



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0024247
(43) 공개일자 2020년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/36 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
C12M 1/42 (2017.01) C12N 15/10 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12M 41/48 (2013.01)
C12M 35/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7002327
- (22) 출원일자(국제) 2018년06월30일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년01월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/040519
- (87) 국제공개번호 WO 2019/006436
국제공개일자 2019년01월03일
- (30) 우선권주장
62/527,339 2017년06월30일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
인스크립타 인코포레이티드
미국 콜로라도 보울더 센트럴 애비뉴 5500 스위트 220 (우: 80301)
- (72) 발명자
마스크엘리어, 던
미국 80301 콜로라도 보울더 센트럴 애비뉴 5500 스위트 220
벨그라더, 필립
미국 80301 콜로라도 보울더 센트럴 애비뉴 5500 스위트 220
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

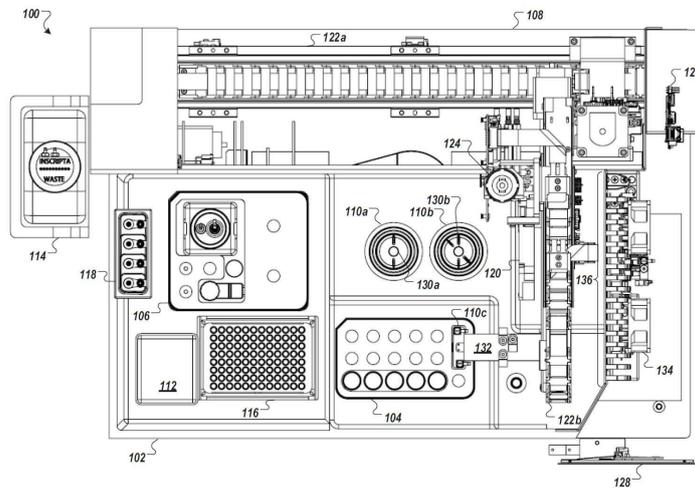
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 자동 세포 처리 방법, 모듈, 기기 및 시스템

(57) 요약

예시적인 실시예에서, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 하나 이상의 세포들 내의 핵산 서열들로 다중 편집들을 자동화하도록 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류	(30) 우선권주장
<i>C12M 41/36</i> (2013.01)	62/551,069 2017년08월28일 미국(US)
<i>C12N 15/1082</i> (2013.01)	62/566,374 2017년09월30일 미국(US)
(72) 발명자	62/566,375 2017년09월30일 미국(US)
버나테, 조그	62/566,688 2017년10월02일 미국(US)
미국 80301 콜로라도 보울더 센트럴 애비뉴 5500	62/567,697 2017년10월03일 미국(US)
스위트 220	62/620,370 2018년01월22일 미국(US)
길, 라이언	62/648,130 2018년03월26일 미국(US)
미국 80301 콜로라도 보울더 센트럴 애비뉴 5500	62/649,731 2018년03월29일 미국(US)
스위트 220	62/657,651 2018년04월13일 미국(US)
네스, 케빈	62/657,654 2018년04월13일 미국(US)
미국 80301 콜로라도 보울더 센트럴 애비뉴 5500	62/671,385 2018년05월14일 미국(US)
스위트 220	62/689,068 2018년06월23일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

자동화 다중-모듈 세포 편집 기기(automated multi-module cell editing instrument)로서,
모듈들의 전부 또는 일부를 수용하도록 구성된 하우징(housing);
세포들을 수용하도록 구성된 리셉터클(receptacle);
핵산들을 수용하도록 구성된 하나 이상의 리셉터클들;
핵산들을 세포들 내로 도입하도록 구성된 형질전환 모듈(transformation module);
형질전환 모듈에서 세포 형질전환 후 세포들이 회복되게 하도록 구성된 회복 모듈(recovery module);
도입된 핵산들이 세포들에서 핵산들을 편집하게 하도록 구성된 편집 모듈(editing module); 및
사용자 입력 및/또는 사전-프로그래밍된 스크립트(script)의 선택에 기반하여 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기를 작동시키도록 구성된 프로세서(processor)를 포함하는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 2

제1 항에 있어서,
상기 하나 이상의 리셉터클들의 핵산들은 골격(backbone) 및 편집 카세트(cassette)를 포함하며, 상기 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기는 핵산 어셈블리 모듈(nucleic acid assembly module)을 더 포함하는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 3

제2 항에 있어서,
상기 핵산 어셈블리 모듈은 자석을 포함하는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 4

제3 항에 있어서,
상기 핵산 어셈블리 모듈은 등은 핵산 어셈블리를 수행하도록 구성되는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 5

제1 항에 있어서,
상기 편집 모듈 및 회복 모듈이 조합되는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 6

제1 항에 있어서,
세포들을 성장시키도록 구성된 성장 모듈을 더 포함하는,

자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 7

제6 항에 있어서,
상기 성장 모듈은 성장하는 세포들의 광학 밀도를 측정하는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 8

제7 항에 있어서,
상기 광학 밀도는 연속적으로 측정되는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 9

제6 항에 있어서,
상기 프로세서는 세포들이 사용자에게 의해 요청된 시간에 표적 광학 밀도에 도달하도록 성장 모듈에서 성장 조건들을 조정하도록 구성되는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 10

제1 항에 있어서,
세포들을 수용하도록 구성된 리셉터클 및 핵산들을 수용하도록 구성된 하나 이상의 리셉터클들이 시약 카트리지 내에 함유되는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 11

제10 항에 있어서,
세포 편집에 요구되는 일부 또는 모든 시약들이 시약 카트리지 내에 함유되는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 12

제11 항에 있어서,
상기 시약 카트리지 내에 함유된 시약들은 프로세서에 의한 스크립트 관독에 의해 위치될 수 있는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 13

제12 항에 있어서,
상기 시약 카트리지는 시약들을 포함하고 키트(kit)로 제공되는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 14

제1 항에 있어서,
상기 형질전환 모듈은 전기천공 장치(electroporation device)를 포함하는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 15

제14 항에 있어서,
상기 전기천공 장치는 관류(flow-through) 전기천공 장치인,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 16

제1 항에 있어서,
세포들을 농축하고 세포들을 전기 적격성(electrocompetent)이 되게 하도록 구성되는 여과 모듈을 더 포함하는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 17

자동화 다중-모듈 세포 편집 기기로서,
모듈들의 일부 또는 전부를 수용하도록 구성된 하우징;
세포들을 수용하도록 구성된 리셉터클;
핵산들을 수용하도록 구성된 적어도 하나의 리셉터클;
골격 및 편집 카세트를 조립하도록 구성된 핵산 어셈블리 모듈;
세포들을 성장시키도록 구성된 성장 모듈;
조립된 핵산들을 세포들 내로 도입하기 위한 전기천공기를 포함하는 형질전환 모듈;
조립된 핵산들이 세포들 내의 핵산들을 편집하게 하도록 구성된 편집 모듈; 및
사용자 입력 및/또는 사전 프로그래밍된 스크립트의 선택에 기반하여 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기를 작동
시키도록 구성된 프로세서를 포함하는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 18

제17 항에 있어서,
상기 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기에서 세포 편집을 수행하기 위해 시약들을 함유한 적어도 하나의 시약 카
트리지를 더 포함하는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 19

제18 항에 있어서,
상기 셀들 및 핵산들용 리셉터클들은 시약 카트리지 내에 배치되는,
자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

청구항 20

자동화 다중-모듈 세포 편집 기기로서,
모듈들의 일부 또는 전부를 수용하도록 구성된 하우징;
세포들을 수용하도록 구성된 리셉터클;
핵산들을 수용하도록 구성된 적어도 하나의 리셉터클;
a) 골격 및 편집 카세트를 조립하고, b) 조립 후 조립된 핵산들을 탈염시키도록 구성된 핵산 어셈블리 모듈;

세포들을 성장시키도록 구성된 성장 모듈;

세포들을 농축시키고 세포들을 전기 적격성이 되게 하도록 구성되는 여과 모듈;

조립된 핵산들을 세포들 내로 도입하기 위한 관류 전기천공기를 포함하는 형질전환 모듈;

형질전환 모듈에서 전기천공 후 세포들이 회복되게 하고 핵산들이 세포들을 편집하게 하도록 구성된 조립식 회복 및 편집 모듈; 및

사용자 입력에 기반하여 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기를 작동시키도록 구성된 프로세서를 포함하는,

자동화 다중-모듈 세포 편집 기기.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 출원은 2017 년 6 월 30 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Automated Editing of Nucleic Acids Within a Cell"인 미국 가 특허 출원 일련번호 62/527,339 호; 2017 년 8 월 28 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Electroporation Cuvettes for Automation"인 미국 특허 출원 일련번호 62/551,069 호; 2017 년 9 월 30 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Electroporation Device"인 미국 특허 출원 일련번호 62/566,374 호; 2017 년 9 월 30 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Electroporation Device"인 미국 특허 출원 일련번호 62/566,375 호; 2017 년 10 월 2 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Introduction of Exogenous Materials into Cells"인 미국 특허 출원 일련번호 62/566,688 호; 2017 년 10 월 3 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Automated Nucleic Acid Assembly and Introduction of Nucleic Acids into Cells"인 미국 특허 출원 일련번호 62/567,697 호; 2018 년 1 월 22 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Automated Filtration and Manipulation of Viable Cells"인 미국 특허 출원 일련번호 62/620,370 호; 2018 년 3 월 29 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Automated Control of Cell Growth Rates for Induction and Transformation"인 미국 특허 출원 일련번호 62/649,731 호; 2018 년 5 월 14 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Automated Control of Cell Growth Rates for Induction and Transformation"인 미국 특허 출원 일련번호 62/671,385 호; 2018 년 3 월 26 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Genomic Editing in Automated Systems"인 미국 특허 출원 일련번호 62/648,130 호; 2018 년 4 월 13 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Combination Reagent Cartridge and Electroporation Device"인 미국 특허 출원 일련번호 62/657,651 호; 2018 년 4 월 13 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Automated Cell Processing Systems Comprising Cartridges"인 미국 특허 출원 일련번호 62/657,654 호; 및 2018 년 6 월 20 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Nucleic Acid Purification Protocol for Use in Automated Cell Processing Systems"인 미국 특허 출원 일련번호 62/689,068 호를 우선권으로 주장한다. 위에서 확인된 모든 출원들은, 모든 목적들을 위해 그 전문들이 인용에 의해 본 출원에 포함된다.

배경 기술

[0002]

다음의 논의에서, 특정 물질들 및 방법들은 배경 및 소개 목적들로 설명될 것이다. 본 명세서에 포함된 것은 종래 기술의 "인정(admission)"으로서 해석해서는 안 된다. 출원인은 적절한 경우에, 본 명세서에서 언급된 물질들 및 방법들이 적용 가능한 법적 조항들 하에서 종래 기술을 구성하지 않는다는 것을 입증할 권리를 명시적으로 보유한다.

[0003]

조작된 뉴클레아제(engineered nucleases)를 이용한 게놈 편집은 살아있는 유기체의 게놈에서 핵산들의 변화들이 이루어지는 방법이다. 특정 뉴클레아제는 게놈의 표적 영역들에서 부위-특이적 이중 가닥 절단들(site-specific double-strand breaks)을 생성하고, 이는 비상동성 말단-결합(nonhomologous end-joining) 또는 상동성 재조합(homologous recombination)에 의해 회복될 수 있으며, 표적 편집들을 초래한다. 그러나, 이들 방법들은 낮은 효율들로 인해 그리고 세포 형질전환, 성장 측정 및 세포 선택에 대한 과제들로 인해 자동화와 양립될 수 없었다. 또한, 전통적인 벤치탑 장치들(benchtop devices)은 반드시 자동화 모듈 시스템(modular system)으로 양호하게 확장 및 통합될 필요가 없다. 따라서, 편집된 세포 집단들을 생성하는 방법들 및 시스템들은 번거롭고, 재귀 기술들을 사용하여 여러 번의 편집들을 도입하는 과제들은 생성될 수 있는 세포 집단들의 본질 및 복잡성을 제한한다.

[0004]

따라서, 편집된 세포들이 자동화 기기 외부의 추가 실험에 사용될 수 있는 자동화 방식으로 조립된 핵산들 및

다른 생물학적 분자들을 살아있는 세포들에 도입하기 위한 자동화 기기들, 시스템들 및 방법들이 필요하다.

발명의 내용

- [0005] 특정 실시예들에서, 자동화 방법들은 다수의 세포들에서 하나 이상의 표적 게놈 영역들의 뉴클레아제-지정 게놈 편집을 위해 사용되며, 상기 방법들은 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들에서 수행된다. 이들 방법들은 원하는 게놈 변화들에 관심이 있는 살아있는 세포들의 라이브러리들(libraries)을 생성하는데 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 사용하여 수행된 자동화 방법들은 다양한 뉴클레아제-지정 게놈 편집 기술들과 함께 사용될 수 있고, 하나 이상의 선택 가능한 마커들(markers)의 사용과 함께 또는 마커들의 사용 없이 사용될 수 있다.
- [0006] 따라서, 본 개시는 선택된 실시예들에서, 뉴클레아제-지정 게놈 편집을 포함한, 자동화 다중-모듈 세포 편집 (automated multi-module cell editing)을 위한 모듈들, 기기들 및 시스템들을 제공한다. 본 개시의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들의 다른 특정 실시예들은 재귀 게놈 편집, 예를 들어, 기기들 내에서 2 개 이상의 편집 작동들을 통해 세포 집단의 하나 이상의 세포들 내의 게놈들에 다중 편집들을 순차적으로 도입하도록 설계된다.
- [0007] 따라서, 본 명세서에서 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기의 실시예들이 제공되며, 상기 기기는 모듈들의 전부 또는 일부를 포함하도록 구성된 하우징(housing); 세포들을 수용하도록 구성된 리셉터클(receptacle); 핵산들을 수용하도록 구성된 하나 이상의 리셉터클들; 핵산들을 세포들 내로 도입하도록 구성된 형질전환 모듈; 형질전환 모듈에서 세포 형질전환 후 세포가 회복되게 하도록 구성된 회복 모듈; 세포들 내의 형질전환된 핵산들이 세포들에서 핵산들을 편집하게 하도록 구성된 편집 모듈; 및 사용자 입력 및/또는 적절한 제어기 스크립트(script)의 선택에 기반하여 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기를 작동시키도록 구성된 프로세서를 포함한다.
- [0008] 일부 양태들에서, 하나 이상의 리셉터클들의 핵산들은 골격 및 편집 카세트(cassette)를 포함하며, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기는 핵산 어셈블리 모듈을 더 포함한다. 일부 양태들에서, 핵산 어셈블리 모듈은 자석을 포함하고, 일부 양태들에서, 핵산 어셈블리 모듈은 단일 등은 반응을 사용하여 조립을 수행하도록 구성된다. 다른 양태들에서, 핵산 어셈블리 모듈은 증폭 및/또는 절찰 방법(ligation method)을 수행하도록 구성된다.
- [0009] 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기의 일부 양태들에서, 편집 모듈 및 회복 모듈이 조합된다.
- [0010] 일부 양태들에서, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기는 세포들을 성장시키도록 구성된 성장 모듈을 더 포함할 수 있으며, 일부 구현예들에서 성장 모듈은 성장하는 세포들의 광학 밀도를 연속적으로 또는 간격을 두고 측정한다. 일부 구현예들에서, 프로세서는 세포들이 사용자에게 의해 요청된 시간에 표적 광학 밀도에 도달하도록 성장 모듈에서 성장 조건들을 조정하도록 구성된다. 또한, 일부 실시예들에서, 사용자는 성장 프로세스와 관련하여 업데이트될(updated) 수 있다.
- [0011] 일부 양태들에서, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기는 세포들을 수용하도록 구성된 리셉터클 및 핵산들을 수용하도록 구성된 하나 이상의 리셉터클들이 시약 카트리리지 내에 함유되는 시약 카트리지를 포함한다. 또한, 시약 카트리지는 또한, 세포 편집에 요구되는 일부 또는 모든 시약들을 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 시약 카트리리지 내에 함유된 시약들은 프로세서에 의한 스크립트 판독에 의해 위치될 수 있으며, 일부 구현예들에서 시약 카트리지는 시약들을 포함하고 키트로 제공된다.
- [0012] 일부 양태들에서, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기의 형질전환 모듈은 전기천공 장치를 포함하며; 일부 구현예들에서 전기천공 장치는 관류 전기천공 장치(flow-through electroporation device)이다.
- [0013] 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기의 일부 양태들은 액체들을 교환하고 그리고/또는 세포들을 농축하도록 구성된 여과 모듈을 더 포함한다. 특정 양태들에서, 여과 시스템은 또한, 세포들을 전기 적격성(electrocompetent)이 되게 하는데 사용될 수 있다.
- [0014] 다른 실시예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기가 제공되며, 여기서 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기는 모듈들의 일부 또는 전부를 수용하도록 구성된 하우징; 세포들을 수용하도록 구성된 리셉터클; 핵산 골격 및 편집 카세트를 수용하도록 구성된 적어도 하나의 리셉터클; a) 골격 및 편집 카세트를 조립하고, b) 조립 후 조립된 핵산들을 탈염시키도록 구성된 핵산 어셈블리 모듈; 세포들을 성장시키고 세포들의 광학 밀도(OD)를 측정하도록 구성된 성장 모듈; 세포들을 농축시키고 세포들을 전기 적격성이 되게 하도록 구성되는 여과 모듈; 조립된 핵산들을 세포들 내로 도입하기 위한 관류 전기천공기를 포함하는 형질전환 모듈; 형질전환 모듈에서 전기천공 후 세포들이 회복되게 하고 조립된 핵산들이 세포들 내의 핵산들을 편집하게 하도록 구성된 조립식 회복 및 편

집 모듈; 및 사용자 입력 및/또는 적절한 제어기 스크립트의 선택에 기반하여 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기를 작동시키도록 구성된 프로세서를 포함한다.

- [0015] 일부 구현예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기는 복수의 시약 저장소들, 관류 전기천공 장치, 및 복수의 시약 저장소들에 위치한 시약들을 분배하고 관류 전기천공 장치를 제어하기 위해 프로세서에 의해 판독 가능한 스크립트를 포함하는 시약 카트리지를 제공한다.
- [0016] 일부 양태들에서, 성장 모듈은 온도 제어된 회전 성장 약병, 약병을 스핀시키기 위한 모터 어셈블리, 예를 들어, 약병 내의 OD를 측정하기 위한 분광 광도계, 및 사용자로부터의 입력을 수용하고 세포들의 성장 속도를 제어하기 위한 프로세서를 포함한다. 성장 모듈은 회전 성장 약병에서 성장 세포의 OD를 연속적으로 또는 설정된 간격들로 자동 측정하고, 사용자가 지정한 대로 표적 OD 및 표적 시간으로의 세포들의 성장을 제어할 수 있다. 즉, 본 명세서에 설명된 방법들 및 장치들은 실시간으로 세포 성장을 모니터링하고, 사용자에 의해 지정된 표적 시간에 표적 OD에 도달하도록 실시간으로 회전 성장 약병의 온도를 조정하는 피드백 루프(feedback loop)를 제공한다.
- [0017] 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기의 일부 양태들에서, 형질전환 모듈은 관류 전기천공 장치를 포함하며, 여기서 관류 전기천공 장치는 세포 샘플 및 조립된 핵산들을 관류 전기천공 장치 내로 도입하기 위한 입구 및 입구 채널(channel); 관류 전기천공 장치로부터 전기천공된 세포 샘플의 퇴출을 위한 출구 및 출구 채널; 입구 채널과 출구 채널 사이에 교차 위치되는 흐름 채널; 및 2 개 이상의 전극들을 포함하며; 여기서 2 개 이상의 전극은 제 1 입구 채널과 유동 채널의 교차점과 출구 채널과 흐름 채널의 교차점 사이의 흐름 채널 내에 흐름 채널의 세포 샘플과 유체 연통되게 위치되고 전기 펄스 또는 전기 펄스들을 세포 샘플에 적용하도록 구성된다. 특정 양태들에서, 관류 전기천공 장치는 2 개 이상의 흐름 채널들을 병렬로 포함할 수 있다.
- [0018] 세포들 내의 게놈 편집 작동들을 구현하기 위해 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기를 사용하기 위한 시스템들이 또한 제공된다. 이들 시스템들은 선택적으로, 세포 준비, 핵산 준비, 편집된 세포 집단들의 선택, 편집된 세포 집단들의 기능 분석, 편집된 세포 집단들의 저장 등을 위한 기기와 다른 장치들 또는 리셉터클들 사이에 하나 이상의 인터페이스들(interfaces)을 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기를 사용하기 위한 방법들이 제공된다. 일부 방법들에서, 전기 적격성 세포들은 바람직하게 원하는 광학 밀도로 기기에 직접 제공되고 형질전환 모듈로 전달된다. 일부 방법들에서, 세포들은 성장 모듈로 전달되고, 여기서 세포들은 원하는 광학 밀도로 성장된다. 이어서, 세포들은 성장 약병으로부터 여과 모듈로 전달되고, 여기서 세포들은 농축되고 선택적으로 전기 적격성으로 된다. 이어서, 세포들은 형질전환 모듈로 전달된다.
- [0020] 일부 양태들에서, 조립된 핵산 카세트들이 기기에 직접 제공되고 형질전환 모듈로 전달된다. 일부 양태들에서, 벡터 골격 및 하나 이상의 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 편집 카세트들과 같은 핵산들은 세포 도입 또는 준비와 동시에 또는 순차적으로 핵산 어셈블리 모듈로 전달된다. 이러한 양태에서, 핵산들이 조립되고, (예를 들어, 액체 교환 또는 삼투현상을 통해)탈염되고, 형질전환 모듈로 전달되어 전기적격성 세포들로 전기천공된다. 전기천공 또는 형질감염은 형질전환 모듈에서 일어난 다음에, 세포들은 선택적으로 하나 이상의 게놈 편집들을 함유하는 세포들의 선택을 포함하는 회복/편집 모듈로 전달된다. 회복/편집/선택 후, 세포들은 연구를 위해 직접 회수되어 사용되거나 추가 연구를 위해 저장될 수 있거나, 기기 내에서 편집 단계들을 반복함으로써 다른 회차(또는 다수의 회차)의 게놈 편집이 수행될 수 있다.
- [0021] 뉴클레아제-지정 게놈 편집을 위한 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기를 사용하여 생성된 세포 라이브러리들이 또한 제공되며, 여기서 상기 기기는 하우징; 세포들 및 세포들에서 뉴클레아제-지정 게놈 편집 이벤트들(events)을 촉진시키기 위한 서열들을 포함하는 하나 이상의 합리적으로 설계된 핵산들을 수용하도록 구성된 리셉터클; 핵산(들)을 세포들 내로 도입하기 위한 형질전환 모듈; 뉴클레아제 지정 게놈 편집 이벤트들이 세포들에서 발생하게 하는 편집 모듈; 및 사용자 입력에 기반하여 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기를 작동시키도록 구성된 프로세서를 포함하며; 여기서 자동화 기기에 의해 생성된 뉴클레아제 지정 게놈 편집 이벤트들은 합리적으로 설계된 편집들을 갖는 개별 세포들을 포함하는 세포 라이브러리를 초래한다.
- [0022] 일부 양태들에서, 세포 라이브러리는 포화 돌연변이 유발 세포 라이브러리를 포함한다. 일부 양태들에서, 세포 라이브러리는 프로모터 교환 세포 라이브러리(promoter swap cell library)를 포함한다. 다른 양태들에서, 세포 라이브러리는 중단 교환 세포 셀 라이브러리를 포함한다. 또 다른 양태들에서, 세포 라이브러리는 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 교환 세포 라이브러리를 포함한다. 또 다른 양태들에서, 세포 라이브러리는 프로모터

교환 세포 라이브러리를 포함한다.

- [0023] 일부 구현예들에서, 라이브러리는 적어도 100,000 개의 편집된 세포들을 포함하고, 또 다른 구현예들에서 라이브러리는 적어도 1,000,000 개의 편집된 세포들을 포함한다.
- [0024] 일부 구현예들에서, 뉴클레아제 지정 게놈 편집은 RGN 지정 게놈 편집이다. 바람직한 양태에서, 기기는 유도성 뉴클레아제의 사용을 위해 구성된다. 뉴클레아제는 예를 들어, 화학적으로 유도되거나, 바이러스 유도되거나, 광 유도되거나, 온도 유도되거나, 열 유도될 수 있다.
- [0025] 일부 구현예들에서, 기기는 단일 사이클(cycle)에서 다수의 세포들의 다중화 게놈 편집을 제공한다. 일부 양태들에서, 기기는 단일 사이클에서 적어도 5 개의 세포들의 게놈을 편집하는 능력을 가진다. 다른 양태들에서, 기기는 단일 사이클에서 적어도 100 개의 세포들의 게놈을 편집하는 능력을 가진다. 또 다른 양태들에서, 기기는 단일 사이클에서 적어도 1,000 개의 세포들의 게놈을 편집하는 능력을 가진다. 또 다른 양태들에서, 기기는 단일 사이클에서 적어도 10,000 개의 세포들의 게놈을 편집하는 능력을 가진다. 특정 양태들에서, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 단일 사이클에서 적어도 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} 개의 세포들의 게놈을 편집하는 능력을 가진다.
- [0026] 단일 사이클에서 편집을 위해 표적화될 수 있는 세포 집단의 게놈 부위들의 수는 2 내지 10,000,000 개일 수 있다.
- [0027] 재귀 편집을 수반하는 일부 실시예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기는 각각의 주기 동안 세포 집단의 게놈들에 단일 게놈 편집이 추가된 상태로 둘 이상의 게놈 편집들을 세포들 내로 도입하는 것을 제공한다. 따라서, 일부 양태들에서, 본 개시의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 사이클 당 세포 집단에서 세포 당 2 개 이상의 편집들, 세포 집단에서 세포 당 3 개 이상의 편집들, 세포 집단에서 세포 당 5 개 이상의 편집들, 또는 세포 집단에 대한 단일 사이클에서 세포 당 10 개 이상의 편집들을 순차적으로 제공하는데 유용하다.
- [0028] 특정 실시예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기는 사이클 당 편집 모듈에 도입된 세포들의 적어도 10 %의 편집 효율, 바람직하게 사이클 당 편집 모듈에 도입된 세포들의 적어도 20 %의 편집 효율, 더 바람직하게 사이클 당 편집 모듈에 도입된 세포들의 적어도 25 %의 편집 효율, 훨씬 더 바람직하게 사이클 당 편집 모듈에 도입된 세포들의 적어도 30 %의 편집 효율, 훨씬 더 바람직하게 사이클 당 편집 모듈에 도입된 세포들의 적어도 40 %의 편집 효율, 그리고 훨씬 더 바람직하게 사이클 당 편집 모듈에 도입된 세포들의 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90% 이상의 편집 효율을 제공할 수 있다.
- [0029] 다른 특징들, 장점들 및 양태들이 아래에서 더 상세히 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 본 명세서에 포함되어 본 명세서의 일부를 구성하는 첨부 도면들은 하나 이상의 실시예들을 예시하고 상세한 설명과 함께 이들 실시예들을 설명한다. 첨부 도면들은 반드시 축척대로 그려진 것은 아니다. 첨부된 그래프들(graphs) 및 도면들에 예시된 임의의 값들 또는 치수들은 단지 예시 목적들을 위한 것이며 실제 또는 바람직한 값들 또는 치수들을 나타내거나 나타내지 않을 수 있다. 적용 가능한 경우에, 일부 또는 모든 특징들은 기본 특징들에 대한 설명을 돕기 위해 예시되지 않을 수 있다. 도면들에서:
 - 도 1a 및 도 1b는 기기의 일부로서 교체 가능한 카트리지(들)를 사용하여 다수의 세포들의 다중 게놈 편집을 위한 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 예시적인 실시예의 평면도 및 사시도를 도시한다.
 - 도 2a 및 도 2b는 도 1a 및 도 1b의 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 측면도 및 정면도를 도시한다.
 - 도 2c 및 도 2d는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 제2 예시적인 새시(chassis)를 도시한다.
 - 도 3a 내지 도 3c는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 세포 세척 및/또는 농축 모듈의 측면도, 절단도 및 사시도를 도시한다.
 - 도 4는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 조합된 핵산 어셈블리 모듈 및 정제 모듈을 도시한다.
 - 도 5a는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 인라인(inline) 전기천공 모듈을 도시한다.

도 5b 및 도 5c는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 일회용 관류 전기천공 모듈을 도시한다.

도 6a 및 도 6b는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 세척 카트리지를 도시한다.

도 6c 내지 도 6e는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 시약 카트리지를 도시한다.

도 7a 내지 도 7c는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 여과 모듈의 기능 블록도 및 2개의 사시도를 제공한다.

도 7d는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 필터 카트리지의 사시도이다.

도 8a 내지 도 8f는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 세포 성장 모듈들을 도시한다.

도 9는 자동화 다중-모듈 세포 처리를 위한 예시적인 방법의 흐름도이다.

도 10a는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 의한 박테리아 세포들의 자동화 처리를 위한 제1 예시적인 작업 흐름에 대한 흐름도이다.

도 10b는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 의한 박테리아 세포들의 자동화 처리를 위한 제2 예시적인 작업 흐름에 대한 흐름도이다.

도 10c는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 의한 효모 세포들의 자동화 세포 처리를 위한 예시적인 작업 흐름에 대한 흐름도이다.

도 11은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 명령들을 제공하고 그로부터 피드백을 수신하기 위한 예시적인 그래픽(graphical) 사용자 인터페이스를 예시한다.

도 12a는 다수의 세포들의 다중화 게놈 편집을 위한 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 다른 예시적인 실시예의 기능 블록 시스템 다이어그램이다.

도 12b는 다수의 세포들의 재귀적, 다중화 게놈 편집을 위한 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 또 다른 예시적인 실시예의 기능 블록 시스템 다이어그램이다.

도 13은 자동화 다중 모드 세포 처리 기기에 사용하기 위한 예시적인 제어 시스템이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 첨부 도면들과 관련하여 아래에 기재되는 설명은 개시된 요지의 다양한 예시적인 실시예들에 대해 설명하려는 것이다. 구체적인 특징들 및 기능들은 각각의 예시적인 실시예와 관련하여 설명되나, 개시된 실시예들이 이들 각각의 특정 특징들 및 기능들 없이 실시될 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0032] 본 명세서에 설명된 기술들의 실시는 Green 등의 Eds. (1999), Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds. (2007), Genetic Variation: A Laboratory Manual; Dieffenbach, Dveksler, Eds. (2003), PCR Primer: A Laboratory Manual; Bowtell and Sambrook (2003), Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis; Sambrook and Russell (2006), Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 및 Green and Sambrook, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2014); Stryer, L. (1995) Biochemistry (4th Ed.) W.H. Freeman, New York N.Y.; Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, London; Nelson and Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry 3rd Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.; 및 Berg 등의 (2002) Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.에 기재된 기술들을 사용할 수 있으며, 이들 모두는 모든 목적들을 위해서 인용에 의해 그 전문이 본 명세서에 포함된다.

[0033] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥상 달리 명시하지 않는 한 복수의 지시대상들을 포함한다는 점에 유의한다. 따라서, 예를 들어, "올리고(oligo)"에 대한 지칭은 동일한 기능을 하는 하나 이상의 올리고들을 지칭하고, "방법들"은 당업자에게 공지된 등가의 단계들 및 방법들 등에 대한 지칭을 포함한다. 즉, 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 바와 같은 단수형 표현들은 "하나 이상"의 의미를 가진다. 또한, 본원에서만 사용될 수 있는 "좌", "우", "최상부", "바닥", "전방", "후방", "측면", "높이", "길이", "폭", "상부", "하부", "내측", "외측", "내부", "외부"와 같은 용어들은 기

준점들을 설명하며 임의의 특정 방위 또는 구성으로 본 개시의 실시예들을 반드시 제한하지는 않는다는 것이 이해되어야 한다. 또한, "제1", "제2", "제3" 등과 같은 용어들은 단지 본 명세서에 개시된 바와 같은 다수의 부분들, 구성요소들, 단계들, 작동들, 기능들 및/또는 기준점들 중 하나를 식별하고, 마찬가지로 임의의 특정 구성 또는 방위로 본 개시의 실시예들을 반드시 제한하지 않는다.

[0034] 또한, 용어들 "대략", "근접", "최소" 및 유사한 용어들은 일반적으로 특정 실시예들에서 20 %, 10 %, 바람직하게는 5 %의 마진 내에서 식별된 값 및 이들 사이의 임의의 값들을 포함하는 범위들을 지칭한다.

[0035] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0036] 본 명세서에 언급된 모든 공개문헌들(특허들, 공개된 출원들 및 비-특허 문헌을 포함)은 현재 설명된 방법들, 모듈들, 기기들 및 시스템들과 관련하여 사용되거나 수정될 수 있는 장치들, 시스템들 및 방법들을 설명하고 개시하려는 목적을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 모든 목적들을 위해 인용에 의해 포함된다.

[0037] 값들의 범위가 제공되는 경우에, 그 범위의 상한과 하한 사이의 각각의 중간 값 및 그 언급된 범위의 임의의 다른 언급된 값이나 중간 값이 개시 내에 포함된다는 것이 이해된다. 이들 더 작은 범위들의 상한 및 하한은 더 작은 범위들에 독립적으로 포함될 수 있고 또한, 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계에 종속된 개시 내에 포함된다. 언급된 범위가 한계들 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우에, 이들 포함된 한계들 중 둘 다를 제외한 범위가 또한 개시에 포함된다.

[0038] 명세서 전체에 걸쳐 "일 실시예" 또는 "실시예"에 대한 지칭은 실시예와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 개시된 요지의 적어도 하나의 실시예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 명세서 전체의 여러 장소들에서 "일 실시예에서" 또는 "실시예에서"라는 문구의 출현은 반드시 동일한 실시예를 지칭하는 것은 아니다.

[0039] 또한, 특정 특징들, 구조들 또는 특성들은 하나 이상의 실시예들에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다. 또한, 개시된 요지의 실시예들은 그의 수정들 및 변형들을 포함하도록 의도된다.

[0040] **도입 및 개요**

[0041] 선택된 실시예들에서, 본 명세서에 설명된 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들, 시스템들 및 방법들은 살아있는 세포들에서의 다중화 게놈 편집뿐만 아니라, 편집된 세포 집단들의 라이브러리들을 구축하기 위한 방법들에 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 다양한 게놈 편집 기술들, 특히 뉴클레아제 지정 게놈 편집과 함께 사용될 수 있다. 본 개시의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 다양한 부류들의 게놈 편집들을 포함하는 라이브러리들을 코딩 영역들, 비-코딩 영역들(non-coding regions), 또는 이들 모두에 구축하기 위한 방법들을 포함한, 살아있는 세포들의 게놈을 편집하기 위한 게놈 부위들을 표적화하는 핵산 서열들을 도입하기 위한 신규한 방법들을 제공한다. 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 자동화된 다중화 방식으로 하나 이상의 게놈 편집들을 갖는 세포들의 라이브러리들을 생성함으로써, 단일 사이클에서 다수의 세포들에 게놈 편집들을 도입하는데 특히 적합하다. 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 또한, 둘 이상의 편집들, 예를 들어, 세포 집단의 개별 세포들의 상이한 표적 게놈 부위들에 대한 편집들을 도입하는데 적합하다. 하나이든 여러 개이든, 이들 게놈 편집들은 바람직하게, 합리적으로 설계된 편집들, 즉 세포의 게놈 내의 표적 영역들에 대한 특정 편집들을 도입하도록 설계되고 생성되는 핵산들이다. 게놈-편집 이벤트들을 촉진하기 위해 사용된 서열들은 뉴클레아제 절단을 안내하고, 관심 영역에 대한 게놈 편집의 도입 및/또는 둘 모두를 돕는 서열들을 포함한다. 이들 서열들은 또한, 세포의 게놈의 특히 합리적으로 설계된 편집이 추적되게 하도록 세포의 게놈의 영역에 대한 편집을 포함할 수 있다. 세포들에 편집들을 도입하는 그러한 방법들은 예를 들어, Gill 등의 발명의 명칭이 "CRISPR enabled multiplexed genome engineering" 인 미국 특허 제 9,982,278 호, 및 Gill 등의 발명의 명칭이 "Methods for generating barcoded combinatorial libraries" 인 미국 특허 제10,017,760 호(미국 특허 출원 일련번호 15/632,222 호)에 개시되어 있다.

[0042] 그러한 핵산들 및 올리고뉴클레오타이드(또는 "올리고")는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 또는 이의 유사체를 포함한, 다양한 길이들을 가질 수 있는 폴리머 형태의 뉴클레오타이드를 포함하는 것으로 의도되지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 구현예들에 사용하기 위한 핵산들 및 올리고뉴클레오타이드들은 화학 합성 또는 후속 효소 변형 또는 폴리머라제 복사 동안 도입된 안정성을 향상시키기 위해 하나 이상의 위치들에서 변형될 수 있다. 이들 변형들은 올리고머에 하나 이상의 알킬화 핵산, 잠금 핵산(LNAs), 펩티드 핵산(PNAs), 포스포 네이트, 포스포티오에이트를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 변형된 뉴클레오타이드의 예들은 5-플루오로우라실, 5-브로모라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸사이

토신, 5-(카르복시히드록실메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실퀴오신, 이노신, N6-이소펜테닐라데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸사이토신, 5-메틸사이토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실퀴오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-D46-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 위부톡소신, 슈도우라실, 퀴오신, 2-티오사이토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필) 우라실, (acp3)w, 및 2,6-디아미노푸린을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 핵산 분자들은 또한, 염기 모이어티, 당 모이어티 또는 포스페이트 골격에서 변형될 수 있다.

[0043] 뉴클레아제 지정 게놈 편집

[0044] 선택된 실시예들에서, 본 명세서에 설명된 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 뉴클레아제 지정 게놈 편집 시스템을 이용한다. 유기체 게놈에 편집들을 제공하기 위한 다수의 상이한 뉴클레아제 기반 시스템들이 존재하며, 각각은 어느 하나의 단일 편집 시스템들, 순차적 편집 시스템들(예를 들어, 상이한 뉴클레아제 지정 시스템들을 순차적으로 사용하여 세포에 둘 이상의 게놈 편집들을 제공함) 및/또는 재귀 편집 시스템들(예를 들어, 단일 뉴클레아제 지정 시스템들을 사용하여 세포에 2 개 이상의 게놈 편집들을 도입함)에서 사용될 수 있다. 예시적인 뉴클레아제 지정 게놈 편집 시스템들이 본 명세서에서 설명되지만, 당업자는 다른 효소 지정 편집 시스템들이 또한 예시적인 실시예들의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들에 유용하다는 것을 본 개시를 읽음으로써 인식할 것이다.

[0045] 본 명세서에 기재된 자동화 시스템들은 본 개시의 기기를 사용하여 게놈의 절단 및 표적 게놈 영역 내로 편집을 도입하기 위해 뉴클레아제를 사용할 수 있음에 유의해야 한다.

[0046] 예시적인 실시예들의 특정 양태들에서, 뉴클레아제 편집 시스템은 편집 타이밍(timing)을 제어할 수 있는 유도성 시스템이다. 유도성 시스템은 뉴클레아제의 유도성 발현, 편집 핵산들의 유도성 발현, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 뉴클레아제 활성을 조절하는 능력은 표적-의 절단을 줄이고 정확한 게놈 조작을 촉진할 수 있다. 본 개시를 읽었을 때 당업자에게 자명한 바와 같이, 다수의 상이한 유도성 시스템들이 본 개시의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들과 함께 사용될 수 있다.

[0047] 특정 양태들에서, 뉴클레아제에 의한 절단은 또한, 표적 영역에서 게놈 편집을 갖는 세포들을 선택하기 위해 예시적인 실시예들의 자동화 다중-모듈 세포 편집기기들과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 뉴클레아제 인식 부위를 제거하는(예를 들어, 상동성 재조합을 통해) 게놈 편집된 세포들은 세포들을 그러한 편집 후 뉴클레아제에 노출시킴으로써 예시적인 실시예들의 자동화 다중-모듈 세포 편집기기들 및 시스템들을 사용하여 선택될 수 있다. 게놈 편집 없는 세포들의 DNA는 절단될 것이고, 그 후에 제한된 성장 및/또는 소멸을 가질 것이지만, 뉴클레아제 인식 부위를 제거한 게놈 편집을 받은 세포들은 이후의 뉴클레아제 노출에 의해 영향을 받지 않을 것이다.

[0048] 세포 또는 세포들의 집단이 유도 분자에 의해 유도되는 핵산-유도 뉴클레아제 인코딩 DNA를 포함하면, 뉴클레아제는 유도 분자의 존재하에서만 발현될 것이다. 대안적으로, 세포 또는 세포들의 집단이 억제 분자에 의해 억제되는 핵산-유도 뉴클레아제 인코딩 DNA를 포함하면, 뉴클레아제는 억제 분자의 부재시에만 발현될 것이다.

[0049] 예를 들어, RNA-유도 뉴클레아제를 사용하여 편집하기 위한 유도성 시스템들이 설명되어 있는데, 이는 화학적 유도를 사용하여 RNA-유도 뉴클레아제에 대한 세포들의 일시적 노출을 제한한다. (Zhang 등에 의해 2015 년 1 월 23 일자로 출원된 발명의 명칭이 “Inducible DNA Binding Proteins and Genome Perturbation Tools and Applications Thereof” 인 미국 특허 출원 공개 제2015/0291966 A1 호; 또한 Horizon/Dharmacon, Lafayette, CO.로부터 이용 가능한 유도성 렌티바이러스 발현 벡터들(inducible lentiviral expression vectors) 참조. 추가의 기술들을 위해서, 예를 들어, Campbell, Targeting protein function: the expanding toolkit for conditional disruption, *Biochem J.*, 473(17): 2573-2589 (2016) 참조.

[0050] 다른 예들에서, 바이러스-유도성 뉴클레아제는 세포들에서 유전자 편집을 유도하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, Dong의 Establishment of a highly efficient virus-inducible CRISPR/Cas9 system in insect cells, *Antiviral Res.*, 130:50-7 (2016) 참조. 다른 예에서, 핵산 지정 뉴클레아제의 유도성 발현을 위해서, 변이체들은 뉴클레아제를 에스트로겐 수용체(ERT2)의 호르몬-결합 도메인과 융합시킴으로써 4-하이드록시타목시펜(4-HT)을 갖는 포유동물 세포들에서 스위칭 온 및 오프될 수 있다. Liu 등의 *Nature Chemical Biology*, 12 :

980-987 (2016) 및 Tan에 의해 2016 년 11 월 7 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Chemical-Inducible Genome Engineering Technology"인 국제 특허 출원 공개 WO 2017/078631 A1 호 참조.

[0051] 또한, 원핵 및 진핵 세포 모두에서의 세포들에서 유전자들의 제어된 발현을 위해서 다수의 유전자 조절 제어 시스템들이 개발되었다. 이들 시스템들은 테트라사이클린-제어 전사 활성화 시스템(Tet-On/Tet-Off, Clontech, Inc. (Palo Alto, CA)), Lac Switch Inducible system(Brent 등의 발명의 명칭이 "Regulation of eucaryotic gene expression"인 미국 특허 제 4,833,080 호), 엑디손-유도성 유전자 발현 시스템(No 등의 Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice, PNAS, 93(8):3346-3351 (1996)), 및 큐메이트(cumate) 유전자-스위치 시스템(Mullick 등의 The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells, BMC Biotechnology, 6:43 (2006))을 포함한다.

[0052] 예시적인 실시예들의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 사용하여 편집될 수 있는 세포들은 임의의 원핵, 고세균 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 본 예시적인 실시예들과 함께 사용하기 위한 원핵 세포들은 그람(gram) 양성 박테리아 세포들, 예를 들어, 바실러스 서브틸리스 또는 그람 음성 박테리아 세포들, 예를 들어, 이. 콜라이 세포들일 수 있다. 예시적인 실시예들의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들과 함께 사용하기 위한 진핵 세포들은 임의의 식물 세포들 및 임의의 동물 세포들, 예를 들어, 곰팡이 세포들, 곤충 세포들, 양서류 세포들, 선충 세포들 또는 포유동물 세포들을 포함한다.

[0053] **아연-핑거 뉴클레아제 게놈 편집(Zinc-finger Nuclease Genome Editing)**

[0054] 선택된 실시예들에서, 본 명세서에 설명된 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 아연-핑거 뉴클레아제 게놈 편집을 수행한다. 아연-핑거 뉴클레아제(ZFNs)는 아연 핑거 DNA-결합 도메인을 DNA-절단 도메인에 융합시킴으로써 생성된 인공 제한 효소들이다. 아연 핑거 도메인들은 유기체 게놈의 표적-특정 영역들로 조작될 수 있다. (Urnov 등의 Nature Reviews Genetics, 11 : 636-646 (2010)); Carroll 등의 2003 년 1 월 22 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Targeted Chromosomal Mutagenesis Using Zinc Finger Nucleases" 인 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2003/087341 A2 호). 유기체의 내인성 DNA 복구 기계를 사용하여 ZFNs는 게놈의 표적 영역을 정확하게 변경하는데 사용될 수 있다. ZFNs는 돌연변이체 대립 유전자의 DNA에서 이중 가닥 파괴("DSBs")를 생성함으로써 이형접합 개체들에서 우세한 돌연변이를 비활성화하는데 사용될 수 있으며, 이는 동종 템플릿이 없는 경우에 비-동종 말단 결합(NHEJ)에 의해 복구될 것이다. NHEJ는 양단들을 함께 결합하여 DSBs를 복구하고 절단이 깨끗하고 복잡하지 않은 경우에 일반적으로 돌연변이를 일으키지 않는다. (Durai 등의 Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells, Nucleic Acids Res., 33(18):5978-90 (2005)). 이러한 복구 메커니즘은 indels 또는 염색체 재배열을 통해 게놈 오류들을 유도하고, 종종 그 위치에서 코딩된 유전자 생성물이 기능하지 않게 하는데 사용될 수 있다.

[0055] 대안적으로, DNA는 상동성 의존 복구(HDR)를 사용하여 외인성 이중 가닥 DNA 단편들의 존재하에서 게놈에 도입될 수 있다. DSBs를 복구하기 위한 상동성 서열에 대한 HDR의 의존성은 HDR 시스템에 의한 템플릿(template)으로서 사용될 때, 관심 있는 게놈 영역 내에서 원하는 변화의 생성으로 이어지는 DSB의 플랭킹 서열들(flanking sequences)과 상동인 서열 내에 원하는 서열을 삽입함으로써 이용될 수 있다.

[0056] 다수의 ZFNs 쌍은 또한 게놈 서열의 전체의 큰 세그먼트들을 완전히 제거하는데 사용될 수 있다(Lee 등의 Genome Res., 20 (1): 81-9 (2009); 및 Gregory 등의 2010 년 7 월 28 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Methods and Compositions for Treating Trinucleotide Repeat Disorders" 인 미국 특허 출원 공개 번호 2011/0082093 A1 호). 확장된 CAG/CTG 반복 트랙들은 헌팅턴 병(Huntington's disease), 근긴장성 이영양증(myotonic dystrophy), 및 여러 척수 소뇌성 실조증(spino cerebellar ataxias)을 포함한 12 가지 초과 유전적 신경계 질환의 유전적 근거이다. 인간 세포들에서 ZFNs가 DSBs를 CAG 반복으로 유도하고 반복을 긴 병리학적 길이에서 짧고 덜 독성인 길이로 축소할 수 있음이 입증되었다(Mittelman 등의 Zinc-finger directed double-strand breaks within CAG repeat tracts promote repeat instability in human cells, PNAS USA, 106 (24): 9607-12 (2009); 및 Miller 등의 2013 년 2 월 28 일자로 출원된 발명의 명칭이 "Methods and Compositions for Treating Huntington's Disease" 인 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0253040 A1 호).

[0057] **메가뉴클레아제 게놈 편집**

[0058] 선택된 실시예들에서, 본 명세서에 설명된 자동화 다중-모듈 세포 편집, 모듈 기기들 및 시스템들은 메가뉴클레아제 게놈 편집을 수행한다. 메가뉴클레아제는 1990 년대에 확인되었으며, 후속 연구는 이들이 게놈 상동 재조합을 효율적으로 유도하고, 게놈의 코딩 또는 비-코딩 영역들에서 돌연변이들을 생성하고, 게놈들의 코딩 영역

들의 판독 프레임들을 변경할 수 있기 때문에 특히 게놈 편집을 위한 유망한 도구들인 것으로 나타났다. (예를 들어, Epinat 등의 A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in eukaryotic cells, 예를 들어, yeast and mammalian cells, Nucleic Acids Research, 31(11): 2952-2962; Chouluka 등의 2014 년 12 월 30 일자로 허여된 발명의 명칭이 “Chromosomal Modification Involving the Induction of Double-stranded DNA Cleavage and Homologous Recombination at the Cleavage Site” 인 미국 특허 제 8,921,332 호 참조). 메가뉴클레아제의 높은 특이성은 다른 자연 발생 제한 효소들보다 높은 정밀도와 훨씬 낮은 세포 독성을 제공한다.

[0059] **전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 편집**

[0060] 선택된 실시예들에서, 본 명세서에 설명된 자동화 다중-모듈 세포 편집 모듈들, 기기들 및 시스템들은 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 편집을 수행한다. 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALENs)는 DNA의 특정 서열들을 절단하도록 조작될 수 있는 제한 효소들이다. 이들은 TAL 이펙터 DNA-결합 도메인을 DNA 절단 도메인(DNA 가닥들을 절단하는 뉴클레아제)에 융합시킴으로써 만들어진다. 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)는 실제적으로 임의의 원하는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있으며, 따라서 뉴클레아제와 조합될 때, DNA는 특정 위치들에서 절단될 수 있다. (예를 들어, Miller 등의 A TALE nuclease architecture for efficient genome editing, Nature Biotechnology, 29 (2): 14378 (2011); Boch의 Nature Biotech.,TALEs of genome targeting, 29(2): 135-6 (2011); Bonas 등의 2010 년 1 월 12 일자로 출원된 발명의 명칭이 “Modular DNA-binding Domains and Methods of Use” 인 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2010/079430 A1 호; Voytas 등의 2010 년 12 월 10 일자로 출원된 발명의 명칭이 “TAL Effector-Mediated DNA Modification” 인 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2011/072246 A2 호 참조).

[0061] ZFNs와 같이, TALENs는 DSBs를 유도함으로써 게놈들을 편집할 수 있다. 표적 영역들의 TALEN 생성 부위-특정 DSBs는 NHEJ 또는 HDR을 통해 복구되어 표적 게놈 편집들을 초래한다. TALENs는 외인성 이중 가닥 DNA 단편들의 존재하에서 indels, 재배열을 도입하거나 NHEJ를 통해 게놈에 DNA를 도입하는데 사용될 수 있다.

[0062] **RNA-유도 뉴클레아제(RGN) 편집**

[0063] 특정 양태들에서, 예시적인 실시예들의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들의 게놈 편집은 RNA-유도 뉴클레아제(RGNs)가 특정 표적 영역들을 유기체 게놈에 편집하는데 사용되는 클러스터된 규칙적으로 간격을 둔 짧은 팔린드롬(palindromic) 반복(CRISPR) 기술들을 이용한다. 합성 유도 RNA(gRNA)와 복합체화된 RGN을 세포 내로 전달함으로써, 세포의 게놈을 원하는 위치에서 절단하여 게놈의 표적 영역을 편집할 수 있다. 가이드 RNA는 RGN 단백질들이 표적 게놈 영역의 DNA를 인식하고 절단하는 것을 돕는다. 유도 RNA의 뉴클레오티드 서열을 조작함으로써, RGN 시스템은 절단을 위해 임의의 DNA 서열을 표적화하도록 프로그래밍될 수 있다.

[0064] 예시적인 실시예들의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들과 함께 사용되는 RGN 시스템은 원하는 표적 게놈 영역에서 절단 및 페이스트(paste) 할 수 있는 능력을 갖는 임의의 RNA-유도 뉴클레아제 시스템을 사용하여 게놈 편집을 수행할 수 있다. 특정 양태들에서, RNA-유도 뉴클레아제 시스템은 2 개의 분리된 RNA 분자들을 gRNA, 예를 들어, CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)로서 사용할 수 있다. 다른 양태들에서, gRNA는 crRNA 및 tracrRNA 서열 둘 다를 포함하는 단일 gRNA일 수 있다.

[0065] 특정 양태들에서, 게놈 편집은 표적 영역에 원하는 DNA 변화를 도입하고 표적 영역으로부터 프로토-스페이스 모티프(proto-spacer motif; PAM) 영역을 제거하여, 예를 들어, 표적 영역에 상보적인 합성 gRNA와 복합체를 이룬 RNA-유도 뉴클레아제에 노출될 때, 그 표적 영역에서 게놈의 임의의 추가 편집을 배제한다. 이러한 양태에서, 제1 편집 이벤트는 예를 들어, RGN-지정 편집 이벤트 또는 상동 재조합 이벤트일 수 있고, 원하는 편집을 갖는 세포들은 표적 영역에 상보적인 합성 gRNA와 복합체화된 RGN을 사용하여 선택될 수 있다. 제1 편집 이벤트를 거치지 않은 세포들은 절단될 것이며, 따라서 적절한 선택 기준하에서 계속 실행되지 않을 것이다. 원하는 돌연변이를 함유하는 세포들은 더 이상 필요한 PAM 부위를 함유하지 않기 때문에 절단되지 않을 것이며, 자동화된 다중-모듈 세포 편집 기기에서 계속 성장하고 전파될 것이다.

[0066] RGN 단백질 시스템이 선택을 위해 사용될 때, 이는 주로 필요한 절단 활동이며; 따라서 RNA-유도 뉴클레아제 단백질 시스템은 편집에 사용된 것과 동일할 수 있거나, 특정 PAM 부위를 사용하여 절단하는데 효율적이지만, 반드시 부위에서 편집하는데 효율적이지 않은 RGN 단백질 시스템일 수 있다. 선택에 사용된 뉴클레아제의 한 가지 중요한 양태는 이전 게놈 편집 조작의 편집 접근법을 사용하여 대체된 PAM 부위의 인식이다.

[0067] **동종 재조합에 의한 게놈 편집**

[0068] 다른 양태들에서, 예시적인 실시예들의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들의 게놈 편집은 cre-lox 기술 및 FRET 기술들을 포함한 상동성 재조합 방법들을 이용할 수 있다. 부위-특이적 상동성 재조합은 재조합 효소 인식에 필요한 짧은 특이적 DNA 서열들이, 재조합이 일어나는 유일한 부위들이라는 점에서 일반적인 상동성 재조합과 상이하다. 부위-특이적 재조합은 부위들을 인식하고 이들 부위들에서의 재조합을 촉진하기 위해 전문적인 재조합 효소가 필요하다. 각각 재조합 효소 및 특이적 동족 부위들을 포함하는 다수의 박테리오파지- 및 효모-유래 부위-특이적 재조합 시스템들은 DNA 통합의 목적으로 진행 세포들에서 작동하는 것으로 나타났으며, 따라서 본 발명의 사용에 적용될 수 있으며, 이들은 박테리오파지 P1 Cre/lox, 효모 FLP-FRT 시스템 및 티로신 계열의 부위-특이적 재조합 효소들의 Dre 시스템을 포함한다. 그러한 시스템들 및 사용 방법들은 예를 들어, 미국 특허 제 7,422,889 호; 제 7,112,715 호; 제 6,956,146 호; 제 6,774,279 호; 제 5,677,177 호; 제 5,885,836 호; 제 5,654,182 호; 및 제 4,959,317 호에 설명되며, 이들은 그러한 재조합 효소들을 사용하는 방법들을 교시하기 위해 인용에 의해 본 명세서에 포함된다. 박테리오파지 람다 Int 인테그라제, HK2022 인테그라제와 같은 티로신 계열의 다른 시스템들, 또한 박테리오파지 phiC31, R4Tp901 인테그라제와 같은 별도의 세린 계열 재조합 효소들에 속하는 시스템들은 그들 각각의 재조합 부위들을 사용하여 포유류 세포들에서 작동하는 것으로 공지되어 있으며, 또한 본 발명의 사용에 적용될 수 있다. 상동 재조합을 위한 예시적인 방법론들은 미국 특허 제 6,689,610 호; 제 6,204,061 호; 제 5,631,153 호; 제 5,627,059 호; 제 5,487,992 호; 및 제 5,464,764 호에 설명되어 있으며, 이들 각각의 전문은 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0069] **기기 구조**

[0070] 도 1a 및 도 1b는 카트리지 기반 소스 물질들(예를 들어, 시약들, 효소들, 핵산들, 세척액들 등)을 이용하는 예시적인 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기(100)를 도시한다. 기기(100)는 예를 들어, 실험실 환경 내에서 사용하기 위한 데스크탑 기기(desktop instrument)로서 설계될 수 있다. 기기(100)는 세포들에서 자동화 게놈 절단 및/또는 편집을 수행함에 있어서 다양한 단계적 조작들을 수행하기 위해 재사용 가능 및 일회용 요소들의 혼합을 포함할 수 있다. 카트리지 기반 소스 물질들은 예를 들어, 로봇 취급 시스템(108)에 의한 접근을 위해 기기(100)의 데크(deck)(102) 상의 지정된 구역들에 위치 설정될 수 있다. 도 1b에 예시된 바와 같이, 데크(102)는 보호 싱크(sink)를 포함하여 기기(100)의 임의의 모듈들로부터 유출, 적하 또는 넘치는 오염물들이 보호 싱크의 립 내(lip)에 담겨질 수 있다.

[0071] 도 1a를 참조하면, 일부 구현예들에서, 기기(100)는 DNA 샘플들 및 기타 소스 물질들을 기기(100)에 도입하기 위한 시약 카트리지(104), 용출액 및 기타 소스 물질들을 기기(100)에 도입하기 위한 세척 카트리지(106), 및 자동화 게놈 절단 및/또는 편집을 수행하기 위해 모듈들(예를 들어, 모듈들(110a, 110b 및 110c)) 카트리지 리셉터클들(예를 들어, 카트리지들(104 및 106)의 리셉터클들)과 기기(100)의 저장 유닛들(예를 들어, 유닛들(112, 114, 116 및 118)) 사이에서 물질들을 이동시키기 위한 로봇 취급 시스템(108)을 포함한다. 세포 공급물(106)의 처리가 완료되면, 일부 실시예들에서 세포 출력물은 로봇 취급 시스템(108)에 의해 임시 저장 및 이후 검색을 위해 예를 들어, 시약 카트리지(104) 또는 세척 카트리지(106)에 놓이는 저장 유닛 또는 리셉터클로 전달될 수 있다.

[0072] 로봇 취급 시스템(108)은 예를 들어, 카트리지들(104, 106)의 다양한 물질 소스들로부터 다양한 모듈들(110) 및 시약 카트리지(104) 또는 세척 카트리지(106) 내의 리셉터클일 수 있는 저장 유닛으로 액체들을 전달하기 위한 공기 변위 펌프(120)를 포함할 수 있다. 다른 실시예들에서, 로봇 취급 시스템(108)은 시약 카트리지(104) 및/또는 세척 카트리지(106)로부터 다양한 모듈들(110)로 소스 물질들의 용기들(예를 들어, 튜브들 또는 약병들)을 전달하기 위한 픽 앤 플레이스 헤드(pick and place head)(예시되지 않음)를 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 하나 이상의 카메라들 또는 다른 광학 센서들(도시되지 않음)은 갠트리(gantry)(122)를 따라 로봇 취급 장치의 적절한 운동 및 위치를 확인한다.

[0073] 일부 실시예들에서, 로봇 취급 시스템(108)은 기기(100) 내에서 소스 물질들, 시약(예를 들어, 핵산 어셈블리) 및 세포들을 전달하기 위해 전달 팁 공급부(116)(예를 들어, 피펫 팁 랙(pipette tip rack))에 제공된 일회용 전달 팁들을 사용한다. 사용된 전달 팁들(116)은 예를 들어, 고체 폐기물 유닛(112)에서 폐기될 수 있다. 일부 구현예들에서, 고체 폐기물 유닛(112)은 로봇 취급 시스템(108)의 픽 앤 플레이스 헤드로부터 튜브들, 팁들, 약병들 및/또는 필터들을 제거하기 위한 키퍼(kicker)를 포함한다. 예를 들어, 예시된 바와 같이 로봇 취급 시스템(108)은 필터 픽업 헤드(124)를 포함한다.

[0074] 일부 실시예들에서, 기기(100)는 공기 변위 펌프(120)에 연결되는 시퍼들(sippers)을 갖는 전기천공 큐벳들(cuvettes)을 포함한다. 일부 구현예들에서, 세포들 및 시약은 시퍼를 통해 전기천공 큐벳으로 흡입되고, 큐벳

은 기기(100)의 하나 이상의 모듈들(110)로 이동된다.

- [0075] 일부 구현예들에서, 기기(100)는 도 13의 처리 시스템(1310)과 같은 처리 시스템(126)에 의해 제어된다. 처리 시스템(126)은 사용자 입력에 기반하여 기기(100)를 작동시키도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 사용자 입력은 터치 스크린 제어 디스플레이(touch screen control display)(128)를 통해 기기(100)에 의해 수신될 수 있다. 처리 시스템(126)은 기기(100)의 다양한 모듈들(110)의 타이밍, 지속기간, 온도 및 다른 작동들을 제어할 수 있다. 도 1b를 참조하면, 처리 시스템(126)은 기기(100)의 작동을 위해 전원(150)에 연결될 수 있다.
- [0076] 도 1a를 참조하면, 시약 카트리리지(104)는 예시된 바와 같이, 16 개의 저장소(5 X 3 저장소의 매트릭스와 추가 저장소) 및 관류 형질전환 모듈(전기천공 장치)(110c)을 포함한다. 세척 카트리리지(106)는 예를 들어, 세척 용액들, 또는 반복적인 과정 전체에 걸쳐 종종 사용되는 용액들을 저장하기 위해 큰 튜브들 또는 저장소들을 수용하도록 구성될 수 있다. 또한, 일부 실시예들에서, 세척 카트리리지(106)는 소량의, 예를 들어, 소스 배지뿐만 아니라 편집된 세포를 위한 저장소 또는 보관소를 유지하기 위해 더 작은 수의 튜브들, 약병들 또는 저장소들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 세척 카트리리지(106)는 2 개 이상의 시약 카트리리지들(104)이 순차적으로 사용되고 교체될 때 체자리에 유지되도록 구성될 수 있다. 시약 카트리리지(104) 및 세척 카트리리지(106)가 별도의 카트리리지들로서 도 1a에 도시되지만, 다른 실시예들에서 세척 카트리리지(106)의 내용물들은 시약 카트리리지(104)에 통합될 수 있다. 추가 실시예들에서, 3 개 이상의 카트리리지들이 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기(100)에 로딩될 수 있다. 특정 실시예들에서, 자동 다중-모듈 세포 처리 기기(100)에서의 시약 카트리리지(104), 세척 카트리리지(106) 및 모듈들(110)의 다른 구성요소들은 키트(kit)로 함께 포장된다.
- [0077] 세척 및 시약 카트리리지들(104, 106)은 일부 구현예들에서 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기(100)에 사용하기 위해 제공된 일회용 키트들이다. 예를 들어, 사용자는 세포 처리를 활성화하기 전에 각각의 시약 카트리리지(104) 및 세척 카트리리지(106)를 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 채시(chassis) 내에서 개방하고 위치시킬 수 있다. 예시적인 채시는 도 2a 내지 도 2d와 관련하여 아래에서 더 상세히 논의된다.
- [0078] 일부 구현예들에서, 카트리리지들(104, 106)의 구성요소들은 로봇 취급 시스템(108)에 의한 인식을 위해 바 코드들(bar codes)과 같은 기계 판독 가능한 표시로 표시된다. 예를 들어, 로봇 취급 시스템(108)은 내용물들을 확인하기 위해 각각의 카트리리지들(104, 106) 내의 용기들을 스캔(scan)할 수 있다. 다른 구현예들에서, 기계 판독 가능한 표시는 각각의 카트리리지(104, 106) 상에 표시될 수 있고, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기(100)의 처리 시스템은 기계 판독 가능한 표시에 기반하여 저장된 물질들 맵(map)을 식별할 수 있다.
- [0079] 도 6a 및 도 6b를 참조하면, 일부 실시예들에서, 세척 카트리리지(106)는 한 쌍의 큰 병들(602), 4 개의 작은 튜브들(604) 세트 및 카트리리지 본체(608)에 유지된 큰 튜브(606)를 포함한 세척 카트리리지(600)이다. 일부 실시예들에서, 병들(602) 및 튜브들(604, 606) 각각은 시퍼(sipper) 또는 피펫터(pipettor)와 같은 자동화 액체 취급 시스템에 의한 접근을 위해 천공 가능한 호일(foil)로 밀봉된다. 다른 실시예들에서, 병들(602) 및 튜브들(604, 606) 각각은 밀봉 가능한 접근 개스킷(gasket)을 포함한다. 일부 실시예들에서, 병들(602) 및 튜브들(604, 606) 각각의 최상부에는 내용물들의 자동 식별을 위해 기계 판독 가능한 표시(예시되지 않음)가 표시된다.
- [0080] 일부 실시예들에서, 큰 병들(602)은 각각 세척 용액을 함유한다. 세척 용액은 동일하거나 상이한 세척 용액들일 수 있다. 일부 예들에서, 세척 용액들은 예를 들어, 완충액, 완충액과 10 % 글리세롤, 80 % 에탄올을 함유할 수 있다.
- [0081] 일부 구현예들에서, 커버(cover)(610)는 병들(602) 및 튜브들(604, 606)을 카트리리지 본체(608) 내에 고정한다. 도 6b를 참조하면, 커버(610)는 병들(602) 및 튜브들(604, 606) 각각에 접근하기 위한 구멍들을 포함할 수 있다. 또한, 커버(610)는 카트리리지의 유형을 식별하기 위한(예를 들어, 카트리리지 내용물들의 맵에 접근하기 위한) 기계 판독 가능한 표시(612)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 각각의 구멍은 개별 내용물들에 따라 별도로 표시될 수 있다.
- [0082] 도 6c 내지 도 6e를 참조하면, 일부 구현예들에서 시약 카트리리지(104)는 16 개의 작은 튜브들 또는 약병들(626)의 세트, 및 카트리리지 본체(622)에 유지된 관류 전기천공 모듈(624)을 포함한 시약 카트리리지(620)이다. 일부 실시예들에서, 작은 튜브들 또는 약병들(626) 각각은 시퍼(sipper) 또는 피펫터(pipettor)와 같은 자동화 액체 취급 시스템에 의한 접근을 위해 천공 가능한 호일로 밀봉된다. 다른 실시예들에서, 작은 튜브들 또는 약병들(626) 각각은 밀봉 가능한 접근 개스킷을 포함한다. 일부 실시예들에서, 작은 튜브들 또는 약병들(626) 각각의 최상부에는 내용물들의 자동 식별을 위해 기계 판독 가능한 표시(도시되지 않음)가 표시된다. 기계 판독 가능

한 표시는 바코드, QR 코드 또는 다른 기계 판독 가능한 코딩을 포함할 수 있다. 특정 용기를 식별하기 위한 다른 자동화 수단은 컬러 코딩, 심볼 인식(예를 들어, 텍스트, 이미지, 아이콘 등) 및/또는 형상 인식(예를 들어, 용기의 상대적 형상)을 포함할 수 있다. 용기 자체에 표시되기보다는, 일부 실시예들에서, 카트리지 본체 및/또는 카트리지 커버의 상부 표면은 내용물들을 식별하기 위한 기계 판독 가능한 표시를 포함할 수 있다. 작은 튜브들 또는 약병들은 각각 동일한 크기일 수 있다. 대안적으로, 다수 부피의 튜브들 또는 약병들이 시약 카트리지(620)에 제공될 수 있다. 예시적인 예에서, 각각의 튜브 또는 약병은 2 내지 20 mL, 4 내지 10 mL, 또는 약 5 mL를 유지하도록 설계될 수 있다.

[0083] 예시적인 예에서, 작은 튜브들 또는 약병들(626)은 각각 다음 물질들 중 하나를 보유할 수 있다: 벡터 골격, 올리고뉴클레오티드, 등온성 핵산 어셈블리용 시약, 사용자 제공 세포 샘플, 유도제, 완충액 중의 자기 비드들, 에탄올, 세포 선택용 항생제, 세포들 및 핵산들 용출 시약들, 오일 오버레이(oil overlay), 다른 시약들 및 세포 성장 및/또는 회복 배지.

[0084] 일부 구현예들에서, 커버(628)는 카트리지 본체(622) 내에 작은 튜브들 또는 약병들(626)을 고정한다. 도 6d를 참조하면, 커버(628)는 작은 튜브들 또는 약병들(626) 각각에 접근하기 위한 구멍들을 포함할 수 있다. 3 개의 큰 구멍들(632)은 사용자 공급 물질들을 추가하기 위한 위치들을 나타내기 위해 굵은(예를 들어, 청색) 띠로 개략적으로 표시된다. 사용자 공급 물질들은 예를 들어, 벡터 골격, 올리고뉴클레오티드 및 세포 샘플을 포함할 수 있다. 또한, 커버(610)는 카트리지의 유형을 식별하기 위한(예를 들어, 카트리지 내용물들의 맵에 접근하기 위한) 기계 판독 가능한 표시(630)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 각각의 구멍은 개별 내용물들에 따라 별도로 표시될 수 있다. 일부 구현예들에서, 사용자 공급 물질들의 위치를 보장하기 위해, 실험실 환경에서 충전하기 위해 제공된 약병들 또는 튜브들은 세포 샘플 약병 또는 튜브만이 세포 샘플 구멍에 끼워지고, 올리고뉴클레오티드 약병 또는 튜브만이 올리고뉴클레오티드 구멍에 끼워지는 등의 독특한 형상들 또는 크기들을 가질 수 있다.

[0085] 도 1a를 다시 참조하면, 갠트리(122)를 포함하는 로봇 취급 시스템(108)이 또한 예시된다. 일부 예들에서, 로봇 취급 시스템(108)은 Mannedorf, Switzerland, Hamilton Company of Reno, NV 소재의 Tecan Group Ltd.(예를 들어, Ott의 발명의 명칭이 “Pipetting device, fluid processing system and method for operating a fluid processing system” 인 W02018015544A1 호 참조), 또는 Fort Collins, CO. 소재의 Beckman Coulter, Inc(예를 들어, Striebl 등의 발명의 명칭이 “Methods and systems for tube inspection and liquid level detection” 인 US20160018427 A1 호 참조)에 의해 제작된 것들과 같은 자동화 액체 취급 시스템을 포함할 수 있다. 로봇 취급 시스템(108)은 공기 변위 피펫터(120)를 포함할 수 있다. 시약 카트리지들(104, 106)은 공기 변위 피펫터(120)와 같은 로봇 취급 시스템(108)의 액체 취급 기기와 특히 쉽게 통합될 수 있게 한다. 일부 실시예들에서, 공기 변위 피펫터(120)만이 갠트리(122)에 의해 이동되고 다양한 모듈들(110) 및 카트리지들(104, 106)은 정지 상태를 유지한다. 피펫 팁(116)은 공기 변위 피펫터(120)와 함께 사용하기 위해 제공될 수 있다.

[0086] 일부 실시예들에서, 자동화 기계식 모션 시스템(액추에이터)(도시되지 않음)은 XY 축 모션 제어부 또는 XYZ 축 모션 제어부를 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템 (100)의 하나 이상의 모듈들(110) 및/또는 카트리지들(104, 106)에 추가로 공급한다. 예를 들어, 사용된 피펫 팁들(116)은 로봇 취급 시스템에 의해 폐기물 보관소(112)에 놓일 수 있다. 예를 들어, 로봇 취급 시스템이 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기(100) 내의 다른 모듈들(110)로 물질들을 이동시킬 때 로봇 취급 시스템과의 충돌을 피하기 위해서 활성 모듈이 로봇 취급 시스템과 접촉-접근 가능하게 위치되도록 상승하거나 반대로 사용 후에 낮아질 수 있다.

[0087] 일부 구현예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기(100)는 시약 카트리지(104)에 포함된 관류 전기천공 모듈(110c)을 포함한다. 관류 전기천공 연결 브릿지(bridge)(132)는 예를 들어, 세포들 및 핵산들이 입력 채널을 통해 장치 내로 전달된 후에 관류 전기천공 장치와 맞물린다. 브릿지(132)는 액밀 시일 및 전극들에 대한 전기 연결뿐만 아니라 전기천공 모듈(110c) 내에서 전기천공을 수행하기 위한 제어를 제공한다. 예를 들어, 전기천공 연결 브릿지(132)는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기(100)의 전자 랙(rack)(136) 내의 관류 전기천공 제어부(134)에 연결될 수 있다.

[0088] 일부 구현예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기(100)는 이중 세포 성장 모듈들(110a, 110b)을 포함한다. 세포 성장 모듈들(110a, 110b)은 각각, 예시된 바와 같이 회전 세포 성장 약병(130a, 130b)을 포함한다. 세포 성장 모듈들(110a, 110b) 중 적어도 하나는 통합 여과 모듈(예시되지 않음)을 추가로 포함할 수 있다. 대안적인 실시예들에서, 여과 모듈 또는 세포 세척 및 농축 모듈은 (예를 들어, 도 12a 및 도 12b의 세포 성장 모듈(1210a) 및 여과 모듈(1210b)과 관련하여 설명된 바와 같이)세포 성장 모듈들(110a, 110b)로부터 대신 분리될

수 있다. 세포 성장 모듈들(110a, 110b)은 예를 들어, 도 8a 내지 도 8f의 세포 성장 모듈(800)과 관련하여 논의된 특징들 및 기능들을 각각 포함할 수 있다.

- [0089] 세포 성장 모듈들(110a, 110b) 중 하나 또는 둘 모두의 여과 부분은 일부 실시예들에서, 필터 카세트(118)에 저장된 교체 가능한 필터들을 사용한다. 예를 들어, 로봇 취급 시스템은 세포 성장 모듈(110a, 110b) 중 하나 또는 둘 모두와 함께 사용하기 위해 필터들을 픽업하고 필터와 맞물리기 위해 필터 픽업 헤드(124)를 포함할 수 있다. 필터 픽업 헤드는 필터를 성장 모듈로 전달하고, 성장 모듈로부터 세포들을 피펫팅 한 다음에, 세포들을 세척하고 전기적격성을 갖게 한다. 세포들로부터의 배지 및 세척 유체들은 폐기물 모듈(114)에 배치된다.
- [0090] 일부 구현예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기(100)는 시약 카트리지(104)에 제공된 물질들을 세포 편집을 위해 조립된 핵산으로 조합하기 위한 핵산 어셈블리 및 정제 기능(예를 들어, 핵산 어셈블리 모듈)을 포함한다. 또한, 탈염 또는 정제 조작은 조립된 핵산들을 정제하고 핵산들이 세포들 내로 보다 효율적으로 전기천공 되도록 완충액을 탈염시킨다. 핵산 어셈블리 및 정제 특징부는 반응 챔버 또는 튜브 리셉터클(도시되지 않음) 및 자석(도시되지 않음)을 포함할 수 있다.
- [0091] 예시적인 기기(100)가 모듈들(110)의 특정 배열을 포함하는 것으로 예시되지만, 이러한 구현예는 단지 예시적인 목적들을 위한 것이다. 예를 들어, 다른 실시예들에서, 다소간의 모듈들(110)이 기기(100) 내에 포함될 수 있고, 예를 들어, 하이브리도마를 생산하기 위한 세포 융합 모듈 및/또는 단백질 생산을 위한 모듈과 같은 상이한 모듈들이 포함될 수 있다. 또한, 특정 모듈들은 도 1a의 복제 세포 성장 모듈들(110a, 110b)과 같은 특정 실시예들 내에서 복제될 수 있다.
- [0092] 일부 실시예들에서, 세포들은 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기에 도입되기 전에 수정된다. 예를 들어, 세포들은 일반적으로 카나마이신 또는 클로람페니콜에 대한 항생제 내성 유전자로 표적 유전자를 대체하기 위해 λ 적색 시스템(λ red system)을 사용하여 수정될 수 있다. (Datsenko 및 Wanner의 One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products, PNAS USA, 97(12):6640-5 (2000); Stewart 등의 2003년 1월 21일자로 허여된 발명의 명칭이 “DNA Cloning Method Relying on the E. coli recE/recT Recombination System”인 미국 특허 제 6,509,156 B1 호 참조). 일부 실시예들에서, 세포들은 뉴클레아제용 발현 카세트를 포함한 벡터로 이미 형질전환되거나 형질감염되었을 수 있다. 다른 예에서, 원하는 유전자 편집이 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기에 도입되기 전에 (예를 들어, 상동성 지정 복구를 사용하여) 세포 집단에 도입될 수 있고, 시스템은 뉴클레아제를 사용하여 이들 편집들을 선택하고 그리고/또는 세포 집단에 추가 편집들을 추가하는데 사용된다.
- [0093] 도 2a 내지 도 2d는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 데스크탑 버전에서 사용하기 위한 예시적인 새시(200 및 230)를 예시한다. 예를 들어, 새시(200, 230)는 약 24 내지 48 인치의 폭, 약 24 내지 48 인치의 높이 및 약 24 내지 48 인치의 깊이를 가질 수 있다. 새시(200, 230) 각각은 자동화 세포 처리에 사용되는 다수의 모듈들 및 일회용 공급물들을 보유하도록 설계될 수 있다. 또한, 각각의 새시(200, 250)는 모듈들 사이에서 물질들을 이동시키기 위한 로봇 취급 시스템을 장착할 수 있다.
- [0094] 도 2a 및 도 2b는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 제1 예시적인 새시(200)를 도시한다. 예시된 바와 같이, 새시(200)는 커버(202)를 들어올리고 새시(200)의 내부에 접근하기 위한 핸들(204) 및 힌지들(206)을 갖는 커버(202)를 포함한다. 냉각 격자(214)는 내부 팬(도시되지 않음)을 통한 공기 흐름을 허용할 수 있다. 또한, 새시(200)는 조정 가능한 받침대(adjustable feet)(220)에 의해 들어 올려진다. 받침대(220)는 예를 들어, 새시(200) 아래에 추가적인 공기 흐름을 제공할 수 있다. 제어 버튼(216)은 일부 실시예들에서, 새시(200) 내에서 단일 버튼 자동 세포 처리의 시작 및 정지를 허용한다.
- [0095] 새시(200) 내부에서, 일부 구현예들에서 로봇 취급 시스템(208)은 물질들 카트리지들(212a, 212b) 및 모듈들 위에 갠트리(210)를 따라 배치된다. 제어 회로, 액체 취급 튜브들, 공기 펌프 제어부들, 밸브들, 열 유닛들(예를 들어, 가열 및 냉각 유닛들) 및 다른 제어 메커니즘들은 일부 실시예들에서, 제어 박스 영역(218)에서 새시(200)의 테크 아래에 배치된다.
- [0096] 예시되지 않았지만, 일부 실시예에서 디스플레이 스크린은 예를 들어, 커버(202)의 일부분을 덮는 새시(200)의 전면부에 위치될 수 있다. 디스플레이 스크린은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 상황에 관한 정보를 사용자에게 제공할 수 있다. 다른 예에서, 디스플레이 스크린은 세포 처리를 수행하기 위해 사용자로부터의 입력들을 수용할 수 있다.
- [0097] 도 2c 및 도 2d는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 제2 예시적인 새시(230)를 도시한다. 예시된 바와 같이,

새시(230)는 힌지(234)를 갖는 투명 도어(232)를 포함한다. 예를 들어, 도어는 지면 좌측으로 스윙하여 새시의 작업 구역에 대한 접근을 제공할 수 있다. 예를 들어, 사용자는 투명 도어(232)를 개방하여 시약 카트리지와 및 세척 카트리지와 같은 공급물들을 새시(230)에 로딩할 수 있다.

[0098] 일부 실시예들에서, 새시(230)의 전면은 도어(232)의 우측에 예시된 디스플레이(예를 들어, 터치 스크린 디스플레이 장치)(236)를 더 포함한다. 디스플레이(236)는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 상황에 관한 정보를 사용자에게 제공할 수 있다. 다른 예에서, 디스플레이(236)는 세포 처리를 수행하기 위해 사용자로부터의 입력들을 수용할 수 있다.

[0099] 새시(230)의 우측면에 있는 공기 격자(238)는 (예를 들어, 테크 위의)새시(230)의 (예를 들어, 테크 위의)작업 구역 내에 공기 흐름을 제공할 수 있다. 새시(230)의 좌측에 있는 제2 공기 격자(240)는 새시(230)의 (예를 들어, 테크 아래의)제어 박스 영역(242) 내에 공기 흐름을 제공할 수 있다. 예시되지 않았지만, 일부 실시예들에서 새시(200)의 받침대(220)와 같은 받침대는 새시(230)를 작업 표면 위로 상승시켜 추가의 공기 흐름을 제공할 수 있다.

[0100] 새시(230) 내부에서, 일부 구현예들에서 로봇 취급 시스템(248)은 카트리지들(252a, 252b), 물질 공급부(254a, 254b)(예를 들어, 피펫 팁들 및 필터들), 및 모듈들(256)(예를 들어, 이중 성장 약병들) 위에 갠트리(250)를 따라 배치된다. 일부 실시예들에서, 제어 회로, 액체 취급 튜브들, 에어 펌프 제어부들, 밸브들 및 다른 제어 메커니즘들은 제어 박스 영역(242)에서 새시(230)의 테크 아래에 배치된다.

[0101] 일부 실시예들에서, 액체 폐기물 유닛(246)은 새시(230)의 좌측 외벽에 장착된다. 액체 폐기물 유닛(246)은 예를 들어, 잠재적 오염을 피하고 액체 폐기물 유닛(246)의 신속한 비움 및 교체를 보장하기 위해서 새시(230)의 외부에 장착될 수 있다.

[0102] **핵산 어셈블리 모듈**

[0103] 본 개시의 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기의 특정 실시예들은 기기 내에 핵산 어셈블리 모듈을 포함한다. 핵산 어셈블리 모듈은 원하는 게놈 편집 이벤트들을 용이하게 하기 위해 필요한 핵산들을 수용하도록 구성된다. 핵산 어셈블리 모듈은 또한, 벡터 어셈블리를 위한 적절한 벡터 골격을 수용하고 이어서 관심 세포들의 형질 전환을 수행하도록 구성될 수 있다.

[0104] 일반적으로, 용어 "벡터(vector)"는 그것이 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터들은 단일 가닥, 이중 가닥 또는 부분 이중 가닥인 핵산 분자들; 하나 이상의 자유 말단들을 포함하고 자유 말단들이 없는(예를 들어, 원형) 핵산 분자들; DNA, RNA 또는 둘 모두를 포함하는 핵산 분자들; 및 당업계에 공지된 다른 종류의 폴리뉴클레오티드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 하나의 유형의 벡터는 "플라스미드(plasmid)"이며, 이는 예컨대, 표준 분자 클로닝 기술들(standard molecular cloning techniques)에 의해 추가 DNA 세그먼트들이 삽입될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 다른 유형의 벡터는 바이러스-유래 DNA 또는 RNA 서열들이 바이러스(예를 들어, 레트로바이러스, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 복제 결함 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스들)로 포장하기 위해 벡터에 존재하는 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터들은 또한, 숙주 세포로의 형질감염을 위해 바이러스에 의해 운반되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 벡터들은 이들이 도입되는 숙주 세포(예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터들 및 에피솜 포유동물 벡터)에서 자율 복제할 수 있다. 다른 벡터들(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)은 숙주 세포로 도입될 때 숙주 세포의 게놈에 통합되어 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터들은 이들이 작동 가능하게 연결되는 유전자들의 발현을 지정할 수 있다. 그러한 벡터들은 본 명세서에서 "발현 벡터들(expression vectors)"로 지칭된다. 재조합 DNA 기술들에 유용한 공통 발현 벡터들은 종종 플라스미드 형태이다. 벡터들에 대한 추가 논의가 본 명세서에서 제공된다.

[0105] 재조합 발현 벡터들은 형질전환에 적합한 형태의 핵산, 및 일부 핵산 서열들에 대해서, 숙주 세포에서의 핵산의 번역 및 발현을 포함할 수 있으며, 이는 발현될 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되는 하나 이상의 조절 요소들을 - 발현에 사용될 숙주 세포들에 기반하여 선택될 수 있음 - 재조합 발현 벡터들이 포함함을 의미한다. 재조합 발현 벡터 내에서, "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 관심 있는 뉴클레오티드 서열이 전사를 허용하고 일부 핵산 서열들에 대해서, (예를 들어, 시험 관내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포 내로 도입될 때 숙주 세포에서)뉴클레오티드 서열의 번역 및 발현을 허용하는 방식으로 조절 요소(들)에 연결되는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 적절한 재조합 및 클로닝 방법들은 2004 년 9 월 2 일자로 출원되어 US 2004-0171156 A1 호로 공개된 발명의 명칭이 "Recombinational Cloning Using Nucleic Acids Having Recombination

Sites”인 미국 특허 출원 일련번호 10/815,730 호에 개시되며, 이의 내용들은 모든 목적들을 위해 그 전문이 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.

- [0106] 일부 실시예들에서, 조절 요소는 전사를 유도하기 위해 그리고 일부 핵산 서열들에 대해서, 표적화 가능한 뉴클레아제 시스템의 하나 이상의 성분들의 번역 및 발현을 유도하기 위해 표적화 가능한 뉴클레아제 시스템의 하나 이상의 요소들에 작동 가능하게 연결된다.
- [0107] 일부 실시예들에서, 백터는 핵산 유도 뉴클레아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함할 수 있다. 핵산-유도 뉴클레아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 특정 세포들, 예컨대 원핵 또는 진핵 세포들에서의 발현을 위해 코돈(codon) 최적화될 수 있다. 진핵 세포들은 효모, 진균, 조류, 식물, 동물 또는 인간 세포들일 수 있다. 진핵 세포들은 비인간 영장류를 포함한 인간, 쥐, 생쥐, 토끼, 개, 또는 비인간 포유동물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 포유동물과 같은 특정 유기체의 세포들이거나 그로부터 유래된 세포들일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 백터는 전사될 때 유도 RNA를 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함할 수 있다.
- [0108] 핵산 어셈블리 모듈은 자동화 방식으로 매우 다양한 상이한 핵산 어셈블리 기술들을 수행하도록 구성될 수 있다. 개시된 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들의 핵산 어셈블리 모듈에서 수행될 수 있는 핵산 어셈블리 기술들은 PCR, BioBrick 어셈블리(Hillson의 2016년 6월 7일자로 허여된 발명의 명칭이 "Scar-less Multi-part DNA Assembly Design"인 미국 특허 제 9,361,427 호), Type IIS cloning(예들 들어, GoldenGate assembly; Weber 등의 2010년 7월 6일자로 출원된 발명의 명칭이 "System and Method of Modular Cloning"인 유럽 특허 출원 공개 번호 EP 2 395 087 A1 호), 및 Ligase Cycling Reaction(de Kok S, Rapid and Reliable DNA Assembly via Ligase Cycling Reaction, ACS Synth Biol., 3(2):97-106 (2014); Engler 등의 PLoS One, A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability, 3(11):e3647 (2008); Pachuk 등의 2000년 11월 7일자로 허여된 발명의 명칭이 "Chain Reaction Cloning Using a Bridging Oligonucleotide and DNA Ligase"인 미국 특허 제 6,143,527 호)를 포함한, 제한 엔도뉴클레아제를 사용하는 이들 어셈블리 방법들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 다른 실시예들에서, 개시된 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들에 의해 수행되는 핵산 어셈블리 기술들은 Gibson Assembly®, CPEC, SLIC, Ligase Cycling 등과 같은 핵산들의 인접한 부분들 사이의 중첩들에 기반한다. 추가 어셈블리 방법들은 효모에서의 갭 복구(Bessa의 Improved gap repair cloning in yeast: treatment of the gapped vector with Taq DNA polymerase avoids vector self-ligation, Yeast, 29(10):419-23 (2012)), 게이트웨이 클로닝(gateway cloning)(Ohtsuka, Lantibiotics의: mode of action, biosynthesis and bioengineering, Curr Pharm Biotechnol, 10(2):244-51 (2009); Hartley 등의 1999년 3월 30일자로 허여된 발명의 명칭이 "Recombinational Cloning Using Engineered Recombination Sites"인 미국 특허 제 5,888,732 호; Hartley 등의 2001년 8월 21일자로 허여된 발명의 명칭이 Recombinational Cloning Using Nucleic Acids Having Recombination Sites"인 미국 특허 제 6,277,608 호), 및 토포이소머라제-매개 클로닝(Udo의 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, PLoS One, 10(9): e0139349 (2015); Chestnut 등의 2005년 7월 12일자로 허여된 발명의 명칭이 "Methods and Reagents for Molecular Cloning"인 미국 특허 제 6,916,632 B2 호)를 포함한다. 이들 및 다른 핵산 어셈블리 기술들은 예를 들어, Sands 및 Brent의 Overview of Post Cohen-Boyer Methods for Single Segment Cloning and for Multisegment DNA Assembly, Curr Protoc Mol Biol., 113:3.26.1-3.26.20 (2016); Casini 등의 Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly, Nat Rev Mol Cell Biol., (9):568-76 (2015); Patron의 DNA assembly for plant biology: techniques and tools, Curr Opin Plant Biol., 19:14-9 (2014)에 설명되어 있다.
- [0109] 핵산 어셈블리는 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기에서 사용되는 핵산 어셈블리의 유형에 따라 온도 제어된다. 예를 들어, PCR이 핵산 어셈블리 모듈에서 이용될 때, 모듈은 온도들이 변성, 어닐링 및 확장 사이에서 순환할 수 있게 하는 열 순환 능력을 가질 것이다. 단일 온도 어셈블리 방법들이 핵산 어셈블리 모듈에 이용될 때, 모듈은 수행될 특정 어셈블리 과정을 최적화하는 온도에 도달하고 유지하는 능력을 가질 것이다. 이들 온도들 및 이들 온도들을 유지하기 위한 지속기간은 스크립트에 의해 실행되는 사전 프로그래밍된 매개변수들 세트에 의해 결정되거나, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템을 사용하여 사용자에게 의해 수동으로 제어될 수 있다.
- [0110] 일 실시예에서, 핵산 어셈블리 모듈은 도 4에 예시된 것과 같은 단일 등은 반응을 사용하여 어셈블리를 수행하

기 위한 모듈이다. 등은 어셈블리 모듈은 단일 등은 반응을 사용하여 분자 클로닝 방법을 수행하도록 구성된다. 특정 등은 어셈블리 방법은 서열 동일성에 기반하여 최대 15 개의 핵산 단편들을 동시에 조합할 수 있다. 어셈블리 방법은 일부 실시예들에서, 인접한 핵산 단편들과 대략 20 내지 40 개의 염기 중첩을 포함하는 조립될 핵산들을 제공한다. 단편들은 완충액 성분들과 함께 3 개의 효소-엑소뉴클레아제, 폴리머라제 및 리가제를 갖는 칩테일(cocktail)과 혼합된다. 과정은 등은이고 단일 반응 용기를 사용하여 1 단계 또는 2 단계 방법으로 수행될 수 있기 때문에, 등은 어셈블리 반응들은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 사용하는데 이상적이다. 1 단계 방법은 단일 단계 등은 과정을 사용하여 최대 5 개의 상이한 단편들을 조립할 수 있다. 효소들의 단편들 및 마스터 믹스(master mix)는 조합되어 50 °C에서 최대 1 시간 동안 배양된다. 최대 15 개의 단편들을 갖는 더 복잡한 구성들을 생성하거나 100 bp로부터 10 kb까지의 단편들을 통합하기 위해 전형적으로 2 단계가 사용되며, 여기서 2 단계 반응은 마스터 믹스를 두 번의 별도의 첨가를 요구하는데, 하나는 엑소뉴클레아제 및 어닐링 단계용이고 다른 하나는 폴리머라제 및 절찰 단계용이다.

[0111] 도 4는 통합 정제를 갖는 예시적인 등은 핵산 어셈블리 모듈(400)을 예시한다. 등은 핵산 어셈블리 모듈(400)은 (예를 들어, 피펫 또는 시퍼를 통해)등은 핵산 어셈블리 모듈(400)로 그리고 그로부터 액체들을 전달하기 위한 접근 개스킷(404)을 갖는 챔버(402)를 포함한다. 일부 실시예들에서, 접근 개스킷(404)은 챔버(402) 내에 위치되는 교체 가능한 약병에 연결된다. 예를 들어, 사용자 또는 로봇 조작 시스템은 처리를 위해 약병을 등은 핵산 어셈블리 모듈(400) 내에 놓을 수 있다.

[0112] 챔버(402)는 저항 히터(408)와 하우징(406)을 공유한다. 일단 샘플이 등은 핵산 어셈블리 모듈(400)의 챔버(402)에 도입되면, 저항 히터(408)는 챔버(402)의 내용물들을 원하는 온도로 가열하는데 사용될 수 있다. 열 램핑(thermal ramping)은 챔버(402)의 내용물들(예를 들어, 로봇 조작 시스템의 피펫터 또는 시퍼 유닛을 통해 접근 개스킷(404)을 통해 공급되는 물질들)에 기반하여 설정될 수 있다. 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템의 처리 시스템은 표적 온도 및 열 램핑 계획을 결정할 수 있다. 열 램핑 및 표적 온도는 하우징(406) 내에 포함된 서미스터(410)와 같은 열 센서를 모니터링함으로써 제어될 수 있다. 특정 실시예에서, 저항 히터(408)는 하우징(406) 내의 온도를 20 °C 내지 80 °C, 25 °C 내지 75 °C, 37 °C 내지 65 °C, 40 °C 내지 60 °C, 45 °C 내지 55 °C 또는 바람직하게는 약 50 °C로 유지하도록 설계된다.

[0113] 정제 모듈

[0114] 일부 실시예들에서, 핵산 조립 모듈이 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기에 포함될 때, 기기는 또한, 핵산 어셈블리 혼합물(예를 들어, 염류, 미네랄들)의 원치 않는 성분들을 제거하기 위한 정제 모듈을 포함할 수 있으며, 특정 실시예들에서, 조립된 핵산들을 농축시킨다. 핵산 조립 후 액체를 교환하는 방법들의 예들은 자성 비드들(예를 들어, 캘리포니아 칼스배드 소재의 Invitrogen Corp.에 의한 SPRI 또는 Dynal(Dynabeads)), 실리카 비드들, 실리카 스핀 컬럼들, 유리 비드들, 침전(예를 들어, 에탄올 또는 이소프로판올을 사용함), 알칼리성 용해, 삼투 정제, 부탄올 추출, 막 기반 분리 기술들, 여과 등을 포함한다.

[0115] 일 양태에서, 정제 모듈은 여과, 예를 들어, 한외여과(ultrafiltration)를 제공한다. 예를 들어, 다양한 다공성들의 이방성 친수성 셀룰로오스 막들이 끼워진 다양한 미세 농축기들이 이용 가능하다. (예를 들어, Juan, Li-Jung 등의 "Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation." Journal of Biological Chemistry 275.27 (2000): 20436-20443에 사용된 Millipore SCX microconcentrators 참조). 다른 예에서, 정제 및 농축은 조립된 핵산들 및 이온성 염을 포함하는 액체 샘플을 불용성 포스페이트 염을 포함한 이온 교환기와 접촉시키고, 액체를 제거하고, 이온 교환기로부터 핵산을 용출시키는 것을 포함한다.

[0116] 정제 모듈의 특정 양태에서, 0.6 내지 2.0x 부피의 SPRI 비드들이 핵산 어셈블리에 첨가될 수 있는 SPRI 비드들이 사용될 수 있다. 핵산 어셈블리 생성물은 SPRI 비드들에 결합되고, SPRI 비드들은 펠릿을 보유한 튜브, 용기 또는 챔버에 가깝게 자석을 자동으로 위치시킴으로써 펠릿화된다. 예를 들어, 0.6 내지 2.0x 부피의 SPRI 비드들이 핵산 어셈블리에 첨가될 수 있다. 예를 들어, SPRI 비드들은 에탄올로 세척될 수 있고, 결합된 핵산 어셈블리 생성물은 예를 들어, 물, 트리스 완충액 또는 10 % 글리세롤에서 용출된다.

[0117] 특정 양태에서, 자석은 자석을 위치시키는 선형 액추에이터에 결합된다. 일부 구현예들에서, 핵산 어셈블리 모듈들은 통합된 어셈블리 및 정제를 위해 설계된 조합식 어셈블리 및 정제 모듈이다. 예를 들어, 등은 핵산 어셈블리 모듈과 관련하여 위에서 논의된 바와 같이, 일단 등은 핵산 어셈블리 반응이 발생하는데 충분한 시간이 경과하면 챔버(402)의 내용물들(예를 들어, 등은 핵산 어셈블리 시약들 및 핵산들)은 일부 실시예들에서 자성 비드들(도시되지 않음)과 조합되어 정제 과정을 활성화시킨다. 완충액 중의 SPRI 비드들은 예를 들어, 로봇 취급 시스템에 의해 등은 핵산 어셈블리 모듈의 내용물들로 전달된다. 그 후, 일부 실시예들에서, 솔레노이드

(solenoid)(412)는 챔버(402) 내에 포함된 자기 비드들을 여기시키기 위해 자석에 의해 작동된다. 특정 예에서, 솔레노이드는 챔버(402) 내의 자기 비드들에 2 파운드 자기 인장력 내지 5 파운드 자기 인장력, 또는 대략 4 파운드 자기 인장력을 부여할 수 있다. 챔버(402)의 내용물들은 조립된 백터 및 올리고뉴클레오티드가 자기 비드들에 결합하는데 충분한 시간 동안 배양될 수 있다.

[0118] 결합 후, 일부 구현예들에서, 결합된 등은 핵산 어셈블리 믹스(예를 들어, 등은 핵산 어셈블리 시약 + 조립된 백터 및 올리고뉴클레오티드)가 등은 핵산 어셈블리 모듈로부터 제거되고 비드들에 부착된 핵산들이 80 % 에탄올로 1 회 내지 수회 세척된다. 세척되면, 비드들에 부착된 핵산들은 완충액으로 용출되고 형질전환 모듈로 전달된다.

[0119] 일부 구현예들에서, 약병은 처리를 위해 챔버(402)의 제자리에 잠겨진다. 예를 들어, 사용자는 피펫터 또는 시퍼와 맞물릴 때 약병을 유지하도록 설계된 챔버(402)에서 멈춤쇠를 넘어 약병을 가압할 수 있다. 다른 예에서, 사용자는 약병을 제자리로 비틀어, 돌기를 대응하는 채널에 맞물림시키고 상향 운동을 차단할 수 있다. 위치 센서(도시되지 않음)는 약병의 후퇴를 보장할 수 있다. 특정 실시예에서, 위치 센서는 챔버(402)의 일부와 약병 사이의 맞물림을 검출하는 자기 센서이다. 다른 실시예들에서, 위치 센서는 수축된 위치에서 약병의 존재를 검출하는 광학 센서이다. 채널 및 돌기를 사용하는 실시예들에서, 돌기에 의해 가압된 기계식 스위치는 약병의 맞물림을 검출할 수 있다.

[0120] **성장 모듈**

[0121] 핵산들이 조립됨에 따라서, 세포들은 편집 준비를 위해서 성장될 수 있다. 세포 성장은 성장 모듈에서 측정되는 광학 밀도에 의해(예를 들어, OD 600 nm에서) 모니터링될 수 있고, 피드백 루프는 표적 시간에서 표적 OD에 도달하도록 세포 성장을 조정하는데 사용된다. 측정될 수 있는 세포 밀도 및 생리학적 상태의 다른 측정치들은 pH, 용존 산소, 방출된 효소들, 음향 특성들 및 전기적 특성들을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0122] 일부 양태들에서, 성장 모듈은 분광 광도계 또는 형광계에 의해 조사되는 셰이커(shaker) 또는 보텍서(vortexer) 내에 배양 튜브를 포함한다. 셰이커 또는 보텍서는 세포들을 가열 또는 냉각시킬 수 있으며 세포 성장은 실시간 흡광도 또는 형광 측정에 의해 모니터링된다. 일 양태에서, 세포들은 25 °C 내지 40 °C에서 1 내지 10 OD의 OD600 흡광도로 성장된다. 세포들은 또한, 25 °C 내지 35 °C, 25 °C 내지 30 °C, 30 °C 내지 40 °C, 30 °C 내지 35 °C, 35 °C 내지 40 °C, 40 °C 내지 50 °C, 40 °C 내지 45 °C 또는 44 °C 내지 50 °C의 온도 범위들에서 성장할 수 있다. 다른 양태에서, 세포들은 42 °C 내지 50 °C에서의 가열에 의해 또는 유도제를 첨가함으로써 유도된다. 세포들은 또한, 42 °C 내지 46 °C, 42 °C 내지 44 °C, 44 °C 내지 46 °C, 44 °C 내지 48 °C, 46 °C 내지 48 °C, 46 °C 내지 50 °C, 또는 48 °C 내지 50 °C의 범위들에서 가열함으로써 유도될 수 있다. 일부 양태들에서, 세포들은 유도 후 0 °C 내지 10 °C로 냉각된다. 세포들은 또한 유도 후에 0 °C 내지 5 °C, 0 °C 내지 2 °C, 2 °C 내지 4 °C, 4 °C 내지 6 °C, 6 °C 내지 8 °C, 8 °C 내지 10 °C, 또는 5 °C 내지 10 °C의 온도 범위들로 냉각될 수 있다.

[0123] 도 8a는 도 8b 및 도 8c에 예시된 세포 성장 장치(850)와 같은 세포 성장 장치와 함께 사용하기 위한 회전 성장 약병(800)의 일 실시예를 도시한다. 회전 성장 약병(800)은 일부 구현예들에서 액체 배지 및 세포들을 수용하기 위한 개방 말단(804), 세포들을 성장시키기 위한 1 차 용기를 한정하는 중심 약병 영역(806), 적어도 하나의 광 경로(808, 810)를 한정하는 테이퍼진 잘록한 영역(816), 폐쇄 말단(816) 및 구동 맞물림 메커니즘(812)을 갖는 투명한 용기이다. 회전 성장 약병(800)은 약병(800)이 회전하는 중심 중축(820)을 가질 수 있고, 광 경로들(808, 810)은 일반적으로 약병의 중축에 수직일 수 있다. 일부 예들에서, 제1 광 경로(810)는 테이퍼진 잘록한 영역(818)의 하부 수축 부분에 위치될 수 있다. 일부 구현예들에서, 구동 맞물림 메커니즘(812)은 약병(800)을 회전시키기 위해 구동 메커니즘(예를 들어, 액추에이터, 모터(도시되지 않음))과 맞물린다. 액추에이터는 구동 모터(864)를 위한 구동 샤프트(874)를 포함할 수 있다(도 8d).

[0124] 일부 실시예들에서, 회전 성장 약병(800)은 예를 들어, 테이퍼진 잘록한 영역(818)의 상부 테이퍼 영역에 제2 광 경로(808)를 포함한다. 일부 예들에서, 제2 광 경로(808)에 대한 테이퍼진 잘록한 영역(818)의 상부 테이퍼 영역을 한정하는 벽들은 제1 광로(810)에 대한 테이퍼진 잘록한 영역(810)의 하부 잘록한 부분을 한정하는 벽들보다 중축(820)에 대해 더 넓은 각도로 배치될 수 있다. 두 광 경로들(808, 810)은 예를 들어, 세포 배양액(세포들 + 성장 배지)으로 끊임없이 충전되는 회전 성장 약병(800)의 영역에 위치될 수 있고 성장 약병(800)의 회전 속도에 의해 영향을 받지 않는다. 예시된 바와 같이, 제2 광 경로(808)는 제1 광 경로(810)보다 더 짧아서 약병에서 세포 배양액의 OD 값들이 높은 수준에(예를 들어, 나중에 세포 성장 과정에) 있을 때 광학 밀도(OD) 값들의 민감한 측정을 허용하는 반면에, 제1 광 경로(810)는 약병에서 세포 배양액의 OD 값들이 더 낮은

수준에(예를 들어, 초기의 세포 성장 과정에) 있을 때 OD 값들의 민감한 측정을 허용한다.

[0125] 회전 성장 약병(800)은 재사용 가능할 수 있거나, 바람직하게 회전 성장 약병은 소모품이다. 일부 실시예들에서, 회전 성장 약병(800)은 소모품이며 성장 배지가 미리 충전된 사용자에게 제공될 수 있으며, 여기서 약병(800)은 개방 말단(804)에서 호일 시일로 밀봉된다. 그러한 방식으로 포장된 배지-충전된 회전 성장 약병은 독립형 세포 성장 장치 또는 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템의 일부인 세포 성장 모듈과 함께 사용하기 위한 키트의 일부일 수 있다. 약병에 세포들을 도입하기 위해, 사용자는 단지 원하는 부피의 세포들만을 피펫팅하고, 피펫 팁을 사용하여 약병(800)의 호일 시일을 통해 편칭할 필요가 있다. 대안적으로, 물론, 자동화 기기는 세포들을 예를 들어, 시약 카트리지로부터 성장 약병으로 전달할 수 있다. 성장 배지는 성장 약병에 제공될 수 있거나 또한 세포들을 첨가하기 전에 시약 카트리지로부터 성장 약병으로 전달될 수 있다. 개방 말단(804)은 연장된 립(802)을 포함하여 세포 성장 장치(850)와 중첩 또는 맞물릴 수 있다(도 8b 및 도 8c). 자동화된 기기들에서, 회전 성장 약병(800)은 도 13에 예시된 바와 같이 처리 시스템(1310)의 일부인 스캐너 또는 카메라에 의해 판독될 수 있는 바코드 또는 다른 식별 수단으로 태그될 수 있다.

[0126] 일부 구현예들에서, 회전 성장 약병(800)의 부피 및 세포 배양액(성장 배지 포함)의 부피는 크게 달라질 수 있지만, 회전 성장 약병(800)의 부피는 약병(800)이 회전하는 동안 성장 약병(800)의 세포 배양액이 적절한 통기를 얻는데 충분히 커야 한다. 실제로, 회전 성장 약병(800)의 부피는 1 내지 250 ml, 2 내지 100 ml, 5 내지 80 ml, 10 내지 50 ml, 또는 12 내지 35 ml의 범위일 수 있다. 마찬가지로, 세포 배양물(세포 + 성장 배지)의 부피는 회전 성장 약병(800)에서 적절한 통기를 허용하는데 적절해야 한다. 따라서, 세포 배양액의 부피는 성장 약병(800) 부피의 약 10 내지 85 %, 또는 성장 약병 부피의 15 내지 80 %, 또는 성장 약병 부피의 20 내지 70 %, 30 내지 60 %, 또는 40 내지 50 %이어야 한다. 일 예에서, 35 ml 성장 약병(800)에 대해서, 세포 배양액의 부피는 약 4 ml 내지 약 27 ml일 수 있다.

[0127] 회전 성장 약병(800)은 일부 실시예들에서 생체 적합성 투명 물질로 제조되거나 광 경로(들)를 포함한 약병(800)의 적어도 일부는 투명하다. 또한, 회전 성장 약병(800)이 제조되는 물질은 약 0 °C 이하로 냉각되고 약 75 °C 이상으로 가열, 예컨대 약 2 °C 또는 약 70 °C, 약 4 °C 또는 약 60 °C, 또는 약 4 °C 또는 약 55 °C 로 냉각되고 가열되어 온도 기반 세포 분석 및 저온에서의 장기 저장을 모두 수용해야 한다. 또한, 약병을 제조하는데 사용되는 물질은 바람직하게 회전하는 동안 변형 없이 55 °C까지의 온도를 견딜 수 있다. 적합한 물질들은 유리, 폴리 염화비닐, 폴리에틸렌, 폴리아미드, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리카보네이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMMA), 폴리설폰, 폴리우레탄 및 이들 및 다른 폴리머들의 공-중합체들을 포함한다. 바람직한 물질들은 폴리프로필렌, 폴리카보네이트 또는 폴리스티렌을 포함한다. 일부 실시예들에서, 회전 성장 약병(800)은 예를 들어, 사출 성형 또는 압출에 의해 저렴하게 제조된다.

[0128] 도 8b는 회전 성장 약병(800)의 대안적인 구현예인 회전 성장 약병(800b)의 평면도를 예시한다. 일부 예들에서, 약병(800b)은 약병(800b)의 중심을 향해 돌출하는 내부 표면에 부착된 하나 이상의 패들들(822)을 포함할 수 있다. 도 8b에 도시된 약병(800b)은 약병(800b)의 주변 주위에 실질적으로 동일하게 이격된 3 개의 패들들(822)을 포함하지만, 다른 예들에서 약병(800b)은 2 개, 4 개 또는 그 초과 패들들(822)을 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 패들들은 세포 성장 장치 내에서 회전하는 약병(800b) 내에 높은 혼합 및 통기를 제공하여 미생물 성장을 촉진시킨다.

[0129] 도 8c 및 도 8d는 회전 성장 약병(800)을 수용하는 예시적인 세포 성장 장치(850)의 도면들을 예시한다. 일부 실시예들에서, 세포 성장 장치(850)는 약병(800) 내의 세포들 또는 세포 성장을 미리 결정된 온도 범위로 가열 또는 냉각시키기 위해 회전한다. 일부 구현예들에서, 회전 성장 약병(800)은 메인 하우징(852)의 상부 표면을 지나 연장하는 약병(800)의 연장된 립(802)과 함께 메인 하우징(852) 내부에 위치될 수 있다. 일부 양태들에서, 연장된 립(802)은 사용자가 장치(850)의 메인 하우징(852)으로부터 약병(800)을 삽입하거나 회수하기 위한 파지 표면을 제공한다. 부가적으로, 메인 하우징(852) 내로 완전히 삽입될 때, 연장된 립(802)의 하부 표면은 메인 하우징(852)의 상부 표면에 인접한다. 일부 예들에서, 세포 성장 장치(850)의 메인 하우징(852)은 회전 성장 약병(800)의 외부 표면들이 메인 하우징(852)의 내부 표면들에 인접하여 약병(800)을 메인 하우징(852) 내에 고정하도록 크기가 정해진다. 일부 구현예들에서, 세포 성장 장치(850)는 메인 하우징(854)의 각각의 측면에 배치된 말단 하우징(854) 및 메인 하우징(852)의 하부 말단에 배치된 하부 하우징(856)을 포함할 수 있다. 일부 예들에서, 하부 하우징(856)은 세포 성장 장치(850)를 온도 제어(예를 들어, 가열/냉각) 메커니즘 또는 자동화 세포 처리 시스템의 새시와 같은 다른 구조물에 부착하는데 사용될 수 있는 플랜지들(858)을 포함할 수 있다.

- [0130] 도 8d에 도시된 바와 같이, 일부 구현예들에서, 세포 성장 장치(850)는 메인 하우징(852)에 삽입된 회전 성장 약병(800)의 수직 하중을 지지하는 메인 하우징(852)에 위치한 상부 베어링(860) 및 하부 베어링(862)을 포함할 수 있다. 일부 예들에서, 세포 성장 장치(850)는 또한, 메인 하우징(852)에 삽입될 때 약병(800)의 제1 광 경로(810) 및 제2 광 경로(808)와 정렬되는 1 차 광학 포트(866) 및 2 차 광학 포트(868)를 포함할 수 있다. 일부 예들에서, 1 차 및 2 차 광학 포트들(866, 868)은 광이 약병(800)을 통과하여 세포 성장 OD 측정들을 수행할 수 있게 하는 투명한 물질로 구성된 메인 하우징의 깎들, 개구들 또는 부분들이다. 광학 포트들(866, 868)에 더하여, 세포 성장 장치(850)는 광 경로(들)에 하나 이상의 조명 원들을 제공하는 방출 보드(board)(870), 및 광이 회전 성장 약병(800) 내의 세포 배양액을 통해 이동한 후에 광을 검출하기 위한 검출기 보드(872)를 포함할 수 있다. 일 예에서, 방출 보드(870) 상에 배치된 조명 원들은 세포 배양(예를 들어, 포유동물 세포들, 박테리아 세포들, 동물 세포들, 효모 세포들에 상관없이)에 전형적으로 사용되는 성장 배지와 상응하는 하나 이상의 표적 파장들에서 조명을 제공하는 발광 다이오드들(LEDs) 또는 포토다이오드들(photodiodes)을 포함할 수 있다.
- [0131] 일부 구현예들에서, 방출 보드(870) 및/또는 검출기 보드(872)는 방출 보드(870)에 의해 출력되는 광의 파장을 제어하고 검출기 보드(872)에서 감지된 조명을 수신하고 처리하는 처리 시스템(예를 들어, 처리 시스템 (126, 1220, 1310))에 유선 또는 무선 연결을 통해 통신 가능하게 연결된다. 원격 제어 가능한 방출 보드(870) 및 검출기 보드(872)는 일부 양태들에서, 세포 성장 과정 동안 자동화 OD 측정들을 수행하도록 제공한다. 예를 들어, 처리 시스템(126, 1220)은 OD 측정들이 수행되는 주기를 제어할 수 있으며, 이러한 주기는 미리 결정된 간격 또는 사용자 요청에 따른 주기일 수 있다. 또한, 처리 시스템(126, 1220)은 검출기 보드 (872)로부터 수신된 센서 데이터를 사용하여 실시간 OD 측정들을 수행하고 세포 성장 조건들(예를 들어, 온도, 속도/회전 방향)을 조정할 수 있다.
- [0132] 일부 실시예들에서, 하부 하우징(856)은 회전 성장 약병(800)이 세포 성장 장치(850) 내에서 회전하게 하는 회전 운동을 발생시키는 구동 모터(864)를 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 모터(864)는 회전 성장 약병(800)의 하부 말단과 맞물리는 구동 샤프트(874)를 포함할 수 있다. 회전 성장 약병(800)에 대한 회전 운동을 발생시키는 모터(864)는 일부 실시예들에서, 0 내지 약 3000 RPM의 일정한 분당 회전 수(RPM)를 유지하도록 구성될 수 있는 내장 구동 제어부를 갖는 브러시리스(brushless) DC 타입 구동 모터이다. 대안적으로, 스테퍼 (stepper), 서보(servo) 또는 브러시 DC 모터와 같은 다른 모터 유형들이 사용될 수 있다. 선택적으로, 모터 (864)는 회전 방향의 역전을 허용하는 방향 제어부 및 실제 RPM을 감지 및 보고하는 타코미터(tachometer)를 가질 수 있다. 다른 예들에서, 모터(864)는 미리 결정된 주파수에서 회전 방향을 역전시킴으로써 진동 운동을 생성할 수 있다. 일 예에서, 약병(800)은 350 RPM의 속도로 1 초 동안 각각의 방향으로 회전된다. 모터(864)는 일부 구현예들에서, 모터(864)의 작동을 제어하도록 구성된 처리 시스템(예를 들어, 처리 시스템(126, 1220))에 유선 또는 무선 통신 네트워크를 통해 통신 가능하게 결합되며, 이는 예를 들어, 도 13의 모듈 제어기(1330)와 관련하여 설명된 바와 같이 프로세서 내에 프로그래밍되고/되거나 사용자 입력에 의해 제공되는 프로토콜들을 실행하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 모터(864)는 약병(800)의 속도 및/또는 회전 방향을 변화시켜 세포 배양액의 축 방향 침강을 유발하여 혼합을 향상시킴으로써 세포 응집을 방지하고 통기를 증가시키도록 구성될 수 있다. 일부 예들에서, 모터(864)의 회전 속도 또는 회전 방향은 검출기 보드(872)로부터 수신된 광학 밀도 센서 데이터에 기반하여 변할 수 있다.
- [0133] 일부 실시예들에서, 세포 성장 장치(850)의 메인 하우징(852), 말단 하우징(854) 및 하부 하우징(856)은 알루미늄, 스테인리스 강을 포함한 견고한 물질 및 플라스틱을 포함한 다른 열 전도성 물질들로 제조될 수 있다. 이들 구조물들 또는 그의 일부분들은 다양한 기술들, 예를 들어, 금속 제조, 사출 성형, 융합된 구조물 층의 생성 등을 통해 생성될 수 있다. 일부 예들에서 회전 성장 약병(800)이 재사용 가능하지만, 다른 실시예들에서 약병(800)은 바람직하게 소모품이다. 세포 성장 장치(850)의 다른 구성요소들은 일부 양태들에서, 바람직하게 재사용 가능하고 독립형 벤치탑 장치(benchtop device) 또는 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템의 모듈로서 기능을 할 수 있다.
- [0134] 일부 구현예들에서, 세포 성장 모듈에 통신 가능하게 결합된 처리 시스템은 성장하는 세포 배양액을 위한 "블랭크(blank)" 또는 제어부로서 사용될 정보로 프로그래밍될 수 있다. 일부 예들에서, "블랭크" 또는 제어부는 세포 성장 배지만을 함유하는 용기이며 이는 100 % 투과율 및 0 OD를 생성하는 반면에, 세포 샘플들은 광선을 편향시키고 낮은 백분율의 투과율 및 높은 OD를 가질 것이다. 세포들이 배지에서 성장하고 밀도가 높아짐에 따라서, 투과율이 감소하고 OD가 증가한다. 일부 구현예들에서, 세포 성장 모듈의 프로세서는 세포 배양(예를 들어, 포유동물 세포들, 박테리아 세포들, 동물 세포들, 효모 세포들에 관계없이)에 전형적으로 사용되는 성장

배지에 상응하는 블랭크들에 대한 과장 값들을 사용하도록 프로그래밍될 수 있다. 대안적으로, 제2 분광 광도계 및 용기가 세포 성장 모듈에 포함될 수 있으며, 여기서 제2 분광 광도계는 지정된 간격들로 블랭크를 판독하는데 사용된다.

[0135] 도 8e는 온도를 제어하고 세포 성장 약병(890)(도 8f) 내에서 혼합 및 통기를 촉진하기 위해 회전보다는 흔들림을 이용하는 다른 유형의 세포 성장 장치(880)를 예시한다. 일부 예들에서, 세포 성장 장치(880)는 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템으로의 통합을 위해 종래의 벤치탑 셰이커보다 크기가 더 작다. 일부 구현예들에서, 세포 성장 장치(880)는 세포 성장 약병(890)을 수용하는 하우징(884)을 포함한다. 일부 예들에서, 세포 성장 장치(880)는 약병(890) 아래에 위치되어 모터의 속도에 기반하여 약병(890)의 궤도 운동을 생성하는 모터 조립체를 포함할 수 있다. 일 예에서, 약병(890)은 750 RPM과 같은 600 내지 900 RPM에서 수평면에 있는 궤도를 따라 이동하는데, 이는 약 250 RPM에서 선회하는 더 큰 벤치탑 셰이커보다 상당히 더 빠르다. 일부 양태들에서, 흔들림 모션은 적어도 하나의 수평 평면에서 생성된다. 일부 예들에서, 진탕 세포 성장 장치(880)와 함께 사용되는 세포 성장 약병(890)은 종래의 벤치 셰이커에서 사용되는 플라스크(flask)와 실질적으로 형상이 유사한 원뿔형 바닥 튜브이다. 회전 세포 성장 장치(850)와 유사하게, 세포 성장 장치(880)는 세포 성장 과정 동안 자동화 OD 측정들을 수행하기 위한 조명 보드(870) 및 검출기 보드(872)를 포함할 수 있다. 일부 예들에서, 광원(882)은 검출기 보드에 의해 측정된 조명을 발생하는 세포 성장 장치(880)에 결합될 수 있으며, 이는 일부 예들에서 광원(882)으로부터 약병(890) 아래에 또는 약병(890)의 반대편에 위치된다.

[0136] 계놈 편집을 수용하지 않은 세포들의 배경을 감소시키기 위해, 성장 모듈은 또한, 편집된 세포들을 풍부하게 하는 선택 과정을 허용할 수 있다. 예를 들어, 도입된 핵산은 항생제 내성 또는 다른 선택 가능한 마커를 부여하는 유전자를 포함할 수 있다. 순차적인 편집 회차에 대한 선택 가능한 마커들 도입을 교대하는 것은 또한, 편집되지 않은 세포들의 배경을 제거할 수 있고 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기의 다중 사이클들이 순차적인 계놈 편집을 갖는 세포들을 선택할 수 있게 한다.

[0137] 적합한 항생제 내성 유전자들은 암피실린 내성 유전자, 테트라사이클린 내성 유전자, 카나마이신 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 카나바닌 내성 유전자, 블라스티시딘 내성 유전자, 하이그로마이신 내성 유전자, 푸로마이신 내성 유전자 및 클로람페니콜 내성 유전자와 같은 유전자들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시예들에서, 죽은 세포 배경의 제거는 세정제들, 삼투 스트레스(osmotic stress), 온도, 효소, 프로테아제, 박테리오파지, 환원제들 또는 카오트로프와 같은 용해 증진제들을 사용하여 보조된다. 다른 실시예들에서, 세포 제거 및/또는 배지 교환은 죽은 세포 배경을 감소시키는데 사용된다.

[0138] **세포 세척 및/또는 농축 모듈**

[0139] 세포 세척 및/또는 농축 모듈은 세포 환경에서 액체들을 교환하기 위한 임의의 방법을 이용할 수 있고, 세포들을 농축시키거나 세포가 핵산 어셈블리 모듈에 사용된 것과 본질적으로 동일하거나 더 큰 부피의 액체로 유지하게 할 수 있다. 또한, 일부 양태들에서, 세포 세척 모듈에서 수행되는 과정들은 또한, 예를 들어, 세척에서 글리세롤을 사용함으로써 세포들을 전기적격성으로 만든다.

[0140] 밀도 구배 정제, 투석, 이온 교환 컬럼들, 여과, 원심 분리, 희석 및 정제용 비드들의 사용을 포함한 다수의 상이한 방법들이 사용되어 세포들을 세척할 수 있다.

[0141] 일부 양태들에서, 세포 세척 및/또는 농축 모듈은 원심 분리 장치를 이용한다. 다른 양태들에서, 세포 세척 및/또는 농축 모듈은 여과 모듈을 이용한다. 또 다른 양태에서, 비드들은 세포 표면에 결합하는 모이어티들에 결합된다. 이들 모이어티들은 항체들, 렉틴들, 밀 배아 아글루티닌(wheat germ agglutinin), 돌연변이된 라이소자임들 및 리간드들(ligands)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0142] 다른 양태들에서, 세포들은 자화되도록 조작되어, 세척 단계들 후에 자석이 세포를 펠릿화할 수 있다. 세포 자화의 메커니즘은 페리틴 단백질 발현을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0143] 일부 구현예들에서, 세포 세척 및/또는 농축 모듈은 원심 분리 어셈블리 모듈이다. 도 3a 내지 도 3c를 참조하면, 일부 구현예들에서 원심 분리 어셈블리 모듈(300)은 핵산 어셈블리 물질들(예를 들어, 올리고, 벡터 골격, 효소 등)을, 로터(rotor)(308)에 연결된 약병 버킷들(buckets)(306a)에 위치한 하나 이상의 약병(304a, 304b)에 전달하기 위해 로봇 취급 시스템(도시되지 않음)에 의해 작동되도록 설계된 최상부 도어(302)를 포함한다. 일부 실시예들에서, 로봇 취급 시스템은 약병들(304a, 304b)을 원심 분리 어셈블리 모듈(300)로 전달한다. 다른 실시예들에서, 사용자는 약병 버킷들(306a, 306b) 내에 약병들(304a, 304b)을 배치한다. 일부 실시예들에서, 약병 버킷들(306a, 306b)은 약병 버킷들(306a, 306b)이 회전하는 동안 외측으로 스윙할 수 있도록

록 힌지 연결을 통해 로터(308)에 연결된다. 다른 실시예들에서, 버킷들(306a, 306b)의 위치는 고정된다.

[0144] 일부 실시예들에서, 원심 분리 어셈블리 모듈(300)은 기후 제어된다. 예를 들어, 내부 온도는 냉각 코일들(310) 및 절연체(312)에 의해 관리될 수 있다. 냉각제 공급 및 복귀 라인들(314)은 냉각제를 냉각 코일들(310)로 펌핑하여 원심 분리 어셈블리 모듈(300)의 챔버(316)를 냉각시킬 수 있다. 일부 예들에서, 원심 분리 어셈블리 모듈(300)은 챔버(316)를 0 °C 내지 10 °C, 2 °C 내지 8 °C, 가장 바람직하게 약 4 °C로 냉각시키도록 설계될 수 있다. 또한, 응축 제어는 챔버(316) 내의 습도를 제한하도록 제공될 수 있다. 일부 실시예들에서, 기후 제어는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템을 통해 설정된다. 예를 들어, 처리 시스템은 신호들을 회로(320)의 인터페이스들로 보낼 수 있다.

[0145] 일부 실시예들에서, 모터(318)는 로터(308)를 회전 구동시킨다. 모터(318) 및 따라서 로터(308)의 가속 및 감속은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템에 의해 제어될 수 있다. 예시된 바와 같이, 모션 센서(322)(예를 들어, 가속도계 또는 자이로스코프(gyroscope))는 회전 매개변수를 모니터링하도록 모터(318)의 베이스에 위치된다. 대안적으로, 가속도계 또는 자이로스코프와 같은 모션 센서(예시되지 않음)는 회전 매개변수를 모니터링하도록 챔버(316) 내에 놓일 수 있다. 예를 들어, 처리 시스템은 모션 센서로부터의 신호들을 모니터링하고 회전이 매개변수를 벗어나면 안전 차단을 실시하기 위한 조건들을 분석할 수 있다. 예시적인 실시예에서, 로터 암(rotor arm)은 최대 10000 분당 회전수(RPM), 최대 8000 RPM 또는 최대 약 6500 RPM으로 회전하도록 설계될 수 있다. 처리 시스템은 원심 분리 어셈블리 모듈(300)에 공급된 물질들에 기반하여 회전 속도를 변경할 수 있다.

[0146] 일부 구현예들에서, 세포 세척 및/또는 농축 모듈은 여과 모듈이다. 도 7a를 참조하면, 블록도는 여과 모듈(700)의 예시적인 기능 유닛들을 예시한다. 일부 구현예들에서, 여과 모듈(700)의 메인 제어부(702)는 세척 유체(706)를 흡입하기 위한 제1 액체 펌프(704a) 및 액체 폐기물을 액체 폐기물 유닛(708)(예를 들어, 도 1a의 액체 폐기물 유닛(114) 또는 도 12a 및 도 12b의 액체 폐기물 유닛(1228)과 같음)으로 제거하기 위한 제2 액체 펌프(704b)를 포함한다. 흐름 센서(712)는 커넥터(connector)(714) 상의 액체 폐기물 유닛(708)에 배치되어 여과 모듈로부터 액체 폐기물의 방출을 모니터링할 수 있다. 밸브(716)(예시된 바와 같은 3방 밸브)는 세척 유체(716)와 여과 모듈(700)을 선택적으로 연결하기 위해 커넥터(718) 상의 세척 유체(716)에 배치될 수 있다.

[0147] 일부 구현예들에서, 여과 모듈(700)은 세포 샘플을 여과 및 농축하기 위한 필터 매니폴드(filter manifold)(720)를 포함한다. 필터 매니폴드(720)는 세척 유체 및/또는 액체 폐기물의 흐름 및 온도를 모니터링하기 위한 하나 이상의 온도 센서(들)(722) 및 압력 센서(들)(724)를 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 센서들(722, 724)은 도 13의 처리 시스템(1310)과 같은 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템의 처리 시스템에 의해 모니터링되고 분석된다. 필터 매니폴드(720)는 세척 유체 및/또는 액체 폐기물의 흐름을 지향시키기 위한 하나 이상의 밸브들(726)을 포함할 수 있다. 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템은 예를 들어, 여과 모듈(700)에 의해 여과물을 지향시키기 위해 일련의 명령들에 따라 밸브들을 작동시킬 수 있다.

[0148] 여과 모듈(700)은 적어도 하나의 필터(730)를 포함한다. 여과 모듈(700)에 사용하는데 적합한 필터의 예들은 막 필터들, 세라믹 필터들 및 금속 필터들을 포함한다. 필터는 임의의 형상으로 사용될 수 있으며; 필터는 예를 들어, 원통형이거나 본질적으로 평탄할 수 있다. 주어진 작동 또는 주어진 작업 흐름에 대해 선택된 필터는 일부 실시예들에서, 작업 흐름의 유형(예를 들어, 박테리아, 효모, 바이러스 등) 또는 처리되는 물질들의 양에 의존한다. 예를 들어, 평탄한 필터들이 비교적 저렴하고 일반적으로 사용되지만, 원통형 필터들과 같이 더 큰 표면적을 갖는 필터들은 더 높은 유속들을 수용할 수 있다. 다른 예에서, 중공 필터들은 소량(예를 들어, 약 10 ml 미만)의 샘플을 처리할 때 더 낮은 회수율을 입증할 수 있다. 예를 들어, 박테리아와 함께 사용하기 위해, 사용된 필터는 막 필터, 특히 중공 섬유 필터인 것이 바람직할 수 있다. 용어 "중공 섬유(hollow fiber)"는 관형 막을 의미한다. 일부 예들에서, 튜브의 내경은 적어도 0.1 mm, 더 바람직하게 적어도 0.5 mm, 가장 바람직하게 적어도 0.75 mm이며, 바람직하게 튜브의 내경은 최대 10 mm, 더 바람직하게 최대 6 mm, 가장 바람직하게 최대 1 mm이다. 중공 섬유들을 갖는 여과 모듈들은 G.E. Life Sciences(Marlborough, MA) 및 InnovaPrep(Drexel, MO)를 포함한 다양한 회사들로부터 상업적으로 이용 가능하다(예를 들어, 발명의 명칭이 "Liquid to Liquid Biological Particle Concentrator with Disposable Fluid Path" 인 Page 등의 US20110061474A1 호 참조).

[0149] 일부 구현예들에서, 여과 모듈(700)은 사용 후 필터(730)를 배출하기 위한 필터 배출 수단(728)(예를 들어, 액추에이터)을 포함한다. 예를 들어, 사용자 또는 로봇 취급 시스템은 필터가 여과 동안 필터 매니폴드(720)에 의해 유지되도록 사용하기 위한 위치로 필터(730)를 푸시할 수 있다. 여과 후, 사용된 필터(730)를 제거하기

위해, 필터 배출 액추에이터(728)는 사용자 또는 로봇 취급 시스템이 사용된 필터(730)를 여과 모듈(700)로부터 제거할 수 있도록 필터(730)를 해제함으로써 필터(730)를 배출할 수 있다. 일부 예들에서, 사용된 필터(730)는 도 1a 및 도 1b의 고체 폐기물 유닛(112), 도 12a 및 도 12b의 고체 폐기물 유닛(1218) 내에 배치되거나, 도 7d에 예시된 바와 같이 필터 카트리리지(740)로 복귀될 수 있다.

[0150] 도 7d를 참조하면, 일부 구현예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 새시 내에 배치된 필터 카트리리지(740)에 제공된 필터들(730)은 로봇 취급 시스템(예를 들어, 도 1a 및 도 1b와 관련하여 설명된 로봇 취급 시스템(108), 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(1218))에 의해 여과 모듈(700)로 전달되고 사용 전에 여과 모듈(700) 내에 위치된다.

[0151] 일부 구현예들에서, 여과 모듈(700)은 주기적 세정을 필요로 한다. 예를 들어, 처리 시스템은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 사용자 인터페이스 및/또는 무선 메시징 수단(예를 들어, 문자 메시지, 이메일 및/또는 개인용 컴퓨팅 장치 애플리케이션(computing device application))을 통해 세정이 필요할 때 사용자에게 경고할 수 있다. 오염 제거 필터는 예를 들어, 여과 모듈(700)에 로딩될 수 있고 여과 모듈(700)은 세척 용액 및/또는 알코올 혼합물로 세정될 수 있다.

[0152] 일부 구현예들에서, 여과 모듈(700)은 커넥터(718)를 통해 세척 유체(716)를 포함하는 세척 카트리리지(710)(예컨대, 도 6a의 세척 카트리리지(600))와 유체 연결된다. 예를 들어, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 새시 내에 세척 카트리리지(710)의 사용자에게 의해 위치될 때, 커넥터(718)는 세척 카트리리지(710)의 바닥 입구와 정합하여 세척 유체(716)와 여과 모듈(700) 사이에 액체 통로를 생성할 수 있다.

[0153] 도 7b 및 도 7c를 참조하면, 일부 구현예들에서, 이중 필터 여과 모듈(750)은 이중 세척 저장소들(754) 위에 배치된 이중 필터들(752, 754)을 포함한다. 예에서, 각각의 필터는 0.45um 기공들 및 85 cm² 초과의 면적을 갖는 중공 코어(core) 섬유 필터일 수 있다. 세척 저장소들(754)은 일부 예들에서 부피가 50 mL, 100 mL 또는 200 mL를 초과할 수 있다. 일부 실시예들에서, 세척 저장소들(754)은 도 6a의 세척 또는 시약 카트리리지(600)와 같은 세척 카트리리지(756)에 배치된다.

[0154] 일부 구현예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템은 X(수평) 및 Z(수직) 방향으로 이중 필터들(752)의 작동을 제어하여 세척 저장소들 내에 필터들(752a, 752b)을 위치시킨다. 특정 예에서, 이중 필터들(752)은 X 축을 따라 함께 이동할 수 있지만, 독립적인 Z 축 모션 범위를 가질 수 있다.

[0155] 예시된 바와 같이, 여과 모듈(750)의 이중 필터들(752)은 가는 암 본체(slender arm body)(758)에 연결된다. 일부 실시예들에서, 여과 모듈(750)의 임의의 펌프들 및 밸브들은 본체(758)로부터 원격으로(예를 들어, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 새시의 바닥 내에) 배치될 수 있다. 이러한 방식으로, 여과 모듈(750)은 훨씬 더 큰 종래의 상업용 여과 모듈들을 대체할 수 있다.

[0156] 또한, 일부 실시예들에서, 여과 모듈(750)은 도 7a의 저장 유닛(708) 또는 도 1a의 액체 폐기물 저장 유닛(114) 또는 도 12a 및 도 12b의 액체 폐기물 저장 유닛(1228)과 같은 액체 폐기물 저장 유닛으로 액체 폐기물을 방출하도록 설계된 폐기물 정제 시스템과 액체 연통된다.

[0157] **형질전환 모듈**

[0158] 형질전환 모듈은 형질감염, 형질전환 및 미세 유체 분야의 당업자에 의해 일상적으로 사용되는 임의의 세포 형질전환 또는 형질감염 기술들을 구현할 수 있다. 마이크로퓨즈 튜브들(microfuge tubes), 테스트 튜브들, 큐벳들(cuvettes), 다중-웰 플레이트들(multi-well plates), 마이크로섬유들 및 흐름 기기들에서 형질전환이 발생할 수 있다. 형질전환 모듈의 온도 및 제어는 도 13의 처리 시스템(1310)과 같은 처리 시스템을 사용하여 제어될 수 있으며, 사용자에게 의해 및/또는 처리 시스템에 제공된 스크립트를 통해 제어부가 설정된다.

[0159] 형질전환은 외인성 핵산 서열(예를 들어, DNA)을 표적 세포로 도입하기 위한 다양한 당업계에 인정된 기술들을 포함하도록 의도되며, 본 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 모든 형질전환 및 형질감염 기술들을 포함한다. 그러한 방법들은 전기천공, 리포펙션(lipofection), 옵토퍼레이션(optoporation), 주입, 미세 침전, 미세 주입, 리포솜(liposomes), 입자 충격, 소노포레이션(sonoporation), 레이저 유도 천공, 비드 형질감염, 인산칼슘 또는 염화칼슘 공침(co-precipitation) 또는 DEAE-덱스트란-매개 형질감염(DEAE-dextran-mediated transfection)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 세포들은 예를 들어, 수크로오스(sucrose) 또는 글리세롤 세척을 사용하여 벡터 흡수를 위해 또한 준비될 수 있다. 또한, 기계적 및 화학적 형질감염 방법들의 능력들을 이용하는 하이브리드(hybrid) 기술들, 예를 들어, 화학적 형질감염과 기계적 방법들을 조합하는 자기감염(magnetofection)

인 형질감염 방법론이 사용될 수 있다. 다른 예에서, 양이온성 지질들(cationic lipids)은 유전자 총 또는 전기천공기들과 조합하여 배치될 수 있다. 표적 세포들을 형질전환 또는 형질감염시키기 위한 적합한 물질들 및 방법들은 예를 들어, "Green and Sambrook, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2014"에서 찾을 수 있다.

[0160] 전기천공 과정을 위해 세포들로 전기천공될 세포들 및 물질(시약)을 현탁시키는데 사용되는 배지 또는 완충액은 MEM, DMEM, IMDM, RPMI, Hanks', PBS 또는 Ringer's 용액을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 배지 또는 완충액 일 수 있으며, 여기서 배지는 키트의 일부로서 시약 카트리지에 제공될 수 있다. 대부분의 진행 세포들의 전기천공을 위해, 배지 또는 완충액은 일반적으로 적절한 삼투압을 유지하기 위해 염류를 함유한다. 배지 또는 완충액의 염류는 또한 배지를 전도성으로 만든다. 박테리아와 같은 매우 작은 원핵 세포들의 전기천공을 위해, 때때로 물 또는 10 % 글리세롤이 매우 높은 전기장 강도를 허용하기 위해 낮은 전도 매체로서 사용된다. 그 경우에, 전달될 하전된 분자들은 여전히 지질-기반 세포막들보다 물-기반 매체를 더욱 전도성으로 만들고, 그 매체는 특히 세포막들과 비교하여 대략적으로 여전히 전도성으로 간주될 수 있다.

[0161] 선택된 세포들 내로 전기천공될 화합물은 핵산들, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, DNA, RNA, 펩티드, 단백질들 및 호르몬들, 사이토카인, 케모카인, 약물들 또는 약물 전구체들과 같은 소분자들과 같은 전기천공에 유용한 것으로 당업계에서 공지된 임의의 화합물일 수 있다.

[0162] 세포들 내로 물질의 전기천공을 달성하는데 충분한 전압을 사용하는 것이 중요하지만, 너무 많은 전력과 같은 너무 많은 전압은 세포 생존력을 감소시킬 것이다. 예를 들어, 인간 세포주의 현탁액을 전기천공하기 위해서는 약 1000 μF 의 커패시터로부터 지수 방전을 갖는 4 mm-겹 큐벳에서 0.2 ml 샘플에 대해 200 볼트가 필요하다. 그러나 동일한 0.2 ml 세포 현탁액을 2 cm 전극 거리(큐벳 간격 거리의 5 배)를 가진 더 긴 용기에 놓으면, 필요한 전압은 1000 볼트이지만, 커패시터로부터의 전기 에너지가 다음 방정식을 따르기 때문에 단지 40 μF (1000 μF 의 1/25)의 커패시터가 필요하다:

[0163] $E=0.5 U^2 C$

[0164] 여기서, E는 전기 에너지, U는 전압, 그리고 C는 정전용량이다. 따라서, 고전압 펄스 발생기는 비슷한 양의 에너지를 저장하기 위해 훨씬 더 작은 커패시터가 필요하기 때문에 실제로 제조하기가 쉽다. 유사하게, 더 높은 전압들의 다른 파형들을 발생하는 것은 어렵지 않다.

[0165] 본 개시의 전기천공 장치들은 비교적 짧은 양의 시간 내에 높은 속도의 세포 형질전환을 허용할 수 있다. 세포 형질전환 속도는 세포 유형 및 형질전환되는 세포들의 수에 의존한다. 예를 들어, 대장균에 대해서, 전기천공 장치들은 초당 1 내지 10^{10} 개의 세포들, 초당 10^4 내지 10^7 , 초당 10^5 내지 10^8 , 또는 초당 10^6 내지 10^9 의 세포 형질전환 속도를 제공할 수 있다. 전기천공 장치들은 또한, 장치를 사용하여 단일 형질전환 절차에서 1 세포 내지 10^{10} 세포들 범위의 세포 배치들(batches)의 형질전환을 허용한다.

[0166] 본 개시의 전기천공 장치들을 사용한 형질전환의 효율은 세포들의 적어도 10 %가 생물학적 분자의 전달을 허용하도록 충분히 천공되게 할 수 있다. 바람직하게는, 본 개시의 전기천공 장치들을 사용한 형질전환 효율은 적어도 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % 또는 그 초과 효율을 초래하여 생물학적 분자의 전달을 허용하는데 충분히 세포들이 천공될 수 있다.

[0167] 일부 실시예들에서, 전기천공은 큐벳, 웰(well), 튜브, 챔버, 플로우 셀(flow cell), 채널 또는 피펫 팁에서 수행된다. 다른 실시예들에서, 큐벳, 웰, 튜브 또는 챔버는 바닥으로부터 충전되고 비워진다. 일부 실시예들에서, 큐벳은 바닥에 연결된 시피를 포함한다.

[0168] 도 5a는 최상부로부터 바닥으로, 자동 공기 변위 피펫(도시되지 않음)과 같은 피펫과 맞물리도록 구성된 맞물림 부재(504)를 둘러싸는 하우징(502) 및 필터 (506)를 포함한 예시적인 단일 유닛 전기천공 장치(500)(전기천공 모듈)를 도시한다. 하우징(502) 이외에, 전극들(512) 및 전기천공 챔버(516)의 벽들(514)을 포함한 전기천공 장치(500)의 전기천공 큐벳(510) 부분이 존재한다. 일부 예들에서, 챔버는 폭이 0.01 내지 100 mm, 높이가 1 내지 5,000 mm, 및 부피가 1 내지 20,000 μl 범위; 폭이 0.03 내지 50 mm, 높이가 50 내지 2,000 mm, 및 부피가 500 내지 10,000 μl ; 또는 폭이 0.05 내지 30 mm, 높이가 2 내지 500 mm, 및 부피가 25 내지 4,500 μl 범위 일 수 있다.

[0169] 일부 실시예들에서, 제1 저장소(508)는 필터(506)와 전기천공 챔버(516) 사이에 놓일 수 있고, 제1 저장소는 전기천공 챔버(516)와 유체 연통하여 전기천공 챔버(516)를 지나서 취할 수 있는 임의의 세포 샘플을 위한 빈 저

장소를 제공한다. 일부 예들에서, 제1 저장소(508)는 폭이 0.1 내지 150 mm, 높이가 0.1 내지 250 mm, 및 부피가 0.5 내지 10,000 μl ; 폭이 0.3 내지 100 mm, 높이가 30 내지 150 mm, 및 부피가 20 내지 4,000 μl ; 또는 폭이 0.5 내지 100 mm, 높이가 0.5 내지 100 mm, 및 부피가 5 내지 2,000 μl 범위일 수 있다.

[0170] 일부 구현예들에서, 전기천공 장치(500)는 (필터(506)를 통해)제1 저장소(508)와 유체 연통하는 다른 저장소(524)를 추가로 포함할 수 있다. 제2 저장소(524)는 필터(506)와 맞물림 부재(504) 사이에 놓여 필터(506)를 통과시킬 수 있는 임의의 액체들에 의한 오염으로부터 피펫을 보호할 수 있다. 일부 예들에서, 제2 저장소(524)는 폭이 0.1 내지 250 mm, 높이가 0.2 내지 1000 mm, 및 부피가 0.1 내지 2,500 μl ; 폭 0.1 내지 150 mm, 높이가 50 내지 400 mm, 및 부피가 1 내지 1,000 μl ; 또는 폭이 0.2 내지 100 mm, 높이가 0.5 내지 200 mm 및 부피가 2 내지 600 μl 범위일 수 있다.

[0171] 일부 실시예들에서, 시퍼(518)는 전기천공 챔버(516)와 유체 연통되고 그에 결합되며, 시퍼(518)는 전기천공 챔버(516)에 대한 근위 말단(520) 및 전기천공 챔버(516)로부터의 원위 말단(522)을 가진다. 시퍼(518)의 원위 말단(522)은 전기천공 장치(500)로부터 세포 샘플의 흡수 및 분배를 허용할 수 있다. 시퍼(518)는 일부 실시예들에서 로봇 조작 시스템의 일부이다. 시퍼(518)는 일부 예들에서, 폴리염화비닐, 폴리에틸렌, 폴리아미드, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 아크릴로니트릴 부타디엔, 폴리카보네이트, 폴리에테르에테르케톤(PEEK), 폴리설피론 및 폴리우레탄과 같은 플라스틱, 이들 및 다른 폴리머의 공중합체들, 유리(예컨대, 유리 모세관), 및 알루미늄, 스테인리스 강 또는 구리와 같은 금속 튜빙으로 만들어질 수 있다. 예시적인 물질들은 결정성 스티렌 및 시클릭 올레핀 공중합체를 포함한다. PEEK는 가격이 저렴하고 쉽게 제조할 수 있는 플라스틱이 선호된다. 일부 예들에서, 시퍼(518)는 폭이 0.02 내지 2,000 mm, 높이가 0.25 내지 2,000 mm, 및 부피가 1 내지 2,000 μl ; 폭이 0.02 내지 1,250 mm, 높이가 250 내지 1,500 mm, 및 부피가 1.5 내지 1,500 μl ; 또는 폭이 0.02 내지 10 mm, 높이가 4.0 내지 1,000 mm, 부피가 2.5 내지 1,000 μl 범위일 수 있다.

[0172] 일부 예들에서, 전기천공 장치(500)의 하우징(502) 및 맞물림 부재(504)는 실리콘, 수지, 폴리염화비닐, 폴리에틸렌, 폴리아미드, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 아크릴로니트릴 부타디엔, 폴리카보네이트, 폴리에테르에테르케톤(PEEK), 폴리설피론 및 폴리우레탄, 이들 및 다른 폴리머의 공중합체들로 제조될 수 있다. 유사하게, 일부 예들에서 전기천공 챔버의 벽(512)은 실리콘, 수지, 유리, 유리 섬유, 폴리염화비닐, 폴리에틸렌, 폴리아미드, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 아크릴로니트릴 부타디엔, 폴리카보네이트, 폴리에테르에테르케톤(PEEK), 폴리설피론 및 폴리우레탄, 이들 및 다른 폴리머의 공중합체들로 만들어질 수 있다. 예시적인 물질들은 결정성 스티렌 및 시클릭 올레핀 공중합체들을 포함한다. 이들 구조 또는 그의 일부분들은 다양한 기술들, 예를 들어, 사출 성형, 융합된 구조 층의 생성 등을 통해 생성될 수 있다. 폴리카보네이트 및 시클릭 올레핀 폴리머들이 바람직한 물질들이다.

[0173] 일부 실시예들에서, 전기천공 챔버(516)는 일반적으로 원통 형상이다. 다른 실시예들에서, 전기천공 챔버(516)는 직사각형, 원뿔형 또는 정사각형일 수 있다.

[0174] 필터(506)는 일부 예들에서 다공성 플라스틱, 소수성 폴리에틸렌, 면 또는 유리 섬유들로 형성될 수 있다. 바람직하게, 필터(506)는 다공성 플라스틱들과 같은 저비용 물질로 구성된다. 필터는 폭이 0.2 내지 500 mm, 높이가 0.2 내지 500 mm, 및 부피가 1 내지 3,000 μl ; 폭이 0.3 내지 250 mm, 높이가 20 내지 200 mm, 및 부피가 50 내지 2,500 μl ; 또는 폭이 0.5 내지 150 mm, 높이가 0.2 내지 80 mm, 및 부피가 10 내지 2,000 μl 범위일 수 있다.

[0175] 맞물림 부재(504)는 전기천공 기기에 사용되는 액체 취급 장치와 양립되는 치수를 갖도록 구성된다.

[0176] 전기천공 장치들의 구성요소들은 개별적으로 제조된 후 조립될 수 있거나, 전기천공 장치들의 특정 구성요소들은 단일 개체로서 제조 또는 성형될 수 있으며, 성형 후에 다른 구성요소들이 추가될 수 있다. 예를 들어, 시퍼, 전기천공 벽들 및 하우징은 단일 개체로서 제조되거나 성형될 수 있으며, 전극들, 필터, 맞물림 부재는 나중에 단일 개체에 추가되어 전기천공 모듈을 형성한다. 유사하게, 전기천공 벽들 및 하우징은 단일 개체로서 제조될 수 있으며, 성형 후에 전기천공 모듈에 시퍼, 전극들, 필터, 맞물림 부재가 추가된다. 통합 및 비-통합 구성요소들의 다른 조합들이 가능하다.

[0177] 전극들(512)은 전기장의 인가를 견딜 수 있는 구리, 티타늄, 알루미늄, 황동, 은, 로듐, 금 또는 백금, 또는 흑연과 같은 금속으로 형성될 수 있다. 예를 들어, 인가된 전기장은 알루미늄과 같은 금속들로 만들어진 전극들을 파괴할 수 있다. 다용도 전기천공 장치가 필요하다면, 전극 판들은 전기 화학 부식에 저항하는 금속들로 코팅될 수 있다. 귀금속들, 예를 들어, 금과 같은 전도성 코팅들이 전극 판들을 보호하는데 사용될 수 있다. 특

정 예에서, 전기천공 큐벳은 제1 금속 전극 및 금 층으로 덮인 티타늄으로 만들어진 제2 금속 전극을 포함할 수 있다. 반대로, 전기천공 장치(500)가 단일 용도(예를 들어, 일회용)로 설계되면, 알루미늄과 같은 덜 비싼 금속들이 사용될 수 있다.

- [0178] 일 실시예에서, 전극들 사이의 거리는 0.3 mm 내지 10 mm일 수 있다. 다른 실시예에서, 전극들 사이의 거리는 1 mm 내지 20 mm, 또는 1 mm 내지 10 mm, 또는 2 mm 내지 5 mm일 수 있다. 전기천공 챔버의 내경은 0.1 mm 내지 10 mm일 수 있다. 전극들 사이의 상이한 장 세기들을 피하기 위해서, 전극들은 전극들의 전체 표면에 걸쳐 서로 일정한 거리로 평행하게 배열되어야 한다. 바람직하게, 제1 금속 전극 및 제2 금속 전극은 +/- 20 μm 미만의 거리 변화들을 갖는 평행 배열로 2 내지 4 mm의 거리만큼 분리된다. 또한, 전극들의 표면은 핀 홀들(pin holes)이나 피크들(peaks)없이 가능한 한 매끄러워야 한다. 1 내지 10 μm의 조도(roughness)(Rz)를 갖는 전극들이 바람직하다. 다른 실시예들에서, 전기천공 장치는 예를 들어, 전기천공 장치의 시퍼 부분에 접지 전위를 인가하는 적어도 하나의 추가 전극을 포함한다.
- [0179] 단일 유닛 장치(500)로서 예시되지만, 다른 실시예들에서 전기천공 모듈은 다중 전기천공 유닛들을 포함한다. 각각의 전기천공 유닛은 1 μl 내지 20 ml의 세포 샘플 부피들을 전기천공하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 전기천공 유닛들의 상이한 부피 용량들이 다중 유닛 전기천공 장치에서 이용 가능할 수 있다.
- [0180] 다중 유닛 전기천공 모듈에서, 일부 실시예들에서 전극들은 독립된 독립형 요소들이다. 다른 실시예들에서, 다중 유닛 전기천공 장치는 인접한 전기천공 유닛들의 전기천공 큐벳들이 전극을 공유하도록 배열된 전극들을 포함할 수 있다. 그러한 다중 유닛 전기천공 장치들은 바람직하게 자동화 장치에서 예를 들어, 2 개 이상의 전기천공 유닛들, 4 개 이상의 전기천공 유닛들, 8 개 이상의 전기천공 유닛들, 16 개 이상의 전기천공 유닛들, 32 개 이상의 전기천공 유닛들, 48 개 이상의 전기천공 유닛들, 64 개 이상의 전기천공 유닛들, 또는 심지어 96 개 이상의 전기천공 유닛들을 포함할 수 있다. 다중 병렬 장치들이 사용되는 경우에, 전형적으로 각각의 유닛에 유사한 부피들이 사용된다.
- [0181] 예시적인 치수들이 제공되지만, 치수는 물론, 세포 샘플의 부피 및 전기천공될 세포들 및/또는 물질을 함유하는 데 사용되는 용기(들)에 따라 달라질 것이다.
- [0182] 바람직한 실시예들에서, 형질전환 모듈은 전기천공 챔버가 있는 하우징, 전기 펄스 발생기와 맞물리도록 구성된 제1 전극 및 제2 전극을 갖는 적어도 하나의 관류 전기천공 장치를 포함한다. 일부 구현예들에서, 관류 전기천공 장치들은 도 1a의 카트리지들(104, 106)과 같은 교체 가능한 카트리지(예를 들어, 형질전환 모듈(110c))와 정합하도록 구성되며, 그에 의해서 전기 접점들이 전기천공 장치의 전극들과 맞물린다. 특정 실시예들에서, 전기천공 장치들은 오토클레이브 가능하고 그리고/또는 일회용이며, 시약 카트리지 내에 시약과 함께 포장되고 그리고/또는 시약 카트리지로부터 제거될 수 있다. 전기천공 장치는 1 μl 내지 2 ml, 10 μl 내지 1 ml, 25 μl 내지 750 μl, 또는 50 μl 내지 500 μl의 세포 샘플 부피들을 전기천공하도록 구성될 수 있다. 개시된 전기천공 장치들로 전기천공될 수 있는 세포들은 포유동물 세포(인간 세포들 포함), 식물 세포들, 효모들, 다른 진핵 세포들, 박테리아, 고세균 및 다른 세포 유형들을 포함한다.
- [0183] 일부 실시예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템들(예를 들어, 도 1a의 카트리지(104))에 사용하기 위한 시약 카트리지들은 하나 이상의 전기천공 장치들(예를 들어, 도 1a의 전기천공 모듈(110c)), 바람직하게 관류 전기천공 장치들을 포함한다. 도 5b는 시약 카트리지의 일부일 수 있는 6 개의 공동 결합된 관류 전기천공 장치들(예를 들어, 유닛들 또는 모듈들)(532a 내지 532f)의 세트(530)의 저면 사시도이며, 도 5c는 그의 평면 사시도이다. 카트리지는 단일 기관(534)에 배열된 1 개 내지 6 개 또는 그 초과 of 관류 전기천공 유닛들(532a 내지 532f)을 포함할 수 있다. 6 개의 관류 전기천공 유닛들(532a 내지 532f)의 각각은 세포 샘플 입구들을 한정하는 대응하는 웰들(536a 내지 536f) 및 세포 샘플 출구들을 한정하는 웰들(538a 내지 538f)(도 5c 참조)을 가진다. 또한, 도 5b에서 볼 수 있듯이, 각각의 전기천공 유닛(532a 내지 532f)은 각각의 입구(540a 내지 540f), 각각의 출구(542a 내지 542f), 각각의 흐름 채널(544a 내지 544f), 및 관류 전기천공 유닛(532a 내지 532f)의 각각의 흐름 채널(544a 내지 544f) 내의 구조물의 어느 한 측면에 있는 두 개의 전극들(546a 내지 546f)을 포함한다.
- [0184] 일단 6 개의 관류 전기천공 유닛들(532a 내지 532f)이 제조되면, 일부 실시예들에서 이들은 인접한 유닛으로부터 각각의 유닛을 분리하는 스코어 라인들(score lines)을 따라 서로 분리될 수(즉, "부러져 떨어질 수(snapped apart)") 있고 한 번에 한 개가 사용될 수 있거나, 대안적으로 다른 실시예들에서 2 개 이상의 관류 전기천공 유닛들(532a 내지 532f)이 병렬로 사용될 수 있으며, 이 경우에 이들 2 개 이상의 유닛들은 바람직하게 스코어 라인들을 따라 연결된 상태로 유지된다.

- [0185] 일반적으로 말해서, 대략 10 ml 미만 및 1 μ l만큼 작은 세포 현탁액 부피들을 사용하는 미세 유체 전기천공법은 형질감염 또는 형질전환 과정보다 더 정밀한 제어를 허용하고 벤치-스케일(bench-scale)의 전기천공 장치와 비교해서 다른 세포 처리 도구들과의 유연한 통합을 허용한다. 따라서 미세 유체 전기천공법은 예를 들어, 단일 세포 형질전환, 처리 및 분석; 다중 유닛 전기천공 장치 구성들; 및 통합된 자동 다중-모듈 세포 처리 및 분석에 독특한 장점들을 제공한다.
- [0186] 시약 카트리지들에 포함된 관류 전기천공 장치들은 낮은 독성으로 고효율 세포 전기천공을 달성할 수 있다. 본 개시의 관류 전기천공 장치들의 특정 실시예들에서, 형질전환의 독성 수준은 세포 유형 및 세포들에 도입되는 핵산들에 따라서, 전기천공 후 10 % 초과, 바람직하게 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % 또는 심지어 95 % 초과와 생존 세포들을 초래한다.
- [0187] 형질전환 후, 세포들은 세포들에 도입된 핵산들의 형질전환 및 발현의 결과로서 발생하는 게놈 편집 과정을 촉진하는 조건들하에서 회수될 수 있다.
- [0188] **자동화 다중-모듈 세포 처리 방법**
- [0189] 도 9는 도 1a 및 도 1b 그리고 도 12a 및 도 12b에 예시된 시스템들과 같은 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템을 사용하기 위한 예시적인 방법(900)의 흐름도이다. 예를 들어, 도 13의 처리 시스템은 방법(900)의 처리 단계를 지시할 수 있다. 예를 들어, 소프트웨어 스크립트는 각각의 처리 단계에 대한 설정들 및 방법(900)의 액션들을 수행하기 위해 로봇 취급 시스템의 운동을 위한 명령들을 식별할 수 있다. 일부 실시예들에서, 소프트웨어 명령 스크립트(software instruction script)는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 공급된 카트리지에 의해 식별될 수 있다. 예를 들어, 카트리지는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 메모리(예를 들어, 도 13의 메모리(1302)와 같은)에 저장된 스크립트의 식별을 포함한 바코드 또는 QR 코드와 같은 기계 판독 가능한 표시를 포함할 수 있다. 다른 예에서, 카트리지는 무선 주파수(RF) 태그와 같은 기계 판독 가능한 표시에 내장된 다운로드 가능한 스크립트를 포함할 수 있다. 다른 실시예들에서, 사용자는 예를 들어, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템에 유선 또는 무선 연결을 통한 스크립트의 다운로드를 통해 또는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 사용자 인터페이스를 통한 저장된 스크립트의 선택을 통해 스크립트를 식별할 수 있다. 특정 예에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기는 사용자 설정들을 제출하고 세포 처리를 활성화하기 위한 터치 스크린 인터페이스를 포함할 수 있다.
- [0190] 일부 구현예들에서, 방법(900)은 세포들을 성장 모듈(902)로 전달하는 것으로 시작한다. 성장 모듈은 예를 들어, 도 8a 내지 도 8f와 관련하여 설명된 성장 모듈(800)일 수 있다. 특정 예에서, 처리 시스템(120)은 도 12a 및 도 12b와 관련하여 설명된 바와 같이 로봇 취급 시스템(108)으로 하여금 세포들(106)을 성장 모듈(110a)로 전달할 것을 지시할 수 있다. 다른 예에서, 도 1a와 관련하여 설명된 바와 같이, 세포들은 로봇 취급 시스템(108)에 의해 카트리지들(104, 106) 중 하나로부터 성장 모듈들(110a, 110b)로 전달될 수 있다. 일부 실시예들에서, 성장 약병은 성장 배지를 함유하고 예를 들어, 키트의 일부로서 공급될 수 있다. 다른 실시예들에서, 성장 약병은 예를 들어, 액체 취급 장치를 통해 시약 용기로부터 전달된 배지로 충전될 수 있다.
- [0191] 일부 실시예들에서, 세포들을 (예를 들어, 시약 카트리지(104)로부터 또는 기기에 추가된 약병으로부터) 전달하기 전에, 기계 판독 가능한 표시는 약병 또는 용기가 세포들을 포함한 것으로서 표시되어 있는지 확인하기 위해서 세포들에 대해 지정된 위치에 위치된 약병 또는 다른 용기에서 스캔될 수 있다. 또한, 기계 판독 가능한 표시는 기기에 제공된 세포들의 유형을 나타낼 수 있다. 일부 실시예들에서, 세포들의 유형은 기기로 하여금 특정 처리 스크립트(예를 들어, 로봇 취급 시스템에 대한 일련의 명령들 및 다양한 모듈들의 설정 및 활성화)를 선택하게 할 수 있다.
- [0192] 일부 구현예들에서, 세포들은 성장 모듈에서 원하는 광학 밀도(904)로 성장된다. 예를 들어, 도 1a 및 도 1b의 처리 시스템(126) 또는 도 12a 및 도 12b의 처리 시스템(1220)은 성장 주기 동안 세포들을 배양하기 위한 성장 모듈(110a)의 온도 설정을 관리할 수 있다. 처리 시스템(126, 1220)은 광학 밀도를 나타내는 성장 모듈(110a, 110b)로부터 센서 신호들을 추가로 수신하고 센서 신호들을 분석하여 세포들의 성장을 모니터링할 수 있다. 일부 실시예들에서, 사용자는 세포들의 성장을 관리하기 위한 성장 매개변수들, 예를 들어, 세포들의 온도 및 교반 정도를 설정할 수 있다. 또한, 일부 실시예들에서, 사용자는 성장 과정과 관련하여 업데이트될 수 있다. 일부 예들에서, 업데이트들은 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템의 사용자 인터페이스에 제시된 메시지, 사용자의 휴대폰 번호로의 문자 메시지, 이메일 계정으로의 이메일 메시지, 또는 휴대용 전자 장치(예를 들어, 휴대폰, 태블릿 등)에서 실행되는 앱으로 전송된 메시지를 포함할 수 있다. 메시지들에 응답하여, 일부 실시예들에서, 사용자는 온도와 같은 매개변수들을 수정하여 세포 성장을 조절할 수 있다. 예를 들어, 사용자는 자동화

다중-모듈 세포 처리 시스템의 사용자 인터페이스를 통해 또는 도 11의 사용자 인터페이스(1100)와 같은 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템과 통신하는 휴대용 컴퓨팅 장치 애플리케이션을 통해 업데이트된 매개변수들을 제출할 수 있다.

- [0193] 광학 밀도와 관련하여 설명되었지만, 다른 구현예들에서 성장 모듈 내의 세포 성장은 상이한 측정치의 세포 밀도 및 생리학적 상태, 예컨대 일부 예들에서 pH, 용존 산소, 방출된 효소들, 음향 특성들 및 전기적 특성들을 사용하여 모니터링될 수 있다.
- [0194] 일부 구현예들에서, 원하는 광학 밀도(904)에 도달하면, 세포들은 성장 모듈로부터 여과 모듈 또는 세포 세척 및 농축 모듈(906)로 전달된다. 예를 들어, 도 1a 및 도 1b의 로봇 취급 시스템(108) 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(1208)은 세포들을 성장 모듈(1210a)로부터 여과 모듈(1210b)로 전달할 수 있다. 여과 모듈은 예를 들어, 세포들이 전기 적격성을 갖도록 설계될 수 있다. 또한, 여과 모듈은 세포 샘플의 부피가 전기천공에 적절한 부피로 감소되도록 구성될 수 있다. 다른 예에서, 여과 모듈은 세포 샘플로부터 염류와 같은 원하지 않는 성분들을 제거하도록 구성될 수 있다. 일부 실시예들에서, 로봇 취급 시스템(108)은 셀을 세척하기 위해 세척 용액을 여과 모듈(1210b)로 전달한다.
- [0195] 일부 구현예들에서, 세포들은 전기 적격성이 있고 여과 모듈 또는 세포 세척 및 농축 모듈(908)에서 용출된다. 세척 용액을 사용하여 세포들이 용출될 수 있다. 예를 들어, 세포들은 시약 소스로부터의 시약들을 사용하여 용출될 수 있다. 여과 모듈 또는 세포 세척 및 농축 모듈은 예를 들어, 도 7a 및 도 7b에 예시된 여과 모듈(700)과 유사할 수 있다. 위에서 논의된 바와 같이, 밀도 구배 정제, 투석, 이온 교환 컬럼들, 여과, 원심 분리, 희석 및 정제용 비드들의 사용을 포함한, 다수의 상이한 방법들이 세포들을 세척하는데 사용될 수 있다. 일부 양태들에서, 세포 세척 및 농축 모듈은 원심 분리 장치를 사용한다. 다른 양태들에서, 여과 모듈은 여과 기기를 사용한다. 또 다른 양태들에서, 비드들은 세포 표면에 결합하는 모이어티에 결합된다. 이들 모이어티들은 항체들, 렉틴들, 밀 배아 아글루티닌, 돌연변이된 라이소자임 및 리간드들을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 다른 양태들에서, 세포들은 자화되도록 조작되어, 세척 단계들 후에 자석이 세포들을 켈릿화할 수 있다. 세포 자화의 메커니즘은 페리틴 단백질 발현을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0196] 일부 실시예들에서, 세척 용액은 용출 전에 여과 모듈로 전달된다. 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은 예를 들어, 세척 용액에 대해 지정된 위치에 위치한 약병 또는 용기로부터 세척 용액을 전달할 수 있다. 세척액을 전달하기 전에, 약병, 용기 또는 저장소의 내용물들을 확인하기 위해 세척액에 대해 지정된 위치에 위치한 약병 또는 다른 용기 또는 저장소에서 기계 판독 가능한 표시가 스캔될 수 있다. 또한, 기계 판독 가능한 표시는 기계에 제공된 세척 용액의 유형을 나타낼 수 있다. 세척 용액의 유형은 일부 실시예들에서 시스템이 특정 처리 스크립트(예를 들어, 특정 세척 용액에 적절한 여과 모듈의 설정들 및 활성화)를 선택하게 할 수 있다.
- [0197] 다른 실시예들에서, 세포들은 세척 카트리지의 세포 세척 모듈에서 용출된다. 예를 들어, 용출된 세포들은 도 1a에 예시된 세척 카트리지(106)의 빈 용기에 수집될 수 있으며, 로봇 취급 시스템(108)은 시약 카트리지(104) (또는 세척 카트리지(106)의 시약 웰)로부터 용출된 세포들로 배지를 전달할 수 있다.
- [0198] 일단 세포들이 여과 모듈(906)에 의한 형질전환을 위해 전기 적격성이 되게 하고 50 μ l 내지 10 ml, 또는 100 μ l 내지 80 ml, 또는 150 μ l 내지 8 ml, 또는 250 μ l 내지 7 ml, 또는 500 μ l 내지 6 ml, 또는 750 μ l 내지 5 ml과 같은 적절한 부피로 현탁되면, 일부 구현예들에서 세포들은 형질전환 모듈(918)로 전달된다. 도 1a 및 도 1b의 로봇 취급 시스템(108)은 예를 들어, 세포들을 여과 모듈로부터 형질전환 모듈(110c)로 전달할 수 있다. 여과 모듈은 형질전환 모듈에 물리적으로 결합될 수 있거나, 이들 모듈은 분리될 수 있다. 카트리지-기반 공급부들을 갖는 도 1a의 기기(100)와 같은 실시예에서, 세포들은 형질전환 모듈로 전달하기 전에 시약 카트리지(104)와 같은 카트리지 내의 저장소로 용출될 수 있다.
- [0199] 일부 구현예들에서, 핵산들은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기 외부에서 준비된다. 예를 들어, 조립된 벡터 또는 다른 핵산 어셈블리는 방법(900)에서 형질전환 과정 및 다른 과정들을 실행하기 전에 사용자에게 의해 시약으로서 포함될 수 있다.
- [0200] 그러나, 다른 구현예들에서, 핵산들은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 의해 준비된다. 일부 실시예들에서, 다음 단계들(910 내지 916)의 일부분은 단계들(902 내지 908)의 일부분과 병렬로 수행된다. 일부 실시예들에서, 다음 단계들의 적어도 일부분은 단계들(902 내지 908) 전 및/또는 후에 수행된다.
- [0201] 일부 구현예들에서, 편집 올리고뉴클레오티드 및 벡터 골격과 같은 핵산들뿐만 아니라 일부 예들에서 효소들 및

다른 반응 성분들은 핵산 어셈블리 모듈로 전달된다(910). 핵산 어셈블리 모듈은 자동화 방식으로 하나 이상의 폭넓은 다양한 상이한 핵산 어셈블리 기술들을 수행하도록 구성될 수 있다. 핵산 어셈블리 모듈에서 수행될 수 있는 핵산 어셈블리 기술들은 PCR, BioBrick 어셈블리, 유형 IIS 클로닝(예를 들어, GoldenGate 어셈블리) 및 리가제 사이클링(Ligase Cycling) 반응을 포함한 제한 엔도뉴클레아제를 사용하는 이들 어셈블리 방법들을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 다른 예들에서, 핵산 어셈블리 모듈은 Gibson Assembly®, CPEC, SLIC, Ligase Cycling 등과 같은 핵산들의 인접한 부분들 간의 중첩들에 기반하여 어셈블리 기술을 수행할 수 있다. 핵산 어셈블리 모듈에 의해 수행될 수 있는 추가의 예시적인 어셈블리 방법들은 효모에서의 겹 복구, 게이트웨이 클로닝 및 토포이소머라제-매개 클로닝을 포함한다. 핵산 어셈블리 모듈은 예를 들어, 도 4와 관련하여 설명된 핵산 어셈블리 모듈(400)일 수 있다. 특정 예에서, 처리 시스템(120)은 도 12b와 관련하여 설명된 바와 같이 로봇 취급 시스템(1208)으로 하여금 핵산들(1206)을 핵산 어셈블리 모듈(1210e)로 전달하도록 지시할 수 있다. 다른 예에서, 도 1a와 관련하여 설명된 바와 같이, 핵산들은 로봇 취급 시스템(108)에 의해 카트리지들(104, 106) 중 하나로부터 핵산 어셈블리 모듈로 전달될 수 있다.

[0202] 일부 실시예들에서, 각각의 핵산 샘플들, 효소들 및 다른 반응 성분들을 전달하기 전에, 기계 판독 가능한 표시는 이들 물질들에 대해 지정된 위치들에 위치된 약병들 또는 다른 용기들에서 스캔되어 약병들 또는 용기들이 예상 물질을 함유한 것으로 표시되어 있는지를 확인할 수 있다. 또한, 기계 판독 가능한 표시는 하나 이상의 핵산 샘플들, 효소들 및 기기에 제공된 다른 반응 성분들의 유형을 나타낼 수 있다. 일부 실시예들에서, 물질들의 유형(들)은 기기로 하여금 특정 처리 스크립트(예를 들어, 로봇 취급 시스템이 추가 물질들 및/또는 핵산 어셈블리 모듈의 설정들 및 활성화를 식별하기 위한 일련의 명령들)를 선택하게 할 수 있다.

[0203] 일부 실시예들에서, 핵산 어셈블리 모듈은 사용된 핵산 어셈블리의 유형에 따라 온도 제어된다. 예를 들어, PCR이 핵산 어셈블리 모듈에서 이용될 때, 모듈은 온도가 변성, 어닐링 및 확장 사이에서 순환할 수 있게 하는 열 순환 능력을 가질 수 있다. 단일 온도 어셈블리 방법들이 핵산 어셈블리 모듈에 이용될 때, 모듈은 수행되는 특정 어셈블리 과정을 최적화하는 온도에 도달하고 유지하는 능력을 가질 수 있다.

[0204] 일부 실시예들에서, 온도 제어는 도 13의 처리 시스템(1310)과 같은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템에 의해 관리된다. 이들 온도들 및 온도들을 유지하는 기간은 사전 프로그래밍된 매개변수들의 세트(예를 들어, 처리 스크립트 내에서 또는 처리 시스템에 의해 액세스 가능한 다른 메모리 공간에서 식별됨)에 의해 결정되거나 처리 시스템과의 인터페이스를 통해 사용자에게 의해 수동으로 제어될 수 있다.

[0205] 일단 어셈블리 반응이 일어나는데 충분한 시간이 경과되면, 일부 구현예들에서, 핵산 어셈블리는 정제 모듈로 전달된다(914). 처리 시스템은 예를 들어, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 제공된 반응 유형, 물질들 유형 및 사용자 설정들 중 하나 이상에 기반하여 어셈블리 반응의 타이밍을 모니터링할 수 있다. 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은 예를 들어, 시퍼 또는 피켓터 인터페이스를 통해 핵산 어셈블리를 정제 모듈로 전달할 수 있다. 다른 예에서, 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은 핵산 어셈블리를 함유하는 약병을 핵산 어셈블리 모듈의 챔버로부터 탈염/정제 모듈의 챔버로 전달할 수 있다.

[0206] 일부 구현예들에서, 핵산 어셈블리는 정제 모듈에서 탈염되고 용출된다(916). 정제 모듈은 예를 들어, 핵산 어셈블리 혼합물의 원치 않는 성분들(예를 들어, 염류, 미네랄들 등)을 제거할 수 있다. 일부 실시예들에서, 정제 모듈은 조립된 핵산들을 핵산 어셈블리 부피보다 더 작은 부피로 농축시킨다. 핵산 조립 후 액체를 교환하는 방법들의 예들은 자성 비드들(예를 들어, 캘리포니아 칼스베드 소재의 Invitrogen Corp.에 의한 SPRI 또는 Dynal(Dynabeads)), 실리카 비드들, 실리카 스핀 컬럼들, 유리 비드들, 침전(예를 들어, 에탄올 또는 이소프로판올을 사용함), 알칼리 용해, 삼투 정제, 부탄올로 추출, 막 기반 분리 기술들, 여과 등을 포함한다. 예를 들어, 다양한 다공성의 이방성 친수성-생성된 셀룰로오스 막이 끼워진 하나 이상의 미세 농축기가 사용될 수 있다. 다른 예에서, 탈염/정제 모듈은 혼합물을 불용성 포스페이트 염을 포함한 이온 교환기와 접촉시키고, 액체를 제거하고, 이온 교환기로부터 핵산을 용출시킴으로써 핵산 및 이온 염을 포함한 액체 샘플을 처리할 수 있다.

[0207] 예시적인 실시예들에서, 핵산 어셈블리는 정제 모듈의 챔버에서 SPRI 비드들과 같은 자기 비드들과 조합될 수 있다. 핵산 어셈블리는 핵산 어셈블리가 자성 비드들에 결합하는데 충분한 시간 동안 설정 온도에서 배양될 수 있다. 배양 후, 핵산 어셈블리가 세척되고 용출될 수 있도록 자석이 챔버에 근접하게 맞물릴 수 있다. 이러한 과정의 예시적인 예는 도 4의 조합식 등은 핵산 어셈블리 및 정제 모듈과 관련하여 논의된다.

[0208] 핵산 어셈블리가 용출되면, 핵산 어셈블리는 일부 구현예에서, 형질전환 모듈에 전달된다(918). 도 1a 및 도

1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은, 예를 들어, 위에 설명된 바와 같이 핵산 어셈블리를 시퍼 또는 피펫터 인터페이스를 통해서 형질전환 모듈에, 예를 들어, 큐벳-기반 전기천공기 모듈 또는 관류 전기천공기 모듈에 전달할 수 있다. 예를 들어, 전달 동안 탈염 조립된 핵산은 단계(908)로부터 전기 적격성 세포들과 조합될 수 있다. 다른 실시예에서, 형질전환 모듈이 전기 적격성 세포들 및 핵산 어셈블리의 각각을 별도로 수용할 수 있고 혼합을 가능하게 한다(예를 들어, 하나 이상의 채널들을 개방하여 공유된 챔버에서 물질들을 조합한다).

[0209] 세포들은 형질전환 모듈에서 형질전환될 수 있다(920). 형질전환은 일부 예들에서, 전기천공, 리포펙션(lipofection), 옵토포레이션(optoporation), 주입(injection), 미량침전(microprecipitation), 미세주입(microinjection), 리포솜들(liposomes), 입자 충격(particle bombardment), 소노포레이션(sonoporation), 레이저-유도 천공(laser-induced poration), 비드 형질감염(bead transfection), 인산칼슘 또는 염화칼슘 공침, 또는 DEAE-덱스트란-매개 형질감염을 포함한, 외인성 핵산 서열(예를 들어, DNA)을 표적 세포 내로 도입하기 위한 임의의-인지된 기술(형질전환 또는 형질감염중 어느 하나)을 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 기계적 및 화학적 형질감염 방법들의 성능들을 이용하는 하이브리드 기술들(hybrid techniques), 예컨대, 화학적 형질감염을 기계적인 방법들과 조합하는 형질감염 방법인 마그네토펙션(magnetofection)이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 양이온성 지질들이 유전자 총들(gene guns) 또는 전기천공기들과 조합하여 배치될 수 있다.

[0210] 일부 구현예들에서, 형질전환 모듈은 전기천공을 이용하여 DNA 물질의 흡수를 촉발시킨다. 완충액 또는 배지가 형질전환 모듈로 전달될 수 있고, 세포들에 첨가되어, 세포들이 전기천공 동안에 생존한 세포에 유리한 완충액 또는 배지에 현탁될 수 있게 한다. 완충액 또는 배지를 전달하기 전에, 기계-관독 가능한 표시가 완충액 또는 배지에 지정된 위치에 자리하는 약병 또는 다른 용기 또는 저장소 상에서 스캐닝되어 약병, 용기 또는 저장소의 내용물을 확인시켜 줄 수 있다. 추가로, 기계-관독 가능한 표시는 기기에 제공된 완충액 또는 배지의 유형을 나타낼 수 있다. 완충액 또는 배지의 유형은, 일부 실시예들에서, 기기가 특정의 처리 스크립트(processing script)(예를 들어, 특정의 완충액 또는 배지에 적절한 형질전환 모듈의 설정 및 활성화)를 선택할 수 있게 한다. 박테리아 세포 전기천공의 경우에, 낮은 전도성 배지, 예컨대, 물 또는 글리세롤 용액들이 일시적인 고전류에 의한 열 생성을 감소시키기 위해서 사용될 수 있다. 효모 세포들의 경우에, 소르비톨 용액이 사용될 수 있다. 포유동물 세포 전기천공의 경우에, 세포들이 높은 전도성 배지 또는 완충액, 예컨대, MEM, DMEM, IMDM, RPMI, 헵크액(Hanks' solution), PBS, HBSS, HeBS 및 링거액(Ringer's solution)에 현탁될 수 있다. 특정 예에서, 로봇 취급 시스템(108)은 카트리지들(104, 106) 중 하나로부터 완충액을 형질전환 모듈(110c)로 전달할 수 있다. 형질전환 모듈은, 예를 들어, 관류 전기천공 모듈, 예컨대, 도 5a 및 도 5b와 관련하여 설명된 전기천공 모듈일 수 있다. 도 1a 및 도 5b와 관련하여 설명된 바와 같이, 형질전환 모듈은 도 1a의 카트리지(104)를 구비한 일회용 관류 전기천공 모듈(110c)일 수 있다.

[0211] 일부 구현예들에서, 형질전환 모듈은 핵산 흡수를 위한 세포들을 추가로 준비한다. 예를 들어, 박테리아 세포들이 핵산들의 첨가 전에 수크로오스 또는 글리세롤 세척액으로 처리될 수 있고, 효모 세포들은 리튬 아세테이트, 디티오트레이톨(DTT) 및 TE 완충액의 용액으로 처리될 수 있다. 핵산 흡수를 위한 세포들의 준비를 포함하는 다른 구현예들에서, 여과 모듈 또는 또 다른 별도의 모듈(예를 들어, 세포 세척 모듈)이 핵산 업데이트를 위한 세포들을 준비할 수 있다.

[0212] 형질전환되면, 세포들은 제2 성장/회복/편집 모듈로 전달된다(922). 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은, 예를 들어, 시퍼(sipper) 또는 피펫터 인터페이스(pipettor interface)를 통해서 형질전환된 세포들을 제2 성장 모듈에 전달할 수 있다. 다른 예에서, 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은 형질전환된 세포들을 함유하는 약병을 형질전환 모듈의 챔버로부터 제2 성장 모듈의 챔버로 전달할 수 있다.

[0213] 제2 성장 모듈은 일부 실시예들에서, 회복 모듈로서 작용하여, 세포들이 형질전환 과정으로부터 회복되게 한다. 다른 실시예들에서, 세포들은 제2 성장 모듈에 전달되기 전에 별도의 회복 모듈에 제공될 수 있다. 회복 동안에, 제2 성장 모듈은 형질전환된 세포들이 도입된 핵산들을 흡수하고, 특정 양태들에서는, 도입된 핵산들을 세포의 계능 내로 통합되게 한다. 제2 성장 모듈은 세포 성장에 최적인 임의의 사용자-정의 온도, 바람직하게는 25°C, 30°C, 또는 37°C에서 세포들을 배양하도록 구성될 수 있다.

[0214] 일부 실시예들에서, 제2 성장 모듈은 항생제 또는 다른 시약을 기반으로 하여 형질전환된 세포들을 선택하는 선택 모듈로서 작용한다. 일 예에서, RNA-유도된 뉴클레아제(RGN) 단백질 시스템이 원하는 편집을 수용하지 않은 세포들의 계능들을 절단하기 위한 선택을 위해서 사용된다. 선택을 위해서 사용된 RGN 단백질 시스템은 편

집에 사용된 RGN과 동일 또는 상이할 수 있다. 항생제 선택 물질의 예에서, 항생제는 제2 성장 모듈에 첨가되어 선택이 일어나게 할 수 있다. 적합한 항생제 내성 유전자들은 암피실린-내성 유전자, 테트라사이클린-내성 유전자, 카나마이신-내성 유전자, 네오마이신-내성 유전자, 카나바닌-내성 유전자, 블라스티사이드-내성 유전자, 히그로마이신-내성 유전자, 퓨로마이신-내성 유전자, 또는 클로람페니콜-내성 유전자와 같은 유전자들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은 예를 들어, 시퍼 또는 피펫터 인터페이스를 통해서 항생제를 제2 성장 모듈에 전달할 수 있다. 일부 실시예들에서, 죽은 세포 배경을 제거하는 것은 용해 증진제들(lytic enhancers), 예컨대, 세정제들, 최면 세척(hypnotic wash)에 의한 삼투 스트레스(osmotic stress), 온도, 효소들, 프로테아제들, 박테리오파이지, 환원제들, 또는 카오토트로프들 chaotropes)을 사용하여 보조된다. 도 13의 처리 시스템(1310)은, 예를 들어, 환경적 변수, 예컨대, 온도를 변경시켜 선택을 유도할 수 있는 반면에, 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은 추가 물질들(예를 들어, 세정제들, 효소들, 환원제들 등)을 전달하여 선택을 보조할 수 있다. 다른 실시예들에서, 여과에 의한 세포 제거 및/또는 배지 교환이 이용되어 죽은 세포 배경을 감소시킨다.

[0215] 추가의 실시예들에서, 선택을 적용하는 것에 추가로 또는 그에 대안으로, 제2 성장 모듈이 형질전환된 세포들에서의 게놈 편집을 허용하는 편집 모듈로서 작용한다. 대안적으로, 다른 실시예들에서, 회복 및 선택 후(실행된 경우) 세포들은 별도의 편집 모듈로 전달된다. 편집 모듈로서, 제2 성장 모듈은, 예를 들어, 도입된 핵산들의 발현을 통해서, 세포들의 게놈들의 편집을 유도한다. 뉴클레아제의 발현은 화학적, 빛, 바이러스, 또는 온도 유도 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 제2 성장 모듈은 예를 들어, 온도 유도 과정 동안에 세포들을 가열 또는 냉각하도록 구성될 수 있다. 특정 예시에서, 세포들은 42 °C 내지 50 °C에서 가열함으로써 유도될 수 있다. 예시에 추가로, 세포들은 이어서 유도 후에 0 °C 내지 10 °C로 냉각될 수 있다. 화학적 또는 바이러스 유도의 예에서, 유도제는 제2 성장 모듈로 전달되어 편집을 유도할 수 있다. 유도 가능한 뉴클레아제가 세포들에 도입되면, 편집 동안에, 유도 가능한 뉴클레아제가 유도인자 분자, 예컨대, 도 12a와 관련되어 설명된 유도인자 분자(1224)의 도입을 통해서 유도된다. 유도제 또는 유도인자 분자는, 일부 구현예들에서, 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)에 의해서(예를 들어, 피펫터 또는 시퍼 인터페이스를 통해서) 제2 성장 모듈에 전달된다.

[0216] 일부 구현예들에서, 추가의 세포 편집이 요망되지 않으면(924), 세포들이 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템으로부터의 이후 제거를 위해서 세포 성장 모듈로부터 저장 유닛으로 전달될 수 있다(926). 저장 유닛은, 예를 들어, 도 12a 및 도 12b의 저장 유닛(114)을 포함할 수 있다. 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은, 예를 들어, 세포들을 시퍼 또는 피펫터 인터페이스를 통해서 저장 유닛(114)에 전달할 수 있다. 또 다른 예에서, 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은 세포들을 함유하는 약병을 제2 성장 모듈의 챔버로부터 저장 유닛 내의 약병 또는 튜브로 전달할 수 있다.

[0217] 일부 구현예들에서, 추가의 세포 편집이 요망되면(924), 세포들은 동일하거나 상이한 여과 모듈에 전달되고 전기 적격성이 부여될 수 있다(908). 추가로, 일부 실시예들에서, 새로운 조립된 핵산 샘플이 이때 핵산 어셈블리 모듈에 의해서 제조될 수 있다. 회귀적 편집(recursive editing) 전에, 일부 실시예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기는 사용자에게 의해서 공급되는 추가 물질들(예를 들어, 교체 카트리지들)을 필요로 할 수 있다.

[0218] 단계들은 제2 편집 라운드 동안에 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예들에서, 단계(904)의 후속 수행 시에, 선택적 성장 배지가 성장 모듈에 전달되어 제1 편집 라운드로부터의 편집된 세포들의 선택을 가능하게 한다. 도 1a 및 도 1b 또는 도 12a 및 도 12b의 로봇 취급 시스템(108)은 예를 들어, 선택적 성장 배지에 대해서 지정된 위치에 자리하는 시약 카트리지에 있는 약병 또는 용기로부터 선택적 성장 배지를 전달할 수 있다. 선택적 성장 배지를 전달하기 전에, 기계-관독 가능한 표시가 선택적 성장 배지에 대해 지정된 위치에 자리하는 약병 또는 다른 용기 또는 저장소 상에서 스캐닝되어 약병, 용기 또는 저장소의 내용물을 확인시켜 줄 수 있다. 추가로, 기계-관독 가능한 표시는 기기에 제공된 선택된 성장 배지의 유형을 나타낼 수 있다. 선택적 성장 배지의 유형은, 일부 실시예들에서, 기기가 특정의 처리 스크립트(예를 들어, 특정의 선택적 성장 배지에 적절한 성장 모듈의 설정 및 활성화)를 선택할 수 있게 한다. 회귀적 편집 작업 흐름의 특정 예가 도 10a 내지 도 10c와 관련하여 설명되어 있다.

[0219] 일부 구현예들에서, 방법(900)은 물질들을 요구하고 그리고/또는 사용자의 계획과 협동하여 편집 사이클을 완료하도록 타이밍될 수 있다. 예를 들어, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기는 사용자에게 하나 이상의 세포 처리 사이클들(예를 들어, 하나 이상의 회귀적 편집들)의 완료를 계획하는 능력을 제공하여, 방법(900)이 사용자의 바람직한 시간에서의 완료 목적에 맞춰 실시되게 할 수 있다. 시간 계획은, 예를 들어, 도 13의 사용자 인터페이스

이스(1316)와 같은 사용자 인터페이스를 통해서 설정될 수 있다. 특정 예시에서, 사용자는 제1 사이클의 완료를 4:00 PM으로 설정하여, 사용자가 물질들의 추가의 카트리지를 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 공급하여 다른 세포 편집 라운드의 밤샘 처리를 가능하게 할 수 있다.

[0220] 일부 구현예들에서, 방법(900)의 전체에 걸쳐서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기는 사용자에게 이의 현재 상태를 알려줄 수 있다. 예를 들어, 도 13의 사용자 인터페이스(1316)는 현재의 처리 스테이지의 그래픽 표시를 나타낼 수 있다. 특정 예에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 전면은 세포 처리의 현 상태를 도시하는 동영상 그래픽을 나타내는 사용자 인터페이스(예를 들어, 터치 스크린)와 중첩될 수 있다. 사용자 인터페이스는 임의의 사용자 및/또는 현재의 처리 스테이지와 연관된 디폴트 설정들(예를 들어, 온도 설정, 시간 설정 등)을 추가로 나타낼 수 있다.

[0221] 비록, 특정의 일련 작업들로서 예시되지만, 다른 실시예들에서, 더 많거나 더 적은 단계들이 방법(900)에 포함될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예들에서, 각각의 편집 라운드에서의 맞물림 전에, 저장소들, 카트리지를, 및/또는 약병들의 내용물이 검사되어 적절한 물질이 처리를 진행하기 위해서 이용 가능한지를 확인할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예들에서, 하나 이상의 이미징 센서들(예를 들어, 바코드 스캐너들, 카메라들 등)이 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 하우징 내의 다양한 자리들에서의 내용물을 확인할 수 있다. 일 예에서, 복수 이미징 센서들이 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 하우징 내에 배치될 수 있고, 각각의 이미징 센서는 하나 이상의 물질들(예를 들어, 기계-판독 가능한 표시, 예컨대, 바코드들 또는 QR 코드들, 물질들의 모양들/크기들 등)을 검출하도록 구성된다. 또 다른 예에서, 적어도 하나 이미징 센서는 로봇 취급 시스템에 의해서 복수의 자리들로 이동되어 하나 이상의 물질을 검출할 수 있다. 추가의 실시예들에서, 하나 이상의 중량 센서들이 일회용 또는 교체 가능한 물질들의 존재 또는 부재를 검출할 수 있다. 예시적인 예에서, 전달 팁 공급 홀더(transfer tip supply holder: 116)가 중량 센서를 포함하여 팁들이 영역 내로 로딩되었는지 그렇지 않은지를 검출할 수 있다. 또 다른 예시적인 예에서, 액체 폐기물의 수준이 세포 처리를 계속하기 전에 폐기를 필요로 하는 한계 수준에 도달한 것을 광학 센서가 검출할 수 있다. 추가 물질들에 대한 요구들, 폐기물 물품의 제거, 또는 그밖의 사용자 개입들(예를 들어, 하나 이상의 요소들의 수동 설정 등)이, 일부 구현예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 그래픽 사용자 인터페이스 상에 제시된다. 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기는, 일부 구현예들에서, 예를 들어, 소프트웨어 앱(software app), 이메일 또는 문자 메시지를 통해서, 새로운 물질 또는 다른 수동 개입들에 대한 요구로 사용자와 접촉한다.

[0222] **자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에서의 세포 처리를 위한 작업 흐름**

[0223] 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기는 동일한 모듈들을 사용하여 다양한 세포 처리 작업 흐름들(cell processing workflows)을 수행하도록 설계된다. 예를 들어, 개별적인 용기들 내 또는 카트리지 형태 내의 소스 물질들(source materials)은 상이할 수 있으며, 그에 따라서, 대응하는 명령들(예를 들어, 소프트웨어 스크립트)이 동일한 기본 기기 및 로봇 취급 시스템을 사용하여, 선택될 수 있다. 즉, 다중-모듈 세포 처리 시스템이 세포 샘플들 및 세포 샘플들의 상이한 유형들을 처리하기 위한 많은 상이한 작업 흐름들을 수행하도록 구성될 수 있다. 실시예들에서, 동일한 작업 흐름이 세포 샘플을 회귀적으로 편집하기 위해서 반복적으로 수행될 수 있다. 다른 실시예들에서, 세포 샘플은 회귀적으로 편집되지만, 작업 흐름은 반복적으로 변화될 수 있다.

[0224] 도 10a 내지 도 10c는 두 개의 세포 성장 모듈들(1002, 1008), 두 개의 여과 모듈들(1004 및 1010), 및 관류 전기천공 모듈(1006)을 포함하는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기를 사용하여 수행될 수 있는 예시적인 작업 흐름들을 예시한다. 비록, 별도의 성장 모듈들(1002, 1008) 및 여과 모듈들(1004, 1010)로서 설명되지만, 각각은 그 대신에 이중 모듈로서 설계될 수 있다. 예를 들어, 성장 모듈들(1002 및 1008)을 포함하는 이중 성장 모듈이 일부 전기 회로망, 제어들, 및 전원을 공유하고 동일한 하우징에 배치된 이중 회전 성장 약병들을 포함할 수 있다. 유사하게, 이중 여과 모듈은 두 개의 별도의 필터들 및 액체 공급 튜브들을 포함하지만, 전기 회로망, 전원 및 하우징을 공유하는 여과 모듈들(1004 및 1010)을 포함할 수 있다. 모듈들(1002, 1004, 1006, 1008, 및 1010)은 예를 들어, 도 1a 및 도 1b와 관련하여 설명된 기기(100)의 일부일 수 있다.

[0225] 도 10a를 참조하면, 흐름도는 세포 원액(1012)에 대한 두 개의 편집들을 생성시키는, 동일한 처리 단계들을 갖는 두 처리 스테이지를 포함하는 제1 박테리아 계승 편집 작업 흐름(1000)을 예시한다. 각각의 스테이지는 상이한 소스 물질들의 카트리지를 기반으로 하여 작동할 수 있다. 예를 들어, 제1 카트리지는 제1 올리고 라이브러리(1014a) 및 제1 sgRNA 골격(1016a)을 포함할 수 있다. 처리 스테이지들 사이에서 또는 처리 전에 그러한 제1 카트리지와는 상이한 위치에서 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기 내로 도입된 제2 카트리지는 제2 올리고 라이브러리(1014b) 및 제2 sgRNA 골격(1016b)을 포함할 수 있다. 각각의 카트리지는 편집된 세포들의 라이브러

리를 구축하기 위한 "라이브러리 카트리지(library cartridge)"로서 여겨질 수 있다. 세포 원액(1012)은 일부 실시예들에서, 제1 라이브러리 카트리지에 포함된다. 세포 원액(1012)은 두 개의 카트리지를 포함하는 키트 내에 공급될 수 있다. 대안적으로, 사용자는 세포 원액(1012)의 용기(예를 들어, 약병 또는 튜브)를 구매한 카트리지에 추가할 수 있다.

[0226] 작업 흐름(1000)은 일부 실시예들에서, 도 13의 처리 시스템(1310)과 같은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템에 의해서 수행된 스크립트를 기반으로 하여 수행된다. 스크립트는 제1 예에서, 제1 카트리지에 추가된 기계-관독 가능한 마커 또는 태그를 통해서 접근될 수 있다. 일부 실시예들에서, 각각의 처리 스테이지는 별도의 스크립트를 사용하여 수행된다. 예를 들어, 각각의 카트리지는 카트리지의 내용물을 처리하기 위한 스크립트의 지시 또는 스크립트 자체를 포함할 수 있다.

[0227] 일부 구현예들에서, 제1 스테이지는 접종, 성장 및 모니터링(1018a)을 위해서 세포 원액(1012)을 제1 성장 모듈(1002) 내로 도입하는 것으로 시작된다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 세포 원액(1012)의 약병을 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병에 함유된 배지에 추가한다. 또 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 카트리지로 부터 세포 원액(1012)을 피펫 채취하고 세포 원액(1012)을 회전 성장 약병에 함유된 배지에 첨가한다. 세포들은 이 시점에서 4 °C의 온도에서 유지되었을 수 있다. 특정 예에서, 20 ml의 세포 원액이 30°C의 온도에서 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병 내에서 0.50의 OD로 성장될 수 있다. 제1 성장 모듈(1002)에 첨가된 세포 원액(1012)은 성장 약병의 자동 모니터링을 통해서 0.50의 OD가 감지될 때까지 시간에 따라서 모니터링될 수 있다. 모니터링은 주기적이거나 연속적일 수 있다. 비록, 정확한 시간은 원하는 OD의 검출에 좌우되지만, 이러한 모니터링은 예를 들어, 약 900 분(추정됨)이 소요될 수 있다.

[0228] 일부 구현예들에서, 원하는 OD로 세포들을 성장시킨 후에, 유도인자가 세포들을 유도하기 위해서 제1 성장 모듈(1002)에 첨가된다. 특정 예에서, 100 μl의 유도인자가 첨가될 수 있으며, 성장 모듈(1002)은 혼합물의 온도를 42 °C까지 상승시켜 15 분 동안 유지시킬 수 있다.

[0229] 세포 원액(1012)은 성장 및 유도 후에, 일부 구현예들에서, 세포들에 전기 적격성을 부여하기 위해서(1020a) 그리고 형질전환을 위한 세포들의 부피를 감소시키기 위해서, 제1 여과 모듈(1004)에 전달된다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 세포 원액(1012)의 약병을 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병으로부터 제1 여과 모듈(1004)의 약병 홀더로 이동시킨다. 또 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병으로부터 세포 원액(1012)을 피펫 채취하고 그것을 제1 여과 모듈(1004)에 전달한다. 예를 들어, 세포 원액(1012)을 제1 성장 모듈(1002)로 전달하기 위해서 사용되는 일회용 피펫 채취 팁이 사용되어 세포 원액(1012)을 제1 성장 모듈(1002)로부터 제1 여과 모듈(1004)로 전달할 수 있다. 일부 실시예들에서, 세포 원액(1012)을 제1 성장 모듈(1002)로부터 제1 여과 모듈(1004)로 전달하기 전에, 제1 성장 모듈(1002)이 4 °C로 냉각되어, 세포 원액(1012)이 유사하게 이러한 온도로 저하되게 한다. 특정 예에서, 제1 성장 모듈(1002)의 온도는 약 8 분의 기간에 걸쳐서 약 4 °C로 저하될 수 있으며, 성장 모듈(1002)은 온도를 4 °C에서 약 15 분 동안 유지시켜 세포 원액(1012)의 온도의 감소를 확실하게 할 수 있다.

[0230] 세포 원액을 전달하기 전에, 일부 구현예들에서, 제1 여과 모듈(1004)의 필터가 세척 용액을 사용하여 사전-세척된다. 세척 용액은, 예를 들어, 세척 카트리지, 예컨대, 도 1a와 관련하여 설명된 카트리지(1006)에 공급될 수 있다. 제1 여과 모듈(1004)은, 예를 들어, 도 7a와 관련하여 설명된 바와 같이 세척 카트리지의 세척 용액과 유체 소통 가능하게 연결될 수 있다.

[0231] 제1 여과 모듈(1004)은 예를 들어, 이중 여과 모듈, 예컨대, 도 7b 및 도 7c와 관련하여 설명된 여과 모듈(750)의 일부일 수 있다. 특정 예에서, 제1 여과 모듈(1004)은 용출 약병과 제1 여과 모듈(1004) 사이에서 세포 물질을 전달하는 동안의 세척 및 용출 과정 동안에 4 °C에서 유지될 수 있다.

[0232] 일부 구현예들에서, 여과 모듈(1004)에서 세포들에 전기 적격성을 부여하면, 세포 원액(1012)은 형질전환을 위한 형질전환 모듈(1006)(예를 들어, 관류 전기천공 모듈)로 전달된다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 세포 원액(1012)의 약병을 제1 여과 모듈(1004)의 약병 홀더로부터 관류 전기천공 모듈(1006)의 저장소로 이동시킨다. 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 여과 모듈(1002) 또는 임시 저장소로부터 세포 원액(1012)을 피펫 채취하고 그것을 제1 여과 모듈(1004)에 전달한다. 특정 예에서, 제1 여과 모듈(1004)로부터의 400 μl의 농축된 세포 원액(1012)이 형질전환 모듈(1006)로의 전달 전에 혼합 저장소로 전달된다. 예를 들어, 세포 원액(1012)은 조립된 핵산들과 혼합하기 위한 카트리지 내의 저장소에 전달될 수 있고, 이어서, 피펫 팁을 사용하여 로봇 취급 시스템에 의해서 전달될 수 있다. 특정 예에서, 형질전환 모듈은 4 °C에서 유지된다. 세포 원액(1012)은 예시적인 예에서, 약 4 분 이내에 형질전환될 수 있다.

- [0233] 세포들이 성장하고 그리고/또는 전기 적격성이 부여되는 반면에, 일부 구현예들에서, 제1 올리고 라이브러리(1014a)와 sgRNA 골격(1016a)이 등은 핵산 조립 과정을 이용하여 조립되어 등은 핵산 조립 마스터 혼합물(1022a)에서 조립된 핵산들을 생성시킨다. 조립된 핵산들은 작업 흐름(1000)의 제1 스테이지의 제1 처리 단계들(1018a, 1020a) 동안에 일부 시점에서 생성될 수 있다. 대안적으로, 조립된 핵산들은 제1 처리 단계(1018)를 시작하기에 앞서 생성될 수 있다.
- [0234] 일부 실시예들에서, 핵산들은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 등은 핵산 어셈블리 모듈을 사용하여 조립된다. 예를 들어, 로봇 취급 시스템은 제1 올리고 라이브러리(1014a)와 sgRNA 골격(1016a)을 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기 내의 시약 카트리지 내 라이브러리 용기로부터 등은 핵산 어셈블리 모듈(예시되지 않음), 예컨대, 도 12b와 관련하여 설명된 핵산 어셈블리 모듈(1210g)에 첨가할 수 있다. 핵산 조립 혼합물은, 예를 들어, 특정 예로, 50 μ l Gibson Assembly® Master Mix, 25 μ l 벡터 골격(1016a), 및 25 μ l 올리고(1014a)를 포함할 수 있다. 등은 핵산 어셈블리 모듈은 실온에서 유지될 수 있다. 조립 과정은 약 30 분이 소요될 수 있다.
- [0235] 다른 실시예들에서, 핵산들은 다중-모듈 세포 처리 기기의 외부에서 조립되고 소스 물질로서 첨가된다. 예를 들어, 조립된 핵산들의 약병 또는 튜브가 세포 처리의 제1 단계(1018a)를 활성화시키기 전에 시약 카트리지에 추가될 수 있다. 특정 예에서, 100 μ l의 조립된 핵산들이 제공된다.
- [0236] 일부 구현예들에서, 조립된 핵산들은 정제된다(1024a). 조립된 핵산들은, 예를 들어, 로봇 취급 시스템에 의해서 등은 핵산 어셈블리 모듈로부터 정제 모듈(도시되지 않음), 예컨대, 도 12b의 정제 모듈(1210h)로 전달될 수 있다. 다른 실시예들에서, 등은 핵산 어셈블리 모듈은 정제 피쳐들(purification features)(예를 들어, 조합 등은 핵산 조립 및 정제 모듈)을 포함할 수 있다. 추가의 실시예들에서, 조립된 핵산들은 다중-모듈 세포 처리 기기의 외부에서 정제되고 소스 물질로서 첨가된다. 예를 들어, 정제되고 조립된 핵산들의 약병 또는 튜브가 세포 처리의 제1 단계(1018a)를 활성화시키기 전에 세포 원액(1012)을 함유한 시약 카트리지에 추가될 수 있다.
- [0237] 특정 예에서, 등은 핵산 조립 혼합물 내의 100 μ l의 조립된 핵산들이 정제된다. 일부 실시예들에서, 자성 비드들(magnetic beads)이 등은 핵산 어셈블리 모듈에 첨가되고, 예를 들어, 액체 현탁액 중의 180 μ l의 자성 비드들이 로봇 취급 시스템에 의해서 등은 핵산 어셈블리 모듈에 첨가될 수 있다. 등은 핵산 어셈블리 모듈에 기능적으로 연결된 자석이 활성화되고, 샘플이 200 μ l 에탄올 중에서 세척될 수 있다(예를 들어, 로봇 취급 시스템이 에탄올을 등은 핵산 어셈블리 모듈에 전달할 수 있다). 이러한 작동으로부터의 액체 폐기물은, 일부 실시예들에서, (예를 들어, 에탄올을 전달하는데 사용되는 것과 동일한 피펫 팁을 사용하여 로봇 취급 시스템에 의해서) 카트리지의 폐기물 용기에 전달된다. 이 시점에서, 탈염되고 조립된 핵산들은 보유 용기, 예컨대, 카트리지의 저장소에 전달될 수 있다. 탈염되고 조립된 핵산들이, 예를 들어, 세포들이 형질전환에 준비될 때까지, 4 $^{\circ}$ C에서 유지될 수 있다. 특정 예에서, 100 μ l의 조립된 핵산들이 형질전환 모듈(1006)에 전달되기 전에 혼합물 저장소 내의 400 μ l의 농축된 세포 원액(1012)에 첨가될 수 있다. 일부 실시예들에서, 정제 과정은 약 16 분이 소요될 수 있다.
- [0238] 일부 구현예들에서, 조립된 핵산들과 세포 원액(1012)이 관류 전기천공 모듈(1006)에 첨가되고, 세포 원액(1012)이 형질전환된다(1026a). 로봇 취급 시스템은, 예를 들어, 세포 원액(1012)과 조립된 핵산들의 혼합물을, 예를 들어, 피펫 팁을 사용하여 또는 약병 또는 튜브를 전달함을 통해서, 혼합물 저장소로부터 관류 전기천공 모듈(1006)로 전달할 수 있다. 일부 실시예들에서, 내장된 관류 전기천공 모듈, 예컨대, 도 5a의 관류 전기천공 모듈들(500)이 세포 원액(1012)을 형질전환시키기 위해서 사용된다. 다른 실시예들에서, 카트리지-기반 전기천공 모듈, 예컨대, 도 5b의 관류 전기천공 모듈(530)이 세포 원액(1012)을 형질전환시키기 위해서 사용된다. 전기천공 모듈(1006)은, 예를 들어, 4 $^{\circ}$ C의 온도에서 유지될 수 있다. 전기천공 과정은, 예시적인 예에서, 약 4 분이 소요될 수 있다.
- [0239] 형질전환된 세포 원액(1012)은, 일부 구현예들에서, 회복을 위한 제2 성장 모듈(1008)에 전달된다(1028a). 특정 예에서, 형질전환된 세포들은 30 $^{\circ}$ C의 온도에서 제2 성장 모듈(1008) 내에서 회복 과정을 거친다. 형질전환된 세포들은, 예를 들어, 회복을 위해서 약 1 시간 동안 제2 성장 모듈(1008)에서 유지될 수 있다.
- [0240] 일부 구현예들에서, 선택적 배지는 제2 성장 약병(예시되지 않음)으로 전달되고, 세포들은 선택 과정에서 추가 기간 동안 배양되도록 방지된다. 예시적인 예에서, 항생제가 제2 성장 약병에 전달될 수 있고, 세포들이 30 $^{\circ}$ C의 온도에서 추가의 2 시간 동안 배양될 수 있다.
- [0241] 회복 후에, 세포들은 또 다른 편집 라운드를 위해서 또는 용기 내의 저장을 위해서, 예를 들어, 자동 세포 처리 환경 밖에서 수행되는 추가의 실험을 위해서, 준비될 수 있다. 대안적으로, 세포들의 일부가 세포 라이브러리

출력물로서 저장 유닛에 전달될 수 있는 반면에, 세포들의 또 다른 부분은 제2 편집 라운드를 위해서 준비될 수 있다.

- [0242] 일부 구현예들에서, 제2 편집 라운드를 위한 준비에서, 형질전환된 세포들은 배지 교환 및 여과(1030a)를 위해서 제2 여과 모듈(1010)로 전달된다. 형질전환된 세포 원액을 전달하기 전에, 일부 구현예들에서, 제2 여과 모듈(1004)의 필터가 세척 용액을 사용하여 사전-세척된다. 세척 용액은, 예를 들어, 세척 카트리지가, 예컨대, 도 1a와 관련하여 설명된 카트리지가(1006)에서 공급될 수 있다. 제2 여과 모듈(1010)은, 예를 들어, 도 7a와 관련하여 설명된 바와 같은 세척 카트리지의 세척 용액에 유동적으로 연결될 수 있다.
- [0243] 제2 여과 모듈(1010)은, 예를 들어, 이중 여과 모듈, 예컨대, 도 7b 및 도 7c와 관련하여 설명된 여과 모듈 (750)의 일부일 수 있다. 특정 예에서, 제2 여과 모듈(1010)은 용출 약병과 제2 여과 모듈(1010) 사이에서 세포 물질을 전달하는 동안의 세척 및 용출 과정 동안에 4 °C에서 유지될 수 있다. 이러한 여과 과정의 출력물은 특정 예에서, 약병 또는 튜브에 보관되어 추가의 처리를 기다리고, 예를 들어, 형질전환 모듈로 전달된다. 약 병 또는 튜브는 4 °C의 온도의 저장 유닛에서 유지될 수 있다.
- [0244] 제1 처리 스테이지는 하루 동안 수행될 수 있다. 예시적인 실시예에서, 제1 처리 스테이지는 완료되기에 19 시 간 미만(예를 들어, 약 18.7 시간)이 소요되는 것으로 추정된다. 작업 흐름(1000) 중의 이 시점에서, 일부 구현예들에서는, 새로운 물질들이 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 수동으로 첨가된다. 예를 들어, 새로운 시 약 카트리지가 추가될 수 있다. 추가로, 새로운 세척 카트리지가, 교체 필터들, 및/또는 교체 피펫 팁들이 이 시 점에서 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 추가될 수 있다. 추가로, 일부 실시예들에서, 필터 모듈은 세정 과 정을 거칠 수 있고/있거나 교체 및 액체 폐기물 유닛들이 다음 처리 라운드를 위한 준비로 비워질 수 있다. 또 다른 실시예들에서, 시약 카트리지는 둘 이상의 편집 사이클들을 위한 시약들을 제공할 수 있다.
- [0245] 일부 구현예들에서, 제2 편집 라운드는 위에 설명된 제1 처리 스테이지와 동일한 모듈들(1002, 104, 1006, 1008, 및 1010), 동일한 처리 단계들(1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 및 1030), 및 동일한 온도 및 시간 범위를 포함한다. 예를 들어, 제2 올리고 라이브러리(1014b)와 제2 sgRNA 골격(1016b)이 위에 설명된 바와 매우 동일한 방식으로 형질전환된 세포들을 편집하기 위해서 사용될 수 있다. 비록, 2-스테이지 과정으로서 예시 되지만, 다른 실시예들에서는, 최대 2, 4, 6, 8 또는 그 초과와 반복 과정이 수행되어 동일한 세포 원액(1012) 을 계속 편집할 수 있다.
- [0246] 다른 구현예들에서, 도 10b를 참조하면, 작업 흐름(1040)은 제1 처리 스테이지에 대해서와 동일한 처리 단계들 (1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 및 1030) 뿐만 아니라 동일한 모듈들(002, 1004, 1006, 1008, 및 101 0)을 포함한다. 그러나, 도 10a의 작업 흐름(1000)과는 달리, 도 10b의 작업 흐름(1040)의 제2 스테이지는 경 화 단계들을 포함한다. "경화(curing)"는 벡터가 - 예를 들어, 이전 편집 라운드에 사용된 편집 벡터, 뉴클레 아제를 위한 발현 서열을 포함하는 "엔진(engine)" 벡터, 또는 이들 둘 모두가 - 형질전환된 세포들로부터 제거 되는 과정이다. 경화는, 예를 들어, 경화 플라스미드를 사용하여 편집 벡터를 절단하여 편집 및/또는 엔진 벡 터를 비기능성하게 하고(도 10b의 작업 흐름에서 예시됨); 세포 성장을 통해서 세포 집단 내의 벡터를 희석시킴 (즉, 더 많은 성장 사이클들을 세포들이 진행할수록, 더 적은 딸 세포들(daughter cells)이 편집 또는 엔진 벡 터(들)을 보유할 것임)(도시되지 않음)으로써, 또는 예를 들어, 편집 또는 엔진 벡터에 대한 열-민감성 복제 개 시점을 이용(도시되지 않음)함으로써 달성될 수 있다. 일 예에서, "경화 플라스미드"는 자동화 기기의 시약 카 트리지가 내에 함유될 수 있거나, 제2 처리 스테이지 전에 기기에 수동으로 첨가될 수 있다. 작업 흐름(1000)과 같이, 일부 실시예들에서, 작업 흐름(1040)은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템, 예컨대, 도 13 의 처리 시스템(1310)에 의해서 수행된 스크립트를 기반으로 하여 수행된다. 스크립트는 제1 예에서, 제1 카트 리지에 추가된 기계-관독 가능한 마커 또는 태그를 통해서 분석될 수 있다. 일부 실시예들에서, 각각의 처리 스테이지는 별도의 스크립트를 사용하여 수행된다. 예를 들어, 각각의 카트리지는 카트리지의 내용물을 처리하 기 위한 스크립트의 지시 또는 스크립트 자체를 포함할 수 있다. 이러한 방식으로, 예를 들어, 경화 카트리지를 포함하는 제2 스테이지는 경화에 적절한 설정들(예를 들어, 온도들, 시간들, 물질의 양들 등)을 위해서 설계 된 스크립트를 사용하여 수행될 수 있다. 경화를 위한 조건들은 경화를 위해서 사용된 메커니즘에; 즉, 이러한 예에서, 경화 플라스미드가 편집 및/또는 엔진 플라스미드를 어떻게 절단하는지에 좌우될 것이다.
- [0247] 일부 구현예들에서, 제2 작업 흐름(1040) 스테이지는 제1 성장 모듈(1002)에서의 제1 작업 흐름(1040) 스테이지 로부터 제1 편집된 세포들을 수용함으로써 시작된다. 예를 들어, 제1 편집된 세포들은 도 10a의 작업 흐름 (1000)과 관련하여 설명된 단계들(1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 및 1030)을 적용함을 통해서 세포 원 액(1042), 올리고 라이브러리(1044), 및 sgRNA 골격(1046)을 사용하여 편집되었을 수 있다. 제1 편집된 세포

원액(1042)은 예를 들어, 로봇 취급 시스템에 의해서 제1 성장 모듈(1002)에 전달될 수 있다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 편집된 세포 원액(1042)의 약병을 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병에 추가한다. 또 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 저장 유닛의 용기로부터의 제1 편집된 세포 원액(1042)을 피펫 채취하고, 세포 원액(1042)을 회전 성장 약병에 첨가한다. 세포들은 이 시점에서 4 °C의 온도에서 유지되었을 수 있다.

[0248] 일부 구현예들에서, 제1 편집된 세포들은 제1 성장 모듈(1002)에서 집중(1018d)되고, 성장되고, 모니터링된다. 특정 예에서, 제1 편집된 세포 원액(1042)의 분취액이 30 °C의 온도에서 예를 들어, 20 mL의 성장 배지를 함유하는 회전 성장 약병에 0.50의 OD로 전달될 수 있다. 제1 성장 모듈(1002)에 첨가된 세포 원액(1042)은 0.50의 OD가 자동화 모니터링을 통해서 감지될 때까지의 시간이 지남에 따라서 모니터링될 수 있다. 모니터링은 주기적이거나 연속적일 수 있다. 비록, 정확한 시간은 원하는 OD의 검출에 좌우되지만, 이는, 예를 들어, 약 900 분(추정됨)이 소요될 수 있다.

[0249] 일부 구현예들에서, 원하는 OD로 성장한 후에, 유도인자는 세포를 유도하기 위한 제1 성장 모듈(1002)에 첨가된다. 특정 예에서, 100 μ l의 유도인자가 첨가될 수 있고, 성장 모듈(1002)은 혼합물의 온도를 42 °C까지 승온시키고 15 분 동안 유지시킬 수 있다.

[0250] 제1 편집된 세포 원액(1042)은 성장 및 유도 후에, 일부 구현예들에서, 제1 편집된 세포들에 전기 적격성을 부여(1020d)하기 위한 제1 여과 모듈(1004)에 전달된다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 편집된 세포 원액(1042)의 약병을 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병으로부터 제1 여과 모듈(1004)의 약병 홀더로 이동시킨다. 또 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병으로부터 제1 편집된 세포 원액(1042)을 피펫 채취하고, 그것을 제1 여과 모듈(1004)에 전달한다. 예를 들어, 제1 편집된 세포 원액(1042)을 제1 성장 모듈(1002)로 전달하기 위해서 사용된 일회용 피펫 채취 팁이 제1 성장 모듈(1002)로부터의 세포 원액(1042)을 제1 여과 모듈(1004)로 전달하기 위해서 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 제1 성장 모듈(1002)로부터의 세포 원액(1042)을 제1 여과 모듈(1004)로 전달하기 전에, 제1 성장 모듈(1002)이 4 °C로 냉각되어, 세포 원액(1042)이 유사하게 그러한 온도로 저하되게 한다. 특정 예에서, 제1 성장 모듈(1002)의 온도는 약 8 분의 기간에 걸쳐서 약 4 °C로 저하될 수 있고, 성장 모듈(1002)은 약 15 분 동안 4 °C의 온도에서 유지되어 세포 원액(1012)의 온도의 감소를 확실하게 할 수 있다.

[0251] 제1 편집된 세포 원액(1042)을 여과 모듈에 전달하기 전에, 일부 구현예에서, 제1 여과 모듈(1004)의 필터가 세척 용액을 사용하여 사전-세척된다. 세척 용액은, 예를 들어, 세척 카트리지가, 예컨대, 도 1a와 관련하여 설명된 카트리지가(1006)에서 공급될 수 있다. 제1 여과 모듈(1004)은, 예를 들어, 도 7a와 관련하여 설명된 바와 같이, 세척 카트리지의 세척 용액에 유동적으로 연결될 수 있다.

[0252] 제1 여과 모듈(1004)은, 예를 들어, 이중 여과 모듈, 예컨대, 도 7b 및 도 7c와 관련하여 설명된 여과 모듈(750)의 일부일 수 있다. 특정 예에서, 제1 여과 모듈(1004)은 용출 약병과 제1 여과 모듈(1004) 사이에서 세포 물질들을 전달하는 동안의 세척 및 용출 과정 동안에 4 °C에서 유지될 수 있다.

[0253] 일부 구현예들에서, 여과 모듈(1004)에서의 제1 편집된 세포들에의 전기 적격성 부여(1020d)시에, 제1 편집된 세포 원액(1042)이 형질전환을 위한 형질전환 모듈(1006)(예를 들어, 관류 전기천공 모듈)로 전달된다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 여과 모듈(1004)의 약병 홀더로부터의 세포 원액(1042)의 약병을 관류 전기천공 모듈(1006)의 저장소로 이동시킨다. 또 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 여과 모듈(1002) 또는 일시적인 저장소로부터 세포 원액(1042)을 피펫 채취하고, 그것을 제1 여과 모듈(1004)에 전달한다. 특정 예에서, 제1 여과 모듈(1004)로부터의 400 μ l의 농축된 세포 원액(1042)이 형질전환 모듈(1006)로의 전달 전에 혼합 저장소로 전달된다. 예를 들어, 세포 원액(1042)은 경화 플라스미드(1050)와의 혼합을 위해서 카트리지가 내의 저장소로 전달되고, 이어서, 혼합되고, 피펫 팁을 사용하여 로봇 취급 시스템에 의해서 전달될 수 있다. 특정 예에서, 형질전환 모듈(1006)은 4 °C에서 유지될 수 있다. 세포 원액(1042)은, 예시적인 예에서, 약 4 분 내에 형질전환될 수 있다.

[0254] 형질전환된 세포 원액(1042)은 일부 구현예들에서, 회복/경화(1028d)를 위한 제2 성장 모듈(1008)로 전달된다. 특정 예에서, 20 ml의 형질전환된 세포들이 30 °C의 온도의 제2 성장 모듈(1008)에서 회복 과정을 거치게 된다. 형질전환된 세포들은, 예를 들어, 회복을 위해서 약 1 시간 동안 제2 성장 모듈(1008)에서 유지될 수 있다. 또 다른 편집 라운드가 요망되면, 제1 편집 플라스미드 또는 벡터가 경화된다. 또 다른 편집 라운드가 요망되지 않으면, 제1 편집 플라스미드 및 엔진 플라스미드가 경화될 수 있다.

[0255] 회복 및 경화 후에, 세포들이 또 다른 편집 라운드를 위해서 또는 자동화 세포 처리 기기 밖의 추가의 조사에서

사용되기 위한 저장을 위해서 준비될 수 있다. 예를 들어, 세포들의 일부가 세포 라이브러리 출력물로서 저장 유닛에 전달될 수 있는 반면에, 세포들의 또 다른 일부는 제2 편집 라운드를 위해서 준비될 수 있다.

[0256] 일부 구현예들에서, 제2 편집 라운드를 위한 준비에서, 형질전환된 세포들은 배지 교환 및 여과(1030d)를 위해서 세포들에 전기 적격성을 부여하기 위한 글리세롤을 함유하는 제2 여과 모듈(1010)로 전달된다. 형질전환된 세포 원액을 전달하기 전에, 일부 구현예들에서, 제2 여과 모듈(1004)의 필터가 세척 용액을 사용하여 사전-세척된다. 세척 용액은, 예를 들어, 세척 카트리지를, 예컨대, 도 1a와 관련하여 설명된 카트리지를(1006)에서 공급될 수 있다. 제2 여과 모듈(1010)은, 예를 들어, 도 7a와 관련하여 설명된 바와 같은 세척 카트리지의 세척 용액에 유동적으로 연결될 수 있다.

[0257] 제2 여과 모듈(1010)은, 예를 들어, 이중 여과 모듈 예컨대, 도 7b 및 도 7c와 관련하여 설명된 여과 모듈(750)의 일부일 수 있다. 특정 예에서, 제2 여과 모듈(1010)은 용출 약병과 제2 여과 모듈(1010) 사이에서 세포 물질들을 전달하는 동안의 세척 및 용출 과정 동안에 4 °C에서 유지될 수 있다. 이러한 여과 과정의 출력물은 특정 예에서, 약병 또는 튜브에 보관되어 추가의 처리를 기다린다. 약병 또는 튜브는 4 °C의 온도의 저장 유닛에서 유지될 수 있다.

[0258] 도 10c를 참조하여 보면, 흐름도는, 세포 원액(1062)에 대한 두 개의 편집들을 생성시키는, 동일한 처리 단계들을 갖는 두 개의 처리 스테이지들을 포함하는 효모 작업 흐름(1060)을 예시한다. 각각의 스테이지는 소스 물질들의 상이한 카트리지를 기반으로 작동될 수 있다. 예를 들어, 제1 카트리지는 제1 올리고 라이브러리(1070a)와 제1 sgRNA 골격(1072a)을 포함할 수 있다. 처리 스테이지들 사이에 또는 처리 전에 그러나 제1 카트리지와 상이한 위치에서 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기 내로 도입된 제2 카트리지는 제2 올리고 라이브러리(1070b)와 제2 sgRNA 골격(1072b)을 포함할 수 있다. 각각의 카트리지는 편집된 세포들의 라이브러리를 구축하기 위한 "라이브러리 카트리지"로서 여겨질 수 있다. 대안적으로, 사용자는 세포 원액(1062a)의 용기(예를 들어, 약병 또는 튜브)를 효모 세포 키트 내에 포함된 구매한 카트리지의 각각에 추가할 수 있다.

[0259] 작업 흐름(1060)은, 일부 실시예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템의 처리 시스템, 예컨대, 도 13의 처리 시스템(1310)에 의해서 수행된 스크립트를 기반으로 하여 수행된다. 스크립트는 제1 예에서, 제1 카트리지에 추가된 기계-관독 가능한 마커 또는 태그를 통해서 접근될 수 있다. 일부 실시예들에서, 각각의 처리 스테이지는 별도의 스크립트를 사용하여 수행된다. 예를 들어, 각각의 카트리지는 카트리지의 내용물을 처리하기 위한 스크립트의 지시 또는 스크립트 자체를 포함할 수 있다.

[0260] 일부 구현예들에서, 제1 스테이지는 접종, 성장 및 모니터링(1018e)을 위해서 세포 원액(1062)을 제1 성장 모듈(1002) 내로 도입하는 것으로 시작된다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 세포 원액(1062)의 약병을 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병에 추가한다. 또 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 카트리지를로부터 세포 원액(1062)을 피펫 채취하고 세포 원액(1062)을 회전 성장 약병에 첨가한다. 세포들은 이 시점에서 4 °C의 온도에서 유지되었을 수 있다. 특정 예에서, 20 ml의 세포 원액이 30 °C의 온도에서 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병 내에서 0.75의 OD로 성장될 수 있다. 제1 성장 모듈(1002)에 첨가된 세포 원액(1012)은 자동 모니터링을 통해서 0.75의 OD가 감지될 때까지 성장 모듈(1002) 내에서 시간이 지남에 따라서 자동적으로 모니터링될 수 있다. 모니터링은 주기적이거나 연속적일 수 있다.

[0261] 일부 구현예들에서, 유도 가능한 발현 시스템이 사용될 수 있다. 따라서, 원하는 OD로의 성장 후에, 유도인자가 세포들을 유도하기 위한 제1 성장 모듈(1002)에 첨가된다. 유도인자는 소분자이거나 갈락토오스와 같은 상이한 당을 함유한 배지로의 배지 교환일 수 있다.

[0262] 세포 원액(1062)은 성장 및 유도 후에, 일부 구현예들에서, 배지를 교환(1064d)하기 위한 제1 여과 모듈(1004)에 전달된다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 세포 원액(1062)의 약병을 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병으로부터 제1 여과 모듈(1004)의 약병 홀더로 이동시킨다. 또 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병으로부터 세포 원액(1062)을 피펫 채취하고, 그것을 제1 여과 모듈(1004)에 전달한다. 예를 들어, 세포 원액(1062a)을 제1 성장 모듈(1002)로 전달하기 위해서 사용된 일회용 피펫 채취 팁이 제1 성장 모듈(1002)로부터의 세포 원액(1062)을 제1 여과 모듈(1004)로 전달하기 위해서 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 제1 성장 모듈(1002)로부터의 세포 원액(1062)을 제1 여과 모듈(1004)로 전달하기 전에, 제1 성장 모듈(1002)이 4 °C로 냉각되어, 세포 원액(1062)이 유사하게 그러한 온도로 저하되게 한다. 특정 예에서, 제1 성장 모듈(1002)의 온도는 약 8 분의 기간에 걸쳐서 약 4 °C로 저하될 수 있고, 성장 모듈(1002)은 약 15 분 동안 4 °C의 온도에서 유지되어 세포 원액(1062)의 온도의 감소를 확실하게 할 수 있다. 배지 교환 동안에, 예시적인 예에서, 0.4 ml의 1 M 소르비톨이 세포 원액(1062)에 첨가될 수 있다.

- [0263] 세포 원액(1062)을 전달하기 전에, 일부 구현예에서, 제1 여과 모듈(1004)의 필터가 세척 용액을 사용하여 사전-세척된다. 세척 용액은, 예를 들어, 세척 카트리지가, 예컨대, 도 1a와 관련하여 설명된 카트리지가(1006)에서 공급될 수 있다. 제1 여과 모듈(1004)은, 예를 들어, 도 7a와 관련하여 설명된 바와 같이, 세척 카트리지의 세척 용액에 유동적으로 연결될 수 있다.
- [0264] 제1 여과 모듈(1004)은, 예를 들어, 이중 여과 모듈, 예컨대, 도 7b 및 도 7c와 관련하여 설명된 여과 모듈(750)의 일부일 수 있다. 특정 예에서, 제1 여과 모듈(1004)은 용출 약병과 제1 여과 모듈(1004) 사이에서 세포 물질들을 전달하는 동안의 세척 및 용출 과정 동안에 4 °C에서 유지될 수 있다.
- [0265] 배지 교환 작업 후에, 일부 구현예들에서, 세포 원액(1062)은 컨디셔닝(conditioning: 1066a)을 위한 제1 성장 모듈(1002)로 역 전달된다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 세포 원액(1062)의 약병을 제1 여과 모듈(1004)로부터 제1 성장 모듈(1002)로 이동시킨다. 또 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 세포 원액(1062)을 제1 여과 모듈(1004)로부터 피펫 채취하고, 그것을 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병으로 전달한다. 컨디셔닝 동안에, 예를 들어, 5 ml DTT/LIAC 및 80 mM의 소르비톨이 세포 원액(1062)에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 로봇 취급 시스템은 DTT/LIAC 및 소르비톨을 개별적으로 또는 동시에 제1 성장 모듈(1002)로 전달할 수 있다. 세포 원액(1062)은, 예를 들어, 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병의 회전을 통해서 DTT/LIAC 및 소르비톨과 혼합될 수 있다. 컨디셔닝 동안에, 세포 원액(1062)은 4 °C의 온도에서 유지될 수 있다.
- [0266] 일부 구현예들에서, 컨디셔닝 후에, 세포 원액(1062)은 세포들을 세척 및 준비(1068)하기 위해서 제1 여과 모듈(1004)에 전달된다. 예를 들어, 세포들은 본 단계에서 전기 적격성이 부여될 수 있다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 세포 원액(1062)의 약병을 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병으로부터 제1 여과 모듈(1004)의 약병 홀더로 이동시킨다. 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 성장 모듈(1002)의 회전 성장 약병으로부터 세포 원액(1062)을 피펫 채취하고, 그것을 제1 여과 모듈(1004)에 전달한다.
- [0267] 세포 원액을 전달하기 전에, 일부 구현예에서, 제1 여과 모듈(1004)의 필터가 세척 용액을 사용하여 사전-세척된다. 세척 용액은, 예를 들어, 세척 카트리지가, 예컨대, 도 1a와 관련하여 설명된 카트리지가(1006)에서 공급될 수 있다. 제1 여과 모듈(1004)은, 예를 들어, 도 7a와 관련하여 설명된 바와 같이, 세척 카트리지의 세척 용액에 유동적으로 연결될 수 있다. 다른 실시예들에서, 동일한 필터가 단계(1064a)에서 배지 교환을 위해서 사용되는 필터로서 전기 적격성을 부여하기 위해서 사용된다. 일부 실시예들에서, 1 M 소르비톨이 효모 세포들에 전기 적격성을 부여하기 위해서 사용된다.
- [0268] 일부 구현예들에서, 여과 모듈(1004)에서의 전기 적격성 부여 시에, 세포 원액(1062)이 형질전환을 위한 형질전환 모듈(1006)(예를 들어, 관류 전기천공 모듈)로 전달된다. 일 예에서, 로봇 취급 시스템은 제1 여과 모듈(1004)의 약병 홀더로부터의 세포 원액(1062)의 약병을 관류 전기천공 모듈(1006)의 저장소로 이동시킨다. 또 다른 예에서, 로봇 취급 시스템은 여과 모듈(1004) 또는 일시적인 저장소로부터 세포 원액(1062)을 피펫 채취하고, 그것을 제1 여과 모듈(1004)에 전달한다. 특정 예에서, 제1 여과 모듈(1004)로부터의 400 μ l의 농축된 세포 원액(1062)이 형질전환 모듈(1006)로의 전달 전에 혼합 저장소로 전달된다. 예를 들어, 세포 원액(1062)은 핵산 성분들(골격 및 편집 올리고뉴클레오티드)과의 혼합을 위해서 카트리지가 내의 저장소로 전달되고, 이어서, 혼합되고, 피펫 팁을 사용하여 로봇 취급 시스템에 의해서 전달될 수 있다. 골격(벡터) 및 편집 올리고뉴클레오티드가 세포들에서 (생체내)조립되기 때문에, 핵산 어셈블리 모듈은 효모 편집에 필요한 성분이 아니다. 특정 예에서, 형질전환 모듈은 4 °C에서 유지된다.
- [0269] 일부 구현예들에서, 조립되는 핵산들 및 세포 원액(1062)이 관류 전기천공 모듈(1006)에 첨가되고, 세포 원액(1062)이 형질전환된다(1026e). 로봇 취급 시스템은, 예를 들어, 세포 원액(1062e)과 핵산 어셈블리의 혼합물을, 예를 들어, 피펫 팁을 사용하여 또는 약병 또는 튜브를 전달함을 통해서, 혼합 저장소로부터 관류 전기천공 모듈(1006)로 전달할 수 있다. 일부 실시예들에서, 내장된 관류 전기천공 모듈, 예컨대, 도 5a의 관류 전기천공 모듈들(500)이 세포 원액(1062e)을 형질전환시키기 위해서 사용된다. 다른 실시예들에서, 카트리지가-기반 전기천공 모듈, 예컨대, 도 5b의 관류 전기천공 모듈(530)이 세포 원액(1062e)을 형질전환시키기 위해서 사용된다. 전기천공 모듈(1006)은, 예를 들어, 4 °C의 온도에서 유지될 수 있다.
- [0270] 형질전환된 세포 원액(1062e)은 일부 구현예들에서, 회복(1028a)을 위한 제2 성장 모듈(1008)로 전달된다. 특정 예에서, 20 ml의 형질전환된 세포들이 제2 성장 모듈(1008)에서 회복 과정을 거친다.
- [0271] 일부 구현예들에서, 선택적 배지, 예를 들어, 영양요구성 성장 배지 또는 약물을 함유하는 배지가 제2 성장 약병(예시되지 않음)에 전달되고, 세포들이 선택 과정에서 추가의 기간 동안 배양을 위해서 방치된다. 예시적인

예에서, 항생제가 제2 성장 약병에 전달될 수 있고, 세포들이 30 °C의 온도에서 추가의 2 시간 동안 배양될 수 있다.

- [0272] 회복 후에, 세포들이 또 다른 편집 라운드를 위해서 또는 세포 라이브러리에서의 저장을 위해서 준비될 수 있다. 예를 들어, 세포들의 일부가 세포 라이브러리 출력물(1076a)로서 저장 유닛에 전달될 수 있지만, 세포들의 또 다른 일부는 제1 편집 라운드(1078a)를 위해서 준비될 수 있다. 세포들은, 예를 들어, 4 °C의 온도에서 저장될 수 있다.
- [0273] 일부 구현예들에서, 제2 편집 라운드를 위한 준비에서, 형질전환된 세포들은 배지 교환(1078a)을 위한 제2 여과 모듈(1010)로 전달된다. 형질전환된 세포 원액(1062a)을 전달하기 전에, 일부 구현예들에서, 제2 여과 모듈(1004)의 필터가 세척 용액을 사용하여 사전-세척된다. 세척 용액은, 예를 들어, 세척 카트리지가, 예컨대, 도 1a와 관련하여 설명된 카트리지가(1006)에서 공급될 수 있다. 제2 여과 모듈(1010)은, 예를 들어, 도 7a와 관련하여 설명된 바와 같은 세척 카트리지의 세척 용액에 유동적으로 연결될 수 있다.
- [0274] 제2 여과 모듈(1010)은, 예를 들어, 이중 여과 모듈, 예컨대, 도 7b 및 도 7c와 관련하여 설명된 여과 모듈(750)의 일부일 수 있다. 특정 예에서, 제2 여과 모듈(1010)은 용출 약병과 제2 여과 모듈(1010) 사이에서 세포 물질들을 전달하는 동안의 세척 및 용출 과정 동안에 4 °C에서 유지될 수 있다.
- [0275] 일부 구현예에서, 여과 과정 동안에, 효소 제제(enzymatic preparation)가 첨가되어 세포 원액(1062a)의 세포 벽들을 용해시킨다. 예를 들어, 효모 용해 효소, 예컨대, Zylomase®가 세포 벽들을 용해시키기 위해서 첨가될 수 있다. 효모 용해 효소는, 특정 예에서, 30 °C의 온도에서 5 내지 60 분 동안 세포 원액(1026a)에서 배양될 수 있다. 이러한 여과 과정의 출력물은, 특정 예에서, 약병 또는 튜브에 보관되어 추가의 처리를 기다린다. 약병 또는 튜브가 4 °C의 온도의 저장 유닛에서 유지될 수 있다.
- [0276] 제1 처리 스테이지는 1 일 동안 수행될 수 있다. 작업 흐름(1060)의 이러한 시점에서, 일부 구현예들에서는, 새로운 물질들이 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 수동으로 첨가된다. 예를 들어, 새로운 세포 원액(1062b) 및 새로운 시약 카트리지가 추가될 수 있다. 추가로, 새로운 세척 카트리지가, 교체 필터들, 및/또는 교체 피펫 팁들이 이 시점에서 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템에 첨가될 수 있다. 추가로, 일부 실시예들에서, 필터 모듈은 세정 과정을 거칠 수 있고/있거나 교체 및 액체 폐기물 유닛이 다음 처리 라운드를 위한 준비에서 비워질 수 있다.
- [0277] 일부 구현예들에서, 제2 편집 라운드는 위에 설명된 제1 처리 스테이지와 동일한 모듈들(1002, 104, 1006, 1008, 및 1010), 동일한 처리 단계들(1018, 1064, 1066, 1026, 1028, 및 1076 및/또는 1078), 및 동일한 조건들(예를 들어, 온도 및 시간 범위 등)을 포함한다. 예를 들어, 제2 올리고 라이브러리(1070b)와 제2 sgRNA 골격(1072b)이 위에 설명된 바와 매우 동일한 방식으로 형질전환된 세포들의 조합을 편집하기 위해서 사용될 수 있다. 비록, 2-스테이지 과정으로서 예시되지만, 다른 실시예들에서는, 최대 2, 3, 4, 6, 8 또는 그 초과인 반복 과정이 수행되어 세포 원액(1062)을 계속 편집할 수 있다.
- [0278] **예 I: 완전-자동화 Singleplex RGN-유도된 편집 실행**
- [0279] MAD7 뉴클레아제를 사용한 Singleplex 자동화 게놈 편집이 본 개시의 자동화 다중-모듈 기기로 성공적으로 수행되었다. 미국특허 제9,982,279호 참조.
- [0280] ampR 플라스미드 골격 및 lacZ_F172* 편집 카세트를 자동화 기기 내에 포함된 등은 핵산 어셈블리 모듈에서 Gibson Assembly®를 통해서 "편집 벡터"로 조립하였다. lacZ_F172이 lacZ 유전자를 기능적으로 녹아웃(knock)시켰다. "lacZ_F172*"는 편집이 lacZ 아미노산 서열 내의 172 번째 잔기에서 발생함을 나타낸다. 조립 후에, 생성물을 AMPure 비드들을 사용하여 등은 핵산 어셈블리 모듈에서 탈염시켰고, 80% 에탄올로 세척하였고, 완충액에서 용출시켰다. 조립된 편집 벡터와 재조합공학 준비된 전기 적격성 대장균(*E. Coli*) 세포들을 전기천공을 위한 형질전환 모듈 내로 전달시켰다. 형질전환 모듈은 ADP-EPC 큐벳을 포함하였다. 예를 들어, 미국특허출원 제62/551069호 참조. 세포들 및 핵산들을 조합하고, 1 분 동안 혼합하였고, 전기천공을 30 초 동안 수행하였다. 천공 펄스(poring pulse)를 위한 매개변수들: 전압, 2400 V; 길이, 5 ms; 간격, 50 ms; 펄스들의 수, 1; 극성, +. 전달 펄스들을 위한 매개변수들은: 전압, 150 V; 길이, 50 ms; 간격, 50 ms; 펄스들의 수, 20; 극성, +/-이었다. 전기천공 후에, 세포들을 회복 모듈(또 다른 성장 모듈)로 전달하고, 클로람페니콜을 함유하는 SOC 배지에서 회복되게 하였다. 카르바니실린을 1 시간 후에 배지에 첨가하였고, 세포들을 또 다른 2 시간 동안 회복되게 하였다. 회복 후에, 세포들을 사용자에게 의해서 회복될 때까지 4 °C에서 유지시켰다.

- [0281] 자동화 과정 및 회복 후에, 세포들의 분취액을 락토오스(당 기질로서), 클로람페니콜, 및 카르베니실린이 보충된 맥콘키 한천 베이스(MacConkey agar base) 상에 적층시키고, 집락들이 나타날 때까지 성장시켰다. 백색 집락들은 기능적으로 편집된 세포들을 나타내고, 자주색 집락들은 비-편집된 세포들을 나타냈다. 모든 액체의 전달들은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 자동화 액체 취급 장치에 의해서 수행되었다.
- [0282] 자동화 처리의 결과는, 대략 $1.0E^{-03}$ 전체 세포들이 형질전환되었고(통상의 벤치탑(benchtap) 결과들과 비교 가능), 편집 효율이 83.5%이었다는 것이다. 백색 집락들에서의 lacZ₁₇₂ 편집물은 세포들의 계능의 편집된 영역의 서열화에 의해서 확인되었다. 추가로, 자동화 세포 처리의 단계들이 웹캠(webcam)에 의해서 원격으로 관찰되었고, 문자 메시지가 전송되어 자동화 처리 절차의 상태를 업데이트시켰다.
- [0283] **예 II: 완전-자동화 회귀적 편집 실행**
- [0284] 회귀적 편집을 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템을 사용하여 성공적으로 달성하였다. ampR 플라스미드 골격 및 lacZ_{V10}* 편집 카세트를 자동화 시스템에 포함된 등은 핵산 어셈블리 모듈에서 Gibson Assembly®를 통해서 "편집 벡터" 내로 조립하였다. lacZ_{F172} 편집과 유사하게, lacZ_{V10} 편집은 lacZ 유전자를 기능적으로 녹아웃시켰다. "lacZ_{V10}"는 편집이 lacZ 아미노산 서열 내의 아미노산 위치 10에서 발생함을 나타낸다. 조립 후에, 생성물을 AMPure 비드들을 사용하여 등은 핵산 어셈블리 모듈에서 탈염시켰고, 80% 에탄올로 세척하였고, 완충액에서 용출시켰다. 제1 조립된 편집 벡터와 재조합공학 준비된 전기 적격성 대장균(*E. Coli*) 세포들을 전기천공을 위한 형질전환 모듈 내로 전달시켰다. 형질전환 모듈은 ADP-EPC 큐벳을 포함하였다. 세포들 및 핵산들을 조합하고, 1 분 동안 혼합하였고, 전기천공을 30 초 동안 수행하였다. 천공 펄스를 위한 매개변수들은: 전압, 2400 V; 길이, 5 ms; 간격, 50 ms; 펄스들의 수, 1; 극성, +이었다. 전달 펄스들을 위한 매개변수들은: 전압, 150 V; 길이, 50 ms; 간격, 50 ms; 펄스들의 수, 20; 극성, +/-이었다. 전기천공 후에, 세포들을 회복 모듈(다른 성장 모듈)로 전달하고, 클로람페니콜을 함유하는 SOC 배지에서 회복하게 하였다. 카르베니실린을 1 시간 후에 배지에 첨가하고, 세포들을 또 다른 2 시간 동안 성장시켰다. 이어서, 세포들을 원심분리 모듈에 전달한 다음, 배지 교환을 수행하였다. 세포들을 클로람페니콜 및 카르베니실린을 함유하는 TB에 재현탁시켰고, 그곳에서 세포들이 2.7의 OD₆₀₀으로 성장한 후에, 농축되고, 전기 적격성이 부여되었다.
- [0285] 세포 성장 동안에, 제2 편집 벡터를 등은 핵산 어셈블리 모듈에서 제조하였다. 제2 편집 벡터는 카나마이신 내성 유전자를 포함하였고, 편집 카세트는 galK Y145* 편집물을 포함하였다. 성공적이면, galK Y145* 편집은 세포들에 갈락토오스를 흡수하고 대사하는 능력을 부여한다. galK Y154* 카세트에 의해서 생성된 편집은 154 번째 아미노산 잔기에 있는 정지 코돈을 도입하여, 티로신 아미노산을 정지 코돈으로 변화시킨다. 이러한 편집은 galK 유전자 생성물을 비-기능성있게 하고 세포들이 갈락토오스를 대사할 수 있는 것을 억제한다. 조립 후에, 제2 편집 벡터 생성물을 AMPure 비드들을 사용하여 등은 핵산 어셈블리 모듈에서 탈염시키고, 80% 에탄올로 세척하고, 완충액에서 용출시켰다. 조립된 제2 편집 벡터 및 전기 적격성 대장균(*E. Coli*) 세포들(형질전환되고 제1 편집 벡터를 위해서 선택됨)을 위에 설명된 것과 동일한 매개변수들을 이용하여 전기천공을 위한 형질전환 모듈 내로 전달시켰다. 전기천공 후에, 세포들을 회복 모듈(또 다른 성장 모듈)로 전달하고, 카르베니실린을 함유하는 SOC 배지에서 회복되게 하였다. 회복 후에, 세포들을 검색될 때까지 4 °C에서 유지시켰고, 그 후에, 세포들의 분취액을 클로람페니콜, 및 카나마이신으로 보충된 LB 한천 상에 적층시켰다. lacZ 및 galK 편집들을 정량화하기 위해서, 복제 패치 플레이트들을 두 가지 배지 유형 상에서 생성시켰다: 1) 락토오스(당 기질로서), 클로람페니콜, 및 카나마이신으로 보충된 맥콘키 한천 베이스, 및 2) 갈락토오스(당 기질로서), 클로람페니콜, 및 카나마이신으로 보충된 맥콘키 한천 베이스. 모든 액체 전달들은 자동화 다중-모듈 세포 처리 시스템의 자동화 액체 취급 장치에 의해서 수행되었다.
- [0286] 이러한 회귀적 편집 실험에서, 선별된 집락들의 41%는 lacZ 및 galK 편집들 둘 모두를 가졌고, 이의 결과는 "벤치탑(benchtap)" 또는 수동 접근법을 이용하여 얻은 이중 편집 효율들에 비견되었다.
- [0287] **기기 구조의 대안적인 실시예들**
- [0288] 도 12a 및 도 12b는 단일 사이클에서 복수의 세포들에서의 자동화 세포 처리, 예를 들어, 편집을 수행하기 위한 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기의 예시적인 대안적 실시예들을 예시하고 있다. 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은, 예를 들어, 실험실 환경 내에서 사용을 위해서 설계된 데스크탑 기기들일 수 있다. 그러한 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 세포들에서의 자동화 계능 절단 및/또는 편집을 수행하는데 있어서의 다양한 단계적 작업을 수행하기 위한 재사용 가능한 일회용 요소들의 혼합을 포함할 수 있다.

- [0289] 도 12a는 본 개시의 일 실시예에 따라서 단일 사이클에서 복수의 세포들에서의 자동화 세포 처리, 예를 들어, 편집을 수행하기 위한 제1 예시적인 기기(1200)의 블록 다이어그램이다. 일부 구현예들에서, 기기(1200)는 데크(1202), DNA 샘플 성분들을 기기(1200)에 도입하기 위한 시약 공급 용기(1204), 세포들을 기기(1200)에 도입하기 위한 세포 공급 용기(1206), 및 기기(1200)의 모듈들(예를 들어, 모듈들(1210a, 1210b, 1210c, 1210d)), 용기들(예를 들어, 용기들(1204, 1206, 1212, 1222, 1224, 및 1226))과 기기(1200)의 저장 유닛들(예를 들어, 유닛들(1216, 1218, 1228, 및 1214)) 사이에서 물질들을 전달시켜 자동화 세포 처리를 수행하기 위한 로봇 취급 시스템(1208)을 포함한다. 세포 공급(1206)의 처리의 완료 시에, 일부 실시예들에서, 세포 출력물(1212)이 로봇 취급 시스템(1208)에 의해서 일시적인 저장 및 후속 검색을 위한 저장 유닛(1214)으로 전달될 수 있다.
- [0290] 로봇 취급 시스템(1208)은, 예를 들어, 액체들을 다양한 물질 소스들로부터 다양한 모듈들(1210) 및 저장 유닛(1214)으로 전달하기 위한 공기 변위 펌프(air displacement pump)를 포함할 수 있다. 다른 실시예들에서, 로봇 취급 시스템(1208)은 소스 물질들의 용기들(예를 들어, 튜브들)을 공급 카트리지(예시되지 않음, 도 1a와 관련하여 논의됨)로부터 다양한 모듈들(1210)로 전달하기 위한 픽 앤 플레이스 헤드(pick and place head)를 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 하나 이상의 카메라들 또는 다른 광학 센서들(도시되지 않음)이 적절한 갠트리(gantry) 이동 및 위치를 확인한다.
- [0291] 일부 실시예들에서, 로봇 취급 시스템(1208)은 기기(1200) 내에서 소스 물질들, 시약(1204) (예를 들어, 핵산 어셈블리), 및 세포들(1206)을 전달하기 위한 전달 팁 공급에 제공된 일회용 전달 팁들(1216)을 사용한다. 사용된 전달 팁들(1216)은, 예를 들어, 고체 폐기물 유닛(1218)에서 폐기될 수 있다. 일부 구현예들에서, 고체 폐기물 유닛(1218)은 로봇 취급 시스템(1208)의 픽 앤 플레이스 헤드로부터 튜브를 제거하기 위한 키퍼(kicker)를 함유한다.
- [0292] 일부 실시예들에서, 기기(1200)는 공기 변위 펌프에 연결되는 시퍼들을 구비한 전기천공기(electroporator) 큐벳들을 포함한다. 일부 구현예들에서, 세포들(1206) 및 시약(1204)이 시퍼를 통해서 전기천공 큐벳 내로 흡입되고, 큐벳이 기기(1200)의 하나 이상의 모듈들(1210)로 이동된다.
- [0293] 일부 구현예들에서, 기기(1200)는 처리 시스템(1220), 예컨대, 도 13의 처리 시스템(1310)에 의해서 제어된다. 처리 시스템(1220)은 사용자 입력을 기반으로 하여 기기(100)를 작동시키도록 구성될 수 있다. 처리 시스템(1220)은 기기(1200)의 다양한 모듈들(1210)의 시간, 기간, 온도 및 다른 작동들을 제어할 수 있다. 처리 시스템(1220)은 기기(1200)의 작동을 위한 전원(도시되지 않음)에 연결될 수 있다.
- [0294] 일부 실시예들에서, 기기(1200)는, 예를 들어, 편집의 상황에서, 세포들(1206) 내로의 핵산(들)의 도입을 위한 형질전환 모듈(1210c)을 포함한다. 예를 들어, 로봇 취급 시스템(1208)은 시약(1204) 및 세포들(1206)을 형질전환 모듈(1210c)로 전달할 수 있다. 형질전환 모듈(1210)은 형질감염, 형질전환 및 미세 유체 공학(microfluidics)의 분야에서 통상의 기술자에 의해서 통상적으로 사용되는 임의의 세포 형질전환 또는 형질감염 기술들을 수행할 수 있다. 형질전환은, 이들 형질전환 및 형질감염 기술들을 포함한, 표적 세포 내로 외인성 핵산 서열(예를 들어, DNA)을 도입시키기 위한 다양한 본 기술분야에서 인식되는 기술들을 포함하도록 의도된다. 그러한 방법들은 전기천공, 리포펙션(lipofection), 옵토포레이션(optoporation), 주입(injection), 미량침전(microprecipitation), 미세주입(microinjection), 리포솜들(liposomes), 입자 충격(particle bombardment), 소노포레이션(sonoporation), 레이저-유도 천공(laser-induced poration), 비드 형질감염, 인산 칼슘 또는 염화칼슘 공침, 또는 DEAE-덱스트란-매개 형질감염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 형질전환은 마이크로퓨지 튜브들(microfuge tubes), 시험 튜브들, 큐벳들, 다중-벽 플레이트들, 미세섬유들, 또는 흐름 기기들에서 수행될 수 있다. 처리 시스템(1220)은 형질전환 모듈(1210c)의 온도 및 작동을 제어할 수 있다. 일부 구현예들에서, 처리 시스템(1220)은 사용자에게 의해서 설정된 하나 이상의 가변 제어들에 따라서 형질전환 모듈(1210c)의 작동에 영향을 준다.
- [0295] 일부 구현예들에서, 형질전환 모듈(1210c)은 세포 적격성(cell competence)을 전처리 용액(1222), 예를 들어, 수크로오스 또는 글리세롤 세척액으로 증가시킴으로써 벡터 흡수를 위한 세포들을 제조하도록 구성된다. 추가적으로, 기계적 및 화학적 형질감염 방법들의 능력들을 이용하는 하이브리드 기술들, 예를 들어, 화학적 형질감염을 기계적 방법들과 조합하는 형질감염 방법인 마그네토펙션이 이용될 수 있다. 다른 예에서, 양이온성 지질들이 유전자 총들(gene guns) 또는 전기천공기들과 조합하여 배치될 수 있다. 표적 세포들을 형질전환시키거나 형질감염시키기에 적합한 물질들 및 방법들은, 예를 들어, 문헌[Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2014] 및 그 밖의 실험 매뉴얼들에서 발견될 수 있다.

- [0296] 형질전환 후에, 일부 구현예들에서, 세포들은 회복 모듈(1210d)에 전달될 수 있다. 일부 실시예들에서, 회복 모듈(1210d)은 편집 모듈의 조합 회복 및 유도이다. 회복 모듈(1210d)에서, 세포들이 회복되고 핵산들을 발현하게 할 수 있으며, 유도 가능한 뉴클레아제 시스템에서, 뉴클레아제가, 예를 들어, 일시적으로-제어된 유도, 예컨대, 일부 예들에서, 화학적, 빛, 바이러스, 또는 온도 유도 또는 뉴클레아제의 발현을 위한 유도인자 분자(1224)의 도입에 의해서, 세포들에 도입된다.
- [0297] 편집 후에, 일부 구현예들에서, 세포들은 저장 유닛(1214)에 전달되고, 그곳에서, 세포들은, 그러한 세포들이 편집된 세포 집단, 예를 들어, 편집된 세포 라이브러리의 추가의 연구 또는 검색을 위해서 제거될 때까지, 세포 출력물(1212)로서 저장될 수 있다.
- [0298] 일부 구현예들에서, 기기(1200)는 회귀적 계놈 편집을 위해서 설계되고, 그곳에서, 복수의 편집들이 세포 집단의 세포들 내의 계놈 내로 순차적으로 도입된다. 일부 구현예들에서, 시약 공급(1204)은 회귀적 처리를 위해서 저장 유닛으로부터 세포 출력물(1212)에 접근하기 전에 보충된다. 다른 구현예들에서, 복수의 시약 공급물들(1204) 및/또는 이들의 큰 부피들이 기기(1200) 내로 도입되어, 사용자 상호작용이 후속 처리 사이클 전에 반드시 요구되지 않게 할 수 있다.
- [0299] 세포 출력물(1212a)의 일부가, 일부 실시예들에서, 자동화 세포 성장 모듈(1210a)에 전달된다. 예를 들어, 세포 출력물(1212a)의 모두가 전달될 수 있거나, 단지 분취액이 전달되어, 기기가 점증적으로 개질된 샘플을 보유하게 할 수 있다. 세포 성장 모듈(1210a)은, 일부 구현예들에서, 성장 동안에 세포들의 OD를 측정하여 이들이 편집의 유도 전에 원하는 농도에 있는 것을 확실하게 한다. 이용될 수 있는 세포 밀도 및 생리학적 상태의 그 밖의 척도들은 pH, 용존산소, 방출된 효소들, 음향학적 특성들 및 전기적 특성들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0300] 계놈 편집을 받지 않은 세포들의 배경을 감소시키기 위해서, 일부 실시예들에서, 성장 모듈(1210a)은 선택적 성장 배지(1226)를 사용하여 편집된 세포들을 부화시키기 위해서 선택 과정을 수행한다. 예를 들어, 도입된 핵산은 항생제 내성을 부여하는 유전자 또는 또 다른 선택 가능한 마커를 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 복수의 선택적 유전자들 또는 마커들(1226)이 회귀적 편집 동안에 세포들 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 순차적 편집 라운드들을 위해서 선택 가능한 마커들의 도입을 교번시키는 것은 비편집된 세포들의 배경을 제거할 수 있고, 기기(1200)의 복수의 사이클들이 순차적 계놈 편집들을 갖는 세포들을 선택하게 한다. 적합한 항생제 내성 유전자들은 암피실린-내성 유전자, 테트라사이클린-내성 유전자, 카나마이신-내성 유전자, 네오마이신-내성 유전자, 카나바닌-내성 유전자, 블라스티사이드인-내성 유전자, 히그로마이신-내성 유전자, 퓨로마이신-내성 유전자, 및 클로람페니콜-내성 유전자와 같은 유전자들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0301] 성장 모듈(1210a)로부터, 세포들이 여과 모듈(1210b)로 전달될 수 있다. 여과 모듈(1210b) 또는, 대안적으로, 세포 세척 및 농축 모듈이 배지 교환을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시예들에서, 죽은 세포 배경을 제거하는 것은 용해 증진제들, 예컨대, 세정제들, 삼투 스트레스, 온도, 효소들, 프로테아제들, 박테리오파아지, 환원제들, 또는 카오트로프들을 사용하여 보조된다. 다른 실시예들에서, 세포 제거 및/또는 배지 교환이 죽은 세포 배경을 감소시키기 위해서 이용된다. 여과 모듈(1210b)로부터의 폐기물 생성물은, 일부 실시예들에서, 액체 폐기물 유닛(1228)에서 수집된다.
- [0302] 여과 후에, 세포들은 형질전환 모듈(1210c)에, 그리고 이어서, 회복 모듈(1210d)에, 그리고 마지막으로, 위에서 상세히 설명된 바와 같은 저장 유닛(1214)에 제시될 수 있다.
- [0303] 도 12b를 참조하면, 도 12a와 유사하게, 단일 사이클에서의 복수의 세포들에서 자동화 계놈 절단 및/또는 편집을 수행하기 위한 제2 예시적인 기기(1240)는 데크(1202), 기기(1240)에 하나 이상의 핵산 성분들을 도입하기 위한 시약 공급 용기(1204), 기기(1240)에 세포들을 도입하기 위한 세포 공급 용기(1206), 및 기기(1240)의 모듈들(예를 들어, 모듈들(1210a, 1210b, 1210c, 1210f, 1210g, 1210m, 및 1210h)), 용기들(예를 들어, 용기들(1204, 1206, 1212, 1214, 1224, 1242, 1244, 및 1246)), 및 저장 유닛들(예를 들어, 유닛들(1214, 1216, 1218, 및 1228)) 사이에서 물질들을 이동시켜 자동화 세포 처리를 수행하기 위한 로봇 취급 시스템(1208)을 포함한다. 세포 공급(1206)의 처리의 완료 시에, 일부 실시예들에서, 세포 출력물(1212)이 로봇 취급 시스템(1208)에 의해서 일시적인 저장 및 후속 검색을 위한 저장 유닛(1214)으로 전달될 수 있다.
- [0304] 일부 실시예들에서, 로봇 취급 시스템(1208)은, 도 12a와 관련되어 설명된 바와 같이, 기기(1240) 내에서 소스 물질들, 벡터 골격(1242), 편집 올리고들(1244), 시약(1204)(예를 들어, 핵산 어셈블리를 위한, 핵산 정제를 위한, 세포들에 전기 적격성을 부여하기 위한, 등), 및 세포들(1206)을 전달하기 위해서 전달 팁 공급(1216)에서

제공된 일회용 전달 팁들을 사용한다.

- [0305] 다른 실시예들에서, 기기(1240)는 공기 변위 펌프에 연결되는 시퍼들을 구비한 전기천공기 큐벳들을 포함한다. 일부 구현예들에서, 세포들(1206) 및 시약(1204)이 시퍼를 통해서 전기천공 큐벳 내로 흡입되고, 큐벳이 기기(1240)의 하나 이상의 모듈(1210)로 이동된다.
- [0306] 도 12a와 관련하여 설명된 바와 같이, 일부 구현예들에서, 기기(1240)는 처리 시스템(1220), 예컨대, 도 13의 처리 시스템(1310)에 의해서 제어된다.
- [0307] 기기(1240)는, 일부 실시예들에서, 핵산 어셈블리 모듈(1210g)을 포함하고, 특정 예에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기들, 핵산 어셈블리 모듈(1210g)은, 일부 실시예들에서, 등은 핵산 어셈블리를 포함할 수 있다. 위에 설명된 바와 같이, 등은 핵산 어셈블리 모듈은 Gibson Assembly® 분자 클로닝 방법을 수행하도록 구성된다.
- [0308] 일부 실시예들에서, 핵산들의 조립 후에, 핵산들(예를 들어, 등은 핵산 어셈블리의 예에서, 등은 핵산 조립 혼합물(핵산들 + 등은 핵산 조립 시약들))이 정제 모듈(1210h)에 전달된다. 여기에서, 핵산 조립 혼합물의 원치 않는 성분들이 제거되고(예를 들어, 염류, 미네랄들), 특정의 실시예에서, 조립된 핵산들이 농축된다. 예를 들어, 예시적인 실시예에서, 정제 모듈(1210h)에서, 등은 핵산 조립 혼합물이 무-염 완충액 및 자성 비드들, 예컨대, 고품상 가역적 고정화(Solid Phase Reversible Immobilization: SPRI) 자성 비드들 또는 AMPure 비드들과 조합될 수 있다. 등은 핵산 조립 혼합물은 조립된 핵산들이 자성 비드들에 결합되도록 충분한 시간(예를 들어, 30초 내지 10 분) 동안 배양될 수 있다. 일부 실시예들에서, 정제 모듈은 자성 비드들과 맞물리도록 구성된 자석을 포함한다. 자석은 상청액이 결합되고 조립된 핵산들로부터 제거될 수 있도록 그리고 결합되고 조립된 핵산들이, 예를 들어, 80% 에탄올로 세척될 수 있도록 맞물릴 수 있다. 다시 설명하면, 자석이 맞물릴 수 있고, 80% 에탄올 세척 용액이 제거될 수 있다. 자성 비드/조립된 핵산들이 건조되어질 수 있고, 이어서, 조립된 핵산들이 용출될 수 있고, 자석이 이때 다시 맞물려서 비드들을 격리시키고, 용출되고 조립된 핵산들을 함유하는 상청액을 제거한다. 이어서, 조립된 핵산들은 형질전환 모듈(예를 들어, 바람직한 실시예에서 전기천공기)에 전달될 수 있다. 형질전환 모듈은 이미 전달 시의 전기 적격성 세포들을 함유할 수 있다.
- [0309] 일부 실시예들에서, 기기(1240)는, 도 12a와 관련하여 설명된 바와 같이, 세포들(1206) 내로의 핵산(들)의 도입을 위해서 형질전환 모듈(1210c)을 포함한다. 그러나, 이러한 환경에서, 정제 모듈(1210h)로부터 출력된 조립된 핵산들(1204)이 세포들(1206)과의 조합을 위해서 형질전환 모듈(1210c)에 전달된다.
- [0310] 형질전환 모듈(1210c)에서의 형질전환 후에, 일부 구현예들에서, 세포들은 회복 모듈(1210m)로 전달될 수 있다. 회복 모듈(1210e)에서, 세포들은 회복되게 하고, 핵산들을 발현하게 할 수 있으며, 유도 가능한 뉴클레아제 시스템에서, 뉴클레아제가, 예를 들어, 일시적으로-제어된 유도, 예컨대, 일부예들에서, 화학적, 빛, 바이러스, 또는 온도 유도 또는 뉴클레아제의 발현을 위한 유도인자 분자의 도입에 의해서, 유도된다.
- [0311] 회복 후에, 일부 구현예들에서, 세포들은 편집 모듈(1210f)에 전달된다. 편집 모듈(1210f)은 적절한 조건들을 공급하여, 예를 들어, 도입된 핵산들의 발현 및 유도 가능한 뉴클레아제의 유도를 통해서, 세포들의 게놈들의 편집을 유도한다. 세포들은 유도 가능한 뉴클레아제를 포함할 수 있다. 뉴클레아제는, 일부 예들에서, 편집 모듈(1210f) 내에서 화학적으로 유도되고/되거나, 생물학적으로 유도되고/되거나(예를 들어, 유도 가능한 프로모터를 통해서), 바이러스적으로 유도되고/되거나, 빛 유도되고/되거나, 온도 유도되고/되거나, 열 유도될 수 있다.
- [0312] 편집 후에, 일부 구현예들에서, 세포들은 도 12a와 관련하여 설명된 바와 같은 저장 유닛(1214)으로 전달된다.
- [0313] 일부 구현예들에서, 기기(1240)는 회귀적 게놈 편집을 위해서 설계되고, 그곳에서, 복수의 편집들이 세포 집단의 세포들의 내부의 게놈들 내로 순차적으로 도입된다. 일부 구현예들에서, 시약 공급(1204)은 회귀적 처리를 위한 저장 유닛으로부터의 세포 출력물(1212)에의 접근 전에 보충된다. 예를 들어, 추가의 벡터 골격(1242) 및/또는 편집 올리고들(1244)이 핵산 어셈블리 모듈(1210g) 및 정제 모듈(1210h)을 통한 조립 및 제조를 위한 기기(1240) 내로 도입될 수 있다. 다른 구현예들에서, 복수의 벡터 골격 부피들(1242) 및/또는 편집 올리고들(1244)이 기기(1240) 내로 도입되어, 사용자 상호작용이 후속 처리 사이클 전에 반드시 요구되지는 않게 될 수 있다. 각각의 후속 사이클을 위해서, 벡터 골격(1242) 및/또는 편집 올리고들(1244)이 변화될 수 있다. 핵산 어셈블리의 준비 시에, 핵산 어셈블리가 시약 공급(1204) 또는 또 다른 저장 영역에서 제공될 수 있다.
- [0314] 세포 출력물(1212a)의 일부는, 일부 실시예들에서, 도 12a와 관련하여 논의된 바와 같이, 자동화 세포 성장 모듈(1210a)로 전달된다.

- [0315] 계층 편집을 받지 않은 세포들의 배경을 감소시키기 위해서, 일부 실시예들에서, 성장 모듈(1210a)은, 도 12a와 관련하여 논의된 바와 같이, 선택적 성장 배지(1226)를 사용하여 편집된 세포들을 부화시키기 위해서 선택 과정을 수행한다.
- [0316] 성장 모듈(1210a)로부터, 세포들은, 도 12a와 관련하여 논의된 바와 같이, 여과 모듈(1210b)로 전달될 수 있다. 예시된 바와 같이, 용출 공급(1246)으로부터의 용출물(예를 들어, 완충액, 글리세롤)이 배지 교환을 위해서 여과 모듈(1210b) 내로 전달될 수 있다.
- [0317] 여과 후에, 세포들은 형질전환을 위한 형질전환 모듈(1210c)에, 그리고 이어서, 회복 모듈(110m) 및 편집 모듈(1210f)에, 그리고 마지막으로, 위에서 상세히 설명된 바와 같은 저장 유닛(1214)에 제시될 수 있다.
- [0318] 일부 실시예들에서, 도 12a 및/또는 도 12b의 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기는, 도 1a 및 도 1b와 관련하여 논의된 바와 같이, 하나 이상의 교체 가능한 공급 카트리지를 및 로봇 취급 시스템을 포함할 수 있다. 각각의 카트리는 핵산 조립 혼합물, 올리고뉴클레오타이드들, 벡터, 성장 배지, 선택 물질(예를 들어, 항생제들), 유도제, 핵산 정제 시약들, 예컨대, 고상 가역적 고정화(SPRI) 비드들, 에탄올, 및 10% 글리세롤 중 하나 이상을 함유할 수 있다.
- [0319] 비록, 예시적인 기기들(1200, 1240)이 모듈들(1210)의 특성의 배열을 포함하는 것으로 예시되지만, 이들 배열들은 단지 예시 목적을 위한 것이다. 예를 들어, 다른 실시예들에서, 더 많거나 더 적은 모듈들(1210)이 기기들(1200, 1240)의 각각 내에 포함될 수 있다. 또한, 상이한 모듈들, 예컨대, 예를 들어, 하이브리도마들(hybridomas)을 제공하기 위한 세포 융합을 촉진하는 모듈, 조립 전에 핵산들을 증폭시키는 모듈, 및/또는 단백질 발현 및/또는 분비를 촉진하는 모듈이 기기에 포함될 수 있다. 추가로, 특성의 모듈들(1210), 예컨대, 도 1a의 복제 세포 성장 모듈들(110a, 110b)이 특성의 실시예들 내에서 되풀이될 수 있다. 기기들(1200 및 1240)의 각각이, 또 다른 예에서, 배지 카트리지, 예컨대, 도 1a의 카트리지들(104 및 106)을 수용하도록 설계될 수 있다. 추가의 변형들이 가능하다.
- [0320] **자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 대한 제어 시스템**
- [0321] 도 11을 참조하면, 스크린 샷(screen shot)은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기와 인터페이싱(interfacing)하기 위한 예시적인 그래픽 사용자 인터페이스(graphical user interface (GUI): 1100)를 예시한다. 인터페이스는, 예를 들어, 도 2c 및 도 2d의 디스플레이(236) 상에 제시될 수 있다. 일 예에서, GUI(1100)는 터치 스크린(touch screen: 1316) 상에 도 13의 처리 시스템(1310)에 의해서 제시될 수 있다.
- [0322] 일부 구현예들에서, GUI(1100)는 많은 정보 및 데이터 창들, 예컨대, 프로토콜 창(protocol pane: 1102), 온도 창(1106), 전기천공 창(1108) 및 세포 성장 창(1110)으로 분할된다. 추가의 창들이 가능하다. 예를 들어, 일부 실시예들에서, GUI(1100)는 각각의 모듈, 예컨대, 일부 예들에서, 핵산 어셈블리 모듈, 정제 모듈, 세포 성장 모듈, 여과 모듈, 형질전환 모듈, 편집 모듈, 및 회복 모듈의 각각중 하나 이상을 위한 창을 포함한다. GUI(1100)의 하부 창들은, 일부 실시예들에서, 현재의 작업 흐름(예를 들어, 프로토콜 창(1102)에서 선택되는 바와 같거나, 스크립트 인터페이스를 통해서 로딩된 스크립트 내에서 지정된 바와 같음(예시되지 않음))에 적용 가능한 모듈들을 나타낸다. 일부 실시예들에서, 스크롤 또는 페이징 피쳐(scroll or paging feature)가 사용자가 도 11의 스크린 샷 내에 예시되지 않은 추가의 창에 접근할 수 있게 할 수 있다.
- [0323] GUI(1100)는, 일부 실시예들에서, 다양한 스크린들, 예컨대, 예시된 스크린 샷에 (예를 들어, 홈 제어(1120a)의 사용을 통해서) 접근하기 위한 일련의 제어들(1120)을 포함한다. 예를 들어, 편집 제어(1120b)의 선택을 통해서, 사용자에게는 하나, 둘 또는 일련의 세포 처리 단계들을 제공하기 위한 옵션이 제공될 수 있다. 스크립트 제어(1120c)의 선택을 통해서, 사용자에게는 새로운 처리 스크립트를 추가하거나 기존의 처리 스크립트를 변경하기 위한 기회가 제공될 수 있다. 사용자는, 일부 실시예들에서, 헬프 제어(1120d)를 선택하여 GUI(1100) 및 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 피쳐들에 관한 추가의 정보를 얻을 수 있다. 일부 구현예들에서, 사용자는 설정 제어(settings control: 1120e)를 선택하여 원하는 처리 및/또는 GUI(100), 예컨대, 일부 예들에서, 시간대(time zone), 언어, 유닛들, 네트워크 접근 옵션들을 위한 설정 옵션들에 접근한다. 전력 제어(1120f)는, 선택되는 때에, 사용자가 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 전력을 차단할 수 있게 한다.
- [0324] 프로토콜 창(1102)을 참조하면, 일부 구현예들에서, 사용자는 프로토콜 엔트리 필드(protocol entry field: 1112)에서 프로토콜(또는, 대안적으로, 드롭-다운 메뉴: drop-down menu)을 입력함으로써 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에 의해 실행될 프로토콜(예를 들어, 스크립트 또는 작업 흐름)을 선택한다. 다른 실시예들에서, 프로토콜은 예를 들어, 스크립트 제어(1120b)를 선택함으로써 접근된 별도의 사용자 인터페이스 스크린을 통해

서 선택될 수 있다. 다른 예에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기는 프로토콜을 선택하고 그것을 프로토콜 엔트리 필드(1112)에 제시할 수 있다. 예를 들어, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 처리 시스템은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기 내로 로딩된 하나 이상의 카트리지 상에 위치한 기계-관독 가능한 표시를 스캐닝하여 적절한 프로토콜을 결정할 수 있다. 예시된 바와 같이, "Microbe_Kit1 (1.0.2)" 프로토콜이 선택되었으며, 이는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기와 함께 사용하기 위해서 구매한 카트리지들 및 그 밖의 일회용 용품들의 키트에 대응할 수 있다.

[0325] 일부 구현예들에서, 프로토콜 창(1102)은 추가로 프로토콜 엔트리 필드(1112)에 제시된 프로토콜의 실행을 제어하기 위한 출발 제어(1114a) 및 정지 제어(1114b)를 더 포함한다. GUI(1100)는, 예를 들어, 터치 스크린 인터페이스 상에 제공될 수 있고, 그곳에서, 출발 제어(1114a)의 터치 선택이 세포 처리를 시작하고, 정지 제어(1114b)의 선택이 세포 처리를 정지시킨다.

[0326] 실행 상태 창(run status pane: 1104)을 참조하면, 일부 구현예들에서, 차트(1116)는 프로토콜 창(protocol pane: 1102)에서 확인된 프로토콜의 처리의 스테이지들을 예시한다. 예를 들어, 실행 완료(1118a)의 일부가 청색으로 예시되는 반면에, 현재 스테이지(1118b)의 일부가 녹색으로 예시되고, 임의의 에러들(1118c)은 에러가 발생된 실행 완료(1118a)의 일부의 과정을 따라서 시점으로부터 연장되는 마커들로 표시된다. 메시지 영역(1118d)은 완료된 실행의 백분율, 완료된 스테이지의 백분율, 및 전체 에러의 수를 나타낸다. 일부 실시예들에서, 차트(1116)를 선택하면, 사용자에게 실행 상태에 관한 더 많은 세부사항들, 예컨대, 일부 예들에서, 에러의 유형의 식별, 현재 처리 스테이지의 명칭(예를 들어, 핵산 조립, 정제, 세포 성장, 여과, 형질전환, 회복, 편집 등), 및 실행 내의 처리 스테이지들의 목록이 제시될 수 있다. 추가로, 일부 실시예들에서, 실행 완료 시간 메시지는 실행이 완료될 것으로 추정되는 날짜 및 시간을 나타낸다. 실행은, 일부 예들에서, 사용자 개입 없이 실행되도록 계획된 단일 세포 편집 과정 또는 일련의 회귀적 세포 편집 과정들을 나타낼 수 있다. 일부 실시예들(도시되지 않음)에서, 실행 상태 창(1104)은 추가적으로 사용자 개입이 요구될 추정된 시간(예를 들어, 카트리지 교체, 고형 폐기물 폐기, 액체 폐기물 폐기 등)을 예시한다.

[0327] 일부 구현예들에서, 실행 상태 창(1104)은 세포 처리를 일시 정지하기 위한 일시 정지 제어(1124)를 포함한다. 사용자는, 예를 들어, 식별된 에러를 정정하거나 폐기물 제거와 같은 수동 개입을 수행하기 위해서 현재 실행을 일시 정지시키는 것을 선택할 수 있다.

[0328] 온도 창(1106)은, 일부 실시예들에서, 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 다양한 장치를 위한 온도 설정을 나타내는 대응하는 메시지들(1128)을 갖는 일련의 아이콘들(1126)을 예시한다. 아이콘들은, 좌측으로부터 우측으로, 형질전환 모듈(1126a)(예를 들어, 도 1a의 시약 카트리지(110c)와 연관된 관류 전기천공 카트리지 또는 도 5b의 관류 전기천공 장치들(534)), 정제 모듈(1126b), 제1 성장 모듈(1126c), 제2 성장 모듈(1126d), 및 여과 모듈(1126e)을 나타낼 수 있다. 대응하는 메시지들(1128a 내지 1128e)은 대응하는 모듈의 현재 온도, 낮은 온도 및 높은 온도(예를 들어, 본 스테이지 또는 본 실행에 대해서)를 식별한다. 아이콘들(1126) 중 하나를 선택하는데 있어서, 일부 실시예들에서, 시간의 온도의 그래픽 디스플레이가 검토될 수 있다.

[0329] 온도 창 아래에서, 일부 구현예들에서는, 일련의 창들이 많은 모듈들의 현재 상태를 식별한다. 예를 들어, 전기천공 창(1108)은 형질전환 모듈의 상태를 나타내는 반면에, 세포 성장 창(1110)은 성장 모듈의 상태를 나타낸다. 일부 실시예들에서, 여기에서 나타난 창들은 현재 실행 동안에 이미 사용된 임의의 모듈들의 상태(예시된 바와 같이, 실행 상태 창(1104)에서)뿐만 아니라 현재 작동 모듈(예를 들어, 현재 스테이지에서의 세포 처리에 포함된 모듈)의 상태를 식별한다. 과거 상태 정보가, 예를 들어, 세포 처리의 앞선 스테이지(들)에서 사용된 매개변수들에 관한 정보를 사용자에게 제시할 수 있다.

[0330] 전기천공 창(1108)을 참조하면, 일부 구현예들에서, 볼트, 밀리암페어, 및 줄(joule)의 작동 매개변수들(1130a)이 제시된다. 추가적으로, 상태 메시지(1132a)는 형질전환 모듈의 기능에 관한 추가의 정보, 예컨대, 일부 예들에서, 에러 상태, 남은 처리 시간, 모듈의 내용물(예를 들어, 모듈에 첨가된 물질들)을 식별할 수 있다. 일부 구현예들에서, 상태 메시지(1132a) 위의 아이콘(1134a)은 대응하는 모듈이 능동적으로 처리될 때 활성 모드(예를 들어, 색상, "리트 업(lit up)", 진하게, 등)로 제시될 것이다. 아이콘(1134a)의 선택은, 일부 실시예들에서, 작동 매개변수들(1130a)에 관한 상세한 정보를 그래픽 디스플레이로 표시하게 한다.

[0331] 세포 성장 창(1110)을 참조하면, 일부 구현예들에서, OD 및 성장 시간들의 작동 매개변수들(1130b)이 제시된다. 추가적으로, 상태 메시지(1132b)는 성장 모듈의 기능에 관한 추가의 정보, 예컨대, 일부 예들에서, 에러 상태, 남은 처리 시간, 또는 모듈의 내용물(예를 들어, 모듈에 첨가된 물질들)을 식별할 수 있다. 일부 구현예들에서, 상태 메시지(1132b) 위의 아이콘(1134b)은 대응하는 모듈이 능동적으로 처리될 때 활성 모드(예

를 들어, 색상, "리트 업(lit up)", 진하게, 등)로 제시될 것이다. 아이콘(1134b)의 선택은, 일부 실시예들에서, 작동 매개변수들(1130b)에 관한 상세한 정보를 그래픽 디스플레이로 표시하게 한다.

- [0332] 다음으로, 예시적인 실시예에 따른 예시적인 처리 시스템 및 처리 환경의 하드웨어 설명이 도 13을 참조로 하여 설명된다. 도 13에서, 처리 시스템(1310)은 위에 설명된 과정의 일부를 수행하는 CPU(1308)를 포함한다. 예를 들어, CPU(1308)는 도 9의 방법(900)의 처리 스테이지들 및/또는 도 10a 내지 도 10c의 작업 흐름들을 관리할 수 있다. 처리 데이터, 및 스크립트들, 명령들, 및/또는 사용자 설정이 메모리(1302)에 저장될 수 있다. 이들 처리 데이터, 및 스크립트들, 명령들, 및/또는 사용자 설정은 또한 저장 매체 디스크(1304), 예컨대, 휴대용 저장 매체(예를 들어, USB 드라이브, 광학 디스크 드라이브 등)에 저장될 수 있거나, 원격으로 저장될 수 있다. 예를 들어, 이러한 처리 데이터, 및 스크립트들, 명령들, 및/또는 사용자 설정은 네트워크(1328)를 통해서 처리 시스템(1310)에 접근 가능한 자리에서 저장될 수 있다. 추가로, 청구된 진보사항들은 본 발명의 처리의 명령들이 저장되는 컴퓨터-관독 매체의 형태에 의해서 제한되지 않는다. 예를 들어, 명령들은 처리 시스템(1310), 예컨대, 서버, 컴퓨터, 스마트폰, 또는 그 밖의 휴대용 컴퓨터 장치가 통신하는 플래시(FLASH) 메모리, 램(RAM), 롬(ROM), 또는 임의의 그 밖의 정보 처리 장치에 저장될 수 있다.
- [0333] 추가로, 청구된 진보사항들의 구성요소들이, CPU(1308) 및 운영 체제(operating system)와 함께, 예컨대, 당업자에게는 공지된 다른 컴퓨팅 시스템들과 함께 실행되는, 유틸리티 애플리케이션(utility application), 백그라운드 데몬(background daemon), 또는 운영 체제의 구성요소, 또는 이들의 조합으로서 제공될 수 있다.
- [0334] CPU(1308)는 ARM 프로세서, 시스템-온-어-칩(system-on-a-chip: SOC), 마이크로프로세서, 마이크로컨트롤러, 디지털 신호 프로세서(digital signal processor: DSP)일 수 있거나, 당업자에 의해서 인식될 수 있는 그 밖의 프로세서 유형들일 수 있다. 추가로, CPU(1308)는 위에 설명된 본 발명의 처리의 명령들을 수행하기 위해서 병렬로 협동적으로 작동하는 복수의 프로세서들로서 실현될 수 있다.
- [0335] 처리 시스템(1310)은 처리 환경(1300)의 일부이다. 도 13에서의 처리 시스템(1310)은 또한 처리 환경(1300) 내의 추가의 요소들에 접근하기 위해서 네트워크(1328)와 인터페이스하기 위한 네트워크 제어기(1306)를 포함한다. 이해될 수 있는 바와 같이, 네트워크(1328)는 공용 네트워크, 예컨대, 인터넷, 또는 사설 네트워크, 예컨대, LAN 또는 WAN 네트워크, 또는 이들의 조합일 수 있고, 또한, PSTN 또는 ISDN 서브-네트워크들을 포함할 수 있다. 네트워크들(1328)은 EDGE, 3G 및 4G 무선 셀룰러 시스템을 포함한 셀룰러 네트워크와 같은 무선일 수 있다. 무선 네트워크는 또한 Wi-Fi, 블루투스, 또는 임의의 그 밖의 공지된 무선 통신 형태일 수 있다.
- [0336] 처리 시스템(1310)은 사용자 인터페이스(예를 들어, 터치 스크린)(1316)와 인터페이스하는 범용 I/O 인터페이스(1312), 하나 이상의 센서들(1314), 하나 이상의 주변 장치들(1318)을 더 포함한다. 주변 I/O 장치들(1318)은, 일부 예들에서, 비디오 기록 시스템, 오디오 기록 시스템, 마이크로폰, 외부 저장 장치, 및/또는 외부 스피커 시스템들을 포함할 수 있다. 하나 이상의 센서들(1314)은 자이로스코프(gyroscope), 가속도계(accelerometer), 중력 센서, 선형 가속도계, 글로벌 위치확인 시스템(global positioning system), 바코드 스캐너(bar code scanner), QR 코드 스캐너, RFID 스캐너, 온도 모니터, 및 조명 시스템 또는 조명 요소 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0337] 범용 저장 제어기(1324)가 저장 매체 디스크(1304)를 통신 버스(communication bus: 1340), 예컨대, 병렬 버스 또는 직렬 버스, 예컨대, 처리 시스템의 구성요소들의 모두를 상호연결시키기 위한 범용 직렬 버스(Universal Serial Bus: USB) 또는 유사한 것과 연결시킨다. 저장 제어기(1324), 네트워크 제어기(1306) 및 범용 I/O 인터페이스(1312)의 일반적인 특징 및 기능의 설명은 이들 특징이 공지되어 있으므로 간결함을 위해서 본 명세서에서는 생략된다.
- [0338] 처리 시스템(1310)은, 일부 실시예들에서, 하나 이상의 온보드 및/또는 주변 센서들(1314)를 포함한다. 센서들(1314)은, 예를 들어, 내부 전자제품 및/또는 자동화 다중-모듈 처리 기기의 하우징 내로 직접 통합될 수 있다. 센서들(1314)의 일부는, 예를 들어, 와이어를 통해서, I/O 인터페이스(1312)와 직접적인 물리적 접촉 상태에 있거나; 예를 들어, 블루투스, Wi-Fi 또는 NFC 연결을 통해서, 무선 접촉될 수 있다. 예를 들어, 무선 통신 제어기(1326)가 하나 이상의 무선 센서들(1314)과 I/O 인터페이스(1312) 사이의 통신을 가능하게 할 수 있다. 더욱이, 하나 이상의 센서들(1314)은, 예를 들어, 네트워크(1328)를 기반으로 하는 중계 서버들(intermediary servers) 또는 저장 장치들을 통해서, 간접 접촉될 수 있거나; 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기 내의 어딘가의 신호 누산기와 (유선, 무선 또는 간접) 접촉될 수 있고, 이는 차례로 I/O 인터페이스(1312)와 (유선, 무선 또는 간접) 접촉된다.

- [0339] I/O 인터페이스(1312)와 통신하는 일군의 센서들(1314)이 더 완전한 신호들의 맵(map)을 생성시키기 위해서 복수의 장소들로부터 주어진 신호 유형을 모으기 위해 조합 사용될 수 있다. I/O 인터페이스(1312)와 통신하는 하나 이상의 센서들(1314)은, 예를 들어, 다른 신호들을 여과하거나, 삭제하거나, 거부하기 위해서, 비교기(comparator) 또는 입증 요소(verification element)로서 사용될 수 있다.
- [0340] 일부 실시예들에서, 처리 환경(1300)은 무선 통신 제어기(1326)를 통해서 처리 시스템(1310)과 통신하는 컴퓨터 장치(1338)를 포함한다. 예를 들어, 무선 통신 제어기(1326)는 사용자의 스마트폰 또는 다른 개인 컴퓨터 장치에 지정된 이메일 메시지들, 문자 메시지들, 및/또는 소프트웨어 애플리케이션 경보들(software application alerts)의 교환을 가능하게 할 수 있다.
- [0341] 처리 환경(1300)은, 일부 구현예들에서, 로봇 물질 취급 시스템(1322)을 포함한다. 처리 시스템(1310)은 로봇 물질 취급 시스템의 요소들을 작동시키기 위한 제어 신호들을 발행하기 위한, 예컨대, 갠트리의 위치를 조작하기 위한, 시퍼 또는 피펫터 요소를 하강 또는 상승시키기 위한, 및/또는 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기에서 시퍼/피펫터와 다양한 용기들(예를 들어, 챔버들, 약병들 등) 사이의 액체 전달을 유발시키기 위해서 펌프들 및 밸브들을 작동시키기 위한 로봇 제어기(1320)를 포함할 수 있다. 로봇 제어기(1320)는, 일부 예들에서, 하드웨어 드라이버, 펌웨어 요소(firmware element), 및/또는 처리 시스템(1310)을 로봇 물질 취급 시스템(1322)과 인터페이스시키기 위한 하나 이상의 알고리즘들 또는 소프트웨어 패키지들을 포함할 수 있다.
- [0342] 일부 구현예들에서, 처리 환경(1310)은 하나 이상의 모듈 인터페이스들(1332), 예컨대, 일부 예들에서, 자동화 다중-모듈 처리 시스템의 각각의 모듈의 처리를 활성화시키고 제어하기 위한 하나 이상의 센서 인터페이스들, 전력 제어 인터페이스들, 밸브 및 펌프 인터페이스들, 및/또는 작동기 인터페이스들을 포함한다. 예를 들어, 모듈 인터페이스들(1332)은 세포 성장 장치(850)를 회전시키는 구동 모터(864)를 위한 작동기 인터페이스(도 8d) 및 회전 성장 약병(800) 내의 세포 성장의 광학 밀도를 감지하는 검출기 보드(872)를 위한 센서 인터페이스를 포함할 수 있다. 모듈 제어기(1330)는, 일부 실시예들에서, 모듈 인터페이스들(1332)과 인터페이스하도록 구성된다. 모듈 제어기(1330)는 하나 또는 많은 제어기들(예를 들어, 일부 모듈들이 단일의 제어기를 공유할 수 있지만, 가능하게는 모듈 당 하나의 제어기)을 포함할 수 있다. 모듈 제어기(1330)는, 일부 예들에서, 하드웨어 드라이버, 펌웨어 요소, 및/또는 처리 시스템(1310)을 모듈 인터페이스들(1332)과 인터페이스시키기 위한 하나 이상의 알고리즘들 또는 소프트웨어 패키지들을 포함할 수 있다.
- [0343] 처리 환경(1310)은, 일부 구현예들에서, 자동화 다중-모듈 처리 시스템 내의 기후 조건들을 제어하기 위한 열관리 시스템(1336)을 포함한다. 열관리 시스템(1336)은 자동화 다중-모듈 세포 처리 기기의 하나 이상의 모듈들 내의 기후 조건들을 추가로 제어할 수 있다. 처리 시스템(1310)은, 일부 실시예들에서, 열관리 시스템(1336)과 인터페이스하기 위한 온도 제어기(1334)를 포함한다. 온도 제어기(1334)는, 일부 예들에서, 하드웨어 드라이버, 펌웨어 요소, 및/또는 처리 시스템(1310)을 열관리 시스템(1336)과 인터페이스시키기 위한 하나 이상의 알고리즘들 또는 소프트웨어 패키지들을 포함할 수 있다.
- [0344] **자동화 편집 방법들, 모듈들, 기기들 및 시스템들을 사용한 세포 라이브러리들의 생산**
- [0345] 일 양태에서, 본 개시는, 본 명세서에서 더욱 상세히 설명된 바와 같이, 다양한 편집 전략들을 사용하여 다양한 세포 유형들 중 관심 RNA들 및/또는 단백질들의 발현, 수준들 및/또는 활성을 변화시키는, 세포들의 라이브러리를 생성시키기 위한 자동화 편집 방법들, 모듈들, 기기들, 및 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 제공한다. 따라서, 본 개시는 본 개시의 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들에 의해서 생성된 편집된 세포 라이브러리들을 포함하는 것으로 의도된다. 이들 세포 라이브러리들은 다양한 유기체들의 세포들에서의 유전자 녹아웃들(gene knockouts), 유전자 녹인들(gene knock-ins), 삽입들, 삭제들, 단일 뉴클레오티드 편집들, 단편 일렬 반복 편집들(short tandem repeat edits), 프레임시프트들(frameshifts), 및 트리플렛 코돈 팽창(triplet codon expansion) 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 상이한 표적화된 편집들을 가질 수 있다. 이들 편집들은 게놈의 코딩 또는 비-코딩 영역들에 관한 것일 수 있고, 바람직하게는 합리적으로 설계된다.
- [0346] 다른 양태들에서, 본 개시는 DNA-연관된 과정들을 변화시키는 세포들의 라이브러리를 생성시키기 위한 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 제공한다. 예를 들어, 세포 라이브러리는 선택된 유전자들의 발현을 조절하는 조절 요소들의 DNA 결합을 방해하기 위한 DNA 결합 부위들 내의 편집들을 갖는 개별적인 세포들을 포함할 수 있다. 또한, 세포 라이브러리들은 세포 과정, 예컨대, 이질염색질 형성, 스위치-클래스 재조합(switch-class recombination) 및 VDJ 재조합에 영향을 주는 게놈 DNA에서의 편집들을 포함할 수 있다.
- [0347] 특정 양태들에서, 세포 라이브러리들은 세포 집단 내의 개별적인 세포들의 다중 편집을 이용하여 생성되며, 세

포 집단 내의 복수의 세포들은 단일의 편집 라운드로 편집된다. 즉, 세포 라이브러리의 세포들 내의 복수의 변화들이 단일의 자동화 작동 내에 있다. 단일의 다중 자동화 작동에서 발생될 수 있는 라이브러리들은 무려 500 편집된 세포들, 1000 편집된 세포들, 2000 편집된 세포들, 5000 편집된 세포들, 10,000 편집된 세포들, 50,000 편집된 세포들, 100,000 편집된 세포들, 200,000 편집된 세포들, 300,000 편집된 세포들, 400,000 편집된 세포들, 500,000 편집된 세포들, 600,000 편집된 세포들, 700,000 편집된 세포들, 800,000 편집된 세포들, 900,000 편집된 세포들, 1,000,000 편집된 세포들, 2,000,000 편집된 세포들, 3,000,000 편집된 세포들, 4,000,000 편집된 세포들, 5,000,000 편집된 세포들, 6,000,000 편집된 세포들, 7,000,000 편집된 세포들, 8,000,000 편집된 세포들, 9,000,000 편집된 세포들, 10,000,000 편집된 세포들 또는 그 초과인 편집된 세포들을 포함할 수 있다.

[0348] 다른 특정 양태들에서, 세포 라이브러리들은 세포 집단 내의 개별적인 세포들의 회귀적 편집을 이용하여 생성되고, 편집들이 2 이상의 편집 라운드들에서 개별적인 세포들에 추가된다. 회귀적 편집의 이용은 라이브러리의 개별적인 세포들에서의 게놈 내의 2 이상의 부위들을 표적화하는 2 이상의 편집들의 융합을 초래한다. 자동화 회귀적 작동에서 생성될 수 있는 라이브러리들은 무려 500 편집된 세포들, 1000 편집된 세포들, 2000 편집된 세포들, 5000 편집된 세포들, 10,000 편집된 세포들, 50,000 편집된 세포들, 100,000 편집된 세포들, 200,000 편집된 세포들, 300,000 편집된 세포들, 400,000 편집된 세포들, 500,000 편집된 세포들, 600,000 편집된 세포들, 700,000 편집된 세포들, 800,000 편집된 세포들, 900,000 편집된 세포들, 1,000,000 편집된 세포들, 2,000,000 편집된 세포들, 3,000,000 편집된 세포들, 4,000,000 편집된 세포들, 5,000,000 편집된 세포들, 6,000,000 편집된 세포들, 7,000,000 편집된 세포들, 8,000,000 편집된 세포들, 9,000,000 편집된 세포들, 10,000,000 편집된 세포들 또는 그 초과인 편집된 세포들을 포함할 수 있다.

[0349] 자동화 시스템을 이용하기 위해서 본 명세서를 기반으로 하여 변형될 수 있는 비-자동화 편집 전략들의 예들은, 예를 들어, 미국특허 제 8,110,360 호, 제 8,332,160 호, 제 9,988,624 호, 제 20170316353 호, 및 제 20120277120 호에서 발견될 수 있다.

[0350] 특정 양태들에서, 회귀적 편집이 먼저 세포 표현형을 생성시키기 위해서 사용되고, 이어서, 이후 편집 라운드가 표현형을 역전시키거나 다른 세포 특성들을 가속시키기 위해서 사용될 수 있다.

[0351] 일부 양태들에서, 세포 라이브러리는 세포에서의 비천연 아미노산들의 생성을 위한 편집들을 포함한다.

[0352] 특정 양태들에서, 본 개시는 본 개시의 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 사용하여 생성된 하나 이상의 조절요소들에서의 편집들을 갖는 편집된 세포 라이브러리들을 제공한다. 용어 "조절요소"는 특정의 환경 및/또는 상황에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열의 전사 및/또는 번역에 영향을 줄 수 있는 핵산 분자를 나타낸다. 이러한 용어는, 프로모터들, RNA 폴리머라제와 전사 인자들의 기본적인 상호작용을 위해서 요구되는 핵심 요소들, 업스트림 요소들, 증진체들, 및 반응 요소들을 포함한, 전사 및 RNA 안정성을 촉진하거나 조절하는 모든 요소들을 포함하는 것으로 의도된다(예를 들어, Lewin, "Genes V" (Oxford University Press, Oxford) pages 847-873 참조). 원핵생물들에서의 예시적인 조절요소들은 프로모터들, 오퍼레이터 서열들, 및 리보솜 결합 부위들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 진핵 세포들에서 사용되는 조절요소들은 프로모터들, 증진체들, 인슐레이터들(insulators), 스플라이싱 신호들(splicing signals) 및 폴리아데닐화 신호들을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0353] 바람직하게는, 편집된 세포 라이브러리는 특정의 세포 유형에서의 단백질 구조, 발현 및/또는 활성의 예측들을 기반으로 하여 설계되는 합리적으로 설계된 편집들을 포함한다. 예를 들어, 합리적인 설계는, 뉴클레아제 발현 및/또는 결합, 성장 조건들, 및 그 밖의 실험 조건들을 포함한 상이한 매개변수들이 총체적으로 뉴클레아제 편집의 역학을 어떻게 제어하는지를 예측하기 위해서, 특정의 뉴클레아제 및 유전자 조절을 갖는 게놈 편집의 시스템-와이드 생물리학적 모델(system-wide biophysical model)을 기반으로 할 수 있다. 예를 들어, Farasat and Salis, PLoS Comput Biol., 29:12(1):e1004724 (2016) 참조.

[0354] 일 양태에서, 본 개시는 본 발명의 자동화 편집 기기, 시스템들 및 방법들을 사용하여 생성된 다양한 합리적으로 설계된 조절 서열들을 갖는 편집된 세포들의 라이브러리의 생성을 제공한다. 예를 들어, 편집된 세포 라이브러리는 구성적 및/또는 유도 가능한 프로모터들, 증진체 서열들, 오퍼레이터 서열들 및/또는 리보솜 결합 부위들의 세트들 사용하여 생성된 원핵 세포 집단들을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 편집된 세포 라이브러리는 관심 단백질들의 발현을 위한 구성적 및/또는 유도 가능한 프로모터들, 증진체 서열들, 오퍼레이터 서열들, 및/또는 상이한 코작(Kozak) 서열들의 세트들 사용하여 생성된 진핵 서열들을 포함할 수 있다.

- [0355] 일부 양태들에서, 본 개시는 유기체의 게놈을 가로지른 관심 서열들에서의 편집들 중 하나 이상의 부류들을 포함하는 합리적으로 설계된 편집들을 갖는 세포들을 포함하는 세포 라이브러리들을 제공한다. 특정 양태들에서, 본 개시는 게놈의 서브셋(subset)을 가로지러 관심 서열들에서의 편집들 중 하나 이상의 부류들을 포함하는 합리적으로 설계된 편집들을 갖는 세포들을 포함하는 세포 라이브러리들을 제공한다. 예를 들어, 세포 라이브러리는 엑솜(exome), 예를 들어, 게놈의 모든 또는 대부분의 개방 판독 프레임들(open reading frames)을 가로지른 관심 서열들에서의 편집들 중 하나 이상의 부류들을 포함하는 합리적으로 설계된 편집들을 갖는 세포들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포 라이브러리는 키놈(kinome)을 가로지른 관심 서열들에서의 편집들 중 하나 이상의 부류들을 포함하는 합리적으로 설계된 편집들을 갖는 세포들을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 세포 라이브러리는 시크레토ם(secretome)을 가로지른 관심 서열들에서의 편집들 중 하나 이상의 부류들을 포함하는 합리적으로 설계된 편집들을 갖는 세포들을 포함할 수 있다. 또 다른 양태들에서, 세포 라이브러리는 엑솜 내에서 인코딩된 단백질들의 다양한 아이소폼들(isoforms)을 분석하기 위해서 생성된 합리적으로 설계된 편집들을 갖는 세포들을 포함할 수 있고, 세포 라이브러리들은, 예를 들어, 전사체 분석을 위한, 하나 이상의 특이적 아이소폼들의 발현을 제어하기 위해서 설계될 수 있다.
- [0356] 중요하게는, 특정 양태들에서, 세포 라이브러리들은 라이브러리 내의 개별적인 세포들에서의 하나 이상의 단백질들의 발현 사이의 유사성을 감소시키기 위해서 무작위 서열들, 예를 들어, 무작위 프로모터 서열들을 사용하는 편집들을 포함할 수 있다. 추가적으로, 세포 라이브러리 내의 프로모터들은 강하고 그리고/또는 적정 가능한 발현을 가능하게 하기 위해서 구성적이거나, 유도 가능하거나 또는 이들 둘 모두일 수 있다.
- [0357] 다른 양태들에서, 본 개시는 선택된 유전자 표적의 최적의 발현을 식별하기 위해 편집들을 포함하는 세포들의 라이브러리를 생성시키기 위한 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 제공한다. 예를 들어, 대사 공학을 통한 생화학물질의 생산은 흔히 경로 효소의 발현을 필요로 하고, 최고의 생산 수율들은 세포에서의 최대량의 표적 경로 효소에 의해서 항상 달성되지는 않지만, 오히려, 개별적인 효소의 발현 수준들 및 관련된 조절 단백질들 및/또는 경로들의 미세-조정에 의해서 달성된다. 유사하게, 이종 단백질들의 발현 수준들이 최적의 수율들을 위해서 실험적으로 조절될 수 있다.
- [0358] 전사가 유전자 발현 수준들에 영향을 주는 가장 명확한 방법은, 프로모터 또는 증진제 강도 및 트랜스-활성화 인자들(trans-activating factors)의 조합들에 의해서 변화될 수 있는 Pol II 개시 속도를 통해서 이루어진다 (Kadonaga, et al., Cell, 116(2):247-57 (2004)). 진핵생물들에서, 신장률(elongation rate)은 또한 대안적인 스플라이싱에 영향을 줌으로써 유전자 발현 패턴들을 결정할 수 있다(Cramer et al., PNAS USA, 94(21):11456-60 (1997)). 유전자에 대한 실패한 증진은 Pol II로의 프로모터의 접근성을 감소시킴으로써 하류 유전자들의 발현에 손상을 줄 수 있다(Greger, et al., 2000 PNAS USA, 97(15):8415-20 (2000)). 전사 간섭로서 공지된 이러한 과정은 하등 진핵생물들에서 특히 관련되는데, 그 이유는 이들이 흔히 밀접한 간격을 둔 유전자들을 가지고 있기 때문이다.
- [0359] 일부 실시예들에서, 본 개시는 세포 유전자 전사를 최적화하기 위한 방법들을 제공한다. 유전자 전사는 전사 개시(RNAP 동원 및 전사 복합체 형성), 신장(스트랜드 합성/연장), 및 전사 종결(RNAP 탈착 및 종결)을 포함하는 몇 가지 독특한 생물학적 현상들의 결과이다.
- [0360] **부위 지정 돌연변이 유발**
- [0361] 세포 라이브러리들은, 부위 지정된 돌연변이 유발을 이용하여, 즉, 단백질 또는 다른 게놈 특징의 아미노산 서열이 단백질 또는 게놈 특징을 돌연변이시킴으로써 의도적으로 그리고 정밀하게 변경될 수 있을 때에, 자동화 편집 방법들, 모듈들, 기기들 및 시스템들을 사용하여 생성될 수 있다. 이들 세포주들은 다양한 목적으로, 예를 들어, 세포들 내의 단백질 기능, 세포들 내의 효소 활성 부위들의 식별, 및 새로운 단백질들의 디자인을 결정하는데 유용할 수 있다. 예를 들어, 부위 지정된 돌연변이 유발은 상이한 화학적 특성을 갖는 또 다른 아미노산을 위한 단백질의 서열에서 단일 아미노산을 교환하기 위해서 다중 양상으로 사용될 수 있다. 이는 세포 집단 내의 개별적인 세포들에서의 합리적으로 설계된 또는 무작위로 생성된 돌연변이의 효과를 측정하게 한다. 예를 들어, Berg, et al. Biochemistry, Sixth Ed. (New York: W.H. Freeman and Company) (2007) 참조.
- [0362] 또 다른 예에서, 편집들은 결합 부위들에서의 아미노산들의 치환, 예컨대, 단백질 복합체 내의 상호작용을 위한 단백질 결합 부위에서의 하나 이상의 아미노산들의 치환 또는 보조인자(cofactor) 또는 리간드를 수용할 수 있는 효소 포켓들(enzymatic pockets) 내의 하나 이상의 아미노산들의 치환을 위해 세포 라이브러리 내의 개별적인 세포들에 대해 이루어질 수 있다. 이러한 부류의 편집들은, 단백질 복합체 내에서 다른 보조인자들, 리간드들 등과의 상호작용을 포함한, 하나 이상의 단백질들의 특징의 특성들을 측정하기 위해서 단백질에 특이적인 조

작들의 생성을 가능하게 한다.

- [0363] 또 다른 예들에서, 다양한 편집 유형들이 발현 양적 형질 유전자좌들(expression quantitative trait loci: eQTLs)을 연구하기 위한 부위 특이적 돌연변이 유발을 이용한 세포 라이브러리 내의 개별적인 세포들에 대해서 이루어질 수 있다. eQTL는 유전자 발현 표현형의 유전 분산(genetic variance)의 분해를 설명하는 유전자좌이다. 본 발명의 라이브러리는 eQTLs을 평가하고 이를 실제 질환 상태들에 연결시키는데 유용할 것이다.
- [0364] 특정 양태들에서, 본 개시의 세포 라이브러리들 내로 도입된 편집들은 단백질들의 공지된 또는 예측된 구조들을 기반으로 한 합리적인 디자인을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, Chronopoulou EG and Labrou, Curr Protoc Protein Sci.: Chapter 26:Unit 26.6 (2011) 참조. 그러한 부위 지정된 돌연변이 유발은 라이브러리 내의 개별적인 세포들에게 하나 이상의 부위-지정된 편집들, 및 바람직하게는, 세포 집단 내의 둘 이상의 부위-지정된 편집들(예를 들어, 조합성 편집들)을 제공할 수 있다.
- [0365] 다른 양태들에서, 본 개시의 세포 라이브러리들은 유전자의 코딩 영역에서의 코돈들의 모두 또는 실질적으로 모두의 부위-지정된 코돈 돌연변이 "스캐닝"을 이용하여 생성된다. 이러한 양상에서, 특정 코돈들의 개별적인 편집들은 유전자의 하나 이상의 코돈들에서 특이적 다형현상들(polymorphisms)을 기반으로 하여 기능상실(loss-of-function) 또는 기능획득(gain-of-function)에 대해서 검사될 수 있다. 이들 라이브러리들은 어느 유전 변화들이 세포 또는 세포 집단에서의 특이적 표현형의 침묵 또는 원인인지를 결정하기 위한 강력한 도구일 수 있다. 코돈들의 편집들은 분석하는 유전자에서 실별된 공지된 다형현상들 및/또는 돌연변이들을 기반으로 하여 무작위로 발생될 수 있거나 합리적으로 디자인될 수 있다. 더욱이, 세포 내의 경로에서 한번에 둘 이상의 유전자들에 대해서 이들 기술들을 사용하는 것은 잠재적인 단백질:단백질 상호작용들 또는 세포 기능들 또는 경로들에서의 과잉들(redundancies)을 측정할 수 있다.
- [0366] 예를 들어, 알라닌 스캐닝은 주어진 단백질의 안정성 또는 기능에 대한 특이적 잔기의 기여를 측정하기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, Lefevre, et al., Nucleic Acids Research, Volume 25(2):447-448 (1997) 참조. 알라닌은 흔히, 많은 그밖의 아미노산들이 보유하는 이차 구조 선호도들을 의태할 수 있는 이의 비-벌키(non-bulky), 화학적 불활성, 메틸 작용기 때문에, 이러한 코돈 스캐닝 기술에서 사용된다. 코돈 스캐닝은 또한 특이적 잔기의 측쇄가 세포 기능 및/또는 활성화에 중요한 역할을 하는지를 측정하기 위해서 사용될 수 있다. 때로는, 그 밖의 아미노산들, 예컨대, 발린 또는 류신이, 돌연변이된 잔기의 크기의 보존이 필요한 경우에, 코돈 스캐닝 세포 라이브러리들의 생성에서 사용될 수 있다.
- [0367] 다른 특정 양태들에서, 세포 라이브러리들은, 단백질, 예컨대, 효소 또는 호르몬의 활성화 부위를 측정하기 위해서 그리고 세포 라이브러리에서의 이들 단백질들 중 하나 이상의 작용 기전을 밝혀내기 위해서, 본 발명의 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 사용하여 생성될 수 있다. 분자 모델링 연구들과 연관된 부위 지정된 돌연변이 유발이 효소의 활성화 부위 구조 및 결과적으로 이의 작용 메커니즘을 발견하기 위해서 사용될 수 있다. 이들 세포 라이브러리들의 분석은, 다양한 유전자 배경들에서의 세포내 교환(intracellular trafficking) 및 단백질 안정성/반감기에 대한 단백질 복합체들의 서브단위들 사이의 접촉들에서, 단백질들의 활성화 부위들에서의 특이적 아미노산 잔기들에 의해서 발휘된 역할의 이해를 제공할 수 있다.
- [0368] **포화 돌연변이 유발**
- [0369] 일부 양태들에서, 본 개시의 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 사용하여 생성된 세포 라이브러리들은 단일 코돈 또는 코돈들의 세트가 특정의 유전자 또는 관심 유전자들의 위치에서 모든 가능한 아미노산들을 생성시키기도록 무작위화되는, 포화 돌연변이 유발 라이브러리들일 수 있다. 이들 세포 라이브러리들은 예를 들어, 유도 진화를 위한, 변이체들을 생성시키기에 특히 유용할 수 있다. 예를 들어, Chica, et al., Current Opinion in Biotechnology 16 (4): 378-384 (2005); nd Shivange, Current Opinion in Chemical Biology, 13 (1): 19-25 참조.
- [0370] 일부 양태들에서, 상이한 동의 코돈들(degenerate codons)을 포함하는 편집들이 라이브러리들 내의 개별적인 세포들에서의 아미노산들의 세트들을 인코딩하기 위해서 사용될 수 있다. 일부 아미노산들이 다른 것들보다 더 많은 코돈들에 의해서 인코딩되기 때문에, 아미노산들의 정확한 비율은 동일하지 않을 수 있다. 특정 양태들에서, 더욱 제한된 변성 코돈들이 사용된다. 'NNK' 및 'NNS'는 모두 20 개의 아미노산들을 인코딩하는 이점을 가지지만, 여전히 정지 코돈을 시간의 3%로 인코딩한다. 대안적인 코돈들, 예컨대, 'NDT', 'DBK'는 정지 코돈들을 완전히 회피하며, 모든 생물리학적 유형(음이온성, 양이온성, 양쪽성의 소수성, 방향족 소수성, 친수성, 소형)을 여전히 포함하는 최소 아미노산들의 세트를 인코딩한다.

- [0371] 특정 양태들에서, 비-과잉 포화 돌연변이 유발, 여기에서, 특정의 유기체를 위한 대부분의 일반적으로 사용되는 코돈이 포화 돌연변이 유발 편집 과정에서 사용된다.
- [0372] **프로모터 스왑들(swaps) 및 래더들(ladders)**
- [0373] 하나 이상의 관심 유전자들의 발현을 분석하고 그리고/또는 최적화하기 위한 한 가지 메커니즘은 세포들이 하나 이상의 관심 유전자들에 연결된 특이적 프로모터들을 갖는 유전 편집들을 포함하는, "프로모터 스왑" 세포 라이브러리의 생성을 통해서 이루어진다. 따라서, 본 개시의 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 사용하여 생성된 세포 라이브러리들은, 예를 들어, 관심 유전자의 발현을 증가 또는 감소시켜서 대사 또는 유전 경로를 최적화시키기 위해서 사용될 수 있는 프로모터 스왑 세포 라이브러리들일 수 있다. 일부 양태들에서, 프로모터 스왑 세포 라이브러리는 세포 활력 또는 생존 능력에 영향을 주는 유전자, 예를 들어, 세포들의 성장 속도 또는 전체 건강에 영향을 주는 단백질을 인코딩하는 유전자의 발현의 증가 또는 감소를 식별하기 위해서 사용된다. 일부 양태들에서, 프로모터 스왑 세포 라이브러리는 프로모터들 사이의 의존성들 및 논리를 갖는 세포들을 생성시켜 합성 유전자 네트워크들을 생성시키기 위해서 사용될 수 있다. 일부 양태들에서, 프로모터 스왑들은 자연에서의 동종 및 이종 둘 모두의 (복합 조직들) 집단들의 세포들 사이의 세포 대 세포 소통을 제어하기 위해서 사용될 수 있다.
- [0374] 세포 라이브러리들은 일정 범위의 발현 강도들의 표현을 기반으로 하여 함께 그룹을 이룬 임의의 주어진 수의 프로모터들 및 임의의 주어진 수의 표적 유전자들을 이용할 수 있다. 프로모터 서열들의 래더(ladder)는 적어도 하나의 조건 하에 적어도 하나의 유전자와의 발현을 변화시킨다. 이어서, 이러한 래더는 본 개시의 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 사용하여 유기체 내의 일군의 유전자들에 조직적으로 적용된다.
- [0375] 특정 양태들에서, 본 개시의 자동화 편집 과정들, 모듈들 및 시스템들을 사용하여 형성된 세포 라이브러리는 달리 동일한 유전 배경에서 하나 이상의 관심 표적 유전자들에 작동 가능하게 연결된 주어진 프로모터를 대표하는 개별적인 세포들을 포함한다. 자동화 시스템들을 이용하기 위해서 변경될 수 있는 비-자동화 편집 전략들의 예들은, 예를 들어, 미국특허 제 9,988,624 호에서 찾아볼 수 있다.
- [0376] 특정 양태들에서, 프로모터 스왑 세포 라이브러리는 관심 유전자들의 발현을 위한 "프로모터 래더"로서 작용하는 사전-선택된 프로모터들 세트에 작동 가능하게 연결되는 표적 유전자들의 세트를 편집함으로써 생성된다. 예를 들어, 세포들은 하나 이상의 개별적인 관심 유전자들이 편집되어 프로모터 래더에서 상이한 프로모터들과 작동 가능하게 연결되도록 편집된다. 내인성 프로모터가 존재하지 않거나, 그것의 서열이 알려지지 않았거나, 그것이 일부 방법으로 미리 변화된 경우에, 프로모터 래더의 개별적인 프로모터들이 관심 유전자들의 앞에서 삽입될 수 있다. 이들 생산된 세포 라이브러리들은 달리 동일한 유전적 정황에서 하나 이상의 표적 유전자들에 작동 가능하게 연결된 래더의 개별적인 프로모터를 갖는 개별적인 세포들을 가진다.
- [0377] 프로모터들은 일반적으로는 상이한 유전자좌들을 가로질러 가변적인 발현을 생성시키도록 선택되고, 유도 가능한 프로모터들, 구성적 프로모터들, 또는 이들 둘 모두를 포함할 수 있다.
- [0378] 프로모터 래더를 사용하여 편집된 표적 유전자들의 세트가 게놈내의 모든 또는 대부분의 개방 판독 프레임들(open reading frames: ORFs), 또는 게놈의 선택된 서브셋, 예를 들어, 키놈 또는 세크레토믹의 ORFs를 포함할 수 있다. 일부 양태들에서, 표적 유전자들은 유전자들의 다양한 아이소폼들을 위한 코딩 영역들을 포함할 수 있고, 세포 라이브러리들은 하나 이상의 특이적 아이소폼들의 발현을 위해서, 예를 들어, 다양한 프로모터들을 사용한 전사체 분석을 위해서 설계될 수 있다.
- [0379] 표적 유전자들의 세트는 또한 특정의 세포 경로, 예를 들어, 조절 경로 또는 신호전달 경로와 연루되는 것으로 공지되었거나 그렇게 여겨지는 유전자들일 수 있다. 표적 유전자들의 세트는 앞서 입증된 유익한 편집들(앞선 프로모터 스왑들 또는 앞서 SNP 스왑들)과의 관련에 의해서, 앞서 생성된 편집들 사이의 상위성 상호작용들을 기반으로 한 알고리즘 선택에 의해서, 표적에 대한 유익한 ORF에 관한 가설들을 기반으로 한 다른 선택 기준에 의해서, 또는 무작위 선택을 통해서, 기능과 관련된 ORFs일 수 있다. 특이적 실시예들에서, 표적 유전자들은 비-코딩 RNAs을 포함한 비-단백질 코딩 유전자들을 포함할 수 있다.
- [0380] 인슐레이터 요소들 및 그 밖의 게놈 구조 요소들(genomic organization elements)을 포함한 그 밖의 기능적 유전 요소들의 편집은 또한 표적 유전자들의 세트의 발현 수준을 조직적으로 변화시키기 위해서 사용될 수 있고, 본 개시의 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 사용하여 도입될 수 있다. 일 양태에서, 세포들의 집단은 증진제 서열들의 래더를 단독으로 또는 선택된 프로모터들 또는 프로모터 래더와 함께 사용하여 편집되어,

이들 증진제 요소들에서 다양한 편집들을 갖는 세포 라이브러리를 생성시킨다. 또 다른 양태에서, 세포들의 집단은 리보솜 결합 서열들의 래더를 단독으로 또는 선택된 프로모터들 또는 프로모터 래더와 함께 사용하여 편집되어, 이들 리보솜 결합 서열들에서 다양한 편집들을 갖는 세포 라이브러리를 생성시킨다.

[0381] 또 다른 양태에서, 세포들의 집단은 편집되어 전사물(transcript) 또는 단백질의 5' 또는 3' 말단에의, 또는 임의의 다른 자리에서의 다양한 mRNA 및/또는 단백질 안정화 또는 불안정화 서열들의 부착을 가능하게 한다.

[0382] 특정 양태들에서, 미리 확립된 세포주의 세포들의 집단이 본 개시의 자동화 편집 방법들, 모듈들, 기기들 및 시스템들을 사용하여 편집되어, 세포들의 기능, 건강 및/또는 생존 능력을 개선시키기 위한 세포 라이브러리를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 대규모 제조에 현재 사용되는 많은 산업적 균주들이 무작위 돌연변이 유발 과정들을 여러해, 때로는 수십년의 기간에 걸쳐서 반복적으로 사용하여 개발되었다. 원치않는 중성 및 유해한 돌연변이들이 유익한 변화들과 함께 균주들에 도입되었고, 시간이 지남에 따라서, 이는 전체적인 강성 및 주요 특성들, 예컨대, 성장 속도들에 결합들이 있는 균주들을 생성시켰다. 또 다른 예에서, 포유동물 세포주들은 세포들의 계대배양을 통해서 시간이 지남에 따라서 계속 돌연변이되고, 유사하게 이들 세포주들은 불안정하게 되고 바람직하지 않은 특성을 획득할 수 있다. 본 개시의 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들은 바람직하지 않은 계놈 서열들을 제거하거나 변화시키고 그리고/또는 새로운 계놈 서열들을 도입하여 세포들의 바람직한 특성들을 유지시키면서 결합을 처리하기 위해서 편집 전략들, 예컨대, SNP 및/또는 STR 스위핑(swapping), 인델 생성(indel creation), 또는 그 밖의 기술들을 사용할 수 있다.

[0383] 회귀적 편집이 사용되는 경우에, 편집된 세포 라이브러리 내의 개별적인 세포들에서의 편집은 발현, 안정성 및/또는 제어를 최적화하기 위해 계놈 내의 이소성 부위(예를 들어, CarT 유전자좌)에서의 "부착 받침들(landing pads)"의 포함을 통합할 수 있다.

[0384] 일부 실시예들에서, 하나 이상의 편집들(도입 또는 제거)을 포함하는 개별적인 세포들을 갖는 생성된 각각의 라이브러리는 하나 이상의 기준하에 배양되고 분석된다(예를 들어, 관심 화학물질 또는 생성물의 생산). 이어서, 특이적 기준을 보유한 세포들이 세포 내의 하나 이상의 특정 편집들과 연관되거나 상관된다. 이러한 방식으로, 임의의 수의 유전적 또는 표현형적 관심 특성에 대한 주어진 편집의 효과가 측정될 수 있다. 특정 기준 또는 향상된 기능성/강성과 연관된 다중 편집들의 식별이 매우 바람직한 특성을 갖는 세포들을 유도할 수 있다.

[0385] **녹아웃 또는 녹인 라이브러리들**

[0386] 특정 양태들에서, 본 개시는 다양한 관심 유전자들의 "녹아웃(knock-out)" (KO) 또는 "녹인(knock-in)" (KI) 편집들을 갖는 세포들의 라이브러리를 생성시키기 위한 자동화 편집 방법들, 모듈들, 기기들 및 시스템들을 제공한다. 따라서, 본 개시는 선택된 관심 유전자들의 발현을 제거 또는 감소시켜 세포 라이브러리 내의 개별적인 세포들에서의 유전자 기능에 대한 이들 편집들의 효과를 얻는 하나 이상의 돌연변이를 갖는, 본 개시의 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들에 의해서 생성된 편집된 세포 라이브러리들을 포함하는 것으로 의도된다.

[0387] 세포 라이브러리는 표적 유전자 KO(예를 들어, 삽입/삭제를 통해서) 또는 KOs(예를 들어, 동종 지정된 복구)를 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 이중 가닥 절단들(double strand breaks)은 흔히 비-동종 말단 접합 DNA 복구 경로(non-homologous end joining DNA repair pathway)를 통해서 복구된다. 그러한 복구는 에러 발생이 쉬운 것으로 공지되어 있고, 그에 따라서, 유전자 기능을 방해할 수 있는 삽입들 및 삭제들이 도입될 수 있다. 바람직하게는, 그러한 편집들은 관심 유전자들에 특이적으로 영향을 주도록 합리적으로 설계되고, 하나 이상의 관심 유전자좌의 KI 또는 KO를 갖는 개별적인 세포들이 생성될 수 있다. 둘 이상의 관심 유전자좌들의 KO 또는 KI를 갖는 세포들이 본 개시의 자동화 회귀적 편집을 사용하여 생성될 수 있다.

[0388] 특정 양태들에서, KO 또는 KI 세포 라이브러리들은 세포 집단 내의 세포들의 동시 다중 편집을 사용하여 생성되고, 세포 집단 내의 복수의 세포들이 단일의 편집 라운드로 편집된다. 즉, 세포 라이브러리의 세포들 내의 복수의 변화들이 단일의 자동화 작동에서 이루어진다. 다른 특정 양태들에서, 세포 라이브러리들은 세포 집단 내의 개별적인 세포들의 회귀적 편집을 사용하여 생성되고, 계놈 내의 둘 이상의 부위들의 다중 편집들의 단일 세포들 내로의 융합을 발생시킨다.

[0389] **SNP 또는 단편 일렬 반복 스왑들**

[0390] 일 양태에서, 세포 라이브러리들은 본 개시의 자동화 편집 방법들, 자동화 다중-모듈 세포 편집 기기들을 사용하여 단일의 뉴클레오티드 다형형상들("SNPs")을 개별적인 세포들의 계놈들 내로 조직적으로 도입 또는 치환시켜 "SNP 스왑" 세포 라이브러리를 생성시킴으로써 생성된다. 일부 실시예들에서, 본 개시의 SNP 스와핑 방법들

은 유익한 SNPs의 첨가와 유해한 및/또는 중성 SNPs의 제거 둘 모두를 포함한다. SNP 스왑들은 코딩 서열들, 비-코딩 서열들 또는 이들 둘 모두를 표적으로 할 수 있다.

[0391] 다른 양태에서, 세포 라이브러리는 본 개시의 자동화 편집 방법들, 모듈들, 기기들, 및 시스템들을 사용하여 단편 일렬 반복체들(short tandem repeats: STR)을 개별적인 세포들의 게놈들 내로 도입 또는 치환하여 "STR 스왑" 세포 라이브러리를 생성시킴으로써 생성된다. 일부 실시예들에서, 본 개시의 STR 스와핑 방법들은 유익한 STRs의 첨가와 유해한 및/또는 중성 STRs의 제거 둘 모두를 포함한다. STR 스왑들은 코딩 서열들, 비-코딩 서열들 또는 이들 둘 모두를 표적으로 할 수 있다.

[0392] 일부 실시예들에서, 세포 라이브러리를 생성시키기 위해서 사용되는 SNP 및/또는 STR 스와핑은 다중화되고, 세포 집단 내의 복수의 세포들은 단일의 편집 라운드로 편집된다. 즉, 세포 라이브러리의 세포들 내의 복수의 변화들이 단일 자동화 작동에서 이루어진다. 다른 실시예들에서, 세포 라이브러리를 생성시키기 위해서 사용된 SNP 및/또는 STR 스와핑은 회귀적이고, 복수의 유익한 서열들의 융합 및/또는 유해한 서열들의 단일 세포들 내로의 제거를 초래한다. 복수의 변화들은 규정된 변화들 또는 돌연변이들의 부분적 무작위 조합 라이브러리의 특이적 세트일 수 있다. 유해한 돌연변이들의 제거 및 유익한 돌연변이의 통합이 다양한 세포 과정들에서의 즉각적인 개선을 제공할 수 있다. 유전적 부담의 제거 또는 유전적 부담이 없는 균주 내로의 유익한 변화들의 통합이 또한 추가의 개선들을 가능하게 할 수 있는 추가의 무작위 돌연변이 유발을 위한 새롭고 강한 출발점을 제공한다.

[0393] SNP 스와핑은 무작위 돌연변이 유발 접근법들의 근본적인 한계들을 극복하는데, 그 이유는 그것이 무작위 접근법이 아니라 세포들을 가로지른 개별적인 돌연변이들의 조직적인 도입 또는 제거이기 때문이다.

[0394] **스플라이스 부위 편집**

[0395] RNA 스플라이싱은 인트론들이 절제되고 엑손들이 함께 스플라이싱되어 단백질 내로 번역되는 mRNA를 생성시키는 과정이다. 세포 기계(cellular machinery)에 의한 스플라이싱 신호들의 정확한 인식이 이러한 과정에 중요하다. 따라서, 일부양태들에서, 세포들의 집단은 다양한 유전자들의 스플라이스 부위 변이체들의 라이브러리를 생성시키기 위해서 다양한 유전자좌들 내의 공지된 및/또는 예측된 스플라이스 공여체 및/또는 수용체 부위들에 대한 조직적 편집을 이용하여 편집된다. 그러한 편집은 세포 정황에서의 유전자들의 다양한 아이소폼들의 생물학적 관련성을 밝히는 것을 도울 수 있다. 다양한 포유동물 질병들과 연관된 실제 또는 예측된 돌연변이들을 포함한, 다양한 코딩영역들의 스플라이싱 부위들의 합리적인 설계를 위한 서열들이 분석 기술들, 예컨대, 문헌[Nalla and Rogan, Hum Mutat, 25:334-342 (2005); Divina, et al., Eur J Hum Genet, 17:759-765 (2009); Desmet, et al., Nucleic Acids Res, 37:e67 (2009); Faber, et al., BMC Bioinformatics, 12(suppl 4):S2 (2011)]에서 발견되는 것들을 사용하여 예측될 수 있다.

[0396] **출발/정지 코돈 교환들 및 핵산 유사체들의 통합**

[0397] 일부 양태들에서, 본 개시는 본 개시의 자동화 편집 방법들, 모듈들, 기기들 및 시스템들을 사용하여 세포 라이브러리들을 생성시키는데, 여기서, 그러한 라이브러리들은 유기체의 게놈의 전체에 걸쳐서 또는 게놈 내의 코딩 영역들의 선택된 서브셋, 예를 들어, 키놈 또는 세크레톰에 대한 출발 및 정지 코돈 변이체들을 스와핑시킴으로써 생성된다. 세포 라이브러리에서, 개별적인 세포들은 하나 이상의 관심 유전자를 위한 천연 출발 또는 정지 코돈을 대체하는 하나 이상의 출발 또는 정지 코돈들을 가질 것이다.

[0398] 예를 들어, 진핵생물들에 의해서 사용되는 전형적인 출발 코돈들은 ATG (AUG)이며, 원핵생물들은 대체로 ATG (AUG)를 사용한 후에, GTG (GUG) 및 TTG (UUG)를 사용한다. 세포 라이브러리는 하나 이상의 관심 유전자들을 위한 천연 출발 코돈들에 대한 치환들을 갖는 개별적인 세포들을 포함할 수 있다.

[0399] 일부 양태들에서, 본 개시는 선택된 관심 유전자들의 앞에서 ATG 출발 코돈들을 TTG로 대체시킴으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 개시는 ATG 출발 코돈들을 GTG로 대체시킴으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 개시는 GTG 출발 코돈들을 ATG로 대체시킴으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 개시는 GTG 출발 코돈들을 TTG로 대체시킴으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 개시는 TTG 출발 코돈들을 ATG로 대체시킴으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 개시는 TTG 출발 코돈들을 GTG로 대체시킴으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다.

[0400] 다른 예들에서, 에스. 세레비시아(*S. cerevisiae*) 및 포유동물에 전형적인 정지 코돈들은 각각 TAA (UAA) 및 TGA (UGA)이다. 단자엽식물들(monocotyledonous plants)에 전형적인 정지 코돈은 TGA (UGA)인 반면에, 곤충

및 대장균(*E. coli*)은 정지 코돈으로서 공통적으로 TAA (UAA)를 사용한다(Dalphin, et al., Nucl. Acids Res., 24: 216-218 (1996)). 세포 라이브러리는 하나 이상의 관심 유전자들을 위한 천연 정지 코돈들에 대한 치환들을 갖는 개별적인 세포들을 포함한다.

[0401] 일부 양태들에서, 본 개시는 TAA 정지 코돈들을 TAG로 대체함으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 개시는 TAA 정지 코돈들을 TGA로 대체함으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 개시는 TGA 정지 코돈들을 TAA로 대체함으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 개시는 TGA 정지 코돈들을 TAG로 대체함으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 개시는 TAG 정지 코돈들을 TAA로 대체함으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킨다. 다른 양태들에서, 본 발명은 TAG 정지 코돈들을 TGA로 대체함으로써 세포 라이브러리를 자동 생성시킴을 교시하고 있다.

[0402] **종결인자 스왑들 및 래더들**

[0403] 하나 이상의 관심 유전자들의 사전-스플라이싱된 mRNA의 최적 종결을 식별하기 위한 한 가지 메커니즘은 "종결인자 스왑" 세포 라이브러리의 생성을 통해서 이루어지고, 여기에서, 세포들은 하나 이상의 관심 유전자들에 연결된 특이적 종결인자 서열들을 갖는 유전 편집들을 포함한다. 따라서, 본 개시의 방법들, 모듈들, 기기들 및 시스템들을 사용하여 생성된 세포 라이브러리들은, 예를 들어, 합성 부위들로부터 전사물들을 대체함으로써 mRNA 안정성에 영향을 주기 위해서 사용될 수 있는 종결인자 스왑 세포 라이브러리들일 수 있다. 다른 실시예들에서, 종결인자 스왑 세포 라이브러리는 전사 종결 및 그에 따른 스플라이싱되지 않은 pre-mRNA의 축적의 효율의 증가 또는 감소를 식별하기 위해서 사용될 수 있다(e.g., West and Proudfoot, Mol Cell.; 33(3-9); 354-364 (2009) and/or 3' end processing (e.g., West, et al., Mol Cell. 29(5):600-10 (2008)). 유전자가 복수의 종결 부위들에 연결되는 경우에, 편집들은 유전자와 연관되는 복수의 종결인자들에 대한 편집들의 조합을 편집할 수 있다. 추가의 아미노산들이 또한 종결인자들 상의 단백질 길이에 대한 영향을 측정하기 위해서 단백질들의 말단들에 첨가될 수 있다.

[0404] 세포 라이브러리들은 표적 유전자들의 임의의 주어진 수 및 일정 범위의 활성의 역제를 기반으로 한 종결인자 래더에 대해서 선택된 종결인자들의 임의의 주어진 수의 편집들을 이용할 수 있다. 종결인자 서열들의 래더는 적어도 하나의 조건하에 적어도 하나의 유전자와의 발현을 변화시킨다. 이어서, 이러한 래더는 본 개시의 자동화 편집 방법들, 모듈들, 기기들 및 시스템들을 사용한 유기체 내의 일군의 유전자들에 조직적으로 적용된다.

[0405] 일부 양태들에서, 본 개시는 본 개시의 자동화 편집 방법들, 모듈들, 기기들 및 시스템들을 사용하여 세포 라이브러리들을 생성시키는데, 여기서, 그러한 라이브러리들은 라이브러리의 개별적인 세포들 내의 게놈에서의 하나 이상의 영역에서 종결인자 신호들을 편집하기 위해서 생성된다. 진핵생물들에서의 전사 종결은 RNA 폴리머라제 II와 연관된 단백질 인자들에 의해서 인식되는 종결인자 신호들을 통해서 작동한다. 예를 들어, 세포 라이브러리는 인코딩 폴리아데닐화 특이성 인자(encoding polyadenylation specificity factor: CPSF) 및 절단 촉진 인자(cleavage stimulation factor: CstF)를 인코딩하는 유전자들에서의 편집들 및/또는 종결 부위들로 CPSF 및 CstF 인자에 의해서 동원된 유전자 인코딩 단백질들을 갖는 개별적인 진핵 세포들을 함유할 수 있다. 원핵생물들에서, Rho-독립성 및 Rho-의존성 종결이라 불리는 2 가지 주요 메커니즘은 전사 종결을 매개한다. 예를 들어, 세포 라이브러리는 이들 종결 경로들의 결합, 효율 및/또는 활성에 영향을 미치는 단백질들을 인코딩하는 유전자들에서의 편집들을 갖는 개별적인 원핵 세포들을 함유할 수 있다.

[0406] 특정 양태들에서, 본 개시는 최적의 특성들을 갖는 종결 서열들("종결인자들")을 선택하는 방법들을 제공한다. 예를 들어, 일부 실시예들에서, 본 개시는 하나 이상의 종결인자들을 도입 및/또는 편집하고 그리고/또는, 일정 범위의 활성을 나타내는, 숙주 세포 내의 하나 이상의 종결인자들의 변이체들을 생성시키기 위한 방법들을 교시하고 있다. 종결인자들의 특정의 조합이 종결인자 래더로서 함께 그룹을 이룰 수 있고, 개시의 세포 라이브러리들은 달리 동일한 유전적 배경에서 하나 이상의 관심 표적 유전자들에 작동 가능하게 연결된 종결인자들을 대표하는 개별적인 세포들을 포함한다. 자동화 기기들을 이용하기 위해서 변형될 수 있는 비-자동화 편집 전략들의 예들은, 예를 들어, 발명의 명칭이 "Microbial strain improvement by a HTP genomic engineering platform"인 Serber 등의 미국특허 제9,988,624호에서 찾아볼 수 있다.

[0407] 특정 양태들에서, 종결인자 스왑 세포 라이브러리는 관심 유전자들의 발현을 위한 "종결인자 래더"로서 작용하는 종결인자들의 사전-선택된 세트에 작동 가능하게 연결되는 표적 유전자들의 세트를 편집함으로써 생산된다. 예를 들어, 세포들은 내인성 프로모터가 개별적인 관심 유전자들과 작동 가능하게 연결되어 프로모터 래더에서 상이한 프로모터들로 편집되도록 편집된다. 내인성 프로모터가 존재하지 않거나, 이의 서열이 공지되지 않았거나, 그것이 일부 방식으로 미리 변화된 경우에, 프로모터 래더의 개별적인 프로모터들이 관심 유전자들의 앞에

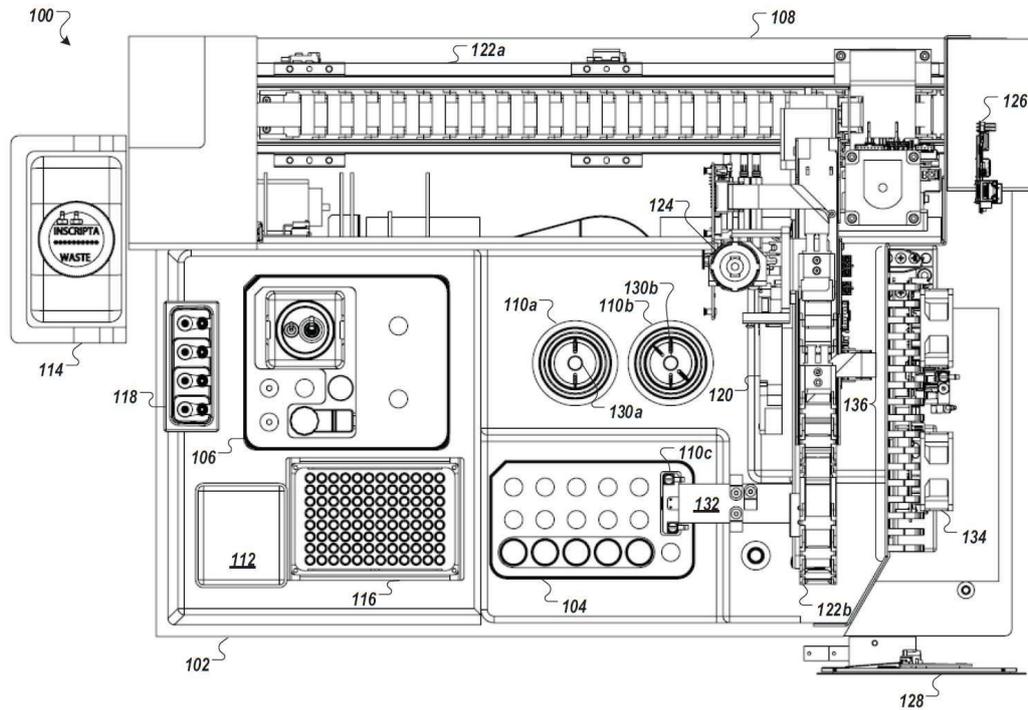
서 삽입될 수 있다. 이들 생산된 세포 라이브러리들은 달리 동일한 유전적 상황에서 하나 이상의 표적 유전자들에 작동 가능하게 연결된 래더의 개별적인 프로모터를 갖는 개별적인 세포들을 지닌다. 이어서, 논의되고 있는 종결인자 래더가 주어진 관심 유전자와 연관된다.

[0408] 종결인자 래더는 게놈 또는 게놈의 선택된 서브셋의 모든 또는 대부분의 ORFs, 예를 들어, 키놈 또는 세크레톰의 ORFs의 종결에 더욱 일반적으로 영향을 주기 위해서 사용될 수 있다. 표적 유전자들의 세트가 또한 특정의 세포 경로, 예를 들어, 조절 경로 또는 신호전달 경로와 연루되는 것으로 공지된 또는 그러한 것으로 추측되는 유전자들일 수 있다. 표적 유전자들의 세트는, 앞서 입증된 유익한 편집들(앞선 프로모터 스왑들 또는 앞선 SNP 스왑들)과의 관련에 의해서, 앞서 생성된 편집들 사이의 상위성 상호작용들을 기반으로 한 알고리즘 선택에 의해서, 표적에 대한 유익한 ORF에 관한 가설들을 기반으로 한 다른 선택 기준에 의해서, 또는 무작위 선택을 통해서, 기능과 관련된 ORFs일 수 있다. 특이적 실시예들에서, 표적 유전자들은 비-코딩 RNAs을 포함한 비-단백질 코딩 유전자들을 포함할 수 있다.

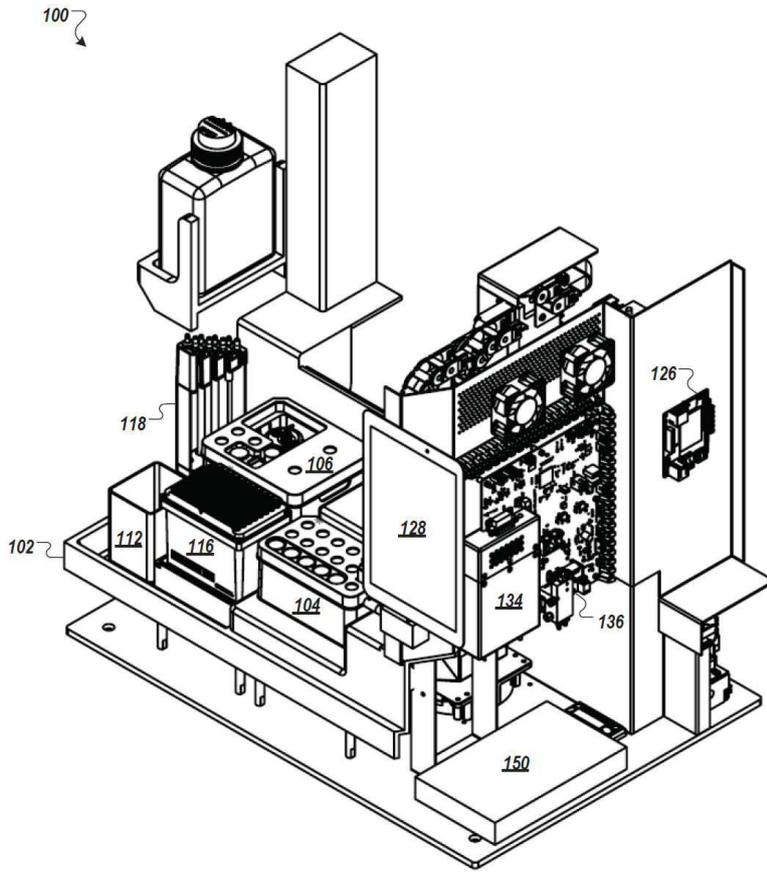
[0409] 특정 실시예들이 설명되었지만, 이들 실시예들은 단지 예로서 제시되었으며, 본 개시들의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 사실, 본 명세서에서 설명된 신규한 방법들, 장치들, 모듈들, 기기들 및 시스템들은 다양한 다른 형태들로 구현될 수 있으며; 더욱이, 본 명세서에서 설명된 방법들, 장치들, 모듈들, 기기들 및 시스템들의 형태에서의 다양한 생략들, 치환들 및 변화들이 본 개시들의 사상을 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다. 첨부되는 청구범위 및 이들의 등가물은 본 개시들의 범위 및 사상 내에 있는 것으로서 그러한 형태들 또는 변형들을 포함하는 것으로 의도된다.

도면

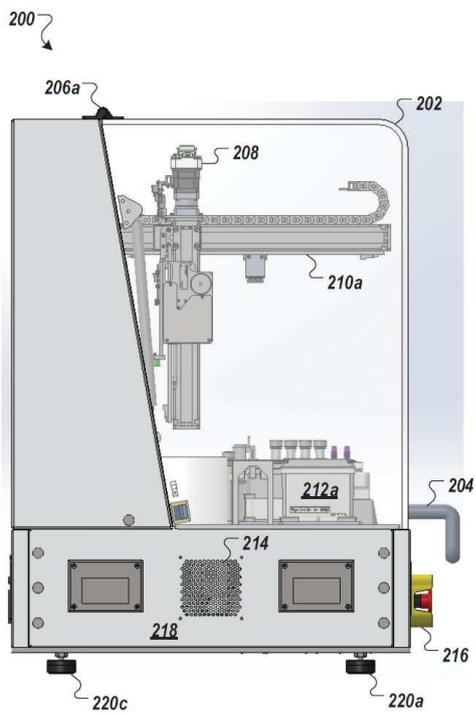
도면1a



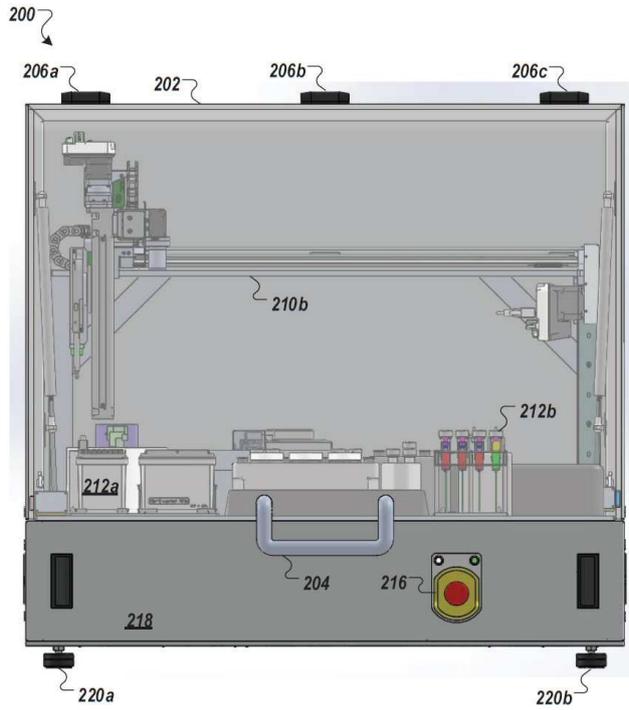
도면1b



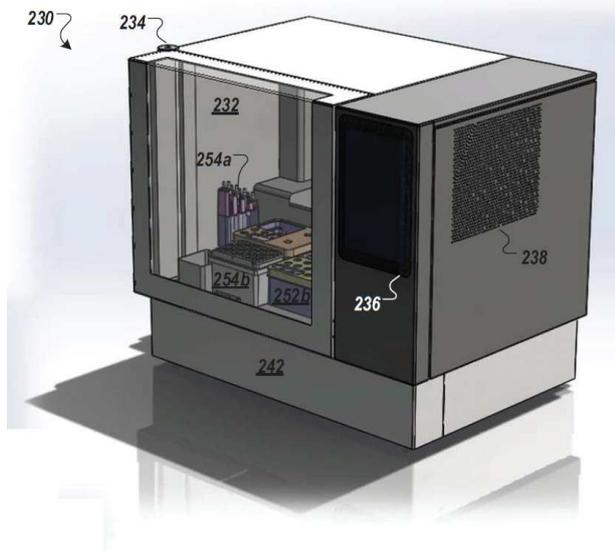
도면2a



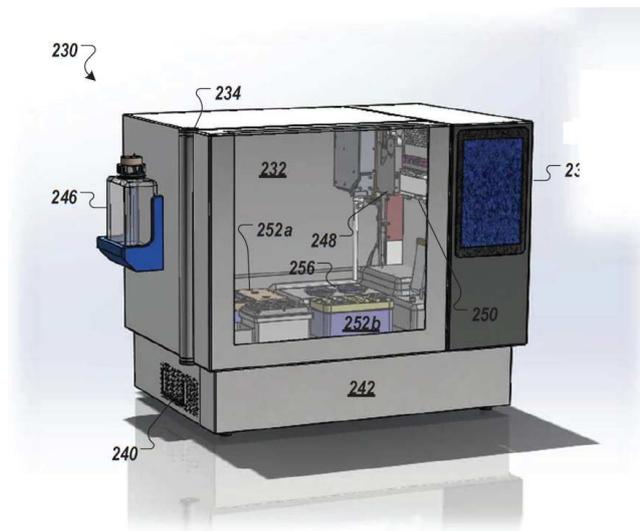
도면2b



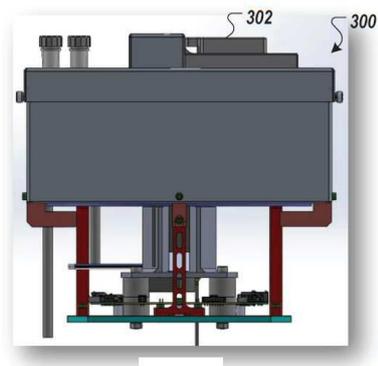
도면2c



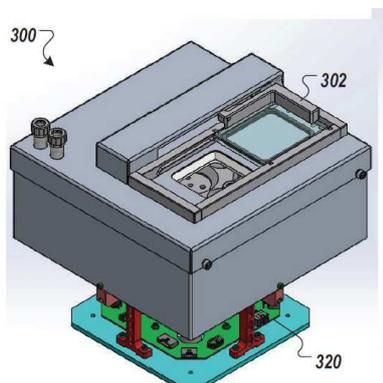
도면2d



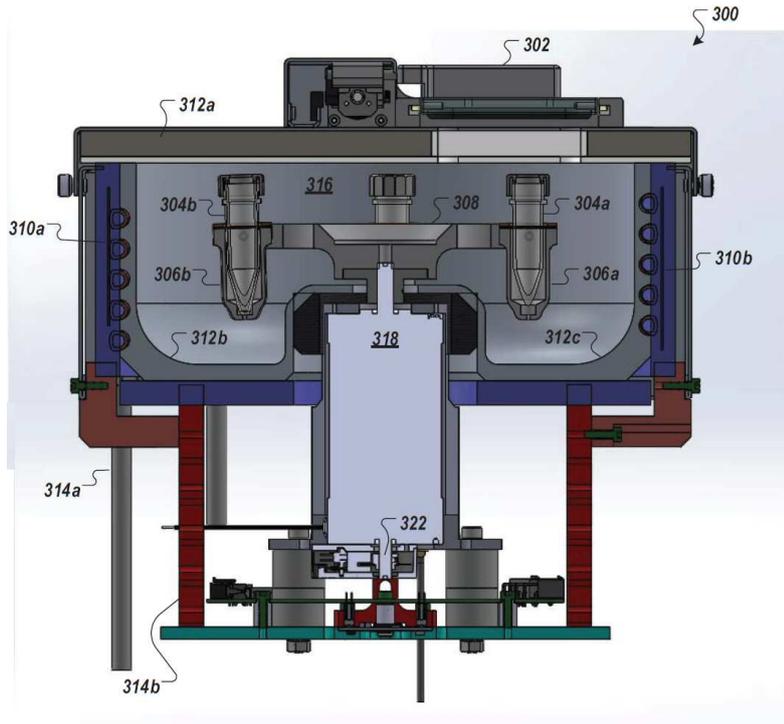
도면3a



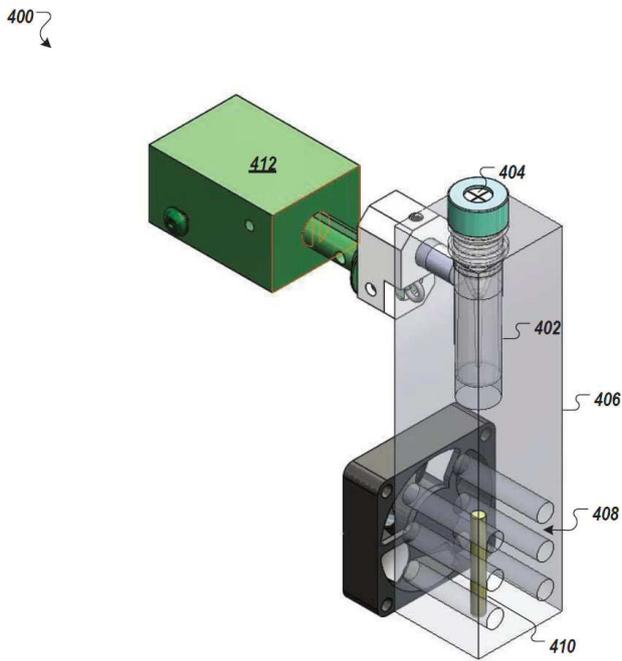
도면3b



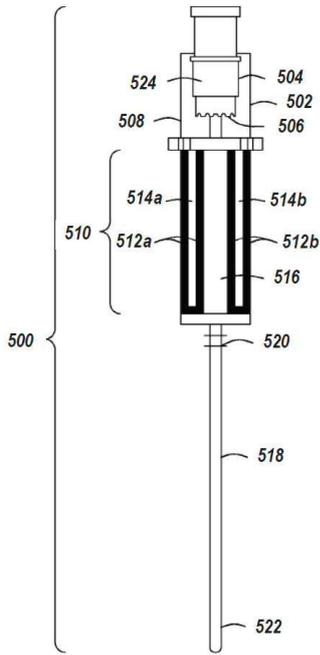
도면3c



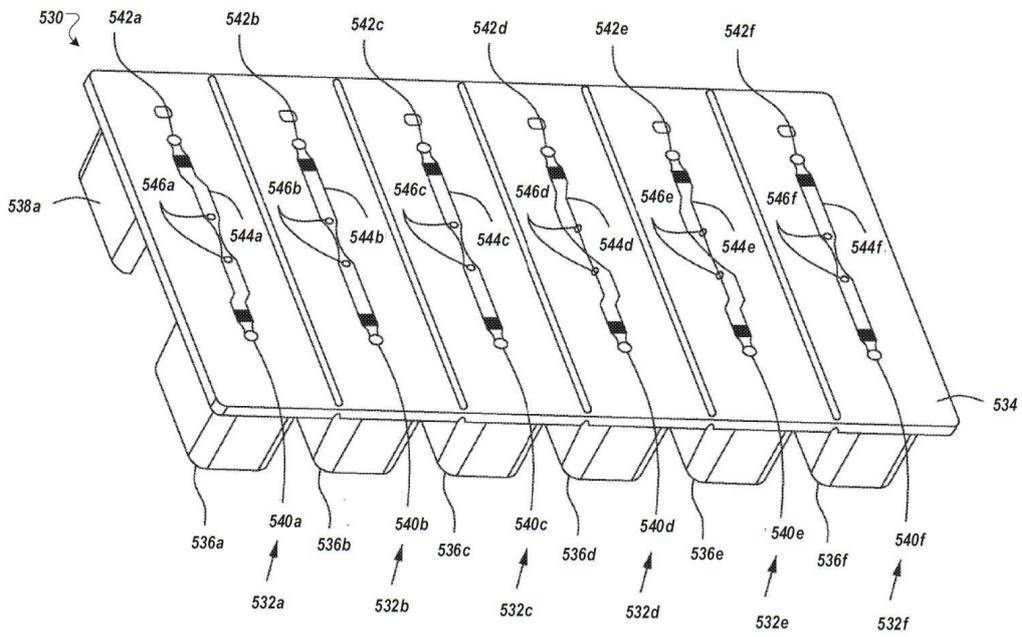
도면4



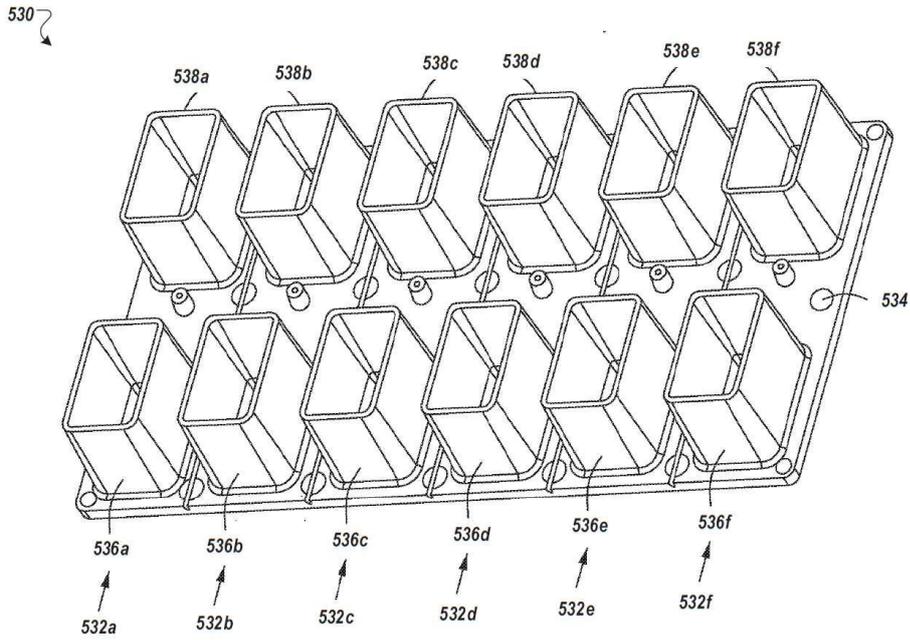
도면5a



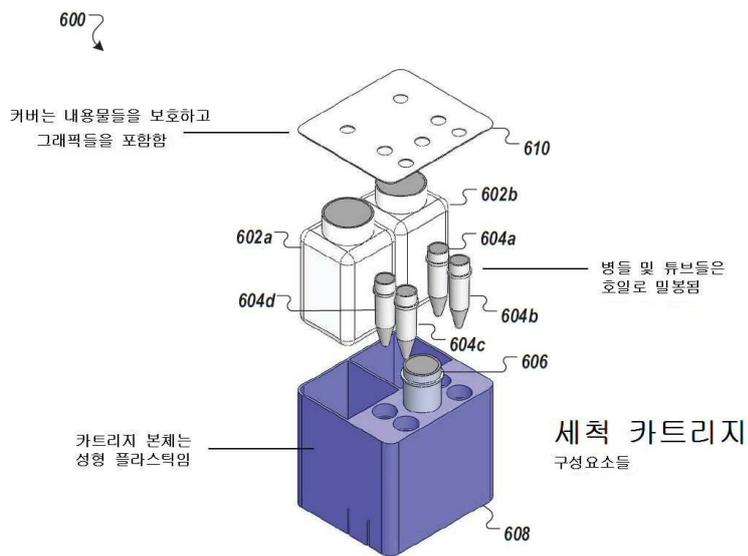
도면5b



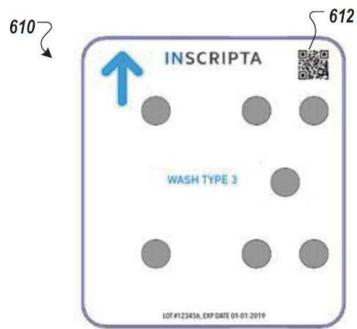
도면5c



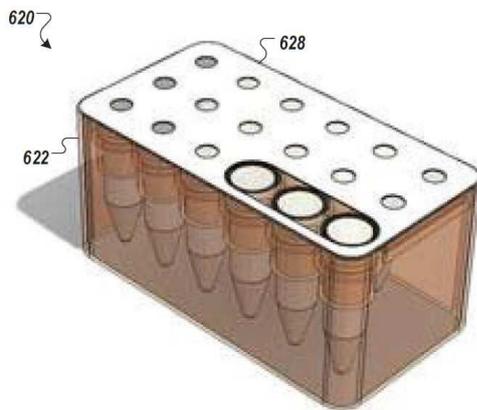
도면6a



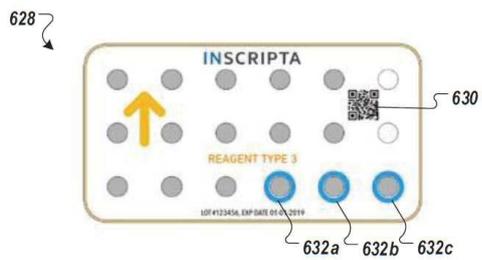
도면6b



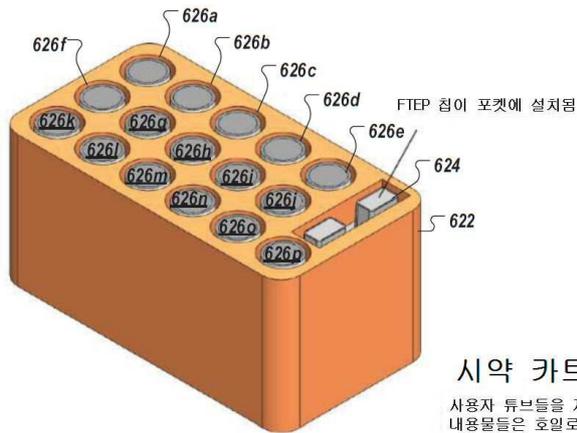
도면6c



도면6d

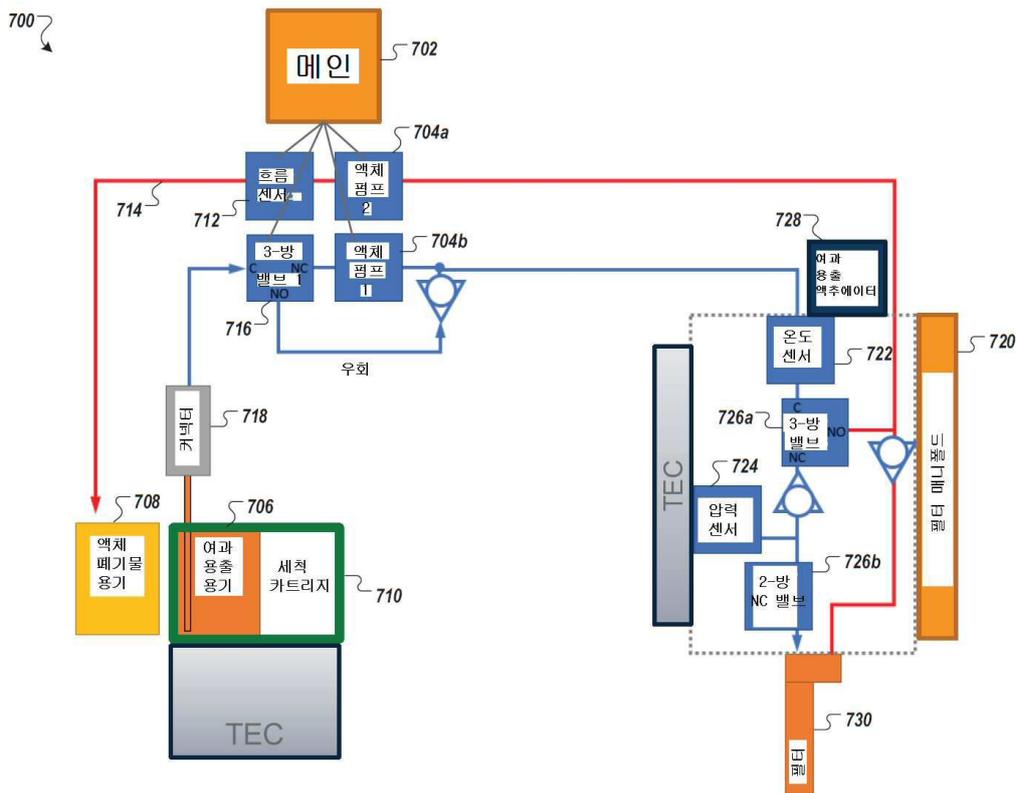


도면6e



시약 카트리지
 사용자 튜브들을 제외한 모든
 내용물들은 호일로 밀봉될 것임

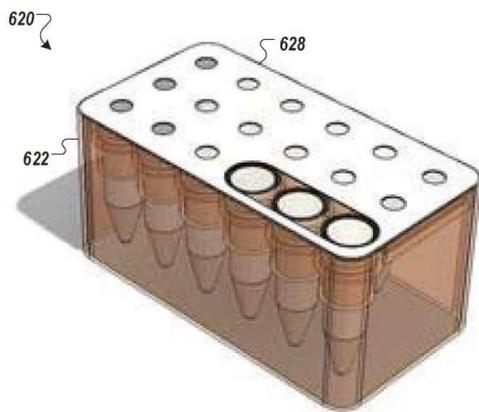
도면7a



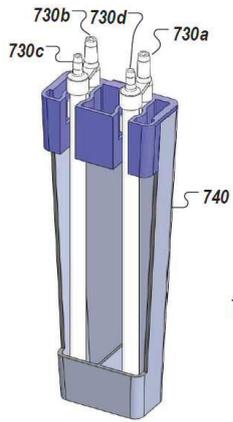
도면7b



도면7c

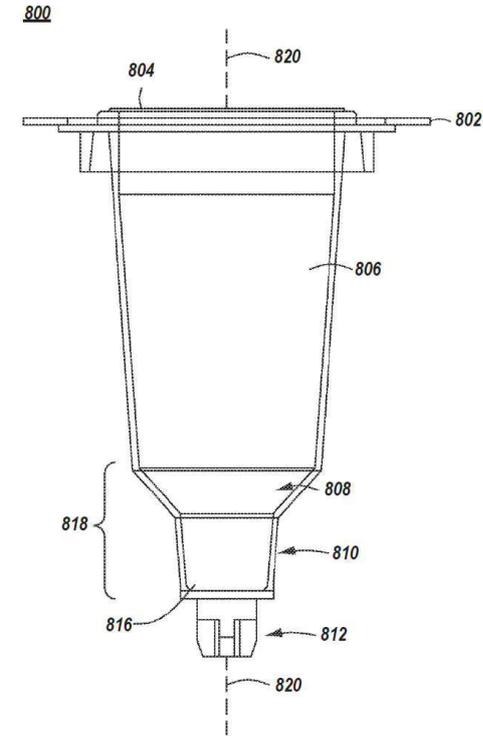


도면7d

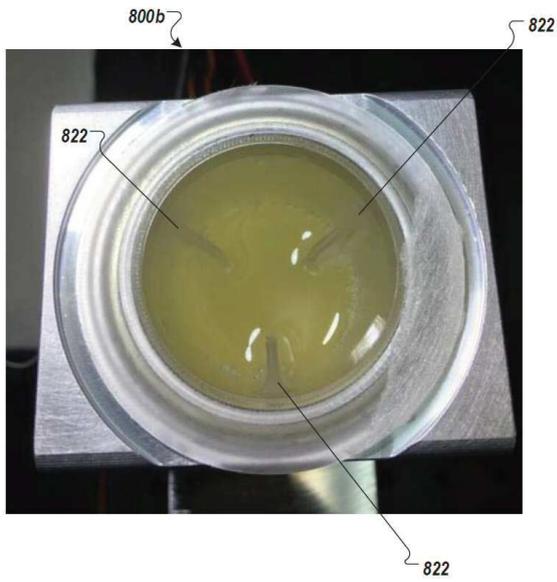


1. 필터 카트리지

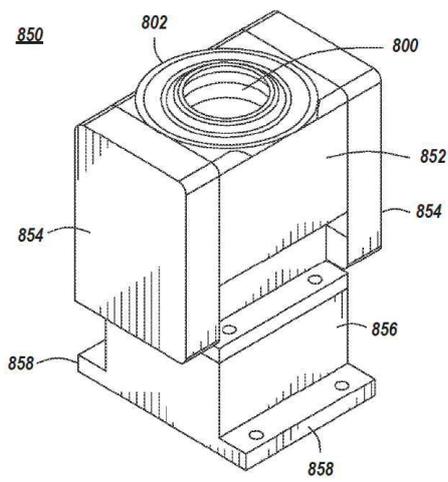
도면8a



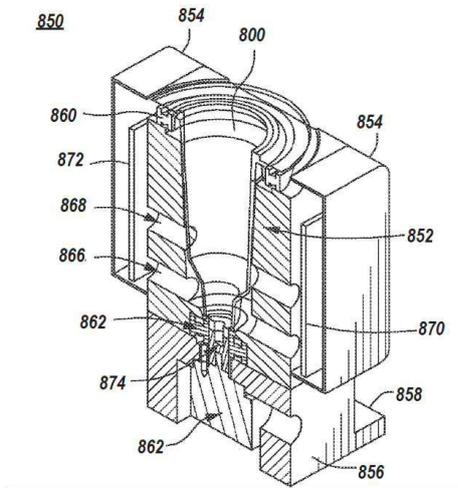
도면8b



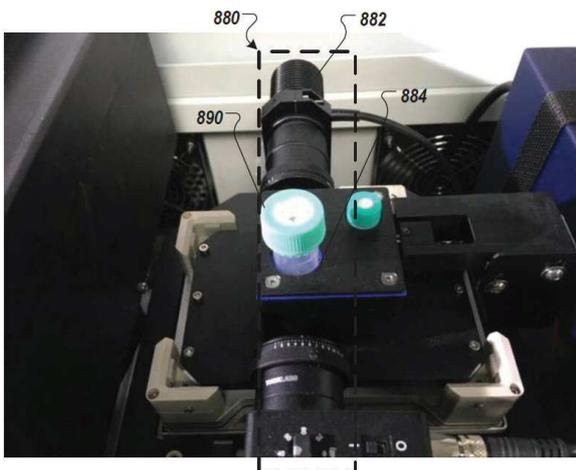
도면8c



도면8d



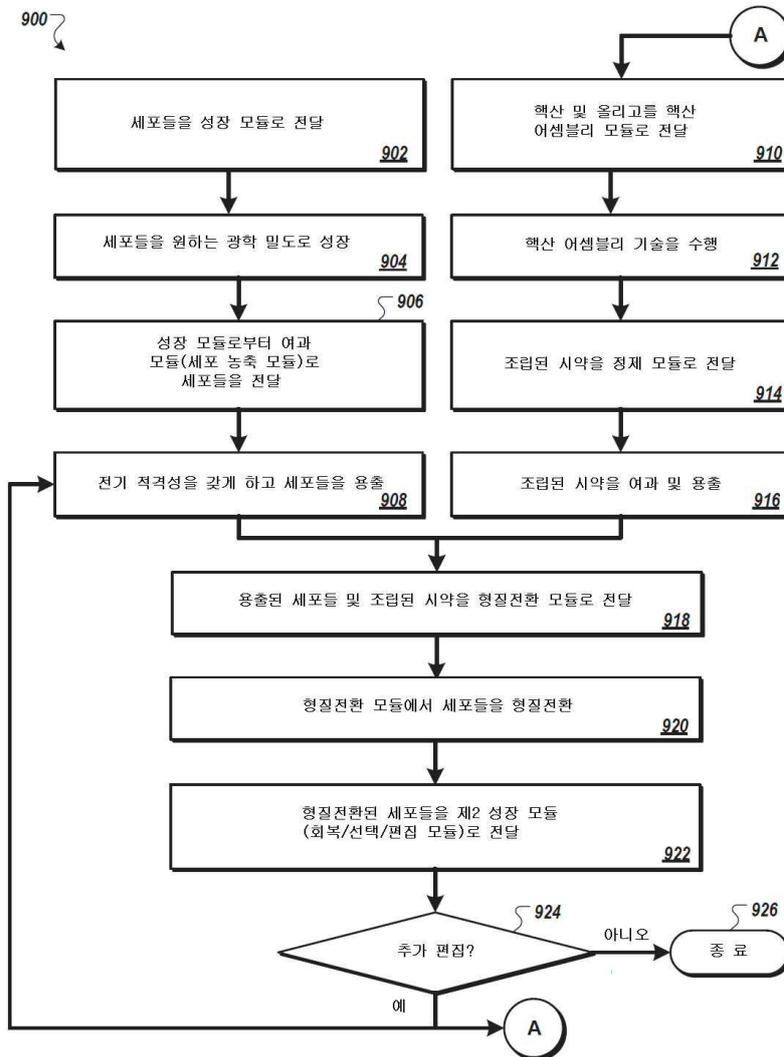
도면8e



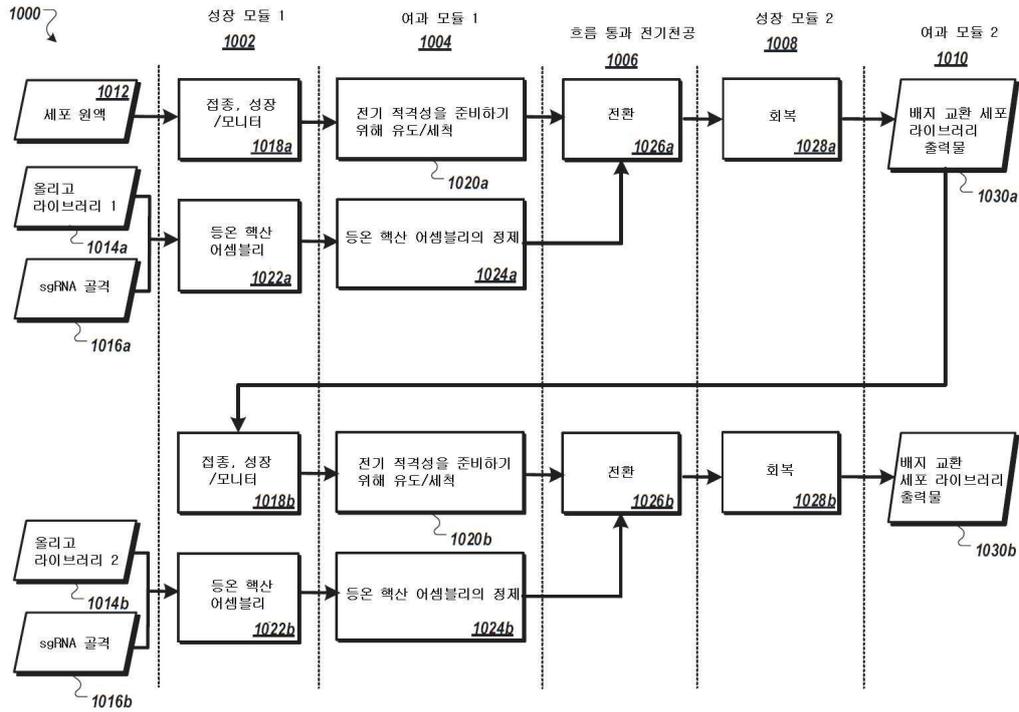
도면8f



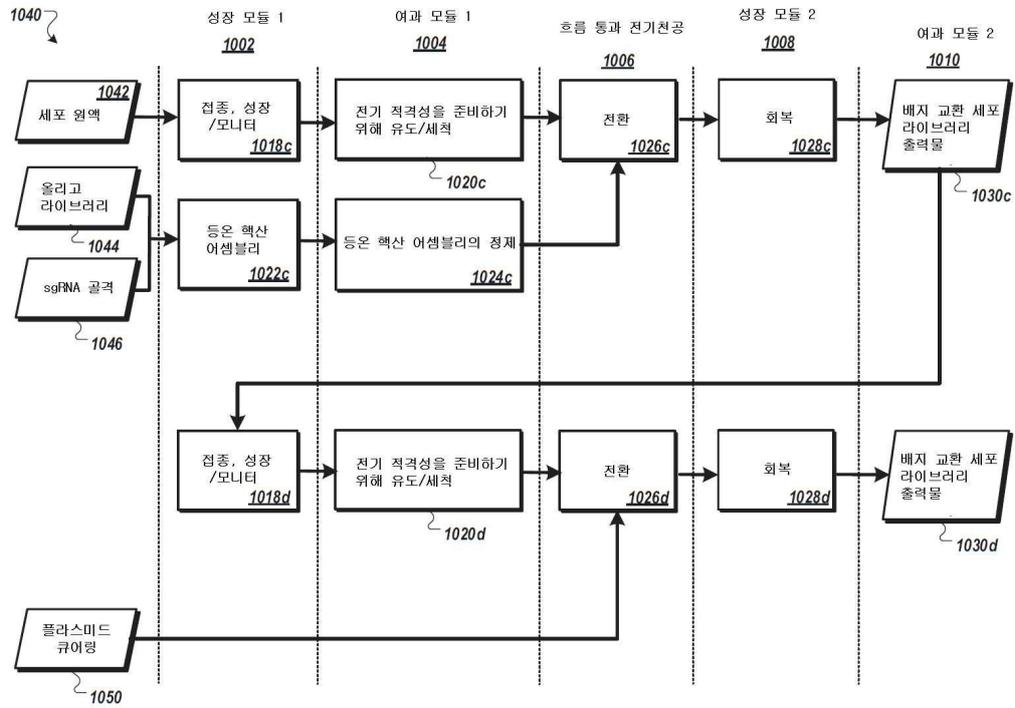
도면9



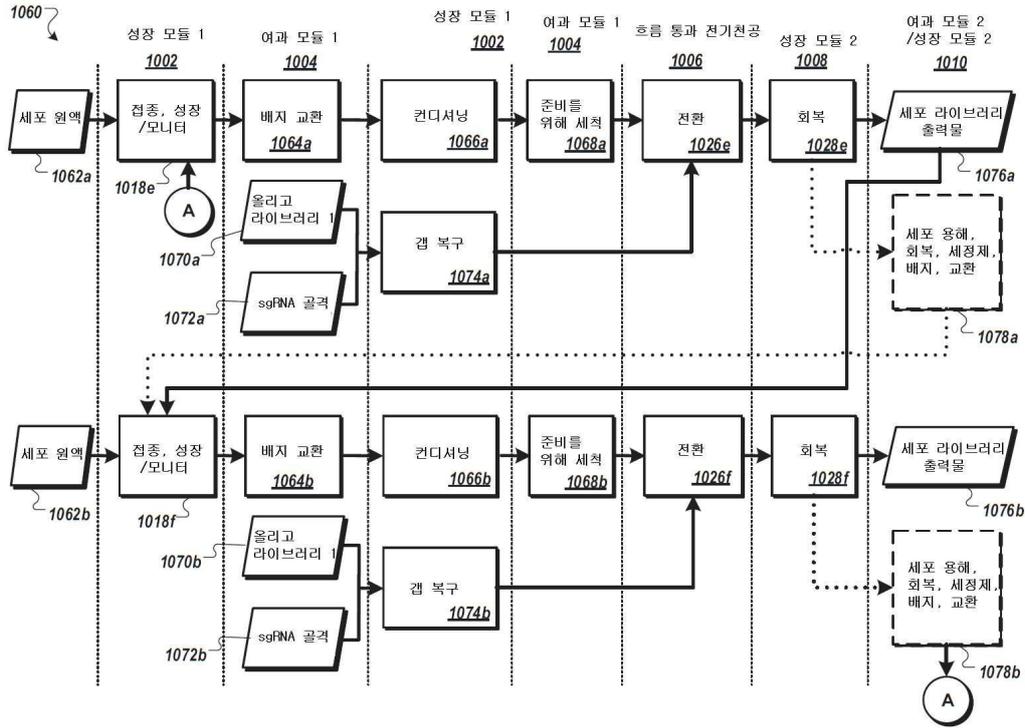
도면10a



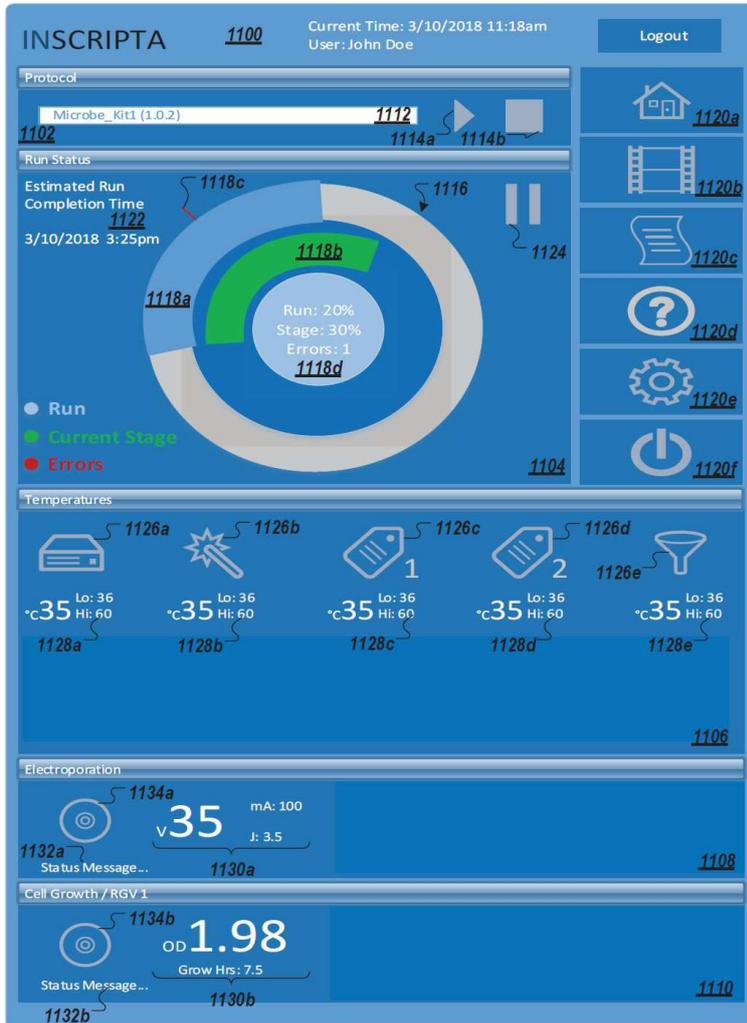
도면10b



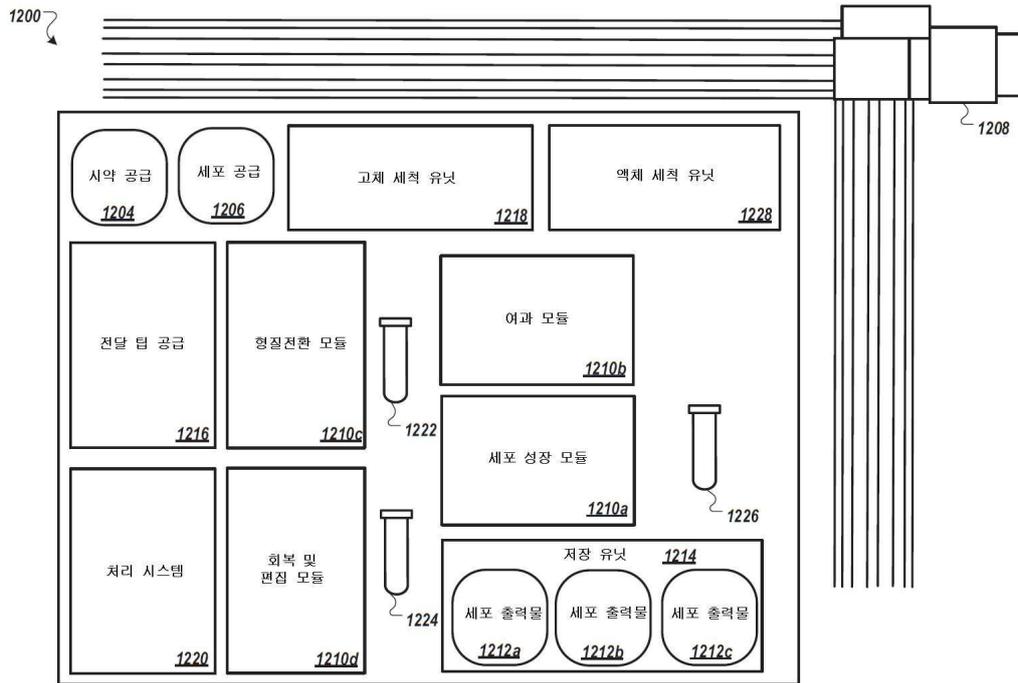
도면10c



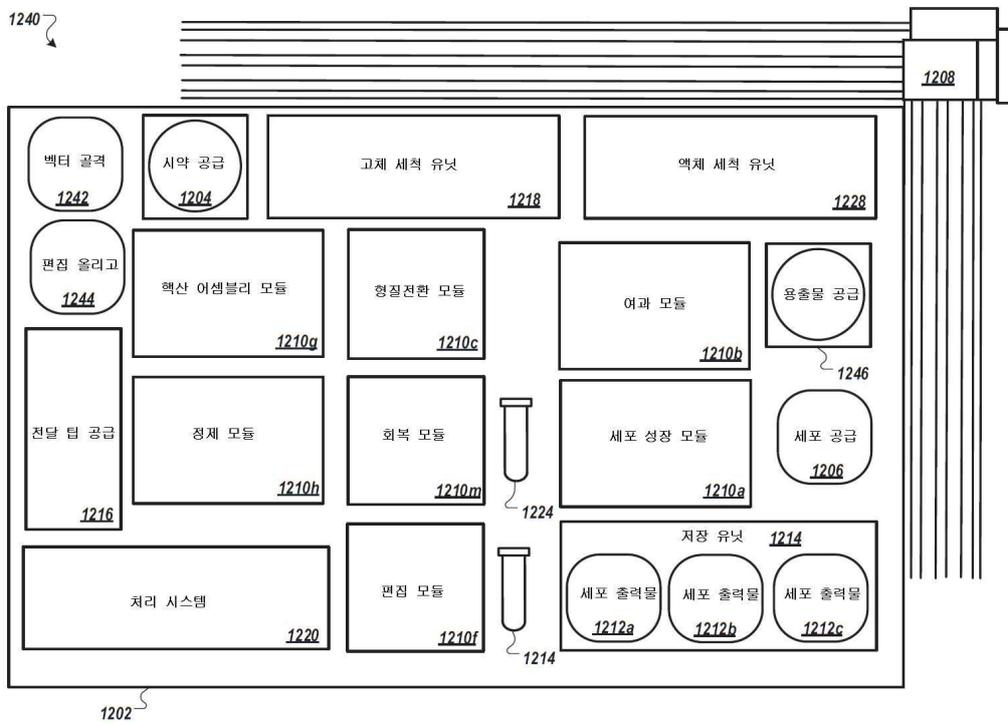
도면11



도면12a



도면12b



도면13

