

Notice

This translation is machine-generated. It cannot be guaranteed that it is intelligible, accurate, complete, reliable or fit for specific purposes. Critical decisions, such as commercially relevant or financial decisions, should not be based on machine-translation output.

DESCRIPTION KR20230106223A

Composition for inhibiting biofilm formation and antibacterial against Gram-positive bacteria and fungi comprising indole derivatives as active ingredients

인돌 유도체를 유효성분으로 함유하는 그람양성균 및 진균에 대한 생물막 형성 억제 및 항균용 조성물

{Composition for inhibiting biofilm formation and antibacterial against Gram-positive bacteria and fungi comprising indole derivatives}

[0001]

[The present invention relates to a composition containing 3,3'-diindolylmethane (DIM) or indole-3-carbinol, which are indole derivatives, as an active ingredient, for inhibiting biofilm formation and antibacterial action against Gram-positive bacteria and fungi.]]

[본 발명은 인돌 유도체인 3,3'-디인돌릴메탄 (3,3'-diindolylmethane, DIM) 또는 인돌-3-카르비놀 (indole-3-carbinol)을 유효성분으로 함유하며, 그람양성균 및 진균에 대한 생물막 형성 억제 및 항균용 조성물에 관한 기술이다.]

[0002]

[In areas infected with bacteria, mucous bacterial colonies formed by a large number of bacteria exist as mucus; such mucous bacterial complexes are called biofilms, bacterial membranes, or biofilms. Biofilms form on various solid surfaces, whether biological or non-biological. Bacterial biofilms are complex structures surrounded by an outer membrane of a polymer substrate composed of polysaccharides, polypeptides, and various biomaterials, and within the biofilm, bacteria communicate with each other to defend against the external environment. Through this, biofilms enable bacteria to survive even under various environmental stresses, including antibiotics.]

[세균이 감염된 부분에는, 다수의 세균이 군락을 이루어 형성하는 점액성 세균 집락이 점액질로 존재하는데 이런 점액질성의 세균 복합체를 바이오필름 (biofilm), 군막 또는 생물막이라고 부른다. 생물막은 생물학적 표면 (biological surface) 또는 비생물학적 표면 (non-biological surface)의 다양한 고체 (solid) 표면에 형성한다. 세균의 생물막은 다당류와 폴리펩타이드 및 다양한 생체물질로 이루어진 폴리머 (polymer) 기질 외막이 둘러싼 복합체이며, 생물막 내부에서 세균은 서로 의사소통을 하여 외부환경에 대하여 방어를 한다. 이를 통하여 생물막은 항생제를 포함한 여러 환경 스트레스 (environmental stress) 아래에서도 세균의 생존을 가능하게 한다.]

[0003]

Bacterial biofilms are found very frequently not only in the general natural environment but also in the medical field related to bacterial infectious diseases.

[세균의 생물막은 일반 자연환경뿐만 아니라 세균감염성 질환과 관련한 의학 분야에서 매우 자주 발견된다.

It can form on human skin and organs, appear as tartar on teeth, and may also occur in industrial equipment, medical equipment, and body implants. Due to these problems, biofilms have been a subject of interest for researchers studying dental caries and periodontal disease, pneumonia associated with cystic fibrosis, earache in the middle ear, skin infections associated with burns, and skin diseases such as athlete's foot. In a 2002 report, the U.S. National Institutes of Health estimated that up to 80% of bacterial populations cause infections by pathogenic bacteria through the formation of such biofilms.]

사람의 피부 및 장기에 형성되기도 하고 치아에서 치석 형태로 나타나기도 하며, 산업용 장비나 의료용 장비 및 신체 이식 기구에 생길 수도 있다. 이런 문제로 인해 생물막은 충치와 치주 질환 (periodontal disease)이나 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis)에 동반하는 폐렴, 중이 (middle ear)에 생기는 이통 (earache), 화상 등에 동반된 피부감염 및 무좀 등의 피부질환 등을 연구하는 학자들의 관심 대상이 되어 왔다. 미국 국립보건연구소는 2002년 보고에서 박테리아군의 최대 80%가 이 같은 생물막 형성을 통한 병원성 세균의 감염을 일으키고 있는 것으로 추산했다.]

[0004]

Antibiotics that were effective against planktonic bacteria, regardless of biofilm formation, also tend to lose their efficacy when the bacteria form a biofilm.

[생물막 형성과는 별개로 부유하던 세균 (planktonic bacteria)에 대해 약효를 나타내던 항생제도 세균이 생물막을 형성하면 효능을 상실하는 경향이 커진다.

When bacteria form a biofilm, antibodies and the like cannot penetrate the thick biofilm, so the bacteria's resistance to antibiotics can increase by up to about 1,000 times. The exact

cause of the increase in antibiotic resistance due to such biofilm formation has not yet been precisely identified, but it is explained by the following three factors. The first is "changes in the physiological life history of microorganisms." When a biofilm is formed, bacterial metabolism and proliferation tend to decrease. At this time, the bacteria inside the biofilm experience a significant reduction in exchange with the surrounding environment for metabolism and proliferation, resulting in lower susceptibility to antibiotics. The second is "physical blocking of the outer membrane composed of polysaccharides and proteins." The electrical properties of the polysaccharide and protein complexes forming the mucous outer membrane of bacteria have a tendency to bind to antibiotics, and by binding to antibiotics, they physically hinder the spread of antibiotics. In other words, the antibiotic is not effectively delivered to each bacterium, resulting in reduced efficacy. The third is an estimate related to the general mechanism of antibiotic resistance acquisition, which is "production of antibiotic inhibitory factors." Among the substances most well-known as antibiotic degradation and inhibitory factors that suppress the efficacy of antibiotics, β -lactamases produced by *Pseudomonas* are cited. When a biofilm is formed, bacteria within the biofilm that were previously non-antibiotic resistant tend to acquire resistance by obtaining resistance factor genes from surrounding antibiotic-resistant bacteria through horizontal gene transfer. In other words, if a biofilm forms at the site of infection, the emergence of antibiotic-resistant bacteria becomes frequent.]

세균이 생물막을 형성하면 두꺼운 생물막을 항체 등이 투과할 수 없어 항생제에 대한 세균의 저항성이 약 1,000배까지 높아질 수 있다. 이런 생물막 형성에 의한 항생제 저항성 증가 원인은 아직 정확하게 밝혀져 있지는 않으나 다음의 3가지 정도로 설명된다. 첫 번째는 "미생물의 생리학적 생활사의 변화" 이다. 생물막이 형성된 상태에서는 세균의 대사 및 증식이 저하되는 경향이 생긴다. 이때 생물막 내부의 세균들은 물질 대사 및 증식을 위한 주위 환경과의 교환 작용이 현저히 저하되어 항생제에 대한 감수성이 낮아지는 결과를 초래한다. 두 번째는 “다당류 및 단백질로 구성된 외막의 물리적 차단” 을 들 수 있다. 세균의 점액성 외막을 형성하는 다당류와 단백질 복합체의 전기적 성질이 항생 물질과 결합하려는 경향을 갖고 있어 항생 물질과 결합함으로써 항생 물질이 퍼지는 것을 물리적으로 방해한다. 즉 항생 물질이 각 세균으로 잘 전달되지 않아 그 효능이 저하되는 결과를 초래한다. 세 번째는 일반적 항생제 내성 획득 기작과 관련 있는 추정으로 "항생제 억제 인자의 생산" 이다. 항생 물질의 효능을 억제하는 항생제 분해 및 억제 인자로 가장 많이 알려진 물질로는 슈도모나스균 (pseudomonas)에 의하여 생산되는 베타-락타메이스 (β -lactamases)를 들 수 있다. 생물막이 형성되면 생물막 내부에 존재하는 항생제 내성이 없던 세균들도 주위의 항생제 내성 세균으로부터 수평 유전자 전이 (horizontal gene transfer)를 통해 내성 인자 유전자를 획득하여 내성을 가지게 되는 경향이 있다. 즉, 감염 부위에 생물막이 형성되면 항생제 내성을 가지는 세균의 출현이 빈번해진다.]

[0005]

For these reasons, when a biofilm forms, resistance to antibiotics widely used to treat

infections develops, weakening the therapeutic effect of antibiotics and leading to a state of chronic bacterial infection.

[이러한 이유들로 인하여 생물막이 형성되면 감염증 치료에 널리 사용되던 항생제에 내성이 발생하여 항생제에 의한 치료 효과가 악화되며, 만성적인 세균 감염 상태에 돌입하게 된다.

In this case, as described above, the susceptibility of bacteria to antibiotics is reduced, making it difficult to eradicate bacterial infections even with the use of a normal amount of antibiotics, leading to the overprescription of antibiotics. As a result, this only increases antibiotic resistance in bacteria and leads to the terrifying outcome of the mass production of antibiotic-resistant superbugs. Therefore, this means that treating bacterial infections with biofilms solely with antibiotics has limitations and cannot be an effective treatment. In particular, infections caused by bacteria forming biofilms are often caused by multidrug-resistant bacteria that are resistant to various antibiotics, making the problem even more serious.]

이 경우 상기에 기술했듯이 세균들의 항생제에 대한 감수성이 낮아져 일반적인 양의 항생제를 사용해도 거의 세균감염의 퇴치가 어려워져 항생제를 과다처방하게 되는데 이 결과로서 세균의 항생제 내성만을 키우게 되고 항생제 내성 슈퍼박테리아의 양산이라는 무서운 결과를 초래하게 된다. 따라서, 생물막이 형성된 세균 감

염증은 단순히 항생제로만 치료하는 것은 한계가 있고 효과적인 치료가 될 수 없음을 의미한다. 특히 생물막을 형성하고 있는 세균에 의한 감염은 여러 가지 항생제에 대해 내성을 갖는 다제내성 (multi-drug resistance) 균에 의한 경우가 많아 더욱 문제가 심각하다.]

[0006]

Therefore, in order to solve the above problem, there is a need to develop therapeutic agents that can maximize the effects of antibiotics and antifungals by inhibiting biofilm formation through suppressing biofilm or the production of outer membranes present in biofilms, altering the surface properties of bacteria, or inducing changes in bacterial growth patterns.

[따라서 상기 문제를 해결하기 위하여, 생물막 또는 생물막에 존재하는 외막생산을 억제하고 세균의 표면 성질을 바꾸거나 세균의 성장패턴에 변화를 유도하여 생물막 형성을 억제하여 항생제 및 항진균제의 효과를 극대화할 수 있는 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

]

]

[0007]

[PatentCitationText[attributes={}; value=[Republic of Korea Published Patent No. 10-2014-0044053 (2014.04.14.

[PatentCitationText[attributes={}; value=[대한민국 공개특허 제10-2014-0044053호 (2014.04.14.
release)]]]

공개)]]]

[0008]

[The present invention aims to provide an antibacterial and biofilm-inhibiting composition containing 3,3'-diindolylmethane (DIM) and indole-3-carbinol as active ingredients to prevent or improve diseases caused by Gram-positive bacteria, such as acne bacteria, Staphylococcus aureus, and Candida albicans, or their biofilms, which are the causes of dermatitis and skin troubles.]

[본 발명은 피부염 질환 및 피부 트러블의 원인이 되는 그람양성균인 여드름균과 황색포도상구균 및 칸디다 알비칸스 또는 이들의 생물막에 의해 발병되는 질환을 예방하거나 개선하기 위해 3,3'-디인돌릴메탄 (DIM) 및 인돌-3-카르비놀을 유효성분으로 함유하는 향균 및 생물막 형성 억제용 조성물을 제공하고자 한다.

]

]

[0009]

[The present invention provides a composition for inhibiting biofilm formation against one or more species selected from the group consisting of Gram-positive bacteria and fungi, containing one or more active ingredients selected from 3,3'-diindolylmethane (DIM) and indole-3-carbinol.]

[본 발명은 3,3'-디인돌릴메탄 (3,3'-diindolylmethane, DIM) 및 인돌-3-카르비놀 (indole-3-carbinol)로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하는 그람양성균 및 진균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 대한 생물막 형성 억제용 조성물을 제공한다.]

]

]

[0010]

[The present invention provides an antimicrobial composition against one or more selected

from the group consisting of Gram-positive bacteria and fungi, containing 3,3'-diindolylmethane (DIM) as an active ingredient.

[본 발명은 3,3'-디인돌릴메탄 (3,3'-diindolylmethane, DIM)을 유효성분으로 함유하는 그람양성균 및 진균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 대한 항균제 조성물을 제공한다.

]

]

[0011]

[In addition, the present invention provides a cosmetic composition for preventing or improving dermatitis or skin troubles caused by one or more selected from the group consisting of Gram-positive bacteria and fungi, containing one or more active ingredients selected from 3,3'-diindolylmethane (DIM) and indole-3-carbinol.

[또한, 본 발명은 3,3'-디인돌릴메탄 (3,3'-diindolylmethane, DIM) 및 인돌-3-카르비놀 (indole-3-carbinol)로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하며, 그람양성균 및 진균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 의해 유발되는 피부염 질환 또는 피부 트러블 예방 또는 개선용 화장품조성물을 제공한다.

]

]

[0012]

[According to the present invention, indole-3-carbinol exhibited the effect of inhibiting biofilm formation without cell death of Gram-positive acne bacteria (*C. ances*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), and *Candida albicans* (*C. albicans*) that cause skin inflammation and troubles, and 3,3'-diindolylmethane (DIM) exhibited strong antimicrobial biofilm activity against the above bacteria and was confirmed to enhance the antimicrobial

activity of antibiotics through concomitant use with antibiotics. Accordingly, a composition containing indole-3-carbinol or 3,3'-diindolylmethane as an active ingredient can be provided as an antimicrobial agent, an antibiotic adjuvant, an antimicrobial biofilm composition, and a cosmetic composition for improving skin inflammatory diseases.

[본 발명에 따르면, 인돌-3-카르비놀은 피부염증과 트러블을 유발시키는 그람양성 여드름균 (*C. ances*)과 황색포도상구균 (*S. aureus*) 및 칸디다 알비칸스 (*C. albicans*)의 세포사멸 없이 생물막 형성을 억제하는 효과를 나타내었으며, 3,3'-디인돌릴메탄 (DIM)은 상기 균들에 대하여 강력한 항생물막 활성을 나타내고, 항생제와의 병행사용을 통하여 항생제의 항균력 활성을 향상시키는 것을 확인함에 따라, 상기 인돌-3-카르비놀 또는 3,3'-디인돌릴메탄을 유효성분으로 함유하는 조성물은 항균제, 항생제 보조제, 항생물막 조성물로 제공될 수 있으며, 피부염증 질환 개선용 화장품 조성물로 제공될 수 있다.

]

]

[0013]

[Figure 1 shows the results of confirming the effects of various indole derivatives on the cell growth of acne bacteria (*C. acne*), representing the MIC (minimal inhibition concentration), which is the minimum growth inhibition concentration of each indole derivative against acne bacteria.

[도 1은 여드름균 (*C. acne*)의 세포 성장에 대한 다양한 인돌유도체의 영향을 확인한 결과로, 여드름균에 대한 각 인돌 유도체의 성장 저해 최소 농도인 MIC (minimal inhibition concentration)를 나타낸 결과이다.

Figure 2 shows the results of confirming the antimicrobial biofilm activity of indole derivatives against acne bacteria, Figure 2A shows the results of screening for biofilm formation of acne bacteria in the presence of 0.1 mM indole derivative, Figures 2B, 2C, and 2D show the results of growth of acne bacteria by concentration and time in the presence of indole, 3,3'-diindolylmethane, and indole-3-carbinol, respectively, Figures 2E, 2F, and 2G show the results of experiments on the degree of biofilm formation and inhibition of acne bacteria by concentration in the presence of indole, 3,3'-diindolylmethane, and indole-3-carbinol, respectively, and error bars represent the standard deviation.

도 2는 여드름균에 대한 인돌 유도체의 항생물막 활성을 확인한 결과로, 도 2A는 0.1 mM의 인돌 유도체의 존재 하에 여드름균의 생물막 형성을 스크리닝한 결과이며, 도 2B, 2C 및 2D는 각각 인돌, 3,3'-디인돌릴메탄 및 인돌-3-카르비놀의 존재 하에서의 여드름균의 성장을 농도별, 시간별로 나타낸 결과이고, 도 2E, 2F 및 2G는 각각 인돌, 3,3'-디인돌릴메탄 및 인돌-3-카르비놀 존재하에서 여드름균의 생물막 형성 및 억제 정도를 농도별로 실험한 결과이며, 오차막대는 표준편차를 나타낸다.

(* , $P < 0.05$ vs. untreated control group) Figure 3 shows the results of confirming the inhibition of biofilm formation by acne bacteria by antibiotics with and without 3,3'-diindolylmethane. Figures 3A, 3B, and 3C show the results of confirming the degree of biofilm inhibition after treatment with benzoyl peroxide, gentamycin, and ciprofloxacin, which are commercially available antibiotics for inhibiting and killing acne bacteria. Figures 3D, 3E, and 3F show the results of measuring the effect of 3,3'-diindolylmethane on biofilm formation inhibition at different concentrations at concentrations where the biofilm formation inhibitory ability of benzoyl peroxide, gentamycin, and ciprofloxacin is between 40-70%, and error bars represent the standard deviation.

(* , $P < 0.05$ 대 비처리 대조군)도 3은 3,3'-디인돌릴메탄의 유무에 따른 항생제에 의한 여드름균의 생물막 형성 억제를 확인한 결과로, 도 3A, 3B 및 3C는 여드름균 억제 및 사멸 항생제로 시판되고 있는 약물들인 과산화 벤조일 (benzoyl peroxide), 겐타마이신 (gentamycin) 및 시프로플록사신 (ciprofloxacin)을 처리한 후 생물막 억제 정도를 확인한 결과이며, 도 3D, 3E 및 3F는 과산화벤조일, 겐타마이신 및 시프로플록사신의 생

물막 형성 억제능이 40-70% 사이인 농도에서 3,3'-디인돌릴메탄이 농도별로 생물막 형성억제에 미치는 영향을 측정된 결과이며, 오차막대는 표준편차를 나타낸다.

(* , $P < 0.05$ versus untreated control group) Figure 4 shows the results of confirming the antimicrobial biofilm activity of 3,3'-diindolylmethane against *Candida albicans* (*C. albicans*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) under anaerobic and aerobic conditions, Figures 4A and 4B show the results of confirming the degree of biofilm formation of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* under aerobic conditions, respectively, and Figures 4C and 4D show the results measured after culturing *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* under anaerobic conditions, respectively, with error bars representing the standard deviation.

(* , $P < 0.05$ 대 비처리 대조군)도 4는 혐기성 및 호기성 조건에서 칸디다 알비칸즈 (*C. albicans*)와 황색포도상구균 (*S. aureus*)에 대한 3,3'-디인돌릴메탄의 항생물막 활성을 확인한 결과로, 도 4A 및 도 4B는 각각 칸디다 알비칸즈 및 황색포도상구균의 호기성 조건에서 생물막 형성 정도를 확인한 결과이며, 도 4C 및 4D는 각각 칸디다 알비칸즈 및 황색포도상구균의 혐기성 조건에서 배양 후 측정된 결과로, 오차막대는 표준편차를 나타낸다.

(* , $P < 0.05$ versus untreated control group) Figure 5 shows the results confirming the antimicrobial biofilm effect of 3,3'-diindolylmethane on acne bacteria. Figure 5A shows the biofilm inhibition of acne bacteria by 3,3'-diindolylmethane (0, 0.02, or 0.05 mM) observed in

2D and 3D images. Figure 5B shows the results confirmed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Figure 5C shows the results of analyzing the biomass, thickness, and biofilm coverage formed on the bottom surface of a plastic plate using the COMSTAT program based on images observed by confocal laser scanning microscopy. The scale size in Figure 5B is 100 μm .

(* , $P < 0.05$ 대 비처리 대조군)도 5는 여드름균에 대한 3,3'-디인돌릴메탄의 항생물막 효과를 확인한 결과로, 도 5A는 3,3'-디인돌릴메탄 (0, 0.02 또는 0.05 mM)에 의한 여드름균의 생물막 억제를 2D와 3D 이미지로 관찰한 것이며, 도 5B는 공초점레이저주사현미경 (Confocal laser scanning microscopy, CLSM)로 확인한 결과이며, 도 5C는 공초점레이저주사현미경으로 관찰한 이미지를 COMSTAT 프로그램을 통해 플라스틱 플레이트 바닥 표면에 형성된 생물막의 양 (biomass), 두께 (thickness) 및 생물막 형성 표면 범위 (coverage)를 분석한 결과로, 도 5B의 눈금자 크기는 100 μm 나타낸다.

(* , $P < 0.05$ versus untreated control) Fig. 5D is a scanning electron microscope (SEM) image formed with or without 3,3'-diindolylmethane (0, 0.02, or 0.05 mM), with yellow and white ruler sizes of 3 μm and 750 nm, respectively, and None represents the untreated control.

(* , $P < 0.05$ 대 비처리 대조군) 도 5D는 3,3'-디인돌릴메탄 (0, 0.02 또는 0.05 mM) 유무 하에 형성된 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscope, SEM) 이미지로, 노란색 및 흰색 눈금자 크기는 각각 3 μm 와 750 nm를 나타내고, None은 처리되지 않은 대조군을 나타낸다.

Figure 6 shows the results confirming the effect of 3,3'-diindolylmethane on multimicrobial biofilms. Under anaerobic conditions, Figure 6A shows the biofilm formation inhibitory activity of 3,3'-diindolylmethane on *Acnebacterium acetaminophen* and *Staphylococcus aureus*, Figure 6B on *Acnebacterium acetaminophen* and *Candida albicans*, and Figure 6C on multimicrobial biofilms of *Acnebacterium acetaminophen*, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus*. Figure 6D shows the results of 2D and 3D analysis of three types of biofilms containing a mixture of *Acnebacterium acetaminophen*, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus* cultured in the presence of 3,3'-diindolylmethane. Figure 6E is an image observed using a confocal laser scanning microscope, and Figure 6F shows the biomass, thickness, and biofilm coverage of the biofilm formed on the bottom surface of a plastic plate using the COMSTAT program. As a result of the analysis, the ruler size is 100 μm .

도 6은 3,3'-디인돌릴메탄이 다균성 생물막에 미치는 영향을 확인한 결과로, 혐기성 조건 하에서 도 6A는 여드름균과 황색포도상구균, 도 6B는 여드름균과 칸디다 알비칸스, 도 6C는 여드름균, 칸디다 알비칸스 및 황색포도상구균의 다균성 생물막에 대한 3,3'-디인돌릴메탄의 생물막 형성 억제 활성을 확인한 결과이며, 도 6D는 3,3'-디인돌릴메탄 존재하에서 배양된 여드름균, 칸디다 알비칸스 및 황색포도상구균이 섞여 있는 3종의

생물막을 2D와 3D에서 탐색한 결과이며, 도 6E는 공초점레이저주사현미경으로 관찰한 이미지이며, 도 6F는 COMSTAT 프로그램을 통해 플라스틱 플레이트 바닥 표면에 형성된 생물막의 양 (biomass), 두께 (thickness) 및 생물막 형성 표면 범위 (coverage)를 분석한 결과로, 눈금자 크기는 100 μm 를 나타낸다.

(* , $P < 0.05$ versus untreated control group) Figure 6G shows the results of scanning electron microscope (SEM) analysis of the biofilm formed by three types of bacteria according to the concentration of 3,3'-diindolylmethane, with yellow and white ruler sizes of 10 and 3 μm , respectively, and None representing the untreated control group.

(* , $P < 0.05$ 대 비처리 대조군) 도 6G는 3,3'-디인돌릴메탄의 농도에 따른 3종 세균이 형성한 생물막 정도를 주사전자현미경 (Scanning Electrone Microscope, SEM)으로 확인한 결과로, 노란색 및 흰색 눈금자 크기는 각각 10 및 3 μm 를 나타내며, None은 처리되지 않은 대조군을 나타낸다.

Figure 7 shows the results of confirming the effects of indole, 3,3'-diindolylmethane and indole-3-carbinol on the production of extracellular polymeric substances (EPS) in acne bacteria, and Figures 7A, 7B, and 7C show the results of measuring the production of extracellular polymeric substances (EPS) in the presence of indole, 3,3'-diindolylmethane, and indole-3-carbinol, respectively.

도 7은 여드름균의 세포외막기질 (extracellular polymeric substances, EPS) 생산에 대한 인돌, 3,3'-디인돌릴메탄 및 인돌-3-카르비놀의 효과를 확인한 결과로, 도 7A, 7B 및 7C는 각각 인돌, 3,3'-디인돌릴메탄 및 인돌-3-카르비놀의 존재 하에서의 세포외막기질 (EPS) 생산량을 측정한 결과이다.

(* , $P < 0.05$ vs. untreated control) Figure 8 shows the results confirming the inhibitory effect of 3,3'-diindolylmethane on mycelial filamentation and aggregation of *Candida albicans*, Figure 8A shows the results confirming the inhibition of filamentous mycelial growth in PDB medium, and Figure 8B shows the results confirming the inhibition of fungal cell aggregation in RPMI-1640 medium containing 10% bovine serum, where the scale size is 100 μm in Figures 8A and 8B, and None represents the untreated control.

(* , $P < 0.05$ 대 비처리 대조군)도 8은 3,3'-디인돌릴메탄은 칸디다 알비칸스의 균사 필라멘트화 및 응집에 대한 억제효과를 확인한 결과로, 도 8A는 PDB 배지에서 사상균사 성장을 억제하는 것을 확인한 결과이며, 도 8B는 10% 소혈청을 함유하는 RPMI-1640 배지에서 진균세포 응집을 억제하는 것을 확인한 결과로, 눈금자 크기는 도 8A와 도 8B에서 100 μm 을 나타내며, None은 처리되지 않은 대조군을 나타낸다.

Figure 9 shows the results of confirming the gene expression level of acne bacteria treated with 3,3'-diindolylmethane. The results were obtained by treating acne bacteria with 3,3'-diindolylmethane, extracting the total RNA of the acne bacteria, and analyzing it using real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR).

도 9는 3,3'-디인돌릴메탄을 처리한 여드름균의 유전자 발현 정도를 확인한 결과로, 여드름균에 3,3'-디인돌릴메탄을 처리하고 여드름균의 전체 RNA를 추출하여 real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR)을 이용하여 분석한 결과이다.

(* = $P < 0.05$ versus untreated control group) Figure 10 shows the results of the study of the present invention regarding the effects of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane derived from cruciferous plants on single and multibacterial biofilms of acne bacteria, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus*, and the mechanism of action thereof.

(* = $P < 0.05$ 대 비처리 대조군)도 10은 십자화과 식물에서 유래하는 인돌-3-카르비놀과 3,3'-디인돌릴메탄이 여드름균, 칸디다 알비칸스 및 황색포도상구균의 단일 및 다균성 생물막에 미치는 영향과 그 작용 기전을 나타낸 본 발명의 연구 결과를 나타낸 것이다.

]

]

[0014]

[The present invention will be described in more detail below.]

[이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

]

]

[0016]

[The inventors of the present invention have completed the present invention to prevent or improve diseases caused by Gram-positive bacteria and fungi by confirming that 3,3'-diindolylmethane (DIM) or indole-3-carbinol, which are indole derivatives, exhibit an effect of

inhibiting the formation of biofilms of Gram-positive bacteria such as acne bacteria, Staphylococcus aureus, and Candida albicans, which are causes of dermatitis and skin troubles.]

[본 발명의 발명자들은 인돌유도체인 3,3'-디인돌릴메탄 (DIM) 또는 인돌-3-카르비놀이 피부염 질환 및 피부 트러블의 원인이 되는 그람양성균인 여드름균과 황색포도상구균 및 칸디다 알비칸스 또는 이들의 생물막 형성을 억제하는 효과를 나타내는 것을 확임함에 따라, 그람양성균 및 진균에 의해 발병되는 질환을 예방하거나 개선하기 위해 본 발명을 완성하였다.

]

]

[0018]

[The present invention may provide a composition for inhibiting biofilm formation against one or more species selected from the group consisting of Gram-positive bacteria and fungi,

containing one or more active ingredients selected from 3,3'-diindolylmethane (DIM) and indole-3-carbinol.]

[본 발명은 3,3'-디인돌릴메탄 (3,3'-diindolylmethane, DIM) 및 인돌-3-카르비놀 (indole-3-carbinol)로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하는 그람양성균 및 진균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 대한 생물막 형성 억제용 조성물을 제공할 수 있다.

]

]

[0019]

[The above Gram-positive bacteria may be selected from the group consisting of Cutibacterium acnes (C. acnes) KCCM 41747 (ATCC 6919) and Staphylococcus strains, and more specifically, the above Staphylococcus strains may be methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus strains, but are not limited thereto.

[상기 그람양성균은 큐티박테리움 아크네스 (Cutibacterium acnes, C. acnes) KCCM 41747 (ATCC 6919) 및 황색포도상구균 (Staphylococcus strains)으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 황색포도상구균은 메치실린 감수성 및 내성 황색포도상구균일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

]

]

[0020]

[The above fungus may be Candida albicans, and more specifically, the above Candida albicans may be fluconazole-resistant Candida albicans DAY185 fungus, but is not limited thereto.

[상기 진균은 칸디다 알비칸즈 (Candida albicans)일 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 칸디다 알비칸즈는 플루코나졸 내성 칸디다 알비칸즈 DAY185 진균일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

]

]

[0021]

[The above indole-3-carbinol may inhibit biofilm formation without cell death.

[상기 인돌-3-카르비놀은 세포 사멸 없이 생물막 형성을 억제하는 것일 수 있다.

]

]

[0022]

[The above 3,3'-diindolylmethane may inhibit multi-species biofilm formation in which Cutibacterium acnes (C. acnes), Candida albicans (C. albicans) and Staphylococcus aureus (S. aureus) form a biofilm together.

[상기 3,3'-디인돌릴메탄은 큐티박테리움 아크네스 (Cutibacterium acnes, C. acnes), 칸디다 알비칸스 (C. albicans) 및 황색포도상구균(S. aureus)이 함께 생물막을 형성하는 다중 종 생물막 형성을 억제하는 것
일 수 있다.

]

]

[0024]

[The present invention may provide an antimicrobial composition for one or more selected from the group consisting of Gram-positive bacteria and fungi containing 3,3'-diindolylmethane (DIM) as an active ingredient.]

[본 발명은 3,3'-디인돌릴메탄 (3,3'-diindolylmethane, DIM)을 유효성분으로 함유하는 그람양성균 및 진균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 대한 항균용 조성물을 제공할 수 있다.

]

]

[0025]

[The above 3,3'-diindolylmethane can help kill one or more bacteria selected from the group consisting of the Gram-positive bacterium Cutibacterium acnes (C. acnes), methicillin-susceptible and resistant Staphylococcus aureus strains, and fluconazole-resistant Candida albicans.

[상기 3,3'-디인돌릴메탄은 그람양성균 큐티박테리움 아크네스 (Cutibacterium acnes, C. acnes), 메치실린 감수성 및 내성 황색포도상구균 (Staphylococcus strains) 및 플루코나졸 내성 칸디다 알비칸스 (Candida albicans)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균을 사멸시키는 도움을 줄 수 있다.

]

]

[0026]

[In addition, the above 3,3'-diindolylmethane (DIM) may be provided as an adjuvant for

enhancing the antibacterial effect of an antibiotic or antimicrobial agent against one or more selected from the group consisting of Gram-positive bacteria and fungi.

[또한, 상기 3,3'-디인돌릴메탄 (3,3'-diindolylmethane, DIM)을 유효성분으로 함유하는 그람양성균 및 진균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 대한 항생제 또는 항균제의 항균 효과 증진용 보조제로 제공될 수 있다.

]

]

[0027]

[The above adjuvant may be used in combination with an antibiotic or antimicrobial agent to enhance the antimicrobial effect of the antibiotic or antimicrobial agent, and the antibiotic may be selected from the group consisting of gentamycin and ciprofloxacin, but is not limited thereto.

[상기 보조제는 항생제 또는 항균제와 병용 처리하여 항생제 또는 항균제의 항균 효과를 향상시키는 것일 수 있으며, 상기 항생제는 겐타마이신 (Gentamycin) 및 시프로플록사신(Ciprofloxacin)으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

]

]

[0029]

[In addition, the present invention may provide a cosmetic composition for preventing or improving dermatitis or skin troubles caused by one or more selected from the group consisting of Gram-positive bacteria and fungi, containing one or more active ingredients selected from 3,3'-diindolylmethane (DIM) and indole-3-carbinol.

[또한, 본 발명은 3,3'-디인돌릴메탄 (3,3'-diindolylmethane, DIM) 및 인돌-3-카르비놀 (indole-3-carbinol)로 부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하며, 그람양성균 및 진균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 의해 유발되는 피부염 질환 또는 피부 트러블 예방 또는 개선용 화장품조성물을 제공할 수 있다.

]

]

[0030]

[The above dermatitis or skin trouble may be caused by Cutibacterium acnes, Staphylococcus strains, Candida albicans, or their biofilms.

[상기 피부염 질환 또는 피부 트러블은 큐티박테리움 아크네스 (Cutibacterium acnes), 황색포도상구균 (Staphylococcus strains), 칸디다 알비칸스 (Candida albicans) 또는 이들의 생물막에 의해 발병하는 것일 수 있다.

]

]

[0031]

[The above dermatitis disease may be selected from the group consisting of comedonal acne, papular acne, pustular acne, nodular acne, cystic acne, acne vulgaris, fulminant acne, nodular acne, keloid acne, psoriasis, atopic dermatitis, seborrheic dermatitis, contact dermatitis, nummular dermatitis, staphylococcal burn skin syndrome, folliculitis, impetigo, abscess, cellulitis, toxic epidermal necrolysis, epidermal peeling syndrome, candidiasis, candidal onychomycosis, and general dermatitis.

[상기 피부염 질환은 면포성 여드름, 구진성 여드름, 농포성 여드름, 결정성 여드름, 낭포성 여드름, 심상성 여드름, 전격성 여드름, 응괴성 여드름, 켈로이드성 여드름, 건선증, 아토피성 피부염, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 화폐성 피부염, 포도구균성열상피부증후군, 모낭염, 농가진, 농양, 연조직염, 독성표피 괴사용해, 표피 박리 증후군, 칸디다증, 칸디다성 손발톱 무좀 및 일반 피부염으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

]

]

[0033]

[The above cosmetic composition may include, in addition to the active ingredients 3,3'-diindolylmethane (DIM) and indole-3-carbinol, conventional auxiliary agents such as stabilizers, solubilizers, vitamins, pigments, and fragrances, and a carrier.

[상기 화장품조성물은 유효성분인 3,3'-디인돌릴메탄 (3,3'-diindolylmethane, DIM) 및 인돌-3-카르비놀 (indole-3-carbinol) 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

]

]

[0034]

[The above cosmetic composition may be prepared in any formulation commonly manufactured in the art, for example, as a solution, suspension, emulsion, paste, gel, cream, lotion, powder, oil, powder foundation, emulsion foundation, wax foundation, and spray, but is not limited thereto.

[상기 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

More specifically, it can be manufactured in the form of sun cream, softening lotion, astringent lotion, nourishing lotion, nourishing cream, massage cream, essence, eye cream, pack, spray, or powder.

보다 상세하게는, 썸 크림, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

]

]

[0035]

[In the case where the above formulation is a paste, cream, or gel, animal oil, vegetable oil, wax, paraffin, starch, tracanth, cellulose derivative, polyethylene glycol, silicone, bentonite, silica, talc, or zinc oxide may be used as a carrier component.

[상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

]

]

[0036]

[In the case where the above formulation is a powder or a spray, lactose, talc, silica, aluminum hydroxide, calcium silicate, or polyamide powder may be used as a carrier

component, and in particular in the case of a spray, it may additionally include a propellant such as chlorofluorohydrocarbon, propane/butane, or dimethyl ether.

[상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

]

]

[0037]

[When the above formulation is a solution or emulsion, a solvent, a solubilizing agent, or an emulsifying agent is used as a carrier component, such as water, ethanol, isopropanol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, benzyl benzoate, propylene glycol, 1,3-butyl glycol oil, glycerol aliphatic ester, polyethylene glycol, or fatty acid ester of sorbitan.]

[상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

]

]

[0038]

[In the case where the above formulation is a suspension, liquid diluents such as water, ethanol, or propylene glycol, ethoxylated isostearyl alcohol, polyoxyethylene sorbitol ester, and polyoxyethylene sorbitan ester, microcrystalline cellulose, aluminum metahydroxide, bentonite, agar, or tracanthenic acid may be used as carrier components.]

[상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

]

]

[0040]

[Hereafter, to aid in understanding the present invention, it will be described in detail with reference to examples.]

[이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

However, the following examples are merely illustrative of the content of the present invention, and the scope of the present invention is not limited to the following examples.

다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

The embodiments of the present invention are provided to more fully explain the invention to those with average knowledge in the art.

본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

]

]

[0042]

[<Experimental Example>]

[<실험예>]

[0043]

[The following experimental examples are intended to provide experimental examples that are commonly applied to each embodiment according to the present invention.]

[하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

]

]

[0045]

[U[attributes={}]; value=[1.

[U[attributes={}]; value=[1.

Strains, Compounds, and Culture Conditions

균주, 화합물 및 배양 조건]]]

[0046]

[For acne bacteria, *Cutibacterium acnes* strain KCCM 41747 (ATCC 6919) Gram-positive bacteria (isolated from human facial acne) was used, for *Staphylococcus aureus*, a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain was used, and for *Candida albicans*, a fluconazole-resistant *Candida albicans* strain DAY 185 was used.

[여드름균으로는 큐티박테리움 아크네스 (*Cutibacterium acnes*) 균주 KCCM 41747 (ATCC 6919) 그람양성균 (isolated from human facial acne), 황색포도상구균으로는 메티실린 감수성 황색포도상구균주 (*Staphylococcus aureus*), 칸디다 알비칸즈로는 프루코나졸 내성(fluconazole-resistance) 칸디다 알비칸즈 (*Candida albicans*) 균주 DAY 185를 이용하였다.

For the culture of acne strains, a solid medium with agar added to Reinforced Clostridium Media (RCM) and a liquid medium without agar were used, and experiments were conducted at 37°C under anaerobic conditions.

여드름 균주 배양을 위한 배지로 Reinforced Clostridium Media (RCM)에 agar를 첨가한 고체 배지와 agar 첨가 없는 액체 배지를 사용하였고 37°C, 혐기성 조건에서 실험을 수행하였다.

For anaerobic conditions, BD GasPak™ EZ Gas Generating Anaerobic Pouch Systems (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) pouches were used.

혐기성 조건을 위해서 BD GasPak™ EZ Gas Generating Anaerobic Pouch Systems (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) 파우치를 이용하였다.

Staphylococcus aureus strains were cultured in LB (Lysogeny broth) medium at 37°C, and Candida albicans strains were cultured in PDB (potato dextrose broth) medium at 37°C.

황색포도상구균 균주는 37°C의 LB(Lysogeny broth) 배지에서 배양하였고, 칸디다 알비칸스 균주는 37°C의 PDB(potato dextrose broth) 배지에서 배양하였다.

]

]

[0047]

[A total of 20 indoles are 7-azaindole, 7-benzyloxyindole, 3,3-diindolylmethane (DIM), 7-formylindole, 7-hydroxyindole, indole, indole-3-acetamide, indole-3-acetic acid, indole-3-acetonitrile, indole-3-butyric acid, indole-3-carbinol, indole-3-carboxyaldehyde, indole-7-carboxylic acid, indole-3-propionic acid, isatin, 7-methoxyindole, 7-methylindole, methyl indole-7-carboxylate, 7-nitroindole and 2-oxindole were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Wako Chemicals Inc.

[전체 20개의 인돌은 7-azaindole, 7-benzyloxyindole, 3,3-diindolylmethane (DIM), 7-formylindole, 7-hydroxyindole, indole, indole-3-acetamide, indole-3-acetic acid, indole-3-acetonitrile, indole-3-butyric acid, indole-3-carbinol, indole-3-carboxyaldehyde, indole-7-carboxylic acid, indole-3-propionic acid, isatin, 7-methoxyindole, 7-methylindole, methyl indole-7-carboxylate, 7-nitroindole 및 2-oxindole을 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA), Wako Chemicals Inc.

(Richmond, VA, USA) or Combi-Blocks, Inc.

(Richmond, VA, USA) 또는 Combi-Blocks, Inc.

I purchased and used it in San Diego, CA, USA.

(San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

]

]

[0048]

Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as the solvent to dissolve all indole derivatives, and DMSO (0.1% v/v) was used as the negative control.

[모든 인돌 유도체들을 용해하기 위한 용매로 디메틸설폭사이드 (DMSO)를 사용하였으며, DMSO (0.1% v/v)를 음성대조군으로 사용하였다.

0.1% The DMSO below did not show any effect on bacterial growth or biofilm formation.

0.1% 이하의 DMSO는 박테리아 성장 또는 생물막 형성에 영향이 나타내지 않았다.

]

]

[0050]

[U[attributes={}; value=[2.

[U[attributes={}; value=[2.

Measurement of plankton cell growth and verification of minimum inhibitory concentration (MIC)

플랑크톤 세포 성장 측정 및 최소성장억제농도(MIC) 확인]]]

[0051]

[To confirm the effect of indole on the plankton growth of acne bacteria, cell culture medium cultured in a 96-well plate for 6 days was diluted 1:50 in fresh RCM medium and re-inoculated, and each concentration of indole derivatives was treated.

[여드름균의 플랑크톤 성장에 있어서 인돌의 효과를 확인하기 위해, 96-웰 플레이트(96-well plate)에 6일간 배양된 세포배양액을 1:50으로 신선한 RCM 배지에 희석하여 재접종하고 각각의 농도의 인돌 유도체들을 처리하였다.

The plates were cultured at 37°C under anaerobic conditions, and an anaerobic state was maintained using an anaerobic pouch.

플레이트를 37°C, 혐기성 조건으로 배양하였으며, 혐기성 파우치를 이용하여 혐기 상태를 유지시켰다.

After 96 hours of culture, cell turbidity was checked at 600 nm using a spectrophotometer (Optizen 2120UV spectrophotometer).

96시간 배양 후 분광광도계(Optizen 2120UV spectrophotometer)를 이용하여 600 nm에서 세포 혼탁도를 확인하였다.

]

]

[0053]

[U[attributes={}]; value=[3.

[U[attributes={}]; value=[3.

Biofilm Formation Inhibition Analysis

생물막 형성 억제 분석]]]

[0054]

[Crystal violet analysis was performed to quantify biofilm formation.

[크리스탈 바이올렛 분석을 수행하여 생물막 형성을 정량하였다.

Briefly, acne bacteria cultured for 96 hours were diluted 1:50 in sterile RCM medium and cultured for 6 days at 37°C under anaerobic conditions with or without indole.

간략하게, 96시간 배양된 여드름균을 멸균된 RCM 배지로 1:50으로 희석하고, 인돌이 존재하거나 존재하지 않는 조건으로 37°C, 혐기성 조건하에서 6일 동안 배양하였다.

]

]

[0055]

[To quantify the biofilm, the plates were washed three times with distilled water to discard the plankton cells, and only the biofilm cells attached to the wells were stained with 0.1% crystal violet for 20 minutes.

[생물막을 정량은 플레이트를 증류수로 세 번 세척하여 플랑크톤 세포를 폐기하고 웰에 부착된 생물막 세포만을 0.1% 크리스탈 바이올렛으로 20분간 염색하였다.

Afterwards, the plate was washed three times with sterile distilled water, and crystal violet was extracted using 95% ethanol. The absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer (Multiskan EX microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)).

그 후, 플레이트를 멸균 증류수로 3회 세척하고 95% 에탄올을 이용하여 크리스탈 바이올렛을 추출하여 분광광도계(Multiskan EX microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA))를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

The result was presented as the average value of at least 12 repeated wells.

최소 12개의 반복 웰의 평균값으로 결과를 나타내었다.

]

]

[0056]

[The percentage of inhibition rate represents relative biofilm formation (100 x biofilm formation with chemical/biofilm formation of untreated control).

[억제율의 백분율은 상대적인 생물막 형성을 나타낸다 (100 x biofilm formation with chemical/biofilm formation of untreated control).

In addition, the antibacterial and biofilm efficacy of benzoyl peroxide, gentamycin, ciprofloxacin, and 3,3-diindolylmethane, which are antibiotics well known as acne treatments, were compared.

또한 여드름 치료제로 잘 알려진 항생제인 benzoyl peroxide, gentamycin, ciprofloxacin과 3,3-diindolylmethane의 항균 및 항생물막 효능을 비교하였다.

]

]

[0058]

[U[attributes={}]; value=[4.

[U[attributes={}]; value=[4.

Analysis of Multi-species Biofilm Formation by Acne Bacteria, Staphylococcus aureus, and
Candida albicans

여드름균, 황색포도상구균 및 칸디다 알비칸즈의 다종 생물막 형성 분석]]]

[0059]

[To generate biofilms of Acne Bacteria, Staphylococcus aureus, and Candida albicans, Acne Bacteria ($59 \pm 4 \times 10$, Sup[attributes={}; value=[7]], CFU), Staphylococcus aureus cells ($59 \pm 4 \times 10$, Sup[attributes={}; value=[7]], CFU), and Candida albicans cells ($23 \pm 3 \times 10$, Sup[attributes={}; value=[5]], CFU) were simultaneously inoculated and cultured in mixed RCM/LB /PDB medium (1:1:1).

[여드름균, 황색포도상구균 및 칸디다 알비칸스의 다종 생물막을 생성하기 위해, 여드름균 ($59 \pm 4 \times 10$, Sup[attributes={}; value=[7]], CFU), 황색포도상구균 세포 ($59 \pm 4 \times 10$, Sup[attributes={}; value=[7]], CFU), 칸디다 알비칸스 세포 ($23 \pm 3 \times 10$, Sup[attributes={}; value=[5]], CFU)를 혼합 RCM/LB /PDB 배지 (1:1:1)에 동시에 접종하고 배양하였다.

Biofilm formation was analyzed under anaerobic conditions at 37°C for 6 days using an anaerobic pouch.

혐기성 파우치를 사용하여 37°C에서 6일 동안 혐기성 조건하에서 바이오필름 형성을 분석하였다.

To form two types of biofilms, Acne bacteria and Staphylococcus aureus or Acne bacteria and Candida albicans were inoculated into RCM/LB (1:1) or RCM/PDB (1:1) medium in 96-well plates and cultured at 37°C for 6 days under anaerobic conditions.

종 생물막 형성을 위해, 여드름균과 황색포도상구균 또는 여드름균과 칸디다 알비칸스를 96-웰 플레이트의 RCM/LB (1:1) 또는 RCM/PDB 배지 (1:1)에 접종하고 혐기성 조건에서 37°C에서 6일 동안 배양하였다.

]

]

[0061]

[U[attributes={}]; value=[5.

[U[attributes={}]; value=[5.

Live imaging microscopy, confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM) observations

실시간 영상 현미경 (live imaging microscopy), 공초점 레이저 주사현미경 (CLSM) 및 주사전자현미경 (SEM) 관찰]]

[0062]

[To quantify the biofilm of Acne Bacteria or the mixed biofilm of Acne Bacteria /Staphylococcus aureus/Candida albicans in the presence or absence of 3,3-diindolylmethane, anaerobic pouches were used and cultured under anaerobic conditions at 37°C for 6 days.

[3,3-diindolylmethane의 존재 유무에 따른 여드름균의 생물막 또는 여드름균/황색포도상구균/칸디다 알비칸즈의 혼합 생물막을 정량화하기 위해, 혐기성 파우치를 사용하여 혐기성 조건 하에서 37°C에서 6일 동안 배양하였다.

Afterwards, plankton cells were removed by washing three times with PBS, and the biofilm was observed in real time at various magnifications using an optical microscope iRiS, SuperView, Digital Cell Imaging System.

그 후, PBS로 3회 세척하여 플랑크톤 세포를 제거하고 광학현미경 iRiS, SuperView, Digital Cell Imaging System을 사용하여 다양한 배율에서 실시간 생물막을 확인하였다.

The biofilm images were reconstructed into 2D and 3D figures using ImageJ.

생물막 이미지는 ImageJ를 사용하여 2D 및 3D 그림으로 재구성되었다.

]

]

[0063]

[Acne bacteria biofilms or mixed acne bacteria/Staphylococcus aureus or acne bacteria /Staphylococcus aureus/Candida albicans biofilms were cultured for 6 days in 96-well polystyrene plates with 3,3-diindolylmethane added at various concentrations under anaerobic conditions without stirring.

[여드름균 생물막 또는 혼합 여드름균/황색포도상구균 또는 여드름균/황색포도상구균/칸디다 알비칸스의 생물막은 6일 동안 혐기성 조건에서 교반없이 96-웰 폴리스티렌 플레이트에서 3,3-diindolylmethane를 농도 별로 첨가하여 배양하였다.

Afterwards, the plankton cells were washed three times with water and discarded, and stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.

그 후, 플랑크톤 세포를 물로 3회 세척하여 버리고 카복시플루오레신 다이아세테이트 석신이미딜 에스터 (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)로 염색하였다.

Biofilm cells on the plate were visualized using a 488 nm Ar laser (emission wavelength 500–550 nm) with a confocal laser scanning microscope (Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japan).

플레이트 위의 생물막 세포는 공초점 레이저 주사현미경(Confocal Laser Scanning Microscope, Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japan)을 사용하여 488 nm Ar 레이저 (방출 파장 500~550 nm)로 시각화했다.

COMSTAT software was used to determine biofilm volume (μm , Sup[attributes={}; value=[3]], $/\mu\text{m}$, Sup[attributes={}; value=[2]],), average biofilm thickness (μM), and substrate range (%).

COMSTAT 소프트웨어는 생물막 부피 (μm , Sup[attributes={}; value=[3]], $/\mu\text{m}$, Sup[attributes={}; value=[2]],), 평균 생물막 두께 (μM) 및 기질 범위 (%)를 결정하는데 사용되었다.

For each experimental sample, two independent bacterial cultures were used, and more than 10 random points were analyzed.

각각의 실험 샘플에 대해 2개의 독립적인 배양 세균을 사용하고 10개 이상의 무작위 지점을 분석했다.

]

]

[0064]

Various types of biofilms on nylon membranes were observed using a scanning electron microscope (SEM).

[주사 전자 현미경 (SEM)으로 나일론 멤브레인에서의 다종 생물막을 관찰하였다.

Briefly, single or mixed species were treated in a 96-well plate with or without 3,3-diindolylmethane, and a nylon membrane (0.4 x 0.4 mm square) was added to each well.

간략하게, 단일 또는 혼합 종을 96-웰 플레이트에 3,3-diindolylmethane이 존재하거나 존재하지 않는 조건으로 처리하고, 각 웰에 나일론 멤브레인(0.4 x 0.4 mm 정사각형)을 첨가하였다.

]

]

[0065]

[A biofilm was grown on a nylon membrane by co-culturing for 6 days without stirring under anaerobic conditions at 37°C.

[37°C, 혐기성 조건하에서 교반 없이 6일 동안 함께 배양하여 나일론 멤브레인 위에 생물막을 성장시켰다.

Afterwards, biofilm cells attached to a nylon membrane were fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% formaldehyde for 20 hours, sequentially fixed with osmium tetroxide, dehydrated with an ethanol series (50, 70, 80, 90, 95, and 100%) for 30 minutes each, and with isoamyl acetate for 20 hours.

그 후, 나일론 멤브레인에 부착된 생물막 세포를 2.5% 글루타알데하이드 및 2% 포르말알데하이드로 20시간 동안 고정시키고, 사산화오스뮴으로 연속적으로 고정시키고, 에탄올 시리즈(50, 70, 80, 90, 95 및 100%)로 각각 30분, 아세트산 이소아밀(isoamyl acetate)을 이용하여 20시간 탈수시켰다.

]

]

[0066]

[After critical point drying, cells on a filter were coated with palladium/gold, and the cells were observed and imaged using a voltage of 15 kV under an S-4800 scanning electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

[임계점 건조 후, 필터상 세포를 팔라듐/금으로 코팅하고, S-4800 scanning electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan)하에서 15 kV의 전압을 이용하여 세포를 관찰하고 이미지화하였다.

]

]

[0068]

[U[attributes={}]; value=[6.

[U[attributes={}]; value=[6.

Analysis of Extracellular Polymeric Substance (EPS) Production

세포외기질 생산 (extracellular polymeric substance, EPS) 분석]]]

[0069]

[To quantify EPS, 50 ml of control and indole-treated acne bacteria were cultured at 37°C for 6 days.

[EPS 정량을 위해, 50 ml의 대조군 및 인돌이 처리된 여드름균을 37°C에서 6일 동안 배양하였다.

After incubation, the culture was centrifuged at $8,228 \times g$ for 10 minutes, and the supernatant was separated.

배양 후 배양물을 $8,228 \times g$ 로 10분간 원심분리하고 상층액을 분리하였다.

]

]

[0070]

The culture supernatant was removed by washing the precipitated cells with sterile PBS.

[침전세포를 멸균된 PBS로 세척하여 배양 상층액을 제거하였다.

50 ml of isotonic buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 2.5% NaCl) was added to the cell pellet, and the mixed bacteria were left overnight at 4°C.

등장성 완충액 (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 2.5% NaCl) 50 ml를 세포 펠렛에 첨가하고, 혼합한 세균을 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다.

Afterwards, the cell suspension was mixed for 5 minutes and centrifuged at $8,228 \times g$ for 10 minutes.

이후, 세포 현탁액을 5분간 믹싱하고 $8,228 \times g$ 에서 10분간 원심분리하였다.

The supernatant containing EPS that was bound to the cells was separated from the cells.

세포에 결합되어 있던 EPS가 포함된 상층액을 세포로부터 분리하였다.

Cold ethanol was added to the supernatant in a ratio of 1:3 and left to stand overnight at -20°C .

차가운 에탄올을 1:3의 비율로 상기 상층액에 첨가하고 -20°C 에서 하룻밤 동안 정치시켰다.

4

After collecting the EPS precipitated by centrifuging at $18,514 \times g$ for 30 minutes at 4°C , the precipitate was washed with 70% ethanol, dried, and weighed.

℃에서 $18,514 \times g$ 로 30분간 원심분리하여 침전된 EPS를 수집한 후, 침전물을 70% 에탄올로 세척하여 건조시키고 무게를 측정하였다.

The percentage of EPS production inhibition by indole was calculated by expressing the weight of the treated EPS as a percentage of the weight of the control group.

인돌에 의한 EPS 생성 억제 백분율은 처리된 EPS 중량을 대조군 중량의 백분율로 표현하여 계산하였다.

]

[0072]

[U[attributes={}; value=[7.

[U[attributes={}]; value=7.

Analysis of Hyphal Formation and Cell Aggregation for *Candida albicans*

칸디다 알비칸즈에 대한 균사 형성 및 세포 응집 분석]]]

[0073]

A real-time video microscope system was used to observe the growth of the filamentous body and hyphae formation.

[사상체의 성장과 균사 형성을 관찰하기 위해, 실시간 영상 현미경 시스템을 사용하였다.

Briefly, *Candida albicans* cells were diluted 1:50 in 1 ml of PDB medium containing various concentrations of indole, indole-3-carbinol, or 3,3-diindolylmethane, revoculated, and then cultured at 37°C for 24 hours without stirring.

간략하게, 칸디다 알비칸즈 세포를 다양한 농도의 인돌, indole-3-carbinol 또는 3,3-diindolylmethane을 함유하는 1 ml의 PDB 배지에 1:50으로 희석하고 재접종한 후, 교반 없이 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.

Afterwards, cells were visualized using the iRiS, Sup[attributes={}; value=[TM]], Digital Cell Imaging System according to the manufacturer's instructions.

그 후, 제조업체의 설명에 따라 iRiS, Sup[attributes={}; value=[TM]], Digital Cell Imaging System을 사용하여 세포를 시각화하였다.

At least four cultures were used, and for cell aggregation analysis, Candida albicans cultures incubated overnight in 1 ml of mycelial-promoting medium (RPMI-1640, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA) supplemented with 10% bovine serum were diluted 1:50.

이때 최소한 4개의 배양물이 사용되었으며, 세포 응집 분석을 위해 칸디다 알비칸즈는 10% 소 혈청이 보충된 1 ml의 군사 촉진 배지 (RPMI-1640, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA)에 밤새 배양한 배양물을 1:50으로 희석하였다.

]

]

[0074]

[For cell aggregation evaluation, *Candida albicans* cells were inoculated into a 1.7 ml tube containing 1 ml of mycelial-promoting medium (RPMI-1640, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA) supplemented with 10% bovine serum (GE Healthcare Bio-Sciences) for 20 hours, diluted 1:50, and cultured at 37°C for 24 hours without stirring.

[세포 응집 평가를 위해 칸디다 알비칸스 세포를 1.7 ml 튜브에 10% 소 혈청 (GE Healthcare Bio-Sciences)이 보충된 1 ml의 군사 촉진 배지 (RPMI-1640, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA)에 20시간 배양하여 1:50으로 희석하여 접종하고 37°C에서 24시간 동안 교반하지 않고 배양하였다.

After culture, cells were visualized at 4× and 10× magnifications using iRiS, Sup[attributes= {}; value=[TM]], Digital Cell Imaging, and at least 5 independent experiments were performed.

배양 후, 세포는 4× 및 10× 배율에서 iRIS, Sup[attributes={}; value=[TM]], Digital Cell Imaging을 사용하여 시각화되었고, 최소 5번의 독립적인 실험이 수행되었다.

]

]

[0076]

[U[attributes={}; value=[8.

[U[attributes={}; value=[8.

Quantitative Real-Time Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) for Gene Expression Studies

유전자발현 연구를 위한 정량적 실시간 역전사 PCR (qRT-PCR)]]]

[0077]

[For gene expression analysis, 15 ml of acne bacteria with an initial turbidity of 0.05 at OD600 ($23 \pm 3 \times 10$, Sup[attributes={}; value=[5]], CFU) was inoculated into a 15 ml tube of RCM liquid medium and cultured for 3 days at 37°C without stirring under anaerobic conditions.

[유전자 발현 분석을 위해 OD600 ($23 \pm 3 \times 10$, Sup[attributes={}; value=[5]], CFU)에서 초기 탁도가 0.05인 여드름균 15 ml를 15 ml 튜브의 RCM 액체 배지에 접종하고 혐기성 조건에서 교반 없이 37°C에서 3 일 동안 배양하였다.

After culture, the cells were cultured for an additional 24 hours at 37°C without stirring under conditions with or without 3,3-diindolylmethane (0.1 mM).

배양 후, 세포를 교반 없이 37°C에서 추가 24시간 동안 3,3-diindolylmethane (0.1mM)의 존재하거나 존재하지 않는 조건으로 배양하였다.

To prevent RNA degradation, RNAlater (RNase inhibitor, Ambion, TX, USA) was used before harvesting the cells.

RNA 분해를 방지하기 위해 RNAlater (RNase inhibitor, Ambion, TX, USA)를 세포를 수확하기 전에 사용하였다.

Total RNA was extracted and washed using the Qiagen RNeasy mini Kit (Valencia, CA, USA).

Qiagen RNeasy mini Kit (Valencia, CA, USA)를 사용하여 전체 RNA를 추출하고 세척하였다.

]

]

[0078]

[qRT-PCR was used to determine the expression of biofilm and toxicity-related genes, namely PPA1761, PPA1796, PPA2105, PPA380, hly, PPA0149, btuR, cbiL, roxP, tly, and PPA0349. 16S rRNA expression was not affected by 3,3-diindolylmethane.]

[qRT-PCR을 사용하여 생물막 및 독성 관련 유전자, 즉 PPA1761, PPA1796, PPA2105, PPA380, hly, PPA0149, btuR, cbiL, roxP, tly 및 PPA0349의 발현을 결정하였다. 16s rRNA의 발현은 3,3-diindolylmethane에 의해 영향을 받지 않았다.

It was performed using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the ABI StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

SYBR Green 마스터 믹스 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)을 사용하여 수행되었다.

At least two independent cultures and four PCR reactions were used.

최소 2개의 독립적인 배양물 및 4개의 PCR 반응이 사용되었다.

]

]

[0080]

[U[attributes={}; value=[9.

[U[attributes={}; value=[9.

Statistical Analysis

통계 분석]]]

[0081]

[The number of copies for each experiment is provided for each method, and results are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

[각 실험에 대한 복제 수는 각 방법에 제공되며, 결과는 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시되었다.

After one-way ANOVA, Dunnett's test using an SPSS version was performed for statistical analysis.

일원 분산 분석 후 SPSS 버전을 사용한 Dunnett의 검정을 통계 분석을 위해 수행하였다.

A P value of < 0.05 was considered significant.

< 0.05 의 P 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

In the figure, the * indicates a significant change between the treated and untreated samples.

그림에서 *표는 처리된 샘플과 처리되지 않은 샘플 간의 상당한 변화를 나타낸다.

]

]

[0083]

[B[attributes={}; value=[<Example 1> Confirmation of antibacterial and biofilm activity of
indole against acne bacteria]]]

[B[attributes={}; value=[<실시예 1> 여드름균에 대한 인돌의 항균성 및 항생물막 활성 확인]]]

[0084]

[To evaluate the antimicrobial biofilm properties against acne bacteria, 20 indoles at a concentration of 0.1 mM were screened in a 96-well plate as shown in Fig. 1.

[여드름균에 대한 항생물막 특성을 평가하기 위해 0.1 mM 농도의 20개의 인돌을 96-웰 플레이트에 도 1과 같이 스크리닝하였다.

]

]

[0085]

[As a result, among the indole derivatives tested as shown in Figure 2A, 7-azaindole, 7-benzyloxyindole, 3,3'-diindolylmethane (DIM), and indole-3-carbinol at a concentration of 0.1

mM significantly inhibited biofilm formation by acne bacteria, whereas indole and other indole derivatives were less effective.

[그 결과, 도 2A와 같이 테스트한 인돌 유도체들 중에서 0.1 mM 농도의 7-azaindole, 7-benzyloxyindole, 3,3'-diindolylmethane (DIM) 및 indole-3-carbinol은 여드름균에 의한 생물막 형성을 유의하게 억제한 반면, 인돌 및 기타 인돌은 덜 효과적이었다.

]

]

[0086]

[The antimicrobial concentrations of 20 indole analogs against acne bacteria were investigated using minimum inhibitory concentration (MIC) analysis.

[최소성장저해농도(MIC) 분석을 사용하여 여드름균에 대한 20개의 인돌유사체들의 항균 농도를 조사하였다.

As a result, as shown in Figure 1, the MIC of most indole analogs was >5 mM, whereas the MICs of indole-3-carbinol, 3,3'-diindolylmethane, 7-methylindole, and 7-nitroindole were >5 mM, 0.1 mM, 1.0 mM, and 2 mM, respectively, after 6 days of culture.

그 결과, 도 1과 같이 대부분 인돌유사체들의 MIC는 >5 mM인 반면, indole-3-carbinol, 3,3'-diindolylmethane, 7-methylindole, 및 7-nitroindole의 MIC는 배양 6일 후 각각 >5 mM, 0.1 mM, 1.0 mM 및 2 mM이었다.

]

]

[0087]

[In addition, referring to the plankton growth curve in Figure 2, it was confirmed that indole

up to 0.1 mM did not inhibit cell growth, 3,3'-diindolylmethane at 0.1 mM completely inhibited cell growth, and indole-3-carbinol at 0.1 mM partially inhibited cell growth.

[또한, 도 2의 플랑크톤 성장 곡선을 참고하면, 0.1 mM까지의 인돌은 세포 성장을 억제하지 않고, 0.1 mM에서의 3,3'-diindolylmethane은 세포 성장을 완전히 억제하며, 0.1 mM에서의 indole-3-carbinol은 부분적으로 세포 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

]

]

[0088]

[From the above results, it was confirmed that the formation of acne bacteria biofilms was partially inhibited due to the antibacterial activity of 3,3'-diindolylmethane and indole-3-carbinol.

[상기 결과로부터 3,3'-diindolylmethane 및 indole-3-carbinol의 항균활성으로 인해 부분적으로 여드름
균의 생물막 형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

]

]

[0090]

[B[attributes={}; value=[<Example 2> Confirmation of Inhibitory Effect of Indole-3-carbinol,
3,3'-diindolylmethane, and Antibiotics on Acne Bacteria Biofilms]]]

[B[attributes={}; value=[<실시예 2> Indole-3-carbinol, 3,3'-diindolylmethane 및 항생제의 여드름
균 생물막 억제 효과 확인]]]

[0091]

[From the previously confirmed biofilm experiment results, it was confirmed that indole, indole-3-carbinol, and 3,3'-diindolylmethane inhibit the formation of acne bacteria biofilms in a concentration-dependent manner.

[앞서 확인된 생물막 실험 결과로부터 인돌, Indole-3-carbinol 및 3,3'-diindolylmethane이 농도 의존적으로 여드름균의 생물막 형성이 억제되는 것이 확인되었다.

]

]

[0092]

[More specifically, as shown in Fig. 2E, 1 mM (117 µg/ml) of indole significantly inhibited the formation of acne bacteria biofilms, and the above results are the first report that indole has antimicrobial film activity against acne bacteria.

[보다 상세하게, 도 2E와 같이 1 mM (117 µg/ml)의 인돌은 여드름균 생물막 형성을 유의하게 억제하였으며, 상기 결과는 Indole이 여드름균에 대한 항균막 활성을 갖는다는 첫 번째 보고이다.

However, as shown in Figure 2F, 0.1 mM (32 µg/ml) of 3,3'-diindolylmethane almost inhibited biofilm formation, whereas Indole-3-carbinol inhibited acne bacteria biofilm formation in a concentration-dependent manner as shown in Figure 2G, but at a lower level than 3,3'-diindolylmethane.

그러나 도 2F와 같이 0.1 mM (32 µg/ml)의 3,3'-diindolylmethane은 생물막 형성을 거의 억제한 반면, Indole-3-carbinol은 도 2G와 같이 농도 의존적으로 여드름균 생물막 형성을 억제하였지만 3,3'-diindolylmethane 보다 낮았다.

]

]

[0093]

[Meanwhile, the antimicrobial biofilm activity of 3,3'-diindolylmethane was compared with three antibiotics commonly used as acne treatments: benzoyl peroxide, gentamycin, and ciprofloxacin.

[한편, 3,3'-diindolylmethane의 항생물막 활성은 일반적인 여드름 치료제로 사용되는 항생제인 benzoyl peroxide, gentamycin 및 ciprofloxacin의 3가지 항생제와 비교하였다.

Referring to Figure 3, the formation of a biofilm by acne bacteria was inhibited in a concentration-dependent manner.

도 3을 참고하면, 여드름균의 생물막 형성을 농도 의존적으로 억제되었다.

Benzoyl peroxide, commonly used for acne treatment, showed a lower inhibitory effect on the formation of acne bacteria biofilms than 3,3'-diindolylmethane, whereas gentamycin and the broad-spectrum antibiotic ciprofloxacin were more effective in inhibiting the cell growth and biofilm formation of acne bacteria.

여드름 치료에 흔히 사용되는 benzoyl peroxide은 3,3'-diindolylmethane 보다 낮은 여드름 세균의 생물막 형성 억제 효과를 나타낸 반면, gentamycin과 광범위한 항생제 ciprofloxacin은 여드름균의 세포 성장과 바이오 필름 형성을 억제하는데 더 효과적이었다.

For example, as shown in Figures 3A to 3C, 200 µg/ml of benzoyl peroxide inhibited biofilm formation by 60% with an MIC of 400 µg/ml. 20 µg/ml of gentamycin inhibited biofilm formation by 98% with an MIC of 100 µg/ml, and 1 µg/ml of ciprofloxacin inhibited biofilm formation by 94% with an MIC of 5 µg/ml.

예를 들어, 도 3A 내지 도 3C와 같이 200 µg/ml의 benzoyl peroxide는 MIC가 400 µg/ml로 생물막 형성을 60% 억제했다. 20 µg/ml의 gentamycin은 MIC 100 µg/ml에서 생물막 형성을 98% 억제하고, 1 µg/ml의 ciprofloxacin은 MIC 5 µg/ml에서 생물막 형성을 94% 억제하였다.

]

]

[0095]

[B[attributes={}; value=[<Example 3> Confirmation of the effect of a combination of 3,3'-diindolylmethane and antibiotics on the antimicrobial biofilm effect against acne bacteria]]]

[B[attributes={}; value=[<실시예 3> 여드름균에 대한 3,3'-diindolylmethane과 항생제의 조합이 항생물막 효과에 미치는 영향 확인]]]

[0096]

[The effect of a combination of 3,3'-diindolylmethane and antibiotics on the antimicrobial biofilm effect against acne bacteria was confirmed.

[여드름균에 대한 3,3'-diindolylmethane과 항생제의 조합이 항생물막 효과에 미치는 영향을 확인하였다.

As a result, when 3,3'-diindolylmethane and antibiotics were used in combination, antimicrobial biofilm activity was enhanced.

그 결과, 3,3'-diindolylmethane과 항생제를 병용하였을 때 항생물막 활성이 향상되었다.

More specifically, as shown in Figure 3E, 5 µg/ml of Gentamycin reduced biofilm formation by 53%, whereas Gentamycin (0.5 µg/ml) and 3,3'-diindolylmethane (0.05 mM) reduced biofilm formation by 93%.

보다 상세하게, 도 3E와 같이 5 µg/ml의 Gentamycin은 생물막 형성을 53% 감소시킨 반면, Gentamycin (0.5 µg/ml) 및 3,3'-diindolylmethane (0.05 mM)은 생물막 형성을 93% 감소시켰다.

In addition, as shown in Figure 3F, 0.5 µg/ml of ciprofloxacin reduced biofilm formation by

37%, whereas treatment with ciprofloxacin (0.5 µg/ml) and 3,3'-diindolylmethane (0.05 mM) reduced biofilm formation by 84%.

또한, 도 3F와 같이 0.5 µg/ml의 ciprofloxacin은 생물막 형성을 37% 감소시킨 반면, ciprofloxacin (0.5 µg/ml) 및 3,3'-diindolylmethane (0.05 mM) 처리는 생물막 형성을 84% 감소시켰다.

However, as shown in Fig. 3D, 3,3'-diindolylmethane did not improve the efficacy of benzoyl peroxide.

그러나 도 3D와 같이 3,3'-diindolylmethane은 benzoyl peroxide 효능을 향상시키지 못하였다.

]

]

[0098]

[B[attributes={}; value=[<Example 4> Confirmation of the antimicrobial biofilm activity of 3,3'-diindolylmethane against biofilm formation by Candida albicans and Staphylococcus aureus]]]

[B[attributes={}; value=[<실시예 4> 칸디다 알비칸즈 및 황색포도상구균의 생물막 형성에 대한 3,3'-diindolylmethane의 항생물막 활성 확인]]]

[0099]

Acne bacteria often form biofilms on the skin along with other microorganisms such as Staphylococcus aureus or Candida albicans, and these biofilms tend to be more resistant to antimicrobial agents.

[여드름균은 종종 황색포도상구균 또는 칸디다 알비칸즈와 같은 다른 미생물과 함께 피부에 생물막을 형성하며, 이러한 생물막들은 항균제에 더 내성이 있는 경향이 있다.]

Therefore, the inhibitory effect of 3,3'-diindolylmethane on *Staphylococcus aureus* or *Candida albicans* biofilms under aerobic and anaerobic conditions was investigated.

따라서 호기성 및 혐기성 조건에서 황색포도상구균 또는 칸디다 알비칸스 생물막에 대한 3,3'-diindolylmethane의 억제 효과를 조사하였다.

]

]

[0100]

[As a result, as shown in Figures 4A and 4B, biofilm formation by *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* was dose-dependently inhibited by 3,3'-diindolylmethane after culturing for 1 day under aerobic conditions.

[그 결과, 도 4A 및 도 4B와 같이 칸디다 알비칸스 및 황색포도상구균에 의한 생물막 형성은 호기성 조건에서 1일 동안 배양한 후 3,3'-diindolylmethane에 의해 용량 의존적으로 억제되었다.

More specifically, 0.1 mM of 3,3'-diindolylmethane inhibited *Candida albicans* biofilm formation by 94% and *Staphylococcus aureus* biofilm formation by 71% under aerobic conditions.

보다 상세하게, 0.1 mM의 3,3'-diindolylmethane은 호기성 조건에서 칸디다 알비칸스 생물막 형성을 94% 억제하였고, 황색포도상구균 생물막 형성을 71% 억제하였다.

In addition, 3,3'-diindolylmethane significantly inhibited biofilm formation by *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* after incubation for 6 days under anaerobic conditions.

또한, 3,3'-diindolylmethane은 혐기성 조건에서 6일 동안 배양한 후 칸디다 알비칸스 및 황색포도상구균에 의한 생물막 형성을 유의하게 억제하였다.

]

]

[0101]

[As the minimum inhibitory concentration (MIC) of 3,3'-diindolylmethane against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* was found to be >1 mM, it can be suggested that the antimicrobial activity of 3,3'-diindolylmethane partially influenced the antibiole activity.

[칸디다 알비칸스 및 황색포도상구균에 대한 3,3'-diindolylmethane의 최소성장억제농도(MIC)는 각각 >1 mM로 확인됨에 따라, 3,3'-diindolylmethane의 항균 활성이 항생물막 활성화에 부분적으로 영향을 미쳤을 것으로 제안될 수 있다.

]

]

[0103]

[B[attributes={}; value=[<Example 5> Confirmation of Inhibition of Acne Bacteria Biofilm by 3,3'-Diindolylmethane via Microscopic Observation]]]

[B[attributes={}; value=[<실시에 5> 현미경 관찰을 통한 3,3'-diindolylmethane에 의한 여드름균의 생물막 억제 확인]]]

[0104]

Biofilm inhibition was analyzed using a live cell imaging system, CSLM, and SEM.

[생물막 억제는 live cell imaging system과 CSLM 및 SEM을 사용하여 분석하였다.]

Referring to Figure 5A, the 3-D color mesh plot confirmed that 3,3'-diindolylmethane inhibits biofilm formation by acne bacteria at 0.02 or 0.05 mM.

도 5A를 참고하면, 3-D 컬러 메쉬 플롯은 0.02 또는 0.05 mM에서 3,3'-diindolylmethane이 여드름균에 의한 생물막 형성을 억제하는 것이 확인되었다.

]

]

[0105]

[In addition, as shown in Figures 5B and 5C, CLSM and COMSTAT analyses showed biofilm changes better.

[또한, 도 5B 및 도 5C와 같이 CLSM 및 COMSTAT 분석은 생물막 변화를 더 잘 나타내었다.

In addition, untreated acne bacteria formed a high-density biofilm (thickness of 40 μm or more and surface coverage of nearly 100%), while acne bacteria treated with 0.02 or 0.05 mM of 3,3'-diindolylmethane significantly reduced biofilm density and thickness.

또한, 처리되지 않은 여드름균은 고밀도 생물막(두께가 40 μm 이상이고 표면 커버리지가 거의 100%)을 형성했으며, 0.02 또는 0.05 mM의 3,3'-diindolylmethane을 처리한 여드름균은 생물막 밀도와 두께를 크게 감소시켰다.

More specifically, biofilm biomass, thickness, and surface coverage were reduced by >88%, 87%, and 95%, respectively, with 0.05 mM of 3,3'-diindolylmethane compared to the untreated control.

보다 상세하게, 생물막 바이오매스, 두께 및 표면 커버리지는 0.05 mM의 3,3'-diindolylmethane가 처리되지 않은 대조군에 비해 각각 >88, 87 및 95% 감소시켰다.

]

]

[0106]

[In addition, through 5D SEM analysis, it was confirmed that 3,3'-diindolylmethane reduces the production of EPS in biofilms and reduces the cell density and biofilm formation of acne bacteria.

[또한, 5D의 SEM 분석을 통하여 3,3'-diindolylmethane이 생물막에서 EPS의 생성을 감소시키고, 여드름균의 세포 밀도 및 생물막 형성을 감소시키는 것이 확인되었다.

Interestingly, 3,3'-diindolylmethane treatment increased cell length, indicating inhibition of cell division.

흥미롭게도 3,3'-diindolylmethane 처리는 세포 길이를 증가시켜 세포 분열의 억제를 나타내었다.

More specifically, the cell size of acne bacteria increased by 240% ($3.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$) and 252%

($3.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$), respectively, in the presence of 0.02 or 0.05 mM of 3,3'-diindolylmethane compared to the untreated control group ($1.25 \pm 0.4 \mu\text{m}$).

보다 상세하게, 여드름균의 세포 크기는 처리되지 않은 대조군 ($1.25 \pm 0.4 \mu\text{m}$)과 비교하여 0.02 또는 0.05 mM의 3,3'-diindolylmethane 존재 하에 각각 240% ($3.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$) 및 252% ($3.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$) 증가되었다.

]

]

[0108]

[B[attributes={}; value=[<Example 6> Antimicrobial biofilm activity of 3,3'-diindolylmethane against various biofilms of Acne Bacteria, Candida albicans, and Staphylococcus aureus]]]

[B[attributes={}; value=[<실시에 6> 여드름균, 칸디다 알비칸스 및 황색포도상구균의 다종 생물막에 대한 3,3'-diindolylmethane의 항생물막 활성]]]

[0109]

[3,3'-diindolylmethane effectively inhibited biofilm formation by acne bacteria, Candida albicans, and Staphylococcus aureus, and thus confirmed the antimicrobial biofilm effect of 3,3'-diindolylmethane against multibacterial biofilms including 2 to 3 types.

[3,3'-diindolylmethane이 여드름균, 칸디다 알비칸스 및 황색포도상구균에 의한 생물막 형성을 효과적으로 억제함에 따라, 2~3종을 포함하는 다균 생물막에 대한 3,3'-diindolylmethane의 항생물막 효과를 확인하였다.

]

]

[0110]

Acne bacteria and Staphylococcus aureus in a 1:1 mixture of RCM and LB, acne bacteria and Candida albicans in a 1:1 mixture of RCM and PDB, and acne bacteria, Staphylococcus aureus and Candida albicans in a 1:1:1 mixture of RCM, LB, and PDB were used; two of the above 2-type mixtures and one of the above 3-type mixtures were inoculated into the culture medium, and the effect of 3,3'-diindolylmethane on the formation of the biofilm was confirmed.

[RCM과 LB의 1:1 혼합에서 여드름균과 황색포도상구균, RCM과 PDB의 1:1 혼합에서 여드름균과 칸디다 알비칸스, RCM, LB 그리고 PDB의 1:1:1 혼합에서 여드름균과 황색포도상구균 그리고 칸디다 알비칸스를 사용하였으며, 상기 2종의 혼합 2개와 3종의 혼합 1개에서 배지에 접종하였으며, 3,3'-diindolylmethane이 상기 생물막 형성에 미치는 영향을 확인하였다.

]

]

[0111]

[As a result, as shown in Figures 6A to 6C, 3,3'-diindolylmethane inhibited biofilm formation in a concentration-dependent manner in all cases.

[그 결과, 도 6A 내지 도 6C와 같이 3,3'-diindolylmethane은 모든 경우에 농도 의존적으로 생물막 형성을 억제하였다.

In particular, as shown in Fig. 6C, 0.05 mM of 3,3'-diindolylmethane inhibited biofilm formation by 69% after culturing for 6 days under anaerobic conditions.

특히, 도 6C와 같이 혐기성 조건에서 6일 동안 배양한 후의 0.05 mM의 3,3'-diindolylmethane에서는 생물막 형성을 69% 억제하였다.

The above results are the first report on three types of biofilms: acne bacteria, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus*.

상기 결과는 여드름균, 칸디다 알비칸스 및 황색포도상구균의 3종 생물막에 대한 첫 번째 보고이다.

]

]

[0112]

In addition, various types of biofilms were observed using a live cell imaging system, CLSM, and SEM.

[또한, Live cell imaging system과 CLSM 및 SEM을 사용하여 다종 생물막이 관찰하였다.

As a result, it was found that 3,3'-diindolylmethane inhibited three types of biofilms in all three methods.

그 결과, 세 가지 방식에서 모두 3,3'-diindolylmethane이 3종의 생물막을 억제하는 것으로 나타났다.

More specifically, as shown in Figures 6D to 6F, the untreated group formed a biofilm with a thickness of about 19 μm with nearly 100% surface coverage, but 3,3'-diindolylmethane at concentrations of 0.02 or 0.05 mM reduced the biofilm density and thickness in a concentration-dependent manner.

보다 상세하게, 도 6D 내지 도 6F와 같이 비치리균에서는 거의 100% 표면 커버리지로 두께 약 19 μm 의 바이오 필름을 형성했지만, 0.02 또는 0.05 mM 농도의 3,3'-diindolylmethane은 농도 의존적으로 생물막 밀도와 두께를 감소시켰다.

On the other hand, as shown in Fig. 6F, the three types of biofilms were less dense and thinner than a single acne bacteria biofilm.

반면, 도 6F와 같이 3종의 생물막은 단일 여드름균 생물막보다 밀도가 낮고 얇았다.

In addition, as shown in Fig. 5B, SEM visualized the presence of acne bacteria, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus* in the mixed biofilm.

또한, 도 5B와 같이 SEM은 혼합 생물막에서 여드름균, 칸디다 알비칸즈 및 황색포도상구균의 존재를 시각화 하였다.

On the other hand, in the control group that was not treated as in Fig. 6G, *Candida albicans* formed pseudohyphae and yeast cells that were much larger than the round cells of *Staphylococcus aureus* or the rod cells of *Acne Bacteria*.

반면, 도 6G와 같이 처리하지 않은 대조군에서는 칸디다 알비칸즈는 황색포도상구균의 원형 세포 또는 여드름균의 막대형 세포보다 훨씬 큰 pseudohyphae와 yeast 세포를 형성하였다.

Meanwhile, treatment with 0.02 mM of 3,3'-diindolylmethane prevented adhesion of most *Candida albicans* cells, and acne bacteria cells were rarely observed among *Staphylococcus aureus* cells.

한편, 0.02 mM의 3,3'-diindolylmethane 처리는 대부분의 칸디다 알비칸즈 세포들의 유착을 막았으며, 황색포도상구균세포 중 여드름균 세포는 거의 관찰되지 않았다.

In particular, 0.05 mM DIM significantly reduced EPS production in three types of biofilms,

leaving only a few Staphylococcus aureus cells, while Candida albicans cells and Acne bacteria cells were not left.

특히 0.05 mM의 DIM은 3종의 생물막에서 EPS의 생산을 유의하게 감소시켰고, 황색포도상구균 세포는 몇 개만 남아있는 반면 칸디다 알비칸스 세포 및 여드름균 세포는 남아있지 않았다.

]

]

[0114]

[B[attributes={}; value=[<Example 7> Confirmation of the effect of 3,3'-diindolylmethane on reducing extracellular matrix (EPS) production in acne bacteria biofilms]]]

[B[attributes={}; value=[<실시에 7> 3,3'-diindolylmethane의 여드름균 생물막에서 세포외기질(EPS) 생산 감소 효과 확인]]]

[0115]

Extracellular matrix (EPS) production is a key feature of biofilm formation and helps protect cells from external environmental issues.

[세포외기질(EPS) 생산은 생물막 형성의 주요 특징으로, 외부의 환경 문제로부터 세포를 보호하도록 돕는다.

Extracellular matrix production by acne bacteria was measured in the presence of indole, 3,3'-diindolylmethane and indole-3-carbinol.

여드름균에 의한 세포외기질 생산은 인돌, 3,3'-diindolylmethane 및 indole-3-carbinol의 존재 하에서 측정되었다.

]

]

[0116]

[Referring to Figures 7A to 7C, indole at a maximum concentration of 2 mM did not affect EPS production, but 3,3'-diindolylmethane and indole-3-carbinol reduced the extracellular matrix production of acne bacteria in a dose-dependent manner, and 0.05 mM of 3,3'-diindolylmethane reduced the extracellular matrix production of acne bacteria by up to 90%.

[도 7A 내지 도 7C를 참고하면, 최대 2 mM 농도의 인돌은 EPS 생산에 영향을 미치지 않았지만, 3,3'-diindolylmethane 과 indole-3-carbinol은 여드름균의 세포외기질 생산을 용량 의존적으로 감소시켰고, 0.05 mM의 3,3'-diindolylmethane은 여드름균의 세포외기질 생산을 90%까지 감소시켰다.

]

]

[0117]

[From the above results, it was confirmed that the antimicrobial biofilm activity of 3,3'-diindolylmethane is partly due to the inhibition of extracellular matrix production.

[상기 결과로부터 3,3'-diindolylmethane의 항생물막 활성은 부분적으로 세포외기질 생산을 억제시킴에 의해 기인함을 확인할 수 있었다.

]

]

[0119]

[B[attributes={}; value=[<Example 8> Confirmation of inhibition of mycelial growth and cell aggregation of Candida albicans with 3,3'-diindolylmethane and indole-3-carbinol]]]

[B[attributes={}; value=[<실시예 8> 3,3'-diindolylmethane과 indole-3-carbinol 칸디다 알비칸즈의 균사 성장 및 세포의 응집 억제 확인]]]

[0120]

[Since the heteromorphic transformation of yeast cells into hyphal cells and cell aggregation are prerequisites for the development of Candida albicans biofilms, microscopy and cell aggregation analysis were performed to study the effect of indole on the morphology of Candida albicans.

[효모 세포의 균사 세포로의 이형 전환 및 세포 응집은 칸디다 알비칸즈 생물막 발달의 전제 조건임이 따라, 인돌의 칸디다 알비칸즈 형태에 대한 영향을 연구하기 위해 현미경과 세포 응집 분석을 수행하였다.

]

]

[0121]

[As a result, in untreated *Candida albicans*, large cell aggregates entangled by hyphae and hyphae were observed after 24 hours.

[그 결과, 처리되지 않은 칸디다 알비칸스에서는 24시간 후에 균사 및 균사에 의해 얽혀 있는 큰 세포 응집체가 관찰되었다.

More specifically, as shown in Fig. 8A, treatment with 0.1 mM of 3,3'-diindolylmethane or indole-3-carbinol inhibited hyphae formation, and yeast and pseudohyphae cells were mostly observed.

보다 상세하게, 도 8A와 같이 0.1 mM의 3,3'-diindolylmethane 또는 indole-3-carbinol 처리한 것에서는 모두 균사 형성을 억제하였으며, 효모와 가성균사 세포가 대부분 관찰되었다.

In addition, as shown in Fig. 8B, indole at a maximum concentration of 0.2 mM did not affect this heterotransformation, but 0.05 mM of 3,3'-diindolylmethane clearly inhibited hyphae formation and cell aggregation.

또한, 도 8B와 같이 최대 0.2 mM 농도의 인돌은 이 이형 전환에 영향을 미치지 않았지만, 0.05 mM의 3,3'-diindolylmethane은 균사 형성과 세포 응집이 분명하게 억제되었다.

]

]

[0122]

[From the above results, it was confirmed that 3,3'-diindolylmethane strongly inhibits the formation of 3,3'-diindolylmethane biofilms by inhibiting hyphae formation and cell aggregation.

[상기 결과로부터 3,3'-diindolylmethane이 균사 형성 및 세포 응집을 억제함으로써 3,3'-diindolylmethane 생물막 형성을 강력하게 억제하는 것이 확인되었다.

]

]

[0124]

[B[attributes={}; value=[<Example 9> Changes in gene expression induced by 3,3'-diindolylmethane in acne bacteria]]]

[B[attributes={}; value=[<실시예 9> 여드름균에서의 3,3'-diindolylmethane에 의한 유전자 발현의 변화]]]

[0125]

[qRT-PCR was performed to confirm the effect of 3,3'-diindolylmethane on the expression of 11 biofilm and toxicity-related genes in acne bacteria.

[qRT-PCR을 수행하여 여드름균에서의 11개의 생물막 및 독성 관련 유전자의 발현에 대한 3,3'-diindolylmethane의 영향을 확인하였다.

Overall, 3,3'-diindolylmethane regulated the expression of several lipase genes, hyaluronate lyase genes, and toxicity-related genes, whereas no change in the expression of housekeeping genes (16s rRNA) was observed as shown in Figure 9.

전반적으로 3,3'-diindolylmethane은 여러 lipase 유전자, hyaluronate lyase 유전자 및 독성 관련 유전자의 발현을 조절한 반면, 도 9와 같이 housekeeping 유전자 (16s rRNA)의 발현 변화는 확인되지 않았다.

In particular, the expression of lipase genes (PPA1796 and PPA2105), hyaluronate lyase (hly), and precorrin-2 C(20)-methyltransferase (cbiL) genes was reduced, while the expression of hemolysin (tly) was tripled by 0.1 mM of 3,3'-diindolylmethane.

특히 lipase genes (PPA1796 및 PPA2105), hyaluronate lyase (hly) 및 precorrin-2 C(20)-methyltransferase (cbiL) 유전자의 발현은 저하된 반면, hemolysin (tly)의 발현은 0.1 mM의 3,3'-diindolylmethane에 의해 3배 상승되었다.

]

]

[0127]

[The specific parts of the present invention have been described in detail above. It will be apparent to those skilled in the art that such specific descriptions are merely preferred embodiments and do not limit the scope of the present invention.]

[이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다.

Accordingly, the substantial scope of the present invention will be defined by the appended claims and their equivalents.

따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

]

]