(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7406990号
(P7406990)

(45)発行日　令和5年12月28日(2023.12.28)

(24)登録日　令和5年12月20日(2023.12.20)

(51)国際特許分類		FI		
C12N	*5/071(2010.01)*	C12N	5/071	ZNA
C12N	*5/078(2010.01)*	C12N	5/078	
C12N	*5/09 (2010.01)*	C12N	5/09	
C12Q	*1/02 (2006.01)*	C12Q	1/02	
G01N	*33/48 (2006.01)*	G01N	33/48	M

請求項の数　67　（全97頁）

(21)出願番号　特願2019-524430(P2019-524430)
(86)(22)出願日　平成29年11月13日(2017.11.13)
(65)公表番号　特表2020-501522(P2020-501522A)
(43)公表日　令和2年1月23日(2020.1.23)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/061377
(87)国際公開番号　WO2018/089928
(87)国際公開日　平成30年5月17日(2018.5.17)
審査請求日　令和2年11月13日(2020.11.13)
(31)優先権主張番号　62/421,074
(32)優先日　平成28年11月11日(2016.11.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　500482810
ホワイトヘッド・インスティテュート・フォー・バイオメディカル・リサーチ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， メイン ストリート ４５５
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ヒト血漿様培地

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

少なくとも９種のタンパク質構成性アミノ酸と、

１種または複数種のビタミンと、

１種または複数種の無機イオンと、

グルコースと、

４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチン、タウリン、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベート、スクシネート、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロール、尿素、ガラクトース、フルクトース、ヒポキサンチンおよび尿酸から選択される少なくとも１０種の小有機化合物と

を含む、基礎培養培地であって、

２０マイクロモル濃度（μＭ）の０．３から３倍の濃度の４－ヒドロキシプロリンを含み、

３５０μＭの０．３から３倍の濃度の尿酸を含む、基礎培養培地。

【請求項２】

前記少なくとも１０種の小有機化合物が、

４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチン、タウリンから選択される少なくとも４種のアミ

ノ酸またはアミノ酸誘導体と、
２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートから選択される少なくとも６種の小有機化合物と
を含む、請求項１に記載の基礎培養培地。
【請求項３】
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンから選択される少なくとも６種のアミノ酸またはアミノ酸誘導体を含む、請求項１または請求項２に記載の基礎培養培地。
【請求項４】
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンを含む、請求項１～３のいずれかに記載の基礎培養培地。
【請求項５】
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートから選択される少なくとも８種の小有機化合物を含む、請求項１～４のいずれかに記載の基礎培養培地。
【請求項６】
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロールおよび尿素から選択される少なくとも３種の小有機化合物を含む、請求項１～５のいずれかに記載の基礎培養培地。
【請求項７】
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロールおよび尿素を含む、請求項１～６のいずれかに記載の基礎培養培地。
【請求項８】
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、ヒポキサンチン、尿酸または両方を含む、請求項１～７のいずれかに記載の基礎培養培地。
【請求項９】
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、ガラクトース、フルクトースまたは両方を含む、請求項１～８のいずれかに記載の基礎培養培地。
【請求項１０】
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、４－ヒドロキシプロリン、アセテート、アセトン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトレート、シトルリン、クレアチン、クレアチニン、ホルメート、フルクトース、ガラクトース、グルタチオン、グリセロール、ヒポキサンチン、ラクテート、マロネート、オルニチン、ピルベート、スクシネート、タウリン、尿素および尿酸を含む、請求項１～９のいずれかに記載の基礎培養培地。
【請求項１１】
前記少なくとも９種のタンパク質構成性アミノ酸が、グリシン、Ｌ－アラニン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパルテート、Ｌ－システイン、Ｌ－グルタメート、Ｌ－グルタミン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－トレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリンおよびＬ－シスチンを含む、請求項１～１０のいずれかに記載の基礎培養培地。
【請求項１２】
前記１種または複数種のビタミンが、以下のビタミン：Ｄ－ビオチン、コリン、葉酸、ミオ－イノシトール、ナイアシンアミド、ｐ－アミノ安息香酸、Ｄ－パントテン酸、ビタ

ミンＢ６、リボフラビン、チアミンおよびビタミンＢ１２のうち少なくとも８種を含む、請求項１～１１のいずれかに記載の基礎培養培地。

【請求項１３】

前記１種または複数種の無機イオンが、以下のイオン：Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、NH_4^+、Cl^-、HCO_3^-、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}およびNO_3^-のうち少なくとも８種を含む、請求項１～１２のいずれかに記載の基礎培養培地。

【請求項１４】

前記培地中に存在する前記イオンの各々の濃度が、表１においてそのイオンについて列挙される濃度の±５０％以内である、請求項１３に記載の基礎培養培地。

【請求項１５】

前記培地中に存在する前記イオンの各々の濃度が、表１においてそのイオンについて列挙される濃度の±２５％以内である、請求項１３に記載の基礎培養培地。

【請求項１６】

前記培地中に存在する前記イオンの各々の濃度が、表１においてそのイオンについて列挙される濃度の±１０％以内である、請求項１３に記載の基礎培養培地。

【請求項１７】

前記培地中に存在する前記イオンの各々の濃度が、表１においてそのイオンについて列挙される濃度である、請求項１３に記載の基礎培養培地。

【請求項１８】

前記１種または複数種の無機イオンが、Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、NH_4^+、Cl^-、HCO_3^-、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}およびNO_3^-を含む、請求項１～１７のいずれかに記載の基礎培養培地。

【請求項１９】

前記１種または複数種の無機イオンが、無機塩として存在し、該無機塩のうち少なくとも６種が、$CaCl_2$、KCl、$MgCl_2$、$MgSO_4$、NaCl、$NaHCO_3$、Na_2HPO_4、$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$およびNH_4Clから選択される、請求項１～１８のいずれかに記載の基礎培養培地。

【請求項２０】

表２中に列挙される前記基礎培養培地中に存在する各々の構成成分の濃度が、表２においてその構成成分について列挙される濃度の±５０％以内である、請求項１～１９のいずれかに記載の基礎培養培地。

【請求項２１】

表２中に列挙される前記基礎培養培地中に存在する各々の構成成分の濃度が、表２においてその構成成分について列挙される濃度の±２５％以内である、請求項１～２０のいずれかに記載の培養培地。

【請求項２２】

表２中に列挙される前記基礎培養培地中に存在する各々の構成成分の濃度が、表２においてその構成成分について列挙される濃度の±１０％以内である、請求項１～２１のいずれかに記載の基礎培養培地。

【請求項２３】

表２中に列挙される前記基礎培養培地中に存在する各々の構成成分の濃度が、表２においてその構成成分について列挙される濃度で存在する、請求項１～２２のいずれかに記載の基礎培養培地。

【請求項２４】

表２中に列挙される各々の構成成分が、前記培地中に存在する、請求項１～２３のいずれかに記載の基礎培養培地。

【請求項２５】

１種または複数種の抗生物質、ｐＨ指示薬または両方をさらに含む、請求項１～２４のいずれかに記載の基礎培養培地。

【請求項２６】

請求項１～２５のいずれかに記載の基礎培養培地を含む培養培地であって、血清または血清代用品をさらに含む培養培地。
【請求項２７】
１％～２０％の血清を含む、請求項２６に記載の培養培地。
【請求項２８】
１％～５％の血清または５％～１０％の血清または１０％～２０％の血清を含む、請求項２７に記載の培養培地。
【請求項２９】
およそ１０％の血清を含む、請求項２７に記載の培養培地。
【請求項３０】
前記血清が、ウシ胎仔血清である、請求項２６から２９のいずれかに記載の培養培地。
【請求項３１】
前記血清が、透析された血清である、請求項２６から３０のいずれかに記載の培養培地。
【請求項３２】
前記血清が、熱不活化血清である、請求項２６から３１のいずれかに記載の培養培地。
【請求項３３】
請求項１から２５のいずれかに記載の基礎培養培地または請求項２６から３２のいずれかに記載の培養培地の構成成分をまとめて含有する１つまたは複数の容器を含むキット。
【請求項３４】
前記培養培地の複数の相互に適合性である構成成分を各々が含有する少なくとも２つの容器を含む、請求項３３に記載のキット。
【請求項３５】
前記培養培地を調製するための指示、該培養培地において細胞を培養するための指示または両方をさらに含む、請求項３３または請求項３４に記載のキット。
【請求項３６】
請求項１から２５のいずれかに記載の基礎培養培地または請求項２６から３２のいずれかに記載の培養培地を調製する方法であって、そのそれぞれの構成成分を組み合わせることを含む、方法。
【請求項３７】
請求項１から２５のいずれかに記載の基礎培養培地または請求項２６から３２のいずれかに記載の培養培地および１種もしくは複数種の哺乳動物細胞を含む組成物。
【請求項３８】
前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞を含む、請求項３７に記載の組成物。
【請求項３９】
前記細胞が、血液細胞を含む、請求項３７または請求項３８に記載の組成物。
【請求項４０】
前記細胞が、がん細胞を含む、請求項３７から３９のいずれかに記載の組成物。
【請求項４１】
試験薬剤をさらに含む、請求項１から２５のいずれかに記載の基礎培養培地、請求項２６から３２のいずれかに記載の培養培地、または請求項３７から４０のいずれかに記載の組成物。
【請求項４２】
前記試験薬剤が、小分子である、請求項４１に記載の基礎培養培地、培養培地または組成物。
【請求項４３】
前記試験薬剤が、化学療法剤である、請求項４１または請求項４２に記載の基礎培養培地、培養培地または組成物。
【請求項４４】
１種または複数種の哺乳動物細胞を培養する方法であって、請求項１から２５のいずれかに記載の基礎培養培地、請求項２６から３２のいずれかに記載の培養培地、または請求

項３７から４０のいずれかに記載の組成物を提供することと、該培養培地において１種または複数種の哺乳動物細胞を培養することとを含む、方法。
【請求項４５】
前記１種または複数種の哺乳動物細胞が、ヒト細胞を含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記１種または複数種の哺乳動物細胞が、血液細胞を含む、請求項４４または請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記１種または複数種の哺乳動物細胞が、がん細胞を含む、請求項４４から４６のいずれかに記載の方法。
【請求項４８】
前記培養培地に試験薬剤を添加することをさらに含む、請求項４４から４７のいずれかに記載の方法。
【請求項４９】
哺乳動物細胞集団または細胞系を特徴付ける方法であって、（ａ）請求項１から２５のいずれかに記載の基礎培養培地または請求項２６から３２のいずれかに記載の培養培地中で哺乳動物細胞集団または細胞系の１種または複数種の細胞を培養することと、（ｂ）該培養培地で培養された該細胞の表現型を検出すること、または該培養培地で培養された細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることとを含む、方法。
【請求項５０】
（ｃ）第２の培養培地において同一集団または細胞系に由来する１種または複数種の細胞を培養することと、（ｄ）該第２の培養培地において培養された該細胞の表現型を検出すること、または該第２の培養培地において培養された該細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることと、（ｅ）ステップ（ｂ）において検出された前記表現型を、第２の培養培地で培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する１種もしくは複数種の細胞の該表現型と比較すること、または該アッセイの結果を、第２の培養培地において培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する１種もしくは複数種の細胞を用いて実施した同一アッセイの結果と比較することとをさらに含む、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
ステップ（ｂ）において得た前記表現型またはアッセイの結果と、ステップ（ｄ）において得た前記表現型またはアッセイの結果との間の差を検出することを含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記細胞を、前記培養培地において該細胞が培養される期間の一部またはすべての間、試験薬剤と接触させることを含む、請求項５０から５１のいずれかに記載の方法。
【請求項５３】
ステップ（ｂ）において得た前記表現型またはアッセイの結果、およびステップ（ｄ）において得た前記表現型またはアッセイの結果が、試験薬剤の存在下で培養された前記細胞または前記細胞系に由来する、請求項５０に記載の方法。
【請求項５４】
前記第２の培養培地が、標準培養培地である、請求項５０から５３のいずれかに記載の方法。
【請求項５５】
前記アッセイが、生存率アッセイ、増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、オートファジーアッセイ、レポーターアッセイまたは細胞毒性アッセイである、請求項４９から５４のいずれかに記載の方法。
【請求項５６】
試験薬剤を特徴付ける方法であって、（ａ）前記試験薬剤の存在下で、請求項１から２５のいずれかに記載の基礎培養培地または請求項２６から３２のいずれかに記載の培養培地において１種もしくは複数種の哺乳動物細胞を培養することと、（ｂ）該細胞を用いて

実施したアッセイの結果を得ることとを含む、方法。
【請求項５７】
（ｃ）前記試験薬剤の存在下で第２の培養培地において同一集団または細胞系に由来する１種または複数種の細胞を培養することと、（ｄ）該第２の培養培地において培養した該細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることとをさらに含む、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記アッセイの結果を、前記試験薬剤の存在下で第２の培養培地において培養されている同一集団または細胞系に由来する１種または複数種の細胞を用いて実施した同一アッセイの結果と比較することをさらに含む、請求項５６または請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記細胞を、前記試験薬剤と少なくとも２４時間接触させることを含む、請求項５７から５８のいずれかに記載の方法。
【請求項６０】
前記第２の培養培地が、標準培養培地である、請求項５７から５９のいずれかに記載の方法。
【請求項６１】
前記試験薬剤の存在下で培養された前記細胞または前記細胞系から得た前記アッセイの結果と、前記試験薬剤の存在下で前記２の培養培地において培養された前記細胞または前記細胞系から得た前記アッセイの結果との間の差を検出することを含む、請求項５８から６０のいずれかに記載の方法。
【請求項６２】
前記１種または複数種の細胞が、ヒト細胞を含む、請求項４９から６１のいずれかに記載の方法。
【請求項６３】
前記１種または複数種の細胞が、血液細胞を含む、請求項４９から６２のいずれかに記載の方法。
【請求項６４】
前記１種または複数種の細胞が、がん細胞を含む、請求項４９から６３のいずれかに記載の方法。
【請求項６５】
前記アッセイが、生存率アッセイ、増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、オートファジーアッセイ、レポーターアッセイまたは細胞毒性アッセイである、請求項５６から６４のいずれかに記載の方法。
【請求項６６】
前記試験薬剤が、小分子である、請求項５６から６５のいずれかに記載の方法。
【請求項６７】
前記試験薬剤が、化学療法剤である、請求項５６から６６のいずれかに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１６年１１月１１日に出願された米国仮特許出願第６２／４２１，０７４号に対する優先権の利益を主張し、その全体が本明細書に参照により援用される。
【０００２】
本発明は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ ｈｅａｌｔｈの補助金第Ｒ０１ＣＡ１０３８６６号およびＲ３７ＡＩ０４７３８９号の下、政府援助によりなされた。米国政府は本発明における一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００３】
伝統的な合成細胞培養培地は、生体液および組織抽出物などの天然培地よりも固有の変

動性の少ない多量の培地に対する必要性に対応するように開発された（Ｆｒｅｓｈｎｅｙ、２０１０年）。Ｅａｇｌｅは、２つの細胞型の最小栄養要求量を定義する際に（Ｅａｇｌｅ、１９５５年ａ、１９５５年ｂ）、５０年超前に最初の標準化された合成培地の１種であるイーグル基礎培地（ＢＭＥ）を調合した（Ｅａｇｌｅ、１９５５年ｃ）。その後すぐ、Ｅａｇｌｅは、最小必須培地（ＭＥＭ）を開発し（Ｅａｇｌｅ、１９５９年）、その後の１０年以内に、ＤｕｌｂｅｃｃｏおよびＦｒｅｅｍａｎが、元々マウス胚細胞の培養のために、ＤＭＥＭ（ダルベッコの改変イーグル培地）を調合し（ＤｕｌｂｅｃｃｏおよびＦｒｅｅｍａｎ、１９５９年）、Ｍｏｏｒｅおよび共同研究者が、血液細胞の培養のためにＲＰＭＩ１６４０を開発した（Ｍｏｏｒｅら、１９６７年）。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００４】

いくつかの態様では、本開示は、哺乳動物細胞を培養するのに有用な細胞培養培地を提供する。いくつかの実施形態では、（ａ）少なくとも９種のタンパク質構成性アミノ酸と、（ｂ）１種または複数種のビタミンと、（ｃ）１種または複数種の無機イオンと、（ｄ）グルコースと、（ｅ）４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチン、タウリン、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベート、スクシネート、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロール、尿素、ガラクトース、フルクトース、ヒポキサンチンおよび尿酸から選択される少なくとも１０種の小有機化合物とを含む基礎培養培地が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、少なくとも１０種の小有機化合物は、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンから選択される少なくとも４種のアミノ酸またはアミノ酸誘導体と、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートから選択される少なくとも６種の小有機化合物とを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１０種の小有機化合物は、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンから選択される少なくとも６種のアミノ酸またはアミノ酸誘導体を含み、いくつかの実施形態では、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートから選択される少なくとも４種の小有機化合物も含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１０種の小有機化合物は、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンを含み、いくつかの実施形態ではまた、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートから選択される少なくとも６種の小有機化合物も含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１０種の小有機化合物は、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートから選択される少なくとも８種の小有機化合物を含み、いくつかの実施形態ではまた、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンから選択される少なくとも４種（または少なくとも６種）のアミノ酸またはアミノ酸誘導体も含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１０種の小有機化合物は、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロールおよび尿素から選択される少なくとも３、４、５または６種の小有機化合物を含み、いくつかの実施形態ではまた、上記の構成成分の組合せのいずれかも含む。

【０００５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１０種の小有機化合物は、ヒポキサンチン、尿酸

または両方を含み、いくつかの実施形態ではまた、上記の構成成分の組合せのいずれかを含む。

【０００６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１０種の小有機化合物は、ガラクトース、フルクトースまたは両方を含み、いくつかの実施形態ではまた、上記の構成成分の組合せのいずれかを含む。

【０００７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１０種の小有機化合物は、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、４－ヒドロキシプロリン、アセテート、アセトン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトレート、シトルリン、クレアチン、クレアチニン、ホルメート、フルクトース、ガラクトース、グルタチオン、グリセロール、ヒポキサンチン、ラクテート、マロネート、オルニチン、ピルベート、スクシネート、タウリン、尿素および尿酸を含む。

【０００８】

いくつかの実施形態では、少なくとも９種のタンパク質構成性アミノ酸は、グリシン、Ｌ－アラニン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパルテート、Ｌ－システイン、Ｌ－グルタメート、Ｌ－グルタミン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－トレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリンおよびＬ－システインを含む。

【０００９】

いくつかの実施形態では、１種または複数種のビタミンは、以下のビタミン：Ｄ－ビオチン、コリン、葉酸、ミオ－イノシトール、ナイアシンアミド、ｐ－アミノ安息香酸、Ｄ－パントテン酸、ビタミンＢ６、リボフラビン、チアミンおよびビタミンＢ１２のうち少なくとも８、９、１０または１１種を含む。

【００１０】

いくつかの実施形態では、１種または複数種の無機イオンは、以下のイオン：Na^{+}、K^{+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、NH_4^{+}、Cl^{-}、HCO_3^{-}、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}、NO_3^{-}のうち少なくとも８、９または１０種を含む。いくつかの実施形態では、培地中に存在する前記イオンの各々の濃度は、表１においてそのイオンについて列挙された濃度の約±５０％以内である。いくつかの実施形態では、培地中に存在する前記イオンの各々の濃度は、表１においてそのイオンについて列挙された濃度の約±２５％以内である。いくつかの実施形態では、培地中に存在する前記イオンの各々の濃度は、表１においてそのイオンについて列挙された濃度の約±１０％以内である。いくつかの実施形態では、培地中に存在する前記イオンの各々の濃度は、表１においてそのイオンについて列挙された濃度の約±０．１％以内である。いくつかの実施形態では、前記イオンの各々は、培地中に存在する。

【００１１】

いくつかの実施形態では、１種または複数種の無機塩は、$CaCl_2$、ＫＣｌ、$MgCl_2$、$MgSO_4$、ＮａＣｌ、$NaHCO_3$、Na_2HPO_4、$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$およびNH_4Clから選択される少なくとも６、７、８または９種の無機塩を含む。

【００１２】

いくつかの実施形態では、培地中に存在する表２中に列挙される構成成分の各々の濃度は、表２においてその構成成分について列挙される濃度の約±５０％以内である。いくつかの実施形態では、培地中に存在する表２に列挙される構成成分の各々の濃度は、表２においてその構成成分について列挙される濃度の約±２５％以内である。いくつかの実施形態では、培地中に存在する表２中に列挙される構成成分の各々の濃度は、表２においてその構成成分について列挙される濃度の約±１０％以内である。いくつかの実施形態では、培地中に存在する表２中に列挙される構成成分の各々の濃度は、表２においてその構成成分について列挙される濃度の約±０．１％以内である。いくつかの実施形態では、表２中

に列挙される構成成分の各々は、培地中に存在する。

【００１３】

いくつかの実施形態では、培養培地は、１種または複数種の抗生物質、ｐＨ指示薬または両方を含む。

【００１４】

いくつかの態様では、本明細書において記載される定義された構成成分の組合せのいずれかを含む培養培地が、本明細書において記載され、培養培地は、血清または血清代用品をさらに含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、約１％～約２０％の血清を含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、約１％～約５％の血清または約５％～約１０％血清または約１０％～約２０％の血清を含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、およそ約１０％の血清を含む。いくつかの実施形態では、血清は、ウシ胎仔血清である。いくつかの実施形態では、血清は、透析された血清である。いくつかの実施形態では、血清は、熱不活化血清である。

【００１５】

いくつかの態様では、培養培地の構成成分をまとめて含有する１つまたは複数の容器を含むキットが本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、キットは、培養培地の複数の相互に適合性である構成成分を各々が含有する少なくとも２つの容器を含む。いくつかの実施形態では、キットは、培養培地を調製するための指示、培養培地において細胞を培養するための指示または両方をさらに含む。

【００１６】

いくつかの態様では、本明細書において記載されるような培養培地を調製する方法であって、そのそれぞれの構成成分を組み合わせることを含む方法が本明細書において記載される。

【００１７】

いくつかの態様では、本明細書において記載される培養培地および１種または複数種の哺乳動物細胞を含む組成物が本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、血液細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、がん細胞を含む。

【００１８】

いくつかの態様では、本明細書において記載される培養培地または組成物は、試験薬剤を含む。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、化学療法剤である。

【００１９】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書において開示される培養培地を使用して細胞を培養する方法を提供する。例えば、１種または複数種の哺乳動物細胞を培養する方法であって、本明細書において記載される培養培地または組成物を提供することと、培養培地において１種または複数種の哺乳動物細胞を培養することとを含む方法が本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、１種または複数種の哺乳動物細胞は、ヒト細胞を含む。いくつかの実施形態では、１種または複数種の哺乳動物細胞は、血液細胞を含む。いくつかの実施形態では、１種または複数種の哺乳動物細胞は、がん細胞を含む。いくつかの実施形態では、方法は、培養培地に試験薬剤を添加することをさらに含む。

【００２０】

いくつかの態様では、哺乳動物細胞集団または細胞系を特徴付ける方法であって、（ａ）本明細書において記載される培養培地中で哺乳動物細胞集団または細胞系の１種または複数種の細胞を培養することと、（ｂ）培養培地で培養された細胞の表現型を検出すること、または培養培地で培養された細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることとを含む方法が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、方法は、（ｃ）第２の培養培地において同一集団または細胞系に由来する１種または複数種の細胞を培養することと、（ｄ）第２の培養培地において培養された細胞の表現型を検出すること、または第２の培養培地において培養された細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることと、

（ｅ）ステップ（ｂ）において検出された表現型を、第２の培養培地で培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する１種もしくは複数種の細胞の表現型と比較すること、またはアッセイの結果を、第２の培養培地において培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する１種もしくは複数種の細胞を用いて実施した同一アッセイの結果と比較することとをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第１の培養培地で培養された細胞から得た表現型またはアッセイの結果と、第２の培養培地において培養された細胞から得た表現型またはアッセイの結果の間の差を検出することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、細胞を、培養培地において細胞が培養される期間の一部またはすべての間、試験薬剤と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、試験薬剤の存在下で培養培地において培養された細胞の表現型を、試験薬剤の存在下で第２の培養培地において培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する細胞の表現型と比較すること、または試験薬剤の存在下で培養培地において培養された細胞を用いて実施したアッセイの結果を、試験薬剤の存在下で第２の培養培地において培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する細胞を用いて実施した同一アッセイの結果と比較することを含む。いくつかの実施形態では、第２の培養培地は、標準培養培地である。いくつかの実施形態では、アッセイは、生存率アッセイ、増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、オートファジーアッセイ、レポーターアッセイまたは細胞毒性アッセイである。

【００２１】

いくつかの態様では、試験薬剤を特徴付ける方法であって、（ａ）試験薬剤の存在下で、本明細書において記載される培養培地において１種または複数種の哺乳動物細胞を培養することと、（ｂ）細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることとを含む方法が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、方法は、（ｃ）試験薬剤の存在下で第２の培養培地において同一集団または細胞系に由来する１種または複数種の細胞を培養することと、（ｄ）第２の培養培地において培養した細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることとをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、アッセイの結果を、試験薬剤の存在下で第２の培養培地において培養されている同一集団または細胞系に由来する１種または複数種の細胞を用いて実施した同一アッセイの結果と比較することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、細胞を、試験薬剤と少なくとも約２４時間接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、第２の培養培地は、標準培養培地である。いくつかの実施形態では、方法は、試験薬剤の存在下で第１の培養培地において培養された細胞から得たアッセイの結果と、試験薬剤の存在下で第２の培養培地において培養された細胞から得たアッセイの結果の間の差を検出することを含む。いくつかの実施形態では、１種または複数種の細胞は、ヒト細胞を含む。いくつかの実施形態では、１種または複数種の細胞は、血液細胞を含む。いくつかの実施形態では、１種または複数種の細胞は、がん細胞を含む。いくつかの実施形態では、アッセイは、生存率アッセイ、増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、オートファジーアッセイ、レポーターアッセイまたは細胞毒性アッセイである。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、化学療法剤である。

【００２２】

いくつかの態様では、本開示は、物質、例えば、治療剤の有効性に影響を及ぼし得る代謝産物を同定する方法を提供する。

【００２３】

いくつかの態様では、本開示は、哺乳動物細胞において、ＵＭＰシンターゼ（ＵＭＰＳ）の活性をモジュレートする方法であって、細胞を、尿酸レベルをモジュレートする薬剤と接触させることを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、薬剤は、尿酸レベルを高め、それによって、ＵＭＰＳの活性を低減する。いくつかの実施形態では、薬剤は、尿酸レベルを低下させ、それによってＵＰＭＳの活性を増加させる。いくつかの実施形態では、哺乳動物被験体に尿酸調節剤を投与する。

【００２４】

いくつかの態様では、がんを処置することを必要とする被験体においてがんを処置する

方法であって、被験体に、（ａ）５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）または５－ＦＵプロドラッグの一方または両方、および（ｂ）尿酸低下剤を投与し、その結果、被験体が５－ＦＵおよび尿酸低下剤の両方に曝露される、例えば、その結果、５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグならびに尿酸低下剤が、活性および／または効果において重複することを含む方法が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤はウリカーゼである。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤は、尿酸排泄剤であり、必要に応じて、プロベネシド、ベンズブロマロンまたはスルフィンピラゾンである。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤は、アンプロジピン（ａｍｐｌｏｄｉｐｉｎｅ）、アトルバスタチン、フェノフィブラート、グアイフェネシンまたはレシヌラドである。いくつかの実施形態では、５－ＦＵプロドラッグは、テガフールまたはカペシタビンである。いくつかの実施形態では、方法は、５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグを、尿酸低下剤が投与されている被験体に投与することを含む。

【００２５】

特許または出願ファイルはカラーで作成される少なくとも１つの図面を含有する。カラー図面付きの本特許または特許出願公開のコピーは、請求し必要な料金を支払えば役所（ｔｈｅ　Ｏｆｆｉｃｅ）から提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１－１】図１Ａは、成人ヒト血漿中の指示成分と比べてＢＭＥ、ＭＥＭ、ＤＭＥＭ、およびＲＰＭＩ　１６４０の指示成分の相対濃度のヒートマップを描いている（$\log_2$変換倍数変化）。培地中に存在しない成分は非存在として示される。種々の従来の培地中のすべての代謝産物の濃度については表４を参照されたい。図１Ｂは、培養およびｉｎ　ｖｉｖｏの細胞が曝露される異なる代謝環境を描く概略図である。図１Ｃは、ヒト血漿様培地（ＨＰＬＭ）の成分を描いている。緑色の箱形で描かれている成分の濃度は成人ヒト血漿中の成分の濃度を反映している。ＨＰＬＭの詳細な調合は表２に示されている。図１Ｄは、ヒト血漿中の指示成分と比べて表示されている培地およびマウス血漿中の指示成分の相対濃度のヒートマップを描いている（$\log_2$変換倍数変化）。Ｎ／Ｄ、倍数変化値は決定できなかった。ＲＰＭＩ$^{+ＩＦＳ}$：５ｍＭのグルコースおよび１０％のＩＦＳを有するＲＰＭＩ　１６４０。ＲＰＭＩ$^{+ｄＩＦＳ}$：５ｍＭのグルコースおよび１０％の透析ＩＦＳを有するＲＰＭＩ　１６４０。ＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$：１０％の透析ＩＦＳを含有するＨＰＬＭ。＊以下の代謝産物：アセテート、アセトン、システイン、ホルメート、ガラクトース、グルタチオン、およびマロネートは使用した代謝産物プロファイリング法では培地試料中で容易に検出されなかった。図１Ｅは、ＲＰＭＩ$^{+ＩＦＳ}$（濃い灰色）、ＲＰＭＩ$^{+ｄＩＦＳ}$（薄い灰色）、またはＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$（緑色）で培養された６種の血液がん細胞系の比成長速度を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）（左）。比成長速度（μ）は自然ｌｏｇ変換成長曲線を使用して計算した（右）。細胞系は以下の血液がん；Ｋ５６２（慢性骨髄性白血病）、ＫＭＳ１２ＢＭ（多発性骨髄腫）、ＮＯＭＯ１（急性骨髄性白血病）、Ｐ１２－Ｉｃｈｉｋａｗａ（Ｔ細胞性急性リンパ芽球性白血病）、ＳＥＭ（Ｂ細胞性急性リンパ芽球性白血病）、ＳＵＤＨＬ４（Ｂ細胞リンパ腫）を表す。

【図１－２】同上。

【図１－３】同上。

【００２７】

【図２－１】図２Ａは、ＲＰＭＩ$^{+ＩＦＳ}$（上の６列）での培養またはＲＰＭＩ$^{+ｄＩＦＳ}$（下の６列）での培養と比べたＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$での培養に続く相対的細胞内代謝産物濃度のヒートマップを描いている。それぞれの群内では、代謝産物は上の６列の平均$\log_2$変換倍数変化により分類される（ｎ＝３）。Ｎ／Ｄ、代謝産物は培地の１つまたは複数での培養に続いて容易に検出されなかったために、倍数変化値は決定できなかった。ヒートマップに含まれるためには、代謝産物は６つの細胞系のうちの少なくとも４つで倍数変化が測定されなければならなかった。代謝産物略字については表６を参照されたい。図２Ｂは、ＲＰＭＩ$^{+ＩＦＳ}$（青色）での培養またはＲＰＭＩ$^{+ｄＩＦＳ}$（赤色）での培養と比

べた、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養に続く表示された方程式により計算された場合のエネルギー充足値を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。図２Ｃは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（青色）での培養またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（赤色）での培養と比べた、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養に続く細胞内ＧＳＨ／ＧＳＳＧ比を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３、＊ｐ＜０．０５）。図２Ｄは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（青色）での培養またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（赤色）での培養と比べた、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養に続く細胞内ラクテート／ピルベート比を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３、＊ｐ＜０．０５）。

【図２－２】同上。

【００２８】

【図３－１】図３Ａは、解糖系から分岐する経路へのおよびピルベートへのグルコース由来の^{13}Ｃの取り込み、ならびにＴＣＡサイクルへの取り込みを含む、ピルベートおよびアセチル－ＣｏＡからのグルコース由来炭素の種々の運命を描いている概略図である。Ｇ１Ｐ：グルコース１－ホスフェート。Ｇ６Ｐ：グルコース６－ホスフェート。Ｆ６Ｐ：フルクトース６－ホスフェート。ＤＨＡＰ：ジヒドロキシアセトンホスフェート。ＧＰＣ：グリセロホスホコリン。ＰＤＨ：ピルビン酸デヒドロゲナーゼ。ＬＤＨ：乳酸デヒドロゲナーゼ。ＧＰＴ：アラニンアミノトランスフェラーゼ。図３Ｂは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（濃い灰色）またはＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）での細胞の培養に続く３つの^{13}Ｃ（Ｍ３）で標識されたピルベートの割合を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）（左）。ＬＣ／ＭＳベースの代謝産物プロファイリングにより測定したＲＰＭＩ$^{+IFS}$およびＨＰＬＭ$^{+dIFS}$におけるピルベートの濃度（ｎ＝４）（右）。図３Ｃは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（濃い灰色）またはＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）での細胞の培養に続く２つの^{13}Ｃ（Ｍ２）で標識されたシトレートの割合を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３；＊ｐ＜０．０００１）。図３Ｄは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（濃い灰色）またはＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）での細胞の培養に続く６つの^{13}Ｃ（Ｍ６）で標識されたＦ６Ｐ／Ｇ１Ｐの割合を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３；＊ｐ＜０．０００１）。図３Ｅは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（濃い灰色）またはＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）での細胞の培養に続く３つの^{13}Ｃ（Ｍ３）で標識されたアラニンの割合を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３；＊ｐ＜０．０００１）。図３Ｆは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（濃い灰色）またはＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）での細胞の培養に続く３つの^{13}Ｃ（Ｍ３）で標識されたＧＰＣの割合を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３；＊ｐ＜０．０００１）。

【図３－２】同上。

【図３－３】同上。

【００２９】

【図４－１】以下の図は、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（青色）またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（赤色）での培養と比べた、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養に続くカルバモイルアスパルテート（図４Ａ）、ジヒドロオロテート（図４Ｂ）、オロテート（図４Ｃ）、およびオロチジン（図４Ｄ）の相対的細胞内存在量を示している（平均±ＳＤ、ｎ＝３；すべてのバーについてｐ＜０．０００１）。図４Ｅは、デノボピリミジン合成経路を描く概略図である。ＮＴ：ヌクレオチダーゼ。ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（青色）またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（赤色）での培養と比べた、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での細胞の培養に続くＣＴＰ（図４Ｆ）およびＵＴＰ（図４Ｇ）の相対的細胞内存在量（平均±ＳＤ、ｎ＝３；＊ｐ＜０．０５）。

【図４－２】同上。

【図４－３】同上。

【００３０】

【図５－１】図５Ａは、最小ＨＰＬＭの組成（上）および指示されたドロップアウト調合物を生成するためにＨＰＬＭ$^{+dIFS}$から除去される成分のリスト（下）を描いている。図５Ｂは、完全ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養と比べてそれぞれのＨＰＬＭ$^{+dIFS}$誘導体または最小ＨＰＬＭ（ＭＨ）での細胞の培養に続くオロテート（上）およびオロチジン（下）の相対的細胞内存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$誘導体の数指定はパネルＡでの数指定に一致する。図５Ｃは、ＬＣ／ＭＳベースの代謝産物プロファイリングにより測定した場合のＲＰＭＩ$^{+IFS}$およびＨＰＬＭ$^{+dIFS}$における

尿酸の濃度を描いている（ｎ＝４）。尿酸は使用した代謝産物プロファイリング法ではＲＰＭＩ＋ｄＩＦＳにおいて容易に検出できなかった。したがって、ＲＰＭＩ＋ｄＩＦＳについての指示された濃度は、培地試料における最小検出の濃度におおよそ一致している。図５Ｄは、ＲＰＭＩ＋ＩＦＳ、ＲＰＭＩ＋ｄＩＦＳ、またはＨＰＬＭ＋ｄＩＦＳでの細胞の培養に続く尿酸の細胞内濃度を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。図５Ｅは、標準ＨＰＬＭ＋ｄＩＦＳでの細胞の培養と比べた、漸増濃度の尿酸を含有するＨＰＬＭ＋ｄＩＦＳでのＫ５６２細胞の培養に続くオロテートおよびオロチジンの相対的細胞内存在量を描いており（平均±ＳＤ、ｎ＝３）、標準ＨＰＬＭ＋ｄＩＦＳは３５０μＭの尿酸を含有する。図５Ｆは、ＲＰＭＩ＋ＩＦＳでの細胞の培養と比べた、３５０μＭの尿酸を補充されたＲＰＭＩ＋ＩＦＳでの細胞の培養に続くオロテート、オロチジン（左）（平均±ＳＤ、ｎ＝３；すべてのバーについてｐ＜０．０００１）、およびＵＴＰ（平均±ＳＤ、ｎ＝３；＊ｐ＜０．０５）（右）の相対的細胞内存在量を描いている。図５Ｇは、尿酸を欠くＨＰＬＭ＋ｄＩＦＳでの細胞の培養と比べた、３５０μＭの尿酸（緑色）または３５０μＭの尿酸９－メチル尿酸（ｍｅｔｈｙｌｕｒｉｃ　ａｃｉｄ）（９－ＭＵＡ）（白色）を含有するＨＰＬＭ＋ｄＩＦＳでのＫ５６２細胞の培養に続くカルバモイルアスパルテート、ジヒドロオロテート、オロテート、およびオロチジンの相対的細胞内存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。図５Ｈは、尿酸の血漿濃度に影響を及ぼす経路を描いている概略図である；１：糸球体濾過（７０％）、２：分泌（１０％）、３：再吸収（９０％）、４：排泄（３０％）（ＢｏｂｕｌｅｓｃｕおよびＭｏｅ、２０１２年）。大半の哺乳動物とは対照的に、ヒトおよび多くの高等霊長類はウリカーゼ（ＵＯＸ）活性を欠き、この活性は尿酸をアラントインに変換する（左）。ＬＣ／ＭＳ代謝産物プロファイリングにより測定した場合のマウス血漿における尿酸およびアラントインの濃度（ｎ＝４）。ヒトメタボロームデータベースでの注釈付きの値から計算したヒト血漿中の尿酸の平均濃度。他の場所（Ｋａｎｄａｒおよびｚａｋｏｖａ、２００８年）で報告されたヒト血漿中のアラントインの濃度（右）。

【図５－２】同上。

【図５－３】同上。

【図５－４】同上。

【００３１】

【図６－１】図６Ａは、二機能性ＵＭＰシンターゼ（ＵＭＰＳ）のそれぞれのドメインが触媒する反応を描いている概略図である。ＯＰＲＴ：オロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ。ＯＤＣ：ＯＭＰデカルボキシラーゼ。図６Ｂは、アロプリノールリボヌクレオチド（上）および６－アザ－ＵＭＰ（下）によるＵＭＰＳのＯＤＣドメインの競合阻害を描いている概略図である。ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）はアロプリノールのそのリボヌクレオチド誘導体への変換を触媒し、ウリジン－シチジンキナーゼ（ＵＣＫ）は６－アザウリジンの６－アザ－ＵＭＰへの変換を触媒する。図６Ｃは、指示された濃度での組換えＵＭＰＳ（ＷＴまたはＹ３７Ａ、Ｒ１５５Ａ変異体）とその基質オロテートおよびＰＲＰＰのインキュベーションに続くＯＭＰ（左）およびＵＭＰ（右）の定量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。ＷＴ：野生型。図６Ｄは、ＵＭＰＳ活性アッセイへの漸増濃度の６－アザ－ＵＭＰまたはビヒクルの添加に続くＯＭＰ（左）およびＵＭＰ（中央）の相対的存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。図６Ｅは、ＵＭＰＳ活性アッセイへの漸増濃度の尿酸またはビヒクルの添加に続くＯＭＰ（左）およびＵＭＰ（中央）の相対的存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。尿酸によるＵＭＰＳのＯＤＣドメインの競合阻害を描いている概略図（右）。図６Ｆは、ＵＭＰＳ活性アッセイへの９－メチル尿酸、アラントイン、アロプリノール、６－アザウリジン、尿酸、またはビヒクルの添加に続くＯＭＰ（左）およびＵＭＰ（右）の相対的存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。

【図６－２】同上。

【００３２】

【図７－１】図７Ａは、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）の代謝を描いている概略図である（上）。５－ＦＵはその細胞傷害性効果を媒介する種々のフルオロヌクレオチド誘導

体に変換される。フルオロウリジントリホスフェート（ＦＵＴＰ）およびフルオロデオキシウリジントリホスフェートは、それぞれＲＮＡおよびＤＮＡ内への誤取り込みにより細胞死をもたらす。フルオロデオキシウリジンモノホスフェート（ＦｄＵＭＰ）は、チミジル酸シンターゼ（ＴＹＭＳ）の阻害により細胞死をもたらす（Ｌｏｎｇｌｅｙら、２００３年）。描かれている酵素は、ウリジンホスホリラーゼ（ＵＰＰ）、ウリジン－シチジンキナーゼ（ＵＣＫ）、チミジンホスホリラーゼ（ＴＹＭＰ）、チミジンキナーゼ（ＴＫ）、およびリボヌクレオチドレダクターゼ（ＲＲＭ）である。指示されている他の代謝産物は、フルオロウリジン（ＦＵＲ）、フルオロウリジンモノホスフェート（ＦＵＭＰ）、フルオロウリジンジホスフェート（ＦＵＤＰ）、フルオロデオキシウリジン（ＦＵＤＲ）、およびフルオロデオキシウリジンジホスフェート（ＦｄＵＤＲ）である。ＵＭＰＳのＯＰＲＴドメインはＦＵＭＰへの５－ＦＵの直接変換を触媒する（下）。図７Ｂは、ＵＭＰＳのＯＰＲＴドメインがＯＭＰへのオロテートのおよびＦＵＭＰへの５－ＦＵの変換を触媒することを示す概略図である。ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（濃い灰色）、ＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（薄い灰色）、またはＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）で培養された場合の、５－ＦＵ（図７Ｃ）またはドキソルビシン（図７Ｄ）に対するＮＯＭＯ１細胞の用量応答（平均±ＳＤ、ｎ＝９）。データポイントは、それぞれが３つの技術的複製物からなる３つの独立した生物学実験の平均である（左プロット）。ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（濃い灰色）、ＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（薄い灰色）、またはＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）で培養された場合の、ＮＯＭＯ１細胞における５－ＦＵ（図７Ｃ）またはドキソルビシン（図７Ｄ）のＥＣ$_{50}$。水平バーは、３つの独立した生物学実験の平均を示している；＊ｐ＜０．００１；ｎｓ：有意でない（右プロット）。ＨＰＬＭ$^{+IFS}$（緑色）または尿酸を欠くＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（青色）で培養された場合の、５－ＦＵ（図７Ｅ）またはドキソルビシン（図７Ｆ）に対するＮＯＭＯ１細胞の用量応答（平均±ＳＤ、ｎ＝９）。データポイントは、それぞれが３つの技術的複製物からなる３つの独立した生物学実験の平均である（左プロット）。ＨＰＬＭ$^{+IFS}$（緑色）または尿酸を欠くＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（青色）で培養された場合の、ＮＯＭＯ１細胞における５－ＦＵまたはドキソルビシンのＥＣ$_{50}$。水平バーは、３つの独立した生物学実験の平均を示している；＊ｐ＜０．００１；ｎｓ：有意でない（右プロット）。図７Ｇは、２０μＭの５－ＦＵで処置され、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）または尿酸を欠くＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（青色）で２４時間培養されたＮＯＭＯ１細胞における５－ＦＵ（左）、ＦｄＵＭＰ（中央）、およびＦＵＭＰ（右）の細胞内存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。ＮＤ：検出されず。図７Ｈは、５－ＦＵにより引き起こされる細胞傷害性の尿酸媒介拮抗作用の提唱される機序を描いている。いかなる理論にも縛られたくはないが、ＵＭＰＳのＯＰＲＴドメインまたはＵＰＰおよびＵＣＫの連続作用は５－ＦＵをＦＵＭＰに変換することができるので、５－ＦＵ感受性に対する尿酸の影響はおそらく所与の細胞型がＯＰＲＴ媒介合成を介してＦＵＭＰを生み出す程度に依存している。

【図７－２】同上。

【図７－３】同上。

【図７－４】同上。

【００３３】

【図８】ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（図８Ａ）、ＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（図８Ｂ）、およびＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（図８Ｃ）で培養される細胞についてのグルコースの正味の消費速度（ｑ、グルコース）対ラクテートの正味の分泌速度（ｑ、ラクテート）（両軸について平均±ＳＥＭ、ｎ＝３）。正味の交換速度を計算するのに使用した方程式については実施例の部の方法を参照されたい。ポイントはＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍにプロットし、線形回帰式を使用して適合させた。

【００３４】

【図９】ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（青色）またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（赤色）での細胞の培養と比べた、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での細胞の培養に続くＡＴＰ（図９Ａ）およびＧＴＰ（図９Ｂ）の相対的細胞内存在量（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。

【００３５】

【図１０】図１０Ａは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（青色）またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（赤色）での細胞の培養と比べた、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での細胞の培養中のオロテートの相対的正味の分泌速度を描いている（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３；すべてのバーについてｐ＜０．０５）。正味の交換速度を計算するのに使用した方程式については実施例の部の方法を参照されたい。図１０Ｂは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（濃い灰色）、ＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（薄い灰色）、またはＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）での細胞の培養中のオロチジン（ｑ）の正味の分泌速度を描いている（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３；＊ｐ＜０．０５）。ＫＭＳ１２ＢＭ以外の指示された細胞系では、オロチジンの正味の分泌は、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$での細胞の培養中１つまたは複数の生物学的複製物では容易に検出されなかった。正味の交換速度を計算するのに使用した方程式については実施例の部の方法を参照されたい。

【００３６】

【図１１－１】図１１Ａは、尿酸を欠くＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での細胞の培養と比べた、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（緑色）でのまたは尿酸を欠き漸増濃度のアロプリノールを含有するＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（オレンジ色）でのＫ５６２細胞の培養に続くカルバモイルアスパルテート、ジヒドロオロテート、オロテート、およびオロチジンの相対的細胞内存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。図１１Ｂは、漸増濃度の尿酸を含有するＨＰＬＭ$^{+dIFS}$でのまたは尿酸を欠き漸増濃度のアロプリノールを含有するＨＰＬＭ$^{+dIFS}$でのＫ５６２細胞の培養に続くＯＭＰの細胞内存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。図１１Ｃは、標準ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（３５０μＭの尿酸を含有している）での細胞の培養と比べた、７００μＭ尿酸を含有するＨＰＬＭ$^{+dIFS}$でのまたは尿酸を欠き漸増濃度のアロプリノールを含有するＨＰＬＭ$^{+dIFS}$でのＫ５６２細胞の培養に続くＵＴＰの相対的細胞内存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３）。図１１Ｄは、尿酸を欠き漸増濃度のアロプリノールを含有するＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養に続く代表的Ｋ５６２試料から指示された保持時間の間の３４７．０３９８の質量／電荷数比（ｍ／ｚ）でピークを示している抽出イオンクロマトグラム（負イオン化モード）を描いている。ピークは、ＩＭＰ（黒色略図）および推定アロプリノールリボヌクレオチド（赤色略図）に一致している（上）。アロプリノールリボヌクレオチド（赤色ボックス）およびＩＭＰ（黒色ボックス）についての化学構造、これらは同一のｍ／ｚを共有するが、保持時間が異なる（下）。

【図１１－２】同上。

【００３７】

【図１２】図１２Ａは、ＯＭＰとの複合体におけるヒトＵＭＰＳのＯＰＲＴドメインの活性部位を描いており（黄色）（タンパク質データバンクエントリー２ＷＮＳ、鎖ＡおよびＢ）；表示されている残基は他の場所（Ｚｈａｎｇら、２０１３年）で報告されている活性部位を含む。操作されたＵＭＰＳバリアントでは残基はアラニンに変異されている（太字）。図１２Ｂは、１：Ｍ．Ｗ．標準；２：野生型ＵＭＰＳ－３ｘＦＬＡＧ；３：ＵＭＰＳ（Ｙ３７Ａ、Ｒ１５５Ａ）－３ｘＦＬＡＧを描いている。

【００３８】

【図１３】図１３Ａは、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$（青色）またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$（赤色）での細胞の培養と比べた、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$でのＳＷ６２０細胞の培養に続くオロテートの相対的細胞内存在量を描いている（平均±ＳＤ、ｎ＝３；両方のバーについてｐ＜０．０００１）。ＨＰＬＭ$^{+IFS}$（緑色）または尿酸を欠くＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（青色）で培養された場合の５－ＦＵ（図１３Ｂ）またはドキソルビシン（図１３Ｃ）に対するＳＷ６２０細胞の用量応答（平均±ＳＤ、ｎ＝９）。データポイントは、それぞれが３つの技術的複製物からなる３つの独立した生物学実験の平均である（左）。ＨＰＬＭ$^{+IFS}$（緑色）または尿酸を欠くＨＰＬＭ$^{+dIFS}$（青色）で培養された場合の、ＳＷ６２０細胞における５－ＦＵまたはドキソルビシンのＥＣ$_{50}$。水平バーは、３つの独立した生物学実験の平均を示している；＊ｐ＜０．００５；ｎｓ：有意でない（右プロット）。

【発明を実施するための形態】

【００３９】

Ⅰ．培養培地調合物

いくつかの態様では、本開示は、広く使用される哺乳動物細胞培養培地の組成が身体の外側の哺乳動物細胞の生存および増殖のために必要な栄養分を提供するように設計されながら、ｉｎ　ｖｉｖｏでの栄養状態を不十分にしか反映しないという認識に関する。いくつかの態様では、本開示は、哺乳動物細胞表現型に対しておよびアッセイにおける哺乳動物細胞の挙動に対して重大な効果を有する、ヒト血液において見出される特定の代謝産物の培養培地中の存在に関する。例えば、培養培地中のこのような代謝産物の存在は、公知または潜在的な治療剤などの外因性物質に対する細胞の応答を有意に変更し得る。

【００４０】

いくつかの態様では、本開示は、培養におけるヒト細胞の生存および増殖を支持し、細胞がｉｎ　ｖｉｖｏで曝露される条件を、従来の培養培地よりも密接に反映する環境を提供する細胞培養培地を提供する。本明細書において記載される培養培地は、ヒト血液中に通常存在する種々の代謝産物を含む。このような代謝産物はまた、血液の液体部分（血漿）および血液を凝固させた後に残存する血液の液体部分（血清）中にも存在する。いくつかの実施形態では、代謝産物の濃度は、血漿および血清において同一またはおよそ同一であり得る。いくつかの実施形態では、１種または複数種の代謝産物の濃度は、血漿と血清との間で異なる場合もある。いくつかの実施形態では、血液、血漿および血清中の代謝産物の濃度は、等価と考えられ、交換可能に使用される。「代謝産物」とは、本明細書で使用される場合、代謝の中間体および産物を指す。いくつかの実施形態では、培養培地は、従来の培養培地では見出されない１種または複数種の代謝産物を含む。「従来の培養培地」とは、少なくとも、市販されている細胞培養培地を含む、細胞培養において広く使用される、または広く使用されている培養培地を指す。従来の培養培地の例としては、例えば、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）（Ｅａｇｌｅ、１９５５年ｃ）、最小必須培地（ＭＥＭ）（Ｅａｇｌｅ、１９５９年）、ダルベッコの改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、イスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）、ロズウェルパーク記念研究所（ＲＰＭＩ）１６４０、ハム栄養混合物（例えば、Ｆ１０、Ｆ１２）、培地１９９、マッコイ５ａおよびそれらの混合物、例えば、ＤＭＥＭ／Ｆ１０、ＤＭＥＭ／Ｆ１２が挙げられる。例えば、Ｆｒｅｓｈｎｅｙ、２０１０年を参照のこと。このような培養培地は、通常、成長因子およびホルモンなどのさらなる支持物質（ｓｕｐｐｏｒｔｉｖｅ　ｓｕｂｓｔａｎｃｅ）を提供するように動物血清が補給される。当業者ならば、同様に従来のものと考えられる、当技術分野で公知のこのような従来の培養培地のいくつかの変形形態があることは理解する。例えば、従来の培養培地はまた、通常の調合物と比較して、Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＲＰＭＩおよびＡｄｖａｎｃｅｄ　ＤＭＥＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）などの、血清補給が低減された（例えば、約５０％～９０％低減された）、哺乳動物細胞の培養を可能にする上記の培地のいずれかの改変版も含む。従来の培養培地の混合物は、約１０％～約９０％の第１の培地を含み、残部は、第２の培地から構成され得る。いくつかの実施形態では、混合物は、約５０：５０混合物である。

【００４１】

本明細書において記載される細胞培養培地は、水性ベースである、すなわち、培地は、水、例えば、脱イオン水、蒸留水中にいくつかの成分を含む。ある特定の実施形態では、培地は、乾燥粉末および／または凍結された構成成分から再構成され得る。

【００４２】

用語「成分」とは、化学的または生物学的起源に関わらず、細胞の生存もしくは増殖を維持または促進するために細胞培養培地において使用され得る、あるいは存在する量で細胞の生存および典型的には、増殖と少なくとも相反しない任意の化合物を指す。用語「構成成分」および「成分」は、交換可能に使用され、すべてこのような化合物を指すものとする。本開示が、特定の成分または成分の群を記載する場合には、このような成分または成分の群は、ある特定の実施形態では、特に断りのない限り、または文脈から明確に明らかでない限り、本明細書において記載される任意のその他の成分または成分の組合せと一緒に培地中に存在し得ると理解されるべきである。

【００４３】

「細胞培養」または「培養」とは、人工の、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ環境における細胞の維持を意味する。しかし、用語「細胞培養」は、一般的な用語であり、個々の細胞の培養だけでなく、組織、オルガノイド、臓器または臓器系の培養も包含するように使用され得るということは理解されるべきであり、それらに対して、用語「組織培養」、「オルガノイド培養」、「臓器培養」、「臓器系培養」または「器官型培養」も使用され得る。

【００４４】

いくつかの態様では、（ａ）少なくとも９種のタンパク質構成性アミノ酸と、（ｂ）１種または複数種のビタミンと、（ｃ）１種または複数種の無機塩と、（ｄ）グルコースと、（ｅ）４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチン、タウリン、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベート、スクシネート、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロール、尿素、ガラクトース、フルクトース、ヒポキサンチンおよび尿酸から選択される少なくとも１０種の小有機化合物とを含む基礎培養培地が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、培養培地は、上記の群から選択される少なくとも５種の小有機化合物を含む。

【００４５】

本明細書で使用される場合、用語「基礎培養培地」または「基礎培地」とは、タンパク質構成性アミノ酸と、糖（複数可）（概して、グルコース）、水溶性ビタミンおよびイオンを含有するが、成長因子およびホルモンを欠き、概して、種々様々な哺乳動物細胞の生存率および増殖を支持する完全培養培地を生成するために、血清またはこのような支持物質のその他の供給源を補給した細胞培養培地を指す。本開示が単数または複数の培養培地を指す場合には、特に断りのない限り、または文脈から明確に明らかでない限り、単数または複数の培養培地は、基礎培養培地であり得るということは理解されるべきである。

【００４６】

培養培地は、タンパク質合成前駆体として働き得るアミノ酸（「タンパク質構成性アミノ酸」）を含む。特に断りのない限り、Ｌ－またはＤ－アミノ酸として存在し得る本明細書において言及されるアミノ酸は、Ｌ－アミノ酸であると理解される。ある特定の実施形態では、培養培地中に含まれ得るタンパク質構成性アミノ酸としては、Ｌ－アラニン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパラギン酸、Ｌ－システイン、Ｌ－グルタミン酸、Ｌ－グルタミン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－トレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシンおよびＬ－バリンが挙げられる。いくつかの実施形態では、これらのアミノ酸のすべては、培養培地中に存在する。いくつかの実施形態では、これらのアミノ酸のすべておよびシスチンは、培養培地中に存在する。あるいは、いくつかの実施形態では、必須アミノ酸のみが培養培地中に含まれる。ヒト細胞などのある特定の哺乳動物細胞は、生存するために適切な量の９種のアミノ酸を有さなくてはならない。これらのいわゆる「必須」アミノ酸は、これらの細胞がその他の前駆体から合成することができない。しかし、システインは、メチオニンに対する必要性を部分的に満たし得（それらは両方とも硫黄を含有する）、チロシンは、フェニルアラニンの代用と部分的になり得る。このような必須アミノ酸としては、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン（および／またはシステイン）、フェニルアラニン（および／またはチロシン）、トレオニン、トリプトファンおよびバリンが挙げられる。いくつかの実施形態では、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン（および／またはシステイン）、フェニルアラニン（および／またはチロシン）、トレオニン、トリプトファンおよびバリンならびに１種または複数種のさらなるタンパク質構成性アミノ酸（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１種）の非必須タンパク質構成性アミノ酸）が培養培地中に存在する。いくつかの実施形態では、培地は、少なくとも必須アミノ酸に加えてシスチンを含む。シスチンは、システインの酸化された二量体形態であり、式（$SCH_2CH(NH_2)CO_2H)_2$を有する。シスチンは、システインに

容易に還元されることができ、本開示の目的上、タンパク質構成性アミノ酸と考えられる。

【００４７】

ある特定の実施形態では、１種または複数種のアミノ酸は、少なくとも部分的にペプチド（例えば、ジペプチドまたはトリペプチド）として提供され得る。例えば、いくつかの実施形態では、グルタミンは、少なくとも部分的にＬ－アラニル－Ｌ－グルタミン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによって$GlutaMAX$（商標）－Ｉとして販売される）として提供され得る。ある特定の実施形態では、本開示の培養培地は、構成成分としてジペプチドまたはトリペプチドを含有しない。

【００４８】

ある特定の実施形態では、培養培地は、ビオチン（例えば、Ｄ－ビオチン）、コリン、葉酸、ミオ－イノシトール、ナイアシンアミド、ｐ－アミノ安息香酸、Ｄ－パントテン酸、ビタミンＢ６、リボフラビン、チアミンおよびビタミンＢ１２から選択される１種または複数種のビタミンを含む。ある特定の実施形態では、培養培地は、前記ビタミンのうち少なくとも６、７、８、９、１０種または１１種すべてを含む。ある特定の実施形態では、培養培地は、少なくともコリン、葉酸、ミオ－イノシトール、ナイアシンアミド（ｎｉａｃｉｎａｍｄｅ）、ビタミンＢ６、リボフラビンおよびチアミンを含む。ある特定の実施形態では、培養培地は、ビオチン（例えば、Ｄ－ビオチン）、コリン、葉酸、ミオ－イノシトール、ナイアシンアミド、ｐ－アミノ安息香酸、Ｄ－パントテン酸、ピリドキシン、ピリドキサール　リボフラビン、チアミンおよびビタミンＢ１２を含む。

【００４９】

ビタミンＢ６とは、生物システムにおいて相互変換され得る化学的に同様の化合物の群を指す。これらは、ピリドキシン（ＰＮ）、ピリドキシン５’－ホスフェート（ＰＮＰ）、ピリドキサール（ＰＬ）、ピリドキサール５’－ホスフェート（ＰＬＰ）、ピリドキサミン（ＰＭ）およびピリドキサミン５’－ホスフェート（ＰＭＰ）を含む。ある特定の実施形態では、培養培地中のビタミンＢ６は、これらの化合物のいずれかまたはその組合せであり得る。例えば、ある特定の実施形態では、ビタミンＢ６は、ピリドキシンである。ある特定の実施形態では、ビタミンＢ６は、ピリドキサールである。ある特定の実施形態では、培地は、ピリドキシンおよびピリドキサールの両方を含有する。ビタミンＢ１２とは、コリン環と呼ばれる平面テトラピロール環の中心に位置するコバルトを含有する化学的に同様の化合物のクラスを指す。これらは、シアノコバラミン、ヒドロキソコバラミン、メチルコバラミンおよびアデノシルコバラミンを含む。ビタミンＢ１２は、これらの化合物のいずれかまたはその混合物として提供され得る。

【００５０】

培養培地は、種々の無機イオンまたは有機イオンのいずれかを含み得る。いくつかの実施形態では、培養培地は、以下のイオン：Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、NH_4^+、Cl^-、HCO_3^-、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}、NO_3^-のうち少なくとも７種（すなわち、７、８、９種または１０種すべて）を含む。イオンは、塩の形態で供給され得る。成分として使用され得る例示的な塩は、本明細書において記載されている。いくつかの実施形態では、１種または複数種のイオンは、少なくとも一部は、対イオンが無機イオンである塩として供給される。例えば、いくつかの実施形態では、Mg^{2+}のすべては、$MgCl_2$および$MgSO_4$として供給される。いくつかの実施形態では、１種または複数種のイオンは、少なくとも一部は、対イオンが小有機分子である塩として供給される。例えば、いくつかの実施形態では、Na^+イオンの一部は、無機ナトリウム塩（例えば、ＮａＣｌ）として供給され、Na^+イオンの一部は、酢酸ナトリウムとして供給される。

【００５１】

ある特定の実施形態では、培養培地の構成成分は、上記のイオン（すなわち、Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、NH_4^+、Cl^-、HCO_3^-、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}、NO_3^-）のうちいずれか１種または複数種の、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の０．３から３倍の間、例えば、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度の約０．５～約２倍、例えば、表１においてこ

のようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．６７～約１．５倍、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±３０％以内、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２０％以内、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１０％以内、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の±約５％以内、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２％以内または表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１％以内である濃度を提供するように選択される。ある特定の実施形態では、培養培地の構成成分は、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙されるとおりである、培地中に存在する前記イオンのうちいずれか１種または複数種の濃度を提供するように選択される。

【００５２】

ある特定の実施形態では、培養培地の構成成分は、培地中に存在する前記イオンの各々の、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．３～約３倍、例えば、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度の約０．５～約２倍、例えば、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．６７～約１．５倍、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±３０％以内、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２０％以内、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１０％以内、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±５％以内、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２％以内または表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１％以内である濃度を提供するように選択される。ある特定の実施形態では、培養培地の構成成分は、表１においてこのようなイオン（複数可）について列挙されるとおりである、培地中に存在する前記イオンの各々の濃度を提供するように選択される。

【表１】

表1:塩イオンおよびイオン濃度(単位:マイクロモル濃度)

イオン	濃度
Na^+	132271
K^+	4142
Ca^{2+}	2390
Mg^{2+}	830
NH_4^+	40
Cl-	116196
HCO_3^-	24000
PO_4^{3-}	966
SO_4^{2-}	350
NO_3^-	80

【００５３】

無機イオンを提供するために培養培地中に含まれ得る無機塩成分としては、それだけには限らないが、カルシウム塩（例えば、ＣａＣｌ$_2$、Ｃａ（ＮＯ$_3$）$_2$・４Ｈ$_2$Ｏ）、カリウム塩（例えば、ＫＣｌ、Ｋ$_2$ＳＯ$_4$）、マグネシウム塩（例えば、ＭｇＣｌ$_2$、ＭｇＳＯ$_4$）、ナトリウム塩（例えば、ＮａＣｌ、ＮａＨＣＯ$_3$、Ｎａ$_2$ＨＰＯ$_4$、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$）、アンモニウム塩（例えば、ＮＨ$_4$Ｃｌ、ＮＨ$_4$ＨＣＯ$_3$、（ＮＨ$_4$）$_2$ＳＯ$_4$）が挙げられる。いくつかの実施形態では、培養培地は、少なくとも１種のカルシウム塩、少なくと

も１種のカリウム塩、少なくとも１種のマグネシウム塩、少なくとも１種のナトリウム塩および少なくとも１種のアンモニウム塩を含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、$CaCl_2$、KCl、$MgCl_2$、$MgSO_4$、NaCl、$NaHCO_3$、Na_2HPO_4、$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$およびNH_4Clから選択される少なくとも６種、少なくとも７種、少なくとも８種または９種の塩を含む。

【００５４】

いくつかの実施形態では、培養培地は、１または複数の、表２中に列挙される小極性化合物を含む。このような化合物は、「極性代謝産物」または「小極性代謝産物」と呼ばれることもある。例えば、いくつかの実施形態では、培養培地は、少なくとも５種、例えば、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６または２７種の、表２中に列挙される小極性化合物を含む。培養培地中に存在し得る小極性化合物は、種々の非タンパク質構成性アミノ酸、アミノ酸誘導体、水溶性酸、糖、プリン代謝産物などを含む。

【００５５】

培養培地中に存在し得る非タンパク質構成性アミノ酸としては、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、シトルリンおよびオルニチンが挙げられる。いくつかの実施形態では、上記の非タンパク質構成性アミノ酸のうち少なくとも３種、すなわち、３、４または５種が、培養培地中に存在する。少なくとも３種の非タンパク質構成性（ｐｒｏｔｅｉｏｎｏｇｅｎｉｃ）アミノ酸が、任意の組合せで存在し得る。

【００５６】

培養培地中に存在し得るアミノ酸誘導体としては、ベタイン（トリメチルグリシン）、カルニチンおよびタウリンが挙げられる。いくつかの実施形態では、上記のアミノ酸誘導体のうち少なくとも１種、すなわち、１、２または３種が、培養培地中に存在する。２種またはそれよりも多いアミノ酸誘導体が存在する場合には、それらは任意の組合せで存在し得る。

【００５７】

いくつかの実施形態では、培養培地は、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンから選択される少なくとも４種、すなわち、４、５、６、７または８種の非タンパク質構成性アミノ酸またはアミノ酸誘導体を含む。少なくとも４種の非タンパク質構成性アミノ酸またはアミノ酸誘導体は、任意の組合せで存在し得る。

【００５８】

いくつかの実施形態では、培養培地は、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートから選択される少なくとも６種（すなわち、６、７、８または９種）の小極性化合物を含む。本開示の目的上、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートは、「群１の小極性代謝産物」と呼ばれることもある。少なくとも６種の群１の小極性代謝産物は、任意の組合せで存在し得る。いくつかの実施形態では、前記群１の小極性代謝産物のすべてが存在する。いくつかの実施形態では、前記群１の小極性代謝産物のうち任意の１種または複数種が、塩として、例えば、ナトリウム塩として提供され得る。

【００５９】

いくつかの実施形態では、培養培地は、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロールおよび尿素からなる群から選択される１種または複数種の、例えば、少なくとも３種（すなわち、３、４、５または６種）の小極性化合物を含む。本開示の目的上、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロールおよび尿素は、「群２の小極性化合物」と呼ばれることもある。少なくとも３種の群２の小極性化合物は、任意の組合せで存在し得る。いくつかの実施形態では、前記群２の小極性化合物の

すべてが存在する。

【００６０】

いくつかの実施形態では、培養培地は、少なくとも７種の群１の小極性代謝産物に加えて、前記群２の小極性化合物のうち少なくとも４種（すなわち、４、５または６種）を含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、少なくとも３種の非タンパク質構成性アミノ酸に加えて、および／または少なくとも１種のアミノ酸誘導体に加えて、少なくとも４種の群２の小極性代謝産物および／または少なくとも７種の群１の小極性代謝産物を含む。いくつかの実施形態では、例えば、培養培地は、少なくとも７種の群１の小極性代謝産物、少なくとも４種の群２の小極性代謝産物、および４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンから選択される少なくとも４種（すなわち、４、５、６、７もしくは８種）の非タンパク質構成性アミノ酸またはアミノ酸誘導体を含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、少なくとも８種の群１の小極性代謝産物、少なくとも５種の群２の小極性代謝産物、および４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンからなる群から選択される少なくとも４種（すなわち、４、５、６、７もしくは８種）の非タンパク質構成性アミノ酸またはアミノ酸誘導体を含む。いくつかの実施形態では、培養培地は、８または９種の群１の小極性代謝産物、５または６種の群２の小極性代謝産物、および４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンから選択される７もしくは８種の非タンパク質構成性アミノ酸またはアミノ酸誘導体を含む。

【００６１】

いくつかの実施形態では、培養培地は、少なくとも１種のプリン代謝産物を含む。いくつかの実施形態では、プリン代謝産物（複数可）は、ヒポキサンチンおよび尿酸から選択される。いくつかの実施形態では、培地は、ヒポキサンチンおよび尿酸の両方を含む。タンパク質構成性アミノ酸、ビタミン、非タンパク質構成性アミノ酸（複数可）、アミノ酸誘導体、イオン、塩、群１の小極性代謝産物、群２の小極性代謝産物、糖および本明細書において記載されるその他の成分の組合せのいずれかに加えて、このようなプリン代謝産物（複数可）が存在し得る。

【００６２】

ある特定の実施形態では、培養培地は、グルコースを含む。ある特定の実施形態では、培養培地中のグルコースの濃度は、約３ｍＭ～約２０ｍＭ、例えば、約５ｍＭ～約１０ｍＭ、例えば、約５ｍＭである。

【００６３】

ある特定の実施形態では、培養培地は、グルコースと、ガラクトース、フルクトースまたは両方などの１種または複数種のさらなる糖とを含む。ある特定の実施形態では、培養培地は、グルコースおよびガラクトースを含む。ある特定の実施形態では、培養培地は、グルコースおよびフルクトースを含む。ある特定の実施形態では、培養培地は、グルコース、ガラクトースおよびフルクトースを含む。ある特定の実施形態では、培養培地中のガラクトースの濃度は、約３０μｍ～約１２０μｍ、例えば、約５０μｍ～約８０μｍ、例えば、約６０μｍ、例えば、５５μｍから６５μｍの間、例えば、６０μｍである。ある特定の実施形態では、培養培地中のフルクトースの濃度は、約２０μｍ～約８０μｍ、例えば、約３０μｍ～約６０μｍ、例えば、約３５μｍ～約４５μｍ、例えば、約４０μｍである。

【００６４】

タンパク質構成性アミノ酸、ビタミン、非タンパク質構成性アミノ酸（複数可）、アミノ酸誘導体、イオン、塩、群１の小極性代謝産物、群２の小極性代謝産物、プリン代謝産物および本明細書において記載されるその他の成分の組合せのいずれかに加えて、糖（複数可）が存在し得る。

【００６５】

いくつかの実施形態では、培養培地は、グルコースと、タンパク質構成性アミノ酸、ビタミン、非タンパク質構成性アミノ酸（複数可）、アミノ酸誘導体、イオン、塩、糖（複数可）および本明細書において記載されるその他の成分の組合せのいずれかとに加えて、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、４－ヒドロキシプロリン、アセテート、アセトン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトレート、シトルリン、クレアチン、クレアチニン、ホルメート、フルクトース、ガラクトース、グルタチオン、グリセロール、ヒポキサンチン、ラクテート、マロネート、オルニチン、ピルベート、スクシネート、タウリン、尿素および尿酸から選択される少なくとも２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６または２７種の小有機化合物を含む。

【００６６】

ある特定の実施形態では、培養培地は、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．３～約３倍、例えば、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度の約０．５～約２倍、例えば、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．６７～約１．５倍、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±３０％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２０％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１０％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±５％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２％以内または表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１％以内または表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）に対してほぼ同等である、いずれか１種または複数種の代謝産物の濃度を有する。いくつかの実施形態では、任意のこのような代謝産物は、正常成人ヒト血漿中のこのような代謝産物の濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍の濃度で存在し得る。

【００６７】

ある特定の実施形態では、培養培地は、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．３～約３倍、例えば、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度の約０．５～約２倍、例えば、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．６７～約１．５倍、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±３０％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２０％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１０％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±５％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１％以内または表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）に対してほぼ同等である、培地中に存在する表２中に列挙される各代謝産物の濃度を有する。いくつかの実施形態では、培養培地は、正常成人ヒト血漿中のこのような構成成分の濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍である、培地中に存在する表２中に列挙される各代謝産物の濃度を有する。

【００６８】

ある特定の実施形態では、培養培地の重量オスモル濃度は、約２６０ｍＯｓｍ／ｋｇ～約３２０ｍＯｓｍ／ｋｇである。ある特定の実施形態では、培地の重量オスモル濃度は、少なくとも約２７５ｍＯｓｍ／ｋｇ、少なくとも約２８０ｍＯｓｍ／ｋｇ、少なくとも約２８５ｍＯｓｍ／ｋｇ、少なくとも約２９０ｍＯｓｍ／ｋｇまたは少なくとも約２９５ｍＯｓｍ／ｋｇまたは最大約３２０ｍＯｓｍ／ｋｇである。ある特定の実施形態では、重量

オスモル濃度は、約２８５ｍＯｓｍ／ｋｇ～３０５ｍＯｓｍ／ｋｇである。ある特定の実施形態では、重量オスモル濃度は、約２９０ｍＯｓｍ／ｋｇ～約３００ｍＯｓｍ／ｋｇ、例えば、約２９５ｍＯｓｍ／ｋｇである。

【００６９】

いくつかの実施形態では、培養培地は、フェノールレッドなどの１種または複数種のｐＨ指示薬を含み得る。いくつかの実施形態では、フェノールレッドは、表２中に列挙される濃度（複数可）の約０．３～約３倍、例えば、表２中に列挙される濃度の約０．５～約２倍の間、例えば、表２中に列挙される濃度の約０．６７～１．５倍で、または表２中に列挙される濃度の約±３０％、約±２０％、約±１０％、約±５％、約±２％、約±１％以内で、または表２中に列挙される濃度（複数可）に対してほぼ同等で、培地中に存在する。いくつかの実施形態では、フェノールレッドは、表２中に列挙される濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍の濃度で存在し得る。いくつかの実施形態では、培地は、フェノールレッドを含まない。

【００７０】

いくつかの実施形態では、培養培地は、培養の間に所望のｐＨを維持することを補助するために１種または複数種の緩衝剤を含み得る。迅速に成長する細胞では、培養培地の頻繁な、一定のまたは継続的な取り替えが、培地ｐＨを回復させるのに役立ち得る。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、重炭酸塩または２－［４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル］エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）である。

【００７１】

ある特定の実施形態では、上記の成分の一部またはすべては、溶液中に一緒に混合される場合に、基礎培地を形成する。例えば、いくつかの実施形態では、培養培地は、表２中に開示される構成成分を表２中に列挙される濃度で含む。表２はまた、種々の構成成分の商業的な供給業者を列挙する。構成成分は任意の供給源から得ることができるということは理解されるべきである。

【表２－１】

表2:例示的基礎培地構成成分および濃度(単位:マイクロモル濃度)

構成成分	濃度 (マイクロモル濃度)	例示的供給業者	製品番号
グルコース	5000	Thermo Fisher Scientific	15023-21
タンパク質構成性アミノ酸			
アラニン	430	Sigma	A7627
アルギニン	110	Sigma	A5131
アスパラギン	50	Sigma	A0884
アスパルテート	20	Sigma	A9256
システイン	40	Sigma	C1276
シスチン	100	Sigma	C8755
グルタメート	80	Sigma	G1251
グルタミン	550	Sigma	G3126
グリシン	300	Sigma	G7126
ヒスチジン	110	Sigma	H5659
イソロイシン	70	Sigma	I2752
ロイシン	160	Sigma	L8000
リシン	200	Sigma	L5626
メチオニン	30	Sigma	M9625
フェニルアラニン	80	Sigma	P2126
プロリン	200	Sigma	P0380
セリン	150	Sigma	S4500
トレオニン	140	Sigma	T8625
トリプトファン	60	Sigma	T0254
チロシン	80	Sigma	T3754
バリン	220	Sigma	V0500

【表２－２】

構成成分	濃度（マイクロモル濃度）	例示的供給業者	製品番号
ビタミン			
ビオチン	0.82	Sigma R7256	
コリン	21.49		
フォレート	2.27		
ミオ-イノシトール	194.27		
ナイアシンアミド	8.19		
p-アミノベンゾエート	7.29		
パントテネート	1.05		
ピリドキシン	4.86		
リボフラビン	0.53		
チアミン	2.96		
ビタミンB-12	0.0037		
塩			
$CaCl_2$	2350	Sigma	C5670
KCl	4100	Sigma	P5405
$MgCl_2$	480	Sigma	M8266
$MgSO_4$	350	Sigma	M2643
NaCl	105000	Sigma	S7653
$NaHCO_3$	24000	Sigma	S5761
Na_2HPO_4	870	Sigma	S9390
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	40	Sigma	C1396
NH_4Cl	40	Sigma	A9434
さらなる極性代謝産物			
2-ヒドロキシブチレート	50	Sigma	220116
3-ヒドロキシブチレート	50	Sigma	298360
4-ヒドロキシプロリン	20	Sigma	H5534
アセテート	40	Sigma	S5636
アセトン	60	EMD Millipore	AX0120
アセチルグリシン	90	Sigma	A16300
アルファ-アミノブチレート	20	Sigma	A2536
ベタイン	70	Sigma	61962
カルニチン	40	Sigma	C0283
シトレート	130	Sigma	251275
シトルリン	40	Sigma	C7629
クレアチン	40	Sigma	C0780
クレアチニン	75	Sigma	C4255

【表２－３】

構成成分	濃度（マイクロモル濃度）	例示的供給業者	製品番号
ホルメート	50	Sigma	94318
フルクトース	40	Sigma	F3510
ガラクトース	60	Sigma	G5388
グルタチオン	25	Sigma	G6013
グリセロール	120	Sigma	G2025
ヒポキサンチン	10	Sigma	H9377
ラクテート	1600	Sigma	L7022
マロネート	10	Sigma	M1296
オルニチン	70	Sigma	O2375
ピルベート	50	Sigma	P2256
スクシネート	20	Sigma	S3674
タウリン	90	Sigma	T0625
尿素	5000	Sigma	U5378
尿酸	350	Sigma	U2625
その他の構成成分			
フェノールレッド	14	Sigma	P5530

【００７２】

いくつかの態様では、本明細書において記載される細胞培養培地は、化学的に定義された基礎培地である。「化学的に定義された」とは、化学組成物内の種々の個々の構成成分の構造、化学式およびパーセンテージが公知であるか、またはそれを定義することができることを意味する。血清および組織抽出物は、すべての個々の構成成分が公知であるわけではないので、少なくとも部分的に化学的に定義されない。それらの公知の構成成分については、種々の構成成分の量および相対パーセンテージは、バッチごとに異なり得る（普通、異なる）。

【００７３】

ある特定の実施形態では、本開示の基礎培地は、成長因子、ホルモンおよび脂質などの支持物質の供給源として働く血清によって補給されると、広範囲の哺乳動物細胞の増殖を支持する。いくつかの実施形態では、ウシ血清、例えば、ウシ胎仔血清または仔ウシ血清が使用され得る。その他の血清供給源としては、ウマおよびヒトが挙げられる。いくつかの実施形態では、基礎培地は、約５％～約２０％血清、例えば、約７．５％～約１５％血清、例えば、約１０％血清（例えば、ウシ胎仔血清）が補給される。いくつかの実施形態では、血清は、熱不活化される。例えば、血清は、約５６℃で約３０分間（またはウマもしくはヒト血清については約２５分間）加熱され得る。いくつかの実施形態では、血清は、熱不活化されない。

【００７４】

いくつかの実施形態では、血清の代わりに、または血清に加えて、支持物質のその他の供給源が使用され得る。例えば、ＫｎｏｃｋＯｕｔ（商標）Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）またはＢＩＴ ９５００（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）などの血清代替物、血小板溶解物、ウシ下垂体抽出物（ＢＰＥ）などの動物抽出物またはそれらの組合せが使用され得る。いくつかの実施形態では、支持物質の供給源は、血清および動物抽出物の場合のように、少なくとも部分的に未定義であり得る。いくつかの実施形態では、支持物質は、その構造および量の点で定義され得る。例えば、公知の量で添加された個々の脂質または化学的に合成もしくは精製された組換えタンパク質（例えば、遺伝子操作された細菌または真菌によって産生された）は、定義された成分と考えられる。個々の定義された構成成分として、個々の定義された構成成分の

混合物として、または血清もしくはその他の少なくとも部分的に未定義の物質の構成成分として基礎培地に添加され得る支持物質の例としては、インスリンまたはインスリン様成長因子、上皮成長因子、トランスフェリン、アルブミン、脂肪酸（例えば、リポ酸、リノール酸および／またはリノレン酸）、リン脂質およびコレステロールが挙げられる。いくつかの実施形態では、基礎培地は、支持物質を添加せずに、ある特定の哺乳動物細胞の増殖を支持し得る。

【００７５】

いくつかの実施形態では、血清、動物抽出物、成長因子、ホルモンおよび／または細胞生存率および増殖の支持に寄与し得るその他の物質を、本開示の基礎培地に添加してもよい。これらの構成成分は、基礎培地に個々に添加してもよく、または２種もしくはそれよりも多いこのような構成成分を混合して、例えば、保存溶液を形成してもよく、次いで、これを基礎培地に添加してもよい。

【００７６】

いくつかの実施形態では、血清もしくは支持物質のその他のソース（複数可）を透析してもよく、またはそうでなければ、小極性代謝産物を除去するように処理してもよい。いくつかの実施形態では、約２，５００～約５，０００ダルトン、例えば、約３５００ダルトンの分子量カットオフを有する透析膜を使用してもよい。透析は、表２中に列挙される少なくとも一部の極性代謝産物を含む少なくとも一部の小極性代謝産物が大部分除去されるように、十分に長い間実施してもよい。例えば、いくつかの実施形態では、いずれか１種または複数種の極性代謝産物のレベルが、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％またはそれよりも大きく低減され得る。いくつかの実施形態では、任意の特定の代謝産物の量が約５０％～約９９％低減される。ほとんどの血清タンパク質（例えば、アルブミン、トランスフェリン、インスリン、成長因子）およびこのようなタンパク質に結合している物質、例えば、脂質などのより大きな物質は、大部分保持される。いくつかの実施形態では、食塩溶液、例えば、緩衝食塩溶液、例えば、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を透析緩衝液として使用してもよい。いくつかの実施形態では、透析緩衝液は、約２５０ｍＯｓｍ／ｋｇ～約３５０ｍＯｓｍ／ｋｇ、例えば、約２８０ｍＯｓｍ／ｋｇ～約３２０ｍＯｓｍ／ｋｇの重量オスモル濃度を有する。

【００７７】

多数の細胞培養培地は、概して、それ自体細胞成長／増殖にとって必要ではないが、細菌および／または真菌などの望ましくない微生物の成長を阻害するために存在する１種または複数種の抗生物質を含有する。当業者ならば、細胞を培養するために培養培地が使用されようとするときに、またはその直前にその培養培地に抗生物質を添加してもよいということは理解している。抗生物質としては、種々の種の微生物、例えば、細菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ属の種を含む）、放線菌属（ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｓ）（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓを含む）および真菌によって産生され、その他の微生物を破壊またはその増殖を阻害する、比較的低分子量の天然および合成化学物質が挙げられる。天然抗生物質と構造および／または作用様式が類似の物質を化学的に合成してもよく、または半合成抗生物質を産生するために天然化合物を修飾してもよい。主要なクラスの抗生物質としては、（１）ペニシリン、セファロスポリンおよびモノバクタムを含むβ－ラクタム、（２）アミノグリコシド、例えば、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン（ｎｅｔｉｌｍｙｃｉｎ）およびアミカシン、（３）テトラサイクリン、（４）スルホンアミドおよびトリメトプリム、（５）フルオロキノロン、例えば、シプロフロキサシン、ノルフロキサシンおよびオフロキサシン、（６）バンコマイシン、（７）例えば、エリスロマイシン、アジスロマイシン、タイロシンおよびクラリスロマイシンを含むマクロライド、ならびに（８）その他の抗生物質、例えば、ポリミキシン、クロラムフェニコールおよびリンコサミドがある。培養培地には、細菌、真菌および／またはウイルスの成長／増殖を阻害する１種または複数種の抗生物質が補給され得る。したがって、ある特定の実施形態では、培養培地は、１種または複数種の抗生物質を含む。ある特定の実施形態では、１種または複数種の抗生物質は、ペニシリン抗生物質を含む。ある

特定の実施形態では、１種または複数種の抗生物質は、アミノグリコシド抗生物質を含む。ある特定の実施形態では、１種または複数種の抗生物質は、ベンジルペニシリンを含む。ある特定の実施形態では、１種または複数種の抗生物質は、ストレプトマイシンを含む。ある特定の実施形態では、培養培地は、ベンジルペニシリンおよびストレプトマイシンを含む。しかし、いくつかの実施形態では、培養培地は、抗生物質を実質的に含まない場合もある。いくつかの実施形態では、培養培地は、ｐＨ指示薬（複数可）、抗生物質（複数可）または両方以外の、検出可能な量で成人ヒト血液中に存在しない物質を実質的に含まない場合もある。

【００７８】

いくつかの態様では、本開示は、従来の培養培地の改変版を提供する。従来の培地の改変版は、従来の培地と同一構成成分を同一量で含有し、１種もしくは複数種の群１の小極性代謝産物および／または１種もしくは複数種の群２の小極性代謝産物を成人ヒト血漿におけるその濃度の約０．３～約３倍の量でさらに含む。いくつかの実施形態では、従来の培養培地は、ＲＰＭＩ、ＤＭＥＭ、ＢＭＥ、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ハム栄養混合物（例えば、Ｆ１０、Ｆ１２）、培地１９９、マッコイ５ａまたは２種もしくはそれよりも多いこのような培地の混合物である。いくつかの従来の培養培地の例示的調合は、表４に提供されている。表４中のすべての濃度は、特に断りのない限りマイクロモル濃度である。いくつかの実施形態では、１種または複数種の小極性代謝産物は、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．５～約２倍、例えば、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．６７～約１．５倍、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±３０％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２０％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１０％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±５％以内、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２％以内または表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１％以内または表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）に対してほぼ同等で存在する。

【表４－１】

表4:例示的従来培地組成

Thermo Fisher Scientific カタログ番号	BME 21010	MEM 11095	DMEM 11965	RPMI 1640 11875
代謝産物名	濃度	濃度	濃度	濃度
グルコース	5555	5555	25000	11111
アラニン	0	0	0	0
アルギニン	99.5	597	398	1149
アスパラギン	0	0	0	378
アスパルテート	0	0	0	150
システイン	0	0	0	0
シスチン	51.1	99	201	208
グルタメート	0	0	0	136
グルタミン	2000*	2000	4000	2055
グリシン	0	0	400	133
ヒスチジン	51.6	200	200	97
ヒドロキシプロリン	0	0	0	153

【表４－２】

イソロイシン	198.5	396	801	382
ロイシン	198.5	396	801	382
リシン	199	398	797	219
メチオニン	50.3	101	201	101
フェニルアラニン	100	194	400	91
プロリン	0	0	0	174
セリン	0	0	400	286
トレオニン	202	403	798	168
トリプトファン	19.6	49	78	25
チロシン	99.6	199	398	111
バリン	201	393	803	171
ビオチン	4.1	0	0	0.819
コリン	7.1	7.1	28.6	21.4
フォレート	2.3	2.2	9.1	2.3
ミオ-イノシトール	11.1	11.1	40	194.4
ナイアシンアミド	8.2	8.2	32.8	8.2
p-アミノベンゾエート	0	0	0	7.2
パントテネート	2.1	2.1	8.4	0.524
ピリドキサール	4.9	4.9	0	0
ピリドキシン	0	0	19.4	4.9
リボフラビン	0.266	0.266	1.1	0.532
チアミン	3	3	11.9	2.9
ビタミンB-12	0	0	0	0.00369
$CaCl_2$	1802	1802	1802	0
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0	0	0	424
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	0	0	0.248	0
$MgSO_4$	814	814	814	407
KCl	5333	5333	5333	5333
$NaHCO_3$	26190	26190	44048	23809
NaCl	117240	117240	110344	103448
Na_2HPO_4	0	0	0	5634
$NaH_2PO_4 \cdot H2O$	1014	1014	906	0

小イオン	濃度	濃度	濃度	濃度
Na^+	144444	144444	155298	138525
K^+	5333	5333	5333	5333

【表４－３】

Ca^{2+}	1802	1802	1802	424
Mg^{2+}	814	814	814	407
NH_4^+	0	0	0	0
Fe^{3+}	0	0	0.248	0
Cl^-	126177	126177	119281	108781
HCO_3^-	26190	26190	44048	23809
PO_4^{3-}	1014	1014	906	5634
SO_4^{2-}	814	814	814	407
NO_3^-	0	0	0.744	848

* Thermo Fisher Scientific製の記載された調合のレシピは、グルタミンを含有しない。示された濃度は、標準BMEの濃度である。

【００７９】

いくつかの態様では、本開示は、尿酸は、成人ヒト血液中に存在するものの代表的なレベルでは、ＵＭＰＳを阻害するという認識に関する。ＵＭＰＳは、ｄｅ　ｎｏｖｏピリミジン生合成経路の最後の２ステップを触媒して、ＵＭＰを生成する。如何なる理論にも束縛されることを望まないが、従来の培養培地と比較して増加したレベルの尿酸を含有する細胞培養培地において培養されたヒト細胞は、従来の培養培地において培養されたヒト細胞よりも、ｉｎ　ｖｉｖｏでのヒト細胞のＵＭＰＳレベルをより密接に反映するＵＭＰＳ活性レベルを有し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも約２００μｍ、例えば、約２００μｍ～約１ｍＭである尿酸の濃度を有する細胞培養培地が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、濃度は、約２００μｍ～約７００μｍ、例えば、約３００μｍ～約４００μｍ、例えば、約３５０μｍである。培養培地は、少なくとも一部の哺乳動物細胞の生存率および増殖を支持するのに十分なタンパク質構成性アミノ酸と、無機イオンと、糖（複数可）（例えば、グルコース）と、ビタミンとを含む。いくつかの実施形態では、従来の培養培地に、選択された尿酸濃度を達成するのに適切な量の尿酸を補給することによって、培養培地を調製してもよい。例えば、ＲＰＭＩ、ＤＭＥＭ、ＢＭＥ、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ハム栄養混合物（例えば、Ｆ１０、Ｆ１２）、培地１９９、マッコイ５ａまたはそれらの混合物がそのように補給され得る。いくつかの実施形態では、従来の培養培地と比較して増加したレベルの尿酸を含有する細胞培養培地を、ピリミジン生合成に関係する、および／またはピリミジン生合成に関与する酵素に対して作用する、もしくはその酵素によって作用される化合物に関係する研究において使用してもよい。

【００８０】

ある特定の実施形態では、１種または複数種の培地構成成分を、同様の特性のその他の化学物質によって置換してもよい。１種または複数種の非必須／不必要な構成成分を有さないこのような改変培地は、本開示の範囲内にある。同様に、当業者ならば、必要な場合、特定の細胞型または適用のための任意の所与の構成成分の最適レベルを、例えば、その特定の構成成分の列挙された濃度または濃度の範囲に基づいて、またはそれから出発して、各構成成分の濃度の範囲（例えば、約１０％、約２５％、約５０％、約７５％、約１００％高い、約２倍、約５倍、約１０倍、約２０倍、約５０倍、約１００倍、約２００倍、約５００倍、約１０００倍高い、または約１０％、約２５％、約５０％、約７５％、約１００％低い、約２倍、約５倍、約１０倍、約２０倍、約５０倍、約１００倍、約２００倍、約５００倍、約１０００倍低い）を試験することによって、決定することができる。このような試験を行うことにおいて、最初の広範囲の濃度試験を、最初の実験の結果に基づいて、後で狭めてもよい。例えば、最初の試験について、目的の１つの構成成分の濃度を、表２において列挙される濃度の約10^{-3}、約10^{-2}、約10^{-1}、約１０倍、約１００倍または約１０００倍の濃度に変更してもよい。約10^{-2}の試験が、所望の増殖を依然として支持し、約10^{-3}が失敗する場合には、次に、最良の範囲を正確に指摘するた

めに、試験の第２のラウンドにおいて約１０$^{-2}$と約１０$^{-3}$との間の約１０倍の濃度差をさらに調査してもよい。したがって、具体的な細胞型または適用についてそのように最適化された培地もまた、本開示の範囲内である。

【００８１】

当業者には容易に明らかとなろうが、所与の成分の濃度を、本明細書において開示された範囲を超えて増加または減少させることができ、増加または減少させた濃度の効果を決定できる。任意の具体的な細胞型または適用のために、Ｈａｍ（Ｈａｍ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｅｄｉａ， Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔｓ ａｎｄ Ｓｕｂｓｔｒａｔａ ｆｏｒ Ｓｅｒｕｍ−Ｆｒｅｅ Ａｎｉｍａｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ、Ａｌａｎ Ｒ． Ｌｉｓｓ， Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、３～２１頁、１９８４年）およびＷａｙｍｏｕｔｈ（Ｗａｙｍｏｕｔｈ，Ｃ．、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｅｄｉａ， Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔｓ ａｎｄ Ｓｕｂｓｔｒａｔａ ｆｏｒ Ｓｅｒｕｍ−Ｆｒｅｅ Ａｎｉｍａｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ、Ａｌａｎ Ｒ． Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、２３～６８頁、１９８４年）によって記載されたアプローチを使用して本培地調合の最適化を実施することができる。培地成分の最適最終濃度は、単一構成成分滴定研究（ｓｉｎｇｌｅ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｔｉｔｒａｔｉｏｎ ｓｔｕｄｙ）において実験による研究によって、または歴史的および現在の科学的文献の解釈によって同定できる。動物細胞を使用する単一構成成分滴定研究では、すべてのその他の構成要素および変数を一定に維持しながら、単一培地構成成分の濃度を変え、動物細胞の生存率、増殖または健康の継続に対する単一構成成分の効果を測定する。同様に、どの培地構成成分（複数可）が特定の細胞表現型または応答に関与する、またはそれに影響を及ぼすかを決定することは、所与の非必須構成成分を完全に省くことおよび／または目的の細胞表現型もしくは応答に対するこのような構成成分の種々の濃度の効果を試験することを含み得る、単一構成成分滴定研究を使用して実施できる。

【００８２】

本明細書において言及されるある特定のビタミン、成長因子、ホルモンまたはサイトカインは、当技術分野で公知のように種々の形態（例えば、種々の天然に存在するまたは天然に存在しない形態）で存在することができ、互いの代用品として使用できるということは理解される。本出願が、特定のビタミン、成長因子、ホルモンまたはサイトカインが使用されることを明記する場合には、本開示は、同様の生物活性を有する、このようなビタミン、成長因子、ホルモンまたはサイトカインの任意の形態（あるいは生物学的に活性な形態を提供するように、細胞培養培地中で、または細胞内で修飾もしくは代謝され得る化合物（複数可））が使用される実施形態を包含すると理解されるべきである。同等の生物活性を提供するように、量を調整することができる。

【００８３】

いくつかの実施形態では、培地成分を液体キャリア中に溶解することができ、または種々の実施形態では乾燥形態で維持することができる。液体キャリア中に、本明細書において記載される好ましい濃度（すなわち、「１倍調合（１×ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ）」）で溶解する場合には、培地のｐＨを約７．０～７．６、例えば、約７．１～７．５、例えば、約７．２～７．４に調整してもよい。培地の重量オスモル濃度を、例えば、ＮａＣｌを補給することによって上記の好ましい範囲に調整してもよい。液体キャリアの種類および成分を溶液に溶解するために使用される方法は、変えてもよく、当業者によって決定できる。概して、培地成分は任意の順序で添加することができる。

【００８４】

細胞培養培地は、いくつかの成分から構成され、これらの成分は、培養培地毎に変わる。「１倍調合物（１×ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ）」は、使用濃度の細胞培養培地中に見出される一部のまたはすべての成分を含有する任意の水溶液を指すものとする。用語「１倍調合物」とは、例えば、細胞培養培地またはその培地の成分の任意のサブグループを指し得る。１倍溶液（１×ｓｏｌｕｔｉｏｎ）中の成分の濃度は、ｉｎ ｖｉｔｒｏで細胞を維持または培養するために使用される細胞培養調合物において見出されるその成分の濃度

とほぼ同一である。細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養のために使用される細胞培養培地は、定義により１倍調合物である。いくつかの成分が存在する場合には、１倍調合物中の各成分は、細胞培養培地中のそれらの成分の濃度とほぼ同等の濃度を有する。例えば、ＲＰＭＩ－１６４０培養培地は、成分の中でもとりわけ、０．２ｇ／Ｌ　Ｌ－アルギニン、０．０５ｇ／Ｌ　Ｌ－アスパラギンおよび０．０２ｇ／Ｌ　Ｌ－アスパラギン酸を含有する。これらのアミノ酸の「１倍調合物」は、溶液中にほぼ同一濃度のこれらの成分を含有する。したがって、「１倍調合物」に言及する場合は、溶液中の各成分が、記載されている細胞培養培地において見出されるものと同じまたはほぼ同じ濃度を有することが意図される。種々の細胞培養培地の１倍調合物中の成分の濃度は、当業者に周知である。例えば、Ｆｒｅｓｈｎｅｙ、２０１０年およびＬｉｓｓ、前掲を参照のこと。しかし、重量オスモル濃度および／またはｐＨは、特に、１倍調合物中により少ない成分が含有される場合には、培養培地と比較して１倍調合物において異なり得る。

【００８５】

「１０倍調合物」とは、その溶液中の各成分が、細胞培養培地中の同じ成分よりも約１０倍より濃縮されている溶液を指すものとする。例えば、ＲＰＭＩ－１６４０培養培地の１０倍調合物は、成分の中でもとりわけ、２．０ｇ／Ｌ　Ｌ－アルギニン、０．５ｇ／Ｌ　Ｌ－アスパラギンおよび０．２ｇ／Ｌ　Ｌ－アスパラギン酸（上記の１倍調合物と比較して）含有し得る。「１０倍調合物」は、いくつかのさらなる成分を、１倍培養培地において見出されるものの約１０倍の濃度で含有し得る。容易に明らかとなるが、「２５倍調合物」、「５０倍調合物」、「１００倍調合物」、「５００倍調合物」および「１０００倍調合物」は、１倍の細胞培養培地（１×ｃｅｌｌ　ｃｕｌｔｕｒｅ　ｍｅｄｉｕｍ）と比較して、それぞれ、成分を約２５倍、約５０倍、約１００倍、約５００倍または約１０００倍の濃度で含有する溶液を示す。やはり、培地調合物および濃縮溶液の重量オスモル濃度およびｐＨは変わり得る。本明細書において培養培地の構成成分の濃度が言及される場合には、これらの濃度は、特に断りのない限りまたは文脈から明確に明らかでない限り、１倍調合物についてである。本開示はまた、１０倍調合物、２５倍調合物、５０倍調合物、１００倍調合物、２５０倍調合物、５００倍調合物および１０００倍調合物および１倍調合物から１０００倍調合物の間の中間濃度を有するその他の調合物を提供する。成分が可溶性のままであり、安定のままであるという条件で、より高度に濃縮された調合物を作製することもできる。高濃度の培養培地構成成分を可溶化する方法を対象とする米国特許第５，４７４，９３１号を参照のこと。培養培地のある特定の構成成分は、上記の濃度のいずれかまたはより高濃度、例えば、２，５００倍、５０００、１００００倍またはそれを超える濃度の溶液として調製され得る。

【００８６】

培地成分が別個の濃縮溶液として調製される場合には、適切な（十分な）量の各濃縮物を、希釈剤と組み合わせて、１倍の培地調合物を産生する。概して、使用される希釈剤は、水であるが、ある特定の実施形態では、水性緩衝液、水性食塩溶液またはその他の水溶液を含むその他の溶液が使用され得る。

【００８７】

本発明の培養培地は、通常、不要な汚染を防ぐために滅菌される。例えば、濃縮成分を混合した後に、約０．１～１．０μｍ孔径の低タンパク質結合メンブレンフィルター（例えば、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、マサチューセッツ州、ベッドフォードから商業的に入手可能）を通す濾過によって滅菌を遂行して、滅菌培養培地を産生してもよい。あるいは、成分の濃縮されたサブグループをフィルター滅菌して、滅菌溶液として保存してもよい。次いで、これらの滅菌濃縮物を、無菌条件下で滅菌希釈剤と混合して、濃縮された１倍の滅菌培地調合物を産生できる。本培養培地の構成成分の多くは、熱不安定性であり、ほとんどの加熱滅菌法の間に達成される温度などによって不可逆的に分解されるので、オートクレーブ処理またはその他の高温ベースの滅菌方法は好まれない。

【００８８】

当業者には容易に明らかとなるが、培養培地の構成成分の各々は、溶液中の１種または

複数種のその他の構成成分と反応し得る。したがって、本発明は、本明細書において開示される調合物（例えば、表２中に列挙される構成成分を含む調合物）ならびにこれらの成分が組み合わされた後に形成される任意の反応混合物を包含する。

【００８９】

本明細書において記載される培養培地は、Ｓｉｇｍａなどの種々の化学物質供給業者から別個に購入された個々の構成成分から作製できる。表２には、種々の供給業者の現在のカタログによるある特定の培地構成成分の製品番号が列挙されるが、構成成分は、異なる供給業者から得てもよく、または合成してもよいということは理解されるべきである。

【００９０】

いくつかの実施形態では、複数の構成成分を含むある特定の市販の組成物を、好都合に混合し、さらなる構成成分を補給して、培養培地を作製してもよい。例えば、ある特定の実施形態では、培養培地は、本明細書において記載されるその他の構成成分（例えば、塩、アミノ酸、グルコース、極性代謝産物）を、本明細書において記載されるようなおよそのその対応する濃度に組み合わせた、ＲＰＭＩ　１００Ｘビタミンミックス（Ｓｉｇｍａ　Ｒ７２５６）を含み得る。

【００９１】

いくつかの態様では、本開示は、細胞培養培地を作製する方法であって、本明細書において開示される構成成分を組み合わせて、本明細書において記載される培養培地のいずれかを形成することを含む方法を提供する。いくつかの態様では、本開示は、細胞培養培地を作製する方法であって、本明細書において開示される構成成分を組み合わせて、本明細書において記載される基礎培養培地のいずれかを形成することと、基礎培養培地に血清または支持物質の別の供給源を添加することとを含む方法を提供する。

【００９２】

特に断りのない限り、本明細書で使用される場合、最大Ｘ％までの変形形態とは、列挙された値に関して±Ｘ％までの変形形態を意味する。例えば、列挙された値が１００μＭである場合には、２５％までの変形形態は、値が、約７５μＭ～約１２５μＭ（すなわち、約７５～１２５μＭ）の範囲であり得ることを意味する。特に断りのない限り、値の範囲が開示される場合には、終点は範囲内に含まれる。終点が排除される実施形態および一方の終点が含まれ、もう一方の終点が排除される実施形態もまた提供される。さらに、特に断りのない限り、または文脈および当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値は、種々の実施形態において示された範囲内の任意の具体的な値または部分的な範囲、例えば、文脈が明確に別のことを示さない限り、範囲の下限の単位の１０分の１までを想定することができるということは理解されるべきである。一連の数値が本明細書において示される場合には、本発明は、任意の介在する値、または最も低い値が最小として選択されてよく、最も大きい値が最大として選択されてよい、一連のものの中の任意の２つの値によって定義される範囲に関する実施形態を含むことも理解される。

【００９３】

ある特定の構成成分は、塩、エステル、生物学的に活性な代謝産物または誘導体として、あるいは細胞によって、または培地中で代謝され、処理され、もしくは分解されて、本明細書において開示される特定の構成成分の生物学的に活性な形態をもたらす前駆体として提供され得ることは理解されたい。この文脈において「生物学的に活性な」とは、細胞培養培地中に存在する場合に細胞に対してその所望の効果を発揮する、構成成分の能力を指す。ある特定の化合物、例えば、ある特定の培地構成成分は、特定の幾何または立体異性形態で存在し得る。シス－およびトランス－異性体、Ｅ－およびＺ－異性体、Ｒ－およびＳ－鏡像異性体、ジアステレオマー、（Ｄ）－異性体、（Ｌ）－異性体、（－）－および（＋）－異性体、それらのラセミ混合物およびそれらのその他の混合物を含むこのような化合物は、特に断りのない限り、種々の実施形態において本開示によって包含される。ある特定の化合物は、多様なまたはプロトン化状態で存在してもよく、種々の立体配置を有してもよく、溶媒和物（例えば、水との（すなわち、水和物）もしくは一般的な溶媒との）として存在してもよく、および／または種々の結晶形態（例えば、多形）または種々

の互換異性形態を有してもよい。このような代替プロトン化状態、立体配置、溶媒和物および形態を示す実施形態は、適用される場合には本開示によって包含される。

【００９４】

本明細書において記載される培地は、液体もしくは固体粉末、または両方の組合せであり得る。いくつかの実施形態では、液体形態は、培地のすべての構成成分を含有し得る。あるいは、液体培地は、個々のパッケージが各々、その適切な状態で（温度、湿度など）保存され得るように、別個のパッケージとして貯蔵されてもよい。例えば、表２中に列挙された構成成分のほとんどまたはすべては、本開示の培地中にあるように望まれる場合は、単一溶液中に予め溶解され、適切な条件（例えば、約２～８℃、例えば、約４℃、暗所および乾燥した場所でなど）で貯蔵されてもよい。他の構成成分であって、その構成成分のための貯蔵条件で長期間にわたると不安定であり得る、またはその他の構成成分と低速度で反応し得る、または別の方法で別個のストックとしてより良好に維持され得る他の構成成分は、例えば、便宜上または好みによって、異なる条件のセット下（例えば、約－２０℃または約－８０℃など）で貯蔵してもよい。これらの別個に貯蔵された構成成分が、全培地を構成するために一緒にされるのは、使用の少し前または直前のみである。別個のパッケージは各々、別個に、または種々の濃縮ストック（例えば、２倍、５倍、１０倍、１００倍、１０００倍など）として上市または販売されてもよい。

【００９５】

同様に、培地または個々の構成成分は、水性培地（水など）を用いる再構成の際に、所望の培地またはその濃縮ストック（例えば、２倍、５倍または１０倍など）をもたらす乾燥粉末の形態であり得る。いくつかの実施形態では、培地の少なくとも一部の構成成分は、液体／水性形態にある。いくつかの実施形態では、培地の少なくとも一部またはすべての構成成分は、固体／粉末形態にある。構成成分、例えば、保存溶液は、貯蔵温度（例えば、液体窒素、約－８０℃、約－２０℃、約４℃、室温または約２０～２５℃など）での安定性、光に対する感受性、水性または有機溶液中での自然半減期などを含む構成成分の特徴に従って適切に貯蔵されるべきである。いくつかの保存溶液は、好ましくは、新鮮なストックを維持するために定期的に再作製されてもよい。いくつかの実施形態では、１種または複数種の構成成分は、例えば、培地の使用者によって粉末またはより濃度の高い溶液から新たに調製されてもよく、液体として供給されるその他の構成成分に添加されてもよい。いくつかの実施形態では、例えば、グルコース、尿素および／または尿酸は新たに調製されてもよい。例示的な保存溶液を調製する方法は、実施例に記載されている（表７を参照のこと）。当業者ならば、多数のその他の同様のまたは同等の方法および保存溶液の濃縮物を使用してもよいということを理解する。いくつかの実施形態では、培地は、保存溶液、粉末または両方のセットとして、例えば、複数の個々の容器を含有するキットであって、各々の容器が、構成成分のうちの１種または複数種を含有する保存溶液または粉末を含有する、キットとして提供され得る。キットは、粉末として提供される構成成分を溶解するための１種または複数種の希釈剤を含み得る。

【００９６】

１種または複数種の構成成分が、所望の適用のための培地の性能に対して実質的に影響を及ぼす（例えば、悪影響を及ぼす）ことがない程度に、培養培地は、ある特定の実施形態では、このような構成成分のうち１種または複数種を含み、その存在を許容する。基礎培地のある特定の実施形態において存在し得るさらなる構成成分の例としては、微量金属、親油性代謝産物およびビタミンが挙げられる。ある特定の実施形態では、本開示の培地は、これらのまたはその他の構成成分のうちいずれか１種または複数種を実質的に含まない場合もある。いくつかの実施形態では、培地は、１種または複数種の指定の構成成分を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、「実質的に含まない」とは、細胞成長および／または代謝に対して統計的に有意な効果を有さない少量の構成成分を指す。いくつかの実施形態では、「実質的に含まない」とは、液体が約０．０１％ｖ／ｖ未満、約０．００１％ｖ／ｖ未満または約０．０００１％ｖ／ｖ未満または溶質が約０．０１％ｗ／ｖ未満、約０．００１％ｗ／ｖ未満または約０．０００１％ｗ／ｖ未満であることを指す。い

くつかの実施形態では、「実質的に含まない」とは、濃度が約０．００１ｍｇ／Ｌ未満、約０．０００１ｍｇ／Ｌ未満、約０．００００１ｍｇ／Ｌ未満、約０．０００００１ｍｇ／Ｌまたは約０．００００００１ｍｇ／Ｌ未満であることを指す。いくつかの実施形態では、「実質的に含まない」とは、濃度が約１０ｎＭ未満、約１ｎＭ未満、約１μＭ未満、約１０μＭ未満または約１００μＭ未満であることを指す。いくつかの実施形態では、「実質的に含まない」とは、培地が物質を含んでいないことを指し、それは、物質が、培地に存在しない、または存在する場合には、バイオアッセイ、質量分析、ＮＭＲ、クロマトグラフィーアッセイなどであり得る、物質についての最も高感度の技術的に認められたアッセイによる検出限界未満であることを意味する。

【００９７】

いくつかの実施形態では、基礎培養培地は、少なくとも以下の微量金属：鉄（Ｆｅ）、亜鉛（Ｚｎ）、リチウム（Ｌｉ）、セレン（Ｓｅ）、クロム（Ｃｒ）、銅（Ｃｕ）、マンガン（Ｍｎ）、バナジウム（Ｖｎ）、モリブデン（Ｍｏ）、シリコン（Ｓｉ）、ニッケル（Ｎｉ）、コバルト（Ｃｏ）およびスズ（Ｓｎ）を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、１種または複数種のこのような微量金属は、基礎培地の構成成分として含まれてもよく、または基礎培地もしくは完全培地に添加されてもよい。微量金属は、種々の形態で、例えば、$CuSO_4$、$ZnSO_4$、$FeSO_4$、$Fe(NO_3)_3$）、$MnCl_2$、Na_2SeO_3、Na_2SiO_3、$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$、NH_4VO_3、$NiSO_4$もしくは$SnCl_2$などの塩の形態で提供されてもよい。いくつかの実施形態では、任意のこのような微量金属は、正常成人ヒト血漿中のこのような微量金属の濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍の濃度で存在し得る。

【００９８】

いくつかの実施形態では、基礎培養培地は、親油性代謝産物を実質的に含まない。本明細書で使用される場合、「親油性代謝産物」とは、以下：脂肪酸、コレステロール、コレステロールエステル、セラミド、ジグリセリド、ガングリオシド、グリセロホスホコリン、モノアシルグリセリド、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリンおよびトリグリセリドのうちいずれかの誘導体を含む、またはそれらである化合物を指す。いくつかの実施形態では、１種または複数種のこのような親油性代謝産物は、基礎培地の構成成分として含まれてもよく、または基礎培地もしくは完全培地に添加されてもよい。いくつかの実施形態では、任意のこのような親油性代謝産物は、正常成人ヒト血漿中のこのような親油性代謝産物の濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍の濃度で存在し得る。

【００９９】

いくつかの実施形態では、基礎培養培地は、ビオチン、コリン、葉酸、ミオ－イノシトール、ナイアシンアミド、ｐ－アミノ安息香酸、Ｄ－パントテン酸、ビタミンＢ６、リボフラビン、チアミンおよびビタミンＢ１２以外のビタミンを実質的に含まない。いくつかの実施形態では、基礎培養培地は、上記のビタミンのうち１種または複数種に加えて、１種または複数種のビタミンを含む。基礎培地の構成成分として含まれてもよい、または基礎培地もしくは完全培地に添加されてもよいさらなるビタミンとしては、例えば、ビタミンＣ、ビタミンＤ、ビタミンＫ３、ビタミンＥおよびビタミンＡが挙げられる。いくつかの実施形態では、任意のこのようなビタミンは、正常成人ヒト血漿中のこのようなビタミンの濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍の濃度で存在し得る。いくつかの実施形態では、１種または複数種の小極性代謝産物は、正常成人ヒト血漿中のこのようなビタミンの濃度の約０．５～約２倍で、例えば、表２においてこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．６７～約１．５倍、正常成人ヒト血漿中のこのようなビタミンの濃度の約±３０％以内、約±２０％以内、約±１０％以内または約±５％以内で存在する。

【０１００】

いくつかの実施形態では、基礎培養培地は、本明細書において記載されるように存在し得るビタミン以外の、正常成人ヒト血液中で約６μＭ未満の通常の濃度を有する代謝産物を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、約６μＭ未満の正常成人ヒト血液中の濃度を有する１種または複数種の代謝産物は、基礎培地の構成成分として含まれてもよく、または基礎培地もしくは完全培地に添加されてもよい。ある特定の実施形態では、例えば、１種または複数種の指定の代謝産物を欠く培養培地で培養された細胞を、同一の培養培地であるが、正常成人ヒト血液中でその濃度が６μＭ未満である選択された代謝産物（複数可）が添加された培養培地で培養された細胞と比較することが、目的のものであり得る。このような比較は、本明細書において記載されるアッセイのいずれかを実施することおよび結果を比較することを含み得る。いくつかの実施形態では、任意のこのような代謝産物は、正常成人ヒト血漿中のこのような代謝産物の濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍の濃度で存在し得る。

【０１０１】

ある特定の実施形態では、２－ヒドロキシグルタレート、アセチルアスパルテート、アセチルカルニチン、アセチルセリン、アコニテート、アラントイン、アミノアジペート、アルギニノスクシネート、非対称性ジメチルアルギニン、ベーター－アラニン、カルノシン、シチジン、デオキシシチジン、フマレート、キヌレニン、マレート、メチオニンスルホキシド、プソイドウリジン、リビトール、ソルビトール、チミジン、トリメチルリシン、ウラシル、ウリジン、キサンチンおよびキサントシンから選択される任意の１種または複数種の代謝産物は、基礎培地または完全培地において明確に含まれる場合も、明確に排除される場合もある。いくつかの実施形態では、前記リストの化合物の中の少なくとも１種のアミノ酸またはアミノ酸誘導体が含まれる。いくつかの実施形態では、プリン、ピリミジン、ヌクレオシド、ヌクレオチドまたは化合物のリストに列挙されたこれらのうちいずれかの誘導体を含む少なくとも１種の化合物が含まれる。例えば、いくつかの実施形態では、培地は、ウリジンを、例えば、約２μＭ～約４μＭの濃度で含む。例えば、ある特定の実施形態では、培養培地は、アセチルカルニチン、アルファ－ケトグルタレート、ウリジンおよびマレートのうち１種または複数種（例えば、２、３種またはすべて）を含有する。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、任意のこのような代謝産物は、表３中に列挙されたこのような代謝産物の濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍の濃度で存在し得る。ある特定の実施形態では、培養培地は、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．３～約３倍、例えば、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度の約０．５～約２倍、例えば、表３におけるこのような代謝産物について列挙される濃度の約０．６７～約１．５倍、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±３０％以内、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２０％以内、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１０％以内、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±５％以内、表３におけるこのような代謝産物について列挙される濃度の約±２％以内または表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１％以内または表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）に対してほぼ同等である、任意の１種または複数種の代謝産物の濃度を有する。ある特定の実施形態では、培養培地は、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．３～約３倍の間、例えば、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度の約０．５～約２倍、例えば、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約０．６７～約１．５倍、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±３０％以内、表

３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２０％以内、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１０％以内、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±５％以内、表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±２％以内または表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）の約±１％以内または表３におけるこのような代謝産物（複数可）について列挙される濃度（複数可）に対してほぼ同等である、または表３におけるこのような代謝産物について列挙される濃度に対して同等である、培地中に存在する表３中に列挙される各代謝産物の濃度を有する。

【表３－１】

表3:ある特定のさらなる代謝産物

代謝産物名	濃度 (uM)
2-ヒドロキシグルタレート	0.7
アセチルカルニチン	5.79
アラントイン	2.1
アミノアジペート	2
非対称性ジメチルアルギニン	0.505
ベータ-アラニン	2.72
カルノシン	6.54
シチジン	0.175
デオキシシチジン	0.2
フマレート	1.5
キヌレニン	1.8
マレート	7.6
メチオニンスルホキシドide	4
プソイドウリジン ıe	3.18
リビトール	0.46
ソルビトール	7.045
チミジン	0.205
ウラシル	1.135

【表３－２】

ウリジン	3.11
キサンチン	1.43
キサントシン	5.08

【０１０３】

ある特定の実施形態では、培養培地は、マレートを４μＭ～８μＭ、例えば、５μＭ～６μＭ、さらに、例えば、５μＭの濃度で含有する。ある特定の実施形態では、培養培地は、アルファ－ケトグルタレートを、４μＭ～８μＭ、例えば、５μＭ～６μＭ、さらに、例えば、５μＭの濃度で含有する。ある特定の実施形態では、培養培地は、アセチルカルニチンを、４μＭ～８μＭ、例えば、５μＭ～６μＭ、さらに、例えば、５μＭの濃度で含有する。ある特定の実施形態では、培養培地は、ウリジンを、１μＭ～５μＭ、例えば、２μＭ～４μＭ、さらに、例えば、３μＭの濃度で含有する。

【０１０４】

ある特定の実施形態では、基礎細胞培養培地は、以下の成長因子：ＥＧＦ、ＦＧＦ、ＩＧＦ－１、ＩＧＦ－２、ＰＤＧＦ、ＶＥＧＦ、コロニー刺激因子１（ＣＳＦ－１）、コロ

ニー刺激因子２（ＣＳＦ－２）およびコロニー刺激因子２（ＣＳＦ－３）のうちいずれか１種または複数種を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、１種または複数種の成長因子は、基礎培地または完全培地に添加されてもよい。いくつかの実施形態で、任意のこのような因子は、正常成人ヒト血漿中のこのような因子の濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍の濃度で存在するように添加されてもよい。ある特定の実施形態では、基礎細胞培養培地は、成長因子を実質的に含まない。

【０１０５】

ある特定の実施形態では、基礎細胞培養培地は、以下のホルモン：コルチゾール、エストロゲン、成長ホルモン、インスリン、プロゲステロン、テストステロンおよびトリヨードチロニン（Ｔ３）のうちいずれか１種または複数種を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、１種または複数種のホルモンは、基礎培地または完全培地に添加されてもよい。いくつかの実施形態では、任意のこのようなホルモンは、正常成人ヒト血漿中のこのようなホルモンの濃度の最大約０．２５、約０．５、約０．７５、約１、約１．２５、約１．５、約２、約２．５または約３倍の濃度で存在するように添加されてもよい。ある特定の実施形態では、基礎細胞培養培地は、ホルモンを実質的に含まない。

【０１０６】

血清またはその他の少なくとも部分的に未定義の物質（複数可）を含む培養培地のそれらの実施形態では、任意の１種または複数種の代謝産物、成長因子、ホルモンまたはその他の化合物は、培養培地中に、あるとすれば、基礎培地中に存在する量に加えて、血清またはその他の少なくとも部分的に未定義の物質（複数可）によって与えられる量で存在し得る。成長因子、ホルモンまたはその他のタンパク質は、組換えタンパク質であり得るか、または天然に存在する供給源から精製してもよい。ある特定の実施形態では、組換えヒトタンパク質を使用してもよい。

ＩＩ．使用の方法

【０１０７】

さまざまな真核細胞のいずれかを培養するために、本明細書において記載される培養培地を使用してもよい。いくつかの実施形態では、本明細書において記載される組成物および／または方法において使用される細胞は、動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、霊長類細胞（ヒトまたは非ヒト霊長類）、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター）細胞またはイヌ、ネコまたはウシ細胞である。特定の目的のある特定の実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。本明細書において言及されるかどうかに関わらず、特に断りのない限りまたは文脈から明確に明らかでない限り、細胞はヒト細胞であり得るということは理解されるべきである。

【０１０８】

細胞は、種々の実施形態において、初代細胞、不死化細胞、正常細胞、異常細胞、がん細胞、非がん細胞などであり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、体細胞である。細胞は、目的の特定の組織または臓器を起源とするものであっても、特定の細胞型のものであってもよい。初代細胞は被験体から新たに単離されてもよく、培養で、制限された回数、例えば、１～５回継代されていてもよく、または培養で少数の集団倍加、例えば、１～５回集団倍加を起こしていてもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、細胞の集団のメンバー、例えば、非不死化または不死化細胞系のメンバーである。いくつかの実施形態では、「細胞系」とは、培養で少なくとも１０継代または少なくとも１０回の集団倍加の間維持されている細胞の集団を指す。いくつかの実施形態では、細胞系は、単一細胞に由来する。いくつかの実施形態では、細胞系は、複数の細胞に由来する。いくつかの実施形態では、細胞系の細胞は、単一試料（例えば、腫瘍から得た試料）または個体に由来する細胞（複数可）に由来する。細胞は、例えば、約３ヶ月より長い（適宜継代しながら）または約２５回の集団倍加よりも長い間、培養で長期増殖が可能である細胞系のメンバーであり得る。非不死化細胞系は、例えば、老化の前に、培養で約２０～８０回の間の集団倍加

を起こすことが可能であり得る。不死化細胞系は、本質的に制限のない寿命を獲得している、すなわち、細胞系は、本質的に限界なく増殖可能と思われる。本明細書における目的上、培養で少なくとも約１００回の集団倍加を起こしている、または起こすことが可能である細胞系が不死と考えられ得る。

【０１０９】

多数の細胞系が当技術分野で公知である。細胞系は、例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）、Ｃｏｒｉｅｌｌ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｓｉｔｏｒｉｅｓ、Ｄｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ ａｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ（Ｇｅｒｍａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ；ＤＳＭＺ）、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）、Ｊａｐａｎｅｓｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｂｉｏｒｅｓｏｕｒｃｅｓ（ＪＣＲＢ）、理化学研究所、Ｃｅｌｌ Ｂａｎｋ Ａｕｓｔｒａｌｉａなどといった寄託機関または細胞バンクから得ることができる。上記の寄託機関および細胞バンクの紙面のおよびオンラインカタログは、参照により本明細書に組み込まれる。所望の場合には、細胞を、ＤＮＡフィンガープリント法（例えば、ショートタンデムリピート（ＳＴＲ）解析）または一塩基多型（ＳＮＰ）解析（例えば、ＳＮＰアレイ（例えば、ＳＮＰチップ）もしくはシーケンシングを使用して実施され得る）などの当技術分野で公知の種々の方法のいずれかによって、単一個体または特定の細胞系に由来するかどうかを確認するために試験してもよい。

【０１１０】

ある特定の実施形態では、細胞は、足場依存性（ａｎｃｈｏｒａｇｅ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ）であり、これは、細胞が、生存し、機能し、分裂するために安定な表面への接触および足場を必要とすることを意味する。ある特定の実施形態では、細胞は、足場非依存性であり、これは、細胞が、生存し、機能し、分裂するために安定な表面への接触および足場を必要としないことを意味する。足場非依存性細胞は、普通、足場依存性であるが、天然に、またはヒトの介入による操作の結果としてこのような依存を失った細胞型のものであり得る。

【０１１１】

ある特定の実施形態では、細胞は、血液細胞としても本明細書において言及される、血液学的細胞を含む。血液学的細胞は、骨髄系統およびリンパ系統の細胞を含む。骨髄系統細胞としては、それだけには限らないが、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球および血小板が挙げられる。リンパ系統細胞としては、リンパ球、例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞およびナチュラルキラー細胞が挙げられる。Ｔ細胞は、ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞（Ｔｈ１、Ｔｈ２およびＴｈ１７細胞を含む）、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞および／またはキラーＴ細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、血液学的細胞は、末梢血単核細胞を含む。いくつかの実施形態では、血液学的細胞は、樹状細胞を含む。ある特定の実施形態では、細胞は、血液学的がん細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、内皮細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、上皮細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、肝細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、メラノサイト、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞、ニューロン、グリア細胞、間葉系細胞または脂肪細胞を含む。

【０１１２】

ある特定の実施形態では、細胞は幹細胞を含む。幹細胞は、多能性幹細胞、例えば、胚幹細胞もしくは人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞であり得るか、または成体幹細胞、例えば、造血幹細胞、腸幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、脂肪由来幹細胞もしくは内皮幹細胞などのより制限された発生能を有する幹細胞であり得る。いくつかの実施形態では、幹細胞は、複能性である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、単能性である。

【０１１３】

ある特定の実施形態では、細胞は、正常な非がん細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、がん細胞を含む。がん細胞は、任意の種類のがん、例えば、本明細書において

言及されるがんの種類のいずれかに由来し得る。いくつかの実施形態では、がん細胞は、遺伝子操作された細胞であり、これは、１種または複数種のがん遺伝子を非がん細胞に導入することによって、および／または非がん細胞において１種または複数種の腫瘍抑制細胞を不活化することによって生成することができる。例示的ながん細胞系は、実施例に記載されている。多数のその他のがん細胞系が当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、がん細胞系は、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ（ＣＣＬＥ）（Ｂａｒｒｅｔｉｎａ，Ｊ．ら、（２０１２年）Ｎａｔｕｒｅ ４８３巻：６０３～６０７頁；ｐｏｒｔａｌｓ．ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｃｃｌｅ／ｈｏｍｅ）に含まれるものである。いくつかの実施形態では、がん細胞、例えば、がん細胞系は、ヒト腫瘍を起源とする。いくつかの実施形態では、がん細胞、例えば、がん細胞系は、非ヒト動物において生じる腫瘍を起源とする。いくつかの実施形態では、がん細胞、例えば、がん細胞系は、天然に生じるがん（すなわち、例えば、実験目的で、意図的に誘導されていない、または生成されていない腫瘍）を起源とする。いくつかの実施形態では、がん細胞は、血液学的がん細胞、例えば、白血病またはリンパ腫細胞を含む。いくつかの実施形態では、がん細胞は、癌細胞（ｃａｒｃｉｎｏｍａ ｃｅｌｌ）または肉腫細胞を含む。いくつかの実施形態では、がん細胞は、がん幹細胞を含む。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、細胞は、目的の疾患を有する被験体に由来する。細胞は、１つまたは複数の変異を有し得る、および／または疾患と関連する１つまたは複数の表現型を示し得る。当業者ならば、多数の疾患関連変異を承知している。多数のヒト遺伝子およびヒトにおいて生じる疾患関連変異の概要は、ＭｃＫｕｓｉｃｋ Ｖ．Ａ．（１９９８年）Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ．Ａ Ｃａｔａｌｏｇ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ、第１２版、Ｔｈｅ Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ、Ｍｄ．、およびＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）ウェブサイトで入手可能である、そのオンライン最新版Ｏｎｌｉｎｅ Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ（ＯＭＩＭ）に提供されている。当業者ならば、種々の疾患、例えば、がんを引き起こし得る多数の孤発性変異を承知している。いくつかの実施形態では、目的の疾患を有する、および／または１つもしくは複数の疾患関連変異を有する被験体に由来する細胞は、疾患の細胞モデルとして働き得る。このような細胞は、例えば、疾患を研究するために、および／または潜在的治療剤を同定もしくは特徴付けるために、培養培地において培養し、使用してもよい。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、細胞は、遺伝子改変された細胞を含む。遺伝子改変された細胞は、ゲノムの安定な修飾または安定な染色体外エレメントの導入ならびに転写もしくは翻訳の鋳型として働く外因性核酸が、細胞中に導入されているが、ゲノムの配列は修飾されず、核酸が複製されず、および／または細胞が分裂するにつれて経時的に失われる一時的な修飾を包含する。遺伝子改変された細胞を産生する方法は、当技術分野で周知である。例えば、いくつかの実施形態では、試験細胞は、目的のタンパク質またはＲＮＡをコードする配列を含むベクターの導入によって最初の細胞集団から生成される。核酸またはベクターは、トランスフェクション、感染または当技術分野で公知のその他の方法によって細胞中に導入され得る。細胞による核酸またはベクターの取り込みを促進するために、細胞を適切な試薬（例えば、トランスフェクション試薬）と接触させてもよい。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、ベクターまたは核酸が導入された細胞の子孫によって遺伝されるように安定である。安定な遺伝子改変は、普通、細胞のゲノムＤＮＡの変更、例えば、外因性核酸のゲノムへの挿入またはゲノムＤＮＡの１つもしくは複数のヌクレオチドの欠失もしくは置換を含む。用語「遺伝子改変された」とは、元の遺伝子改変された細胞または細胞集団およびその子孫を指すことは理解される。したがって、本明細書において記載される方法において使用される遺伝子改変された細胞は、元の遺伝子改変された細胞

の子孫であり得る。遺伝子改変は、例えば、導入遺伝子の導入、遺伝子ノックアウトおよびゲノム編集による、例えば、規則的な間隔でクラスター化された短鎖反復回文配列（ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ ｒｅｐｅａｔｓ）／ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ）技術、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）またはジンクフィンガーの使用による、ゲノムの安定な修飾を包含する。修飾としては、ゲノムのコーディングまたは非コーディング領域における挿入、置換、欠失および／または転位（ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ）を挙げることができる。いくつかの実施形態では、修飾は、エピトープタグまたは光学的に検出可能なシグナル（例えば、光の放出および／または吸収）を産生するタンパク質をコードする遺伝子を挿入することを含む。このようなタンパク質としては、例えば、ルシフェラーゼ（例えば、ホタル、ウミシイタケまたはガウシア（Ｇａｕｓｓｉａ）ルシフェラーゼまたはＯｐｌｏｐｈｏｒｕｓ ｇｒａｃｉｌｉｒｏｓｔｒｉｓ由来のルシフェラーゼ酵素（ＮａｎｏＬｕｃ［ＮＬ］））および緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）などの蛍光タンパク質が挙げられる。蛍光タンパク質の限定されない例としては、ＧＦＰおよびその誘導体、赤色、黄色およびシアン蛍光タンパク質などの異なる色の光を発する発色団を含むタンパク質が挙げられる。例示的な蛍光タンパク質としては、例えば、Ｓｉｒｉｕｓ、Ａｚｕｒｉｔｅ、ＥＢＦＰ２、ＴａｇＢＦＰ、ｍＴｕｒｑｕｏｉｓｅ、ＥＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＴａｇＣＦＰ、ｍＴＦＰ１、ｍＵｋＧ１、ｍＡＧ１、ＡｃＧＦＰ１、ＴａｇＧＦＰ２、ＥＧＦＰ、ｍＷａｓａｂｉ、ＥｍＧＦＰ、ＴａｇＹＰＦ、ＥＹＦＰ、Ｔｏｐａｚ、ＳＹＦＰ２、Ｖｅｎｕｓ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、ｍＫＯ、ｍＫＯ２、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＯｒａｎｇｅ２、ＴａｇＲＦＰ、ＴａｇＲＦＰ－Ｔ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、ｍＲｕｂｙ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｍＫａｔｅ２、ｍＰｌｕｍ、ｍＮｅｐｔｕｎｅ、ｍＴｏｍａｔｏ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ｍＡｍｅｔｒｉｎｅ、ｍＫｅｉｍａが挙げられる。例えば、ＧＦＰおよび多数のその他の蛍光タンパク質または発光タンパク質の考察については、Ｃｈａｌｆｉｅ， Ｍ．およびＫａｉｎ， ＳＲ（編）Ｇｒｅｅｎ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎ：ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ａｎｄ ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎａｌｙｓｉｓ、４７巻）、Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ、Ｈｏｂｏｋｅｎ、Ｎ．Ｊ．、２００６年および／またはＣｈｕｄａｋｏｖ， ＤＭら、Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｒｅｖ． ９０巻（３号）：１１０３～６３頁、２０１０年を参照のこと。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、疾患関連変異を生成することまたは修正することを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変された細胞は、がん遺伝子またはキメラ抗原受容体、例えば、キメラＴ細胞受容体を発現する。例えば、細胞は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞であり得る。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、本開示の培養培地において培養された細胞は、特定の細胞型または細胞系の細胞の純粋な集団である。いくつかの実施形態では、集団は、少なくとも約８０％純粋、例えば、少なくとも約８５％、約９０％、約９５％、約９９％またはそれを超えて純粋である。いくつかの実施形態では、特定の型の細胞を、例えば、細胞表面マーカー発現に基づいて単離または精製してもよい。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞の２種またはそれよりも多い識別可能な集団が共培養される。細胞は、異なる細胞型のものであり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、がん細胞およびがん関連細胞（例えば、間質細胞）を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、２またはそれよりも多い型の免疫細胞、例えば、リンパ球の混合集団を含む。いくつかの実施形態では、別個のＤＮＡバーコードを含む複数の細胞を、培地中で培養する。このような細胞は、異なる遺伝子改変（例えば、異なる遺伝子のノックアウト）を有し得る。

【０１１７】

細胞を、当技術分野で公知の標準培養技術を使用して培養してもよい。いくつかの実施形態では、細胞を、およそ５％～１０％CO_2環境において維持してもよい。いくつかの実施形態では、細胞を、およそ２％～２０％O_2環境において維持してもよい。一般に、

哺乳動物細胞は、哺乳動物細胞を培養するために通常使用される範囲内の温度、例えば、約３６～３８℃、例えば、３７℃で、培養物で維持してもよい。哺乳動物細胞はまた、より低いまたはより高い温度も許容し得ることは理解される。細胞は、懸濁物で培養しても、または接着細胞として表面上で培養してもよい。それらは、プラスチック、ガラスまたはその他の適した物質製であり得る、フラスコ、ボトル、ディッシュ、プレート、管などといった種々の種類の培養容器で培養してもよい。いくつかの実施形態では、このような容器の表面を、哺乳動物細胞培養に適したものにするように処理してもよい。いくつかの実施形態では、細胞を、例えば、４～９６００ウェル、例えば、６、２４、９６、３８４または１５３６ウェルを有するマルチウェルプレートにおいて、培養培地で培養してもよい。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、細胞を、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカンなどといった１種または複数種の細胞外基質（ＥＣＭ）構成成分を含む物質上またはその中で、培地中で培養してもよい。例えば、細胞をＭａｔｒｉｇｅｌ（登録商標）中またはその上で培養してもよい。いくつかの態様では、細胞を３次元ヒドロゲルまたはスキャフォールドとして働き得るその他の材料中で培養してもよい。適した材料としては、例えば、動物ＥＣＭ抽出物ヒドロゲル、タンパク質ヒドロゲル、ペプチドヒドロゲル、１種または複数種の非ポリペプチドポリマーを含むポリマーヒドロゲルなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、ヒドロゲルを産生するために、培養培地を１種または複数種のポリマーと混合し、使用してもよい。ある特定の実施形態では、所望の場合には、哺乳動物細胞を凍結するために、例えば、適した凍結保存剤（複数可）を添加した培養培地を使用してもよい。

【０１１９】

実施例にさらに詳細に記載されるように、本開示の培養培地において哺乳動物細胞を培養することは、複数の経路にわたって多数の代謝産物の細胞内存在量に影響を及ぼした。いくつかの態様では、本開示は、１種または複数種の代謝産物のレベルが、哺乳動物細胞がＲＰＭＩ＋１０％ＩＦＳ（ＲＰＭＩ$^{+ＩＦＳ}$とも呼ばれる）において培養された場合に存在するであろう、このような代謝産物（複数可）のレベルと比較して変更された、哺乳動物細胞の集団を提供する。

【０１２０】

いくつかの態様では、本開示は、培養培地において少なくとも約２４時間培養されている哺乳動物細胞の集団を提供する。細胞が、少なくともその長さの時間前にその培養培地中に最初に入れられ、培地中での培養が、その時間から中断されずに継続している（適宜新鮮培地によって置換して）１種または複数種の細胞に由来する場合に、細胞の集団は、特定の培養培地において所与の長さの時間Ｘの間培養されていると考えられる。いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の培養培地において、少なくとも約２、約３、約４、約５、約７、約１４、約２１または約２８日間、またはそれを超える日数の間培養されている哺乳動物細胞の集団を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の培養培地において少なくとも１、２、３、５、１０、１５、２０または２５継代、またはそれを超える継代数の間培養されている哺乳動物細胞の集団を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の培養培地において、少なくとも１、２、３、５、１０、１５、２０または２５回の細胞倍加時間、またはそれを超える回数の細胞倍加時間の間培養されている哺乳動物細胞の集団を提供する。

【０１２１】

実施例に記載されるように、いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるような培養培地において培養された細胞は、ＲＰＭＩ$^{+ＩＦＳ}$において培養された同一細胞系の細胞よりも増加した細胞内レベルのカルバモイルアスパルテート、ジヒドロオロテート、オロテートおよび／またはオロチジンを有するとわかった。いくつかの態様では、本開示は、カルバモイルアスパルテート、ジヒドロオロテート、オロテートおよび／またはオロチジンの、細胞（複数可）がＲＰＭＩ$^{+ＩＦＳ}$において培養された場合のこのような代謝

産物（複数可）の細胞内濃度（複数可）よりも少なくとも２倍高い（例えば、２倍～約１５００倍の間で高い）細胞内濃度を有する、哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団を提供する。

【０１２２】

いくつかの態様では、本開示は、細胞（複数可）がＲＰＭＩ＋ＩＦＳにおいて培養される場合の尿酸の細胞内濃度（複数可）の少なくとも約２倍である（例えば、約２倍～約１５００倍高い）尿酸の細胞内濃度を有する哺乳動物細胞または細胞集団を提供する。いくつかの態様では、本開示は、少なくとも約５０μｍ、例えば、約５０μｍ～約１５００μｍ、例えば、約１００μｍ～約５００μｍ、約５００μｍ～約１０００μｍまたは約１０００μｍ～約１５００μｍ、例えば、約１０００μｍまたは約１１００μｍである尿酸の細胞内濃度を有する哺乳動物細胞または細胞集団を提供する。

【０１２３】

いくつかの態様では、１種または複数種のアッセイが実施される哺乳動物細胞を培養するために、本開示の培養培地を使用してもよい。哺乳動物細胞を使用する多数のアッセイは、当技術分野で公知である。さまざまな目的のためにアッセイを使用してもよい。例えば、それらを使用して候補治療剤を同定してもよく、または活性について、例えば、潜在的治療活性もしくは毒性活性について、１種もしくは複数種の内因性遺伝子産物（例えば、タンパク質）もしくは生物学的経路の発現または活性に対する阻害または刺激効果について、薬剤を特徴付けてもよく、または目的の１種もしくは複数種の細胞表現型に影響を及ぼす遺伝子を同定してもよい。スクリーニングは、異なる撹乱を受けた細胞の集団または複数の個々の集団でアッセイを実施することを含み得る。撹乱は、例えば、種々の化合物に対する曝露および／または遺伝子改変であり得る。スクリーニングを実施して、細胞または遺伝子産物に対して目的の効果を有し得る薬剤（複数可）または遺伝子（複数可）を同定してもよい。目的の効果は、例えば、抗増殖効果、増殖促進効果、アポトーシス促進効果、抗アポトーシス効果、阻害効果、活性化効果などであり得る。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、少なくとも約１０、少なくとも約１００、少なくとも約１，０００、少なくとも約１０，０００またはそれよりも多い異なる試験薬剤または遺伝子改変を試験することを含む。アッセイは、全細胞で実施してもよく、または細胞から単離されたオルガネラ（例えば、ミトコンドリア、核）、細胞溶解物、タンパク質、ＲＮＡまたはその他の細胞の構成要素で実施してもよい。

【０１２４】

「薬剤」とは、本明細書で使用される場合、任意の物質、分子、超分子複合体、材料またはそれらの組合せもしくは混合物を指す。用語「薬剤」は、本明細書において「化合物」と交換可能に使用される。いくつかの態様では、薬剤は、化学式、化学構造または配列によって表され得る。薬剤の例としては、例えば、小分子、ポリペプチド、核酸（例えば、低分子干渉ＲＮＡなどのＲＮＡｉ剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー）、脂質、多糖などが挙げられる。いくつかの実施形態では、薬剤は細胞透過性であり、例えば、細胞によって取り込まれ、細胞内で、例えば、哺乳動物細胞内で作用して生物学的効果をもたらす、通常の薬剤の範囲内のものである。「試験薬剤」とは、細胞に対するその効果に関して、または細胞との相互作用に関して、試験される予定の、または試験されている、または試験された任意の薬剤を指す。試験することは、細胞に対する試験薬剤の効果についての任意の種類の特徴付けまたは解析を含み得る。本明細書において記載される薬剤のいずれも、試験薬剤として使用してもよい。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、培養培地の構成成分として本明細書において記載される化合物のいずれかではない。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、薬剤は小分子である。本明細書で使用される場合、「小分子」とは、質量が約２キロダルトン（ｋＤａ）未満である有機化合物を指す。いくつかの実施形態では、小分子は、約１．５ｋＤａ未満または約１ｋＤａ未満である。いくつかの実施形態では、小分子は、約８００ダルトン（Ｄａ）未満、約６００Ｄａ未満、約５００Ｄａ未満、約４００Ｄａ未満、約３００Ｄａ未満、約２００Ｄａ未満または約１００Ｄａ未

満である。小分子は、少なくとも約５０Ｄａの質量を有することが多い。いくつかの実施形態では、小分子は、非ポリマーである。いくつかの実施形態では、小分子は、アミノ酸またはアミノ酸誘導体ではない。いくつかの実施形態では、小分子は、ヌクレオチドではない。いくつかの実施形態では、小分子は、糖類ではない。いくつかの実施形態では、小分子は、複数の炭素間結合を含有し、１個もしくは複数のヘテロ原子および／またはタンパク質との構造的相互作用（例えば、水素結合）にとって重要な１種もしくは複数種の官能基、例えば、アミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基もしくはカルボキシル基、いくつかの実施形態では、少なくとも２種の官能基を含み得る。小分子は、１種または複数種の上記の官能基で必要に応じて置換されている、１個もしくは複数の環状炭素もしくは複素環式構造体および／または芳香族もしくは多環芳香族（ｐｏｌｙａｒｏｍａｔｉｃ）構造体を含むことが多い。小分子は、塩として提供され得る、電気的に中性の化合物ならびに多原子イオンの両方を包含するということが理解される。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、薬剤は、承認された薬物である。「承認された薬物」とは、薬剤または組成物が、ヒトの処置のためにまたは獣医学的目的のために上市する、販売促進する、配送する、販売する、またはそうでなければ商業的に提供することを可能にするように、政府の規制機関（米国ＦＤＡまたはその他の管轄区において治療剤の承認に関して同様の権限を有する政府機関など）によって承認されている薬剤または組成物を意味する。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、薬剤は、酵素モジュレーターまたは受容体モジュレーターである。「モジュレートする（ｍｏｄｕｌａｔｅ）」（および「モジュレートする（ｍｏｄｕｌａｔｉｎｇ）」、「モジュレートする（ｍｏｄｕｌａｔｅｓ）」などの関連用語）は、目的の分子、プロセス、経路または現象において、質的もしくは量的変化、変更または修飾を引き起こすあるいは促進することを意味する、「モジュレートする」は、目的の分子、プロセス、経路または現象のレベルまたは活性の増加または減少を引き起こすこと、例えば、目的の分子、プロセス、経路もしくは現象を阻害することまたは活性化することを包含する。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、薬剤は、検出可能な標識を含む。本明細書で使用される場合、「検出可能な標識」とは、標識が付着される分子、例えば、小分子、核酸もしくはポリペプチドまたはその他の実体の検出を可能にする部分に組み込まれた少なくとも１つの元素、同位元素または官能基を有する部分を指す。標識は、直接付着されることもあれば（すなわち、結合によって）、テザーによって付着されることもある。標識は、任意の位置で、分子、例えば、小分子、ポリペプチドまたはその他の実体に付着されることもあれば、それらの中に組み込まれることもあるということが理解される。一般に、標識は、５つのクラス：ａ）それだけには限らないが、^{2}Ｈ、^{3}Ｈ、^{13}Ｃ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{18}Ｆ、^{31}Ｐ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{67}Ｇａ，^{76}Ｂｒ、^{99m}Ｔｃ（Ｔｃ－９９ｍ）、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{153}Ｇｄ、^{169}ＹｂおよびＲｅを含む放射活性または重同位元素であり得る同位元素部分を含有する標識、ｂ）酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼなど）に結合され得る、抗体または抗原であり得る、免疫部分を含有する標識、ｃ）着色した、発光、リン光または蛍光部分（例えば、蛍光標識フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）など）である標識、ｄ）１つまたは複数の光親和性部分を有する標識、およびｅ）１つまたは複数の公知の結合パートナー（例えば、ビオチン－ストレプトアビジン、ＦＫ５０６－ＦＫＢＰ）のリガンドである標識のうちのいずれか１つ（または複数）の中に入り得る。ある特定の実施形態では、標識は、放射活性同位元素、例えば、検出可能な粒子、例えば、ベータ粒子を発光する同位元素を含む。ある特定の実施形態では、薬剤は、放射標識された糖、アミノ酸、プリン、ピリミジン、ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含む。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、薬剤は、抗がん剤である。「抗がん剤」とは、がんの処置のために使用される、または開発中である薬剤を指す。このような薬剤としては、種々の小分子、タンパク質（例えば、モノクローナル抗体）ならびに養子細胞移入などの細胞療法が挙げられる。「抗がん剤」は、比較的非特異的な細胞傷害性薬剤または細胞増殖抑制剤、例えば、有糸分裂を阻害するもの（「化学療法剤」とも呼ばれる）ならびに細胞外成長シグナルをより選択的に遮断する薬剤（例えば、シグナル伝達の遮断剤）および古典的な内分泌ホルモン（主に、乳がんのエストロゲンおよび前立腺がんのアンドロゲン）に由来する成長促進シグナルの遮断剤を含む。化学療法剤としては、例えば、ナイトロジェンマスタード（例えば、クロラムブシル、クロルメチン、シクロホスファミド、イホスファミドおよびメルファラン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ホテムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン）などのアルキル化剤およびアルキル化様薬剤；白金剤（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、ＢＢＲ３４６４、サトラプラチンなどのアルキル化様薬剤）、ブスルファン、ダカルバジン、プロカルバジン、テモゾロミド、チオＴＥＰＡ、トレオスルファンおよびウラムスチン（ｕｒａｍｕｓｔｉｎｅ）；葉酸（例えば、アミノプテリン、メトトレキセート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド）などの抗代謝産物；クラドリビン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニンなどのプリン；カペシタビン、シタラビン、フルオロウラシル、フロクスウリジン、ゲムシタビンなどのピリミジン；タキサン（例えば、ドセタキセル、パクリタキセル）、ビンカ（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビン）、エポチロンなどの紡錘体毒／有糸分裂阻害剤；アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、ピクサントロンおよびバルルビシン）、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓの種々の種によって天然に産生された化合物（例えば、アクチノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、プリカマイシン）およびヒドロキシ尿素のような細胞傷害性／抗腫瘍抗生物質；カンプトテカ（ｃａｍｐｔｏｔｈｅｃａ）（例えば、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン）およびポドフィルム（例えば、エトポシド、テニポシド）などのトポイソメラーゼ阻害剤が挙げられる。その他の抗がん剤としては、抗受容体チロシンキナーゼ抗体（例えば、セツキシマブ、パニツムマブ、トラスツズマブ）、抗ＣＤ２０（例えば、リツキシマブおよびトシツモマブ）およびその他のもの、例えば、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ゲムツズマブなどのがん治療のためのモノクローナル抗体；アミノレブリン酸、メチルアミノレブネート、ポルフィマーナトリウムおよびベルテポルフィンなどの光増感剤；チロシンおよび／またはセリン／トレオニンキナーゼ阻害剤、例えば、Ａｂｌ、Ｋｉｔ、インスリン受容体ファミリーメンバー（複数可）、ＶＥＧＦ受容体ファミリーメンバー（複数可）、ＥＧＦ受容体ファミリーメンバー（複数可）、ＰＤＧＦ受容体ファミリーメンバー（複数可）、ＦＧＦ受容体ファミリーメンバー（複数可）、ｍＴＯＲ、Ｒａｆキナーゼファミリーメンバー、ＰＩ３キナーゼなどのホスファチジルイノシトール（ＰＩ）キナーゼ、ＰＩキナーゼ様キナーゼファミリーメンバー、ＭＥＫキナーゼファミリーメンバー、ＪＡＫキナーゼファミリーメンバー、サイクリン依存性キナーゼ（ＣＤＫ）ファミリーメンバー、オーロラキナーゼファミリーメンバーの阻害剤が挙げられる。がんの処置のために上市されている、またはがんにおける少なくとも１つの第ＩＩＩ相治験において有効性を示しているキナーゼ阻害剤としては、セジラニブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、ダブラフェニブ、エルロチニブ、エベロリムス、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、ニロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トファシチニブ、テムシロリムス、トラメチニブ、バンデタニブおよび（ａｍｄ）ベムラフィニブ（ｖｅｍｕｒａｆｉｎｉｂ）が挙げられる。さらにその他の抗がん剤としては、成長因子受容体アンタゴニスト；レチノイド（例えば、アリトレチノインおよびトレチノイン）、アルトレタミン、アムサクリン、アナグレリド、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ（例えば、ペグアスパルガーゼ（ｐｅｇａｓｐａｒａｇａｓｅ））、ベキサロテン、デニロイキンジフチトクス、エストラムスチン、イクサベピロン、マソプロコール、ミトタンおよびテストラクトン、Ｈｓｐ９０阻害剤、プロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、イキサゾミブ、デ

ランゾミブ、オプロゾミブ（ｏｐｒｏｚｏｍｉｂ）およびマリゾミブ）；血管新生阻害剤、例えば、ベバシズマブ（アバスチン）または可溶性ＶＥＧＦ受容体ドメインを含む薬剤（例えば、アフリベルセプト）などの抗血管内皮成長因子剤、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤、アポトーシス促進剤（例えば、Ｂｃｌ－２阻害剤（例えば、オバトクラックス、ナビトクラックス（ｎａｖｉｔｏｃｌａｘ）、ゴシポール））などのアポトーシス誘導剤、Ｒａｓ阻害剤；がんワクチン；チェックポイント阻害剤（例えば、免疫チェックポイント分子と結合するモノクローナル抗体、例えば、イピリムマブなどのＣＴＬＡ４阻害剤、ニボルマブおよびペムブロリズマブなどのＰＤ－１阻害剤、アテゾリズマブなどのＰＤ－Ｌ１アンタゴニスト）などのその他の免疫調節性療法；がん遺伝子を標的にしたＲＮＡｉ剤などが挙げられる。いくつかの抗がん剤は、複数の活性または作用の機序を有し、複数のカテゴリーもしくはクラスに分類され得る、またはさらなる作用の機序もしくは標的を有することは理解されよう。

【０１３０】

細胞生存率、増殖、遺伝子発現、タンパク質活性、形態学、遊走または任意のその他の細胞特性、プロセス、表現型または生物学的経路に対する薬剤または遺伝子改変の効果は、任意の適した方法を使用して測定できる。ある特定の実施形態では、細胞または細胞集団の生存および／または増殖を、細胞計数アッセイ（例えば、目視検査、自動化画像解析、フローサイトメーターなどを使用して）、複製アッセイ、細胞膜完全性アッセイ、細胞性ＡＴＰベースのアッセイ、ミトコンドリアレダクターゼ活性アッセイ、ＢｒｄＵ、ＥｄＵまたはＨ３－チミジン取り込みアッセイ、カルセイン染色、Ｈｏｅｃｈｓｔ　Ｄｙｅ、ＤＡＰＩ、アクチノマイシンＤ、７－アミノアクチノマイシンＤまたはヨウ化プロピジウムなどの核酸色素を使用するＤＮＡ含量アッセイ、例えば、レザズリン（ＡｌａｍａｒＢｌｕｅとして、または種々のその他の名称によって知られることもある）、ＭＴＴ、ＸＴＴおよびＣｅｌｌＴｉｔｒｅ　Ｇｌｏなどの細胞代謝アッセイ、ＳＲＢ（スルホローダミンＢ）アッセイなどのタンパク質含量アッセイ、核断片化アッセイ、細胞質ヒストン関連ＤＮＡ断片化アッセイ（ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ　ｈｉｓｔｏｎｅ　ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ＤＮＡ　ｆｒａｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ　ａｓｓａｙ）、ＰＡＲＰ切断アッセイ、ＴＵＮＥＬ染色またはアネキシン染色によって決定してもよい。いくつかの実施形態では、細胞生存または増殖を、細胞生存または増殖または細胞死を媒介する遺伝子産物をコードする１種または複数種の遺伝子、例えば、細胞周期または細胞死（例えば、アポトーシス）において役割を果たす、またはそれを調節する産物をコードする遺伝子の発現を測定することによって評価する。このような遺伝子の例としては、例えば、サイクリン依存性キナーゼ、サイクリン、ＢＡＸ／ＢＣＬ２ファミリーメンバー、カスパーゼなどが挙げられる。当業者ならば、細胞生存または増殖の指示薬として使用されるべき適切な遺伝子を選択できる。いくつかの実施形態では、細胞生存および／または増殖のアッセイは、細胞数、例えば、生存細胞数を決定でき、細胞生存自体と細胞増殖との間を明確に区別できず、例えば、アッセイ結果は、生存および増殖の組合せを反映し得る。いくつかの実施形態では、生存または増殖または細胞死（例えば、アポトーシスもしくは壊死）を具体的に評価できるアッセイを使用してもよい。

【０１３１】

いくつかの態様では、培養培地は、細胞代謝を解析することおよび／または細胞代謝産物もしくは代謝経路によって作用する、もしくはそれらと相互作用する薬剤を同定もしくは特徴付けることで、特定の使用を見出すことができる。従来の培養培地およびマウス血漿は、ヒト血漿の代謝産物組成を不十分にしか反映しない。実施例に記載されるように、従来の培地が行うよりもヒト血漿の代謝産物組成を良好に反映する本発明の培養培地（１０％ＩＦＳを補給したＨＰＬＭとも呼ばれる）の実施形態における培養は、標準培地における培養と比較して細胞代謝に対して広範囲の効果を有していた。ピリミジン代謝に関与する代謝産物の細胞内存在量の変更が中でも最も有意であった。この効果を、尿酸まで確かめた。尿酸の血漿中濃度は、マウスおよびウシを含むほとんどのその他の哺乳動物においてよりもヒトにおいて最大で１桁大きい（Ａｌｖａｒｅｚ－ＬａｒｉｏおよびＭａｃａ

ｒｒｏｎ－Ｖｉｃｅｎｔｅ、２０１０年；Ｋｒａｔｚｅｒら、２０１４年；Ｗｕら、１９９２年）。尿酸は、ヒト血漿中に存在する濃度では、ｄｅ　ｎｏｖｏピリミジン生合成経路の最後の２ステップを触媒する酵素である、ＵＭＰシンターゼ（ＵＭＰＳ）の内因性阻害剤である。ＵＭＰＳのその他の小分子阻害剤と同様に、尿酸は、オロテートの蓄積を誘導し、順に、その細胞傷害性効果を媒介する５－ＦＵのフルオロヌクレオチド誘導体への代謝をアンタゴナイズする。開示された培養培地は、例えば、細胞代謝を研究し、環境的代謝組成物によって影響を受ける、新規腫瘍特異的傾向または代謝産物－薬物相互作用を同定することを可能にし得る。

【０１３２】

実施例に記載されるように、種々のヒト血液学的がんは、ＨＰＬＭ＋ｄＩＦＳにおいて、ＲＰＭＩ＋ＩＦＳおよびＲＰＭＩ＋ｄＩＦＳにおける速度と、一般的にはより遅いものの、それに匹敵する速度で増殖した。いずれかの理論に束縛されることを望むものではないが、ｉｎ　ｖｉｖｏでのヒト細胞増殖に対する薬剤の効果を予測することを目的としたアッセイは、開示された培養培地を使用して実施した場合に、従来の細胞培養培地におけるよりもより正確であり得る。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、アッセイは、（ｉ）１種または複数種の細胞内物質（例えば、代謝産物、ＲＮＡ、タンパク質）のレベル、（ｉｉ）１種または複数種の物質（例えば、代謝産物、分泌タンパク質）の培地への分泌、（ｉｉｉ）酸化還元状態、（ｉｖ）グルコース利用、または（ｖ）１種または複数種の代謝経路、細胞シグナル伝達経路または酵素の活性のレベルを測定することを含む。当業者ならば、代謝産物、ＲＮＡおよびタンパク質のレベルを検出または測定するために使用できる適切なアッセイを承知している。例えば、代謝産物を、質量分析（例えば、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーまたは質量分析を使用する分離が先行し得る）、核磁気共鳴（ＮＭＲ）、イオン移動度スペクトロメトリー、電気化学的検出（ＨＰＬＣと連結した）、Ｒａｍａｎ分光法または放射標識を使用して検出または測定してもよい。ＲＮＡは、ノーザンブロット、マイクロアレイ、ｎＣｏｕｎｔｅｒ技術、定量的逆転写ＰＣＲなどのハイブリダイゼーションおよび／または増幅を伴う方法を使用して、または遺伝子発現の一連の解析（ＳＡＧＥ）もしくはＲＮＡシーケンシング（ＲＮＡ－Ｓｅｑ）などのシーケンシングベースのアプローチによって、検出または測定してもよい。タンパク質は、検出されるべきタンパク質と結合する抗体を使用する免疫学的方法またはその他の親和性ベースの方法を使用して測定してもよい。タンパク質を検出および測定するために使用できる例示的な方法としては、例えば、免疫組織化学（ＩＨＣ）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、Ｌｕｍｉｎｅｘ（登録商標）アッセイプラットフォームなどのビーズベースのアッセイ、フローサイトメトリー、タンパク質マイクロアレイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降、免疫ブロット（ウエスタンブロット）および質量分析が挙げられる。細胞で実施できる目的のその他のアッセイとしては、例えば、レポーターアッセイ、ＣｈＩＰ－ｃｈｉｐ、ＣｈＩＰ－Ｓｅｑ、バイサルファイトシーケンシングおよび染色体コンホメーション捕捉が挙げられる。いくつかの実施形態では、アッセイは、ＤＮＡ修飾（メチル化など）、タンパク質修飾（例えば、ヒストン修飾またはタンパク質リン酸化）、転写またはＤＮＡ修復を検出することを含む。いくつかの実施形態では、アッセイは、試験薬剤の存在下で培養培地において培養された細胞を使用して実施し、結果を参照値と比較する。参照値は、同一アッセイを試験薬剤の不在下で同一の型の細胞を使用して実施するときに得られる結果であり得る。結果が参照値と異なる場合には、試験薬剤が、アッセイにおいて測定されている分子、経路またはプロセスのレベルもしくは活性に影響を及ぼすと結論づけてもよい。

【０１３４】

目的の代謝経路としては、２、３例を挙げると、例えば、解糖、酸化的リン酸化、プリン生合成、ピリミジン生合成、脂肪酸生合成が挙げられる。いくつかの実施形態では、培養培地において培養された細胞を使用して、グルコース代謝、脂質代謝、ＤＮＡまたはＲＮＡ合成および酸化的リン酸化に影響を及ぼし得る薬剤を同定または特徴付け得る。この

ようなプロセスの欠陥は、例えば、心血管疾患、糖尿病、アテローム性動脈硬化症およびメタボリックシンドロームを含む広範なヒト疾患に関与している。培養培地において培養された細胞を使用して、このような疾患の処置、例えば、このような疾患と関連している代謝的欠陥の修正において潜在的に有用であり得る薬剤を同定または特徴付け得る。

【０１３５】

目的の細胞シグナル伝達経路としては、例えばＴＧＦβ、Ｗｎｔ、ＢＭＰ、Ｎｏｔｃｈ、Ｈｅｄｇｅｈｏｇ、ＨＧＦ－Ｍｅｔ、ＥＧＦ、ＩＧＦ、ＰＤＧＦ、ＦＧＦ、Ｐ３８－ＭＡＰキナーゼ、Ｒａｓ、ＰＩ３キナーゼ－Ａｋｔ、ＳｒｃおよびＮＦ－ｋＢ経路が挙げられる。いくつかの実施形態では、アッセイは、前記経路のうち１種または複数種を阻害または活性化する薬剤を同定することまたは特徴付けることを含む。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、アッセイは、アポトーシス、壊死、オートファジー、遊走、上皮－間葉系移行、Ｔ細胞活性化、Ｔ細胞エフェクター機能または細胞の任意の機能活性を検出することを含む。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、培養培地における培養の間、またはその後に、細胞を検出可能な標識と接触させてもよい。いくつかの実施形態では、アッセイは、イメージングまたは蛍光活性化セルソーティングを含む。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、薬剤または薬剤の組合せを試験して、培養培地において培養された細胞を使用して、抗がん効果を有するかどうかを決定する、または抗がん効果を定量する。いくつかの実施形態では、抗がん効果は、がん細胞生存または増殖の阻害である。薬剤または薬剤の組合せによる細胞増殖または生存の阻害は、完全である場合も、完全ではない場合もあるということは理解される。例えば、細胞増殖は、細胞増殖の阻害または低減の１つと考えられる効果について、完全停止の状態に減少される場合も、減少されない場合もある。いくつかの実施形態では、「阻害」は、非増殖状態にある細胞（例えば、「静止状態」とも呼ばれるG_0状態にある細胞）の増殖を阻害することおよび／または増殖中の細胞（例えば、静止状態ではない細胞）の増殖を阻害することを含み得る。同様に、細胞生存の阻害は、壊死もしくはアポトーシスを引き起こすことまたはそれに寄与すること、および／あるいは細胞を死滅に対して感受性にするプロセス、例えば、アポトーシスもしくは壊死を起こす細胞の傾向を引き起こすことまたは増加させることなどによる、細胞（複数可）の死滅を指し得る。阻害は、参照レベル（例えば、対照レベル）の少なくとも約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９９％または約１００％であり得る。いくつかの実施形態では、抗がん効果は、懸濁培養中で、または軟寒天もしくはメチルセルロースなどの半固体培地中でコロニーを形成する、あるいはポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）などの低付着表面で成長するがん細胞の能力の阻害である。いくつかの実施形態では、抗がん効果は、１種または複数種のがん細胞の、培養において腫瘍球を形成する能力の阻害である。がん細胞を、コロニー形成アッセイ、成長アッセイまたは腫瘍球形成アッセイに先立って、および／またはその間、培養培地において培養してもよい。いくつかの実施形態では、抗がん効果は、１種または複数種のがん細胞の、非ヒト哺乳動物、例えば、マウスに導入した後にｉｎ　ｖｉｖｏでがんを形成する能力の阻害である。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、アッセイは、本明細書において開示される培養培地において培養された細胞の成長速度を測定することを含む。いくつかの実施形態では、細胞を、試験薬剤が添加されている培地で培養する。いくつかの実施形態では、アッセイは、試験薬剤が添加されている培地において培養された細胞を使用して試験薬剤のEC_{50}を測定することを含む。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、アッセイを、培養培地において培養された細胞を使用して実施し、結果を、同一アッセイを、同一の型であるが、従来の培養培地（例えば、ＲＰＭＩ＋ＩＦＳ）において培養された細胞を使用して実施する場合に得られる結果と比較する。結果に相違がある場合には、試験薬剤（もしくはその活性）またはアッセイにおいて解析または試験されている細胞プロセス、特性、表現型もしくは生物学的経路は、環境の代謝組成物によって影響を受けると結論付けることができる。所望の場合には、試験薬剤、活性、細胞プロセス、特性、表現型または生物学的経路に影響を及ぼす特定の代謝産物（複数可）を、例えば、培養培地から１種もしくは複数種の代謝産物または代謝産物の群を体系的に省くこと、および得られた培養培地のうちどれが、効果をもはや示さない結果をもたらすかを決定することによって同定できる。特定の代謝産物または代謝産物の群を省くことが、効果を大幅にまたは完全に無効にする場合には、このような代謝産物（複数可）が効果の原因となっていると推測することができる。この方法を使用して、例えば、治療剤の有効性および／または毒性に影響を及ぼし得る代謝産物－薬物相互作用を同定することができる。

【０１４１】

いくつかの態様では、アッセイは、がん細胞に対する１種もしくは複数種の薬剤または遺伝子改変の効果を、非がん細胞（例えば、がん細胞と同一細胞型の非がん細胞）に対するこのような薬剤または遺伝子改変の効果と比較すること、あるいは２種もしくはそれよりも多い異なる型のがん細胞に対する１種もしくは複数種の薬剤または遺伝子改変の効果を比較することを含み得る。このような比較によって、例えば、腫瘍特異的傾向（がん細胞（もしくは特定のがんの型）中に存在する、または非がん細胞と比較してがん細胞においてより著しい脆弱性）を同定することができ、次いで、これを治療目的のために開発することができる。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、培養培地において培養された細胞を、個別化医療のために使用してもよい。例えば、細胞を被験体から単離し、培地中で培養し、１種または複数種の治療剤の効果を試験するために、例えば、細胞を効果的に死滅させる薬剤または薬剤の組合せを同定するために使用してもよい。ある特定の実施形態では、細胞は、がん細胞を含み、本方法を使用して、被験体を処置するための適切な薬剤または薬剤の組合せを選択してもよい。用語「被験体」とは、細胞を単離することができるおよび／または薬剤を投与することができる個体に関連して本明細書で使用される場合、任意の動物を指す。ある特定の実施形態では、被験体は哺乳動物である。特定の目的のある特定の実施形態では、用語「被験体」とは、ヒトを指す。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示される培養培地において培養された細胞を細胞療法目的で使用してもよい。このような実施形態では、培養培地は、血清およびその他の少なくとも部分的に特徴付けられていない動物由来産物を含まないものであり得る。「細胞療法」とは、治療目的の被験体の身体への生存細胞の導入を指す。細胞は、自己または非自己であり得る。細胞療法は、養子免疫療法（Ｔ細胞などの免疫細胞が被験体中に導入される）、細胞または組織移植（例えば、再生医療目的の、例えば、幹細胞または前駆細胞療法）ならびにサイトカイン、ケモカインおよび成長因子などの可溶性因子を放出する能力を有する細胞の導入を包含する。いずれかの理論に束縛されることを望まないが、成人ヒト血液中に見出されるが、従来の培養培地中に存在しない小極性化合物を含有する培養培地において培養された細胞または組織は、ひとたびレシピエント中に導入されると遭遇する条件に、このような構成成分を欠く培地において培養された細胞または組織が行うよりも良好に適応し得る。いずれかの理論に束縛されることを望まないが、成人ヒト血液中に見出されるが、従来の培養培地中に存在しない小極性化合物を含有する培養培地において培養された細胞または組織は、ひとたびレシピエント中に導入されると、このような構成成分を欠く培地において培養された細胞または組織が行うよりも効率的に生存および／または機能し得る。

【０１４４】
いくつかの実施形態では、開示される培養培地において培養された細胞を、診断目的で使用してもよい。例えば、細胞を、障害、例えば、代謝障害を有すると疑われる被験体から得、培地で培養してもよく、その後、１種または複数種の細胞内または分泌された代謝産物のレベルを測定し、参照レベルと比較してもよい。参照レベルは、例えば、健常被験体に由来する対照細胞中に存在する、もしくはそれによって分泌されるこのような代謝産物（複数可）のレベルまたは特定の障害を有すると知られている被験体に由来する細胞中に存在する、もしくはそれによって分泌されるこのような代謝産物（複数可）のレベルであり得る。
【０１４５】
いくつかの実施形態では、培養培地において培養された細胞を使用して、治療上有用なタンパク質などの目的の産物を産生してもよい。
ＩＩＩ．さらなる方法および組成物
【０１４６】
いくつかの態様では、尿酸は、ｄｅ　ｎｏｖｏピリミジン生合成経路の最後の２ステップを触媒する酵素であるＵＭＰシンターゼ（ＵＭＰＳ）の阻害剤として作用し得る。哺乳動物細胞においてＵＭＰＳの活性をモジュレートする方法であって、細胞を、細胞において尿酸レベルをモジュレートする薬剤と接触させることを含む方法が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、方法は、細胞を、尿酸レベルを増加させ、それによって、ＵＭＰＳを阻害する薬剤と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、細胞を、尿酸レベルを低下させ、それによってＵＭＰＳの活性を増加させる薬剤と接触させることを含む。また、哺乳動物被験体においてＵＭＰＳの活性をモジュレートする方法であって、尿酸レベルをモジュレートする薬剤を被験体に投与することを含む方法が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、方法は、尿酸低下剤を被験体に投与し、それによって、ＵＭＰＳの活性を増加させることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、尿酸上昇剤を被験体に投与し、それによってＵＭＰＳの活性を低下させることを含む。
【０１４７】
いくつかの態様では、本開示は、細胞内代謝産物が、治療剤の活性に影響を及ぼし得るという洞察を提供する。例えば、代謝産物は、治療剤を阻害し、それによって、その有効性を低減し得る。代謝産物は、治療剤の活性に直接的（すなわち、それへの結合によって）または間接的に影響を及ぼし得る。間接的阻害は、代謝産物モジュレート、例えば、細胞内酵素の活性を阻害することに起因し得る。細胞内酵素は、治療剤に作用して、それをより活性な形態に変換するものであり得る。
【０１４８】
いくつかの態様では、治療剤の活性をモジュレートする方法であって、治療剤の活性に影響を及ぼす代謝産物の細胞内レベルをモジュレートすることを含む方法が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、代謝産物は、治療剤の活性を増加させ、それによってその有効性を増大し、方法は、代謝産物のレベルを増加させることを含む。代謝産物のレベルは、例えば、代謝産物自体を投与すること、代謝産物の前駆体を投与すること、または代謝産物の排泄の低下もしくは代謝産物の産生の増加を引き起こす薬剤を投与することによって増加させることができる。いくつかの実施形態では、代謝産物は、治療剤の活性を低減し、それによって、その有効性を低減し、方法は、代謝産物のレベルを低下させることを含む。代謝産物のレベルは、例えば、排泄の増加もしくは代謝産物の産生の低下を引き起こす薬剤または代謝産物を分解する薬剤を投与することによって低下させることができる。治療剤の活性をモジュレートするある特定の方法は、本明細書において例示されており、ここでは、治療剤は、５－フルロウラシル（５－ＦＵ；ＣＡＳレジストリー番号５１－２１－８）または５－ＦＵプロドラッグであり、代謝産物は尿酸である。例えば、本明細書において記載されるように、尿酸は、ＵＭＰＳを阻害する。ＵＭＰＳを阻害することによって、尿酸は、オロテートの蓄積を誘導し、順に、その細胞傷害性効

果を媒介する５－ＦＵのフルオロヌクレオチド誘導体への代謝をアンタゴナイズする。例えば、オロテートは、ＵＭＰＳのオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＯＰＲＴ）ドメインによる、ＦＵＭＰへのその直接変換について５－ＦＵと競合する。したがって、尿酸は、ヒト血漿において見出される通常の濃度で、５－ＦＵの活性を阻害する。しかし、開示された方法は、その他の治療剤および代謝産物に適用できる。いくつかの実施形態では、治療剤は、抗がん剤である。いくつかの実施形態では、治療剤は抗代謝産物である。いくつかの実施形態では、治療剤は、プリンアナログ、ピリミジンアナログ、ヌクレオシドアナログまたはヌクレオチドアナログである。

【０１４９】

ある特定の実施形態では、治療剤は、５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグである。用語「プロドラッグ」とは、本明細書で使用される場合、被験体への投与後に、薬理学的に活性な、またはより薬理学的に活性な化合物に変換される化合物を指す。５－ＦＵは、それ自体プロドラッグである。５－ＦＵおよび５－ＦＵプロドラッグは、さまざまながんの処置において使用される。「がん」とは、制御できないほどに増殖し、正常身体組織に浸潤し、破壊する能力を有する、異常細胞（がん細胞）の発達によって特徴付けられる疾患のクラスを指す。用語「がん」は、本明細書において「腫瘍」または「新生物」と交換可能に使用されてもよく、被験体における特定の固形腫瘍塊またはがん細胞の群を指すために、ならびに疾患自体を指すために使用されてもよい。がんは、悪性固形腫瘍塊（例えば、癌、肉腫）の形成によって特徴付けられる疾患およびさらに検出可能な固形腫瘍塊がない場合もある白血病などの血液学的がんも含む。本明細書で使用される場合、用語「がん」は、それだけには限らないが、以下の型のがん：乳がん、胆道がん、膀胱がん、脳がん（例えば、神経膠芽腫（例えば、星状細胞腫）、髄芽腫）；子宮頸がん；絨毛癌；結腸がん；子宮内膜がん；食道がん；胃がん；血液学的がん；ボーエン疾患およびパジェット疾患を含む上皮内新生物；肝臓がん（例えば、肝細胞癌）；肺がん（例えば、気管支原性癌、小細胞肺がん（ＳＣＬＣ）、非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）、肺の腺癌）；ホジキン疾患および非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫；神経芽細胞腫；黒色腫；眼のがん（例えば、眼球内黒色腫、網膜芽細胞腫）；口腔がん（例えば、口腔扁平上皮癌）；卵巣がん（例えば、上皮細胞、間質細胞、胚細胞または間葉系細胞から生じる）；膵臓がん；前立腺がん；直腸がん；肛門がん；血管肉腫、消化管間質腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫および骨肉腫を含む肉腫；腎細胞癌およびウィルムス腫瘍を含む腎臓がん；基底細胞癌および扁平上皮がんを含む皮膚がん；セミノーマ、非セミノーマ（テラトーマ、絨毛癌）、間質腫瘍および胚細胞腫瘍などの胚性腫瘍（ｇｅｒｍｉｎａｌ　ｔｕｍｏｒ）を含む精巣がん；喉のがん（例えば、喉頭がん、咽頭がん、鼻咽頭がん、口腔咽頭がん）、甲状腺がん（例えば、甲状腺腺癌および髄様癌）を含む。「癌」とは、上皮細胞から生じるがんまたはそれから生じたと考えられるがんを指し、例えば、がんの細胞は、上皮細胞に典型的な種々の分子的、細胞的および／または組織学的特徴を有する。「血液学的がん」とは、造血系およびリンパ系組織のがんを指す。血液学的がんは、例えば、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、髄外形質細胞腫、骨髄異形成症候群および骨髄増殖性疾患などのその他の悪性形質細胞新生物を含む。白血病は、例えば、骨髄性白血病（例えば、急性骨髄性白血病（ａｃｕｔｅ　ｍｙｅｌｏｉｄ　ｌｅｕｋｅｍｉａ：ＡＭＬ、急性骨髄性白血病（ａｃｕｔｅ　ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ　ｌｅｕｋｅｍｉａ）または急性非リンパ性白血病としても知られる）、急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）、急性骨髄単球性白血病（ＡＭｏＬ））、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ））およびリンパ性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ、急性リンパ芽球性白血病とも呼ばれる）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）およびヘアリー細胞白血病）を含む。リンパ腫は、例えば、非ホジキンリンパ腫（例えば、Ｂ細胞リンパ腫（例えば、マントル細胞リンパ腫、小Ｂ細胞リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症（リンパ形質細胞性リンパ腫としても知られる））、Ｔ細胞リンパ腫（例えば、未分化大細胞リンパ腫（例えば、ＡＬＫ陽性またはＡＬＫ陰性）、末梢Ｔ細胞リンパ腫、成人Ｔ細胞白血病／リンパ腫）およびＮＫ細胞リンパ腫）およびホジキンリンパ腫を含む。

【０１５０】
５－ＦＵプロドラッグは、フルオロピリミジンカペシタビン（ＣＡＳレジストリー番号１５４３６１－５０－９）およびテガフール（ＣＡＳレジストリー番号００１７９０２－２３－７）を含む。本開示のある特定の実施形態によれば、尿酸低下剤を被験体に投与することによって、哺乳動物被験体、例えば、ヒト被験体におけるフルオロピリミジン、例えば、５－ＦＵの活性が増強される。本開示は、がんの処置を必要とする被験体を処置する方法であって、５－ＦＵ、５－ＦＵプロドラッグまたは尿酸低下剤を被験体に投与することを含み、その結果、被験体が５－ＦＵおよび尿酸低下剤の両方に曝露される方法を提供する。したがって、いくつかの態様では、本開示は、（ｉ）５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグと、（ｉｉ）尿酸低下剤とを含む併用療法を提供する。「併用療法」とは、本明細書で使用される場合、被験体が同時に両方の薬剤に対して曝露されるような２種もしくはそれよりも多い薬剤の投与、および／またはいずれかの薬剤単独（または３種もしくはそれよりも多い薬剤の場合には、薬剤の任意の部分的組合せ）の投与に比べて全体的に改善された治療効果（増大された有効性、低減された副作用または両方であり得る）を薬剤が一緒に達成することを可能にする時間間隔内に、２種もしくはそれよりも多い薬剤の投与を指定する所定の投薬スキームに従う２種もしくはそれよりも多い薬剤の投与を指す。いくつかの実施形態では、２種またはそれよりも多い薬剤を、互いに２４、４８または７２時間内に投与してもよい。いくつかの実施形態では、２種またはそれよりも多い薬剤を、互いに１、２または４週間以内に投与してもよい。いくつかの実施形態では、５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグおよび尿酸低下剤を、同一組成物中で投与する。いくつかの実施形態では、５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグおよび尿酸低下剤を、別個の組成物中で投与する。別個の組成物中で投与される場合には、いくつかの実施形態では、２種またはそれよりも多い薬剤を例えば、最大２４、４８または７２時間以内に別々に、いくつかの実施形態では、最大１、２、３または４週間以内に別々に投与してもよい。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤は、－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグの投与の最大２４、４８または７２時間前に少なくとも１回投与してもよく、逆もまた同じ。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤は、－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグの投与の最大１、２、３または４週間前に少なくとも１回投与してもよく、逆もまた同じ。各薬剤の複数回用量を投与してもよい（例えば、数週間または数ヶ月の期間にわたって）ということは理解されよう。いくつかの実施形態では、１回または複数回の一続きの処置を投与する。

【０１５１】
いくつかの実施形態では、がんは、肛門がん、乳がん、結腸直腸がん、食道がん、頭頸部がん、膵臓がん、胃がんおよび皮膚がんから選択される。

【０１５２】
いくつかの実施形態では、がんは、（例えば、尿酸による阻害の不在下で）少なくとも部分的にＯＰＲＴ媒介性合成によってＦＵＭＰを生成するがん細胞を含む。例えば、いくつかの実施形態では、がんにおいて生成した（例えば、尿酸による阻害の不在下で）ＦＵＭＰのうち少なくとも約２５％、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％またはそれよりも多くが、ＯＰＲＴ媒介性合成によって生成される。

【０１５３】
いくつかの実施形態では、被験体をまた、５－ＦＵバイオアベイラビリティを増加させる薬剤、例えば、酵素ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの阻害剤（例えば、ウラシル、エニルウラシルもしくはギメラシル）および／または５－ＦＵ毒性を減少させる薬剤、例えば、酵素オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの阻害剤（例えば、オテラシル）を用いて処置してもよい。がんを処置する方法は、１種または複数種のこのような薬剤を被験体に投与することをさらに含み得る。当業者ならば、５－ＦＵおよび５－ＦＵプロドラッグが、通常、その他の抗がん剤と組み合わせて使用されるということを理解する。例えば、５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグは、フォリン酸（ロイコボリンとしても知られる）、オキサリプラチン（もしくはシスプラチンなどのその他の白金ベースの薬物）ならびに／またはイリノテカン、例えば、５－フルオロウラシル、ロイコボリンおよびイ

リノテカンと組み合わせて使用してもよい。がんを処置する方法は、１種または複数種のこのような薬剤を被験体に投与することをさらに含み得る。

【０１５４】

本明細書で使用される場合、被験体に関連して「処置」または「処置すること」は、障害（例えば、がん）の寛解、治癒および／または治癒の維持（すなわち、再燃（ｒｅｌａｐｓｅ）の予防もしくは遅延および／または再発（ｒｅｃｕｒｒｅｎｃｅ）の可能性の低減）を含む。障害が開始した後の処置は、障害および／もしくはその関連症状を低減する、寛解させるまたは完全に取り除くこと、それが悪化することを防ぐこと、進行の速度を減速すること、またはそれがひとたび最初に障害が排除されると再発すること（ｒｅ－ｏｃｃｕｒｒｉｎｇ）を防ぐこと（すなわち、再燃を防ぐこと）を目的とする。処置することは、障害に対してそれ自体では有益な効果を有さないこともあるが、障害に対して有益な効果を有する被験体に投与された第２の薬剤の有効性を増大させる薬剤の投与を包含する。

【０１５５】

尿酸レベルを増加させる薬剤と関連する本明細書において記載される組成物および／または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、尿酸レベルを増加させる薬剤は、尿酸自体である。いくつかの実施形態では、尿酸レベルを低下させる薬剤は、尿酸排泄剤、キサンチンオキシダーゼ阻害剤またはウリカーゼである。

【０１５６】

尿酸低下剤と関連する本明細書において記載される組成物および／または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、尿酸低下剤は、尿酸排泄剤である。尿酸排泄剤は、尿中への尿酸の排泄を増加させ、それによって、血液中の尿酸の濃度を低減する物質である。このような薬剤は、通常、腎臓において近位尿細管に対して作用し、ここで、尿から血液に戻る尿酸の吸収を妨げる。いくつかの実施形態では、尿酸排泄剤は、ＵＲＡＴ１阻害剤、すなわち、尿酸輸送体１（ＵＲＡＴ１）を阻害する化合物、遺伝子ＳＬＣ２２Ａ１２によってコードされ、普通、腎近位尿細管の頂端膜を越える尿細管細胞へのウレート（ｕｒａｔｅ）の輸送において機能するタンパク質である。ＵＲＡＴ１阻害剤としては、ロサルタン、レシヌラド（２－（（５－ブロモ－４－（４－シクロプロピルナフタレン－１－イル）－４Ｈ－１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオ）酢酸）（Ｍｉｎｅｒ，　Ｊ．ら、（２０１６年）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｅｓ　Ｔｈｅｒ．　１８巻（１号）：２１４頁）、ＵＲ－１１０２（Ａｈｎ，　ＳＯら、（２０１６年）Ｊ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｅｘｐ　Ｔｈｅｒ．　３５７巻（１号）：１５７～６６頁）、プロベネシドおよびベンズブロマロンが挙げられる。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤、例えば、ＵＲＡＴ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１３／０２０２５７３号、同２０１４／０１４２１８５号、同２０１５／０２０３４９０号、同２０１５／０１９１４６３号、同２０１５／０３２２００６号、同２０１６／０２２１９７０号および／または同２０１６／０２５０１９３号のいずれかに記載される化合物である。

【０１５７】

尿酸低下剤と関連する本明細書において記載される組成物および／または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、尿酸低下剤は、尿酸の５－ヒドロキシイソウレートへの酸化を触媒する酵素である、ウリカーゼとも呼ばれる尿酸オキシダーゼ（ＵＯ）を含む。ウリカーゼは、天然供給源から精製できるか、または組換えによって産生できる。ラスブリカーゼ（商標名、米国ではＥｌｉｔｅｋ（登録商標）および欧州ではＦａｓｔｕｒｔｅｃ）は、遺伝子改変されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ株によって産生された尿酸オキシダーゼの組換え版である。Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｌａｖｕｓの株からラスブリカーゼをコードするｃＤＮＡをクローニングした。ラスブリカーゼは、３０１個のアミノ酸長を有する同一ポリペプチドサブユニットの四量体タンパク質である。当業者ならば、その他の生物（例えば、その他の真菌、植物、非ヒト動物）に由来するウリカーゼを使用してもよいことを理解する。その承認された適応症のための、すなわち、腫瘍溶解およびその後の血漿尿酸の上昇をもたらすと予測される、抗がん療法を受けて

いる白血病、リンパ腫および固形腫瘍悪性疾患を有する患者における血漿尿酸レベルの最初の管理のためのラスブリカーゼの推奨用量は、毎日の静脈内注入として最大５日間投与される０．２０ｍｇ／ｋｇ／日である（Ｊｅｎａ、２０１０年）が、いくつかの研究において、より短い処置期間（例えば、単回投与）、より少ない投与量または固定用量（例えば、３ｍｇ、６ｍｇ、７．５ｍｇ）が有効であるとわかった（例えば、Ｔｒｉｆｉｌｉｏ ＳＭ．（２００６年）Ｔｈｅ ｅｆｆｅｃｔｉｖｅｎｅｓｓ ｏｆ ａ ｓｉｎｇｌｅ ３－ｍｇ ｒａｓｂｕｒｉｃａｓｅ ｄｏｓｅ ｆｏｒ ｔｈｅ ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ ｏｆ ｈｙｐｅｒｕｒｉｃｅｍｉａ ｉｎ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｈｅｍａｔｏｌｏｇｉｃａｌ ｍａｌｉｇｎａｎｃｉｅｓ ｈａｓ ｂｅｅｎ ｄｅｓｃｒｉｂｅｄ ｉｎ Ｂｏｎｅ Ｍａｒｒｏｗ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．３７巻：９９７～１００１頁；ＭｃＢｒｉｄｅ Ａら（２０１３年）Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ｓｉｎｇｌｅ ｆｉｘｅｄ ｄｏｓｉｎｇ ａｎｄ ｗｅｉｇｈｔ－ｂａｓｅｄ ｄｏｓｉｎｇ ｏｆ ｒａｓｂｕｒｉｃａｓｅ ｆｏｒ ｔｕｍｏｒ ｌｙｓｉｓ ｓｙｎｄｒｏｍｅ ｈａｓ ｂｅｅｎ ｄｅｓｃｒｉｂｅｄ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒａｐｙ．３３巻（３号）：２９５～３０３頁を参照のこと）。いくつかの実施形態では、本開示は、約１０μｇ／ｋｇから約０．２ｍｇ／ｋｇの間の用量でウリカーゼを投与することを意図する。いくつかの実施形態では、本開示は、そうでなければその投与の候補ではない可能性がある被験体、例えば、腫瘍溶解および血漿尿酸の上昇を起こすと予測されない被験体へのウリカーゼの投与を意図する。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、尿酸低下剤が、５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグと組み合わせて投与される被験体は、正常範囲を超える尿酸レベルを有する。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤が、５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグと組み合わせて投与される被験体は、正常範囲内の尿酸レベルを有する。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤が投与される被験体は、異常に高い尿酸レベルと関連する障害、例えば、痛風を患っていない。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤は、被験体の血漿尿酸レベルを約５％から約９５％の間、例えば、少なくとも約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％または約９０％低減する量で投与される。いくつかの実施形態では、被験体の尿酸レベルは、約３５０μＭ未満、例えば、約３００μＭ未満、約２００μＭ未満、約１５０μＭ未満または約１００μＭ未満に低減される。いくつかの実施形態では、血漿尿酸レベルは、薬物の投与の約２４時間後に測定されたレベルであり得る。

【０１５９】

尿酸低下剤と関連する本明細書において記載される組成物および／または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、尿酸低下剤は、キサンチンオキシダーゼ阻害剤を含む。用語「キサンチンオキシダーゼ阻害剤」とは、プリン代謝に関与する酵素であるキサンチンオキシダーゼの活性を阻害する物質を指す。キサンチンオキシダーゼの阻害は、尿酸の産生を低減する。いくつかの実施形態では、キサンチンオキシダーゼ阻害剤は、フェブキソスタットまたはトピロキソスタットを含む。いくつかの実施形態では、キサンチンオキシダーゼ阻害剤は、チアジアゾロピリミジン－５－オン（Ｓａｔｈｉｓｈａ ＫＲら（２０１６年）Ｅｕｒ Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．７７６巻：９９～１０５頁）、アリール－２Ｈ－ピラゾール誘導体（Ｓｕｎ ＺＧら（２０１５年）Ｃｈｅｍ Ｐｈａｒｍ Ｂｕｌｌ（Ｔｏｋｙｏ）；６３巻（８号）：６０３～７頁）または２－アミノ－５－アルキリデン－チアゾール－４－オン（Ｓｍｅｌｃｅｒｏｖｉｃ Ｚら（２０１５年）Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ Ｉｎｔｅｒａｃｔ．２０１５年；２２９巻：７３～８１頁）、２－（インドール－５－イル）チアゾール誘導体（Ｓｏｎｇ ＪＵら（２０１５年）Ｂｉｏｏｒｇ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ Ｌｅｔｔ．２５巻（６号）：１２５４～５８頁）または１－ヒドロキシ／メトキシ－４－メチル－２－フェニル－１Ｈ－イミダゾール－５－カルボン酸誘導体（ＣｈｅｎＳら（２０１５年）Ｅｕｒ Ｊ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ．１０３巻：３４３～５３頁）を含む。好ましい実施形態では、キサンチンオキシダーゼ阻害剤は、ＵＭＰＳを阻害しない。例

えば、いくつかの実施形態では、キサンチンオキシダーゼ阻害剤は、ＵＭＰＳ、例えば、アロプリノールを阻害するプリンヌクレオチドを含まない。いくつかの実施形態では、キサンチンオキシダーゼ阻害剤は、オキシプリノールまたはチスプリン（ｔｉｓｕｐｕｒｉｎｅ）を含まない。いくつかの実施形態では、キサンチンオキシダーゼ阻害剤は、プリンヌクレオチドを含まない。いくつかの実施形態では、尿酸低下剤は、キサンチンオキシダーゼ阻害剤を含まない。

【０１６０】

薬剤（例えば、５－ＦＵ、５－ＦＵプロドラッグまたは尿酸低下剤）を、薬学的に許容されるキャリアまたはビヒクルなどと組み合わせて、適切な医薬組成物を作製してもよい。用語「薬学的に許容されるキャリアまたはビヒクル」とは、ともに製剤化される化合物の薬理学的活性を破壊しない非毒性キャリアまたはビヒクルを指す。当業者ならば、キャリアまたはビヒクルは、被験体への過度の毒性を引き起こさない化合物を送達するのに適切な量での投与に適合している場合に「非毒性」であるということを理解する。使用してもよい薬学的に許容されるキャリアまたはビヒクルとしては、それだけには限らないが、水、生理食塩水、Ｒｉｎｇｅｒ溶液、酢酸ナトリウムまたは酢酸カリウム溶液、５％デキストロースなどが挙げられる。組成物は、適宜所望の製剤化のためにその他の構成成分を含み得る。

【０１６１】

医薬組成物は、それだけには限らないが、血管内（静脈内、動脈内）、筋肉内、皮下、脳内、髄腔内（ｉｎｔｒａｔｈｅｃａｌ）、鼻腔内および肺などの非経口経路ならびに経口、舌下および直腸など消化管経路を含む任意の適した投与経路によって被験体に投与してもよい。いくつかの実施形態では、全身投与経路を使用してもよい。いくつかの実施形態では、障害によって冒された組織または臓器への局所投与を使用してもよい。例えば、いくつかの実施形態では、腫瘍内投与を使用してもよい。

【０１６２】

化合物または組成物、例えば、医薬組成物を、有効量で被験体に使用または投与してもよい。いくつかの実施形態では、「有効量」とは、例えば、活性薬剤（または組成物）が投与される被験体において、目的の１つまたは複数の生物学的応答を誘発するのに十分な量を指す。当業者には明らかであるが、有効である絶対量は、生物学的エンドポイント、特定の活性薬剤、標的組織などといった因子に応じて変わり得る。当業者ならば、「有効量」は、単回用量で投与されてもよく、複数回用量の投与によって達成されてもよいということをさらに理解する。いくつかの実施形態では、有効量の尿酸低下剤は、被験体の血液尿酸レベルを少なくとも約１０％または少なくとも約３０μＭ低減するのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量の尿酸低下剤は、がんを有する被験体において５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグの有効性を改善するのに十分な量であり得る。ある特定の実施形態では、例えば、血液学的がんまたは脳腫瘍についての、固形腫瘍における応答評価基準（Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｃｒｉｔｅｒｉａ Ｉｎ Ｓｏｌｉｄ Ｔｕｍｏｒｓ）（ＲＥＣＩＳＴ）ガイドライン（Ｔｈｅｒａｓｓｅ， Ｐ．ら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、９２巻（３号）：２０５～２１６頁（２０００年）または改訂ＲＥＣＩＳＴガイドライン（バージョン１．１）（Ｅｉｓｅｎｈａｕｅｒ， Ｅ．Ａ．ら、Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ．４５巻（２号）：２２８～４７頁（２００９年））またはその他の一般に受け入れられたガイドラインを使用して定義されるような、がんを有する被験体の客観的応答を使用してもよい。例えば、アウトカムを完全奏効、部分奏効、進行性疾患または安定疾患として分類してもよい。

【０１６３】

一般に、適切な用量は、少なくとも部分的に薬剤の効力、投与経路などに応じて変わる。一般に、有効であり、十分に許容される用量範囲は、当業者によって選択することができる。このような用量は、当技術分野で公知の臨床試験を使用して決定することができる。必要に応じて、例えば、所定の望ましい応答が達成されるまでの漸増する用量の投与に

よって、用量を特定のレシピエントに合わせてもよい。所望の場合には、任意の特定の（ｐａｒｔｉｃｕｌａｒ）被験体のための特定の（ｓｐｅｃｉｆｉｃ）用量レベルを、用いられる特定の化合物の活性、処置されている特定の状態および／またはその重症度、年齢、体重、全身の健康、投与経路、任意の同時薬物療法を含む種々の因子に少なくとも部分的に基づいて選択してもよい。いくつかの実施形態では、有効量または用量は、約０．００１ｍｇ／ｋｇ～約５００ｍｇ／ｋｇ体重、例えば、約０．０１～約１００ｍｇ／ｋｇ体重の範囲である。用量は、体重よりも体表面積に基づいて算出してもよい。いくつかの実施形態では、固定用量を使用する。いくつかの実施形態では、固定用量は、例えば、約０．１ｍｇ～約１ｇの活性薬剤の範囲であり得る。

【０１６４】

当業者ならば、本発明は、目的を実施し、記載された目標および利点ならびに本明細書において固有の目標及び利点を得るように十分に適合されることを容易に理解する。本明細書における説明および実施例の詳細は、ある特定の実施形態の代表的なものであり、例示的なものであり、本発明の範囲に対する制限として意図されない。その中における修飾およびその他の使用は、当業者に想起される。これらの修飾は、本発明の趣旨内に包含される。様々な置換および改変を、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に行うことができるということは、当業者には容易に明らかである。

【０１６５】

本明細書および本特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、冠詞「ａ（１つの）」、「ａｎ（１つの）」、および「ｔｈｅ（その）」は、そうでないことが明確に示されていない限り、複数の指示対象を含むと理解されなければならない。反対に示されない限り、あるいは文脈から明らかでない限り、１つ、１つより多く、またはすべての群メンバーが、所与の産物またはプロセスに存在する、利用される、または他の方法でそれに関連する場合に、群の１つまたは複数のメンバー間に「または」を含む請求項または説明が満たされていると見なされる。本開示は、群の正確に１つのメンバーが、所与の産物またはプロセスに存在する、利用される、または他の方法でそれに関連する実施形態を提供する。本開示はまた、群メンバーのうち１つより多い、またはすべてが、所与の産物またはプロセスに存在する、利用される、または他の方法でそれに関連する実施形態も提供する。さらに、本開示は、特に断りのない限り、または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者に明らかとならない限り、列挙された請求項のうちの１つまたは複数からの１つまたは複数の制限、要素、条項、説明用語などが、同一基本請求項に応じて（または任意のその他の請求項と関連するように）、別の請求項に導入されるすべてのバリエーション、組合せおよび並べ替えを提供するということは理解されるべきである。本明細書において記載されるすべての実施形態は、適切な場合には本明細書において記載されるすべての異なる態様に適用可能であるということが意図される。実施形態または態様または教示のいずれも、適切な場合には、このような実施形態（複数可）、態様（複数可）または教示（複数可）が本開示中に現れる場所に関わらず、１つまたは複数のその他のこのような実施形態または態様と自由に組み合わせることができるということも意図される。要素が、例えば、マーカッシュ群または同様の形式で一覧として示される場合には、要素の各サブグループも開示されており、任意の要素（複数可）が群から除去されてもよいということは理解されるべきである。一般に、本発明または本発明の態様が、特定の要素、特徴などを含むと言及される場合には、本発明のある特定の実施形態または本発明の態様は、このような要素、特徴などからなる、またはそれから本質的になるということは理解されなければならない。単純化の目的で、それらの実施形態は、すべての場合において、本明細書において非常に多数の語句で具体的に示されてはいない。指定の排除が本明細書において列挙されるかどうかに関わらず、任意の実施形態または態様が、請求項から明確に排除され得るということも理解されなければならない。例えば、任意の１種または複数種の構成成分、薬剤、障害、被験体またはそれらの組合せが排除され得る。

【０１６６】

請求項または説明が産物（例えば、物質組成（ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍａｔｔ

ｅｒ））と関連する場合には、特に断りのない限り、または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者に明らかとならない限り、本明細書において開示される方法のいずれかに従って、産物を作製または使用する方法、および本明細書において開示される目的のうちいずれか１つまたは複数のための産物を使用する方法が、適切な場合には本開示によって包含されるということは理解されなければならない。請求項または説明が方法と関連する場合には、特に断りのない限り、または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者に明らかとならない限り、本方法の１つまたは複数のステップを実施するために有用な産物（複数可）、例えば、物質組成、デバイス（複数可）またはシステム（複数可）が、適切な場合には本開示によって包含されるということは理解されなければならない。

【０１６７】

一連の数値が本明細書において示される場合には、一連の中の任意の２つの値によって定義される任意の介在する値または範囲に類似して関する実施形態、および最小値が最小としてとられ得、最大値が最大としてとられ得る実施形態が提供される。「少なくとも」、「最大」などの語句または同様の語句が、本明細書において一連の数に先行する場合には、文脈が明確に別を示さない限り、語句が、種々の実施形態において一覧中の各数に当てはまるということが理解されるべきである。例えば、「少なくとも１、２または３」は、種々の実施形態において「少なくとも１、少なくとも２または少なくとも３」を意味すると理解されなければならない。適切な場合には、ありとあらゆる妥当な下限および上限が明確に意図される。妥当な下限または上限は、例えば、利便性、費用、時間、労力、入手可能性（例えば、試料、薬剤または試薬の）、統計的考察などといった因子に基づいて当業者によって選択または決定することができる。いくつかの実施形態では、上限または下限は、特定の値から２、３、５または１０倍だけ異なり得る。

【０１６８】

「およそ」または「約」は、特に断りのない限り、または文脈から明らかでない限り、いずれかの方向に（その数より大きいまたは小さい）１％の範囲内、またはいくつかの実施形態では、数の５％の範囲内、またはいくつかの実施形態では、数の１０％の範囲内に入る数を一般的に含む（このような数が、あり得る値の１００％を許されないほど超える場合を除く）。したがって、本明細書で使用される場合、「約」は、列挙された値よりも最大１０％高いまたは１０％低い値を含む。ある特定の実施形態では、「約」は、列挙された値の±１０％、±９％、±８％、±７％、±６％、±５％、±４％、±３％、±２％、±１％、±０．５％または±０．１％を示す。数値に「約」または「およそ」が前に置かれている各実施形態について、正確な値が列挙される実施形態が提供されている。数値に「約」または「およそ」が前に置かれていない各実施形態について、値に「約」または「およそ」が前に置かれている実施形態が提供されている。数値は、本明細書で使用される場合、数およびパーセンテージとして表される値も含む。

【０１６９】

反対のことが明確に示されない限り、１より大きい行為を含む本明細書において特許請求される任意の方法において、方法の行為の順序は、方法の行為が列挙されている順序に必ずしも制限されないが、本発明は、順序がそのように制限される実施形態を含むということは理解されなければならない。いくつかの実施形態では、方法を、個体または実体（ｅｎｔｉｔｙ）によって実施され得る。いくつかの実施形態では、方法がまとめて実施されるように、方法のステップを、２つもしくはそれより多い個体または実体によって実施され得る。いくつかの実施形態では、方法を、方法の１つ、１つより多いまたはすべてのステップを実施するように、要請または許可を出している別の個体または実体によって少なくとも部分的に実施され得る。

【０１７０】

特に断りのない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書において記載される任意の産物または組成物を「単離された」と考えてもよいということも理解されなければならない。

【０１７１】

本明細書において使用される節の見出しは、決して制限と解釈されてはならない。任意の節の見出しの下に示される主題は、本明細書において記載される任意の態様または実施形態に適用可能であり得ることは明確に意図される。

【０１７２】

本明細書における実施形態または態様は、本明細書において記載される任意の組成物、物品、キットおよび／または方法を対象とし得る。任意の１つもしくは複数の実施形態または態様を、適切な場合には、任意の１つもしくは複数のその他の実施形態または態様と自由に組み合わせることができるということが意図される。本明細書においていかなる場所でも用語の任意の説明または例示は、別に示されない、または明確に明らかでない限り、このような用語が本明細書において現れる場合はどこでも（例えば、このような用語が関連する任意の態様または実施形態において）適用され得るということは理解される。

【０１７３】

本明細書において記載されるすべての刊行物、特許、データベースおよびその他の参考文献は、その全文がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【０１７４】

（実施例１）

ヒト血漿の極性代謝産物組成を反映する細胞培養培地

公知の合成細胞培養培地、ＢＭＥ、ＭＥＭ、ＤＭＥＭ、およびＲＰＭＩ　１６４０はグルコース、アミノ酸、ビタミン、および塩をヒト血漿の濃度を大部分反映していない濃度で含有する（図１Ａ）。これらの培地は、血漿の質量分析およびＮＭＲ分析により存在していることが明らかにされた追加の構成成分も欠く（Ｐｓｙｃｈｏｇｉｏｓら、２０１１年）。代わりに、基本培地は多くの場合、熱不活化したウシ胎仔血清（ＩＦＳ）を補充され、この血清は未定義で多くの場合非説明の（ｕｎａｃｃｏｕｎｔｅｄ　ｆｏｒ）代謝産物のカクテル、ならびに細胞増殖に必要な成長因子およびホルモンを与える（Ｆｒｅｓｈｎｅｙ、２０１０年）。したがって、細胞代謝に対する環境因子の影響はよく認識されている（Ｄａｖｉｄｓｏｎら、２０１６年；ＤｅＮｉｃｏｌａおよびＣａｎｔｌｅｙ、２０１５年；Ｈｅｎｓｌｅｙら、２０１６年；Ｍａｄｄｏｃｋｓら、２０１３年；Ｍａｙｅｒｓら、２０１６年；ＰａｖｌｏｖａおよびＴｈｏｍｐｓｏｎ、２０１６年；Ｙｕｎｅｖａら、２０１２年）が、ヒト血漿の代謝産物組成をよりよく反映する培地中の培養細胞の疑問（ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｉｏｎ）は大部分が未調査である（図１Ｂ）。

【０１７５】

健康な成人ヒト由来の血漿について報告されている濃度での代謝産物および塩イオンの定義済みのコレクションを有する培養培地（ヒト血漿様培地；ＨＰＬＭ）が本明細書で開示される。（Ｐｓｙｃｈｏｇｉｏｓら、２０１１年；Ｗｉｓｈａｒｔら、２０１３年）。一部の無血清培地は完全に定義された配合表（ｒｅｃｉｐｅ）を有するが、異なる細胞型の培養を支持するための成長因子の細心な仕立て方を必要とする場合が多い（Ｆｒｅｓｈｎｅｙ、２０１０年）。したがって、公知の成長培地には、未知の濃度の極性代謝産物の添加を最小限に抑えつつ、広範囲な細胞の増殖に必要な成長因子およびホルモンを添加するために１０％の透析ＩＦＳを有するＨＰＬＭ（ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$）を補充した。ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$は本明細書では詳細に記載されているが、手短に言えば、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$はグルコース、タンパク質構成性アミノ酸、塩、２７の追加の極性代謝産物、１０％の透析ＩＦＳおよびビタミンをＲＰＭＩ　１６４０と同じ濃度で含有しており（図１Ｃ、表２）；炭酸水素塩緩衝系を生理的ｐＨで使用し、約２９５ｍＯｓｍ／ｋｇの重量オスモル濃度を有する。

【０１７６】

ＲＰＭＩ　１６４０（本明細書ではＲＰＭＩ）は正常な血液細胞ならびに血液がん細胞を培養するために使用される（Ｆｒｅｓｈｎｅｙ、２０１０年；Ｍｏｏｒｅら、１９６７年）ので、この培地は細胞に対するＨＰＬＭ$^{+dIFS}$の効果を比較するための基準として使用した。２種類のＲＰＭＩ調合物を使用し、それぞれが生理的グルコース（５ｍＭ）を

有するが、１０％のＩＦＳ（ＲＰＭＩ＋ＩＦＳ）または１０％の透析ＩＦＳ（ＲＰＭＩ＋ｄＩＦＳ）のいずれかを補充した。代謝産物プロファイリングにより、ＩＦＳを透析すればその極性代謝産物のレベルが実質的に低減されることが確かめられた（図１Ｄ、表５Ａおよび５Ｂ）。さらに、代謝産物プロファイリングにより、ウシ胎仔血清は成人ヒト血漿の代謝組成を反映するのが不十分であることも明らかにされた。なぜならば、１０％のＩＦＳをＲＰＭＩに添加しても多くの代謝産物についてヒト血漿中の報告されている値の１０％の濃度が得られなかったからであった。同様に、マウス血漿中のグルコースおよび多くのアミノ酸の濃度はヒト血漿中のグルコースおよび多くのアミノ酸の濃度に大部分類似しているが、他の代謝産物の濃度は非常に異なっており、マウス血漿において、少なくとも３～１０倍低い（例えば、カルニチンおよび尿酸）または少なくとも３～１０倍高い（例えば、３－ヒドロキシブチレートおよびタウリン）例が挙げられる（図１Ｄ）。したがって、マウス腫瘍モデルは間質細胞および免疫細胞という文脈での代謝の研究には有用であるが、マウス血漿よりもＨＰＬＭ＋ｄＩＦＳのほうがヒト血漿の極性代謝産物組成を密接に反映している。

【表５Ａ－１】

表5A:培養培地の代謝産物プロファイリングの代表的結果

代謝産物名	**RPMI (+IFS)_avg**	RPMI (+IFS)_sd	**RPMI (+dIFS)_avg**	RPMI (+dIFS)_sd	**HPLM (+dIFS)_avg**	HPLM (+dIFS)_sd
グルコース	5240.622	899.152	4928.588	808.526	5110.053	548.542
アラニン	133.728	27.395	2.719	1.267	617.422	64.039
アルギニン	902.633	62.126	811.598	120.868	100.104	18.251
アスパラギン	333.800	8.160	319.944	23.353	48.566	3.062
アスパルテート	134.254	31.571	118.045	22.878	16.710	2.918
システイン	150.410	31.271	150.868	32.911	87.940	3.844
グルタメート	171.664	33.460	101.190	19.680	73.165	10.377
グルタミン	1903.354	136.857	1767.623	65.964	683.427	45.023
グリシン	179.886	36.987	108.043	16.418	331.976	13.665
ヒスチジン	93.087	13.229	79.177	9.077	111.401	15.631
イソロイシン	404.828	56.492	367.061	48.474	77.898	3.082
ロイシン	447.216	58.278	404.672	37.005	188.007	8.107
リシン	190.227	21.888	171.887	26.119	205.678	26.898
メチオニン	99.165	14.223	91.735	10.964	31.590	2.195
フェニルアラニン	98.871	11.532	81.825	9.361	87.817	9.264
プロリン	192.639	21.890	159.524	13.996	234.709	9.899
セリン	257.243	37.825	224.096	31.112	136.072	9.206
トレオニン	185.495	25.544	161.455	18.305	178.400	9.876

【表５Ａ－２】

トリプトファン	29.035	5.092	24.828	4.108	66.081	3.264
チロシン	125.517	22.392	114.026	19.658	100.180	11.815
バリン	198.351	43.947	163.309	28.634	263.340	36.908
ビオチン	0.616	0.072	0.608	0.078	0.053	0.010
コリン	20.863	4.012	11.553	1.920	14.772	0.740
フォレート	3.708	0.969	3.925	0.859	2.223	1.121
ミオ-イノシトール	75.268	13.886	28.747	6.293	172.196	20.415
ナイアシンアミド	7.068	0.704	5.871	0.719	7.788	0.983
p-アミノベンゾエート	6.443	0.932	6.070	1.031	6.504	1.201
パントテナート	5.886	2.313	1.340	0.461	1.387	0.351
ピリドキシン	3.684	0.844	3.575	0.973	3.899	1.470
リボフラビン	0.436	0.157	0.400	0.181	0.457	0.157
チアミン	1.496	0.211	1.272	0.251	2.009	0.153
2-ヒドロキシブチレート	1.912	0.353	N/D		49.112	5.176
3-ヒドロキシブチレート	6.455	1.306	N/D		52.832	11.890
4-ヒドロキシプロリン	153.177	21.960	133.999	16.897	21.966	1.795
アセチルグリシン	N/D		N/D		90.432	22.272
アルファ-アミノブチレート	N/D		N/D		23.464	4.255
ベタイン	10.909	2.128	N/D		68.128	14.406
カルニチン	1.220	0.116	0.077	0.018	42.896	4.360
シトレート	125.602	67.025	87.637	24.997	149.562	41.928
シトルリン	8.392	1.007	0.469	0.073	39.924	3.272
クレアチン	19.783	2.467	0.218	0.016	38.822	4.969
クレアチニン	20.427	1.986	0.470	0.314	101.219	11.848
フルクトース	625.213	202.548	12.278	4.229	30.378	9.120
グリセロール*	28.895	10.954	22.666	0.569	66.203	15.600
ヒポキサンチン	7.645	0.809	N/D		4.099	0.827
ラクテート	1511.917	453.846	10.662	3.823	1523.746	276.059
オルニチン	56.617	10.043	78.645	7.100	71.601	5.931
ピルベート	2.710	0.414	N/D		42.578	13.265
スクシネート	60.326	12.162	2.365	1.059	19.386	3.381

【表５Ａ－３】

タウリン	13.831	4.274	N/D		95.150	13.013
尿素*	1.155	0.690	0.162	0.016	12.014	1.284
尿酸	7.814	2.436	N/D		340.055	19.220

＊値はμＭよりはむしろ正規化されたピーク面積を示しており；ヒートマップでは、倍数変化値はＨＰＬＭと比べて計算した。

表５Ａおよび５Ｂにおけるすべての濃度は、他の方法で指示されていなければマイクロモ

ル濃度である。
表５Ａおよび５Ｂにおける平均および標準偏差値は４つの生物学的複製物から計算される。
Ｎ／Ｄ：検出されず
【０１７７】
表５Ａにおいて、その濃度がＮ／Ｄとして列挙されている代謝産物では、培地試料中の最小検出の濃度に一致する濃度は、アルファアミノブチレートの場合を除いて、図１Ｄでのヒートマップのために使用した。これらの値は以下の通りである：２－ヒドロキシブチレート：０．４μＭ；３－ヒドロキシブチレート：２μＭ；アセチルグリシン：４μＭ；ベタイン：０．５μＭ；ヒポキサンチン：０．０２μＭ；ピルベート：２μＭ；タウリン；４μＭ；尿酸：０．５μＭ。アルファアミノブチレートの最小検出濃度（２０μＭ）は、ＲＰＭＩへのその割り当てによりヒートマップのスケール限界内に収まる倍数変化値がもたらされる程度であった。したがって、混乱する解釈を回避するために比較はヒートマップから排除された。アセテート、アセトン、システイン、ホルメート、ガラクトース、グルタチオン、およびマロネートはＨＰＬＭの定義された構成成分であるが、本実験では培地試料について使用される代謝産物プロファイリング法では容易に検出することはできなかったことは留意するべきである。
【０１７８】
追加の代謝産物が、表５Ｂに示されるＩＦＳまたはｄＩＦＳを含有する培地配合調合物において検出され定量された。これらの化合物はＨＰＬＭの（またはＲＭＰＩの）定義された構成成分ではないが、おそらくＩＦＳ／ｄＩＦＳにより与えられ、したがって、図１Ｄのヒートマップには含まれていない。
【表５Ｂ－１】

表5B:培養培地の代謝産物プロファイリングの代表的結果

代謝産物名	**RPMI (+IFS)_avg**	RPMI (+IFS)_sd	**RPMI (+dIFS)_avg**	RPMI (+dIFS)_sd	**HPLM (+dIFS)_avg**	HPLM (+dIFS)_sd
2-ヒドロキシグタレート	1.497	0.588	N/D		N/D	
アセチルアスパルテート	0.300	0.049	N/D		N/D	
アセチルカルニチン	0.555	0.044	N/D		N/D	
アセチルセリン	0.385	0.121	N/D		N/D	

【表５Ｂ－２】

アコニテート	0.329	0.047	0.153	0.037	0.119	0.045
アラントイン	15.618	3.782	0.301	0.076	2.387	1.683
アミノアジペート	2.039	0.294	N/D		N/D	
アルギニノスクシネート	3.807	1.116	N/D		N/D	
非対称性ジメチルアルギニン	0.884	0.298	0.098	0.003	0.093	0.013
ベーターアラニン	3.637	1.178	N/D		N/D	
カルノシン	1.471	0.260	0.127	0.047	0.077	0.015
シチジン	1.057	0.117	N/D		N/D	
デオキシシチジン	0.214	0.025	N/D		N/D	
フマレート	6.785	1.138	N/D		N/D	
キヌレニン	0.505	0.092	0.286	0.059	0.241	0.039
マレート	16.217	1.947	1.603	0.426	1.282	0.507
メチオニンスルホキシド	1.682	0.224	1.328	0.077	0.703	0.096
プソイドウリジン	0.878	0.092	0.046	0.018	0.042	0.016
リビトール	1.344	0.577	N/D		N/D	
ソルビトール	78.436	17.144	1.474	0.245	1.359	0.391
チミジン	0.384	0.032	N/D		N/D	
トリメチルリシン	1.290	0.286	0.097	0.020	0.095	0.020
ウラシル	3.659	0.314	N/D		N/D	
ウリジン	1.998	0.219	N/D		N/D	
キサンチン	5.597	1.523	0.109	0.086	0.367	0.025
キサントシン	0.244	0.074	N/D		N/D	

【０１７９】

ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$はがん細胞増殖に必要な代謝産物を提供する。なぜならば、種々のヒト血液がんを表す６つの細胞系は、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$において、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$およびＲＰＭＩ$^{+dIFS}$における速度より一般には低いが、それに匹敵する速度で増殖したからであった（図１Ｅ）。

（実施例２）

ＨＰＬＭでの細胞の培養はその代謝ランドスケープおよびグルコース炭素の運命を広範囲に変える

【０１８０】

確立した培地での培養と比べて、ヒト血漿の代謝組成をよりよく模倣する培地で細胞を培養するほうが細胞代謝を変化させるという仮説を試験するため、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$において培養した細胞の代謝産物プロファイルをＲＰＭＩ$^{+IFS}$またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$における代謝産物プロファイルと比較した。実際、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$は、アミノ酸、脂質、およびヌクレオチド代謝を含む、複数の経路をわたる多くの代謝産物の細胞内存在量に有意に影響を与えた（図２Ａ；略字については表６参照）。

【表６】

表6:ある特定の代謝産物略字

完全代謝産物名	ヒートマップで使用される略字
2-ヒドロキシグルタル酸	2-HG
2-ホスホグリセラート/3-ホスホグリセラート	2-PG/3-PG
非対称性ジメチルアルギニン	ADMA
補酵素A	CoA
ジヒドロキシアセトンホスフェート	DHAP
フルクトース6-ホスフェート/グルコース1-ホスフェート	F6P/G1P
フルクトース-1,6-ビスホスフェート	FBP
グリセルアルデヒド3-ホスフェート	G3P
グルコース6-ホスフェート	G6P
ガンマ-アミノ酪酸	GABA
グリセロホスホコリン	GPC
グリセロホスホエタノールアミン	GPEA
グルタチオン	GSH
グルタチオンジスルフィド	GSSG
メチオニンスルホキシド	Met-so
N-アセチルアスパルチルグルタミン酸	NAAG
O-ホスホエタノールアミン	OPE
p-アミノ安息香酸	PABA
ホスホエノールピルベート	PEP
リボース5-ホスフェート/リブロース5-ホスフェート	R5P/リブロース5-P
セドヘプツロース7-ホスフェート	S7P

【０１８１】

アルギニン、アスパラギン、およびタウリンなどのいくつかの代謝産物では、違いは培地それ自体での違いを反映し、アスパルテートおよびラクテートなどの他の代謝産物では、違いは培地それ自体での違いを反映しなかった。大半のＨＰＬＭ$^{+dIFS}$誘導変化は試験した６つの細胞系すべてで共有されたが、一部は細胞系特異的であり、がんの不均一性（ＣａｎｔｏｒおよびＳａｂａｔｉｎｉ、２０１２年；Ｄａｖｉｄｓｏｎら、２０１６年；ＥａｓｏｎおよびＳａｄａｎａｎｄａｍ、２０１６年；Ｈｅｎｓｌｅｙら、２０１６年；Ｈｕら、２０１３年；Ｍａｙｅｒｓら、２０１６年；Ｓｈａｕｌら、２０１６年；Ｙｕｎｅｖａら、２０１２年）が環境条件に対する細胞応答にどのように影響をあたることができるかを明確に示していた。例えば、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$は５つの細胞系でアルギニノスクシネート存在量を低減したが、Ｐ１２－Ｉｃｈｉｋａｗａ細胞ではアルギニノスクシネート存在量を増やした。同様に、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$はＫ５６２、Ｐ１２－Ｉｃｈｉｋａｗａ、およびＳＵＤＨＬ４細胞においてのみフルクトース－６－ホスフェート／グルコース－１－ホスフェート（Ｆ６Ｐ／Ｇ１Ｐ）の劇的上昇を引き起こし、ＫＭＳ１２ＢＭ細胞においてのみオキソグルタレートを中程度低下させた。

【０１８２】

ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養はいかなる細胞系においてもエネルギー充足（Ａｔｋｉｎｓｏｎ、１９６８年）に影響を与えない（図２Ｂ）が、ラクテート／ピルベートにより評価される場合、２つの酸化還元対：ＧＳＨ／ＧＳＳＧ（図２Ｃ）およびＮＡＤＨ／ＮＡＤ$^{+}$の比への変化により反映される酸化還元状態に対する細胞系特異的効果を確かに有していた（Ｉｄｏら、２００４年；Ｗｉｌｌｉａｍｓｏｎら、１９６７年；Ｚｈａｎｇら、２００２年）（図２Ｄ）。

【０１８３】
最後に、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$はグルコース消費とラクテート分泌速度の間の相関関係を有意に変化させず（図８）、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$が大半のがん細胞に共通する好気性解糖表現型にはほとんど効果がないことを示唆していた（Ｈｏｓｉｏｓら、２０１６年；Ｊａｉｎら、２０１２年）。
【０１８４】
グルコース利用を特に研究するため、［Ｕ－^{13}Ｃ］－グルコースを含有するＨＰＬＭ$^{+dIFS}$における３つの細胞系（Ｋ５６２、ＮＯＭＯ１、およびＰ１２－Ｉｃｈｉｋａｗａ）の培養に続いて、いくつかの代謝産物の^{13}Ｃ標識化パターンをＲＰＭＩ$^{+IFS}$またはＲＰＭＩ$^{+dIFS}$での^{13}Ｃ標識化パターンと比較した（図３Ａ）。興味深いことに、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$はピルベートを約４０μＭの濃度で含有し、この濃度はＲＰＭＩ$^{+IFS}$の濃度の１０倍を超えて高いが、３つの^{13}Ｃ（Ｍ３）で標識されたピルベートの割合には影響を及ぼさなかった（図３Ｂ）。しかし、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$は、ＴＣＡサイクルにおけるシトレートのＭ２標識化の低減により反映される、ピルベートの酸化により生み出されるグルコース由来アセチル－ＣｏＡの代謝には確かに影響を及ぼした（図３Ｃ）。
【０１８５】
メタボロームの場合と同様に、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$はグルコース利用に対して細胞系依存性効果も有していた。最も顕著な一つは、Ｋ５６２細胞およびＰ１２－Ｉｃｈｉｋａｗａ細胞のみでのＦ６Ｐ／Ｇ１ＰのＭ６標識化の有意な低減であり（図３Ｄ）、これらの細胞がＨＰＬＭ$^{+dIFS}$で培養された場合、外因性グルコースを超える供給源がＦ６Ｐ／Ｇ１Ｐプールに寄与することが示唆される。さらに、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$はアラニンを約６２０μＭ、ＲＰＭＩ$^{+IFS}$のアラニンのほぼ５倍高い濃度で含有するが、２つの細胞系においてＭ３－アラニンの割合には影響を及ぼさなかった。しかし、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$はＰ１２－Ｉｃｈｉｋａｗａ細胞においてアラニンのＭ３標識化を２分の１未満に低減し（図３Ｅ）、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$がこれらの細胞におけるグルコース由来ピルベートの運命に影響を及ぼすことが明らかにされている。最後に、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$は、Ｋ５６２細胞およびＰ１２－Ｉｃｈｉｋａｗａ細胞でのみグリセロホスホコリンのＭ３標識化も減少させ、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$が、脂質合成のためのグルコース利用に細胞系特異的変化を誘導することが示唆される（図３Ｆ）。ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$で培養された細胞とＲＰＭＩ$^{+dIFS}$で培養された細胞を比べると、これらの変化もほぼすべてが観察されたが、ピルベートおよびアラニンなどのある特定の外因性代謝産物のレベルのより大きな不一致がその対応する^{13}Ｃ標識化パターンに影響を与えた。
【０１８６】
まとめると、これらのデータにより、好気性解糖は本質的に影響を受けなかったが、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養はＲＰＭＩでの培養と比べると、細胞の代謝ランドスケープに対して広範な効果を有したことが明らかにされている。これらの効果は、メタボローム、酸化還元状態、およびグルコース利用への広範囲な変更を含み、試験したすべての細胞系に共通であるまたは細胞系特異的であるのどちらかであった。
（実施例３）
ＨＰＬＭの尿酸構成成分はデノボピリミジン生合成に対して著しい効果を有する
【０１８７】
ＲＰＭＩでの培養と比べたＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養の最も有意な結果の一つはヌクレオチド代謝に関与する４つの代謝産物：カルバモイルアスパルテート、ジヒドロオロテート、オロテート、およびオロチジンの細胞内存在量の増加であった（図４Ａ～Ｄ）。４つのうちのどれもいずれの培地でも検出できなかった。最初の３つは、ＵＭＰを生み出すデノボピリミジン生合成経路における中間体であり、オロチジンはＯＭＰの脱リン酸化産物であり、ＯＭＰはこの経路におけるＵＭＰの直接の前駆体である（図４Ｅ）。試験した６つの細胞系の４つにおいて、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$での培養は、ＵＴＰおよびＣＴＰピリミジンヌクレオチドの細胞内レベルを４０～６０％低減した（図４Ｆ～Ｇ）が、プリンヌクレオチドに対しては類似の効果はなかった（図９）。いかなる理論にも束縛されることを望

まないが、サルベージ経路活性の細胞系依存性寄与（ＥｖａｎｓおよびＧｕｙ、２００４年）またはピリミジンヌクレオチドプールの消費の変更は、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$が、すべての細胞におけるピリミジンヌクレオチドの存在量を減少させない理由を説明し得る。

【０１８８】

ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$のどの成分（複数可）がデノボピリミジン合成経路に影響を及ぼすのかを判定するため、（１）アセトン、クレアチン、クレアチニン、ホルメート、フルクトース、ガラクトース、グルタチオン、グリセロール、およびヒポキサンチン；（２）非タンパク質構成性アミノ酸（８つの代謝産物）；（３）水溶性酸（８つの代謝産物）；（４）尿素；または（５）尿酸を欠くＨＰＬＭ$^{+dIFS}$誘導体においてＫ５６２細胞を培養した（図５Ａ）。注目すべきことに、尿酸のみが観察された効果を媒介した。なぜならば、ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$から尿酸を除去するとオロテートおよびオロチジンレベルをＲＰＭＩにおいて（図３Ｃ～Ｄ）、またはドロップアウト調合物からまとめて欠けている２７の構成成分を欠く最小ＨＰＬＭにおいて培養した細胞のオロテートおよびオロチジンレベルまで低減したからである（図５Ｂ）。ＨＰＬＭ$^{+dIFS}$は尿酸を、それぞれＲＰＭＩ$^{+IFS}$およびＲＰＭＩ$^{+dIFS}$の濃度の４０倍および少なくとも５００倍高い濃度である、３５０ｍＭで含有し（図５Ｃ）、重要なことに、その細胞内濃度は対応する培養培地での濃度を反映している（図５Ｄ）。Ｋ５６２細胞では、尿酸はオロテートおよびオロチジン存在量を用量依存的に増加させ（図５Ｅ）、試験したその最も高い濃度（７００μＭ）ではＯＭＰの検出可能な蓄積をもたらした。ＲＰＭＩ$^{+IFS}$への３５０μＭの尿酸の添加もオロテートおよびオロチジンレベルを大いに上昇させたが、完全ＨＰＬＭ同様に、ＵＴＰ存在量に対しては細胞系依存性効果を有していた（図５Ｆ）。最後に、密接に関係する分子９－メチル尿酸（９－ＭＵＡ）はＫ５６２細胞に入ったが、デノボピリミジン生合成経路でのオロテート、オロチジン、またはその他の中間体のレベルを変えなかった（図５Ｇ）。

【０１８９】

ピリミジン代謝に対する尿酸の効果は、他の哺乳動物よりもヒト、チンパンジー、ゴリラ、および追加の高等霊長類でのほうが最大一桁高い血漿濃度の増加を示している（Ａｌｖａｒｅｚ－ＬａｒｉｏおよびＭａｃａｒｒｏｎ－Ｖｉｃｅｎｔｅ、２０１０年；Ｋｒａｔｚｅｒら、２０１４年；Ｗｕら、１９９２年）。マウスおよびウシを含む大半の哺乳動物種は肝臓酵素ウリカーゼを介して尿酸をアラントインまで代謝するが、ウリカーゼをコードする遺伝子（ＵＯＸ）はヒト科動物の進化中に偽遺伝子化を介して不活化された（Ｋｒａｔｚｅｒら、２０１４年；Ｏｄａら、２００２年；Ｗｕら、１９９２年；１９８９年）。結果として、多くの高等霊長類では、アラントインではなく、尿酸がプリン異化の最終産物である（図５Ｈ）。さらに、マウスでは、約３０μＭの血漿尿酸濃度を有しており、大半のＵＯＸ欠損マウスは極度の高尿酸血症および腎症から生後４週間内に死亡することを考えると、ウリカーゼ活性は不可欠である（Ｗｕら、１９９４年）。したがって、尿酸がデノボピリミジン生合成経路に影響を及ぼすという所見を、マウスで成長しているまたは従来の培地で培養された細胞を研究することによって見つけるのは困難だったと考えられる。

（実施例４）

尿酸はＵＭＰＳの直接の阻害因子である

【０１９０】

オロテートおよびオロチジンの細胞内レベルを上昇させることに加えて、ＨＰＬＭは培地へのそれらの分泌も著しく増加させた（図１０）が、これはオロト酸尿症およびオロチジン尿症（ｏｒｏｔｉｄｉｎｕｒｉａ）を有する患者におけるこれらの代謝産物の高尿中排泄を暗示させる現象である。この障害は、ＵＭＰシンターゼ（ＵＭＰＳ）の遺伝的（Ｂａｉｌｅｙ、２００９年；Ｆｏｘら、１９７３年；Ｓｍｉｔｈら、１９６１年；Ｓｕｃｈｉら、１９９７年）または薬理学的（Ｂｏｎｏら、１９６４年；Ｆａｌｌｏｎら、１９６１年；Ｆｏｘら、１９７０年；ＫｅｌｌｅｙおよびＢｅａｒｄｍｏｒｅ、１９７０年）阻害により引き起こすことが可能なので、ＨＰＬＭの尿酸構成成分は細胞においてこの酵素の阻害をもたらし得る。ＵＭＰＳは、デノボピリミジン生合成経路の最終の２ステップを

触媒してＵＭＰを生み出す二機能性２ドメイン酵素である（Ｊｏｎｅｓ、１９８０年）。第１のステップでは、オロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＯＰＲＴ）ドメインがオロテートとＰＲＰＰからＯＭＰを合成し、第２のステップでは、ＯＭＰデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）ドメインがＯＭＰをＵＭＰに変換する（図６Ａ）。

【０１９１】

尿酸がＵＭＰＳの阻害を引き起こし得るかどうかを判定するため、確立したＵＭＰＳ阻害因子を研究して、確立したＵＭＰＳ阻害因子が開示された細胞においてデノボピリミジン生合成経路に対して尿酸と類似する効果を有するかどうかを確かめた。小分子アロプリノールおよび６－アザウリジンは、それぞれアロプリノールリボヌクレオチドおよび６－アザ－ＵＭＰに変換されると（Ｂｏｎｏら、１９６４年；Ｈａｎｄｓｃｈｕｍａｃｈｅｒ、１９６０年；ＫｅｌｌｅｙおよびＢｅａｒｄｍｏｒｅ、１９７０年；ＭｕｒｒｅｌｌおよびＲａｐｅｐｏｒｔ、１９８６年）ＵＭＰＳのＯＤＣドメインを競合的に阻害するプロドラッグである（図６Ｂ）。Ｋ５６２細胞では、アロプリノールはカルバモイルアスパルテート、ジヒドロオロテート、オロテート、オロチジン、およびＯＭＰのレベルを用量依存的に増加させた（図１１Ａ～Ｂ）。さらに、試験したその最も高い濃度では、アロプリノールはこれらの細胞でのＵＴＰの存在量もほぼ３０％減少させた（図１１Ｃ）。ＬＣ／ＭＳベースの代謝産物プロファイリングを使用して、質量／電荷数比（ｍ／ｚ）がアロプリノールリボヌクレオチドの予想されたｍ／ｚに一致する種が検出され、その大きさは培地中のアロプリノールの濃度と相関していた（図１１Ｄ）。重要なことに、この種は、その異なるクロマトグラフィー保持時間によりそのアイソマー、ＩＭＰと区別することができた。これらのデータは細胞内でのアロプリノールリボヌクレオチドへのアロプリノールの変換と一致している。しかし、推定尿酸リボヌクレオチドと一致する代謝産物ピークは検出されなかった。

【０１９２】

尿酸そのものがＵＭＰＳを直接阻害し得るのかどうかを調べるため、組換えＵＭＰＳおよびその基質、オロテートならびにＰＲＰＰを含有するｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ＵＭＰＳ活性アッセイを開発し、ＯＭＰおよびＵＭＰのＬＣ／ＭＳ検出を介してその活性を確かめた（図６Ｃ）。ＵＭＰＳ変異体（Ｙ３７Ａ、Ｒ１５５Ａ）は、ヒトＵＭＰＳのＯＰＲＴドメインの最近寄託された構造（タンパク質データバンクエントリー２ＷＮＳ、鎖ＡおよびＢ）に基づいて設計されたが（図１２）、活性がなくアッセイでは陰性対照として働いた。確立したＯＤＣ阻害因子、６－アザ－ＵＭＰは、ＵＭＰＳによるＵＭＰ産生を用量依存的に減少させ、５０μＭでは、ＵＭＰレベルを、ビヒクルを含有する反応物でのレベルの約３％まで低減した（図６Ｄ）。６－アザ－ＵＭＰはＯＭＰの存在量も劇的に増加させたが、ＯＭＰの増加はＵＭＰの減少と強く相関してはいなかった。いかなる理論にも束縛されることを望まないが、この結果はＯＰＲＴ反応の公知の可逆性によるものである可能性がある（ＴｒａｕｔおよびＪｏｎｅｓ、１９７７年）。

【０１９３】

注目すべきことに、尿酸はＵＭＰＳによるＵＭＰ生成も用量依存的に阻害し、６－アザ－ＵＭＰ同様、ＵＭＰの減少と完全に相関してはいない様式でＯＭＰも増加させた（図６Ｅ）。尿酸は６－アザ－ＵＭＰほど強力ではなかった。なぜならば、１ｍＭでは、尿酸はＵＭＰレベルを、ビヒクルを含有する反応物でのレベルの約３０％までしか低減できなかったからであった。しかしながら、重要なことに、尿酸は、培養細胞中でオロテートおよびオロチジンレベルを上昇させた濃度と一致する濃度でＵＭＰＳをｉｎ　ｖｉｔｒｏで阻害した。最後に、アロプリノールおよび６－アザウリジンはＵＭＰＳを直接阻害せず、９－ＭＵＡもアラントインもＵＭＰＳを直接阻害しなかった（図６Ｆ）。

【０１９４】

したがって、尿酸は、ヒト血漿中に存在する濃度では、ＵＭＰＳのＯＤＣドメインの直接阻害因子である。

（実施例５）

尿酸は５－フルオロウラシルの細胞傷害性と拮抗する

【０１９５】
５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）は代謝拮抗物質薬であり、５０年超前に開発されたが、数種類のがんの処置において依然として広く使用されている（Ｌｏｎｇｌｅｙら、２００３年）。細胞中では、５－ＦＵは、その細胞傷害性効果を媒介する種々のフルオロヌクレオチド誘導体に代謝される（図７Ａ）。これらの中にはフルオロウリジントリホスフェート（ＦＵＴＰ）があり、これはＲＮＡ中に誤取り込みされると細胞死をもたらす。ＦＵＴＰ合成は、直接的にはＵＭＰＳのＯＰＲＴドメインにより、または間接的にはウリジンホスホリラーゼおよびウリジンキナーゼの連続活性を通じて、フルオロウリジンモノホスフェート（ＦＵＭＰ）への５－ＦＵの変換から始まる（Ｌｏｎｇｌｅｙら、２００３年）。以前の動態研究によれば、オロテートはＯＰＲＴ活性によるＦＵＭＰへの５－ＦＵの直接的変換を巡って５－ＦＵと競合することが明らかにされている（ＲｅｙｅｓおよびＧｕｇａｎｉｇ、１９７５年）（図７Ｂ）。これらの所見と一致して、アロプリノールリボヌクレオチドにより媒介されるＵＭＰＳのＯＤＣドメインの競合的阻害により誘導されるオロテート蓄積により、アロプリノールは、５－ＦＵに対するある特定のがん細胞系の感受性を低減する（ＳｃｈｗａｒｔｚおよびＨａｎｄｓｃｈｕｍａｃｈｅｒ、１９７９年）。したがって、いかなる理論にも縛られたくはないが、尿酸は類似の機序を通じて５－ＦＵに対する細胞の感受性に影響を及ぼし得る。

【０１９６】
実際、ＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$においてＮＯＭＯ１細胞を培養すると、がんの処置で一般的に使用されているＤＮＡ損傷薬剤であるドキソルビシンの効能に影響を及ぼさずに（図７Ｄ）、ＲＰＭＩ$^{+ＩＦＳ}$およびＲＰＭＩ$^{+ｄＩＦＳ}$での培養と比べて、５－ＦＵのＥＣ$_{５０}$をそれぞれ約５倍および約８倍まで減少させた（図７Ｃ）。さらに、ＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$から尿酸だけを除去すると、再びドキソルビシン感受性に影響を及ぼさずに（図７Ｆ）、ＮＯＭＯ１細胞において５－ＦＵのＥＣ$_{５０}$はほぼ６分の１に低減された（図７Ｅ）。５－ＦＵで処置され尿酸を欠くＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$において培養された細胞では、ＦＵＭＰ、フルオロデオキシウリジンモノホスフェート（ＦｄＵＭＰ）、ならびに５－ＦＵが検出された（図７Ｇ）。尿酸含有ＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$での培養はＦｄＵＭＰおよび５－ＦＵの細胞内存在量にほとんど効果はなかったが、ＦＵＭＰレベルを検出限界下まで低減させ、オロテートによるＯＰＲＴ媒介ＦＵＭＰ合成の拮抗と一致していた（図７Ｇ）。

【０１９７】
５－ＦＵはもはや血液がんの処置には使用されていないので、さらに臨床的に関連のあるがん細胞系（Ｌｏｎｇｌｅｙら、２００３年）の５－ＦＵ感受性に対する尿酸の効果を研究した。６つの血液がん細胞系の場合と同様に、ＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$においてＳＷ６２０結腸直腸がん細胞系を培養すると、オロテートの細胞内存在量が増加し（図１３Ａ）、尿酸がこれらの細胞の５－ＦＵ感受性にも影響を及ぼし得ることを示していた。実際、ＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$から尿酸だけを除去すると、ＳＷ６２０細胞の５－ＦＵ　ＥＣ$_{５０}$はＨＰＬＭ$^{+ｄＩＦＳ}$での培養と比べると３分の１に低減した（図Ｓ６Ｂ）が、ドキソルビシン感受性は影響を受けなかった（図１３Ｃ）。

【０１９８】
したがって、ヒト血漿で見出される濃度では、内因性代謝産物の尿酸は、一般の化学療法薬に対するがん細胞の感受性に影響を及ぼし（図７Ｈ）、ウリカーゼの投与によるなどの血漿尿酸レベルを操作すれば（Ｊｅｈａら、２００４年）、ＯＰＲＴ媒介合成を介してＦＵＭＰを生み出すヒト腫瘍の５－ＦＵ感受性が改善され得ることが示唆される。

材料および方法

細胞系および試薬

【０１９９】
以下の細胞系、Ｋ５６２およびＮＯＭＯ１はＤｒ．Ｊａｍｅｓ　Ｇｒｉｆｆｉｎ（Ｄａｎａ　Ｆａｒｂｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）；Ｐ１２－ＩｃｈｉｋａｗａはＤｒ．Ｔｈｏｍａｓ　Ｌｏｏｋ（Ｄａｎａ　Ｆａｒｂｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）；ＳＵＤＨＬ４はＤｒ．Ｍａｒｇａｒｅｔ　Ｓｈｉｐｐ（Ｄａｎａ　Ｆａｒｂｅｒ

Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）；ならびにＫＭＳ１２ＢＭおよびＳＥＭはｔｈｅ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ（Ｂｒｏａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）から快く提供していただいた。ＳＷ６２０細胞系はＡＴＣＣより購入した。細胞系はマイコプラズマ汚染がないことが確かめられ（Ｆｒｅｓｈｎｅｙ、２０１０年）、すべての細胞系の同一性はＳＴＲプロファイリングにより認証された。ＳＷ６２０のＳＴＲプロファイリングは評価した１０の遺伝子座の２つにおいて極めて小さなバックグラウンドが明らかになった。

【０２００】

５－フルオロウラシル（Ｆ６６２７）、６－アザウリジン（Ａ１８８２）、アラントイン（０５６７０）、アロプリノール（ＰＨＲ１３７７）、ドキソルビシン（４４５８３）、オロテート（Ｏ８４０２）、ホスホリボシルピロホスフェート（ＰＲＰＰ）（Ｐ８２９６）、ＵＭＰ（Ｕ６３７５）はＳｉｇｍａから入手し；６－アザ－ＵＭＰ（ｓｃ－２９１１７１）および９－メチル尿酸（ｓｃ－３６２１８４）はＳａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手し；［Ｕ－$^{13}C_6$］－Ｄ－グルコース（ＣＬＭ－１３９６）およびフェニルアラニン－d_8（ＤＬＭ－３７２）はＣａｍｂｒｉｄｇｅ Ｉｓｏｔｏｐｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手した。

【０２０１】

ＨＰＬＭの調合で使用した化合物の供給元およびカタログ番号は表７に収載している。ＨＰＬＭで使用した化合物は、ＲＰＭＩに加えて、表７に収載される１つまたは複数の化合物を含有する保存溶液として調製し、ＲＰＭＩはビオチン、コリン、フォレート、ミオイノシトール、ナイアシンアミド、ｐ－アミノベンゾエート、パントテナート、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、およびビタミンＢ－１２を提供した。

【表７－１】

表7: HPLM調製のために使用された保存溶液

保存溶液プール番号	構成成分	保存濃度	貯蔵
1	グルコース	100X	新たに調製
2	アラニン、アルギニン、アスパラギン、システイン、グリシン、プロリン、セリン	500X	一定分量を−20℃で凍結保存した
3	アスパルテート、システイン、グルタメート、チロシン	500X	1MのHClで調製 ；一定分量を−20℃で凍結保存した
4	グルタミン	250X	一定分量を−20℃で凍結保存した
5	ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン	500X	0.1MのHClで調製;一定分量を−20℃で凍結保存した
6	$CaCl_2$, KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$ NaCl	10X	一定分量を−20℃で凍結保存した
7	$NaHCO_3$, Na_2HPO_4	10X	一定分量を−20℃で凍結保存した
8	$Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$, NH_4Cl	100X	一定分量を−20℃で凍結保存した
9	2-ヒドロキシブチレート、3-ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ラクテート、マロネート、ピルベート、スクシネート	250X	一定分量を−20℃で凍結保存した

【表７－２】

10	4-ヒドロキシプロリン、 アセチルグリシン、 アルファアミノブチレート、 ベタイン、カルニチン、 シトルリン、 オルニチン、タウリン	500X	一定分量を-20℃で凍結保存した
11	クレアチン、クレアチニン	500X	一定分量を-20℃で凍結保存した
12	アセトン	5000X	一定分量を-20℃で凍結保存した
13	ホルメート	5000X	一定分量を-20℃で凍結保存した
14	フルクトース、ガラクトース	500X	一定分量を-20℃で凍結保存した
15	グリセロール	5000X	一定分量を-20℃で凍結保存した
16	ヒポキサンチン	1000X	0.2MのHClで調製; 一定分量を-20℃で凍結保存した
17	尿素	250X	新たに調製
18	尿酸	250X	1MのNaOHで新たに調製
19	フェノールレッド	100X	一定分量を-20℃で凍結保存した

プラスミドおよびプラスミド構築

【０２０２】

ｐＤＯＮＲ２２３－ＫＲＡＳＶ１２およびｐＬＪＭ１－ｅＧＦＰはＡｄｄｇｅｎｅから入手した（それぞれＡｄｄｇｅｎｅ　３１２００および１９３１９）。ｐＤＯＮＲ２２３－ＵＭＰＳはＨｕｍａｎ　ＯＲＦｅｏｍｅ　７．１由来であり、Ｄｒ．Ｓｕｓａｎ　Ｌｉｎｄｑｕｉｓｔから快く提供していただいた。他のプラスミドはすべて下記の通りに構築した。

１．レンチウイルスプラスミドｐＬＪＣ２の構築

【０２０３】

ＫＲＡＳＶ１２遺伝子は、プライマーＪＣ４／ＪＣ５を使用してｐＤＯＮＲ２２３－ＫＲＡＳＶ１２鋳型から増幅させ、ＡｇｅＩ－ＢａｍＨＩで消化し、ｐＬＪＭ１－ｅＧＦＰにクローニングしてｐＬＪＭ１－ＫＲＡＳＶ１２－３ｘＦＬＡＧを生成した。プラスミドｐＬＪＣ１－ＫＲＡＳＶ１２は、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ＰＣＲを使用し、それぞれプライマーＪＣ４８／ＪＣ４９およびＪＣ５０／ＪＣ５１を用いて、ｐＬＪＭ１－ＫＲＡＳＶ１２－３ｘＦＬＡＧの２つのＮｏｔＩ部位を除去して構築した。Ｒａｐ２Ａ遺伝子は、プライマーＪＣ６８／ＪＣ６９を使用してｐＬＪＭ１－Ｒａｐ２Ａ鋳型から増幅し、ＰａｃＩ－ＮｏｔＩで消化し、ｐＬＪＣ１－ＫＲＡＳＶ１２－３ｘＦＬＡＧにクローニングしてｐＬＪＣ１－Ｒａｐ２Ａ－３ｘＦＬＡＧを生成した。次に、Ｒａｐ２Ａ－３ｘＦＬＡＧをコードする配列をプライマーＪＣ＿ＬＪＣ２－Ｆ／ＪＣ７９を使用してｐＬＪＣ１－Ｒａｐ２Ａ－３ｘＦＬＡＧから増幅し、ＡｇｅＩ－ＥｃｏＲＩで消化し、ｐＬＪＭ１－ｅＧＦＰにクローニングしてｐＬＪＭ１－Ｒａｐ２Ａ－３ｘＦＬＡＧを生成した。次に、プラスミドｐＬＪＣ２－Ｒａｐ２Ａ－３ｘＦＬＡＧは、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ＰＣＲを使用し、それぞれプライマーＪＣ４８／ＪＣ４９およびＪＣ５０／ＪＣ５１を用いて、ｐＬＪＭ１－Ｒａｐ２Ａ－３ｘＦＬＡＧの２つのＮｏｔＩ部位を除去して構築した。

２．ＵＭＰＳプラスミドの構築

【０２０４】

ＵＭＰＳ遺伝子はプライマーＪＣ６２４／ＪＣ６２５を使用してｐＤＯＮＲ２２３－ＵＭＰＳ鋳型から増幅し、ＰａｃＩ－ＮｏｔＩで消化し、ｐＬＪＣ２－Ｒａｐ２Ａ－３ｘＦＬＡＧにクローニングしてｐＬＪＣ２－ＵＭＰＳ－３ｘＦＬＡＧを生成した。プラスミドｐＬＪＣ２－ＵＭＰＳ（Ｙ３７Ａ、Ｒ１５５Ａ）－３ｘＦＬＡＧは、オーバラップ拡張ＰＣＲ法に基づく２ステッププロトコルを使用して構築した。第１のステップでは、３つの断片を、以下のプライマー対：ＪＣ＿ＬＪＣ２－Ｆ／ＪＣ７１６、ＪＣ７１５／ＪＣ７２

０、およびＪＣ７１９／ＪＣ＿ＬＪＣ２－Ｒを使用してｐＬＪＣ２－ＵＭＰＳ－３ｘＦＬＡＧ鋳型から増幅した。第２のステップでは、３つの断片を、プライマーＪＣ＿ＬＪＣ２－Ｆ／ＪＣ＿ＬＪＣ２＿Ｒを含有する第２のＰＣＲにプールし、次にＰａｃＩ－ＮｏｔＩで消化し、ｐＬＪＣ２－ＵＭＰＳ－３ｘＦＬＡＧにクローニングした。

プライマー

【０２０５】

ＪＣ４：ＧＣＡＣＣＧＧＴＴＴＡＡＴＴＡＡＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧＧＧＣＡＣＴＧＡＡＴＡＴＡＡＡＣＴＴＧＴＧＧＴＡＧＴＴＧＧ（配列番号１）

【０２０６】

ＪＣ５：ＣＧＣＧＧＡＴＣＣＴＴＡＴＴＡＣＴＴＧＴＣＡＴＣＧＴＣＡＴＣＣＴＴＧＴＡＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＴＧＡＴＣＴＴＴＡＴＡＡＴＣＡＣＣＧＴＣＡＴＧＧＴＣＴＴＴＧＴ（配列番号２）

【０２０７】

ＡＧＴＣＧＣＣＴＧＣＧＧＣＣＧＣＣＡＴＡＡＴＴＡＣＡＣＡＣＴＴＴＧＴＣＴＴＴＧＡＣＴＴＣ（配列番号３）

【０２０８】

ＪＣ４８：ＣＣＡＣＣＧＣＡＣＡＧＣＡＡＧＣＡＧＣＡＧＣＴＧＡＴＣＴＴＣＡＧＡＣＣ（配列番号４）

【０２０９】

ＪＣ４９：ＧＣＴＧＣＴＴＧＡＴＧＣＣＣＣＡＧＡＣＴＧＴＧＡＧＴＴＧＣＡＡＣＡＧ（配列番号５）

【０２１０】

ＪＣ５０：ＣＧＡＧＡＣＴＡＧＣＣＴＣＧＡＧＣＡＧＣＡＧＣＣＣＣＣＴＴＣＡＣＣＧＡＧ（配列番号６）

【０２１１】

ＪＣ５１：ＣＣＧＣＡＴＣＡＣＣＡＴＧＧＴＡＡＴＡＧＣＧＡＴＧＡＣＴＡＡＴＡＣＧ（配列番号７）

【０２１２】

ＪＣ６８：ＣＣＧＴＴＡＡＴＴＡＡＡＧＧＧＡＣＧＡＴＧＣＧＣＧＡＧＴＡＣＡＡＡＧＴＧＧＴＧＧＴＧＣＴＧ（配列番号８）

【０２１３】

ＪＣ６９：ＣＣＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＧＣＴＧＣＣＴＣＣＴＴＧＴＡＴＧＴＴＡＣＡＴＧＣＡＧＡＡＣＡＧＣ（配列番号９）

【０２１４】

ＪＣ＿ＬＪＣ２－Ｆ：ＴＧＴＡＣＧＧＴＧＧＧＡＧＧＴＣＴＡＴＡＴＡＡＧ（配列番号１０）

【０２１５】

ＪＣ７９：ＣＧＧＣＧＧＧＡＡＴＴＣＴＴＡＴＴＡＣＴＴＧＴＣＡＴＣＧＴＣＡＴＣＣＴＴＧＴＡＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＴＧ（配列番号１１）

【０２１６】

ＪＣ６２４：ＣＣＧＴＴＡＡＴＴＡＡＣＧＣＧＡＣＡＡＴＧＧＣＧＧＴＣＧＣＴＣＧＴＧＣＡＧＣＴＴＴＧＧＧＧＣＣＡＴＴＧＧＴＧＡＣ（配列番号１２）

【０２１７】

ＪＣ６２５：ＣＣＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＧＣＴＧＣＣＴＣＣＡＡＣＡＣＣＡＡＧＴＣＴＡＣＴＣＡＡＡＴＡＣＧＣＴＴＣＣＣＡＡＧＣ（配列番号１３）

【０２１８】

ＪＣ７１５：ＣＴＴＴＣＣＴＣＣＣＣＣＡＴＣＧＣＣＡＴＣＧＡＴＣＴＧＣＧＧＧＧＣ（配列番号１４）

【０２１９】

ＪＣ７１６：ＧＣＣＣＣＧＣＡＧＡＴＣＧＡＴＧＧＣＧＡＴＧＧＧＧＧＡＧＧＡＡＡＧ

（配列番号１５）
【０２２０】
ＪＣ７１９：ＧＴＧＣＴＧＴＴＧＧＡＣＧＣＣＧＡＧＣＡＧＧＧＡＧＧＣＡＡＧ（配列番号１６）
【０２２１】
ＪＣ７２０：ＣＴＴＧＣＣＴＣＣＣＴＧＣＴＣＧＧＣＧＴＣＣＡＡＣＡＧＣＡＣ（配列番号１７）
【０２２２】
ＪＣ＿ＬＪＣ２－Ｒ：ＣＣＣＴＴＴＴＣＴＴＴＴＡＡＡＡＴＴＧＴＧＧＡＴＧＡＡＴＡＣＴＧＣＣ（配列番号１８）

ＨＰＬＭの設計
【０２２３】
ヒトメタボロームデータベースは、血清メタボロームデータベース（Ｐｓｙｃｈｏｇｉｏｓら、２０１１年；Ｗｉｓｈａｒｔら、２０１３年）と統合されると、少なくとも1つのヒト生物流体において検出され定量もされた命名されている２，１９２の代謝産物を含有する。この収集物から、以下の手作業で適用されるフィルタリング基準（ｆｉｌｔｅｒｉｎｇ　ｃｒｉｔｅｒｉａ）：（１）正常な成人ヒト血液中の濃度が示されていなかった代謝産物；（２）脂肪酸、コレステロールならびに以下の：コレステロールエステル、セラミド、ジグリセリド、ガングリオシド、グリセロホスホコリン、モノアシルグリセリド（ｍｏｎｏａｃｙｌｇｌｙｃｅｒｉｄｅ）、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、およびトリグリセリドの誘導体を含む、親油性代謝産物；（３）正常成人ヒト血液中で少なくとも１つの参照源により表された場合＜６μＭの濃度を有する代謝産物；（４）正常成人ヒト血液中で１つの参照源だけにより示される濃度を有する代謝産物；ならびに（５）市販されていなかった代謝産物、の１つを満たす分子は除去した。ビタミンは培養中の細胞の栄養要件の１つであるが（Ｅａｇｌｅ、１９５５年）、大半が、本発明者らが設定した６μＭの閾値を十分下回る注釈付きの血漿濃度を有していた。したがって、これらの代謝産物を取り除くよりはむしろ、ＨＰＬＭにビタミンの市販の濃縮混合物をＲＰＭＩ　１６４０の濃度と等価の濃度で補充した。さらに、銅および亜鉛などの微量元素も培養中の細胞には不可欠であるが、これらの元素はＩＦＳでは、アルブミンおよびインスリンなどの輸送分子により十分な量で与えられることが多く、その必要なレベルを超えると細胞増殖にとって有害になる場合が多い（Ｓｉｇｍａ　Ｍｅｄｉａ　Ｅｘｐｅｒｔ）。したがって、微量元素はＨＰＬＭの定義された構成成分中に含めなかった。正常な成人ヒト血液について報告されている計算された平均値に類似する濃度でＨＰＬＭの調合物に含まれるタンパク質構成性アミノ酸、２７の追加の極性代謝産物、および１０の小イオンの最終リストを作成するために、非内在性化合物および気体の除去などの追加の改変も加えた。

細胞培養培地調合
【０２２４】
細胞は次の３つの培地において主に維持された。
【０２２５】
（１）ＲＰＭＩ＋ＩＦＳ：グルコースを欠くＲＰＭＩ　１６４０（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　１１８７９０２０）で、本発明者らは、これに５ｍＭのグルコース、１０％の熱不活化ウシ胎仔血清（ＩＦＳ）、ペニシリン、およびストレプトマイシンを添加した。
【０２２６】
（２）ＲＰＭＩ＋ｄＩＦＳ：グルコースを欠くＲＰＭＩ　１６４０（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　１１８７９０２０）で、本発明者らは、これに５ｍＭのグルコース、１０％の透析ＩＦＳ、ペニシリン、およびストレプトマイシンを添加した。
【０２２７】
（３）ＨＰＬＭ＋ｄＩＦＳ：ＨＰＬＭ（表２参照）で、本発明者らは、これに１０％の透

析ＩＦＳ、ＲＰＭＩ １６４０ １００Ｘ ビタミン（Ｓｉｇｍａ Ｒ７２５６）、ペニシリン、およびストレプトマイシンを添加した。

【０２２８】

熱失活ウシ胎仔血清（Ｓｉｇｍａ Ｆ４１３５）は、ＳｎａｋｅＳｋｉｎ透析チュービング、３．５Ｋ ＭＷＣＯ、３５mm（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＰＩ８８２４４）を使用して、２０倍体積のＰＢＳに対して透析した。透析は９～１２時間ごとに完全ＰＢＳ交換をして４℃で４８時間実行した。すべての培地は、ボトルトップ真空フィルター、セルロースアセテート膜、ポアサイズ０．４５μm（Ｓｉｇｍａ ＣＬＳ４３０５１４）を使用して無菌濾過した。

細胞培養条件

【０２２９】

すべての実験に先立って、細胞は少なくとも７日間目的の培地で成長させ順応させた。すべての細胞は３７℃および５％CO_2で維持した。

【０２３０】

成長曲線では、すべての細胞系は１００，０００細胞／mLの密度で播種し、２５cm^2の長方形傾角ネック細胞培養フラスコ（ｒｅｃｔａｎｇｕｌａｒ ｃａｎｔｅｄ ｎｅｃｋ ｃｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅ ｆｌａｓｋ）（Ｗｅｓｔｎｅｔ４３０６３９）中１２mLの培地で成長させた。細胞密度測定は径設定８～３０μmのＢｅｃｋｍａｎ Ｚ２コールターカウンターを使用して９～１２時間ごとに記録した。

代謝産物プロファイリングおよび代謝産物存在量の定量

【０２３１】

ＬＣ／ＭＳベースの分析はＩｏｎ ＭａｘソースおよびＨＥＳＩ ＩＩプローブを備えたＱＥｘａｃｔｉｖｅベンチトップオービトラップ質量分析計上で実施し、この分析計はＤｉｏｎｅｘ ＵｌｔｉＭａｔｅ３０００ＵＰＬＣ装置（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）と連結されていた。外部質量較正は７日ごとに標準較正混合物を使用して実施した。アセトニトリルはＬＣ／ＭＳ ＨｙｐｅｒＧｒａｄｅ（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）であった。他の溶媒はすべてＬＣ／ＭＳ Ｏｐｔｉｍａグレード（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）であった。

【０２３２】

培地および血漿の代謝産物プロファイリングでは、試料は５０％のメタノール、３０％のアセトニトリル、２０％の水を、内部標準としての１０ｎｇ／mLのフェニルアラニン－d_8と一緒に含有する溶液で１対４０に希釈し、次に－８０℃で保存した。５分間のボルテックスおよび２１３０ｇでの４℃、５分間の遠心分離に続いて、２μLのそれぞれの培地代謝産物試料を、２．１×２０mmのガードカラムを備えたＺＩＣ－ｐＨＩＬＩＣ２．１×１５０mm分析カラム（両方とも５μm粒子サイズ、ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）上に注射した。緩衝液Ａは２０mMの炭酸アンモニウム、０．１％の水酸化アンモニウム；緩衝液Ｂはアセトニトリルであった。クロマトグラフィー勾配は以下の通り：０～２０分：８０％から２０％Ｂの直線勾配；２０～２０．５分：２０％から８０％Ｂの直線勾配；２０．５～２８分：８０％Ｂでの保持であり、０．１５０mL／分の流速で流した。質量分析計はフルスキャンで操作し、極性切換モードはスプレー電圧を３．０ｋＶに設定し、加熱キャピラリーは２７５℃に保持し、ＨＥＳＩプローブは３５０℃に保持した。シースガス流速は４０ユニットに設定し、補助ガス流は１５ユニットに設定し、スイープガス流は１ユニットに設定した。ＭＳデータ取得は、分解能を７０，０００に設定し、ＡＧＣ標的は10^6、最大注射時間２０ミリ秒で、７０～１０００ｍ／ｚの範囲で実施した。

【０２３３】

ホールセル試料の代謝産物プロファイリングでは、細胞はペレット状にし、次に６ウェルプレートにおいて３mLの新しい培養培地中２００，０００細胞／mLの密度で播種した。２４時間のインキュベーション後、細胞は２５０ｇで５分間遠心分離し、１mLの氷冷０．９％無菌ＮａＣｌに再懸濁し、再び２５０ｇで４℃、５分間遠心分離した。代謝産物は内部標準としての１０ｎｇ／mLのフェニルアラニン－d_8を含有する８０％メタノ

ールの１ｍＬ溶液中に抽出した。ボルテックスを１０分間および４℃で１０分間、２１１３０ｇで３分間遠心分離を行った後、試料を窒素ガス下で乾燥させた。乾燥試料は－８０℃で保存し、次に１００μＬの水に再懸濁し；４μＬのそれぞれの細胞試料を、培地試料をプロファイリングするために記載された通りにＬＣ／ＭＳ分析のために注射した。すべての実験では、追加の培養複製物を同一にセットアップし、細胞数および体積を測定するために使用し、数と体積はそれぞれ８～３０μｍの径設定のＢｅｃｋｍａｎＺ２コールターカウンターを使用して測定した。

【０２３４】

ＵＭＰＳ活性アッセイ試料の代謝産物プロファイリングでは、反応混合物は記載の通りに（ＵＭＰＳ活性アッセイ参照）抽出し、５μＬのそれぞれの試料は、質量分析計はフルスキャン、負イオン化モードでのみ操作したことを除いて、培地試料をプロファイリングするために記載された通りにＬＣ／ＭＳ分析のために注射した。

【０２３５】

種々の代謝経路および過程を包含するほぼ１７０の代謝産物のリストを作成した。ホワイトヘッド研究所代謝産物プロファイリングコア施設（ｔｈｅ Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｍｅｔａｂｏｌｉｔｅ Ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｃｏｒｅ ｆａｃｉｌｉｔｙ）により集められた化学標準物質のライブラリーから、本発明者らは、合わせればこのリストのほぼ９０％を占める標準物質の６つのプールを構築した。標準物質はＬＣ／ＭＳにより確認して、その物質が予測されるｍ／ｚ比でロバストなピークを生じることを確かめた。水中１ｍＭのそれぞれの代謝産物を含有する、それぞれのプールの保存溶液を－８０℃で保存した。それぞれの実施日に、これらのストックは水に連続希釈し、さらに適切な抽出溶液に１：１０で希釈し、その後生体試料の所与のバッチと並行して処理した。

【０２３６】

代謝産物同定および定量は、１０ｐｐｍ質量精度ウィンドウおよび０．５分保持時間ウィンドウを使用してＸＣａｌｉｂｕｒ ＱｕａｎＢｒｏｗｓｅｒ ２．２（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて実施した。代謝産物の同一性を確かめるためおよび定量を可能にするため、代謝産物化学標準物質の前述のプールを使用した。典型的には、標準物質の最終濃度は１０ｎＭ、１００ｎＭ、１μＭ、１０μＭ、および１００μＭであった。グルコースでは、化学標準物質溶液も１２５μＭおよび２５０μＭの濃度で作製した。ある特定の代謝産物では、化学標準物質は代謝産物同定のためだけに利用した。化学標準物質を欠く代謝産物では、ピーク同定は高信頼度ピーク割り当てに制限した（Ｓｍｉｔｈら、２００５年）。

【０２３７】

代謝産物抽出プロトコルは試料タイプにより異なっていたので、処理された試料中のフェニルアラニン－d_8の濃度は様々：化学標準物質プール（９ｎｇ／ｍＬ）、培地および血漿試料（９．７５ｎｇ／ｍＬ）、ならびに細胞試料（１００ｎｇ／ｍＬ）であった。したがって、所与のバッチのそれぞれの試料内のフェニルアラニン－d_8の生のピーク面積は先ずこれらの違いを説明するために正規化した。代謝産物を定量するため、本発明者らは先ずそれぞれの代謝産物の生のピーク面積をそれに対応する正規化されたフェニルアラニン－d_8ピーク面積で除した。所与の化学標準物質の正規化された代謝産物ピーク面積から、次に本発明者らは、典型的にはr^2＞０．９５の二次ログ－ログ方程式に適合する対応する標準曲線を作成し、この標準曲線を使用してそれぞれの生物学的代謝産物抽出物における代謝産物の濃度を決定した。次に、特定のホールセルまたは培地／血漿抽出物中の代謝産物のモル総数を試料濃度および対応する試料体積から計算した。したがって、生体試料中の最終代謝産物濃度は、下の適切な方程式を使用して計算した：

【０２３８】

培地および血漿試料：標準曲線による濃度×４０

【０２３９】

ホールセル試料：標準曲線による濃度×１００／（細胞体積、μＬで）

【０２４０】

標準曲線を使用して定量されなかった代謝産物では、正規化されたピーク面積を上の計算において使用した。

グルコース追跡

【０２４１】

細胞をペレット状にし、次に６ウェルプレートにおいて、５ｍＭの［Ｕ－^{13}Ｃ］－グルコースを含有する３ｍＬの培養培地中２００，０００細胞／ｍＬの密度で播種した。２４時間のインキュベーション後、代謝産物抽出を上のホールセル試料について記載されたのと同様に実施した。

ＬＣ／ＭＳのための５－ＦＵ処置

【０２４２】

ＮＯＭＯ１細胞をペレット状にし、次に６ウェルプレートにおいて、２０μＭの５－ＦＵを含有する３ｍＬの培養培地中２００，０００細胞／ｍＬの密度で播種した。２４時間のインキュベーション後、代謝産物抽出を上のホールセル試料について記載されたのと同様に実施した。

高度標的化メタボロミクス

【０２４３】

５－ＦＵ処置に続くホールセル試料におけるＦｄＵＭＰおよびＦＵＭＰの高度標的化分析では、機器は上記の通りに運転したが、追加のｔＳＩＭ（標的にされた選択イオンモニタリング）スキャンは負のイオン化モードであった。ｔＳＩＭ設定は以下の通りであった：分解能は７０，０００に設定し、ＡＧＣ標的は10^5、および最大積算時間２５０ミリ秒であった。標的質量は３２５．０２４３（ＦｄＵＭＰに対応している）および３４１．０１９２（ＦＵＭＰに対応している）であった。それぞれの標的質量周辺の単離ウィンドウは１．０ｍ／ｚに設定した。

【０２４４】

ＵＭＰＳアッセイ試料中のオロテート、ＰＲＰＰ、ＯＭＰ、およびＵＭＰでは、ＦｄＵＭＰおよびＦＵＭＰについて使用されるｔＳＩＭスキャンについて記載されたすべての設定は、最大積算時間が２００ミリ秒であったこと以外は同一であり、標的質量は１５５．００８８（オロテートに対応している）、３２３．０２８６（ＵＭＰに対応している）、３６７．０１８４（ＯＭＰに対応している）、および３８８．９４４５（ＰＲＰＰに対応している）であった。

消費および分泌速度

【０２４５】

成長曲線構築で細胞密度を測定したそれぞれの時点で、小アリコートの培養物を慎重に取り出し、２５０ｇで４℃、５分間遠心分離し、上の培地試料および血漿試料について記載された通りに、得られた上清から代謝産物を抽出した。それぞれの成長曲線が完成すると、本発明者らは増殖の指数期の中間内に収まる時点を決定し、その時点で収集した馴化培地の代謝産物抽出をプロファイリングした。本発明者らは、並行して新鮮培地をプロファイリングし、所与の代謝産物についての特定の消費／分泌速度を単純化したモノーモデル、$q = \mu / Y_{X/S}$に従って入手し、この式は$q = \mu \times V \times (\triangle M / \triangle X)$に展開し、そこではμは特定の成長速度であり、Ｖは培養体積であり、△Ｍ＝代謝産物濃度t_{final}－代謝産物濃度$t_{initial}$、および△Ｘ＝細胞密度t_{final}－細胞密度$t_{initial}$である。このようにして、本発明者らは、以下の代謝産物：グルコース、ラクテート、オロテート、およびオロチジンについてのｑを計算した。

組換えＵＭＰＳの発現および免疫精製

【０２４６】

ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞のトランスフェクションでは、４００万個の細胞を１５ｃｍ培養皿に蒔いた。２４時間後、ポリエチレンイミン法（Ｂｏｕｓｓｉｆら、１９９５年）を使用して、細胞に１５μｇのｐＬＪＣ２－ＵＭＰＳ－３ｘＦＬＡＧまたはｐＬＪＣ２－ＵＭＰＳ（Ｙ３７Ａ、Ｒ１５５Ａ）－３ｘＦＬＡＧをトランスフェクトした。４８時間後、細胞を氷冷ＰＢＳで１回すすぎ、次に直ちに溶解緩衝液（１％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００、

４０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、１００ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭの$MgCl_2$、１タブレットのＥＤＴＡを含まないプロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ　１１５８０８００；２５ｍＬ緩衝液あたり）、１タブレットのＰｈｏｓＳｔｏｐホスファターゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ　０４９０６８４５００１；１０ｍＬ緩衝液あたり））で溶解した。細胞溶解物は２１１３０ｇで、４℃、１０分間の遠心分離により澄明にした。抗ＦＬＡＧ免疫沈澱では、ＦＬＡＧ－Ｍ２親和性ジェル（Ｓｉｇｍａ　Ａ２２２０）を溶解緩衝液で３回洗浄した。実験ごとに、次に、５００μＬの５０／５０スラリーの親和性ジェルを、５つの個々の１５ｃｍ培養皿から収集した澄んだ溶解物のプールに添加し、４℃で３時間回転させながらインキュベートした。免疫沈澱に続いて、ビーズは溶解緩衝液で２回、５００ｍＭのＮａＣｌを含有する溶解緩衝液で３回洗浄した。次に、組換えタンパク質は、１ｍｇ／ｍＬのＦＬＡＧペプチドを含有する溶解緩衝液に４℃で１時間溶出した。溶離液は１００ｇで４℃、４分間遠心分離（ＢｉｏＲａｄマイクロバイオスピンカラム７３２－６２０４）により単離し、２０ボリュームの保存緩衝液（４０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、１００ｍＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭのｄＴＴ）に対して緩衝液交換し（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｎｔｒａ　３０Ｋ　ＮＭＷＬ）、グリセロールと混合し（最終濃度１５％ｖ／ｖ）、最後に液体窒素で瞬間凍結し－８０℃で保存した。タンパク質試料はＢｒａｄｆｏｒｄ試薬およびＢＳＡ標準を使用して定量し、１２％のＳＤＳ－ＰＡＧＥにより確認した。

ＵＭＰＳ活性アッセイ

【０２４７】

それぞれの精製ＵＭＰＳバリアント（２０～４０ｎＭの酵素）とオロテート（１００μＭ）およびＰＲＰＰ（３００μＭ）との反応は、３７℃で、全体積１００μＬ中２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、５ｍＭのNa_2HPO_4、５ｍＭの$MgCl_2$、２ｍＭのｄＴＴ、１００μＭのＥＤＴＡ（（Ｈａｎら、１９９５年）から改作）および種々の濃度の推定阻害因子において実行した。２０分間のインキュベーションに続いて、１５μＬアリコートの反応混合物を取り出して、代謝産物抽出のために８５μＬの氷冷８０％メタノールに直ちに添加し、５分間ボルテックスし、２１１３０ｇで、４℃、１分間遠心分離した。

【０２４８】

６－アザウリジン、６－アザ－ＵＭＰ、９－メチル尿酸、アラントイン、アロプリノール、および尿酸の保存溶液を１ＭのＮａＯＨ中２００ｍＭで新たに作製し、適切に希釈すると、反応ｐＨにほとんど影響はなかった。

【０２４９】

８０％メタノール中で同様に調製されたＵＭＰ化学標準物質（最終濃度６２５ｎＭ、１．２５μＭ、２．５μＭ、５μＭ、および１０μＭ）のピーク面積を使用して、本発明者らは、一次方程式に適合する標準曲線を作成して、反応試料中のＵＭＰ濃度が最初のオロテート濃度の１０％を超えないことを確実にした。ＯＭＰの化学標準物質は利用可能でなかった。

薬物処置アッセイ

【０２５０】

ＮＯＭＯ１細胞を、６ウェルプレートにおいて３ｍＬの培養培地中１６，６６７細胞／ｍＬの密度で播種した。２４時間のインキュベーション後、細胞は５－ＦＵ（１００ｎＭ、１μＭ、１０μＭ、１００μＭ、または１ｍＭ）またはドキソルビシン（１．９５ｎＭ、７．８１ｎＭ、３１．２５ｎＭ、１２５ｎＭ、または５００ｎＭ）で処置した。非処置の対照を含む、すべてのウェルは０．５％のＤＭＳＯを含有していた。薬物の添加に続いて、プレートを２分間穏やかに振盪させた。処置の４日後、それぞれのウェルからの２００μＬを白色の９６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に移し、細胞生存率をＣｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて評価した。発光はＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｍ５プレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）を用いて測定し、非処置の対照に対して正規化した。

【０２５１】

ＳＷ６２０細胞を２０００細胞／ウェルの密度で播種し、２４時間付着させておいた。５－ＦＵおよびドキソルビシンをＤＭＳＯで調製し、ＨＰ　Ｄ３００複合ディスペンサーを使用して分注した。細胞生存率は処置後４日にＣｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ－Ｇｌｏを用いて評価し、発光は上記の通りに測定した。

【０２５２】

用量応答値をＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍにプロットし、Ｏｎｅ　Ｓｉｔｅ－ＦｉｔｌｏｇＩＣ５０方程式を使用して適合させた。

マウス血漿の収集

【０２５３】

ＭＩＴ施設内動物管理使用委員会は血液収集のための手順を承認した。マウスはホワイトヘッド研究所の特定病原体フリー動物施設において一定の固形飼料で維持し、血液収集前の１８時間絶食させた。午前１０時に、３．５ヶ月齢のＣ５７Ｂｌ／６Ｊバックグラウンドのオス野生型マウス（ｎ＝４）の顔面静脈からヘパリン処理したチューブに１００μＬの血液を収集した。血漿を単離するため、収集した血液は８５０ｇで４℃、６分間遠心分離した。次に、血漿画分を新しいチューブに移し、上で培地試料について記載されたのと同様に代謝産物抽出を実施するために一定分量を取り出した。

統計分析

【０２５４】

ｐ値はすべて、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６において両側対応なしｔ－検定を使用して計算した。

参考文献

【化１】

[00255] Adelman, R., Saul, R.L., and Ames, B.N. (1988). Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. Proc Natl Acad Sci U S A. *85*, 2706–2708.

[00256] Atkinson, D.E. (1968). Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry. *7*, 4030–4034.

[00257] Álvarez-Lario, B., and Macarrón-Vicente, J. (2010). Uric acid and evolution. Rheumatology (Oxford). *49*, 2010–2015.

[00258] Bailey, C.J. (2009). Orotic aciduria and uridine monophosphate synthase: A reappraisal. J Inherit Metab Dis. *32*, 227–233.

[00259] Birsoy, K., Possemato, R., Lorbeer, F.K., Bayraktar, E.C., Thiru, P., Yucel, B., Wang, T., Chen, W.W., Clish, C.B., and Sabatini, D.M. (2014). Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. Nature. 1–18.

[00260] Bobulescu, I.A., and Moe, O.W. (2012). Renal Transport of Uric Acid:

【化２】

Evolving Concepts and Uncertainties. Adv Chronic Kidney Dis. *19*, 358–371.

[00261] Bono, V.H., Jr., Weissman, S.M., and Frei, E., III (1964). The Effect of 6-Azauridine Administration on De Novo Pyrimidine Production in Chronic Myelogenous Leukemia. J Clin Invest. *43*, 1486–1494.

[00262] Boroughs, L.K., and DeBerardinis, R.J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. Nat Cell Biol. *17*, 351–359.

[00263] Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. Nat Rev Cancer. *11*, 85-95.

[00264] Cantor, J.R., and Sabatini, D.M. (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. Cancer Discov. *2*, 881–898.

[00265] Chandrasekera, P.C., and Pippin, J.J. (2014). Of rodents and men: species-specific glucose regulation and type 2 diabetes research. ALTEX. *31*, 157–176.

[00266] Comerford, S.A., Huang, Z., Du, X., Wang, Y., Cai, L., Witkiewicz, A.K., Walters, H., Tantawy, M.N., Fu, A., Manning, H.C., et al. (2014). Acetate Dependence of Tumors. Cell.*159*, 1591– 1602.

[00267] Commisso, C., Davidson, S.M., Soydaner-Azeloglu, R.G., Parker, S.J., Kamphorst, J.J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J.A., Thompson, C.B., et al. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. Nature. *497*, 633-637.

[00268] Davidson, S.M., Papagiannakopoulos, T., Olenchock, B.A., Heyman, J.E., Keibler, M.A., Luengo, A., Bauer, M.R., Jha, A.K., O'Brien, J.P., Pierce, K.A., et al. (2016). Environment Impacts the Metabolic Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. Cell Metab. *23*, 517–528.

[00269] DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. Sci Adv. *2*, e1600200.

[00270] DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. Cell Metab. *7*, 11–20.

[00271] Demetrius, L. (2005). Of mice and men. EMBO Rep. *6*, S39–S44.

[00272] DeNicola, G.M., and Cantley, L.C. (2015). Cancer's Fuel Choice: New Flavors for a Picky Eater. Mol Cell. *60*, 514–523.

【化３】

[00273] Dulbecco, R., and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. Virology. *8*, 396–397.

[00274] Eagle, H. (1955a). The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Stain HeLa) in tissue culture. J Exp Med. *102*, 37–48.

[00275] Eagle, H. (1955b). The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture. J Biol Chem. *214*, 839-852.

[00276] Eagle, H. (1955c). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science. *122*, 501–514.

[00277] Eagle, H. (1959). Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures. Science. *130*, 432–437.

[00278] Eason, K., and Sadanandam, A. (2016). Molecular or Metabolic Reprograming: What Triggers Tumor Subtypes? Cancer Res. *76*, 5195–5200.

[00279] Elsea, S.H., and Lucas, R.E. (2002). The mousetrap: what we can learn when the mouse model does not mimic the human disease. ILAR J. *43*, 66–79.

[00280] Evans, D.R., and Guy, H.I. (2004). Mammalian Pyrimidine Biosynthesis: Fresh Insights into an Ancient Pathway. J Biol Chem. *279*, 33035–33038.

[00281] Fallon, H.J., Frei, E., Block, J., and Seegmiller, J.E. (1961). The uricosuria and orotic aciduria induced by 6-azauridine. J Clin Invest. *40*, 1906–1914.

[00282] Favaro, E., Bensaad, K., Chong, M.G., Tennant, D.A., Ferguson, D.J.P., Snell, C., Steers, G., Turley, H., Li, J.-L., Günther, U.L., et al. (2012). Glucose Utilization via Glycogen Phosphorylase Sustains Proliferation and Prevents Premature Senescence in Cancer Cells. Cell Metab. *16*, 751–764.

[00283] Fox, R.M., Royse-Smith, D., and O'Sullivan, W.J. (1970). Orotidinuria induced by allopurinol. Science. *168*, 861–862.

[00284] Fox, R.M., Wood, M.H., and Royse-Smith, D. (1973). Hereditary orotic aciduria: types I and II. Am J. Med. *55*, 791–798.

[00285] Freshney, R.I. (2010). Culture of Animal Cells. A Manual of basic technique and specialized applications. Sixth Edition. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.).

[00286] Handschumacher, R.E. (1960). Orotidylic Acid Decarboxylase: Inhibition Studies with Azauridine 5'-Phosphate. J Biol Chem. *235*, 2917–2919.

【化４】

[00287] Hensley, C.T., Faubert, B., Yuan, Q., Lev-Cohain, N., Jin, E., Kim, J., Jiang, L., Ko, B., Skelton, R., Loudat, L., et al. (2016). Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. Cell. *164*, 681– 694.

[00288] Hosios, A.M., Hecht, V.C., Danai, L.V., Johnson, M.O., Rathmell, J.C., Steinhauser, M.L., Manalis, S.R., and Vander Heiden, M.G. (2016b). Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. Dev Cell. *36*, 540–549.

[00289] Hu, J., Locasale, J.W., Bielas, J.H., O'Sullivan, J., Sheahan, K., Cantley, L.C., Vander Heiden, M.G., and Vitkup, D. (2013). Heterogeneity of tumor-induced gene expression changes in the human metabolic network. Nat Biotechnol. *31*, 522–529.

[00290] Ido, Y., Chang, K., and Williamson, J.R. (2004). NADH augments blood flow in physiologically activated retina and visual cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. *101*, 653–658.

[00291] Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A.L., Kafri, R., Kirschner, M.W., Clish, C.B., and Mootha, V.K. (2012). Metabolite Profiling Identifies a Key Role for Glycine in Rapid Cancer Cell Proliferation. Science. *336*, 1040–1044.

[00292] Jeha, S., Kantarjian, H., Irwin, D., Shen, V., Shenoy, S., Blaney, S., Camitta, B., and Pui, C.-H. (2004). Efficacy and safety of rasburicase, a recombinant urate oxidase (Elitek™), in the management of malignancy-associated hyperuricemia in pediatric and adult patients: final results of a multicenter compassionate use trial. Leukemia. *19*, 34–38.

[00293] Jones, M.E. (1980). Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. Annu Rev Biochem. *49*, 253–279.

[00294] Kamphorst, J.J., Nofal, M., Commisso, C., Hackett, S.R., Lu, W., Grabocka, E., Vander Heiden, M.G., Miller, G., Drebin, J.A., Bar-Sagi, D., et al. (2015). Human Pancreatic Cancer Tumors Are Nutrient Poor and Tumor Cells Actively Scavenge Extracellular Protein. Cancer Res. *75*, 544– 553.

[00295] Kand'ár, R., and Záková, P. (2008). Allantoin as a marker of oxidative stress in human erythrocytes. Clin Chem Lab Med. *46*, 1270-1274.

[00296] Keibler, M.A., Wasylenko, T.M., Kelleher, J.K., Iliopoulos, O., Vander Heiden, M.G., and Stephanopoulos, G. (2016). Metabolic requirements for cancer cell proliferation.

【化５】

Cancer Metab., 4:16.

[00297] Kelley, W.N., and Beardmore, T.D. (1970). Allopurinol: alteration in pyrimidine metabolism in man. Science. *169*, 388–390.

[00298] Kratzer, J.T., Lanaspa, M.A., Murphy, M.N., Cicerchi, C., Graves, C.L., Tipton, P.A., Ortlund, E.A., Johnson, R.J., and Gaucher, E.A. (2014). Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. Proc Natl Acad Sci U S A. *111*, 3763–3768.

[00299] Lehuede, C., Dupuy, F., Rabinovitch, R., Jones, R.G., and Siegel, P.M. (2016). Metabolic Plasticity as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis. Cancer Res. *76*, 5201–5208.

[00300] Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer. *3*, 330–338.

[00301] Lunt, S.Y., and Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Annu Rev Cell Dev Biol. *27*, 441–464.

[00302] MacIver, N.J., Michalek, R.D., and Rathmell, J.C. (2013). Metabolic Regulation of T Lymphocytes. Annu Rev Immunol. *31*, 259–283.

[00303] Maddocks, O.D.K., Berkers, C.R., Mason, S.M., Zheng, L., Blyth, K., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2013). Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. Nature. *493*, 542–546.

[00304] Martignoni, M., Groothuis, G.M.M., and de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. Expert Opin Drug Metab Toxicol. *2*, 875–894.

[00305] Mashimo, T., Pichumani, K., Vemireddy, V., Hatanpaa, K.J., Singh, D.K., Sirasanagandla, S., Nannepaga, S., Piccirillo, S.G., Kovacs, Z., Foong, C., et al. (2014). Acetate Is a Bioenergetic Substrate for Human Glioblastoma and Brain Metastases. Cell. *159*, 1603–1614.

[00306] Mayers, J.R., Torrence, M.E., Danai, L.V., Papagiannakopoulos, T., Davidson, S.M., Bauer, M.R., Lau, A.N., Ji, B.W., Dixit, P.D., Hosios, A.M., et al. (2016). Tissue of origin dictates branched-chain amino acid metabolism in mutant Kras-driven cancers. Science. *353*, 1161–1165.

[00307] Moore, G.E., Gerner, R.E., and Franklin, H.A. (1967). Culture of normal human

【化６】

leukocytes. JAMA. *199*, 519–524.

[00308] Murrell, G.A.C., and Rapeport, W.G. (1986). Clinical Pharmacokinetics of Allopurinol. Clin Pharmacokinet. *11*, 343–353.

[00309] Oda, M., Satta, Y., Takenaka, O., and Takahata, N. (2002). Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. Mol Biol Evol. *19*, 640–653.

[00310] Olson, K.A., Schell, J.C., and Rutter, J. (2016). Pyruvate and Metabolic Flexibility: Illuminating a Path Toward Selective Cancer Therapies. Trends Biochem Sci. *41*, 219-230.

[00311] Pan, M., Reid, M.A., Lowman, X.H., Kulkarni, R.P., Tran, T.Q., Liu, X., Yang, Y., Hernandez- Davies, J.E., Rosales, K.K., Li, H., et al. (2016). Regional glutamine deficiency in tumours promotes dedifferentiation through inhibition of histone demethylation. Nat Cell Biol. *18*, 1090– 1101.

[00312] Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Cell Metab. *23*, 27–47.

[00313] Pearce, E.L., Poffenberger, M.C., Chang, C.H., and Jones, R.G. (2013). Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. Science. *342*, 1242454–1242454.

[00314] Psychogios, N., Hau, D.D., Peng, J., Guo, A.C., Mandal, R., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Krishnamurthy, R., Eisner, R., Gautam, B., et al. (2011). The human serum metabolome. PLoS ONE. *6*, e16957.

[00315] Reyes, P., and Guganig, M.E. (1975). Studies on a pyrimidine phosphoribosyltransferase from murine leukemia P1534J. Partial purification, substrate specificity, and evidence for its existence as a bifunctional complex with orotidine 5-phosphate decarboxylase. J Biol Chem. *250*, 5097– 5108.

[00316] Schug, Z.T., Peck, B., Jones, D.T., Zhang, Q., Grosskurth, S., Alam, I.S., Goodwin, L.M., Smethurst, E., Mason, S., Blyth, K., et al. (2015). Acetyl-CoA Synthetase 2 Promotes Acetate Utilization and Maintains Cancer Cell Growth under Metabolic Stress. Cancer Cell. *27*, 57–71.

[00317] Schwartz, P.M., and Handschumacher, R.E. (1979). Selective antagonism of 5-fluorouracil cytotoxicity by 4-hydroxypyrazolopyrimidine (allopurinol) in vitro. Cancer

【化７】

Res. *39*, 3095–3101.

[00318] Sellers, K., Fox, M.P., Bousamra, M., II, Slone, S.P., Higashi, R.M., Miller, D.M., Wang, Y., Yan, J., Yuneva, M.O., Deshpande, R., et al. (2015). Pyruvate carboxylase is critical for non–small- cell lung cancer proliferation. J Clin Invest. *125*, 687–698.

[00319] Shaul, Y.D., Yuan, B., Thiru, P., Nutter-Upham, A., McCallum, S., Lanzkron, C., Bell, G.W., and Sabatini, D.M. (2016). MERAV: a tool for comparing gene expression across human tissues and cell types. Nucleic Acids Res. *44*, D560–D566.

[00320] Shestov, A.A., Liu, X., Ser, Z., Cluntun, A.A., Hung, Y.P., Huang, L., Kim, D., Le, A., Yellen, G., Albeck, J.G., et al. (2014). Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. Elife. *3*, eLife.03342.

[00321] Smith, L.H., Jr., Sullivan, M., and Huguley, C.M., Jr. (1961). PYRIMIDINE METABOLISM IN MAN. IV. THE ENZYMATIC DEFECT OF OROTIC ACIDURIA. J Clin Invest. *40*, 656–664.

[00322] Suchi, M., Mizuno, H., Kawai, Y., Tsuboi, T., Sumi, S., Okajima, K., Hodgson, M.E., Ogawa, H., and Wada, Y. (1997). Molecular cloning of the human UMP synthase gene and characterization of point mutations in two hereditary orotic aciduria families. Am J Hum Genet. *60*, 525–539.

[00323] Tardito, S., Oudin, A., Ahmed, S.U., Fack, F., Keunen, O., Zheng, L., Miletic, H., Sakariassen, P.Ø., Weinstock, A., Wagner, A., et al. (2015). Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. Nat Cell Biol. *17*, 1556– 1568.

[00324] Traut, T.W., and Jones, M.E. (1977). Kinetic and conformational studies of the orotate phosphoribosyltransferase:orotidine-5'-phosphate decarboxylase enzyme complex from mouse Ehrlich ascites cells. J Biol Chem. *252*, 8374–8381.

[00325] Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Science. *324*, 1029–1033.

[00326] Venneti, S., Dunphy, M.P., Zhang, H., Pitter, K.L., Zanzonico, P., Campos, C., Carlin, S.D., La Rocca, G., Lyashchenko, S., Ploessl, K., et al. (2015). Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo. Sci Transl Med.

【化８】

7, 274ra17–274ra17.

[00327] Williamson, D.H., Lund, P., and Krebs, H.A. (1967). The redox state of free nicotinamide- adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem J. *103*, 514–527.

[00328] Wishart, D.S., Jewison, T., Guo, A.C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., et al. (2013). HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. Nucleic Acids Res. *41*, D801–D807.

[00329] Wu, X.W., Lee, C.C., Muzny, D.M., and Caskey, C.T. (1989). Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. Proc Natl Acad Sci U S A. *86*, 9412–9416.

[00330] Wu, X.W., Muzny, D.M., Lee, C.C., and Caskey, C.T. (1992). Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. J. Mol Evol. *34*, 78–84.

[00331] Wu, X., Wakamiya, M., Vaishnav, S., Geske, R., Montgomery C Jr., Jones, P., Bradley, A., and Caskey, C.T. (1994). Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. *91*, 742-746.

[00332] Yao, C.-H., Fowle-Grider, R., Mahieu, N.G., Liu, G.-Y., Chen, Y.-J., Wang, R., Singh, M., Potter, G.S., Gross, R.W., Schaefer, J., et al. (2016). Exogenous Fatty Acids Are the Preferred Source of Membrane Lipids in Proliferating Fibroblasts. Cell Chem Biol. *23*, 483–493.

[00333] Yuneva, M.O., Fan, T.W.M., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Matés, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y., et al. (2012). The Metabolic Profile of Tumors Depends on Both the Responsible Genetic Lesion and Tissue Type. Cell Metab. *15*, 157–170.

[00334] Zhang, Q., Piston, D.W., and Goodman, R.H. (2002). Regulation of corepressor function by nuclear NADH. Science *295*, 1895–1897.

[00335] Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A. *92*, 7297–7301.

[00336] Han, B.D., Livingstone, L.R., Pasek, D.A., Yablonski, M.J., and Jones, M.E. (1995). Human uridine monophosphate synthase: baculovirus expression, immunoaffinity column

【化９】

purification and characterization of the acetylated amino terminus. Biochemistry *34*, 10835–10843.

[00337] Smith, C.A., O'Maille, G., Want, E.J., Qin, C., Trauger, S.A., Brandon, T.R., Custodio, D.E., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2005). METLIN: a metabolite mass spectral database. Ther Drug Monit. *27*, 747–751.

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。
(項目１)
少なくとも９種のタンパク質構成性アミノ酸と、
１種または複数種のビタミンと、
１種または複数種の無機イオンと、
グルコースと、
４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチン、タウリン、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベート、スクシネート、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロール、尿素、ガラクトース、フルクトース、ヒポキサンチンおよび尿酸から選択される少なくとも１０種の小有機化合物と
を含む、基礎培養培地。
(項目２)
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、
４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチン、タウリンから選択される少なくとも４種のアミノ酸またはアミノ酸誘導体と、
２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートから選択される少なくとも６種の小有機化合物と
を含む、項目１に記載の基礎培養培地。
(項目３)
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンから選択される少なくとも６種のアミノ酸またはアミノ酸誘導体を含む、項目１または項目２に記載の基礎培養培地。
(項目４)
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、４－ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトルリン、オルニチンおよびタウリンを含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目５)
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、アセテート、シトレート、ホルメート、ラクテート、マロネート、ピルベートおよびスクシネートから選択される少なくとも８種の小有機化合物を含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目６)
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロールおよび尿素から選択される少なくとも３種の小有機化合物を含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目７)
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、アセトン、クレアチン、クレアチニン、グルタチオン、グリセロールおよび尿素を含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目８)
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、ヒポキサンチン、尿酸または両方を含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目９)
前記少なくとも１０種の小有機化合物が、ガラクトース、フルクトースまたは両方を含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目１０)

前記少なくとも１０種の小有機化合物が、２－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシブチレート、４－ヒドロキシプロリン、アセテート、アセトン、アセチルグリシン、アルファ－アミノブチレート、ベタイン、カルニチン、シトレート、シトルリン、クレアチン、クレアチニン、ホルメート、フルクトース、ガラクトース、グルタチオン、グリセロール、ヒポキサンチン、ラクテート、マロネート、オルニチン、ピルベート、スクシネート、タウリン、尿素および尿酸を含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。

(項目１１)

前記少なくとも９種のタンパク質構成性アミノ酸が、グリシン、Ｌ－アラニン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパルテート、Ｌ－システイン、Ｌ－グルタメート、Ｌ－グルタミン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－トレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリンおよびＬ－シスチンを含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。

(項目１２)

前記１種または複数種のビタミンが、以下のビタミン：Ｄ－ビオチン、コリン、葉酸、ミオ－イノシトール、ナイアシンアミド、ｐ－アミノ安息香酸、Ｄ－パントテン酸、ビタミンＢ６、リボフラビン、チアミンおよびビタミンＢ１２のうち少なくとも８種を含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。

(項目１３)

前記１種または複数種の無機イオンが、以下のイオン：Na^{+}、K^{+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、NH_4^{+}、Cl^{-}、HCO_3^{-}、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}およびNO_3^{-}のうち少なくとも８種を含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。

(項目１４)

前記培地中に存在する前記イオンの各々の濃度が、表１においてそのイオンについて列挙される濃度の±５０％以内である、項目１３に記載の基礎培養培地。

(項目１５)

前記培地中に存在する前記イオンの各々の濃度が、表１においてそのイオンについて列挙される濃度の±２５％以内である、項目１３に記載の基礎培養培地。

(項目１６)

前記培地中に存在する前記イオンの各々の濃度が、表１においてそのイオンについて列挙される濃度の±１０％以内である、項目１３に記載の基礎培養培地。

(項目１７)

前記培地中に存在する前記イオンの各々の濃度が、表１においてそのイオンについて列挙される濃度である、項目１３に記載の基礎培養培地。

(項目１８)

前記１種または複数種の無機イオンが、Na^{+}、K^{+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、NH_4^{+}、Cl^{-}、HCO_3^{-}、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}およびNO_3^{-}を含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。

(項目１９)

前記１種または複数種の無機イオンが、無機塩として存在し、該無機塩のうち少なくとも６種が、$CaCl_2$、ＫＣｌ、$MgCl_2$、$MgSO_4$、ＮａＣｌ、$NaHCO_3$、Na_2HPO_4、$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$およびNH_4Clから選択される、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。

(項目２０)

表２中に列挙される前記基礎培養培地中に存在する前記構成成分の各々の濃度が、表２においてその構成成分について列挙される濃度の±５０％以内である、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。

(項目２１)

表２中に列挙される前記基礎培養培地中に存在する前記構成成分の各々の濃度が、表２においてその構成成分について列挙される濃度の±２５％以内である、前記項目のいずれ

かに記載の培養培地。
(項目２２)
表２中に列挙される前記基礎培養培地中に存在する前記構成成分の各々の濃度が、表２においてその構成成分について列挙される濃度の±１０％以内である、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目２３)
表２中に列挙される前記基礎培養培地中に存在する前記構成成分の各々の濃度が、表２においてその構成成分について列挙される濃度で存在する、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目２４)
表２中に列挙される前記構成成分の各々が、前記培地中に存在する、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目２５)
１種または複数種の抗生物質、ｐＨ指示薬または両方をさらに含む、前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地。
(項目２６)
前記項目のいずれかに記載の基礎培養培地を含む培養培地であって、血清または血清代用品をさらに含む培養培地。
(項目２７)
１％～２０％の血清を含む、項目２６に記載の培養培地。
(項目２８)
１％～５％の血清または５％～１０％の血清または１０％～２０％の血清を含む、項目２７に記載の培養培地。
(項目２９)
およそ１０％の血清を含む、項目２７に記載の培養培地。
(項目３０)
前記血清が、ウシ胎仔血清である、項目２６から２９のいずれかに記載の培養培地。
(項目３１)
前記血清が、透析された血清である、項目２６から３０のいずれかに記載の培養培地。
(項目３２)
前記血清が、熱不活化血清である、項目２６から３１のいずれかに記載の培養培地。
(項目３３)
項目１から２５に記載の基礎培養培地または項目２６から３２に記載の培養培地の構成成分をまとめて含有する１つまたは複数の容器を含むキット。
(項目３４)
前記培養培地の複数の相互に適合性である構成成分を各々が含有する少なくとも２つの容器を含む、項目３３に記載のキット。
(項目３５)
前記培養培地を調製するための指示、該培養培地において細胞を培養するための指示または両方をさらに含む、項目３３または項目３４に記載のキット。
(項目３６)
項目１から２５に記載の基礎培養培地または項目２６から３２に記載の培養培地を調製する方法であって、そのそれぞれの構成成分を組み合わせることを含む、方法。
(項目３７)
項目１から２５に記載の基礎培養培地または項目２６から３２に記載の培養培地および１種もしくは複数種の哺乳動物細胞を含む組成物。
(項目３８)
前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞を含む、項目３７に記載の組成物。
(項目３９)
前記細胞が、血液細胞を含む、項目３７または項目３８に記載の組成物。

(項目４０)
前記細胞が、がん細胞を含む、項目３７から３９のいずれかに記載の組成物。
(項目４１)
試験薬剤をさらに含む、項目１から２５に記載の基礎培養培地、項目２６から３２に記載の培養培地、または項目３７から４０に記載の組成物。
(項目４２)
前記試験薬剤が、小分子である、項目４１に記載の基礎培養培地、培養培地または組成物。
(項目４３)
前記試験薬剤が、化学療法剤である、項目４１または項目４２に記載の基礎培養培地、培養培地または組成物。
(項目４４)
１種または複数種の哺乳動物細胞を培養する方法であって、項目１から２５に記載の基礎培養培地、項目２６から３２に記載の培養培地、または項目３７から４０に記載の組成物を提供することと、該培養培地において１種または複数種の哺乳動物細胞を培養することとを含む、方法。
(項目４５)
前記１種または複数種の哺乳動物細胞が、ヒト細胞を含む、項目４４に記載の方法。
(項目４６)
前記１種または複数種の哺乳動物細胞が、血液細胞を含む、項目４４または項目４５に記載の方法。
(項目４７)
前記１種または複数種の哺乳動物細胞が、がん細胞を含む、項目４４から４６のいずれかに記載の方法。
(項目４８)
前記培養培地に試験薬剤を添加することをさらに含む、項目４４から４７のいずれかに記載の方法。
(項目４９)
哺乳動物細胞集団または細胞系を特徴付ける方法であって、（ａ）項目１から２５に記載の基礎培養培地または項目２６から３２に記載の培養培地中で哺乳動物細胞集団または細胞系の１種または複数種の細胞を培養することと、（ｂ）該培養培地で培養された該細胞の表現型を検出すること、または該培養培地で培養された細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることとを含む、方法。
(項目５０)
（ｃ）第２の培養培地において同一集団または細胞系に由来する１種または複数種の細胞を培養することと、（ｄ）該第２の培養培地において培養された該細胞の表現型を検出すること、または該第２の培養培地において培養された該細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることと、（ｅ）ステップ（ｂ）において検出された前記表現型を、第２の培養培地で培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する１種もしくは複数種の細胞の該表現型と比較すること、または該アッセイの結果を、第２の培養培地において培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する１種もしくは複数種の細胞を用いて実施した同一アッセイの結果と比較することとをさらに含む、項目４９に記載の方法。
(項目５１)
前記第１の培養培地で培養された細胞から得た前記表現型またはアッセイの結果と、前記第２の培養培地において培養された細胞から得た前記表現型またはアッセイの結果との間の差を検出することを含む、項目４９または項目５０に記載の方法。
(項目５２)
前記細胞を、前記培養培地において該細胞が培養される期間の一部またはすべての間、試験薬剤と接触させることを含む、項目４９から５１のいずれかに記載の方法。
(項目５３)

前記試験薬剤の存在下で前記培養培地において培養された細胞の前記表現型を、前記試験薬剤の存在下で前記第２の培養培地において培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する細胞の前記表現型と比較すること、または前記試験薬剤の存在下で前記培養培地において培養された細胞を用いて実施した前記アッセイの結果を、前記試験薬剤の存在下で前記第２の培養培地において培養されている同一集団もしくは細胞系に由来する細胞を用いて実施した同一アッセイの結果と比較することを含む、項目５２に記載の方法。

(項目５４)

前記第２の培養培地が、標準培養培地である、項目５０から５３のいずれかに記載の方法。

(項目５５)

前記アッセイが、生存率アッセイ、増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、オートファジーアッセイ、レポーターアッセイまたは細胞毒性アッセイである、項目４９から５４のいずれかに記載の方法。

(項目５６)

試験薬剤を特徴付ける方法であって、（ａ）前記試験薬剤の存在下で、項目１から２５に記載の基礎培養培地または項目２６から３２に記載の培養培地において１種もしくは複数種の哺乳動物細胞を培養することと、（ｂ）該細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることとを含む、方法。

(項目５７)

（ｃ）前記試験薬剤の存在下で第２の培養培地において同一集団または細胞系に由来する１種または複数種の細胞を培養することと、（ｄ）該第２の培養培地において培養した該細胞を用いて実施したアッセイの結果を得ることとをさらに含む、項目５６に記載の方法。

(項目５８)

前記アッセイの結果を、前記試験薬剤の存在下で第２の培養培地において培養されている同一集団または細胞系に由来する１種または複数種の細胞を用いて実施した同一アッセイの結果と比較することをさらに含む、項目５６または項目５７に記載の方法。

(項目５９)

前記細胞を、前記試験薬剤と少なくとも２４時間接触させることを含む、項目５６から５８のいずれかに記載の方法。

(項目６０)

前記第２の培養培地が、標準培養培地である、項目５６から５９のいずれかに記載の方法。

(項目６１)

前記試験薬剤の存在下で前記第１の培養培地において培養された細胞から得た前記アッセイの結果と、前記試験薬剤の存在下で前記２の培養培地において培養された細胞から得た前記アッセイの結果との間の差を検出することを含む、項目５６から６０のいずれかに記載の方法。

(項目６２)

前記１種または複数種の細胞が、ヒト細胞を含む、項目４９から６１のいずれかに記載の方法。

(項目６３)

前記１種または複数種の細胞が、血液細胞を含む、項目４９から６２のいずれかに記載の方法。

(項目６４)

前記１種または複数種の細胞が、がん細胞を含む、項目４９から６３のいずれかに記載の方法。

(項目６５)

前記アッセイが、生存率アッセイ、増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、
オートファジーアッセイ、レポーターアッセイまたは細胞毒性アッセイである、項目５６

から６４のいずれかに記載の方法。

(項目６６)

前記試験薬剤が、小分子である、項目５６から６５のいずれかに記載の方法。

(項目６７)

前記試験薬剤が、化学療法剤である、項目５６から６６のいずれかに記載の方法。

(項目６８)

がんを処置することを必要とする被験体においてがんを処置する方法であって、該被験体に、（ａ）５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）または５－ＦＵプロドラッグの一方または両方、および（ｂ）尿酸低下剤を投与し、その結果、該被験体が５－ＦＵおよび尿酸低下剤の両方に曝露されることを含む、方法。

(項目６９)

前記尿酸低下剤がウリカーゼである、項目６８に記載の方法。

(項目７０)

前記尿酸低下剤が、尿酸排泄剤であり、必要に応じて、該尿酸排泄剤が、プロベネシド、ベンズブロマロンまたはスルフィンピラゾンである、項目６９に記載の方法。

(項目７１)

前記尿酸低下剤が、アンプロジピン、アトルバスタチン、フェノフィブラート、グアイフェネシンまたはレシヌラドである、項目７０に記載の方法。

(項目７２)

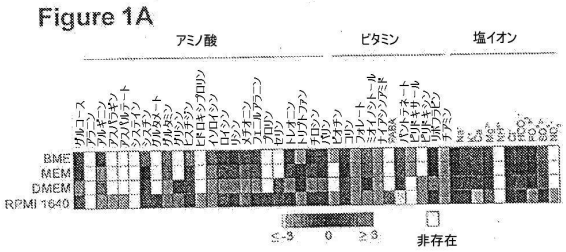
前記５－ＦＵプロドラッグが、テガフールまたはカペシタビンである、項目６８から７１のいずれかに記載の方法。

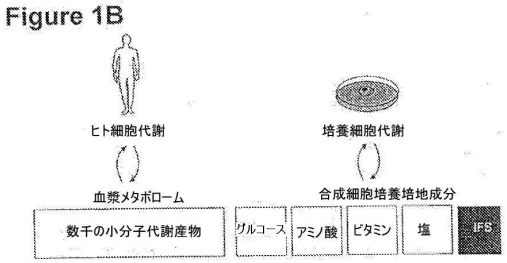
(項目７３)

５－ＦＵまたは５－ＦＵプロドラッグを、尿酸低下剤が投与されている被験体に投与することを含む、項目６８から７２のいずれかに記載の方法。

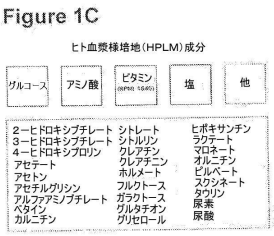
【図面】

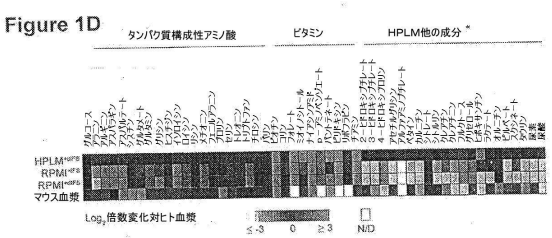
【図１－１】



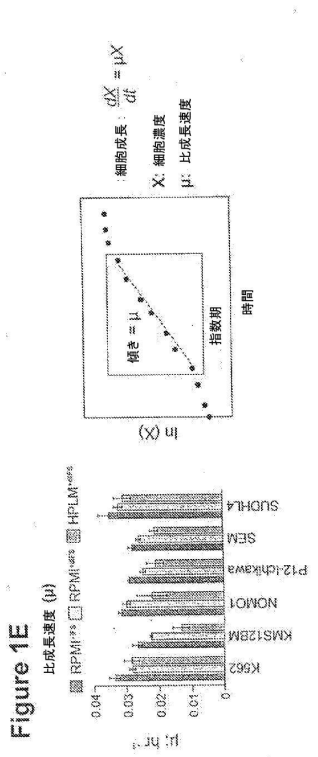


【図１－２】

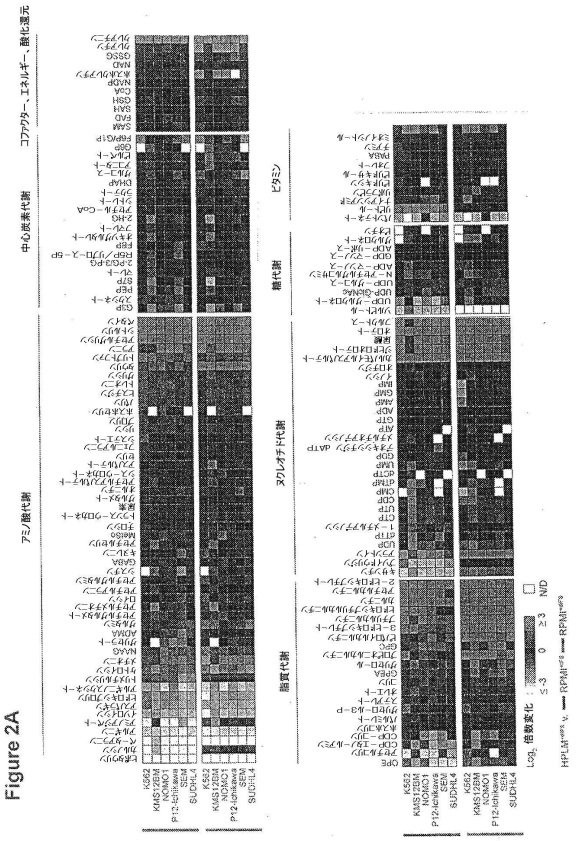




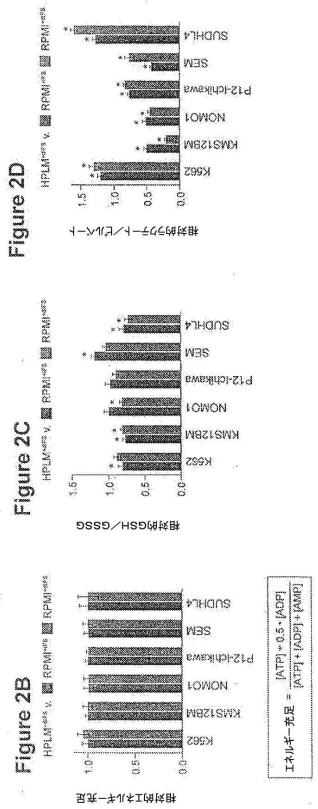
【図１－３】



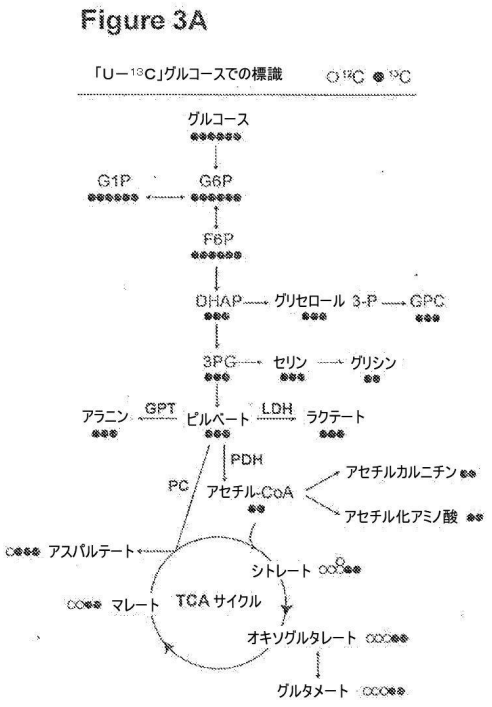
【図２－１】



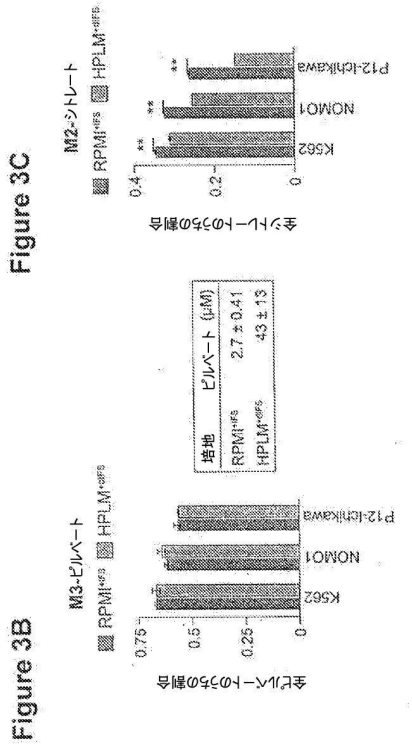
【図２－２】



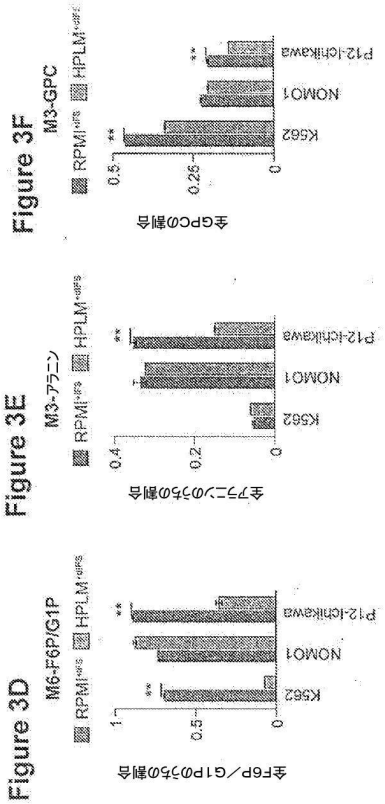
【図３－１】



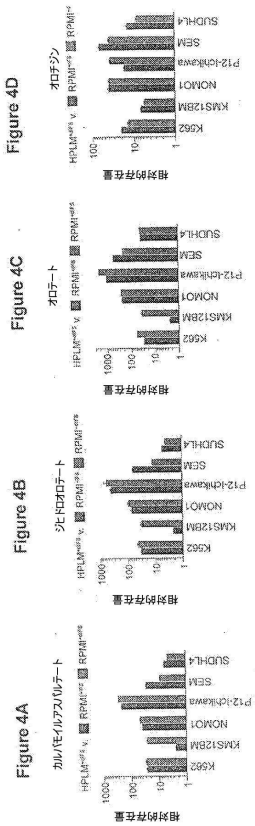
【図３－２】



【図３－３】



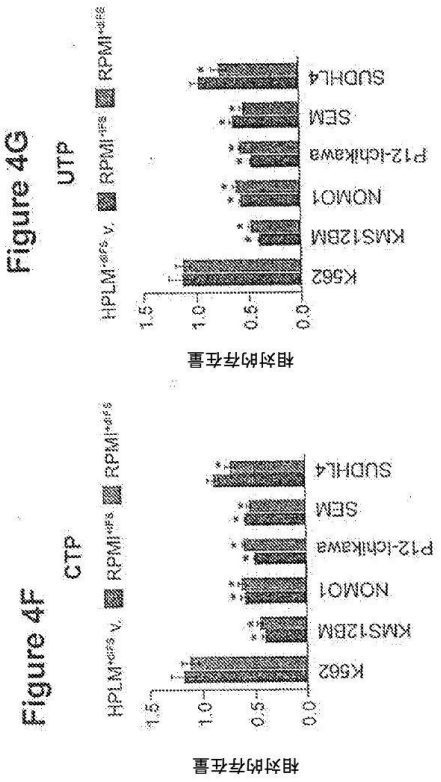
【図４－１】



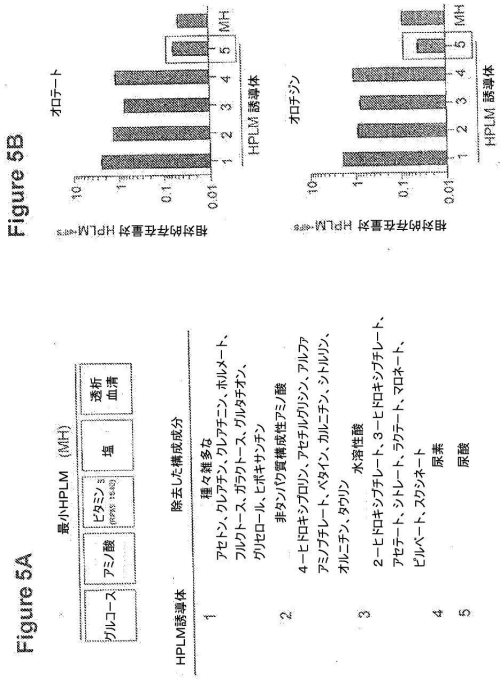
【図４－２】



【図４－３】



【図５－１】

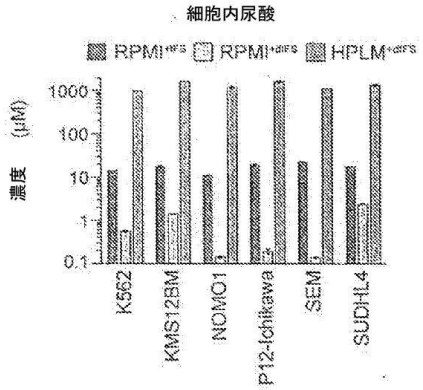


【図５－２】

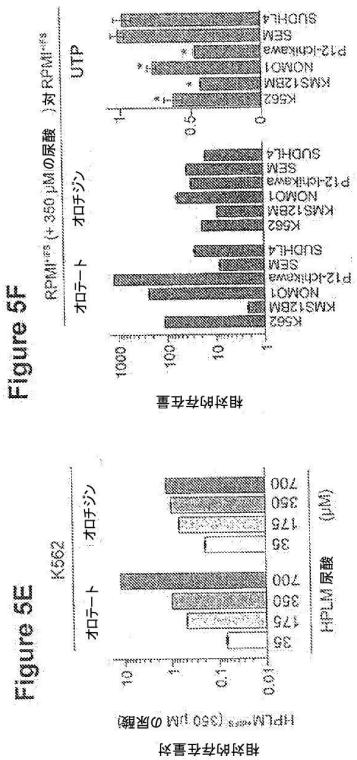
Figure 5C

培養培地	尿酸 (μM)
RPMI+dIFS	7.8 ± 2.4
RPMI+dIFS	< 0.5
HPLM+dIFS	340 ± 19

Figure 5D



【図５－３】



【図５－４】

Figure 5G

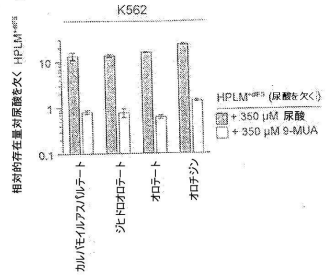
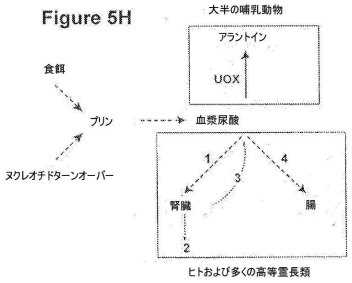


Figure 5H



	血漿濃度 (μM)	
	尿酸	アラントイン
マウス	28 ± 6.8	110 ± 4.4
ヒト	320 ± 80	2.1 ± 1.1

【図６－１】

Figure 6A

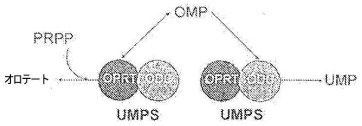


Figure 6B

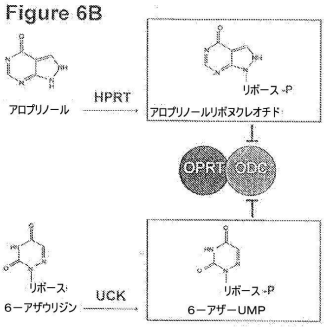
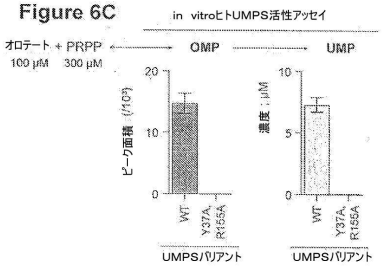


Figure 6C



【図６－２】

Figure 6D

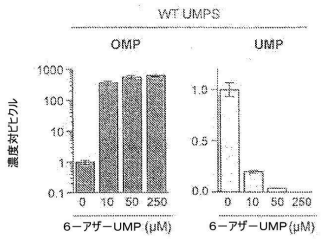


Figure 6E

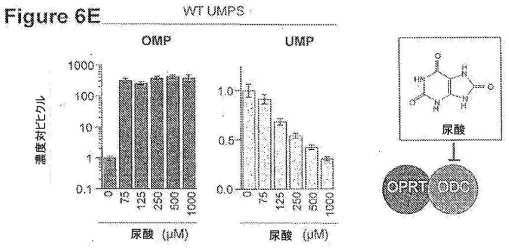
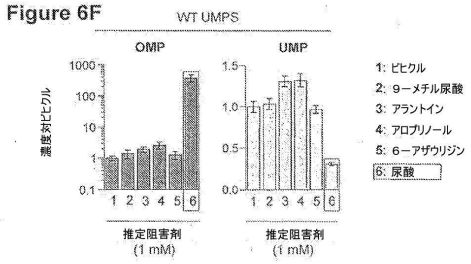


Figure 6F



【図７－１】

Figure 7A

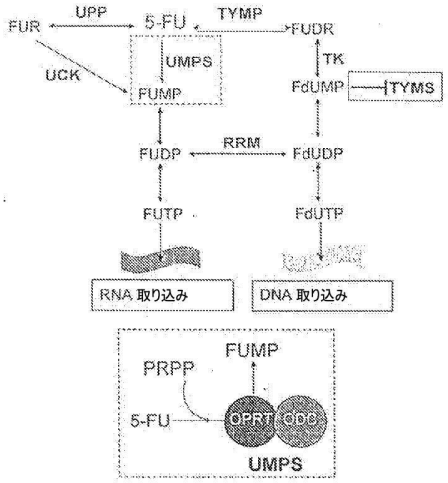
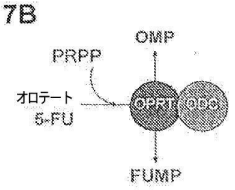


Figure 7B



【図７－２】

Figure 7C

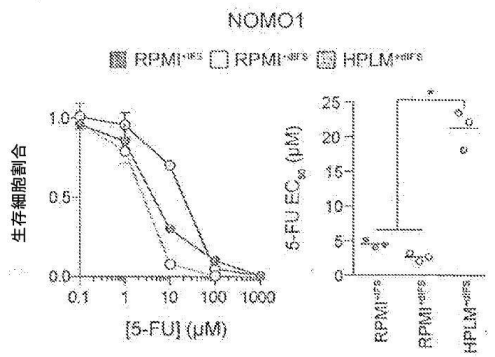
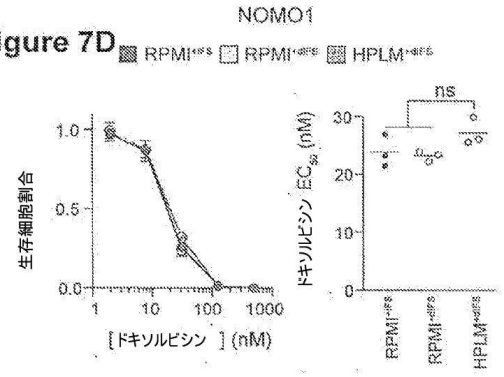


Figure 7D



【図７－３】

Figure 7E

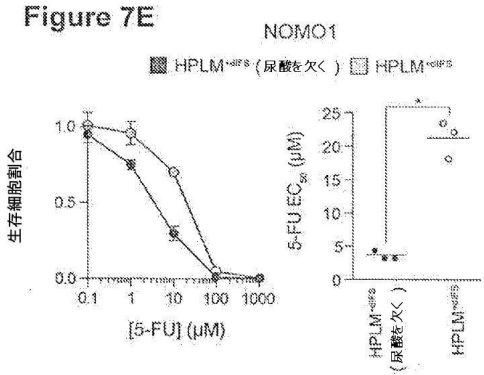
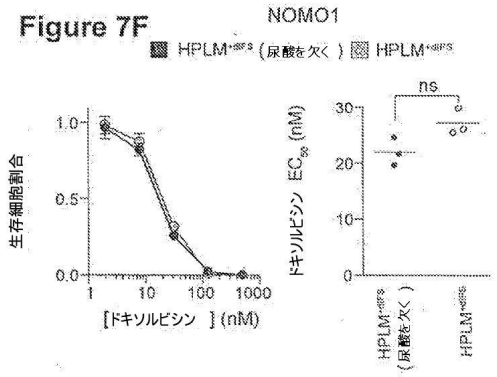


Figure 7F



【図７－４】

Figure 7G

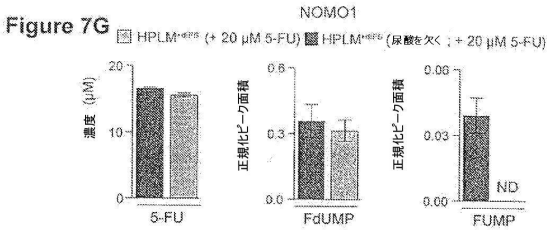
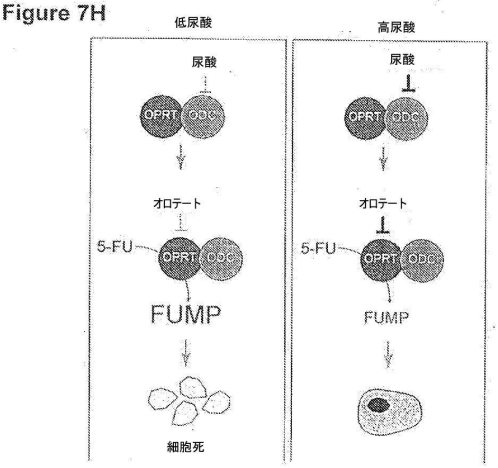
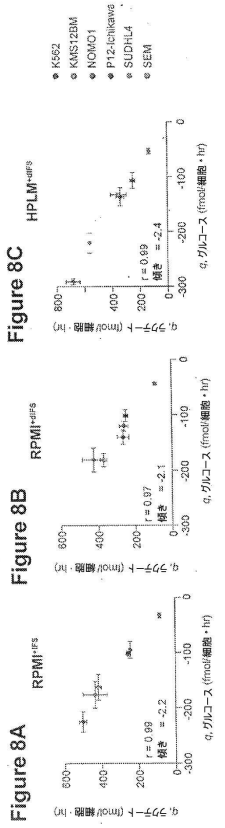


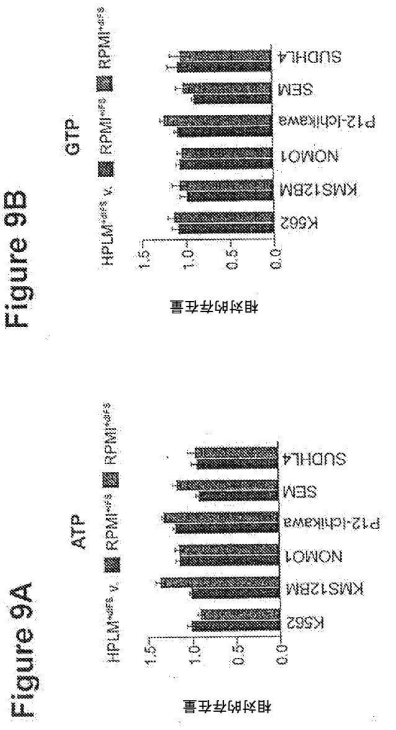
Figure 7H



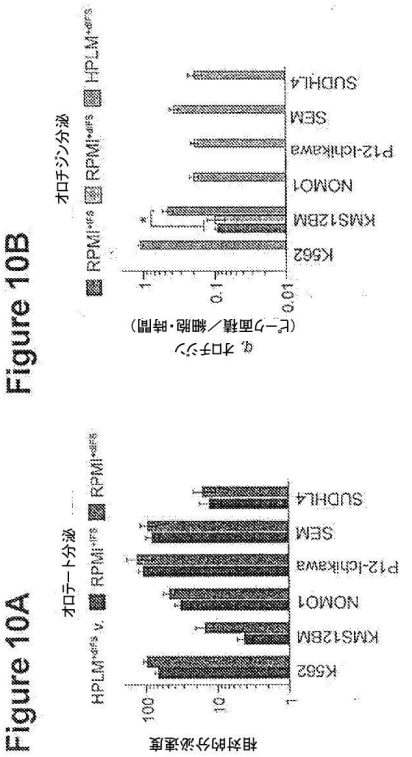
【図８】



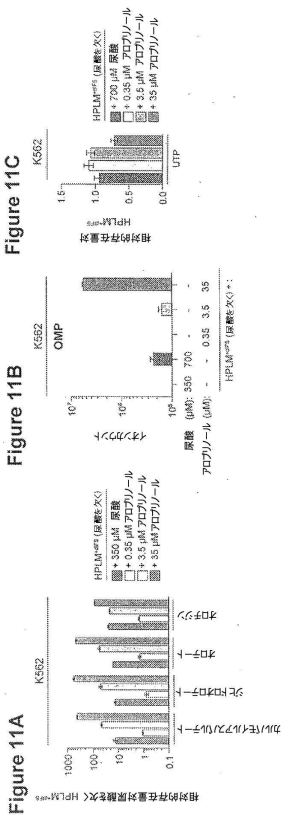
【図９】



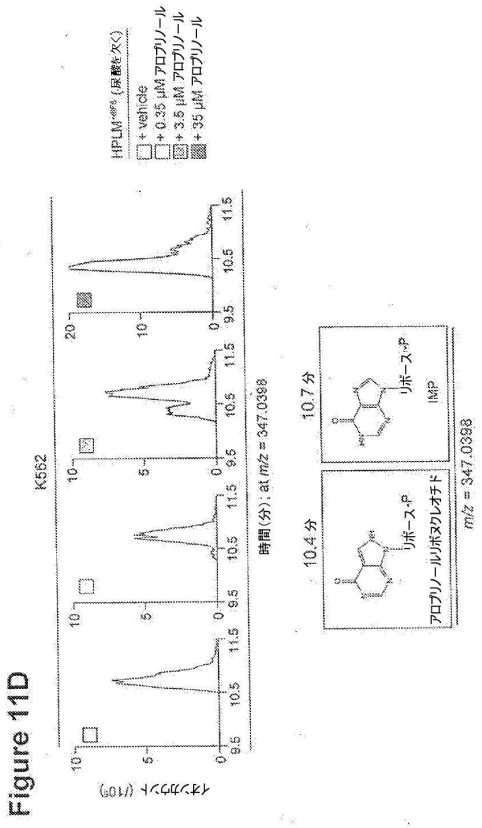
【図１０】



【図１１－１】



【図１１－２】



【図１２】

Figure 12A

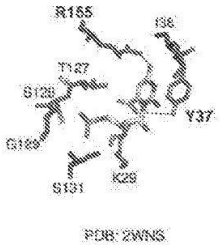
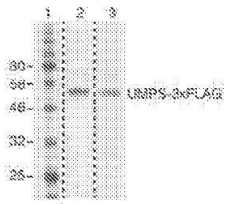
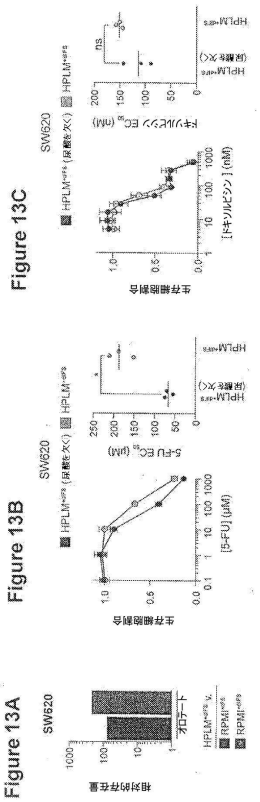


Figure 12B



【図１３】



【配列表】

0007406990000001.app

フロントページの続き

弁護士　山本 健策
(72)発明者　サバティーニ， デイビッド エム．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８， ケンブリッジ， サレー ストリート １２
(72)発明者　キャンター， ジェイソン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， サード ストリート ２７０，ナンバー７０５

審査官　小倉 梢
(56)参考文献　特開昭６２－２７８９８０（ＪＰ，Ａ）
特表２０１４－５０４６０９（ＪＰ，Ａ）
特開２００８－１０９８６６（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５１０８５１（ＪＰ，Ａ）
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　５／００ － ５／２８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）