

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2017년 10월 26일 (26.10.2017) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2017/183864 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 7/00* (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004069
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 14일 (14.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0049549 2016년 4월 22일 (22.04.2016) KR
- (71) 출원인: 전남대학교산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 61186 광주광역시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 김두운 (KIM, Du Woon); 61031 광주광역시 북구 우치로537번길 10, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 윤대웅 (YOON, Dae Woong); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA,

LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

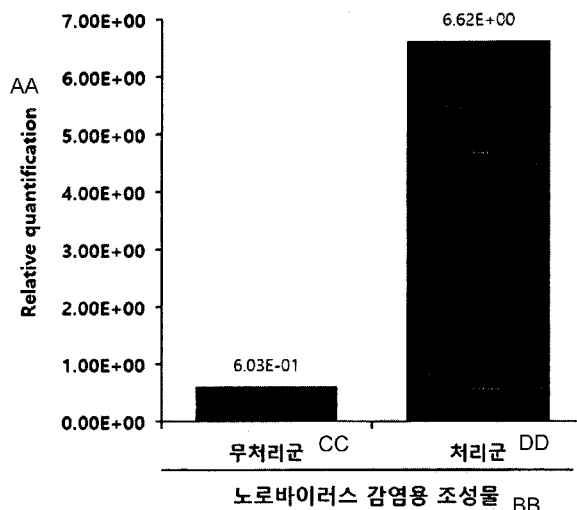
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR NOROVIRUS CULTURE AND METHOD FOR NOROVIRUS CULTURE

(54) 발명의 명칭: 노로바이러스 배양 조성물 및 배양 방법

[도 5]



AA ... Relative quantification
BB ... Composition for Norovirus infection
CC ... Non-treated group
DD ... Treated group

(57) Abstract: The present invention provides a composition for Norovirus culture and a method for Norovirus culture using the same. The present invention induces fast proliferation of Noroviruses by using an activator of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK), which is a substance for improving a viral transcription factor, and an activator of ELAVL1, which has high relevance with the induction of diarrhea, thereby allowing the culture of Noroviruses.

(57) 요약서: 본 발명은 노로바이러스(Norovirus) 배양용 조성물 및 이를 이용한 노로바이러스의 배양 방법을 제공한다. 본 발명은 바이러스 전사인자를 향상시키는 물질인 AMPK(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) 활성제 및 설사유도와 관련성이 높은 ELAVL1 활성제를 이용하여 노로바이러스의 빠른 증식을 유도하여 노로바이러스의 배양을 가능하도록 하였다.



WO 2017/183864 A1

명세서

발명의 명칭: 노로바이러스 배양 조성물 및 배양 방법

기술분야

- [1] 본 특허출원은 2016년 04월 22일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2016-0049549 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 본 발명은 노로바이러스 배양 조성물 및 배양 방법에 관한 것이다.
- [3]

배경기술

- [4] 인간의 장염을 유발하는 칼리시바이러스과(*Caliciviridae*)는 노로바이러스(*Norovirus*), 사포바이러스(*Sapovirus*), 로타바이러스(*Rotavirus*) 등과 함께 바이러스성 구토 설사병의 주요 인자로서, 위생과 의료시스템의 미비로 전염되는 후진국형 질병이 아니라 선진국에서도 아주 빈번히 발병해 확산되는 전염병 인자이다. 최근 노로바이러스, A형간염바이러스, 로타바이러스 등 바이러스성 식중독 발생이 급증하고 있으며, 세계적으로 가장 빈번하게 발생하는 것은 노로바이러스 감염에 의한 바이러스성 식중독인 것으로 보고된 바 있다. 관련자료에 따르면 식중독 발생 원인의 약 50%가 노로바이러스에 의한 것이며, 바이러스성 위장염의 96%가 노로바이러스에 의한 것이라고 보고된 바 있다(Centers for Disease Control and Prevention, Surveillance for Norovirus Outbreaks).
- [5] 전 세계적으로 인체감염형 식중독 바이러스의 중요성이 인식되어 있는 만큼 이에 대한 제어기술 개발에 급증한 관심이 높아지고 있다. 노로바이러스의 경우 감염 모델 시스템 구축이 미약하여 제어기술개발에 한계점이 있다.
- [6] 따라서, 식중독바이러스 감염 모델의 표준기술 개발이 시급하다. 현재까지 노로바이러스 배양을 시도한 연구가 있었다. 면역세포(B 세포)를 이용하여 인체 감염형 노로바이러스를 최대 10배까지 증식하는데 성공하였으나 노로바이러스 백신을 생산하기에는 매우 낮은 수율이다(1). 또한, 무균돼지모델을 이용하여 인체 감염형 노로바이러스 감염저감화 효과 평가에 대한 연구가 진행되었는데(2), 노로바이러스 감염 모델로써 무균돼지는 사육시설 유지 및 분석 단가면에 비경제적이므로 다량시료를 분석해야 하는 노로바이러스 특성상 부적합한 실험동물 모델이다. 인체 감염형 노로바이러스에 대하여 적절한 감염모델 및 배양기술 미비로 감염 기전을 통한 병원성을 연구하는데 어려움이 있다.
- [7]
- [8] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의

내용이 보다 명확하게 설명된다.

[9]

[10] [선행기술문헌]

[11] [비특허문헌]

[12] (비특허문헌 1) Jones, Melissa K., *et al.* (2015) Human norovirus culture in B cells. *Nature protocols* 10.12: 1939-1947.

[13] (비특허문헌 2) Lou, Fangfei, *et al.* (2015) A gnotobiotic pig model for determining human norovirus inactivation by high-pressure processing. *Applied and environmental microbiology* 81.19: 6679-6687.

[14] (비특허문헌 3) Vashist, Surender, *et al.* (2012) Identification of RNA-protein interaction networks involved in the norovirus life cycle. *Journal of virology* 86.22: 11977-11990.

[15] (비특허문헌 4) Einfeld, Amie J., Gabriele Neumann, and Yoshihiro Kawaoka. (2014) Influenza A virus isolation, culture and identification. *Nature protocols* 9.11: 2663-2681.

[16] (비특허문헌 5) Parks, D. J. *et al.* (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284(5418): 1365-1368.

[17] (비특허문헌 6) Makishima, M. *et al.* (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284(5418): 1362-1365.

[18] (비특허문헌 7) Chang, K. O. *et al.* (2004). Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(23): 8733-8738.

[19] (비특허문헌 8) Shivanna, V. *et al.* (2014). The crucial role of bile acids in the entry of porcine enteric calicivirus. *Virology* 456: 268-278.

[20]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[21] 본 발명자들은 노로바이러스의 배양 조성물 및 배양 방법을 개발하고자 노력하였다. 상기 노로바이러스는 급성위장염의 집단감염으로 유명하며, 단 10개의 비리온만으로도 인간에서 발병시킬 수 있다. 지금까지 노로바이러스는 실험실 내에서 배양되지 않아 연구에 어려움이 있어왔다. 본 발명자들은 노로바이러스를 구성하는 아미노산을 분석하고 AMPK의 인산화를 촉진하는 AICAR와 설사유도와 관련성이 높은 ELAVL1을 타겟으로 하는 물질인 리팜핀을 첨가하여 노로바이러스 배양 조성물을 개발하고 이의 노로바이러스 증식 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[22] 따라서, 본 발명의 목적은 노로바이러스 배양 조성물을 제공하는 데 있다.

[23] 본 발명의 다른 목적은 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배양 조성물을 제공하는 데 있다.

[24] 본 발명의 또 다른 목적은 노로바이러스의 배양 방법을 제공하는 데 있다.

[25]

[26] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[27]

과제 해결 수단

[28] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 동물세포 배양 배지에 (a) 발린(Valine), 로이신(Leucine), 페닐알라닌(Phenylalanine), 이소로이신(Isoleucine), 메티오닌(Methionine) 및 트립토판(Tryptophan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산; (b) 트립신(trypsin); (c) AMPK(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) 활성화제; 및 (d) ELAVL1[ELAV(Embryonic Lethal Abnormal Vision)-like protein 1] 활성화제(activator)를 유효성분으로 포함하는 노로바이러스(Norovirus) 배양 조성물을 제공한다.

[29] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 동물세포 배양 배지에 (a) 발린, 로이신, 페닐알라닌, 이소로이신, 메티오닌 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산; (b) 혈청; (c) AMPK 활성화제; 및 (d) ELAVL1 활성화제를 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배양 조성물을 제공한다.

[30]

[31] 본 발명의 노로바이러스 배양 조성물 및 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배양 조성물은 동물세포 배양 배지에 (a) 발린, 로이신, 페닐알라닌, 이소로이신, 메티오닌 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산; (b) AMPK 활성화제; 및 (c) ELAVL1 활성화제를 공통적으로 포함한다.

[32] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 동물세포 배양 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media), MEM(Minimal Essential Medium), KO-DMEM(Knockout-DMEM), G-MEM(Glasgow Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), DMEM/Ham's F12, Advanced DMEM/Ham's F12, Iscove's Modified Dulbecco's Media and Minimal Essential Media (MEM), Ham's F-10, Ham's F-12, Medium 199 또는 RPMI 1640 배지이다.

[33] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 동물세포 배양 배지는 DMEM 또는 MEM이다.

[34] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 동물세포 배양 배지는 DMEM이다.

[35] 본 발명의 노로바이러스 배양 조성물 및 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배양 조성물의 주요한 특징 중 하나는 노로바이러스를 구성하는 아미노산의

분포를 분석하여, 발린, 로이신, 페닐알라닌, 이소로이신, 메티오닌 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함한다는 점이다.

- [36] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 노로바이러스 배양 조성물은 발린, 로이신, 페닐알라닌, 이소로이신, 메티오닌 및 트립토판을 포함한다.
- [37] 상기 아미노산은 노로바이러스를 구성하는 아미노산의 함량에 따라 노로바이러스 배양 배지에 첨가된다.
- [38] 기본적으로 동물세포 배양배지(예컨대, DMEM)은 필수 아미노산을 포함하고 있다. 일례로, WELGENE의 DMEM(Cat. No. LM 001-05)은 발린 0.8 mM, 로이신 0.8 mM, 페닐알라닌 0.4 mM, 이소로이신 0.8 mM, 메티오닌 0.2 mM 및 트립토판 0.08 mM을 포함한다.
- [39] 본 발명은 상기 동물세포 배양배지에 노로바이러스 배양이 적합하도록 아미노산을 추가적으로 첨가한다.
- [40] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아미노산은 0.03 내지 20 mM의 농도를 갖는다.
- [41] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 아미노산 중 발린은 0.5 내지 3.0 mM, 0.7 내지 2.8 mM, 0.9 내지 2.5 mM, 1.1 내지 2.3 mM, 1.3 내지 2.0 mM 또는 1.5 내지 1.8 mM이고, 로이신은 0.5 내지 3.0 mM, 0.7 내지 2.8 mM, 0.9 내지 2.5 mM, 1.1 내지 2.3 mM, 1.3 내지 2.0 mM 또는 1.5 내지 1.8 mM이며, 페닐알라닌은 0.2 내지 1.5 mM, 0.3 내지 1.4 mM, 0.4 내지 1.3 mM, 0.5 내지 1.2 mM, 0.6 내지 1.1 mM 또는 0.7 내지 1.0 mM이고, 이소로이신은 0.5 내지 3.0 mM, 0.7 내지 2.8 mM, 0.9 내지 2.5 mM, 1.1 내지 2.3 mM, 1.3 내지 2.0 mM 또는 1.5 내지 1.8 mM이며, 메티오닌은 0.1 내지 1.0 mM, 0.2 내지 0.9 mM, 0.3 내지 0.8 mM, 0.3 내지 0.7 mM, 0.3 내지 0.6 mM 또는 0.3 내지 0.5 mM이고, 트립토판은 0.03 내지 0.30 mM, 0.07 내지 0.27 mM, 0.10 내지 0.24 mM, 0.12 내지 0.21 mM, 0.14 내지 0.18 mM 또는 0.14 내지 0.17 mM의 농도를 갖는다.
- [42] 하기 실시예에 입증된 바와 같이, 발린 1.6 mM, 로이신 1.6 mM, 페닐알라닌 0.79 mM, 이소로이신 1.6 mM, 메티오닌 0.4 mM, 트립토판 0.15 mM의 농도를 갖는다.
- [43] 이의 경우, 동물세포 배양배지[예컨대, WELGENE의 DMEM(Cat. No. LM001-05)]에 기포함된 아미노산보다 발린, 로이신, 페닐알라닌, 메티오닌 및 이소로이신은 3배 과포함되게 된다.
- [44] 본 발명의 노로바이러스 배양 조성물 및 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배양 조성물의 주요한 특징 중 다른 하나는 AMPK 활성제를 포함한다는 점이다.
- [45] 상기 AMPK는 세포 내 에너지 항상성에 역할을 하는 효소로, AMPK 활성제는 AMPK를 인산화하여 활성화시킨다. 활성화된 AMPK는 PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α)를 활성화시키고 상기 PGC-1 α 는 HNF-4 α (Hepatocyte nuclear factor 4 α), FXR α (Farnesoid receptor

alpha) 및 LRH-1(liver receptor homolog-1)과 같은 바이러스 전사인자를 향상시킨다. 본 발명은 노로바이러스 배양 조성물에 AMPK 활성제를 첨가하여 PGC-1a 활성화에 따른 노로바이러스의 증식을 확인하였다.

- [46] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 AMPK 활성제는 AICAR(5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide), 메트포르민(metformin), 페포르민(phenformin), 부포르민(buformin), 티에노피리돈(thienopyridones), 레스베라트롤(resveratrol), 누트카톤(nootkatone), 티아졸(thiazole), 아디포넥틴(adiponectin), 2-데옥시글루코오스(2-deoxyglucose), AAPDs(atypical antipsychotic drugs), 아디포넥틴 이형 폴리타이드, 카테킨(catechins), 트랜스-10 또는 시스-12 컨쥬게이션된 리놀레산, 코리달린(corydaline), 디티올에티온(dithiolethiones), DNA-PKcs(DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)의 억제제 또는 안타고니스트, 피브레이트(fibrates), GW2974 (N4-(1-benzyl-1Hindazol-5-yl)-N6,N6-dimethyl-pyrido-[3,4-d]-pyrimidine-4,6-diamine), 호노키올(honokiol), 렙틴(leptin), LKB1(serine/threonine kinase 11), 오보바톨(obovitol, 4',5-diallyl-2,3-dihydroxybiphenyl ether) 및 피오글리타존(pioglitazone)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 AMPK 활성제이다.
- [47] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 AMPK 활성제는 AICAR, 메트포르민, 페포르민, 부포르민, 티에노피리돈 및 레스베라트롤로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 AMPK 활성제이다.
- [48] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 AMPK 활성제는 AICAR이다.
- [49] 상기 AICAR은 0.01 내지 0.30 mM, 0.05 내지 0.25 mM, 0.05 내지 0.20 mM 또는 0.05 내지 0.15 mM의 농도를 갖는다.
- [50] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 AICAR은 0.1 mM의 농도를 갖는다.
- [51] 본 발명의 노로바이러스 배양 조성물 및 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배양 조성물은 설사유도와 관련성이 높은 ELAVL1을 타겟으로 하는 물질인 ELAVL1 활성제를 포함한다.
- [52] 상기 ELAVL1 활성제는 ELAVL1 유전자의 발현 및/또는 ELAVL1 단백질의 활성을 상향-조절(up-regulation)시키는 작용을 한다. 상기 ELAVL1, 즉 ELAV like protein 1 또는 HuR(human antigen R)은 마우스의 노로바이러스가 증식하는 동안 숙주세포와 상호작용하는 숙주의 요소로 보고된 바 있다(3).
- [53] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 ELAVL1 활성제는 리팜핀[rifampin 또는 리팜피신(rifampicin)], 리포다당류(lipopolysaccharide), 리토나비어(ritonavir), L-히스타민(L-histidine), L-아르기닌(L-arginine), 덱사메타손(dexamethasone) 및 아라키돈산(arachidonic acid)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 ELAVL1 활성제이다.
- [54] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 ELAVL1 활성제는 리팜핀이다.
- [55] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 리팜핀은 0.01 내지 0.20 mM의 농도를

찾는다.

- [57] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 리팜핀은 0.01 내지 0.15 mM, 0.01 내지 0.10 mM, 0.02 내지 0.08 mM 또는 0.03 내지 0.08 mM의 농도를 갖는다.
- [58] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 리팜핀은 0.06 mM의 농도를 갖는다.
- [59] 본 발명의 노로바이러스 배양 조성물의 주요한 특징 중 다른 하나는 리팜핀(rifampin)을 포함한다는 점이다.
- [60] 상기 리팜핀(rifampin)은 리파마이신 계열의 살균성 항생제이다(Masters, Susan B.; Trevor, Anthony J.; Katzung, Bertram G. (2005년). 《Katzung & Trevor's pharmacology》. 뉴욕: Lange Medical Books/McGraw Hill, Medical Pub. Division. ISBN 0-07-142290-0.). 활동성 결핵 치료, 무증상 보균자의 뇌수막구균 제거제 및 포도상구균 감염 시 다른 항균제들의 작용을 증강시킬 목적으로 사용되는 약물이다. 리팜핀의 가끔 일어나는 부작용으로써 요변색, 위경련, 대변 변색 및 설사가 있다. 본 발명은 리팜핀의 부작용에 의해서 유도되는 설사와 관련이 있는 신호경로인 ELAVL1을 자극하여 노로바이러스 증식을 확인하였다.
- [61] 본 발명의 노로바이러스 배양 조성물은 트립신(trypsin)을 포함한다.
- [62] 상기 트립신은 단백질 분해효소로, 부착 세포(adherent cell) 표면의 세포 부착 단백질(cell adherent protein)을 분해하여 배양 플레이트 및 다른 세포와 분리되게 한다.
- [63] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 트립신은 TPCK(Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) 처리된 트립신이다.
- [64] 상기 TPCK는 키모트립신(chymotrypsin)의 활성화 중심으로 구체적으로 반응하도록 설계되어 있기 때문에 키모트립신의 효소활성(proteolytic activity)을 완벽하게 차단시킨다. 그러나 트립신의 활성화에는 거의 영향을 미치지 않는다(Carpenter, Frederick H. "[26] Treatment of trypsin with TPCK." Methods in enzymology 11 (1967): 237.). 예컨대, 인플루엔자 A 바이러스(Influenza A virus; IAV)의 경우 바이러스 배양을 위하여 키모트립신의 저해제로 TPCK 처리된 트립신을 사용하는데, 이는 IAV의 감염력을 강화시키기 위하여 사하는 것이 아니라, MDCK 세포의 단분자층(monolayer)에 손상을 주기 위한 것으로 IAV 감염 방법으로 통상적으로 사용되고 있다(4). 본 발명에서는 노로바이러스-민감세포로써 MDCK 세포를 사용하였다. TPCK 처리된 트립신을 사용하여 MDCK 세포의 단분자층의 손상을 주어 노로바이러스 진입을 용이하게 하기 위하여 위 방법을 고안하였다.
- [65] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 트립신은 0.0001 내지 0.001 중량% 포함된다.
- [66] 하기 실시예에 입증된 바와 같이, 상기 TPCK 처리된 트립신은 0.0004 중량% 포함된다.
- [67] 본 발명의 노로바이러스 배양 조성물의 주요한 특징 중 또 다른 하나는 혈청을 포함하지 않는다는 점이다.

- [68] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 혈청을 포함하지 않는다.
- [69] 본 발명의 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배양 조성물은 혈청을 포함한다.
- [70] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 혈청은 우태혈청(Fetal Bovine Serum; FBS), 우아혈청(Bovine Calf Serum; BCS), 투석우태혈청(dialyzed fetal bovine serum), 신생우아혈청(Newborn Calf Serum; NCS), 철분 보충 우아혈청(iron supplemented bovine calf serum), 지질제거혈청(De-lipidated serum) 및 말 혈청(horse serum; HS)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 혈청이다.
- [71] 상기 "숙주세포(host cell)"은 바이러스 감염에 대한 감수성(susceptibility)을 갖는 세포를 의미하며, 본 발명의 숙주세포는 노로바이러스 감염에 대한 감수성을 갖는 세포를 의미한다.
- [72] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 숙주세포는 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney)이다.
- [73] 본 발명의 노로바이러스 배양 조성물 및 숙주세포 배양 조성물은 당업계에 통상적으로 사용되는 배양 조성물의 어떠한 첨가제도 첨가될 수 있으며, 예컨대, 본 발명의 노로바이러스 배양 조성물은 추가적으로 항생제 및/또는 항진균제를 포함할 수 있다.
- [74] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 항생제 및/또는 항진균제는 암포테리신(amphotericin), 암피실린(ampicillin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 클로르테트라사이클린(chlortetracycline), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 디하이드로스트렙토마이신(dihydrostreptomycin), 젠타마이신(gentamicin), 카나마이신(kanamycin), 네오마이신(neomycin), 니스타틴(nystatin), 페니실린(penicillin), 폴리믹신(polymyxin), 스펙티노마이신(spectinomycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 테트라사이클린(tetracycline) 및 타일로신(tylosin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항생제 및/또는 항진균제이다.
- [75]
- [76] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 노로바이러스의 배양 방법을 제공한다:
- [77] (a) 상기 제 2 항의 숙주세포 배양 배지에 숙주세포를 접종하여 배양하는 단계;
- [78] (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 상기 제 1 항의 노로바이러스 배양 조성물로 배지를 교체하고 노로바이러스를 감염시키는 단계; 및
- [79] (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 배양하여 노로바이러스를 회수하는 단계.
- [80]
- [81] 상기 방법을 단계별로 설명한다.
- [82] 단계 (a): 숙주세포의 배양
- [83] 먼저, 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배양 배지에 숙주세포를 접종하여 배양한다.

- [84] 상기 단계 (a)의 숙주세포 배양 배지는 앞서 기재한 내용이 공통되므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [85] 상기 숙주세포 배양 배지는 트립신을 포함하지 않는다.
- [86] 상기 단계 (a)의 노로바이러스-민감세포의 배양은 노로바이러스를 접종하기 적합한 정도로 세포가 성장할 때까지 배양한다.
- [87] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 배양은 2 내지 60시간 동안 실시한다.
- [88] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 배양은 2 내지 50시간, 2 내지 40시간, 2 내지 30시간 또는 10 내지 30시간 동안 실시한다.
- [89]
- [90] 단계 (b): 노로바이러스 감염
- [91] 다음, 상기 단계 (a)의 결과물에 노로바이러스 배양 조성물로 배지를 교체하고 노로바이러스를 감염시킨다.
- [92] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 노로바이러스는 0.1 내지 10 MOI(multiplicity of infection) 이다.
- [93] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 노로바이러스는 0.1 내지 8 MOI, 0.1 내지 6 MOI, 0.1 내지 4 MOI 또는 0.5 내지 4 MOI이다.
- [94] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 바이러스 감염은 0.5 내지 10시간 동안 실시한다.
- [95] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 바이러스 감염은 0.5 내지 2시간, 0.5 내지 6시간, 0.5 내지 4시간 또는 1 내지 4시간 동안 실시한다.
- [96]
- [97] 단계 (c): 노로바이러스의 회수
- [98] 다음, 상기 단계 (b)의 결과물을 배양하여 노로바이러스를 회수한다.
- [99] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 바이러스 배양은 0.5 내지 80시간 동안 실시한다.
- [100] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 바이러스 배양은 0.5 내지 48시간, 0.5 내지 72시간, 24 내지 72시간 또는 12 내지 80시간 동안 실시한다.
- [101] 본 발명의 방법은 노로바이러스 배양의 온도를 최적화하였다.
- [102] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b) 및 (c) 는 30-40 온도 조건 하에 실시한다.
- [103] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 단계 (b) 및 (c) 는 30-38, 30-36, 30-35°C 또는 32-35 온도 조건 하에 실시한다.
- [104] 본 발명의 노로바이러스 배양 방법은 노로바이러스의 증식을 증가시키기 위해 배양 배지 내 유효성분의 고갈을 막기 위하여 배양 조성물을 첨가 또는 교체할 수 있다.
- [105] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b) 및 (c) 사이에 노로바이러스 배양

조성물을 첨가하는 단계 (b')를 추가적으로 포함한다.

[106]

발명의 효과

[107] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[108] (a) 본 발명은 노로바이러스(Norovirus) 배양 조성물 및 이를 이용한 노로바이러스의 배양 방법을 제공한다.

[109] (b) 본 발명은 배양이 어렵다고 알려진 노로바이러스의 배양방법을 구축하여 실험실 수준에서 노로바이러스 연구가 가능하도록 한다.

[110] (c) 본 발명은 바이러스 전사인자를 향상시키는 물질인 AMPK(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) 활성화제 및 ELAV1 활성화제를 이용하여 노로바이러스의 빠른 증식을 유도한다.

[111]

도면의 간단한 설명

[112] 도 1은 노로바이러스를 구성하는 아미노산의 분포도를 나타낸다.

[113] 도 2는 AMPK(5'AMP-activated protein kinase) 신호전달체계 활성화에 따른 노로바이러스 증식 기전에 대한 식도를 나타낸다.

[114] 도 3은 본 발명의 노로바이러스 배양 방법을 도식화하여 보여준다.

[115] 도 4는 노로바이러스 감염에 따른 세포의 세포병변효과를 나타낸다.

[116] 도 5는 노로바이러스 감염 조성물 처리에 따른 노로바이러스 복제수를 상대비교하여 나타낸다.

[117] 도 6은 노로바이러스 접종 후 숙주 세포 배양 온도에 따른 노로바이러스 복제수를 상대비교하여 나타낸다.

[118]

발명의 실시를 위한 형태

[119] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[120]

[121] **실시예 1: 노로바이러스 구성 아미노산의 분포도**

[122] 노로바이러스 배양을 최적화하기 위한 필수성분을 포함시키기 위하여 노로바이러스를 구성하는 아미노산 분포를 분석하였다. 그 결과 프롤린(Proline), 발린(Valine), 트레오닌(Threonine), 글리신(Glycine), 로이신(Leucine) 및 알라닌(Alanine)이 각각 전체의 9%, 9%, 8%, 8%, 8% 및 7%로 상위를 차지하였다(도 1). 트레오닌을 제외한 프롤린, 발린, 글리신, 로이신 및 알라닌은 비극성 아미노산으로써, 이러한 필수아미노산이 노로바이러스 증식에 크게 관여할 것으로 간주하였다. 다양한 세포주의 배양을 위하여 사용하는

DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium, WELGENE, LM 001-25)은 MEM(Minimum Essential Medium)에 D-글루코오스 뿐만 아니라 고농도의 아미노산, 비타민을 첨가하여 개발된 배지로써, 본 발명을 위한 기본배지로 사용하였다. 노로바이러스 증식에 관여할 것으로 간주된 6종의 필수아미노산을 DMEM에 기본적으로 함유되어 있는 중량 대비 2배의 중량을 첨가하여 본 조성물을 완성하였다. 바이러스 감염 후 생성되는 ROS 소거능을 지닌 항산화성 유도 전구 아미노산을 제외하여 본 조성물을 완성하였다(표 1).

[123] [표1]

조성물	500 ml 당 첨가량(mg)	MW	농도 또는 몰 농도(mM)	배지I)세포배 양용 배지	배지II)감염용 배지
페니실린-스 트렙토마이 신	10,000 U/ml의 페니실린과 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마 이신 혼합물 5 ml 첨가	-	100 U/mlL의 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마 이신	첨가	첨가
FBS	FBS 50 ml 첨가	-	10% 함유	첨가	무첨가
TPCK-treate d 트립신	2 $\mu\text{g/ml}$ 용액을 1 ml 첨가	-	4 ng/ml	무첨가	첨가
AICAR	13	258.23	0.1	첨가	첨가
리팜핀	0.05	822.94	0.06	첨가	첨가
Val	94	117.14 6	1.60	첨가	첨가
Leu	105	131.17	1.60	첨가	첨가
Phe	66	165.18	0.79	첨가	첨가
Ile	105	131.17	1.60	첨가	첨가
Met	30	149.21	0.40	첨가	첨가
Trp	16	204.23	0.15	첨가	첨가

[124]

[125] 생합성이 불가능한 필수아미노산을 기본 배지로 설정하고, 바이러스 감염 후

생성되는 ROS 소거능을 지닌 항산화성 유도 전구 아미노산은 제외하였다.

[126]

[127] 실시예 2: AMPK 활성화 기전에 따른 노로바이러스 배양을 위한 첨가물 개발

[128] 담즙산(Bile acid)은 장관을 구성하는 활성요소이며, 숙주세포에 담즙산만으로 돼지 칼리시 바이러스(Porcine enteric calicivirus, PEC)의 성장을 도와준다. 최근 들어, 담즙산은 다양한 수송단백질 및 효소들의 합성에 연관되어 있는 물질로써, 핵 수용체 활성화체와 접합체 발현을 조절하는 물질로 규명된 바 있다(5,6). 돼지 칼리시 바이러스의 생활 주기에서 담즙산이 존재할 경우, 바이러스 게놈이 세포내로 진입하여 리소좀(lysosome)으로부터 비리온(virion) 분해를 방지함으로써 바이러스 증식에 기여하는 것으로 보고된 바 있다(7,8). G 단백질 연결 수용체(G protein-coupled receptor) 존재 하에 담즙산은 세포내 cAMP 농도를 높여주며, 인터페론(IFN)을 매개하는 시그널 변환기(transducer)와 활성화체(activator)를 감소시켜 면역체계 저감화로 바이러스 증식을 향상시킨다. 또한, cAMP/Protein kinase A(PKA) 신호체계를 활성화하여 AMPK 인산화를 촉진시킨다. AMPK 인산화는 배고픔, 산화적 스트레스 신호에 의해 활성화하는 신호전달 물질로써 핵 수용체 공활성화 인자(coactivator)인 PGC-1a(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)를 활성화 시킨다. PGC-1a는 HNF-4a, FXRa 및 LRH-1와 같은 바이러스 전사인자를 더욱 더 향상시키는 물질이다. 따라서, 노로바이러스 배양 배지에 PGC-1a의 상위조절자인 AMPK 인산화를 촉진하는 물질인 AICAR(5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide)를 첨가하여 PGC-1a 활성화에 따른 노로바이러스 증식을 향상시키고자 하였다(도 2).

[129]

[130] 실시예 3: 설사 관련 신호경로 자극에 따른 노로바이러스 배양을 위한 첨가물 개발

[131] 리팜핀(rifampin)은 리파마이신 계열의 살균성 항생제이다(Masters, Susan B.; Trevor, Anthony J.; Katzung, Bertram G. (2005년). <Katzung & Trevor's pharmacology>. 뉴욕: Lange Medical Books/McGraw Hill, Medical Pub. Division. ISBN 0-07-142290-0.). 활동성 결핵 치료, 무증상 보균자의 뇌수막구균 제거제 및 포도상구균 감염시 다른 항균제들의 작용을 증강시킬 목적으로 사용되는 약물이다. 그러나, 리팜핀의 가끔 일어나는 부작용으로써 요변색, 위경련, 대변 변색 및 설사가 있다. 노로바이러스 감염 시, 나타나는 증상 중에는 설사를 포함한 오심, 구토, 복통을 동반한다. 이러한 부작용의 네트워크 기전에 ELAVL1[ELAV(Embryonic Lethal Abnormal Visual system)-like protein 1]이 연결되어 있으며, ELAVL1을 조절하는 리팜핀을 노로바이러스 감염 조성물로 포함하였으며, 설사 관련 신호를 유도하여 노로바이러스 증식 여부를 확인하였다. 따라서, 본 발명은 배양세포에 리팜핀의 반복 처리를 통한 부작용에 의해 유도되는 설사 관련 신호경로를 자극하여 노로바이러스 증식을

향상시키고자 하였다.

[132]

[133] 실시예 4: 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배지 및 노로바이러스 감염용 배지의 제조

[134] 노로바이러스 배양을 위한 배지 구성은 크게 1) 숙주세포 성장 배지 및 2) 노로바이러스 감염용 배지로 구분하여 사용하였다. 첫 번째, 숙주세포 성장을 위한 배지로서 DMEM(WELGENE, LM 001-05)을 기본배지로 사용하였으며, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; P/S), 발린(52.5 mg/500 ml), 로이신(52.5 mg/500 ml), 페닐알라닌(15 mg/500 ml), 이소로이신(33 mg/500 ml), 메티오닌(8 mg/500 ml), 트립토판(47 mg/500 ml)을 첨가하였고, AMPK 활성화제인 1 M AICAR 500 μ l(농도: 0.1 mM) 및 리팜핀(0.05 mg/500 ml; 0.06 mM)을 첨가한 후 숙주세포 성장배지는 0.2 μ m 막 필터를 이용하여 여과 멸균하여 사용하였다. 두 번째, 노로바이러스 감염용 배지로서 FBS를 제외한 DMEM 배지에 1% 페니실린/스트렙토마이신, 성장배지와 동일한 양의 아미노산 발린, 로이신, 페닐알라닌, 이소로이신, 메티오닌, 트립토판 및 리팜핀을 첨가하였고, TPCK(Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone)-treated 트립신(2 μ g/ml)을 추가로 넣어 제조한 후 0.2 μ m 막 필터를 이용하여 여과 멸균하여 사용하였다(도 3).

[135]

[136] 실시예 5: 노로바이러스 배양 및 측정 방법

[137] 세포 수준에서 숙주세포를 이용한 노로바이러스 배양 방법은 도 3과 같다. 필수아미노산, AMPK 활성화제 및 리팜핀을 포함한 배지를 노로바이러스 감염 전 24시간 배양단계부터 처리하였다. 노로바이러스 접종 단계에서 TPCK-treated 트립신이 첨가된 감염용 배지(무혈청)를 사용하여 세포에 부착반응을 유도하고, 2시간 후에 새로운 감염용 배지로 교환하였다. 노로바이러스 배양을 극대화하기 위한 방법으로는 1) AMPK 활성화제 및 리팜핀과 필수아미노산이 첨가된 감염용 배지를 12시간 간격으로 교체하여 주고, 2) 숙주세포 배양 온도에 따른 노로바이러스의 증식 여부를 배양 상층액을 수집하여 qRT-PCR을 이용하여 노로바이러스 상대정량을 수행하였다.

[138]

[139] 실시예 6: 노로바이러스 감염용 배지 조성물의 노로바이러스 증식 효과

[140] 세포 수준에서 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포를 개발하기 위하여 16종의 세포주에 대한 1차 선별을 수행하였고, 그 중 MDCK(Madin-Darby canine kidney) 세포주에서 노로바이러스에 민감성을 보였기 때문에 도 3에서와 같이, 노로바이러스 숙주모델로 MDCK 세포주를 이용하여 노로바이러스 감염 실험을 수행하였고, 감염세포의 형태는 도 4와 같다. 24-웰 플레이트에 MDCK 세포주를 배양용 배지를 이용하여 접종(seeding) 후 24시간 동안 배양하였다. 숙주세포 배양용 배지는 노로바이러스 감염 전 24시간 동안 MDCK 세포주에 노출하였다.

이후, 노로바이러스를 감염용 배지에 바이러스 농도를 1 MOI(multiplicity of infection)로 희석한 후 MDCK 세포주에 2시간 동안 부착 반응을 하였다. 2시간 후, 상층액은 수집하여 감염초기 샘플로 사용하였고, 새로운 감염용 배지를 12시간 간격으로 500 ul씩 추가하여 접종 후 48시간 때의 배양 상층액을 감염후기 샘플로 사용하였다. Trizol 시약을 이용하여 감염초기 및 감염후기 샘플에서 RNA를 추출한 후, 6-mer 랜덤 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성하였다. SYBR을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였고, 상대정량을 수행하기 위하여 18S rRNA 발현값을 참조하여 평준화한 뒤, 노로바이러스 상대정량을 수행하였다. 그 결과, 감염 후 72시간 후 노로바이러스 감염용 배지 조성물을 첨가하지 않은 시험군에서는 노로바이러스 초기 접종량 대비 0.06배 감소한 반면, 노로바이러스 감염용 배지 조성물을 첨가한 시험구에서는 노로바이러스 초기 접종량 대비 6.62배 증가함을 qRT-PCR를 통하여 확인하였다. 이로써, AMPK 활성화 및 리팜핀, 필수아미노산 첨가가 노로바이러스 증식에 기여하는 것으로 확인되었다(도 5).

[141]

[142] **실시예 7: 숙주세포 배양온도에 따른 노로바이러스 증식 효과**

[143] MDCK 세포주는 37°C에서 증식과 대사가 활발하게 일어난다. 그러나 배양온도 변화는 세포에게 스트레스로 인지하고, AMPK 신호를 활성화하여 바이러스 증식인자의 공활성 인자인 PGC-1 α 의 활성을 촉진하게 되며, 증식과 대사의 이상으로 면역체계에서 상당한 타격을 주게 된다. 배양온도를 달리하였을 때 노로바이러스의 경우, 숙주세포 배양온도에 따라 바이러스 증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. MDCK 세포주는 인플루엔자 바이러스 숙주세포로 많이 알려진 세포주로서 바이러스 접종 후 저온에서 바이러스를 배양하는 방법을 본 실험에 응용하여 37°C 및 33°C에서 각각 노로바이러스 배양을 수행하였다. 24-웰 플레이트에 MDCK 세포주를 배양용 배지를 이용하여 접종 후 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 이 후, 감염용 배지로 노로바이러스를 1 MOI로 희석한 후 MDCK 세포주에 2시간 동안 접종하였다. 2시간 후, 상층액은 제거하고 새로운 감염용 배지로 교환하였다. 이 후, 37°C 및 33°C로 두 그룹으로 나누어 12시간 간격으로 감염용 배지를 500 ul씩 교환하면서 48시간 동안 37°C 및 33°C에서 각각 배양하였다. 접종 후 48시간 때의 배양 상층액을 샘플로 각각 사용하였다. Trizol 시약을 이용하여 접종 후 48시간 때의 37°C 및 33°C 배지의 상층액에서 RNA를 추출한 후, 6-mer 랜덤 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성하였다. SYBR을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였고, 상대정량을 수행하기 위하여 18S rRNA 발현값을 참조하여 평준화한 뒤, 노로바이러스 상대정량을 수행하였다. 그 결과, 감염 후 37°C에서 배양된 시험구에서는 노로바이러스가 초기접종량 대비 0.26배 감소한 반면, 33°C에서 배양된 시험구에서 노로바이러스 증폭이 초기접종량 대비 2.45배 증식됨을 qRT-PCR를 통하여 확인하였다. 이로써, 숙주세포 배양 온도가 노로바이러스 증식에 영향을 미치는 것으로

확인되었다. 이는 노로바이러스가 증식함에 있어 숙주의 상태에 의존적임을 확인하였다(도 6).

[144]

[145] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 구체적인 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 동물세포 배양 배지에 (a) 발린(Valine), 로이신(Leucine), 페닐알라닌(Phenylalanine), 이소로이신(Isoleucine), 메티오닌(Methionine) 및 트립토판(Tryptophan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산; (b) 트립신(trypsin); (c) AMPK(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) 활성제; 및 (d) ELAVL1[ELAV(Embryonic Lethal Abnormal Vision)-like protein 1] 활성제(activator)를 유효성분으로 포함하는 노로바이러스(Norovirus) 배양용 조성물.
- [청구항 2] 동물세포 배양 배지에 (a) 발린(Valine), 로이신(Leucine), 페닐알라닌(Phenylalanine), 이소로이신(Isoleucine), 메티오닌(Methionine) 및 트립토판(Tryptophan)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산; (b) 혈청; (c) AMPK(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) 활성제; 및 (d) ELAVL1[ELAV(Embryonic Lethal Abnormal Vision)-like protein 1] 활성제(activator)를 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 배양을 위한 숙주세포 배양용 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 동물세포 배양 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media), MEM(Minimal Essential Medium), KO-DMEM(Knockout-DMEM), G-MEM(Glasgow Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), DMEM/Ham's F12, Advanced DMEM/Ham's F12, Iscove's Modified Dulbecco's Media and Minimal Essential Media (MEM), Ham's F-10, Ham's F-12, Medium 199 또는 RPMI 1640 배지인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 아미노산은 0.03 내지 20 mM의 농도를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 트립신은 TPCK(Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) 처리된 트립신인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 트립신은 0.0001 내지 0.001 중량% 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제 2 항에 있어서, 상기 혈청은 우태혈청(Fetal Bovine Serum; FBS), 우아혈청(Bovine Calf Serum; BCS), 투석우태혈청(dialyzed fetal bovine serum), 신생우아혈청(Newborn Calf Serum; NCS), 철분 보충 우아혈청(iron supplemented bovine calf serum), 지질제거혈청(De-lipidated serum) 및 말 혈청(horse serum; HS)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 혈청인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 AMPK 활성제는 AICAR(5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide),

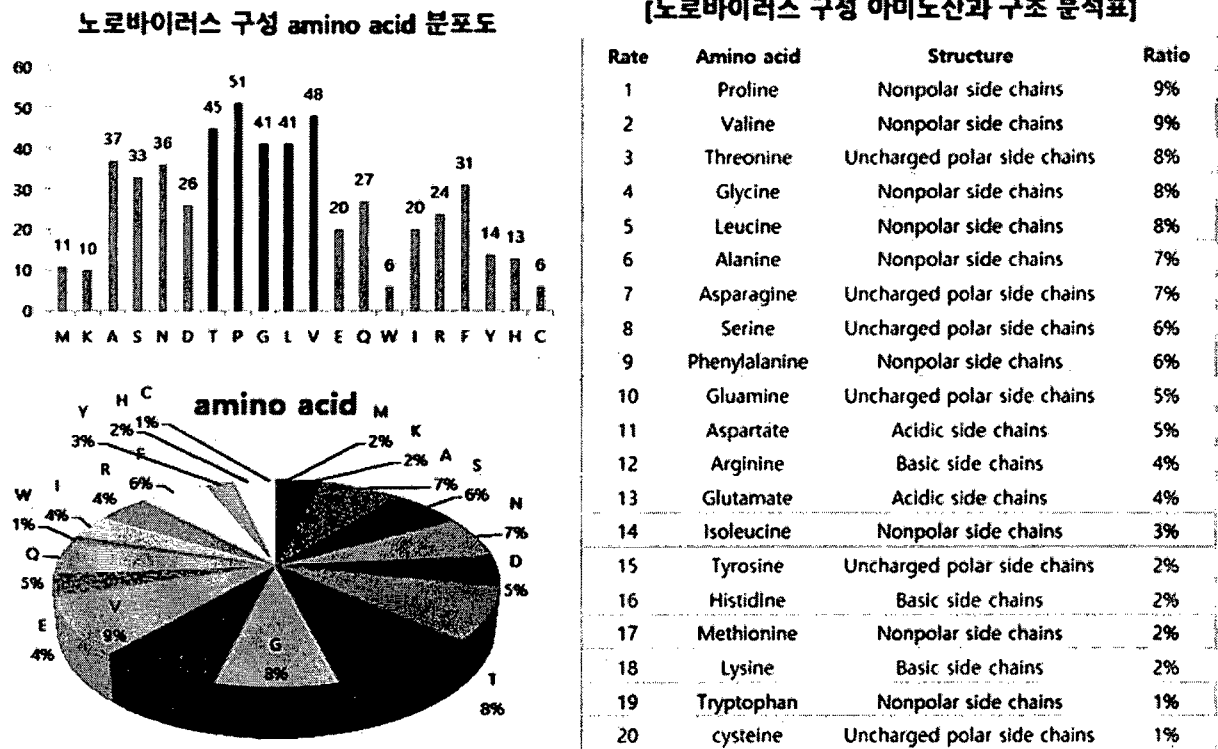
메트포르민(metformin), 펜포르민(phenformin), 부포르민(buformin), 티에노피리돈(thienopyridones), 레스베라트롤(resveratrol), 누트카톤(nootkatone), 티아졸(thiazole), 아디포넥틴(adiponectin), 2-데옥시글루코오스(2-deoxyglucose), AAPDs(atypical antipsychotic drugs), 아디포넥틴 이형 폴리펩타이드, 카테킨(catechins), 트랜스-10 또는 시스-12 컨쥬게이션된 리놀레산, 코리달린(corydaline), 디티올에티온(dithiolethiones), DNA-PKcs(DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)의 억제제 또는 안타고니스트, 피브레이트(fibrates), GW2974

(N4-(1-benzyl-1H-indazol-5-yl)-N6,N6-dimethyl-pyrido-[3,4-d]-pyrimidine-4,6-diamine), 호노키올(honokiol), 렙틴(leptin), LKB1(serine/threonine kinase 11), 오보바톨(obovitol, 4',5-diallyl-2,3-dihydroxybiphenyl ether) 및 피오글리타존(pioglitazone)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 AMPK 활성화제인 것을 특징으로 하는 조성물.

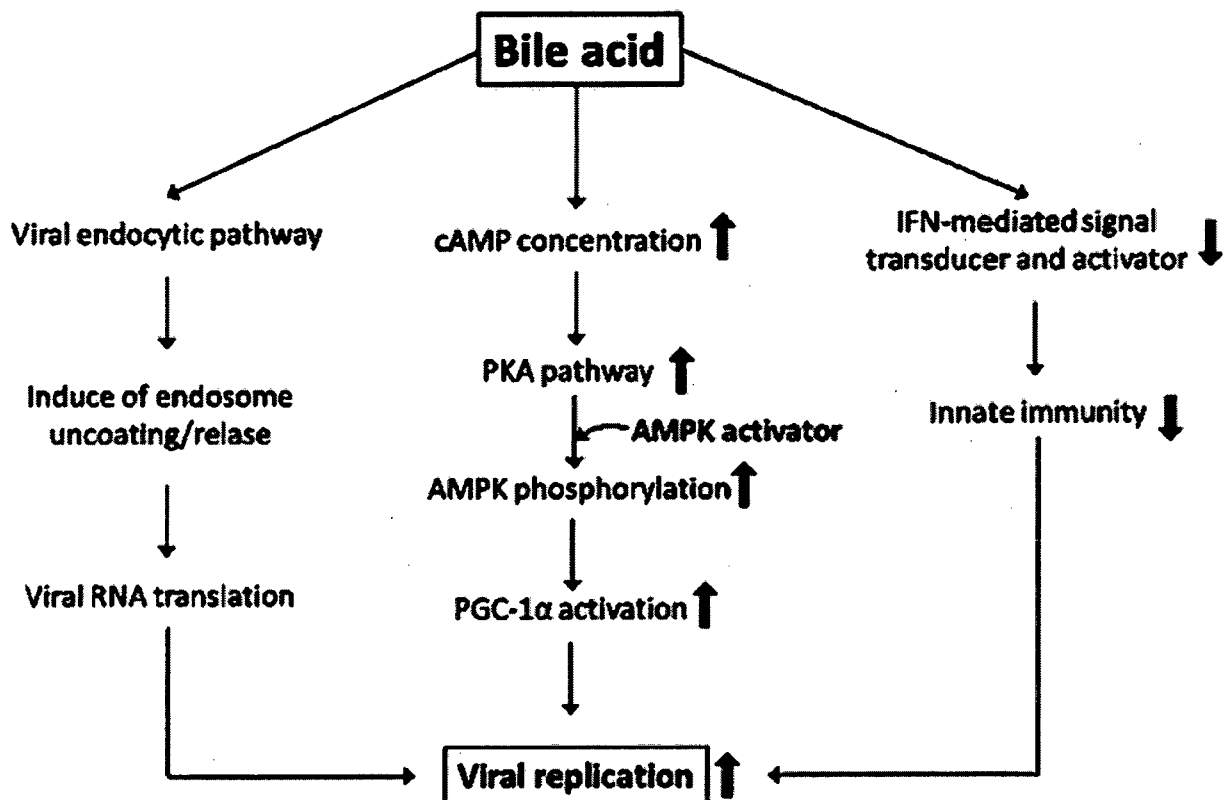
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서, 상기 AMPK 활성화제는 AICAR인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서, 상기 AICAR는 0.01 내지 0.30 mM의 농도를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 11] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 ELAVL1 활성화제는 리팜핀(rifampin), 리포다당류(lipopolysaccharide), 리토나비어(ritonavir), L-히스타민(L-histidine), L-아르기닌(L-arginine), 덱사메타손(dexamethasone) 및 아라키돈산(arachidonic acid)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 ELAVL1 활성화제인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서, 상기 ELAVL1 활성화제는 리팜핀인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서, 상기 리팜핀은 0.01 내지 0.20 mM의 농도를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 14] 제 2 항에 있어서, 상기 숙주세포는 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 15] 다음의 단계를 포함하는 노로바이러스(Norovirus)의 배양 방법:
 (a) 상기 제 2 항의 숙주세포 배양용 조성물에 숙주세포를 접종하여 배양하는 단계;
 (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 상기 제 1 항의 노로바이러스 배양용 조성물로 배지를 교체하고 노로바이러스를 감염시키는 단계; 및
 (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 배양하여 노로바이러스를 회수하는 단계.
- [청구항 16] 제 15 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 숙주세포는 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney)인 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 17] 제 15 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 배양은 2 내지 80시간 동안 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제 15 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 노로바이러스는 0.1 내지 10 MOI(multiplicity of infection) 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 제 15 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 감염은 0.5 내지 10 시간 동안 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 20] 제 15 항에 있어서, 상기 단계 (b) 및 (c) 는 30-40°C 온도 조건 하에 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

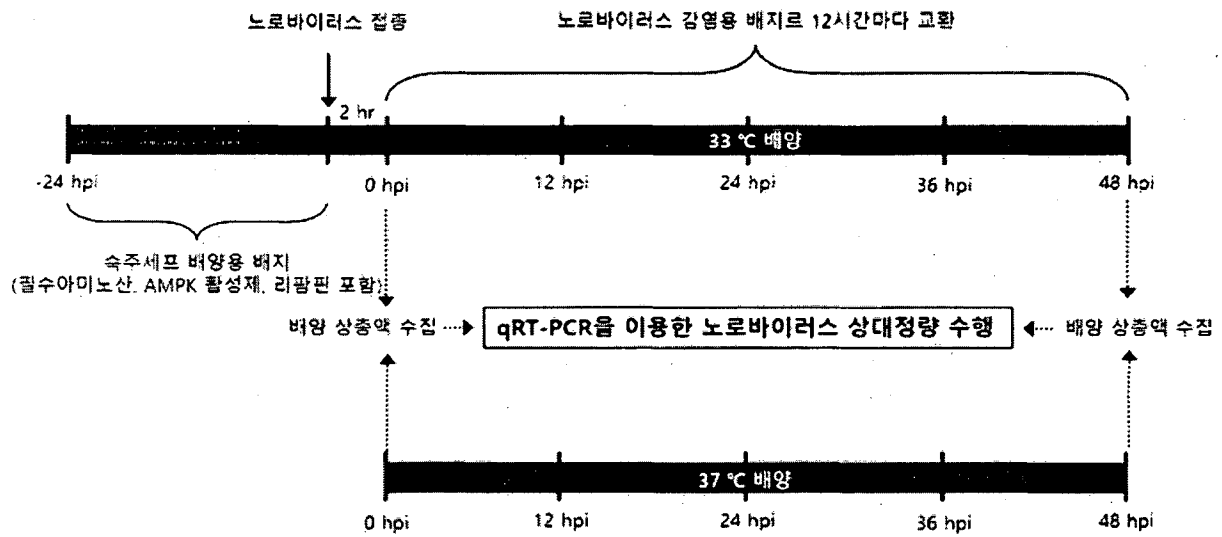
[도 1]



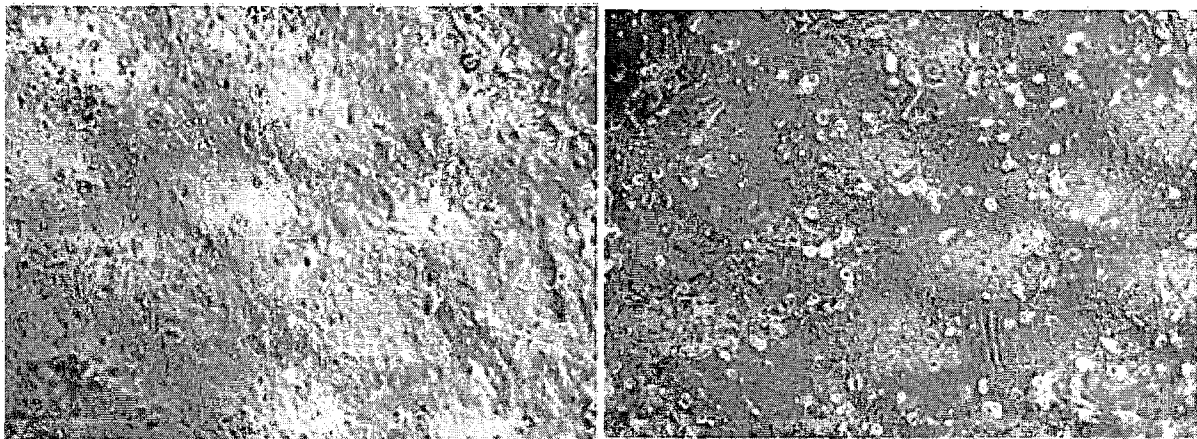
[도 2]



[도 3]



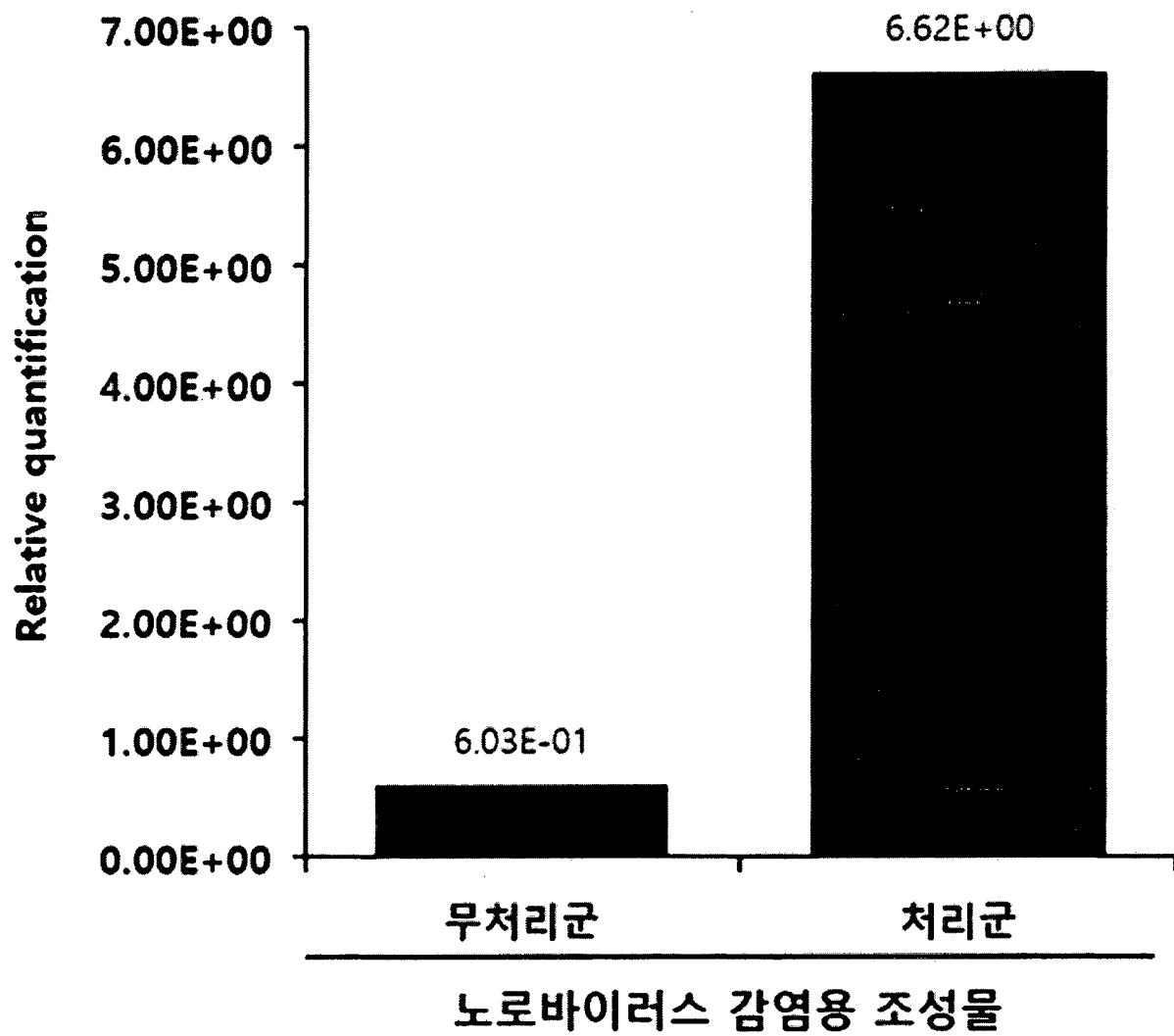
[도 4]



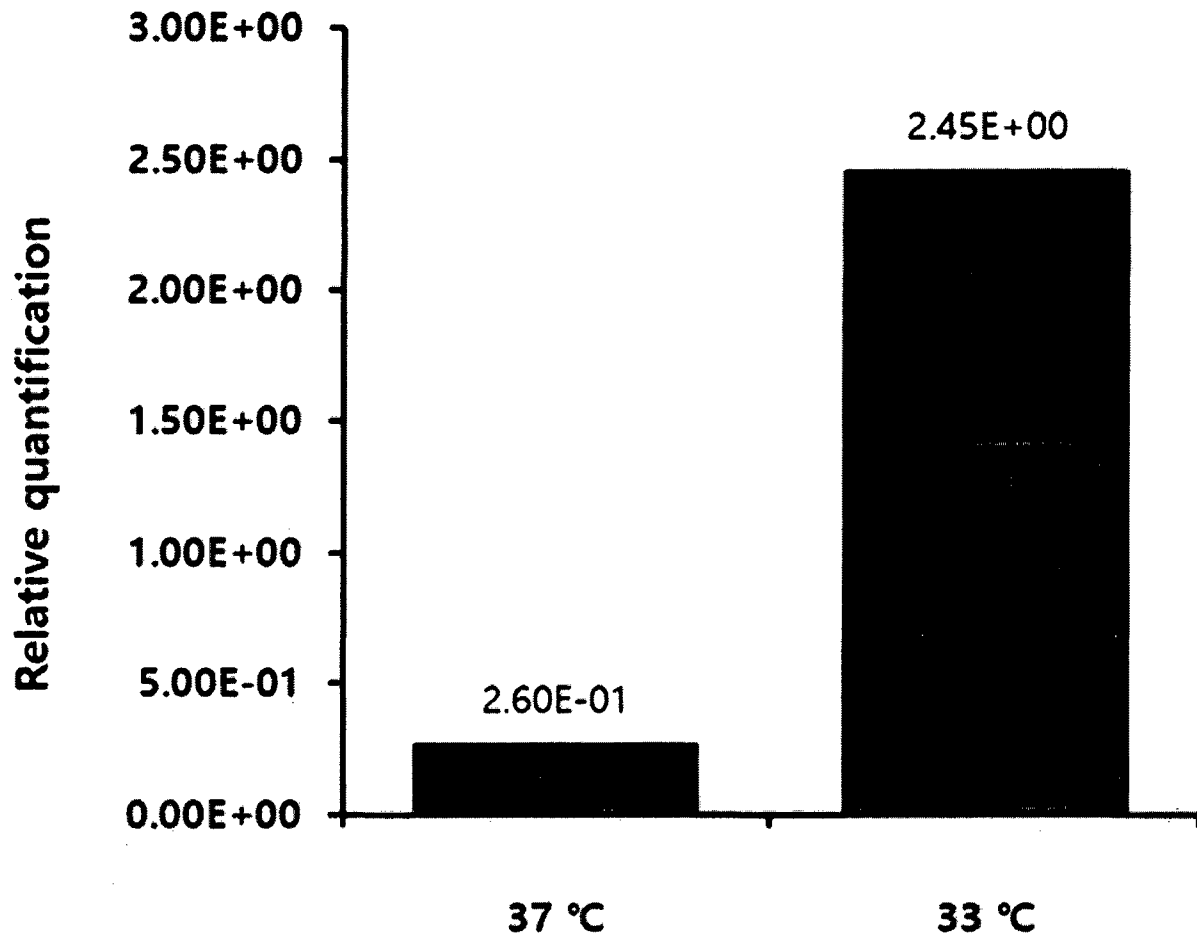
대조군

노로바이러스 감염 후 24 hr

[도 5]



[도 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004069**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12N 7/00(2006.01)i, C12N 5/00(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 7/00; C12N 5/00; C12Q 1/70; C12N 7/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: norovirus, amino acid, trypsin, AMPK activator, ELAVL1 activator, serum, cultivation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2014-513947 A (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 19 June 2014 See claims 1, 46, 89 and 96; paragraphs [0018]-[0028], [0034]-[0035] and [0043].	1-20
X	US 2015-0240215 A1 (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 27 August 2015 See claims 1, 55, 98; paragraphs [0024]-[0026], [0031], [0044]-[0046] and [0053].	1-20
A	US 7264923 B2 (VIRGIN, Herbert W. et al.) 04 September 2007 See claims 1-6.	1-20
A	KIM, Dong-Hwan et al., "Progress on the Development of in vitro Human Norovirus Cell Culture Model", Safe Food, September 2014, vol. 9, no. 3, pages 7-18 See the entire document.	1-20
A	JONES, Melissa K. et al., "Human Norovirus Culture in B Cells", Nature Protocols, 2015, vol. 10, no. 12, pages 1939-1947 See the entire document.	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 JULY 2017 (10.07.2017)

Date of mailing of the international search report

10 JULY 2017 (10.07.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/004069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2014-513947 A	19/06/2014	EP 2699672 A1	26/02/2014
		EP 2699672 A4	14/01/2015
		US 2014-0113353 A1	24/04/2014
		US 2016-0130565 A1	12/05/2016
		US 9212349 B2	15/12/2015
		WO 2012-145375 A1	26/10/2012
US 2015-0240215 A1	27/08/2015	WO 2013-158706 A1	24/10/2013
US 7264923 B2	04/09/2007	US 2005-255480 A1	17/11/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 7/00(2006.01)i, C12N 5/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 7/00; C12N 5/00; C12Q 1/70; C12N 7/02

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 노로바이러스, 아미노산, 트립신, AMPK 활성화제, ELAVL1 활성화제, 혈청, 배양

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2014-513947 A (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 2014.06.19 청구항 1, 46, 89 및 96; 단락 [0018]-[0028], [0034]-[0035] 및 [0043] 참조.	1-20
X	US 2015-0240215 A1 (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 2015.08.27 청구항 1, 55, 98; 단락 [0024]-[0026], [0031], [0044]-[0046] 및 [0053] 참조.	1-20
A	US 7264923 B2 (VIRGIN, HERBERT W. 등) 2007.09.04 청구항 1-6 참조.	1-20
A	김동환 등, '노로바이러스 in vitro 증식 모델 개발', Safe Food, 2014. 09, 제9권, 제3호, 7-18 페이지 전체 문헌 참조.	1-20
A	JONES, MELISSA K. 등, 'Human norovirus culture in B cells', Nature Protocols, 2015, 제10권, 제12호, 1939-1947 페이지 전체 문헌 참조.	1-20

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2014-513947 A	2014/06/19	EP 2699672 A1 EP 2699672 A4 US 2014-0113353 A1 US 2016-0130565 A1 US 9212349 B2 WO 2012-145375 A1	2014/02/26 2015/01/14 2014/04/24 2016/05/12 2015/12/15 2012/10/26
US 2015-0240215 A1	2015/08/27	WO 2013-158706 A1	2013/10/24
US 7264923 B2	2007/09/04	US 2005-255480 A1	2005/11/17