1 1 0 6、電気穿孔ペイン 1 1 0 8 及び細胞成長ペイン 1 1 1 0 等の幾つかの情報ペイン及びデータ入力ペインに分けられる。更なるペインも可能である。例えば、幾つかの実装形態では、GUI 1 1 0 0 は、幾つかの例では、核酸アセンブリモジュール、精製モジュ

10

20

30

40

50

ール、細胞成長モジュール、濾過モジュール、形質転換モジュール、編集モジュール及び回復モジュールのそれぞれの1つ又は複数等、各モジュールにペインを含む。GUI 1100の下部ペインは、幾つかの実施形態では、現在の作業フローに適用可能なモジュール（例えば、プロトコールペイン1102において選択されるか、又はスクリプトインターフェース（図示せず）を通してロードされたスクリプト内で指定される）を表す。幾つかの実施形態では、スクロール又はページング特徴により、ユーザは、図11のスクリーンショット内に示されていない追加のペインにアクセスすることができ得る。

【0272】

GUI 1100は、幾つかの実施形態では、示されるスクリーンショット等の種々の画面にアクセスする（例えば、ホーム制御機構1120aの使用を通して）ための一連の制御機構1120を含む。例えば、編集制御機構1120bの選択を通して、ユーザに、1つ、2つ又は一連の細胞処理ステップを提供する選択肢を提供し得る。スクリプト制御機構1120cの選択を通して、ユーザに、新しい処理スクリプトを追加する機会又は既存の処理スクリプトを変更する機会を提供し得る。ユーザは、幾つかの実施形態では、ヘルプ制御機構1120dを選択して、GUI 1100及び自動マルチモジュール細胞処理機器の特徴に関する更なる情報を取得し得る。幾つかの実装形態では、ユーザは、設定制御機構1120eを選択して、幾つかの例では、タイムゾーン、言語、単位、ネットワークアクセス選択肢等の所望のプロセス及び/又はGUI 1100の設定選択肢にアクセスする。電力制御機構1120fは、選択されると、ユーザが自動マルチモジュール細胞処理機器の電源を切れるようにする。

10

20

【0273】

プロトコールペイン1102を参照すると、幾つかの実装形態では、ユーザは、プロトコールをプロトコール入力フィールド1112に入力すること（又は代替的にドロップダウンメニュー）により、自動マルチモジュール細胞処理機器によって実行されるプロトコール（例えば、スクリプト又は作業フロー）を選択する。他の実施形態では、プロトコールは、例えば、スクリプト制御機構1120bを選択することによりアクセスされる別個のユーザインターフェース画面を通して選択され得る。別の例では、自動マルチモジュール細胞処理機器は、プロトコールを選択し、それをプロトコール入力フィールド1112に提示し得る。例えば、自動マルチモジュール細胞処理機器の処理システムは、自動マルチモジュール細胞処理機器に装填された1つ又は複数のカートリッジに位置決めされた機械可読印をスキャンして、適切なプロトコールを決定し得る。示されるように、「Microbe_Kit1(1.0.2)」プロトコールが選択されており、これは、自動マルチモジュール細胞処理機器と併用するために購入されたカートリッジのキット及び他の使い捨て供給品に対応し得る。

30

【0274】

幾つかの実装形態では、プロトコールペイン1102は、プロトコール入力フィールド1112に提示されたプロトコールの実行を制御する開始制御機構1114a及び停止制御機構1114bを更に含む。GUI 1100は、タッチスクリーンインターフェース上に提供し得、例えば開始制御機構1114aをタッチ選択すると、細胞処理が開始され、停止制御機構1114bを選択すると、細胞処理が停止する。

40

【0275】

実行ステータスペイン1104を参照すると、幾つかの実装形態では、チャート1116は、プロトコールペイン1102において識別されたプロトコールの処理の段階を示す。例えば、実行完了1118aの部分は、青色で示される一方、現在段階1118bの部分は、緑色で示され、任意のエラー1118cは、エラーが生じた実行完了1118aの部分の過程に沿った時点から延びるマーカでフラグされる。メッセージ領域1118dは、完了した実行の割合、完了した段階の割合及びエラー総数を提示する。幾つかの実施形態では、チャート1116が選択されると、ユーザに、幾つかの例ではエラーのタイプの識別、現在の処理段階の名称（例えば、核酸アセンブリ、精製、細胞成長、濾過、形質転換、回復、編集等）及び実行内の処理段階のリスト等の実行ステータスに関する更なる詳

50

細を提示し得る。更に、幾つかの実施形態では、実行完了時間メッセージは、実行が完了すると推定される日時を示す。幾つかの例では、実行は、1つの細胞編集プロセス又はユーザ介入なしで実行がスケジュールされた一連の再帰的細胞編集プロセスを示し得る。幾つかの実施形態（図示せず）では、実行ステータスペイン1104は、ユーザ介入（例えば、カートリッジ交換、固体廃棄物の廃棄、液体廃棄物の廃棄等）が必要とされる推定時間を更に示す。

【0276】

幾つかの実装形態では、実行ステータスペイン1104は、細胞処理を一時停止する一時停止制御機構1124を含む。ユーザは、例えば、識別されたエラーを修正するため又は廃棄物除去等の手動介入を行うために現在の実行の一時停止を選択し得る。

10

【0277】

温度ペイン1106は、幾つかの実施形態では、自動マルチモジュール細胞処理機器の種々の装置の温度設定を示す対応するメッセージ1128を有する一連のアイコン1126を示す。アイコンは、左から右に、形質転換モジュール1126a（例えば、図1Aの試薬カートリッジ110cに関連付けられたフロースルー電気穿孔カートリッジ又は図5Bのフロースルー電気穿孔デバイス534）、精製モジュール1126b、第1の成長モジュール1126c、第2の成長モジュール1126d及び濾過モジュール1126eを表し得る。対応するメッセージ1128a~eは、対応するモジュール（例えば、この段階又はこの実行での）現在の温度、低温及び高温を識別する。アイコン1126の1つを選択するに当たり、幾つかの実施形態では、時間の温度のグラフィック表示をレビューし得る。

20

【0278】

温度ペインの下において、幾つかの実装形態では、一連のペインは、幾つかのモジュールの現在ステータスを識別する。例えば、電気穿孔ペイン1108は、形質転換モジュールのステータスを表す一方、細胞成長ペイン1110は、成長モジュールのステータスを表す。幾つかの実施形態では、ここで提示されるペインは、現在動作可能なモジュール（例えば、現在の段階で細胞処理に関わるモジュール）のステータス及び現在の実行（示されるように、例えば実行ステータスペイン1104における）中に既に利用した任意のモジュールのステータスを識別する。過去のステータス情報は、例えば、細胞処理前の段階において用いられたパラメータに関する情報をユーザに提示し得る。

30

【0279】

電気穿孔ペイン1108を参照すると、幾つかの実装形態では、ボルト、ミリアンペア及びジュール単位の動作パラメータ1130aが提示される。更に、ステータスメッセージ1132aは、幾つかの例では、エラーステータス、処理の残り時間又はモジュールの内容物（例えば、モジュールに追加された材料）等の形質転換モジュールの機能に関する追加情報を識別し得る。幾つかの実装形態では、ステータスメッセージ1132aの上のアイコン1134aは、対応するモジュールが活発に処理中であるとき、アクティブモード（例えば、有色、「点灯」、太字等）で提示される。幾つかの実施形態では、アイコン1134aを選択すると、動作パラメータ1130aに関する詳細情報のグラフィック表示が提示される。

40

【0280】

幾つかの実装形態では、細胞成長ペイン1110を参照すると、成長のOD及び時間の動作パラメータ1130bが提示される。更に、ステータスメッセージ1132bは、幾つかの例では、エラーステータス、処理の残り時間又はモジュールの内容物（例えば、モジュールに追加された材料）等の成長モジュールの機能に関する追加情報を識別し得る。幾つかの実装形態では、ステータスメッセージ1132bの上のアイコン1134bは、対応するモジュールが活発に処理中であるとき、アクティブモード（例えば、有色、「点灯」、太字等）で提示される。幾つかの実施形態では、アイコン1134bを選択すると、動作パラメータ1130bに関する詳細情報のグラフィック表示が提示される。

【0281】

50

次に、図13を参照して、例示的な実施形態による一例の処理システム及び処理環境のハードウェア説明について説明する。図13において、処理システム1310は、上述した処理の一部を実行するCPU1308を含む。例えば、CPU1308は、図9の方法900及び/又は図10A~図10Cの作業フローの処理段階を管理し得る。プロセスデータ及びスクリプト、命令及び/又はユーザ設定は、メモリ1302に記憶され得る。これらのプロセスデータ及びスクリプト、命令及び/又はユーザ設定は、ポータブル記憶培地(例えば、USBドライブ、光ディスクドライブ等)等の記憶培地ディスク1304に記憶され得るか、又は遠隔に記憶され得る。例えば、プロセスデータ及びスクリプト、命令及び/又はユーザ設定は、ネットワーク1328を介して処理システム1310がアクセス可能なロケーションに記憶され得る。更に、請求項に記載される進歩は、本発明のプロセスの命令が記憶されるコンピュータ可読培地の形態によって限定されない。例えば、命令は、フラッシュメモリ、RAM、ROM又はサーバ、コンピュータ、スマートフォン若しくは他のハンドヘルド計算デバイス等、処理システム1310が通信する任意の他の情報処理デバイスに記憶され得る。

【0282】

更に、請求項に記載される進歩の構成要素は、当業者に既知の他の計算システム等のCPU1308及びオペレーティングシステムと併せて実行される実用アプリケーション、バックグラウンドデーモン、オペレーティングシステムの構成要素又はそれらの組合せとして提供され得る。

【0283】

CPU1308は、ARMプロセッサ、システムオンチップ(SOC: system-on-a-chip)マイクロプロセッサ、マイクロコントローラ、デジタル信号プロセッサ(DSP: digital signal processor)であり得るか、又は当業者により認識される他のプロセッサタイプであり得る。更に、CPU1308は、並列に協働的に機能して、上述した本発明によるプロセスの命令を実行する複数のプロセッサとして実施され得る。

【0284】

処理システム1310は、処理環境1300の一部である。図13における処理システム1310は、ネットワーク1328とインターフェースして、処理環境1300内の追加の要素にアクセスするためのネットワークコントローラ1306も含む。理解することができるように、ネットワーク1328は、インターネット等の公衆ネットワーク、LAN若しくはWANネットワーク等の私設ネットワーク又はそれらの任意の組合せであり得る。ネットワーク1328は、EDGE、3G及び4G無線セルラシステムを含むセルラネットワーク等の無線であり得る。無線ネットワークは、Wi-Fi、ブルートゥース(Bluetooth(登録商標))又は既知の任意の他の無線形態の通信でもあり得る。

【0285】

処理システム1310は、ユーザインターフェース(例えば、タッチスクリーン)1316、1つ又は複数のセンサ1314及び1つ又は複数の周辺デバイス1318とインターフェースする汎用I/Oインターフェース1312を更に含む。周辺I/Oデバイス1318は、幾つかの例では、ビデオ録画システム、オーディオ録音システム、マイクロホン、外付け記憶装置及び/又は外部スピーカシステムを含み得る。1つ又は複数のセンサ1314は、ジャイロスコープ、加速度計、重力センサ、線形加速度計、全地球測位システム、バーコードスキャナ、QRコード(登録商標)スキャナ、RFIDスキャナ、温度モニタ及び照明システム又は照明要素の1つ又は複数を含み得る。

【0286】

汎用記憶装置コントローラ1324は、処理システムの全ての構成要素を相互接続する、パラレルバス又はユニバーサルシリアルバス(USB: Universal Serial Bus)等のシリアルバス等の通信バス1340又は同様のものに記憶培地ディスク1304を接続する。記憶装置コントローラ1324、ネットワークコントローラ13

10

20

30

40

50

06及び汎用I/Oインターフェース1312の一般的な特徴及び機能の説明は、これらの特徴が既知であるため、簡潔にするために本明細書において省略される。

【0287】

幾つかの実施形態では、処理システム1310は、1つ又は複数のオンボードセンサ及び/又は周辺センサ1314を含む。センサ1314は、例えば、自動マルチモジュール処理機器の内部電子回路に直接及び/又は筐体に組み込むことができる。センサ1314の一部は、例えば、ワイヤを介してI/Oインターフェース1312と直接、物理的に通信することができるか、又は例えばBluetooth(登録商標)、Wi-Fi若しくはNFC接続を介して無線通信することができる。例えば、無線通信コントローラ1326は、1つ又は複数の無線センサ1314とI/Oインターフェース1312との間の通信を可能にし得る。更に、1つ又は複数のセンサ1314は、例えば、ネットワーク1328を拠点とする中間サーバ又は記憶装置を介して間接的に通信し得るか、又は自動マルチモジュール細胞処理機器内のいずれかの箇所にある1つの累積器と通信(有線、無線又は間接的)し得、累積器は、次に、I/Oインターフェース1312と通信(有線、無線又は間接的)する。

10

【0288】

I/Oインターフェース1312と通信するセンサ1314の群を組み合わせて用いて、複数の場所から所与の信号タイプを収集し、信号のより完全なマップを生成し得る。I/Oインターフェース1312と通信する1つ又は複数のセンサ1314は、例えば、他の信号を濾波、相殺又は拒絶するコンパレータ又は検証要素として使用することができる。

20

【0289】

幾つかの実施形態では、処理環境1300は、無線通信コントローラ1326を介して処理システム1310と通信する計算デバイス1338を含む。例えば、無線通信コントローラ1326は、ユーザのスマートフォン又は他の個人計算デバイスを宛先とした電子メールメッセージ、テキストメッセージ及び/又はソフトウェアアプリケーションアラートの交換を可能にし得る。

【0290】

処理環境1300は、幾つかの実装形態では、ロボット材料ハンドリングシステム1322を含む。処理システム1310は、自動マルチモジュール細胞処理機器におけるガントリの位置操作、シッパー又はピペッター要素の昇降及び/又はシッパー/ピペッターと種々の容器(例えば、チャンバ、バイアル等)との間で液体を移送させるポンプ及び弁の作動等のロボット材料ハンドリングシステムの要素を作動させる制御信号を発行するロボットコントローラ1320を含み得る。ロボットコントローラ1320は、幾つかの例では、処理システム1310をロボット材料ハンドリングシステム1322とインターフェースさせるハードウェアドライバ、ファームウェア要素及び/又は1つ又は複数のアルゴリズム又はソフトウェアパッケージを含み得る。

30

【0291】

幾つかの実装形態では、処理環境1310は、幾つかの例では、1つ又は複数のセンサインターフェース、電力制御インターフェース、弁及びポンプインターフェース及び/又は自動マルチモジュール処理システムの各モジュールの処理をアクティブ化し制御するアクチュエータインターフェース等の1つ又は複数のモジュールインターフェース1332を含む。例えば、モジュールインターフェース1332は、回転細胞成長デバイス850(図8D)の駆動装置モータ864のアクチュエータインターフェース及び回転成長バイアル800内の細胞成長の光学濃度を検知する検出器ボード872のセンサインターフェースを含み得る。モジュールコントローラ1330は、幾つかの実施形態では、モジュールインターフェース1332とインターフェースするように構成される。モジュールコントローラ1330は、1つ又は多くのコントローラを含み得る(例えば、可能な場合にはモジュールにつき1つのコントローラであるが、幾つかのモジュールは、1つのコントローラを共有し得る)。幾つかの例では、モジュールコントローラ1330は、処理システ

40

50

ム 1 3 1 0 をモジュールインターフェース 1 3 3 2 とインターフェースさせるハードウェアドライバ、ファームウェア要素及び / 又は 1 つ又は複数のアルゴリズム又はソフトウェアパッケージを含み得る。

【 0 2 9 2 】

幾つかの実装形態では、処理環境 1 3 1 0 は、自動マルチモジュール処理システムの筐体内の気候条件を制御する熱管理システム 1 3 3 6 を含む。熱管理システム 1 3 3 6 は、自動マルチモジュール細胞処理機器の 1 つ又は複数のモジュール内の気候条件を更に制御し得る。幾つかの実装形態では、処理システム 1 3 1 0 は、熱管理システム 1 3 3 6 とインターフェースする温度コントローラ 1 3 3 4 を含む。幾つかの例では、温度コントローラ 1 3 3 4 は、処理システム 1 3 1 0 を熱管理システム 1 3 3 6 とインターフェースさせるハードウェアドライバ、ファームウェア要素及び / 又は 1 つ又は複数のアルゴリズム又はソフトウェアパッケージを含み得る。

10

自動編集方法、モジュール、機器及びシステムを用いた細胞ライブラリの生成

一態様では、本開示は、本明細書により詳細に説明されるように、種々の編集戦略を用いた種々の細胞タイプでの関心のある RNA 及び / 又はタンパク質の発現、レベル及び / 又は活性が様々な細胞のライブラリを作成する自動編集方法、モジュール、機器及び自動マルチモジュール細胞編集機器を提供する。したがって、本開示は、本開示の自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器により作成された編集細胞ライブラリの包含を意図する。これらの細胞ライブラリは、限定ではなく、種々の有機体の細胞における遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、挿入、欠失、シングルヌクレオチド編集、縦列型反復配列編集、フレームシフト、トリプレットコドン拡張等を含め、異なる標的化編集を有し得る。これらの編集は、ゲノムのコード領域又は非コード領域に向けられ得、好適には合理的に設計される。

20

【 0 2 9 3 】

他の態様では、本開示は、DNA 連結プロセスが様々な細胞のライブラリを作成する自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器を提供する。例えば、細胞ライブラリは、選択された遺伝子の発現を変調する調節エレメントの DNA 結合を妨げる編集を DNA 結合部位に有する個々の細胞を含み得る。加えて、細胞ライブラリは、ヘテロクロマチン形成、クラススイッチ組換え及び V D J 組換え等の細胞プロセスに影響する編集をゲノム DNA に含み得る。

30

【 0 2 9 4 】

特定の態様では、細胞ライブラリは、細胞集団内の個々の細胞の多重化編集を用いて作成され、細胞集団内の複数の細胞を用いて 1 ラウンドの編集で編集され、すなわち、細胞ライブラリ内の細胞内の複数の変更は、1 つの自動動作におけるものである。1 つの多重化自動動作で作成することができるライブラリは、5 0 0 個の編集細胞、1 0 0 0 個の編集細胞、2 0 0 0 個の編集細胞、5 0 0 0 個の編集細胞、1 0 , 0 0 0 個の編集細胞、5 0 , 0 0 0 個の編集細胞、1 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、2 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、3 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、4 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、5 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、6 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、7 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、8 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、9 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、1 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、2 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、3 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、4 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、5 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、6 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、7 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、8 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、9 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、1 0 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞又はそれを超える編集細胞という多くの編集細胞を含むことができる。

40

【 0 2 9 5 】

他の特定の態様では、細胞ライブラリは、細胞集団内の個々の細胞の再帰的編集を用いて作成され、編集は、編集の 2 つ以上のラウンドで個々の細胞に追加される。再帰的編集の使用により、ライブラリの個々の細胞のゲノム内の 2 つ以上の部位を標的化した 2 つ以上の編集が融合する。自動再帰的動作において作成することができるライブラリは、5 0

50

0 個の編集細胞、1 0 0 0 個の編集細胞、2 0 0 0 個の編集細胞、5 0 0 0 個の編集細胞、1 0 , 0 0 0 個の編集細胞、5 0 , 0 0 0 個の編集細胞、1 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、2 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、3 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、4 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、5 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、6 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、7 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、8 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、9 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、1 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、2 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、3 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、4 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、5 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、6 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、7 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、8 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、9 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞、1 0 , 0 0 0 , 0 0 0 個の編集細胞又はそれを超える編集細胞という多くの編集細胞を含むことができる。

10

【0296】

本明細書に基づいて、自動システムを利用するように変更することができる非自動編集戦略の例は、例えば、米国特許第 8 , 1 1 0 , 3 6 0 号明細書、同第 8 , 3 3 2 , 1 6 0 号明細書、同第 9 , 9 8 8 , 6 2 4 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 3 1 6 3 5 3 号明細書及び同第 2 0 1 2 0 2 7 7 1 2 0 号明細書に見出すことができる。

【0297】

特定の態様では、まず、細胞表現型を作成するのに再帰型編集を用い、表現型を逆にし、且つ/又は他の細胞特性を加速化させるために、次の編集後のラウンドを用いることができる。

20

【0298】

幾つかの態様では、細胞ライブラリは、細胞内で非天然アミノ酸を作成する編集を含む。

特定の態様では、本開示は、本開示の自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて作成された1つ又は複数の調節エレメントにおける編集を有する編集細胞ライブラリを提供する。「調節エレメント」という用語は、特定の環境及び/又は状況において操作可能に連結されたコード配列の転写及び/又は翻訳に影響を及ぼすことができる核酸分子を指す。この用語は、転写と、プロモータ、RNAポリメラーゼ及び転写因子の基本相互作用に必要なコアエレメント、上流エレメント、エンハンサー及び応答エレメントを含むRNA安定性を促進又は調節する全てのエレメントの包含を意図する。(例えば、ルーウィン(Lewin)著、「遺伝子V(Genes V)」、(オックスフォード大学プレス(Oxford University Press)、オックスフォード(Oxford)、p. 847~873を参照されたい)。原核生物における例示的な調節エレメントには、限定ではなく、プロモータ、オペレータ配列及びリボゾーム結合部位がある。真核細胞において用いられる調節エレメントには、限定ではなく、プロモータ、エンハンサー、インスレータ、スプライシングシグナル及びポリアデニレーションシグナルがあり得る。

30

【0299】

好適には、編集細胞ライブラリは、特定の細胞タイプでのタンパク質構造、発現及び/又は活性の予測に基づいて設計される、合理的に設計された編集を含む。例えば、合理的な設計は、ヌクレアーゼ発現及び/又は結合を含む異なる編集パラメータ、成長条件及び他の実験条件が集合的にヌクレアーゼ編集のダイナミクスをどのように制御するかを予測するために、特定のヌクレアーゼ及び遺伝子調節を有するゲノム編集のシステム全体生物物理学モデルに基づき得る。例えば、ファラサット(Farasaat)及びサリス(Salis)、プロスコンピュータショナルバイオロジー(PLoS Comput Biol)、第29:12(1)巻、p. e1004724、(2016年)を参照されたい。

40

【0300】

一態様では、本開示は、本発明の自動編集機器、システム及び方法を用いて作成された種々の合理的に設計された調節配列を有する編集細胞のライブラリの作成を提供する。例えば、編集細胞ライブラリは、構成及び/又は誘導プロモータ、エンハンサー配列、オペ

50

レータ配列及び/又はリボゾーム結合部位の組を用いて作成された原核細胞集団を含むことができる。別の例では、編集細胞ライブラリは、構成及び/又は誘導プロモータ、エンハンサー配列、オペレータ配列及び/又は関心のあるタンパク質の発現の異なるコザック配列の組を用いて作成された真核配列を含むことができる。

【0301】

幾つかの態様では、本開示は、有機体のゲノムにわたり関心のある配列内に1つ又は複数のクラスの編集を含む合理的に設計された編集を有する細胞を含む細胞ライブラリを提供する。特定の態様では、本開示は、ゲノムのサブセットにわたり関心のある配列に1つ又は複数のクラスの編集を含む合理的に設計された編集を有する細胞を含む細胞ライブラリを提供する。例えば、細胞ライブラリは、エクソーム、例えばゲノムのあらゆる又は大半のオープン読み枠にわたり関心のある配列に1つ又は複数のクラスの編集を含む合理的に設計された編集を有する細胞を含み得る。例えば、細胞ライブラリは、カイノームにわたり関心のある配列に1つ又は複数のクラスの編集を含む合理的に設計された編集を有する細胞を含み得る。更に別の例では、細胞ライブラリは、セクレトームにわたり関心のある配列に1つ又は複数のクラスの編集を含む合理的に設計された編集を有する細胞を含み得る。更に別の態様では、細胞ライブラリは、エクソーム内でコードされたタンパク質の種々のアイソフォームを解析するために作成された合理的に設計された編集を有する細胞を含み得、細胞ライブラリは、例えば、トランスクリプトーム解析で1つ又は複数の特定のアイソフォームの発現を制御するように設計することができる。

10

【0302】

重要なことに、特定の態様では、細胞ライブラリは、ランダム化配列、例えばランダム化プロモータ配列を用いて、ライブラリ内の個々の細胞内の1つ又は複数のタンパク質の発現間の類似性を低減する編集を含み得る。更に、細胞ライブラリ内のプロモータは、強力及び/又は滴定可能な発現を可能にするように構成、誘導又は両方であり得る。

20

【0303】

他の態様では、本開示は、選択された遺伝子標的の最適な発現を識別する編集を含む細胞のライブラリを作成する自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器を提供する。例えば、代謝工学を通じた生化学物質の製造では、多くの場合、経路酵素の発現が必要であり、細胞内の最高量の標的経路酵素により最良の製造歩留まりが常に達成されるわけではなく、むしろ、最良の製造歩留まりは、個々の酵素及び関連する調節タンパク質及び/又は経路の発現レベルの微調整により達成される。同様に、異種タンパク質の発現レベルも最適な歩留まりに向けて実験的に調整されることもあり得る。

30

【0304】

転写が遺伝子発現レベルに影響を与える最も明白な方法は、Pol II開始の速度によるものであり、これは、プロモータ又はエンハンサーの強度と、トランス活性化因子との組合せにより変調することができる(カドナガ(Kadonaga)ら著、セル(Cell)、第116(2)巻、p. 247~57、(2004年))。真核生物では、伸長率も、オルタナティブスプライシングに影響することにより遺伝子発現パターンを決め得る(クラマー(Cramer)ら著、米国科学アカデミー紀要(PNAS USA)、第94(21)巻、p. 11456~60、(1997年))。遺伝子での終結失敗は、Pol IIへのプロモータのアクセス可能性を低減することにより、下流遺伝子の発現を損ない得る(グレガー(Greger)ら著、2000年米国科学アカデミー紀要(2000 PNAS USA)、第97(15)巻、p. 8415~20、(2000年))。このプロセスは、転写干渉として知られ、下等真核生物において特に関連し、その理由は、下等真核生物が密集した遺伝子を有することが多いためである。

40

【0305】

幾つかの実施形態では、本開示は、細胞遺伝子転写を最適化する方法を提供する。遺伝子転写は、転写開始(RNAp動員及び転写複合体形成)、伸長(鎖合成/拡張)並びに転写終結(RNAp脱離及び終結)を含めた幾つかの別個の生物学的現象の結果である。部位特異的突然変異誘発

50

細胞ライブラリは、部位特異的突然変異誘発を利用する自動編集方法、モジュール、機器及びシステムを用いて、すなわちタンパク質又はゲノム特徴を意図的且つ精密に突然変異させることによりタンパク質又は他のゲノム特徴のアミノ酸配列を変更し得る場合に作成することができる。これらの細胞株は、種々の目的で、例えば細胞内のタンパク質機能の特定、細胞内の酵素活性部位の識別及び新規タンパク質の設計に有用であり得る。例えば、部位特異的突然変異誘発は、多重化様式で用いて、タンパク質配列内の1つのアミノ酸を異なる化学特性を有する別のアミノ酸と交換することができる。これにより、細胞集団内の個々の細胞における合理的に設計又はランダムに生成された突然変異の効果を特定することができる。例えば、バーグ(Berg)ら著、バイオケミストリー(Biochemistry)、第6版、(ニューヨーク(New York): W. H. フリーマンアンドカンパニー(W. H. Freeman and Company))(2007年)を参照されたい。

10

【0306】

別の例では、編集は、細胞ライブラリ内の個々の細胞に対して行い、タンパク質複合体内で相互作用するためのタンパク質結合部位における1つ又は複数のアミノ酸の置換又は補助因子若しくはリガンドを収容することができる酵素ポケットにおける1つ又は複数のアミノ酸の置換等、結合部位におけるアミノ酸を置換することができる。このクラスの編集は、タンパク質複合体内の他の補助因子、リガンド等との相互作用を含め、1つ又は複数のタンパク質の特定の特性を測定する、タンパク質への特定の操作の作成を可能にする。

20

【0307】

更に別の例では、発現定量的形質遺伝子座(eQTL: expression quantitative trait loci)を研究する部位特異的突然変異誘発を用いて細胞ライブラリ内の個々の細胞に対して種々の編集タイプを作成することができる。eQTLは、遺伝子発現表現型の遺伝的分散の割合を説明する遺伝子座である。本発明のライブラリは、eQTLを評価し、eQTLを実際の病的状態にリンクするのに有用である。

【0308】

特定の態様では、本開示の細胞ライブラリに導入される編集は、タンパク質の既知又は予測される構造に基づく合理的な設計を用いて作成され得る。例えば、クロノプロスEG(Chronopoulou EG)及びラブロー(Labrou)著、カレントプロトコールインプロテインサイエンス(Curr Protoc Protein Sci.)、第26章、ユニット26.6、(2011年)を参照されたい。そのような部位特異的突然変異誘発は、ライブラリ内の細胞集団内の個々の細胞に1つ又は複数の部位特異的編集、好適には2つ以上の部位特異的編集(例えば、結合編集)を提供することができる。

30

【0309】

他の態様では、本開示の細胞ライブラリは、遺伝子のコード領域内のコドンの全て又は略全ての部位特異的コドン突然変異「スキャン」を用いて作成される。このようにして、遺伝子の1つ又は複数のコドンにおける特定の多型に基づいて、機能喪失又は機能獲得について特定のコドンの個々の編集を調べることができる。これらのライブラリは、細胞又は細胞集団内の特定の表現型のどの遺伝的変更が沈黙又は原因であるかの特定に強力なツールであり得る。コドンの編集は、ランダムに生成され得るか、又は解析する遺伝子において識別されている既知の多型及び/又は突然変異に基づいて合理的に設計され得る。更に、これらの技法を細胞内の経路内の1つにおける2つ以上の遺伝子に対して用いることで、潜在的なタンパク質:タンパク質相互作用又は細胞の機能若しくは経路における重複を特定し得る。

40

【0310】

例えば、アラニンスキャンを用いて、所与のタンパク質の安定性又は機能への特定の残基の寄与を特定することができる。例えば、ルフェーブル(Lefevre)ら著、ヌク

50

レイックアシヅリサーチ (Nucleic Acids Research)、第25 (2) 巻、p. 447~448、(1997年)を参照されたい。アラニンは、他のアミノ酸の多くが保有する二次構造プリファレンス (preference) を模倣することができる、嵩張らず、化学的に不活性なメチル官能基であるため、このコドン走査技法で用いられることが多い。コドン走査は、特定の残基の側鎖が細胞の機能及び/又は活性における有意な役割を果たすか否かの特定に使用することもできる。ときに、突然変異した残基のサイズの保存が必要である場合、コドン走査細胞ライブラリの作成にバリン又はロイシン等の他のアミノ酸を使用することができる。

【0311】

他の特定の態様では、本発明の自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて、酵素又はホルモン等のタンパク質の活性部位を特定し、細胞ライブラリ内でのこれらのタンパク質の1つ又は複数の動作のメカニズムを明らかにする細胞ライブラリを作成することができる。分子モデリング研究に関連付けられた部位特異的突然変異誘発を用いて、酵素の活性部位構造、したがってその動作のメカニズムを解明することができる。これらの細胞ライブラリの解析は、タンパク質の活性部位における特定のアミノ酸残基により及ぼされる役割、タンパク質複合体のサブユニット間の接触、種々の遺伝的背景での細胞内トラフィック及びタンパク質安定性/半減期についての理解を提供することができる。

飽和突然変異誘発

幾つかの態様では、本開示の自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて作成された細胞ライブラリは、1つのコドン又はコドンの組がランダム化されて、関心のある特定の1つ又は複数の遺伝子の位置において可能な全てのアミノ酸を生成する飽和突然変異誘発ライブラリであり得る。これらの細胞ライブラリは、バリエーションの生成、例えば定方向進化に特に有用であり得る。例えば、チカ (Chica) ら著、カレントオピニオンインバイオテクノロジー (Current Opinion in Biotechnology)、第16 (4) 巻、p. 378~384、(2005年); 及びシバンジ (Shivange)、カレントオピニオンインケミカルバイオロジー (Current Opinion in Chemical Biology)、第13 (1) 巻、p. 19~25を参照されたい。

【0312】

幾つかの態様では、異なる縮重コドンを含む編集は、ライブラリ内の個々の細胞内の複数の組のアミノ酸のコードに用いることができる。アミノ酸によっては、他のアミノ酸よりも多くのコドンによりコードされるものがあるため、アミノ酸の厳密な比率は、同じであることができない。特定の態様では、より制限された縮重コドンが用いられる。「NNK」及び「NNS」は、20個全てのアミノ酸をコードするという利点があるが、それでもなお3%の確率で停止コドンをコードする。「NDT」、「DBK」等の代替のコドンは、停止コドンを全体的に回避し、主要な全ての生物物理学的タイプ (アニオン、カチオン、脂肪族疎水性、芳香族疎水性、親水性、小型) をなお含む最小の組のアミノ酸をコードする。

【0313】

特定の態様では、特定の有機体に最も一般的に用いられるコドンが飽和突然変異誘発編集プロセスで用いられる非重複飽和突然変異誘発である。

プロモータスワップ及びラダー

関心のある1つ又は複数の遺伝子の発現を解析及び/又は最適化する一メカニズムは、細胞が、関心のある1つ又は複数の遺伝子に連結された特定のプロモータを有する遺伝的編集を含む「プロモータスワップ」細胞ライブラリの作成によるものである。したがって、本開示の方法、自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて作成される細胞ライブラリは、プロモータスワップ細胞ライブラリであり得、例えば代謝経路又は遺伝経路を最適化するように関心のある遺伝子の発現を増減させるのに用いることができる。幾つかの態様では、プロモータスワップ細胞ライブラリは、細胞の生命力又は生存能力に影響を及ぼす

10

20

30

40

50

遺伝子、例えば細胞の成長速度又は全体的な健康に影響するタンパク質をコードする遺伝子の発現の増減を識別するのに用いることができる。幾つかの態様では、プロモータスワップ細胞ライブラリは、プロモータ間に依存性及び論理を有する細胞を作成して、合成遺伝子ネットワークを作成するのに用いることができる。幾つかの態様では、プロモータスワップは、同種の性質の集団及び異種の性質（複合組織）の集団の両方の細胞間の細胞間伝達を制御するのに用いることができる。

【0314】

細胞ライブラリは、ある範囲の発現強度の発揮及び任意の所与の数の標的遺伝子に基づいて一緒に群化された任意の所与の数のプロモータを利用することができる。プロモータ配列のラダーは、少なくとも1つの条件下で少なくとも1つの遺伝子座の発現を変える。次に、このラダーは、本開示の自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて有機体内の遺伝子群に系統的に適用される。

10

【0315】

特定の態様では、本開示の自動編集プロセス、モジュール及びシステムを用いて形成される細胞ライブラリは、他の場合には同一の遺伝的背景において関心のある1つ又は複数の標的遺伝子に操作可能に連結された所与のプロモータを表す個々の細胞を含む。自動システムを利用するように変更することができる非自動編集戦略の例は、例えば、米国特許第9,988,624号明細書に見出すことができる。

【0316】

特定の態様では、プロモータスワップ細胞ライブラリは、関心のある遺伝子の発現の「プロモータラダー」として機能する予め選択されたプロモータの組に操作可能に連結されるように標的遺伝子の組を編集することにより生成される。例えば、細胞は、関心のある1つ又は複数の個々の遺伝子がプロモータラダー内の異なるプロモータに操作可能に連結されるよう編集されるように編集される。内因性プロモータが存在しない場合、その配列は、未知であるか、又は何らかの様式で前に変更されており、プロモータラダーの個々のプロモータは、関心のある遺伝子の前に挿入することができる。生成されたこれらの細胞ライブラリは、他の場合には同一の遺伝状況にある1つ又は複数の標的遺伝子に操作可能に連結されたラダーの個々のプロモータを有する個々の細胞を有する。

20

【0317】

プロモータは、一般に、異なる遺伝子座にわたり可変発現が生じるように選択され、誘導プロモータ、構成プロモータ又は両方を含み得る。

30

プロモータラダーを用いて編集された標的遺伝子の組は、ゲノム内の全て若しくは多くのオープン読み枠（ORF：open reading frame）又はゲノムの選択されたサブセット、例えばカイノーム若しくはセクレトームのORFを含むことができる。幾つかの態様では、標的遺伝子は、遺伝子の種々のアイソフォームのコード領域を含むことができ、細胞ライブラリは、1つ又は複数の特定のアイソフォームの発現に向けて、例えば種々のプロモータを用いたトランスクリプトーム解析に向けて設計することができる。

【0318】

標的遺伝子の組は、特定の細胞経路、例えば調節経路又はシグナリング経路に関わることが既知又は疑われる遺伝子でもあり得る。標的遺伝子の組は、以前に実証された有利な編集（前のプロモータスワップ若しくは前のSNPスワップ）への関連により、以前に生成された編集間のエピスタティック相互作用に基づくアルゴリズム的選択により、標的化に有利なORFに関する仮説に基づく他の選択基準により又はランダム選択を通して、機能に関連するORFであり得る。特定の実施形態では、標的遺伝子は、非コードRNAを含む非タンパク質コード遺伝子を含むことができる。

40

【0319】

インスレータエレメント及び他のゲノム編成エレメントを含めた他の機能的遺伝エレメントの編集は、標的遺伝子の組の発現レベルを系統的に変えるのに用いることもでき、本開示の方法、自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて導入することができる。一態様

50

では、細胞の集団は、エンハンサー配列のラダーを単独で又は選択されたプロモータ若しくはプロモータラダーと組み合わせて用いて編集されて、これらのエンハンサーエレメントに種々の編集を有する細胞ライブラリを作成する。別の態様では、細胞の集団は、リボゾーム結合配列のラダーを単独で又は選択されたプロモータ若しくはプロモータラダーと組み合わせて用いて編集されて、これらのリボゾーム結合配列に種々の編集を有する細胞ライブラリを作成する。

【0320】

別の態様では、細胞の集団は、転写産物又はタンパク質の5'若しくは3'末端に又は任意の他のロケーションにおいて、配列を安定化又は不安定化する種々のmRNA及び/又はタンパク質を結合できるように編集される。

10

【0321】

特定の態様では、以前に確立された細胞株の細胞の集団は、本開示の自動編集方法、モジュール、機器及びシステムを用いて編集されて、細胞ライブラリを作成し、細胞の機能、健康及び/又は生存能力を改善し得る。例えば、大規模製造に現在用いられている多くの工業菌株は、ときに数十年という多年の期間にわたり、ランダム突然変異誘発プロセスを繰り返し用いて開発されてきた。不要な中立及び障害突然変異が有利な変更と共に菌株に導入され、時間の経過に伴い、全体のロバスト性及び成長速度等の主要特性に欠陥を有する菌株になった。別の例では、哺乳動物細胞株は、時間期間にわたる細胞の通過を通して突然変異し続け、同様に、これらの細胞株は、不安定になり、望ましくない特性を取得する恐れがある。本開示の自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器は、SNP及び/又はSTRスワップ、インデル作成又は他の技法等の編集戦略を用いて、望ましくないゲノム配列を除去又は変更し、且つ/又は細胞の望ましい特性を保持しながら、欠陥に対処する新しいゲノム配列を導入することができる。

20

【0322】

再帰的編集が用いられる場合、編集細胞ライブラリ内の個々の細胞における編集は、ゲノムにおける異所(例えば、CAR T遺伝子座)での「ランディングパッド」の包含を組み込み、発現、安定性及び/又は制御を最適化することができる。

【0323】

幾つかの実施形態では、1つ又は複数の編集(導入又は除去)を含む個々の細胞を有する、生成された各ライブラリは、1つ又は複数の基準(例えば、関心のある化学製品の生成)下で培養し解析される。次に、特定の基準を保有する細胞に、細胞内の1つ又は複数の特定の編集が関連付けられるか又は相関付けられる。このようにして、関心のある任意の数の遺伝的特性又は表現型特性への所与の編集の効果を特定することができる。特定の基準又は機能性/ロバスト性の強化が関連付けられた複数の編集の識別は、高度に望ましい特性を有する細胞に繋がり得る。

30

ノックアウト又はノックインライブラリ

特定の態様では、本開示は、関心のある種々の遺伝子の「ノックアウト」(KO: knock-out)又は「ノックイン」(KI: knock-in)編集を有する細胞のライブラリを作成する自動編集方法、モジュール、機器及びシステムを提供する。したがって、本開示は、関心のある選択された遺伝子の発現を除去又は低減する1つ又は複数の突然変異を有し、細胞ライブラリ内の個々の細胞での遺伝子機能へのこれらの編集の効果を調べる、本開示の自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器により作成された編集細胞ライブラリの包含を意図する。

40

【0324】

細胞ライブラリは、標的化遺伝子KO(例えば、挿入/削除を介する)又はKO(例えば、相同特異的修復を介する)を用いて作成することができる。例えば、2本鎖切断は、多くの場合、非相同末端結合DNA修復経路を介して修復される。修復は、エラーが生じやすいことが知られており、したがって遺伝子機能を妨げる恐れがある挿入及び削除が導入されることがある。好適には、編集は、関心のある遺伝子に特に影響を及ぼすように合理的に設計され、関心のある1つ又は複数の遺伝子座にKI又はKIを有する個々の細胞

50

を作成することができる。関心のある2つ以上の遺伝子座のKO又はKIを有する細胞は、本開示の自動再帰的編集を用いて作成することができる。

【0325】

特定の態様では、KO又はKI細胞ライブラリは、細胞集団内の細胞の同時多重化編集を用いて作成され、細胞集団内の複数の細胞は、編集の1つのラウンドで編集され、すなわち、細胞ライブラリの細胞内の複数の変更は、1つの自動動作におけるものである。他の特定の態様では、細胞ライブラリは、細胞集団内の個々の細胞の再帰的編集を用いて作成され、ゲノムの2つ以上の部位の複数の編集を1つの細胞に融合する。

SNP又は縦列型反復配列スワップ

一態様では、細胞ライブラリは、シングルヌクレオチド多型(「SNP」)を個々の細胞のゲノムに系統的に導入又は置換して、「SNPスワップ」細胞ライブラリを作成することにより、本開示の自動編集方法、自動マルチモジュール細胞編集機器を用いて作成される。幾つかの実施形態では、本開示のSNPスワップ方法は、有利なSNPの追加及び有害及び/又は中立SNPの除去の両方を含む。SNPスワップは、コード配列、非コード配列又は両方を標的化し得る。

10

【0326】

別の態様では、細胞ライブラリは、縦列型反復配列(「STR」)を個々の細胞のゲノムに系統的に導入又は置換して、「STRスワップ」細胞ライブラリを作成することにより、本開示の自動編集方法、モジュール、機器及びシステムを用いて作成される。幾つかの実施形態では、本開示のSTRスワップ方法は、有利なSTRの追加及び有害及び/又は中立STRの除去の両方を含む。STRスワップは、コード配列、非コード配列又は両方を標的化し得る。

20

【0327】

幾つかの実施形態では、細胞ライブラリの作成に用いられるSNP及び/又はSTRスワップは、多重化され、細胞集団内の複数の細胞は、編集の1つのラウンドで編集され、すなわち、細胞ライブラリの細胞内の複数の変更は、1つの自動動作におけるものである。他の実施形態では、細胞ライブラリの作成に用いられるSNP及び/又はSTRスワップは、再帰的であり、複数の有利な配列及び/又は有害な配列の除去を1つの細胞に融合させる。複数の変更は、特定の組の定義された変更でもあり得るか、又は突然変異の部分的にランダム化された結合ライブラリでもあり得る。有害な突然変異の除去及び有利な突然変異の統合は、種々の細胞プロセスにおける即時改善を提供することができる。遺伝的荷重の除去又は遺伝的荷重のない菌株への有利な変更の統合は、更なる改善を可能にし得る追加のランダム突然変異誘発の新しくロバストな開始点も提供する。

30

【0328】

SNPスワップは、ランダム手法ではなく、むしろ細胞にわたる個々の突然変異の系統的な導入又は除去であるため、ランダム突然変異誘発手法の基本的な制限を解消する。

スプライス部位編集

RNAスプライシングは、イントロンが切除され、エクソンと一緒にスプライスされて、タンパク質に翻訳されるmRNAを作成するプロセスである。細胞機構によるスプライシングシグナルの精密な認識は、このプロセスにとって極めて重要である。したがって、幾つかの態様では、細胞の集団は、種々の遺伝子座における既知及び/又は予測されたスプライスドナー及び/又はアクセプターへの系統的編集を用いて編集されて、種々の遺伝子のスプライス部位バリエーションのライブラリを作成する。そのような編集は、細胞状況における遺伝子の種々のアイソフォームの生物学的関連を明らかにするのに役立つことができる。種々の哺乳動物疾患に関連付けられた実際又は予測された突然変異を含めた種々のコード領域のスプライス部位の合理的な設計の配列は、ナッラ(Nalla)及びローガン(Rogan)著、ヒューマンミュテーション(Hum Mutat)、第25巻、p. 334~342、(2005年); ディヴィーナ(Divina)ら著、ヨーロッパジャーナルオブヒューマンジェネティクス(Eur J Hum Genet)、第17巻、p. 759~765、(2009年); デスメ(Desmet)ら著、ヌクレイッ

40

50

クアシズリサーチ (Nucleic Acids Res)、第37巻、p. e67、(2009年); ファーバ (Faber) ら著、BMC バイオインフォマティクス (BMC Bioinformatics)、第12巻 (付録4): S2、(2011年) に見られる等の解析技法を用いて予想することができる。

開始/停止コドン交換及び核酸類似体の組み込み

幾つかの態様では、本開示は、ライブラリが、有機体のゲノム全体を通して又はゲノム内のコード領域の選択されたサブセット、例えばカイノーム又はセクレトームの開始及び停止コドンバリエーションのスイッチにより作成される、本開示の自動編集方法、モジュール、機器及びシステムを用いた細胞ライブラリの作成を提供する。細胞ライブラリでは、個々の細胞は、関心のある1つ又は複数の遺伝子の元々の開始又は停止コドンを置換する1つ又は複数の開始又は停止コドンを有する。

10

【0329】

例えば、真核生物により使用される典型的な開始コドンはATG (AUG) であり、原核生物は、ATG (AUG) を最も使い、その後GTG (GUG) 及びTTG (UUG) が続く。細胞ライブラリは、関心のある1つ又は複数の遺伝子の元々の開始コドンへの置換を有する個々の細胞を含み得る。

【0330】

幾つかの態様では、本開示は、関心のある選択された遺伝子の前においてATG開始コドンをTTGで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、ATG開始コドンをGTGで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、GTG開始コドンをATGで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、GTG開始コドンをTTGで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、TTG開始コドンをATGで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、TTG開始コドンをGTGで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。

20

【0331】

他の例では、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) 及び哺乳動物に典型的な停止コドンは、それぞれTAA (UAA) 及びTGA (UGA) である。単子葉植物に典型的な停止コドンは、TGA (UGA) である一方、昆虫及び大腸菌 (*E. coli*) は、一般に、停止コドンとしてTAA (UAA) を用いる (ダルフィン (Dalphin) ら著、ヌクレックアシズリサーチ (Nucl. Acids Res.)、第24巻、p. 216~218、(1996年))。細胞ライブラリは、関心のある1つ又は複数の遺伝子の元々の停止コドンの置換を有する個々の細胞を含み得る。

30

【0332】

幾つかの態様では、本開示は、TAA停止コドンをTAGで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、TAA停止コドンをTGAで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、TGA停止コドンをTAAで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、TGA停止コドンをTAGで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、TAG停止コドンをTAAで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を提供する。他の態様では、本開示は、TAG停止コドンをTGAで置換することによる細胞ライブラリの自動作成を教示する。

40

ターミネータスワップ及びラダー

関心のある1つ又は複数の遺伝子の予めスプライスされたmRNAの最適な終結を識別する一メカニズムは、細胞が、関心のある1つ又は複数の遺伝子に連結された特定のターミネータ配列を有する遺伝的編集を含む「ターミネータスワップ」細胞ライブラリの作成によるものである。したがって、本開示の方法、モジュール、機器及びシステムを用いて作成された細胞ライブラリは、ターミネータスワップ細胞ライブラリであり得、ターミネータスワップ細胞ライブラリは、例えば、合成部位から転写産物を解放することによりm

50

RNA安定性に影響を及ぼすために用いることができる。他の実施形態では、ターミネータスワップ細胞ライブラリは、転写終結の効率の増減、したがって非スプライスプレmRNAの蓄積（例えば、ウェスト（West）及びプライドフット（Proudfoot）著、モレキュラーセル（Mol Cell.）、第33（3～9）巻、p. 354～364、（2009年））及び/又は3'末端処理を識別するのに用いることができる（例えば、ウェスト（West）ら著、モレキュラーセル（Mol Cell.）、第29（5）巻、p. 600～10、（2008年））。遺伝子が複数の終結部位に連結される場合、編集は、遺伝子に関連付けられた複数のターミネータへの編集の組合せを編集し得る。追加のアミノ酸をタンパク質の末尾に追加して、ターミネータ上のタンパク質長に効果を特定することもできる。

10

【0333】

細胞ライブラリは、ある範囲の活性の発揮及び任意の所与の数の標的遺伝子に基づいてターミネータラダーに選択されたターミネータの任意の所与の数のターミネータ編集を利用することができる。ターミネータ配列のラダーは、少なくとも1つの条件下で少なくとも1つの遺伝子座の発現を変える。次に、このラダーは、本開示の自動編集方法、機器及びシステムを用いて有機体内の遺伝子群に系統的に適用される。

【0334】

幾つかの態様では、本開示は、ライブラリの個々の細胞内のゲノムの1つ又は複数の領域におけるターミネータシグナルを編集するライブラリが作成される、本開示の自動編集方法、モジュール、機器及びシステムを用いた細胞ライブラリの作成を提供する。真核生物での転写終結は、RNAポリメラーゼIIに関連付けられたタンパク質因子により認識されるターミネータシグナルを通して機能する。例えば、細胞ライブラリは、ポリアデニル化特異性因子（CPSF）及び切断刺激因子（CstF）をコードする遺伝子及び/又は部位を終結するためにCPSF及びCstF因子により動員されるタンパク質をコードする遺伝子において編集を有する個々の真核細胞を含み得る。原核生物では、非依存性終結及び依存性終結と呼ばれる2つの主要メカニズムが転写終結を媒介する。例えば、細胞ライブラリは、これらの終結経路の結合、効率及び/又は活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする遺伝子に編集を有する個々の原核細胞を含み得る。

20

【0335】

特定の態様では、本開示は、最適な特性を有する終結配列（「ターミネータ」）を選択する方法を提供する。例えば、幾つかの実施形態では、本開示は、1つ又は複数のターミネータを導入及び/又は編集し、且つ/又は宿主細胞内の1つ又は複数のターミネータの、ある範囲の活性を示すバリエーションを生成する方法を教示し、提供する。ターミネータの特定の組合せは、ターミネータラダーとして一緒に群化することができ、本開示の細胞ライブラリは、他の場合には同一の遺伝的背景において関心のある1つ又は複数の標的遺伝子に操作可能に連結されたターミネータを表す個々の細胞を含む。自動機器を利用するように変更することができる非自動編集戦略の例は、例えば、「HTPゲノム操作プラットフォームによる微生物株の改良（Microbial strain improvement by a HTP genomic engineering platform）」という名称のサーバ（Serber）らに付与された米国特許第9,988,624号明細書に見出すことができる。

30

40

【0336】

特定の態様では、ターミネータスワップ細胞ライブラリは、関心のある遺伝子の発現のために「ターミネータラダー」として機能する予め選択されたターミネータの組に操作可能に連結されるように標的遺伝子の組を編集することにより生成される。例えば、細胞は、内因性プロモータが関心のある個々の遺伝子に操作可能に連結されるように編集され、プロモータラダー内の異なるプロモータで編集される。内因性プロモータが存在しない場合、その配列が未知である場合又は何らかの様式で前に変更されていた場合、プロモータラダーの個々のプロモータは、関心のある遺伝子の前に挿入することができる。これらの生成された細胞ライブラリは、他の場合には同一の遺伝的背景において1つ又は複数の標

50

的遺伝子に操作可能に連結されたラダーの個々のプロモータを有する個々の細胞を有する。次に、問題となっているターミネータラダーは、関心のある所与の遺伝子に関連付けられる。

【0337】

ターミネータラダーは、ゲノム又はゲノムの選択されたサブセット内の全て若しくは大半のORF、例えばカイノーム又はセクレトームのORFの終結により一般的に影響を及ぼすのに用いることができる。標的遺伝子の組は、特定の細胞経路、例えば調節経路又はシグナリング経路に関わることが既知又は疑われる遺伝子でもあり得る。標的遺伝子の組は、以前に実証された有利な編集（前のプロモータスワップ若しくは前のSNPスワップ）への関連により、以前に生成された編集間のエピスタティック相互作用に基づくアルゴリズム的选择により、標的化に有利なORFに関する仮説に基づく他の選択基準により又はランダム選択を通して、機能に関連するORFであり得る。特定の実施形態では、標的遺伝子は、非コードRNAを含む非タンパク質コード遺伝子を含むことができる。

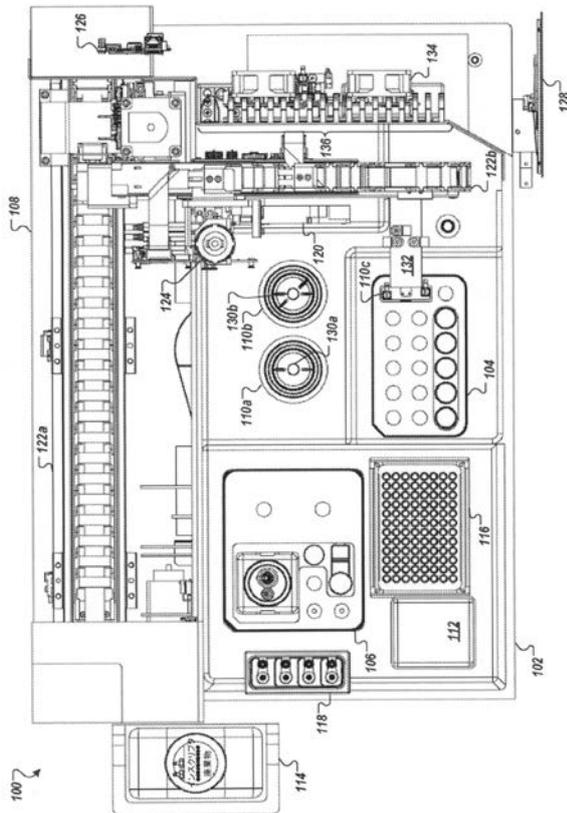
10

【0338】

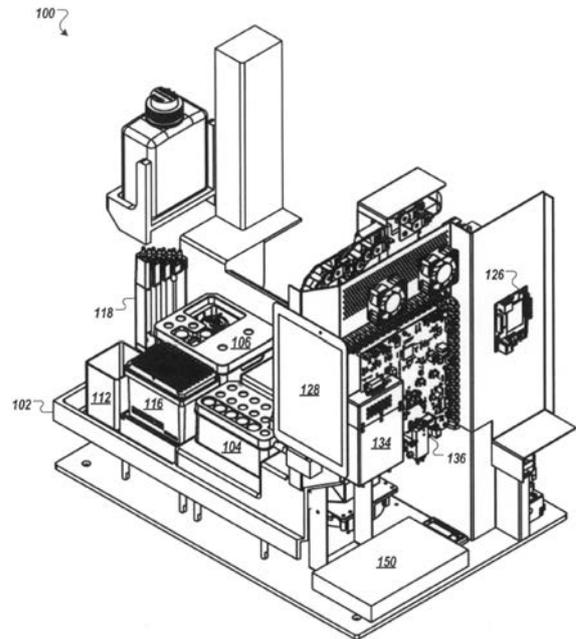
特定の実施形態について説明したが、これらの実施形態は、単なる例として提示され、本開示の範囲の限定を意図しない。実際に、本明細書に記載される新規の方法、装置、モジュール、機器及びシステムは、多様な他の形態で実施することが可能であり、更に、本開示の趣旨から逸脱せずに、本明細書に記載される方法、装置、モジュール、機器及びシステムの形態に対する種々の省略形態、置換形態及び変更形態がなされ得る。添付の特許請求の範囲及びそれらの均等物は、本開示の範囲及び趣旨内にあるそのような形態又は変更形態の包含を意図する。

20

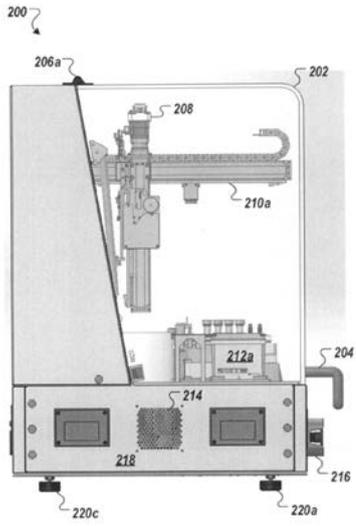
【図1A】



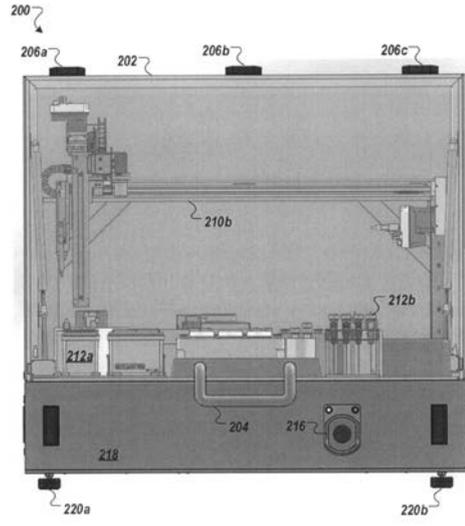
【図1B】



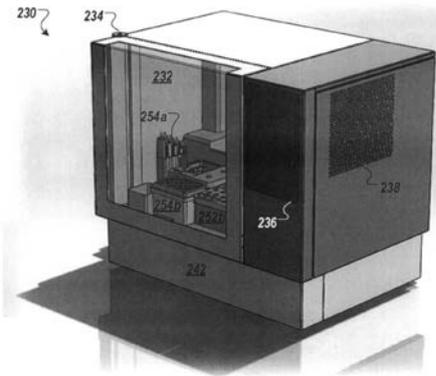
【 図 2 A 】



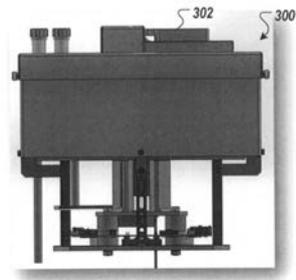
【 図 2 B 】



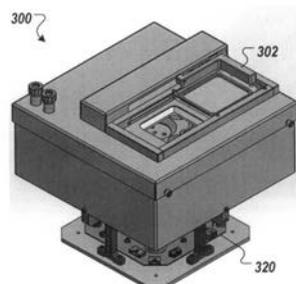
【 図 2 C 】



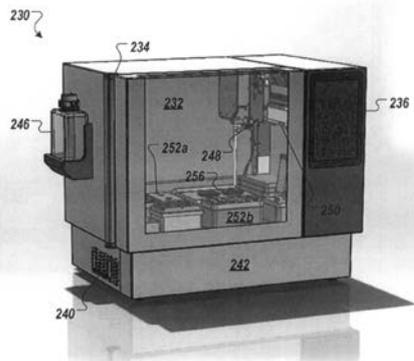
【 図 3 A 】



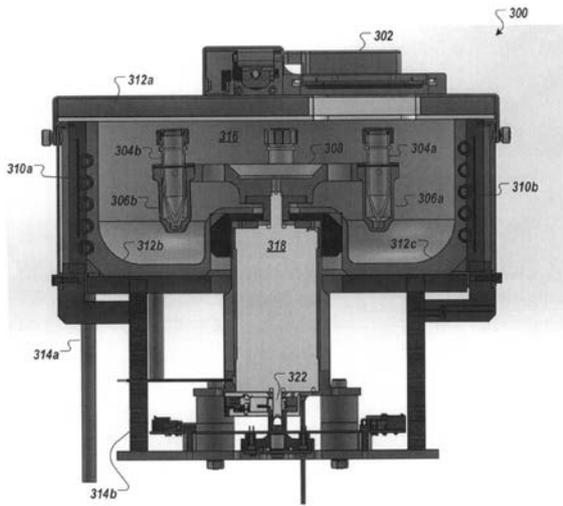
【 図 3 B 】



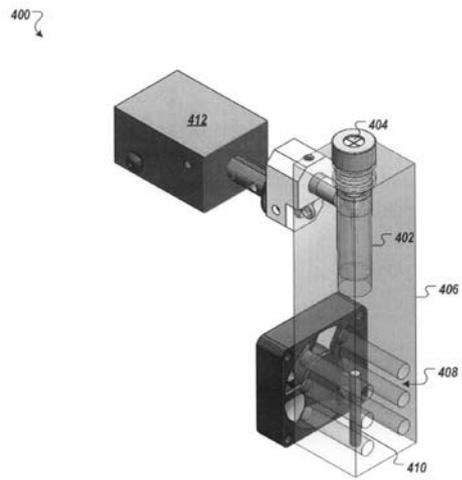
【 図 2 D 】



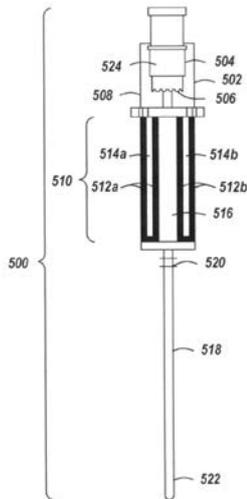
【 図 3 C 】



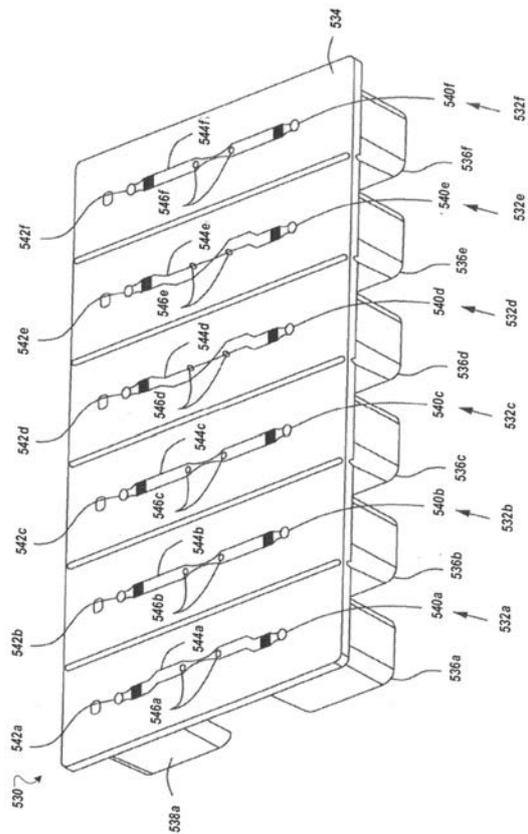
【 図 4 】



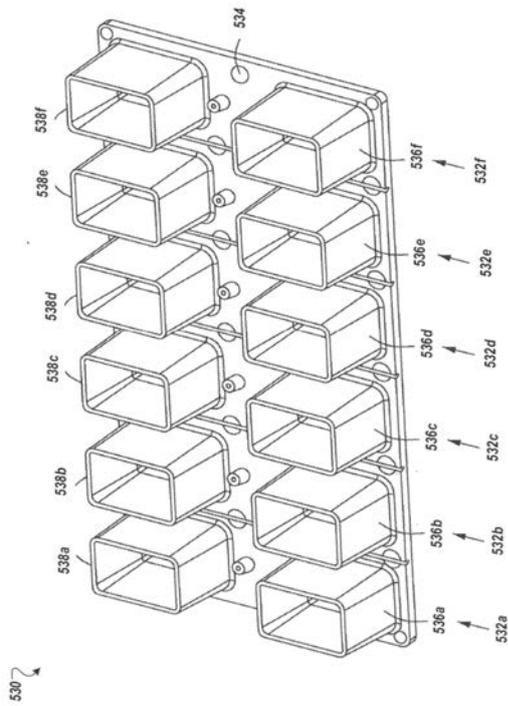
【 図 5 A 】



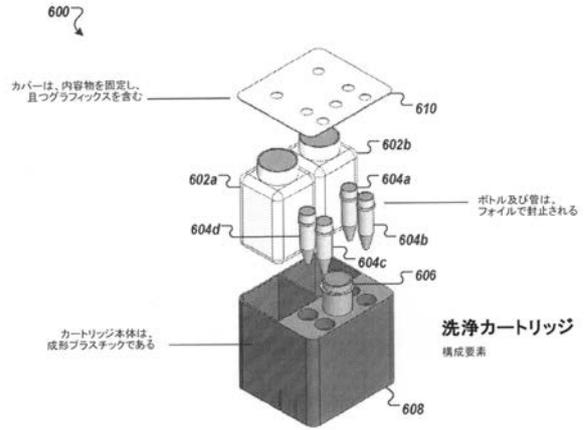
【 図 5 B 】



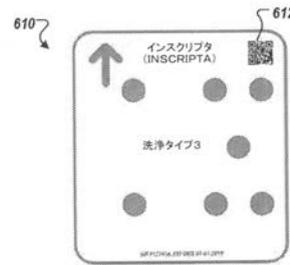
【図5C】



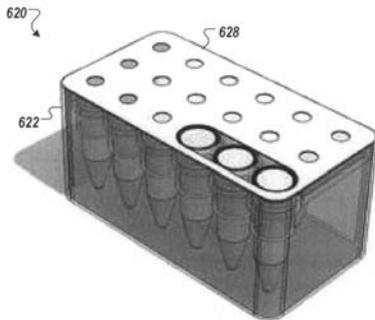
【図6A】



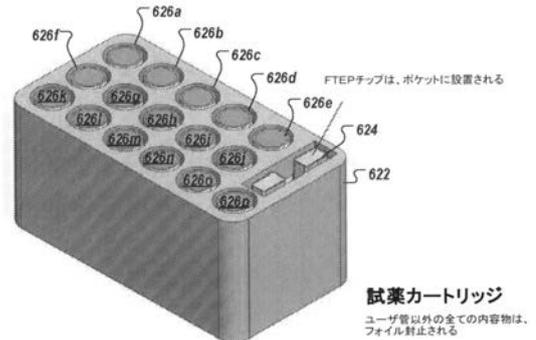
【図6B】



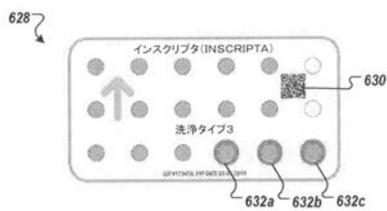
【図6C】



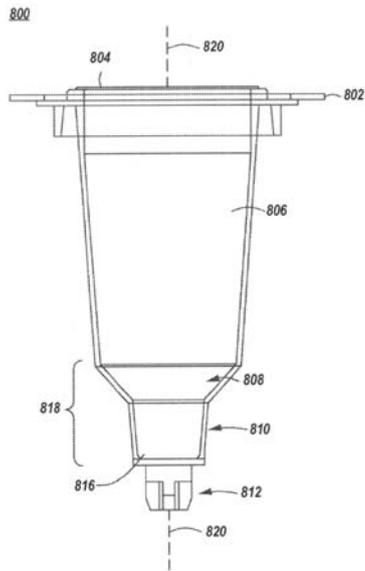
【図6E】



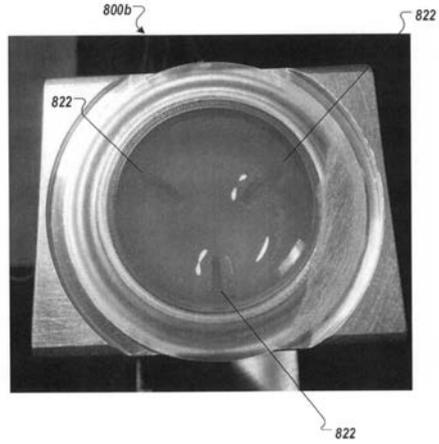
【図6D】



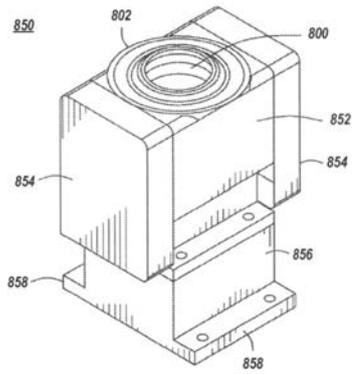
【 図 8 A 】



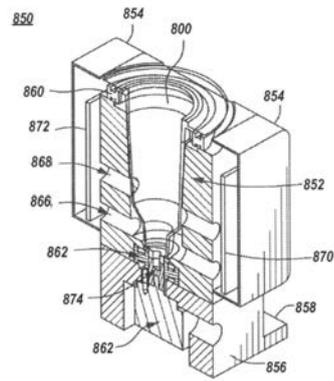
【 図 8 B 】



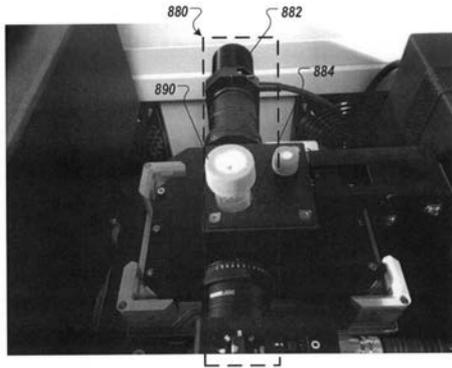
【 図 8 C 】



【 図 8 D 】



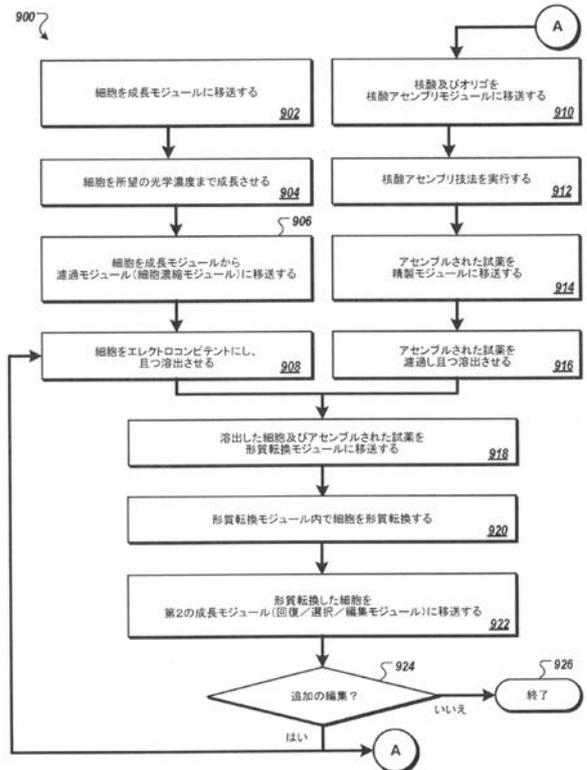
【図 8 E】



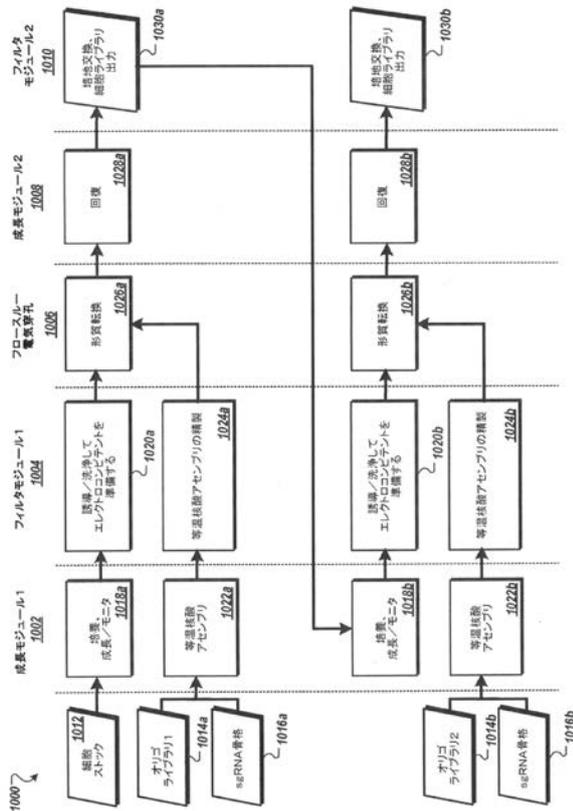
【図 8 F】



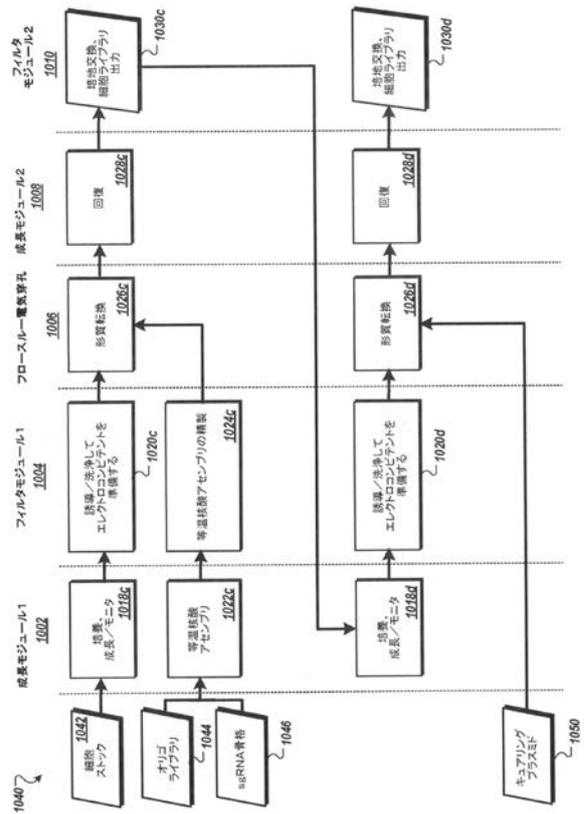
【図 9】



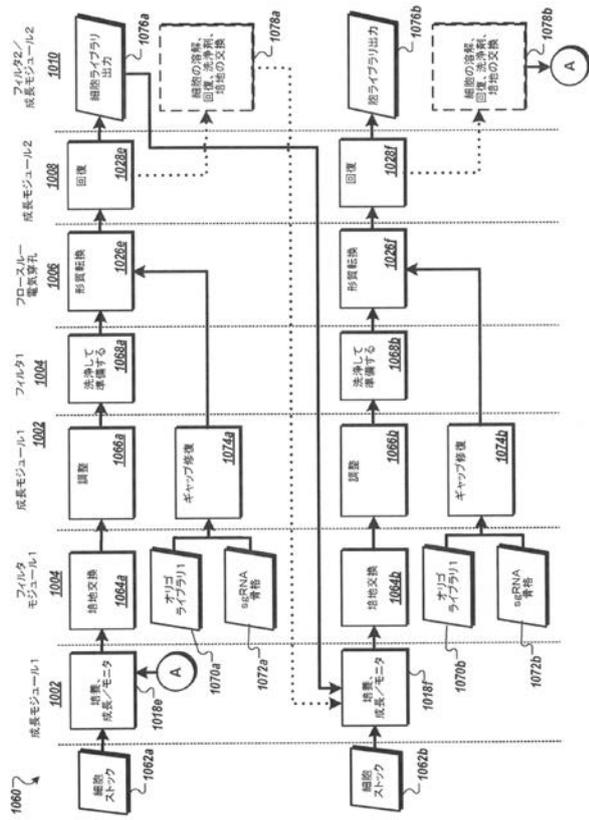
【図 10 A】



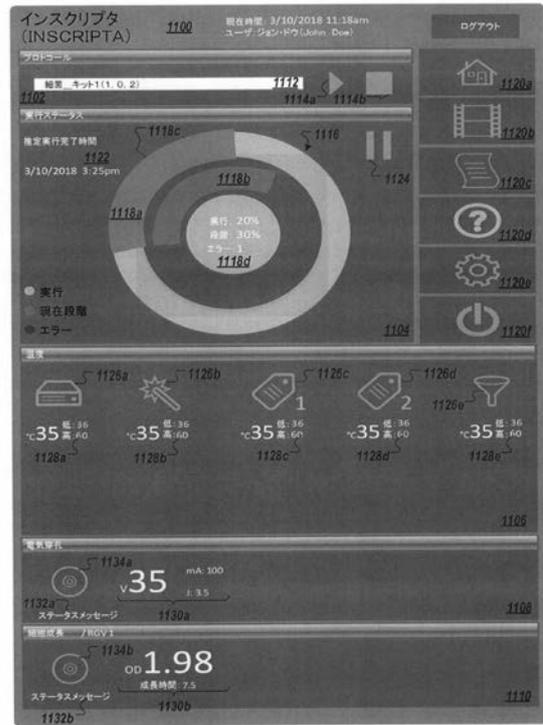
【図 10 B】



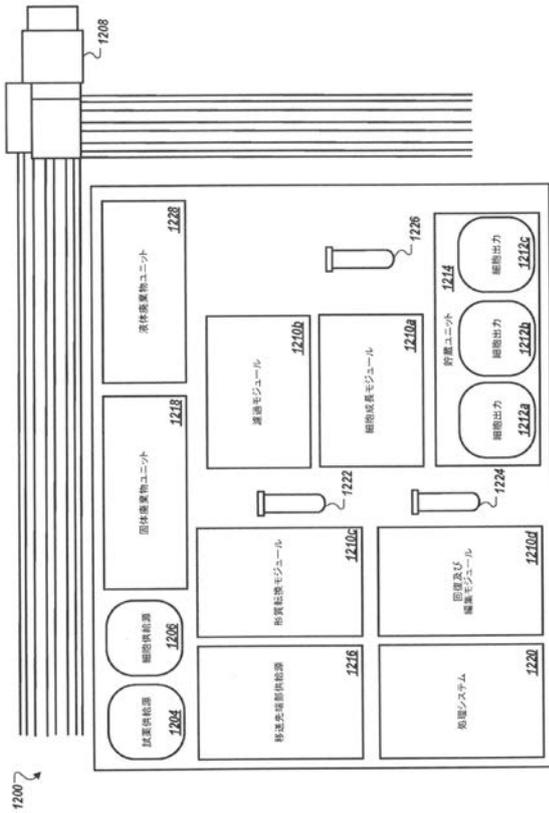
【図10C】



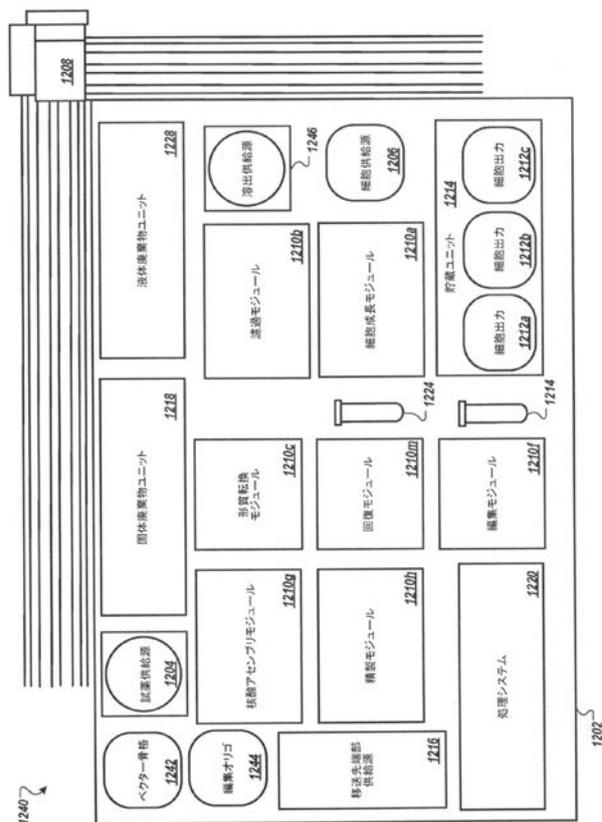
【図11】



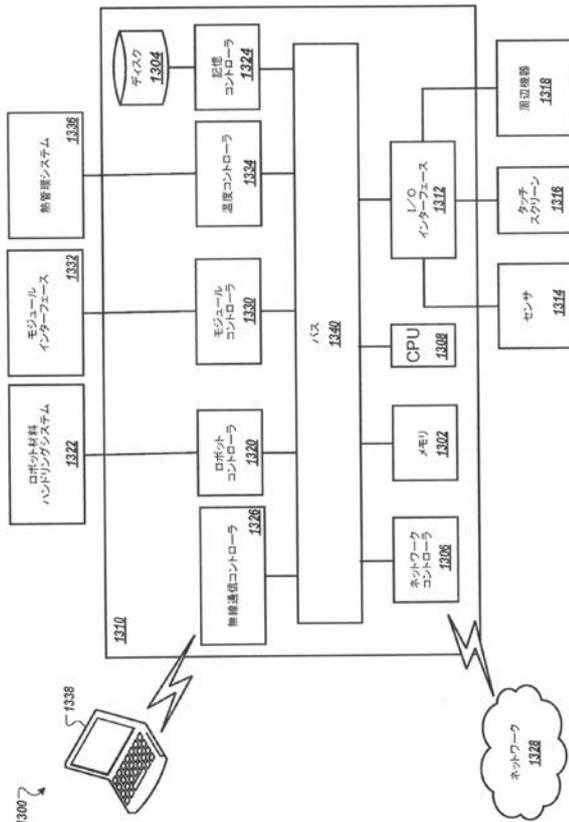
【図12A】



【図12B】



【図 13】



【手続補正書】

【提出日】平成30年11月26日(2018.11.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自動マルチモジュール細胞編集機器において、
 モジュールの幾つかの全てを収容する筐体と、
 細胞を受容するレセプタクルと、
 核酸を受容する1つ又は複数のレセプタクルと、
 前記核酸を前記細胞に導入する形質転換モジュールと、
 前記形質転換モジュールにおける細胞の形質転換後、前記細胞が回復することを可能にする回復モジュールと、
 前記導入された核酸が前記細胞内の核酸を編集することを可能にする、ヌクレアーゼ特異的編集モジュールと、
 ユーザ入力及び予めプログラムされたスクリプトの選択のうち少なくとも一方に基づいて、前記自動マルチモジュール細胞編集機器を動作させるプロセッサと、
成長モジュール、形質転換モジュール、又はヌクレアーゼ特異的編集モジュールのうち
1つから、前記成長モジュール、形質転換モジュール、又はヌクレアーゼ特異的編集モジュールのうち
のさらなる1つまでユーザの介入なしに液体を直接に移動させる、自動液体ハンドリングシステムと
 を備える、自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 2】

前記 1 つ又は複数のレセプタクル内の前記核酸は、骨格及び編集カセットを有し、及び前記自動マルチモジュール細胞編集機器は、核酸アセンブリモジュールを更に備える、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 3】

自動液体ハンドリングシステムはシッパー又はピペッターを備える、請求項 2 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 4】

前記核酸アセンブリモジュールは等温核酸アセンブリを実行するように構成される、請求項 2 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 5】

前記編集モジュール及び前記回復モジュールは単一のモジュールとして結合される、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 6】

前記細胞を成長させる成長モジュールを更に備える、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 7】

前記成長モジュールは前記成長する細胞の光学濃度を測定する、請求項 6 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 8】

前記成長モジュールは光学濃度を連続して測定する、請求項 7 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 9】

前記プロセッサは、前記細胞がユーザによって要求される時間に標的光学濃度に達するように、前記成長モジュール内の成長条件を調整するように構成される、請求項 6 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 10】

前記細胞を受容するレセプタクル及び前記核酸を受容する 1 つ又は複数のレセプタクルは、試薬カートリッジ内に収容される、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 11】

細胞編集に必要な幾つか又は全ての試薬は、前記試薬カートリッジ内に受容される、請求項 10 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 12】

前記試薬カートリッジ内に収容される前記試薬は、前記プロセッサによって読み出されるスクリプトによって位置特定可能である、請求項 11 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 13】

前記試薬カートリッジは試薬を含み、且つキットにおいて提供される、請求項 12 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 14】

前記形質転換モジュールは電気穿孔デバイスを含む、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 15】

前記電気穿孔デバイスはフロースルー電気穿孔デバイスである、請求項 14 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 16】

前記細胞を濃縮させ、且つ前記細胞をエレクトロコンピテントにさせるように構成された濾過モジュールを更に備える、請求項 1 に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項 17】

自動マルチモジュール細胞編集機器において、
モジュールの幾つか又は全てを収容する筐体と、
細胞を受容するレセプタクルと、
核酸を受容する少なくとも1つのレセプタクルと、
ベクター骨格及び編集カセットをアセンブルする核酸アセンブリモジュールであって、前記細胞内での所望のゲノム編集イベントを促進するために核酸を受容し、アセンブリを行う、核酸アセンブリモジュールと、
前記細胞を成長させる成長モジュールと、
アセンブルされた核酸を前記細胞に導入するためのエレクトロポレータを含む形質転換モジュールと、
前記アセンブルされた核酸が前記細胞内の核酸を編集することを可能にする、ヌクレアーゼ特異的編集モジュールと、
ユーザ入力及び予めプログラムされたスクリプトの選択のうちの少なくとも一方に基づいて、前記自動マルチモジュール細胞編集機器を動作させるプロセッサと、
核酸アセンブリモジュール、形質転換モジュール、又はヌクレアーゼ特異的編集モジュールのうちの1つから、前記核酸アセンブリモジュール、形質転換モジュール、又はヌクレアーゼ特異的編集モジュールのうちのさらなる1つまでユーザの介入なしに液体を直接に移動させる、自動液体ハンドリングシステムと
を備える、自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項18】

前記自動マルチモジュール細胞編集機器において細胞編集を実行するための試薬を収容する少なくとも1つの試薬カートリッジを更に備える、請求項17に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項19】

前記細胞及び前記核酸のための前記レセプタクルは、前記試薬カートリッジ内に配置される、請求項18に記載の自動マルチモジュール細胞編集機器。

【請求項20】

自動マルチモジュール細胞編集機器において、
モジュールの幾つか又は全てを収容する筐体と、
細胞を受容するレセプタクルと、
核酸を受容する少なくとも1つのレセプタクルと、
a) 骨格及び編集カセットをアセンブルし、且つ b) アセンブリ後、アセンブルされた核酸を脱塩する核酸アセンブリモジュールと、
前記細胞を成長させる成長モジュールと、
前記細胞を濃縮させ、且つ前記細胞をエレクトロコンピテントにさせる濾過モジュールと、
前記アセンブルされた核酸を前記細胞に導入するためのフロースルーエレクトロポレータを含む形質転換モジュールと、
前記形質転換モジュールにおける電気穿孔後、前記細胞が回復することを可能にし、且つ前記核酸が前記細胞を編集することを可能にする、回復及びヌクレアーゼ特異的編集結合モジュールと、
ユーザ入力に基づいて前記自動マルチモジュール細胞編集機器を動作させるプロセッサと、
成長モジュール、濾過モジュール、形質転換モジュール、又は回復及びヌクレアーゼ特異的編集結合モジュールのうちの1つから、前記成長モジュール、濾過モジュール、形質転換モジュール、又は回復及びヌクレアーゼ特異的編集結合モジュールのうちのさらなる1つまでユーザの介入なしに液体を直接に移動させる、自動液体ハンドリングシステムと
を備える、自動マルチモジュール細胞編集機器。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/40519
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/10, G01N 35/04, G01N 35/00 (2018.01) CPC - G01N 35/10, G01N 35/02, C12M 47/06, B01L 3/5027, B01L 2300/087		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0005025 A1 (CHURCH et al.,) 3 January 2013 (3.01.2013) Abstract; Claim 27; Claim 28; Claim 31; Claim 32; para [0006]; para [0014-0015]; para [0017-0019]	1, 5-9, 14-16 ----- 2-4, 10-13, 17-20
Y		
Y	US 2015/0191719 A1 (GENS, Inc) 9 July 2015 (09.07.2015) para [0008], [0065], [0089], [0107], [0109], [0111], [0112]	2-4, 17-20
Y	US 2016/0367991 A1 (CEPHEID) 22 December 2016 (22.12.2016) Abstract; para [0005]; para [0049]; para [0094]; para [0111]; para [0167]	10-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 August 2017		Date of mailing of the international search report 26 SEP 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 62/566,374
(32)優先日 平成29年9月30日(2017.9.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/566,375
(32)優先日 平成29年9月30日(2017.9.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/566,688
(32)優先日 平成29年10月2日(2017.10.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/567,697
(32)優先日 平成29年10月3日(2017.10.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/620,370
(32)優先日 平成30年1月22日(2018.1.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/648,130
(32)優先日 平成30年3月26日(2018.3.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/649,731
(32)優先日 平成30年3月29日(2018.3.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/657,651
(32)優先日 平成30年4月13日(2018.4.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/657,654
(32)優先日 平成30年4月13日(2018.4.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/671,385
(32)優先日 平成30年5月14日(2018.5.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/689,068
(32)優先日 平成30年6月23日(2018.6.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 ベルグレイダー、フィリップ
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー セントラル アベニュー 5500 ス
イート 220

(72)発明者 ベルナート、ジョージ
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー セントラル アベニュー 5500 ス
イート 220

(72)発明者 ギル、ライアン
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー セントラル アベニュー 5500 ス
イート 220

(72)発明者 ネス、ケビン
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー セントラル アベニュー 5500 ス
イート 220

Fターム(参考) 4B029 AA24 BB02 DF01 HA09