(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 5 월 6 일 (06.05.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/068527 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/702 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/010913

(22) 국제출원일: 2015 년 10 월 15 일 (15.10.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0148881 2014 년 10 월 30 일 (30.10.2014) KR

(71) 출원인: **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: **박희등 (PARK, Hee-Deung)**; 463-869 경기도 성남시 분당구 정자일로 27 1406 호(금곡동, 코오롱더프라우아파트), Gyeonggi-do (KR). **김한신 (KIM, Han-Shin)**; 445-721 경기도 화성시 효행로 846, 106 동 1004 호 (안녕동, 동문굿모닝힐아파트), Gyeonggi-do (KR). **변영주 (BYUN, Young Joo)**; 305-761 대전시 유성구 엑스포로 448, 308-501 (전민동, 엑스포아파트), Daejeon (KR).

(74) 대리인: **정은열 (JUNG, Eun youl)**; 135-893 서울시 강남구 논현로 154 길 16 삼륭빌딩 5 층 (정앤김 특허법률사무소), 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, 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, KN, KP, 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 역내 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 제 21 조(3))

WO 2016/068527 A1

(54) **Title**: BIOFILM FORMATION-SUPPRESSING COMPOSITION COMPRISING RAFFINOSE AS ACTIVE INGREDIENT AND METHOD FOR SUPPRESSING BIOFILM FORMATION USING THE COMPOSITION

(54) **발명의 명칭** : 라피노스를 유효성분으로 포함하는 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 바이오필름 형성 억제 방법

(57) **Abstract**: The present invention relates to a biofilm formation-suppressing composition comprising Raffinose as an active ingredient and a method for suppressing biofilm formation using the composition. According to the present invention, provided are a biofilm formation-suppressing composition which can effectively suppress the formation of a corresponding biofilm on a variety of membrane surfaces on which biofilm forms, and a method for suppressing biofilm formation by means of the composition.

(57) **요약서**: 본 발명은 라피노스를 유효성분으로 포함하는 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 바이오필름 형성 억제 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 바이오필름이 형성되는 다양한 막 표면에서 해당 바이오필름의 형성을 효과적으로 억제할 수 있는 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 바이오필름 형성 억제 방법을 제공할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 라피노스를 유효성분으로 포함하는 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 바이오필름 형성 억제 방법

기술분야

[1] 본 발명은 라피노스를 유효성분으로 포함하는 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 바이오필름 형성 억제 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 미생물의 바이오필름은 환경 내에 적응하기 위한 그들만의 생활양식이다. 미생물에 의하여 형성된 바이오필름은 다양한 표면에 강하게 부착되어 있어 제거하기가 힘들고, 부유생활을 할 때에 비하여, 가혹한 환경 (pH, 온도, 영양분의 고갈 등)과 항생제들의 공격 등에 대하여 훨씬 강한 저항력을 가지기 때문에 멸균, 소독이 힘들다. 또한, 미생물은 이러한 생물막의 형성 결과로 다양한 이득을 얻을 수 있기 때문에, 대부분의 자연 및 산업 환경에서 생물막 형태로 존재하게 된다. 생물막을 형성하는 미생물들은 EPS (extracellular polymeric substance; Carbohydrate, Protein, and Nucleic acid)라 불리는 개개의 미생물이 외부로 분비한 고분자 물질로 덮여 표면에 고착되어 존재한다. 따라서, 바이오필름은 세균, 효모, 곰팡이 등 미생물이 특정조건에서 인체 (피부, 구강, 치아 등)나 설비 (배관, 저장탱크 등) 등의 표면에 필름처럼 부착되어 있는 미생물의 집합체라 할 수 있으며, 그 자체가 미생물의 서식처로도 제공되어 균의 서식을 가속화하기도 한다. 이러한 바이오필름의 미생물은 산업계 및 의학계 전반에서 심각한 문제를 일으킬 수 있으므로, 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 바이오필름 형성을 억제하는 방법 등에 대한 연구가 요구되는 상황이다.

[3] 한편, 라피노스 (Raffinose)는 D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose 각 1분자로 이루어진 비환원성 3당류의 일종으로서, 유카리의 만나 (Eucalyptus), 사탕무의 당밀, 목화 열매 등 다양한 천연물질에 존재하는 물질로 알파-갈락토시다아제 (alpha-galactosidase)에 의하여 수크로오스와 D-Galactose로 분해된다.

[4] 대부분의 박테리아들은 두 가지 다른 상태로 생존할 수 있는 바, 이는 플랑크톤성 (planktonic) 및 고착성 (sessile) 상태이다. 바이오필름이라 함은, 자가-생산된 세포외 폴리머 물질 (extracellular polymeric substances, EPS) 중에 캡슐화된 단일 또는 다중 종들의 집합이며, 특히, 박테리아 감염은 종종 바이오필름과 연관된다. 예를 들어, 수도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas* aeruginosa)에 감염된 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis) 환자들은 폐에 바이오필름이 형성되어 점진적 호흡기 기능 상실 현상을 보인다. 또한, 바이오필름은 의료기기, 컨택트 렌즈 및 인공 이식물의 오작동을 야기하며, 이는 궁극적으로 치명적인 의료적 문제점들로 이어진다. 더 나아가, 산업적 환경에서 바이오필름이 형성될 경우 (예를 들어, 선박 선체, 수 파이프, 및 막 필터 등),

성능이 상실되며, 유지 및 품질 관리에 비용 증가를 초래한다. 그럼에도 불구하고, 생물 및 무생물 표면에 형성된 바이오필름들은 제거하기가 매우 어려운 것으로 알려진 바, 이는 주로 바이오필름 세포들이 항미생물제 또는 살생물제에 대해서 민감하지 않기 때문이다. 바이오필름 세포들은 플랑크톤성 세포들에 비해서 항미생물에 대한 내성이 10 - 1,000배 더 큰 것으로 알려져 있다.

[5] 바이오필름을 억제하기 위한 전통적인 살균성 또는 정균성 접근 방법들과는 대조적으로, 최근에는 박테리아의 성장에는 영향을 주지 않으면서 바이오필름 형성을 방해하는 쪽에 그 초점을 맞춘 연구들이 보고되고 있다 (비특허문헌 1). 예를 들어, 정족수 인식 (quorum sensing, QS)이라 불리우는 박테리아 세포-세포 소통은 화학적 신호 분자들에 의해서 매개되며, 이러한 정족수 인식은 바이오필름 성숙과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 발견을 바이오필름 성숙화를 파괴하는 전략을 개발하는데 사용할 수 있는 바, 정족수 인식 신호 분자들과 구조적으로 유사한 분자들 (예를 들어, 푸라노오스 (furanone), 아지쓰로마이신 (azithromycin), 및 4-니트로-피리딘-N-옥사이드) 또는 정족수 인식 분자들을 분해하는 효소들 (예를 들어, 아실라아제 및 락토나아제)을 사용할 수 있고, 일부 분자들은 바이오필름 형성 과정에서 세포 분산성을 강화시키는 것으로 보고된 바 있다. 또한, EPS 분해 특성을 나타내는 효소 분산제 B가 이러한 목적으로 적용된 바도 있으며 (비특허문헌 2), 일산화질소 및 불포화 지방산인 시스-2-데세노익산 (cis-2-decenoic acid)도 바이오필름 분산을 유도하는 것으로 보고된 바 있다 (비특허문헌 1).

[6] 한편, 다양한 천연 물질들도 바이오필름 형성을 조절하는데 효과적인 것으로 알려져 있으며, 바이오필름 억제에 천연 물질을 사용할 경우, 합성 화합물들에 비해서 독성이 낮고 특이성이 높다는 장점이 있다 (비특허문헌 3). 구체적으로, 콩나물, 카모마일, 당근, 프로폴리스, 황색 고추, 수련, 하바네로 (harbanero), 마늘, 동남아 나무 열매 (*Lagerstroemia* speciosa), 콩, 남플로리다로부터의 의약 식물 (예를 들어, *Conocarpus* erectus), 그레이프프루트, 6-진저롤 (gingerol) 등이 항-QS 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 (비특허문헌 4-8), 몇몇 (예를 들어, 마늘 추출물 및 생강 추출물 내 6-진저롤)은 항바이오필름 효능을 갖는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들 역시 생강 추출물이, 세포성 사이클릭 다이구아닐레이트 (cdi-GMP)를 감소시킴으로써 *P.* aeruginosa 를 포함하는 다양한 박테리아에 대해서 바이오필름 형성을 감소시키는 능력이 있다는 점을 보고한 바 있으나 (비특허문헌 9), 이러한 발견과 관련된 구체적인 활성 화합물(들)에 대해서는 밝힌 바가 없다.

[7] 이에, 본 발명자들은 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 바이오필름 형성을 억제하는 방법 등에 효과적인 물질에 대해 연구하던 중, 다양한 천연물질에 존재하는 라피노스의 생물막 저해효과 및 메커니즘에 대하여 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 이에, 본 발명에서는 갈락토트리사카라이드인 라피노스가 탄수화물 결합 단백질에 결합하고 c-di-GMP를 조절함으로써 미생물의 바이오필름 형성을 억제하는 효과가 있음을 최초로 밝혀내었으며, 이를 기반으로 라피노스를 유효성분으로 포함하는 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 의료 및 기타 산업 분야에서 바이오필름 형성을 억제하기 위한 방법을 제시하고자 한다.

과제 해결 수단

[9] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서, 라피노스를 유효성분으로 포함하는, 바이오필름 형성 억제용 조성물을 제공한다.

[10] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물의 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는데 사용될 수 있다.

[11] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 조성물은 수처리막 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는데 사용될 수 있다.

[12] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 조성물은 식품 및 생활용품의 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는데 사용될 수 있다.

[13] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 대상물의 표면에 코팅 처리하는 단계를 포함하는 바이오필름 형성 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[14] 본 발명에 따르면, 바이오필름이 형성되는 다양한 막 표면에서 해당 바이오필름의 형성을 효과적으로 억제할 수 있는 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 바이오필름 형성 억제 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[15] 도 1은 생강으로부터 바이오필름 형성을 억제하는 화합물들을 스크리닝하는 과정에 있어서,

[16] 도 1a는 본 발명에서 사용된 잠정적 화합물 후보군들이고,

[17] 도 1b는 마이크로적정 플레이트의 웰들 중에서 24 시간 동안 잠정적 화합물 후보군들 및 푸라논 C-30 (양대조군)을 처리하며 *P.* aeruginosa의 바이오필름 형성을 정량화한 그래프로서, 각각의 화합물들의 농도는 10 μM이었으며, 오차 막대는 8회 측정의 표준 편차를 의미한다 (**, 음대조군 대비 $P < 0.0005$).

[18] 도 2a 내지 2d는 *P.* aeruginosa 표현형들에 대한 라피노스의 효과를 나타낸 도면으로서,

[19] 도 2a는 플라스크 중에서 14 시간 동안 다양한 농도들의 라피노스 (0, 1, 10 및 100 μM)와 함께 성장시킨 그래프 (오차 막대는 3회 측정의 표준 편차를 의미한다)를 도시한 것이고,

[20] 도 2b는 유리 슬라이드 상에서 미처리된 *P.* aeruginosa 바이오필름 (좌측), 및 10

μM 라피노스로 처리된 *P.* aeruginosa 바이오필름 (우측)의 CLSM 영상들에 대한 3차원 분석 결과를 도시한 도면으로서, 바이오필름들에 대해서 공초점 레이저 주사 현미경 (CLSM) 영상화를 수행하기 이전에, 핵산 (DAPI; 청색), 탄수화물 (ConA; 녹색), 및 단백질 (Ruby; 적색)에 특이적인 3가지 형광원들을 사용하여 염색한 도면이며, 화살표는 바이오필름 중 중공 구조를 나타낸다.

[21] 도 2c는 콩고 레드 아가 플레이트 상에서 라피노스 미처리된 *P.* aeruginosa (좌측) 및 10 μM 라피노스 처리된 *P.* aeruginosa의 군락 모폴로지를 나타낸 도면이고,

[22] 도 2d는 0.5% BM-2 플레이트 상에서 24 시간 동안 다양한 농도의 라피노스 (0, 1, 10, 100, 및 1,000 μM)와 함께 배양된 무리 운동성 사진 (상단 도면, 축적은 1 cm) 및 무리 운동성에 의해서 야기된 수지들의 길이를 도시한 도면이다 (하단 도면, **, 대조군 대비 $P < 0.0005$).

[23] 도 3a 내지 3c는 *P.* aeruginosa 바이오필름 형성에 대한 라피노스의 효과를 나타낸 것으로서,

[24] 도 3a는 마이크로적정 플레이트 중에서 24 시간 동안 배양한 경우, 다양한 농도 (0, 0.1, 1, 10, 100, 및 1,000 μM)의 라피노스 존재 하에서 바이오필름의 형성 정도를 나타낸 것이고,

[25] 도 3b는 마이크로적정 플레이트 중에서 24 시간 동안 배양한 경우, 다양한 농도 (0, 0.1, 1, 10, 100, 및 1,000 μM)의 수크로오스 존재 하에서 바이오필름의 형성 정도를 나타낸 것이고,

[26] 도 3c는 마이크로적정 플레이트 중에서 24 시간 동안 배양한 경우, 다양한 농도 (0, 0.1, 1, 10, 100, 및 1,000 μM)의 D-(+)-갈락토오스 존재 하에서 바이오필름의 형성 정도를 나타낸 것이다 (오차 막대는 10회 측정의 표준 편차를 의미한다. **, 대조군 대비 $P < 0.0005$; *, 대조군 대비 $P < 0.005$).

[27] 도 4a 및 4b는 EPS 생산에 대한 라피노스의 효과를 나타낸 것으로서,

[28] 도 4a는 다양한 농도의 라피노스 (0, 1, 10, 100, 및 1,000 μM)와 함께 24 시간 동안 배양된 *P.* aeruginosa의 플랑크톤성 및 바이오필름 세포들의 EPS 중 총 탄수화물을 나타낸 것이고,

[29] 도 4b는 다양한 농도의 라피노스 (0, 1, 10, 100, 및 1,000 μM)와 함께 24 시간 동안 배양된 *P.* aeruginosa의 플랑크톤성 및 바이오필름 세포들의 EPS 중 총 단백질을 나타낸 것이다 (오차 막대는 3회 측정의 표준 편차를 의미한다. **, 대조군 대비 $P < 0.005$; *, 대조군 대비 $P < 0.05$).

[30] 도 5a 내지 5d는 라피노스와 *P.* aeruginosa LecA 단백질의 상호작용을 나나타낸 것으로서,

[31] 도 5a는 CPMG NMR 스펙트로스코피에 의해서 라피노스가 LecA에 결합하는 것을 모니터링한 것이고 (첫 번째 줄: LecA 부존재 하에서 라피노스 (0.1 mM)의 NMR 스펙트럼. 두 번째 줄: LecA 존재 (50 μM) 하에서 라피노스 (0.1 mM)의 NMR 스펙트럼. 세 번째 줄: 갈락토오스 첨가 (1 mM) 조건에서 라피노스 (0.1

mM) 및 LecA (50 μM)의 NMR 스펙트럼),

[32] 도 5b는 라피노스 및 LecA의 인 실리코 분석 결과를 나타낸 도면이고 (LecA와 가장 적합하게 도킹된 라피노스의 수소 결합 상호작용 (좌측) 및 LecA의 표면에 존재하는 도킹된 라피노스 (우측)),

[33] 도 5c는 마이크로적정 플레이트 중에서 24 시간 동안 배양한 *ΔlecA* 돌연변이에서 다양한 농도의 라피노스 (0, 1, 10, 및 100 μM)에 따른 바이오필름 형성을 도시한 것이고,

[34] 도 5d는 마이크로적정 플레이트 중에서 24 시간 동안 배양한 *ΔlecA*-pUCP18-LecA에서 다양한 농도의 라피노스 (0, 1, 10, 100 및 1,000 μM)에 따른 바이오필름 형성을 도시한 것이다 (바이오필름 형성 결과는 야생형 - pUCP18를 사용하여 정규화하였으며, 오차 막대는 10회 측정의 표준 편차를 의미한다. **, 대조군 대비 $P < 0.0005$; *, 대조군 대비 $P < 0.005$).

[35] 도 6은 과량의 라피노스를 처리한 경우, CPMG NMR 스펙트로스코피에 의해서 갈락토오스 신호를 모니터링한 도면이다 (첫 번째 줄: LecA 부존재 하에서 갈락토오스 (1 mM)의 NMR 스펙트럼. 두 번째 줄: LecA 존재 (50 μM) 하에서 갈락토오스 (0.1 mM)의 NMR 스펙트럼. 세 번째 줄: 라피노스 첨가 (1 mM) 조건에서 갈락토오스 (0.1 mM) 및 LecA (50 μM)의 NMR 스펙트럼).

[36] 도 7a 내지 7d는 세포성 c-di-GMP 수준에 대한 라피노스의 효과를 나타낸 도면으로서,

[37] 도 7a는 10 μM 라피노스 존재 및 부존재 하에서 24 시간 동안 배양된 *P. aeruginosa* 플랑크톤성 및 바이오필름 세포들에서 세포성 c-di-GMP 수준을 도시한 것이며 (오차 막대는 3회 측정의 표준 편차를 의미한다. **, 대조군 대비 $P < 0.005$; *, 대조군 대비 $P < 0.05$),

[38] 도 7b는 마이크로플레이트의 웰들 중에서 24 시간 동안 다양한 농도의 라피노스 (0, 1, 10, 및 100 μM)와 함께 배양된 *P.* aeruginosa wspF 돌연변이에서 바이오필름 형성을 정량화한 것이고 (오차 막대는 8회 측정의 표준 편차를 의미한다. **, 대조군 대비 $P < 0.00005$; *, 대조군 대비 $P < 0.005$),

[39] 도 7c는 0.5% BM-2 플레이트 상에서 10 μM 라피노스의 존재 (우측) 및 부존재 (좌측) 하에서 24 시간 동안 배양된 *wspF* 돌연변이의 무리 운동성을 나타낸 것이며,

[40] 도 7d는 라피노스 (0, 1, 10, 및 100 μM)와 함께 배양된 *P.* aeruginosa 세포들에 의한 PDE-특이적 기질 비스-pNPP의 분해를 도시한 도면이다 (**, 대조군 대비 $P < 0.000005$; *, 대조군 대비 $P < 0.00005$).

[41] 도 8은 *P.* aeruginosa 바이오필름 분산에 대한 라피노스의 효과를 나타낸 것으로서, 박테리아 세포들은 슬라이드 유리 상에 바이오필름을 형성하였고, 10 μM농도의 라피노스를 2시간 및 4시간 동안 처리하였으며, 방출된 박테리아 세포들을 계수분석하였다 (오차 막대는 3회 측정의 표준 편차를 의미한다. **, 대조군 대비 $P < 0.0005$; *, 대조군 대비 $P < 0.005$).

[42] 도 9a 및 9b는 *P.* aeruginosa lecA 유전자 발현 및 PDE 활성에 대한 라피노스의 효과를 나타낸 도면으로서,

[43] 도 9a는 10 μM 라피노스 존재 및 부존재 하에서 *lecA* 결실 돌연변이 (*ΔlecA*) 및 c-di-GMP 과생산 돌연변이 (*ΔwspF*)에 대한 상대적 *lecA* 유전자 발현을 도시한 것이고,

[44] 도 9b는 *lecA* 결실 돌연변이 (*ΔlecA*)에 대해서 비스-PNPP 분해를 통한 PDE 활성 측정을 도시한 것이다 (오차 막대는 3회 측정의 표준 편차를 의미한다. **, 대조군 대비 $P < 0.0005$; *, 대조군 대비 $P < 0.005$).

[45] 도 10은 다양한 그람 음성, 양성균들의 라피노스 처리에 의한 바이오필름 형성 변화를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[46] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[47] 본 발명 라피노스를 유효성분으로 포함하는 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 바이오필름 형성 억제 방법을 제공한다.

[48] 라피노스 (Raffinose)는 D-Galatose, D-Glucose, D-Fructose 각 1분자로 이루어진 비환원성 3당류의 일종으로서, 화학식은 $C_{18}H_{32}O_{16}$이며, O-α-D-갈락토피라노실-(1,6)-O-α-D-글루코피라노실-(1,2)-β-D-프룩토플라노시드의 구조를 가진다. 라피노스는 유카리의 만나 (Eucalyptus), 사탕무의 당밀, 목화 열매 등 다양한 천연물질에 존재하는 물질로 알파-갈락토시다아제에 의하여 수크로오스와 D-갈락토오스로 분해된다.

[49] 본 발명의 발명자는 다양한 천연물질에 존재하는 라피노스의 바이오필름 형성 저해효과 및 메커니즘에 대하여 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[50] 하기 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 조성물은 미생물의 성장에는 영향을 끼치지 않으며, 바이오필름 형성 저해 효과는 조성물 내 라피노스의 농도에 의존적으로, 약 14-52%의 바이오필름이 저해됨을 확인하였다. 또한, 하기 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이 라피노스는 바이오필름 형성의 주요인자로 작용하는, 세균의 C-di-GMP의 양을 조절하기 때문에 다양한 그람 음성, 양성균에 적용될 수 있음을 확인하였다.

[51] 본 발명에 따른 조성물은 의료 및 기타 산업 분야에서 바이오필름 형성을 억제하기 위한 용도로서 다양하게 사용될 수 있으며, 예를 들어 의료 분야에서는, 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물의 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는데 사용될 수 있다. 구체적으로는, 진찰 및 진단기기, 임상검사기기, 방사선기기, IUD, 기관 튜브, 각종 카테터, 정형외과 기기 등과 같은 수술관련기기, 병원설비 및 응급장비, 비만 및 건강관련기기, 콘택트 렌즈, 스텐트, 밸브, 성형 보형물 등과 같은 다양한 의료 분야에 사용될 수 있다.

[52] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 역삼투막 등과 같은 다양한 수처리막의 표면에

형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는 데에도 사용될 수 있으며, 더 나아가, 다양한 식품 및 세탁기, 가습기, 식기 세척기 등과 같은 다양한 생활용품의 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는데에도 사용될 수 있다.

[53] 한편, 본 발명은 상기 조성물을 대상물의 표면에 코팅 처리하는 단계를 포함하는 바이오필름 형성 억제 방법을 제공한다. 즉, 본 발명에 따른 방법은 전술한 각종 의료기기 등과 수처리막 등의 표면에 상기 조성물을 코팅 처리함으로써 수행될 수 있는데, 이러한 코팅 처리는, 대상물 표면을 조성물 용액에 담지시키거나, 조성물 용액을 대상물 표면에 분무 처리하는 등의 방법에 의해서 수행될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[54] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[55] **실험**

[56] 박테리아 균주 및 화학 물질

[57] *P.* aeruginosa PA14를 모델 바이오필름 형성 균주로서 사용하였다. *P.* aeruginosa의 *wspF* 녹아웃 돌연변이 (Δ*wspF*)를 사용하여 세포성 c-di-GMP를 과생산하는 박테리아에 대해서 라피노스가 효과적인지를 테스트하였다. 생강의 성분들인 6-진저롤 (6-gingerol), 파네솔 (farnesol), L-아스코르브산, 마이리세틴 (myricetin), 및 D-(+)-라피노스 펜타하이드레이트는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 디메틸 설폭사이드 (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) 중에 용해시켰다. 한편, 모델 균주 이외에 다양한 균에 적용될 수 있음을 확인하기 위하여, 그람 음성균으로는 Escherichia coli를 사용하였고, 그람 양성균으로는 Stapylococcus aureus, Rhodococcus qingshengi, Bacillus megaterium, Bacillus amyloliquefaciens를 이용하였다.

[58] 성장 억제 테스트

[59] *P.* aeruginosa를 AB 배지 (300 mM NaCl, 50 mM MgSO4, 0.2% 무비타민 카사미노산 (casamino acids), 10 mM 포타슘 포스페이트, 1 mM L-아르기닌, 및 1% 글루코오스, pH 7.5) 중에서, 라피노스의 농도를 달리해 가면서 (0, 1, 10, 또는 100 μM) 37 ℃, 250 rpm을 유지한 교반 배양기 중에서 14 시간 동안 밤새 배양하였다. 박테리아 성장은 UVmini-1240 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 595 nm에서, 삼중 샘플들에서 매시간 광학 밀도 (OD)를 측정함으로써 평가하였다.

[60] 정적 바이오필름 형성 분석

[61] 테스트 박테리아의 밤새 배양물 (595 nm에서의 OD = 1.5)을 신선한 AB 배지 중에 희석한 다음 (1:20), TPP® 96-웰 폴리스티렌 마이크로적정 플레이트 (Sigma Aldrich)의 웰들에 분획하였다. 교반 없이 24 시간 동안 37 ℃ 웰들 중에서

바이오필름을 형성한 이후에, 현탁된 배양물의 OD를 iMark 마이크로플레이트 흡광 판독기 (BioRad, Richmond, CA, USA)를 사용하여 595 nm에서 측정하였으며, 그 후, 현탁된 배양물을 폐기하였다. 플레이트는 인산 완충용액 (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 및 2 mM KH2PO4, pH2 7.2)으로 세척하여 잔류 현탁된 세포들을 제거하였다. 바이오필름은 1.0% 크리스탈 바이올렛으로 30 분 동안 염색한 다음, 멸균 탈이온수를 사용하여 세척함으로써 잔류 미결합된 염료를 제거하였다. 바이오필름에 결합된 크리스탈 바이올렛은 100% 에탄올로 용리시켰으며, 용리액의 OD를 545 nm에서 측정하였다. 바이오필름은 바이오필름에 결합된 크리스탈 바이올렛의 양으로서 정량하였으며 (545 nm에서 OD), 현탁된 세포들의 양으로 정규화하였다 (595 nm에서 OD).

[62] 드립-플로우 반응기 (drip-flow reactor)를 사용한 바이오필름 형성 분석

[63] *P.* aeruginosa의 1 ml 밤새 배양액 (595 nm에서 OD = 1.5)을 페트리 디쉬 중에서 신선한 19 ml의 AB 배지 (1:20) 중에 희석시켰다. 희석액을 함유하고 있는 페트리 디쉬 내로 유리 슬라이드를 침지시킨 다음, 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하여 유리 슬라이드 상에 바이오필름을 형성시켰다. 바이오필름 세포들로 덮힌 유리 슬라이드를 DFR-110 드립-플로우 바이오필름 반응기 (BioSurface Technologies, Bozeman, MT, USA) 내에 삽입하였다. 라피노스를 함유 (10 μM) 또는 미함유한 신선한 AB 배지를 정량 펌프 (Masterflex C/L tubing pumps, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA)를 사용하여 20 ml.h-1의 속도로 반응기 내로 지속적으로 유입시켰으며, 배양기를 37 ℃에서 24 시간 동안 작동시켰다. 이어서, 유리 슬라이드를 조심스럽게 PBS (pH 7.2)로 세척하였다. 부착된 바이오필름 세포들을 DAPI (Carl Roth), FITC-표지된 ConA (Sigma Aldrich), 및 SYPRO Ruby (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 각각 20 분 동안 연속적으로 염색하였다. 염색된 바이오필름 세포들을 각 염색 단계 이후에 PBS (pH 7.2)로 2회 세척하였다. DAPI, ConA, 및 Ruby 용액들은 각각 DNA, 탄수화물, 및 단백질을 염색하기 위한 것이다. 다음으로, CLSM (Carl Zeiss LSM700, Jena, Germany)을 사용하여 바이오필름 세포들을 관찰하였다. 공초점 영상들을 40 x 대물렌즈 (CApochromat 40x/1.20 W Korr M27, Carl Zeiss)를 사용하여 관찰하였으며, 청색 (DAPI), 녹색 (ConA), 및 적색 (RUBY) 형광 영상들을 Zen 2011 프로그램 (Carl Zeiss)을 사용하여 Z-스택 모드로 동시에 관찰하였다. 형광 필터들에 대한 상세한 방법들은 기존 연구에 서술되어 있다 (Kim H-S & Park H-D (2013) Ginger extract inhibits biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa PA14. *PloS* one 8(9):e76106). 바이오-부피 ($\mu m^3/\mu m^2$), 바이오필름 평균 두께 (μm), 및 조도 계수는 ImageJ 프로그램 중 Comstat2에 의해서 측정하였다 (Heydorn A, *et al.* (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiol-Uk* 146:2395-2407).

[64] pUCP-LecA 발현 플라스미드의 구축

[65] LecA 단백질을 다중카피 플라스미드, pUCP18을 사용하여 이소성으로 (ectopically) 발현시켰다 (Schweizer H (1991) Escherichia-Pseudomonas shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* 97(1):109-112). *lecA* 유전자 영역의 서열은, Pfu 중합효소 (PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하는 PCR에 의해서, 하기 올리고뉴클레오티드들로 증폭시켰다: 5'- ATGGCCGGATCCCGTTGCTGTGCTTTGCTG (BamHI 제한효소 부위는 밑줄 표시) 및 5'- CAGAAGCTTCGGCCACACGGGCAACTTCAC (HindIII 제한효소 부위는 밑줄 표시). 증폭된 540-bp 절편 및 플라스미드 pUCP18은 모두 BamHI 및 HindIII 엔도뉴클레아제로 처리한 다음, 겔 정제하고, T4 리가아제 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 연결하였다. 연결된 플라스미드를 *Escherichia* coli (XL10-Gold Ultracompetent cells, Agilent Technologies) 내로 형질전환시켰다.

[66] pUCP-LecA 발현 플라스미드를 사용한 *P. aeruginosa*의 형질전환

[67] *P.* aeruginosa 야생형 및 *ΔlecA* 돌연변이에 대한 감응세포 (competent cell)의 제조, 및 전기천공법을 사용한 *P.* aeruginosa의 형질전환은 기존 연구에 따라서 수행하였다 (Choi K-H, Kumar A, & Schweizer HP (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent Pseudomonas aeruginosa cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J* Microbiol Meth 64(3):391-397). LB 배지에서 성장시킨 *P. aeruginosa* 야생형 및 *ΔlecA* 세포들의 1.5 mL 밤새 배양물을 실온에서 3분 동안 16,000 x g로 원심분리에 의해서 수거하였다. 세포 펠렛을 1 mL의 300 mM 수크로오스를 사용하여 2회 세척하였으며, 이어서 세포 펠렛을 100 μL의 300 mM 수크로오스 중에 재현탁시켰다. 이어서, 전기천공을 위해서, Qiagen plasmid prep kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)를 사용하여 정제된 플라스미드 DNA (pUCP18 및 pUCP-LecA)를 100 μL의 *P.* aeruginosa 감응세포들과 혼합하였다. 정제된 플라스미드 DNA pUCP18 (빈 벡터)를 야생형 및 *ΔlecA* 돌연변이 감응세포들과 혼합하는 한편, 정제된 pUCP-LecA를 *ΔlecA* 감응세포와 혼합하였다. 혼합물을 0.2 cm 갭의 전기천공 큐벳 (BIO4 RAD, Hercules, CA, USA)으로 옮기고 Gene Pulser XcellTM 전기천공 시스템 (BIO-RAD)을 사용하여 펄스 (25 μF, 200 Ω, 2.5 kV)를 가하였다. 전기천공된 세포들 (100 μL)을 15-ml 코니칼 튜브로 옮기고, 1 mL의 신선한 LB 배지를 첨가한 다음, 혼합물을 250 rpm으로 37 ℃에서 1 시간 동안 교반하였다. 세포들을 100 μg/mL 카르베니실린 (carbenicillin)과 함께 LB 플레이트 상에 도말하고 37 ℃에서 14 시간 동안 배양하였다. 콜로니들을 선별하고 LB 브로쓰 중에서 성장시켰다. 플라스미드 DNA를 분리하고, BamHI 및 HindIII 엔도뉴클라아제로 처리한 다음, 겔 전기영동을 사용하여 분리함으로써 *lecA* 유전자가 플라스미드 내로 삽입된 것을 확인하였다.

[68] 콜로니 모폴로지 분석

[69] *P.* aeruginosa의 밤새 배양물을 라피노스와 함께 (0 또는 10 μM) 신선한

T-브로쓰 배지 (10 g/L 트립톤) 중에 희석시키고, 희석물을 진탕 배양기를 사용하여 37 ℃, 250 rpm으로 14 시간 동안 배양하였다 (595 nm에서 OD = 1.0). 2 μL의 배양물을 Congo-red 플레이트 상에 반점 찍고 (Kim H-S & Park H-D (2013) Ginger extract inhibits biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa PA14. *PloS* one 8(9):e76106), 실온에서 3 내지 7일 동안 배양하였다

[70] EPS 분석

[71] 플랑크톤성 세포들 및 바이오필름 세포들의 EPS를 변형된 음파처리 방법을 사용하여 분석하였다 (Kim H-S & Park H-D (2013) Ginger extract inhibits biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa PA14. *PloS* one 8(9):e76106). 플랑크톤성 세포들은 0 - 1,000 μM의 라피노스와 함께 신선한 AB 배지 (1:20) 중에서 *P.* aeruginosa의 밤새 배양물을 희석시키고, 진탕 교반기 상에서 37 ℃, 250 rpm으로 배양함으로써 제조하였다. 바이오필름 세포들은 붕규산 병을 사용하여 0 - 1,000 μM의 라피노스와 함께 신선한 AB 배지 (1:20) 중에서 *P.* aeruginosa의 밤새 배양물을 희석시키고, 희석물을 진탕 없이 37 ℃에서 24 시간 동안 배양함으로써 제조하였다. 플랑크톤성 배양물 및 바이오필름 배양물 양자 모두로부터의 현탁 세포들에 대한 OD를 스펙트로포토미터를 사용하여 595 nm에서 측정하였다. 바이오필름 세포들을 와류에 의해서 3 mL 0.01 M KCl 중에 재현탁시켰다. 플랑크톤성 배양물 및 바이오필름 배양물을 8,000 x g에서 원심분리하고, 수거된 세포들을 각각 10 mL 및 3 mL 0.01 M KCl 중에 재현탁시켰다. 재현탁된 세포들을 음파처리기 (VCX 750, SONICS, Newtown, CT, USA)를 사용하여 3.5 Hz의 출력 레벨에서 5 초 작동시간 및 5 초 휴지시간으로 4 사이클 동안 교란 (disruption)하였다. 음파처리된 세포들을 4,000 x g에서 원심분리하고, 상등액을 0.22-μm Millex 필터 (Car Roth)를 통하여 여과하였다. 여과된 상등액을 사용하여 단백질 및 탄수화물을 정량하였다. 단백질 분석은 96-웰 마이크로적정 플레이트 중에서 로우리 방법에 의해서 수행하였다: 40 μL 여과물 및 200 μL 로우리 시약 (L3540, Sigma Aldrich)을 마이크로적정 플레이트 중에 혼합하고, 혼합물을 실온에서 10 분 동안 배양한 다음, 혼합물에 20 μL의 Folin-Ciocalteu 시약 (F9252, Sigma Aldrich)을 가하고, 혼합물을 30 분 동안 배양하였다. 단백질 함량은 iMark 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 750 nm에서 OD를 측정함으로써 측정하였다. 탄수화물은 96-웰 마이크로적정 플레이트 중에서 페놀-황산 방법에 의해서 분석하였다: 15 μL 여과물 및 150 μL 황산을 마이크로적정 플레이트 중에 혼합하고, 혼합물을 실온에서 30 분 동안 배양하였다: 30 μL 5% 페놀을 혼합물에 첨가하고, 혼합물을 물 중탕에서 90 ℃로 배양하였다. 혼합물 중 탄수화물 함량은 iMark 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 490 nm에서 OD를 측정함으로써 측정하였다. 단백질 (750 nm에서 OD) 및 탄수화물 (490 nm에서 OD) 함량은 현탁된 세포들 (595 nm에서 OD)로 정규화하였다.

[72] 무리 운동 분석 (Swarming motility assay)

[73] 무리 운동은 기존 방법에 따라서 분석하였다 (Kim H-S & Park H-D (2013)

Ginger extract inhibits biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa PA14. *PloS one* 8(9):e76106.). 라피노스를 함유한 (0 - 1,000 μM) *P.* aeruginosa의 10 μL 밤새 배양물을 BM-2 플레이트 (62 mM 포타슘 포스페이트 [pH 7.0], 2 mM MgSO4, 10 mM FeSO4, 1% 카사미노산, 0.4% 글루코오스, 및 0.5% Bacto 아가) 상에 반점 찍고, 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하였다. 무리 운동의 정도는 수지 (dendrites)의 평균 길이를 측정함으로써 평가하였다.

[74] RT-qPCR 분석

[75] RT-qPCR을 수행하여 *P.* aeruginosa lecA 유전자 발현의 수준을 정량 및 비교하였다. *lecA* 및 하우스키핑 유전자 *proC* 프라이머 세트들을 Primer 3 version 0.4.0 (http://frodo.wi.mit.edu/)을 사용하여 디자인하였다 (하기 표 1 참조). 전장 RNA 추출은, TRI REAGENT (Molecular Research Center, OH, USA)를 사용하여 *P.* aeruginosa 바이오필름 세포들로부터 수행하였다. RT-qPCR은 Bio-Rad CFX-96 실시간 시스템 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 반응 혼합물은 하기 시약들로 구성된다: 10 μL SYBR Premix Ex TaqTM (Takara, Shiga, Japan), 전방 프라이머 및 후방 프라이머 각각 0.8 μL (10 μM), 0.4 μL의 50 X ROXTM Reference Dye I, 2 μL의 추출된 전장 RNA (100 ng/ml), 및 RNase 미함유수, 최종 부피는 20 μL. RNA 추출 및 RT-qPCR 방법에 대한 상세한 프로토콜은 기존의 연구를 참조하였다 (Kim HS, Lee SH, Byun Y, & Park HD (2015) 6-Gingerol reduces Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Scientific reports* 5:8656).

[76] [표1]

프라이머	표적 유전자	서열 (5' → 3')	Tm (℃)	GC %	생성물 크기 (bp)	참고문헌
lecA-F	*lecA*	GGG TTG CAC CCA ATA ATG TC	57.3	50	100	본 발명
lecA-R	*lecA*	CCA ATA TTG ACG CTG AAC G	55.3	45		
proC-F	*proC*	GGC GTA TTT CTT CCT GCT GA	60.4	50	236	종래문헌*
proC-R	*proC*	CCT GCT CCA CTA GTG CTT CG	61.2	60		

[77] *: Savli H, *et al.* (2003) Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of Pseudomonas aeruginosa by real-time quantitative RT-PCR. *J* Med Microbiol 52(Pt 5):403-408.

[78] 바이오필름 분산 분석

[79] *P.* aeruginosa의 밤새 배양물을 신선한 AB 배지 (595 nm에서 OD = 0.05) 중에 희석하였다. 폴리스티렌 페트리 디쉬를 희석액 20 mL로 채웠다. 살균된 유리 슬라이드를 페트리 디쉬 중에 침지시키고, 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하여 유리 슬라이드 상에 바이오필름을 형성하였다. 이어서, 슬라이드를 PBS (pH 7.2)를 사용하여 서서히 린스해주고, 100 μM 라피노스 함유 또는 무함유 AB 배지 20 mL를 함유하는 페트리 디쉬 내로 침지시켰다. 페트리 디쉬를 각각 37 ℃에서 2 시간 및 4 시간 동안 배양하였다. 배양물 100 μL를 PBS (pH 7.2) 중에서 10^{-5}로 연쇄적으로 희석하였다. 군락 형성 단위를 계수하기 위해서, 100 μL의 최종 희석액을 LB 아가 플레이트 상에 도말하고, 37 ℃에서 밤새도록 교반하였다.

[80] 통계적 분석

[81] 측정들 사이의 통계적 차이를 테스트하기 위한 *P*-수치들은 student's *t*test (Excel software, Microsoft, Redmond, WA, USA)에 의해서 추산하였다.

[82] NMR 분석

[83] 모든 스펙트럼은 Bruker Avance 600 MHz 스펙트로미터 (Billerica, MI, USA)를 사용하여 298K에서 측정하였다. 1D 이완-편집된 NMR 실험들은 물 억제를 위해서 여기 조각 (excitation sculpting)을 구비한 CPMG 펄스 서열들을 사용하였다. 사전-획득 지연은 1.2 초였으며, 총 스핀 로크 시간은 400 ms였다. CPMG 실험에 있어서 연속적인 180 펄스들 사이의 스핀 에코에 대한 지연은 2 ms였다. 데이터는 스윕 폭 16 ppm (9,600 Hz) 및 128 스캔으로 수집하였다. 데이터 프로세싱은 Topspin 3.0 (Bruker) 소프트웨어를 사용하여 수행하였으며, 이는 16384 복합체 데이터에 대해서 푸리에 변환 이전에 사인 제곱 윈도우 함수를 갖는다. 샘플들은 10% D20 완충 용액 중에 50 μM 단백질 및 0.1 mM의 라피노스 또는 갈락토오스를 함유하였다. 변위 실험 (displacement experiment)을 위해서, 1 mM의 경쟁물 (라피노스 vs. 갈락토오스)을 각 샘플에 첨가하였다.

[84] 인 실리코 도킹 연구 (*In silico* docking studies)

[85] *리간드 제조 및 최적화:* 라피노스를 *ChemBioDraw* (ver. 11.0.1) 및 *Chem3D* Pro (ver. 11.0.1)를 사용하여 각각 2D 및 3D 구조로 생성하고, .mol 파일 포맷으로 저장하였다. 리간드 제조 및 최적화의 과정은 *SYBYL*-X 2.1.1 (Tripos Inc., St Louis, MI, USA) 중의 *'Sanitize'* 제조 프로토콜에 의해서 수행하였다.

[86] *단백질 제조:* PDB 포맷으로 된 *P.* aeruginosa로부터의 렉틴 PA-IL의 단백질 구조는 RCSB 단백질 데이터 뱅크 (PDB ID: 4AL9)로부터 다운로드하였다. *SYBYL*-X 2.1.1 중의 구조 제조 툴을 사용하여 단백질 제조를 수행하였다. 도킹을 위해서, 단백질-리간드 복합체로부터, 결정성 리간드 멜리비오스 (crystal ligand melibiose), 물 분자, Ca2+ 이온, 및 사슬 F를 제외한 다른 사슬들을 제거하였다. 아미노산 잔기들의 충돌되는 곁사슬들을 교정하였다. 수소 원자들을 디폴트 세팅으로서 *TRIPOS* Force Field 적용 하에 첨가하였다. 최소화 과정은 *POWELL* 방법에 의해서 수행하였고, 초기 최적화 옵션은 디폴트 세팅 *SIMPLEX*로부터 *None*으로 변화시켰으며, 종결 구배 및 최대 반복은 각각 0.5 *kcal/*(mol*Å) 및 1000회로 세팅하였다. 단백질 최소화 이후에, 가공된 LecA 단백질 구조를 *.mol2* 파일 포맷으로 저장하였다.

[87] *도킹 및 스코어링 함수 연구:* 라피노스의 도킹 연구는 *SYBYL*-X 2.1.1 중 *Surflex-Dock* GeomX 모듈에 의해서 수행하였다. 도킹은 *Surflex*-Dock 프로토몰 (protomol)에 의해서 가이드하였다. *Surflex*-Dock에 대한 렉틴 PA-IL의 결합 부위에 대한 정보를 포함하고 있는 프로토몰은 오리지널 결정성 리간드 멜리비오스의 위치 정보에 따라서 정의하였다. 프로토몰의 생성과 관련된 두 가지 인자들은 *Bloat(Å)* 및 쓰레스홀드 (*Threshold*)이며, 각각 0.5 및 0으로 세팅되었다. 각 리간드 당 생성된 포즈 (poses)의 최대 개수 및 최종 포즈들 사이의 최소 RMSD는 각각 20 및 0.05였다. 다른 패러미터들은 모든 구동에서 디폴트 세팅으로 적용하였다.

[88] 세포성 c-di-GMP 농도 분석

[89] 플랑크톤성 세포들 중에서 c-di-GMP의 분석을 위해서, 4.9 mL의 37%

포름알데히드 (Carl Roth)를 라피노스 함유 (10 μM) 및 미함유 하에서 성장된 *P.* aeruginosa의 밤새 배양물 1 리터에 첨가하였다 (595 nm에서의 OD는 1.5). 배양물을 8,000 x g에서 10분 동안 원심분리하고, 수거된 세포들을 0.18% 포름알데히드를 함유하는 40 mL PBS (pH 7.2) 중에 재현탁시켰다. 바이오필름 세포들 중 c-di-GMP의 분석을 위해서, 초기에, *P.* aeruginosa의 밤새 배양물을 신선한 AB 배지 중에 희석시켰다 (1:20). 희석액을 붕규소 병 내에 라피노스 함유 (10 μM) 또는 미함유 상태로 분획하고, 진탕 없이 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하였다. 현탁된 세포들을 따라낸 이후에, 바이오필름 세포들을 PBS (pH 7.2)로 2회 세척하였다. 바이오필름 세포들을 0.18% 포름알데히드를 함유하는 3 mL PBS 중에 와류시킴으로써 재현탁하였다. 플랑크톤성 및 바이오필름 세포들을 8,000 x g에서 10 분 동안 원심분리하고, 수거된 세포들을 5 mL 탈이온수 중에 재현탁시켰다. 재현탁물을 10분 동안 끓이고, 얼음 중에서 10 분 동안 냉각시켰다. 냉각된 재현탁물을 뉴클레오티드 추출을 위해서 100% 에탄올 (9.3 mL)과 혼합하고, 혼합물을 8,000 x g로 10 분 동안 4 ℃에서 원심분리하였다. 세포성 c-di-GMP를 분석하기 위해서, 상등액을 0.22-μm 필터 (Car Roth, Karlsruhe, Germany)를 통해서 여과시켰다. 수거된 세포들을 사용하여 전술한 로우리 방법에 의해서 총 단백질을 분석하였다. 여과된 상등액을 Savant SpeedVac (SC201A, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)을 사용하여 동결건조하고, 동결건조된 세포들을 200 μL 완충용액 A (100 mM KH2PO4, 4 mM 테트라부틸 황산수소 암모늄, pH 5.9) 중에 용해시켰다. 용해된 용액을 0.45-μm 필터 (Car Roth)를 통해서 여과하였다. 여과된 용액 (20 μL)을 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) (Hewlett Packard 1100 Series, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. HPLC는 한국 기초과학 연구원 (서울, 대한민국) 소재의 장비로서, 자외선 검출기 (254 nm), Kinetex C-18 컬럼 (4.6 X 250 mm, 5u, Phenomenex, Torrance, CA, USA), 및 이동상으로서 혼합 완충용액 (75%의 완충용액 A, 및 25%의 순수 메탄올)을 구비한다. C-di-GMP 분리는 하기와 같이 농도구배 HPLC 방법을 사용하여 수행되었다: 0 - 4; 50:50, 5 - 20; 0:100, 및 21 - 30; 50:50 (작동 시간 (분); 완충용액 A 및 메탄올의 비율), 흐름 속도 0.8 mL·min-1.

[90] 인 비트로 PDE 활성 분석

[91] 인 비트로 PDE 활성은 기존 연구에 따라서 분석하였다 (Barraud N, *et al.* (2009) Nitric oxide signaling in Pseudomonas aeruginosa biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J* Bacteriol 191(23):7333-7342). *P.* aeruginosa의 밤새 배양물을 신선한 AB 배지 (1:100) 중에서 희석하고, 다양한 라피노스 농도 (0 - 1,000 μM)로 처리하였으며, 진탕 배양기 중에서 37 ℃, 250 rpm으로 14 시간 동안 배양하였다. 현탁된 배양물을 6,000 x g에서 10 분 동안 4 ℃로 원심분리시키고, 수거된 세포들을 1 ml의 PDE 활성 분석 완충용액 (50 mM NaCl, 50 mM Tris base [pH 8.1], 1 mM

MnCl2, 및 5 mM bis-pNPP) 중에 재현탁시켰다. Bis-pNPP (N3002, Sigma Aldrich)를 c-di-GMP 특이적 PDE의 합성 기질로서 사용하였다. 재현탁된 세포들을 CelLytic Express (C5491, Sigma Aldrich)를 사용하여 용균시켰다. PDE 반응을 위해서, 혼합물을 진탕 배양기 중에서 60 rpm으로 2 시간 동안 37 ℃에서 배양하였다. 이어서, bis-pNPP가 *p*-니트로페놀로 분해되는 것을 분석하기 위해서 iMark 마이크로플레이트 흡광 판독기를 사용하여 410 nm에서 혼합물의 OD를 측정하였다. PDE 활성 (410 nm에서 OD)은 전술한 바와 같이 로우리 방법에 의해서 측정된 총 단백질에 의해서 정규화하였다.

[92] **결과**

[93] 생강 중 바이오필름 억제제의 스크리닝

[94] 생강 추출물에서 자주 검출되는 5가지 후보 성분들 (6-진저롤, 파네솔, L-아스코르브산, 마이리세틴, 및 라피노스, 도 1a 참조)에 대해서 바이오필름 형성을 억제하는 효능을 테스트하였다. 이러한 후보물질들에 의한 바이오필름 생성의 억제 정도는 정적 바이오필름 분석방법을 사용하여 평가하였으며, 이는 96-웰 마이크로적정 플레이트 중 모델 박테리아로서 *P.* aeruginosa PA14를 사용하는 방법에 기반한 것이다. QS 억제를 통해서 바이오필름 생성을 억제하는 것으로 잘 알려진 푸라논 C-30 (Hentzer M, *et al.* (2003) Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors. *The* EMBO journal 22(15):3803-3815)을, 이러한 실험의 양대조군으로 사용하였다. 도 1b는 6-진저롤과 라피노스가 바이오필름 생성을 각각 39% 및 43% 감소시킨 반면에, 파네솔, L-아스코르브산, 및 마이리세틴은 바이오필름 생성을 유의미하게 감소시키지 못했음을 보여준다. 6-진저롤 및 라피노스의 바이오필름 억제 효과는 46% 억제를 나타내는 푸라논 C-30의 그것에 필적하는 것이다. 바이오필름 억제에 대한 6-진저롤의 효과는 기존에 보고된 바 있으며 (Kim HS, Lee SH, Byun Y, & Park HD (2015) 6-Gingerol reduces Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Scientific reports* 5:8656), 본 발명에서는 라피노스가 바이오필름 생성을 억제하는 능력 및 연관된 억제 메커니즘에 대해서 서술하고 있다.

[95] 성장 및 바이오필름 생성에 미치는 라피노스의 효과

[96] *P.* aeruginosa의 성장을 0 - 100 μM 라피노스를 함유하는 배치 배양물에 대해서 측정하였다. 다양한 라피노스 농도들에 대한 성장 곡선은 14 시간 동안의 배양 기간 도중, 유도기 (lag phase), 중식기 (exponential phase) 및 정체기 (stationary phase)에 있어서 유의미하게 다르지 않았다 (도 2a). 이러한 결과들은 *P.* aeruginosa의 성장이 라피노스를 100 μM 첨가할 때까지는 영향을 받지 않는다는 점을 암시한다. 정적 바이오필름 분석은 다양한 농도의 라피노스 (0 - 1,000 μM)를 사용하여 수행되었다. 바이오필름 생성은 라피노스 농도가 증가함에 따라서 점차 감소하였으며 (17 - 58%) (도 3a 내지 3c 참조), 이는 라피노스가 농도 의존적인 방식으로 바이오필름 생성을 억제한다는 것을 의미한다. 라피노스

가수분해 산물 (D-갈락토오스 및 수크로오스)의 바이오필름 억제 능력은 α-갈락토시다아제를 사용하여 더욱 평가하였다. 상기 효소는 미생물, 식물, 및 동물 중에 널리 분포된 것이다. D-갈락토오스 및 수크로오스는 각각 1,000 μM의 농도까지도 통계적으로 ($P > 0.05$) 바이오필름 형성을 감소 또는 증가시키지는 않았다 (도 2a 내지 2c 참조). 또한, 바이오필름 형성에 대한 라피노스의 효과를 흐름 반응기 중에서 테스트하였는 바, 유리 슬라이드 상에 10 μM의 라피노스를 함유하거나 또는 함유하지 않는 성장 배지를 24 시간 동안 지속적으로 적가하였다. 도 2b는 전형적인 바이오필름을 도시한 것이다. 라피노스 처리와 더불어 형성된 바이오필름은 라피노스 처리가 없는 바이오필름에 비해서 상대적으로 얇은 두께 (8.4 μm) 및 작은 부피 (4.8 $\mu m^3/\mu m^2$)를 나타내었다. 비록 라피노스 처리 없이 생성된 바이오필름이 전형적인 *P.* aeruginosa 버섯 모폴로지를 나타내었지만, 10 μM 라피노스 처리와 더불어 생성된 바이오필름은 상대적으로 평평하였다. 흥미롭게도, 10 μM 라피노스 처리와 더불어 생성된 바이오필름은 중공 구조를 나타내었으며 (도 2b의 화살표 참조), 이러한 구조는 라피노스 처리가 없는 바이오필름에서는 나타나지 않았다.

[97] 표현형에 대한 라피노스의 효과

[98] *P.* aeruginosa 군락 모폴로지를 관찰하고, 그 엑소폴리사카라이드 생산에 대한 라피노스의 효과를 평가하기 위해서 콩고-레드 염색 플레이트를 사용하였다. 콩고 레드는 박테리아 바이오필름의 엑소폴리사카라이드 기질에 결합하는 염료이며, *P.* aeruginosa에서 주름진 군락 모폴로지를 형성한다. 도 2c에 도시된 바와 같이, 라피노스 처리가 없는 군락에 대해서는 전형적인 분홍색 주름진 모폴로지가 분명한 반면, 라피노스가 처리된 군락 (10 μM)에 대해서는 분홍색의 평탄한 모폴로지가 관찰되었다. 이는 *P.* aeruginosa에서의 라피노스 처리에 의해서 엑소폴리사카라이드 생산이 감소되었다는 표시이다. 또한, 엑소폴리사카라이드 생산에 대한 라피노스의 효과는 성장 배지 중에서 0 - 1,000 μM의 라피노스와 함께 성장시킨 플랑크톤성 및 바이오필름 세포들 모두로부터의 EPS 중에서 총 탄수화물 함량을 직접적으로 측정함으로써 평가하였다. 또한, 엑소단백질 (바이오필름 기질의 성분) 생산도 분석하였다. 라피노스로 처리된 플랑크톤성 및 바이오필름 세포들 모두에서 총 탄수화물 및 EPS의 단백질 함량이 현저하게 감소하였다 (도 4a 및 4b). 라피노스로 처리한 경우에, 총 탄수화물은 21 - 53% 및 22 - 48% (플랑크톤성 및 바이오필름 세포들 각각에서) 감소한 반면, 총 단백질은 1 - 41% 및 9 - 42% (플랑크톤성 및 바이오필름 세포들 각각에서)만큼 투여량 의존적인 방식으로 감소하였다. *P.* aeruginosa에서의 바이오필름 생성은 무리 운동에 의해서 역으로 조절되는 것으로 보고된 바 있다 (Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM, & O'Toole GA (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by Pseudomonas aeruginosa PA14. *J* Bacteriol 189(9):3603-3612). 무리 운동에 대한 라피노스의 효과 (0 - 1,000 μM)는 *P.* aeruginosa 세포들을 0.5% 연질 아가 플레이트 상에서

배양하고, 중심부로부터의 수지의 길이를 측정함으로써 평가하였다 (도 2d). 라피노스와 함께 성장시킨 세포들의 수지 길이는 라피노스 처리 없이 성장시킨 것들에 비해서 1.6 - 2.4 배 더 길었으며, 이러한 길이는 라피노스의 농도가 증가함에 따라서 함께 증가하였다. 이러한 사실은 라피노스가 연질 아가 플레이트 상에서 무리 운동을 촉진하였다는 점을 암시한다.

[99] LecA에 대한 라피노스의 결합

[100] *P.* aeruginosa는 두 가지 탄수화물 결합 단백질 (렉틴)을 생산하며: LecA (PA-IL) 및 LecB (PA-IIL), 이들은 각각 D-갈락토오스 및 L-푸코오스에 대해서 특이성을 나타낸다 (Garber N, Guempel U, Belz A, Gilboa-Garber N, & Doyle RJ (1992) On the specificity of the D-galactose-binding lectin (PA-I) of Pseudomonas aeruginosa and its strong binding to hydrophobic derivatives of D-galactose and thiogalactose. *BBA*-Gen Subjects 1116(3):331-333; Glick J & Garber N (1983) The intracellular localization of Pseudomonas aeruginosa lectins. *J Gen* Microbiol 129(10):3085-3090). LecA는 D-갈락토오스 및 그 유도체에 대해서 높은 친화도를 나타내고, *P.* aeruginosa 바이오필름 형성에도 관여하기 때문에, D-갈락토오스의 유도체인 라피노스가 LecA에 결합하여 *P.* aeruginosa 바이오필름 형성에 영향을 미치는 메커니즘을 가정해볼 수 있다. 이러한 가설을 테스트하기 위해서, 본 발명에서는 먼저 라피노스의 LecA에 대한 결합을, 라피노스 및 정제된 LecA를 사용해서 1D 이완-편집된 핵 자기 공명 결합 실험에 따라서 평가하였다 (Hajduk PJ, Olejniczak ET, & Fesik SW (1997) One-dimensional relaxation-and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules. *J Am* Chem Soc 119(50):12257-12261; Palmer AG, 3rd, Kroenke CD, & Loria JP (2001) Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Method Enzymol* 339:204-238) (도 5a 참조). 0.1 mM 라피노스의 NMR 신호를 완충용액 중에서 50 μM LecA 존재 및 부존재 하에서 모니터링하였다. 더 나아가, 1 mM 갈락토오스를 첨가하여 동일한 결합 부위에서 경쟁에 의한 라피노스 신호의 변화를 모니터링하였다. LecA 단백질 (도 5a의 첫 번째 행)의 부존재 하에서, 라피노스의 H1 및 H2 신호들을 나타내는 피크들이 5.33 및 4.13 ppm에서 관찰되었다. 이러한 피크들은 LecA 단백질의 존재 하에서는 넓어지고 약해졌으며 (도 5a의 두 번째 행), 신호 강도는 10 배 과량의 갈락토오스를 첨가함으로써 회복되었다 (도 5a의 세 번째 행). 이러한 결과는 라피노스가 LecA에 결합하며, 그 결합 부위는 갈락토오스-결합 부위와 중첩된다는 것을 나타낸다. 더 나아가, 50 mM LecA 용액 중 5.17 및 3.40 ppm에서의 갈락토오스의 C-1 및 C-6 위치에서의 양성자의 신호 또한 1 mM 라피노스를 첨가함으로써 얻어졌다 (도 6). 역으로, LecA 용액 중에서의 갈락토오스 (0.1 mM) 신호들 역시 10배 과량의 라피노스를 처리함으로써 강화되었다 (도 6). 이러한 결과들은 라피노스 및 갈락토스가 LecA 단백질의 동일한 부위에 대해서 경쟁한다는 점을 의미한다.

[101] 라피노스의 LecA에 대한 결합을 더 잘 이해하기 위해서, 라피노스의 인 실리코 도킹 연구 (*in* silico docking studies)를 멜리비오스와의 복합체 중 LecA의 X-선 구조를 사용하여 수행하였다 (PDB: 4AL9). 대부분의 도킹된 라피노스들은 공통된 결합 패턴들을 나타내었으며, 여기에서 갈락토오스 잔기는 LecA 활성 부위의 칼슘 이온을 향하여 돌출되는 반면, 글루코오스 및 프럭토오스 잔기는 LecA의 표면 및 루프 영역을 향하여 배향된다. 라피노스에 대한 최적 도킹 형태가 도 5b에 도시되어 있다. 라피노스의 갈락토오스 잔기는 Tyr 36, His 50, Pro 51, Asp 100, Val 101, 및 Thr 104와 강하게 상호작용하였다. 글루코오스 및 프럭토오스 영역들 또한 수소 결합에 의해서 각각 Gln 53, Gly 37 및 Asn 107과 상호작용하였다. 라피노스의 LecA에 대한 결합과, 바이오필름 억제와의 관련성을 *P.* aeruginosa 균주들을 사용하여 더욱 확인하였는 바, 그 중 하나는 LecA를 생산할 수 없는 균주이고, 또 다른 하나는 LecA를 과생산하는 균주이다. 도 5c에 도시된 바와 같이, *lecA* 녹아웃 돌연변이 (LecA를 생산할 수 없는 균주)는 감소된 바이오필름 형성을 보여주었으며, 더 나아가, 라피노스 농도를 증가시키더라도 바이오필름 형성이 감소되지 않았다 ($P > 0.05$). 이와는 대조적으로, 도 5d에 도시된 바와 같이, pUCP18-LecA (LecA를 과생산하는 균주)를 보유한 *lecA* 녹아웃 돌연변이는 빈 벡터 (pUCP18)를 보유한 야생형 균주와 유사하게 바이오필름을 형성하였다. 더 나아가, pUCP18-LecA를 보유한 *lecA* 녹아웃 돌연변이는 라피노스 존재 하에서, 농도-의존적인 방식으로 (0 - 1,000 μM) 바이오필름 형성 감소를 나타내었다 (도 5d). 이러한 결과들은 LecA가 바이오필름 형성에 필수적이라는 사실을 의미하며, 바이오필름 억제에 있어서, 라피노스가 LecA에 결합하는 것이 필요하다는 것을 의미한다.

[102] 세포성 사이클릭 다이구아닐레이트 (c-di-GMP) 생산의 감소

[103] 세포성 c-di-GMP는 플랑크톤성 및 고착성 라이프스타일 사이의 분자적 결정, 운동성의 조절, 및 유독 인자 (virulence factor) 생산의 유도에 있어서 중요한 역할을 수행한다 (Romling U, Gomelsky M, & Galperin MY (2005) C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol* Microbiol 57(3):629-639). 본 발명자들 역시, 생강 추출물이 *P.* aeruginosa의 플랑크톤성 및 바이오필름 세포들에서 세포성 c-di-GMP 수준을 낮춘다는 점을 보고한 바 있다 (Kim H-S & Park H-D (2013) Ginger extract inhibits biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa PA14. PloS one 8(9):e76106). 따라서, 본 발명에서는 플랑크톤성 및 바이오필름 세포들 모두에서 세포성 c-di-GMP에 대한 라피노스의 효과를 평가하였다. 일반적으로, 바이오필름 세포들은 플랑크톤성 세포들에 비해서 더 높은 c-di-GMP 수준을 나타내었다 (도 7a). 또한, 10 μM의 라피노스 처리에 의해서 c-di-GMP 수준이 플랑크톤성 (47%) 및 바이오필름 세포들 (59%) 모두에서 감소하였다. 부가적으로, 세포성 c-di-GMP 조절에 대한 라피노스 처리의 관련성을 확인하기 위해서, c-di-GMP를 과생산하는 *P.* aeruginosa 돌연변이 (*ΔwspF*)를 사용하였다. *P.* aeruginosa에서 *wspF* 유전자는 메틸에스테라아제를

암호화하는 것으로 알려져 있으며, 메틸에스테라아제는 CheY-유사 수용체 및 다이구아닐레이트 사이클라아제 (GGDEF) 도메인을 함유하는 WspR 단백질의 활성을 조절하는 것으로 추정되고 있다 (Hickman JW, Tifrea DF, & Harwood CS (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. P Natl Acad Sci USA 102(40):14422-14427). *ΔwspF*는 WspR 단백질의 구성적 활성화 (constitutive activation)를 야기하기 때문에, *ΔwspF*는 세포성 c-di-GMP 수준 및 EPS 생산의 상승으로 이어진다 (Chung IY, Choi KB, Heo Y-J, & Cho Y-H (2008) Effect of PEL exopolysaccharide on the wspF mutant phenotypes in Pseudomonas aeruginosa PA14. *J* Microbiol Biotechn 18(7):1227-1234). 도 7b에 도시된 바와 같이, *ΔwspF*는 야생형 균주에 비해서 바이오필름 형성에 있어서 대략 2배 증가를 유도한다. 그러나, 비록 바이오필름 형성 감소가 야생형 균주 수준으로까지 도달하지는 못하였지만, 라피노스 처리 (0 - 100 μM)에 의해서 *ΔwspF*의 바이오필름 형성이 12 -26% 감소하였다. 흥미롭게도, 라피노스는 *ΔwspF*의 무리 운동성을 강화시켰다. 도 7c에 도시된 바와 같이, *ΔwspF*는 0.5% 연질 아가 플레이트 상에서 제한된 무리 운동성을 보여주었지만, 10 μM 라피노스와 함께 성장된 *ΔwspF*는 명백하게 길어진 수지들을 보여주었다.

[104] 상기 결과들은 *P.* aeruginosa의 강화된 c-di-GMP 특이적 포스포디에스테라아제 (PDE) 활성에 의해서 세포성 c-di-GMP 수준이 감소되는 것과 관련이 있는 것으로 보인다. 이는 라피노스와 함께 성장된 *P.* aeruginosa에서 PDE-특이적 기질인 비스-p-니트로페놀 포스페이트 (bis-pNPP)의 분해를 분석하여 PDE의 활성을 측정함으로써 테스트하였다. 도 7d는 라피노스와 함께 성장된 *P.* aeruginosa가, 라피노스 없이 성장된 동일한 균주와 비교할 때, 비스-pNPP 분해의 활성을 1.1 - 2.3배 증가시킴을 보여준다. 이러한 결과는 라피노스가 PDE 활성의 유도를 통해서 *P. aeruginosa* 세포성 c-di-GMP 수준을 감소시켰음을 의미한다.

[105] <u>모델균주 이외의 다양한 그람 음성, 양성균들의 라피노스 처리에 의한 바이오필름 형성 변화 확인</u>

[106] 상기에서 확인된 바와 같이, 라피노스가 세균의 C-di-GMP 양을 조절하기 때문에 모델 균주뿐만 아니라, 다양한 그람 음성, 양성균에 적용가능 여부를 확인하기 위하여 이들에 대한 라피노스의 바이오필름 저해 효과를 관찰하였다.

[107] 도 10은 다양한 그람 음성, 양성균들의 라피노스 처리에 의한 바이오필름 형성 변화를 나타낸 그래프이다. 도 10에 나타난 바와 같이 라피노스의 처리에 의해 실험대상이 된 모든 균주에 대하여 라피노스의 농도에 의존적으로 바이오필름의 형성이 억제됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 라피노스는 효과적인 바이오필름 형성 억제제로서의 활용이 가능함을 시사한다.

[108] **검토**

[109] 바이오필름 감소 이외에도, 라피노스는 *P.* aeruginosa의 다른 표현형들을 변화시켰는 바, 이러한 표현형 변화에는 콩고-레드 플레이트 중 주름성 군락

형성의 억제 (도 2d), 감소된 EPS 생산 (도 4a 및 4b), 및 증가된 무리 운동성 (도 2d) 등이 포함된다. 이러한 변화된 표현형들은 통상적으로 세포성 c-di-GMP 수준이 감소될 때 관찰된다 (Kim H-S & Park H-D (2013) Ginger extract inhibits biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa PA14. *PloS* one 8(9):e76106; Ueda A & Wood TK (2009) Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS* Pathog 5(6):e1000483). 따라서, 라피노스가 세포성 c-di-GMP를 감소시킴으로써 다양한 표현형 변화를 유발하였다고 유추할 수 있다. 이러한 가정은 세포성 c-di-GMP를 과생산하는 *P.* aeruginosa 돌연변이 (*ΔwspF*)를 사용한 실험들에 의해서 확인되는 바: 라피노스는 바이오필름 형성을 감소시켰고 (도 7b), 무리 운동성의 회복을 야기하였다 (도 2d).

[110] c-di-GMP 수준은 서로 반대로 작용하는 두 가지 효소들에 의해서 조절된다. c-di-GMP는 다이구아닐레이트 사이클라아제 (DGCs)에 의해서 두 개의 GTP로부터 생산되고, 포스포디에스테라아제 (PDEs)에 의해서 pGpG를 거쳐서 두 개의 GTP로 분해된다 (Schirmer T & Jenal U (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev* Microbiol 7(10):724-735). 세포성 c-di-GMP 수준을 감소시키기 위해서 두 가지 경로가 가능한 바: GGDEF 도메인을 갖는 DGC의 활성을 감소시키거나, 또는 EAL 및/또는 HD-GYPs 도메인들을 갖는 PDE의 활성을 증가시키는 것이 그것이다. 실험 결과, 라피노스의 농도를 증가시키게 되면 *P. aeruginosa*의 PDE 활성이 증가되는 것으로 나타났으며 (도 7d), 이는 후자의 경로가 라피노스에 의해서 c-di-GMP 수준이 감소되는 메커니즘인 것을 의미한다. 이러한 가설은 다른 연구 결과에 의해서되 뒷받침되는 바 (Chung IY, Choi KB, Heo Y-J, & Cho Y-H (2008) Effect of PEL exopolysaccharide on the wspF mutant phenotypes in Pseudomonas aeruginosa PA14. *J* Microbiol Biotechn 18(7):1227-1234), 상기 연구에서는 *P.* aeruginosa ΔwspF 돌연변이를 사용하여 플라스미드 벡터 중에서 PDE 유전자인 *pvrR*을 클로닝함으로써 PDE 활성을 증가시켰다. 형질전환된 *ΔwspF* 돌연변이는 증가된 PDE 활성과 더불어 감소된 c-di-GMP 수준을 나타내었고, 무리 운동성이 증가하였다. 라피노스 처리에 의해서 c-di-GMP 수준이 감소하는 것을 설명함에 있어서, DGCs의 활성이 감소되는 가능성도 배제할 수는 없다.

[111] 반면에, 세포성 c-di-GMP의 감소된 수준은 감소된 바이오필름 형성 뿐만 아니라, 성장 및 분산의 운동 모드와도 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다 (Ueda A & Wood TK (2009) Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS* Pathog 5(6):e1000483). 바이오필름 분산은 편재화된 세포 사멸 및 용균에 의해서 개시되어, 탈출 세포들에 영양분을 제공하게 된다 (McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, & Kjelleberg S (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev*

Microbiol 10(1):39-50). 이는 바이오필름 마이크로군락들의 중공화 (hollowing)와 관련이 있다 (Barraud N, *et al.* (2006) Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of Pseudomonas aeruginosa. *J* Bacteriol 188(21):7344-7353). 본 발명에서, 라피노스로 처리된 바이오필름에서 중공 구조들이 발견된 바 (도 2c), 라피노스가 세포성 c-di-GMP 수준을 감소시킴으로써 바이오필름 형성을 감소시켰을 뿐만 아니라, 바이오필름의 분산을 촉발하였음을 의미한다. 이러한 가정은 유리 슬라이드 상에 형성된 *P.* aeruginosa 바이오필름으로부터 방출된 플랑크톤성 세포들을 측정함으로써 더욱 평가할 수 있다. 방출된 세포들의 개수는, 미처리된 세포들에 비해서, 100 μM 라피노스로 처리한 경우에, 1.8 - 3.6배 증가하였다 (도 8) 종합하면, 본 발명에 따른 데이터들은 라피노스에 의한 세포성 c-di-GMP 수준의 조절에 의해서 갈락토시드류가 LecA에 결합하는 사실 및 *P. aeruginosa* 바이오필름의 형성을 억제하는 사실 (즉, LecA-리간드 경쟁적 억제만이 바이오필름 억제에 대한 유일한 메커니즘은 아니라는 사실)을 뒷받침해준다. 그럼에도 불구하고, LecA-라피노스 결합이 cdi-GMP 감소를 야기하였는지 또는 라피노스가 LecA-라피노스 결합과는 독립적으로 c-di-GMP를 감소시켰는지에 대해서는 불명확하다.

[112] 한편, LecA 단백질이 바이오필름 형성과 관련된다는 사실을 주지할 필요가 있다. Diggle 등 (Diggle SP, *et al.* (2006) The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in Pseudomonas aeruginosa. *Environ Microbiol* 8(6):1095-1104)은 *P.* aeruginosa 바이오필름에서 *lecA* 유전자 발현을 관찰하였으며, LecA-과생산 균주에서는 바이오필름 형성이 증가되고, *lecA* 돌연변이에서는 감소됨을 보고한 바 있다. 본 발명에서는 RT-qPCR 분석방법을 사용하여 라피노스 처리에 의한 *lecA* 유전자 발현의 방해 여부를 조사하였다 (도 9a 및 9b). 야생형 *P.* aeruginosa에서 라피노스 처리에 의해서 *lecA* 유전자 발현이 50% 감소하였다. 흥미롭게도, 세포성 c-di-GMP를 과생산하는 *P.* aeruginosa 돌연변이 (*ΔwspF*)는 야생형 균주에 비해서 *lecA* 유전자 발현의 측면에서 1.5배 증가를 보였으며, 라피노스 처리 이후에는 *lecA* 유전자 발현의 측면에서 30% 감소를 보였다. 또한, *P.* aeruginosa lecA 녹아웃 돌연변이 (*ΔlecA*)는, 야생형 균주에 비해서, 세포성 c-di-GMP 수준에서 감소를 나타내었으며, c-di-GMP 특이적 PDE의 활성 측면에서는 1.5배 증가를 나타내었다. 이러한 결과들은 라피노스가 LecA에 결합함으로써 *lecA* 유전자 발현을 감소시켰으며, 이는 또한 세포성 cdi-GMP 수준의 감소를 야기하였고, 궁극적으로 바이오필름 억제를 야기하였다.

[113] 라피노스는 다양한 식물들 (예를 들어, 콩, 양배추 및 브로콜리) 및 식물 종자들, 또한 생강에서 발견되는 일반적인 갈락토올리고당이다. 왜 일부 식물들이 라피노스와 같은 박테리아성 바이오필름 억제제를 생산하는지에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없으며, 그러한 바이오필름 억제제들이 우연히 생산된 것인지 또는 진화적 과정에서 생산된 것인지를 연구할 가치가 있다. 어떠한 이유이건 간에,

바이오필름 억제제들의 생산은 식물들에 생존 이득을 부여하는 것으로 보인다. 예를 들어, 오스트리아산 홍조류는 바이오필름 형성을 억제하는데 효과적인 할로겐화된 푸라논을 생산하고 (Hentzer M, *et al.* (2003) Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors. *The* EMBO journal 22(15):3803-3815), 이는 다시 식물에 대한 광을 차단하는 미생물 군락화를 방지하는 것으로 보고된 바 있다. 바이오필름 억제제는 다양한 의료적 및 산업적 분야에 응용될 수 있다. 항생제 내성을 갖는 병원성 박테리아들의 숫자가 증가하여 항생제 치료법에 곤란을 야기하고 있으며, 예를 들어, 95% 이상의 *P.* aeruginosa가 젠타마이신 (gentamicin), 카르베니실린 (carbenicillin), 코-트리목사졸 (co-trimoxazol), 세프티족심 (ceftizoxime), 및 테트라사이클린 (tetracycline) 치료법에 내성을 갖는 것으로 알려져 있다 (Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug* Discov 2(2):114-122). 박테리아 성장에 영향을 주지 않는 바이오필름 억제제는 바이오필름 형성을 수반하는 감염성 질병들을 치료하는데 있어서 항생제에 대한 새로운 대안으로 떠오르고 있다. 이러한 물질들은 또한 바이오파울링 (biofouling) 문제들을 해결할 수도 있는 바, 수처리, 수 분배 파이프, 선박 선체, 세탁기, 가습기, 식기 세척기 등과 같은 다양한 장치들의 막 필터에 사용되는 살생제를 대체할 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 라피노스를 유효성분으로 포함하는 바이오필름 형성 억제용 조성물.

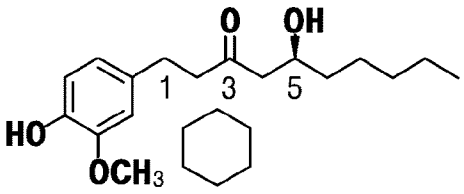
[청구항 2] 제1항에 있어서, 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물의 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 바이오필름 형성 억제용 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 수처리막 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 바이오필름 형성 억제용 조성물.

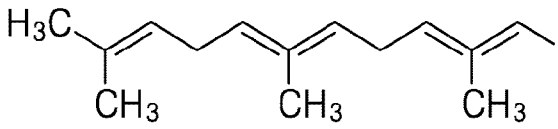
[청구항 4] 제1항에 있어서, 식품 및 생활용품의 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 바이오필름 형성 억제용 조성물.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 대상물의 표면에 코팅 처리하는 단계를 포함하는 바이오필름 형성 억제 방법.

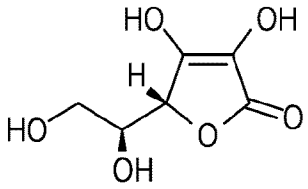
[도1a]



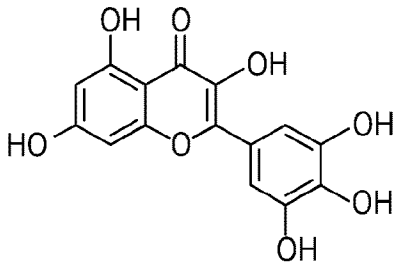
6-진저롤



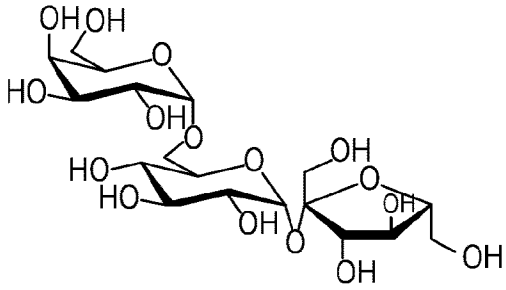
파네솔



L-아스코르브산

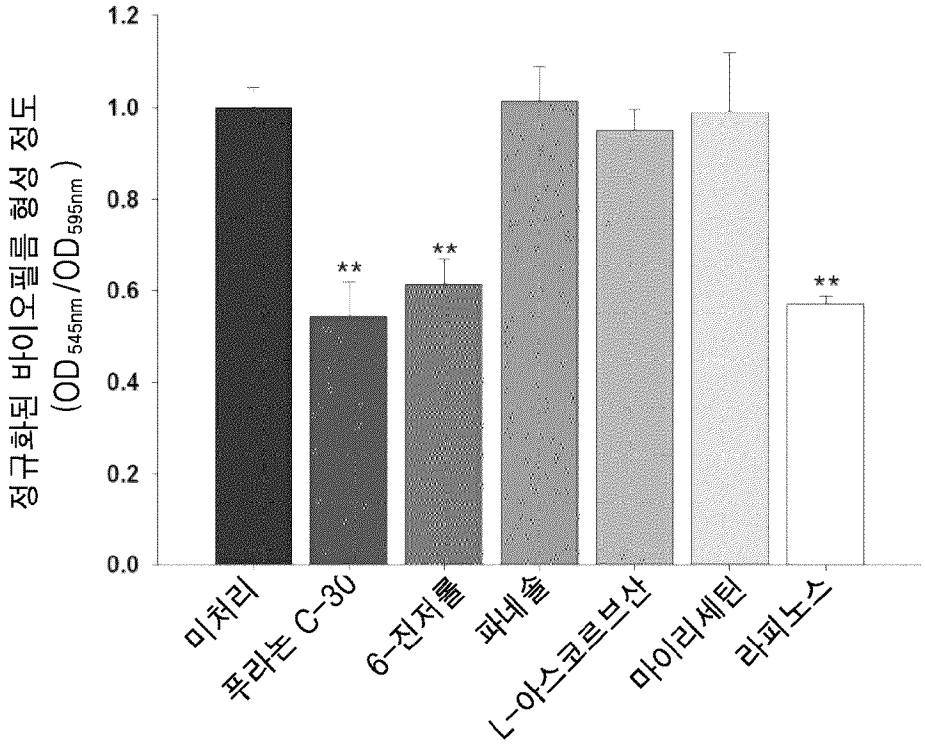


마이리세틴

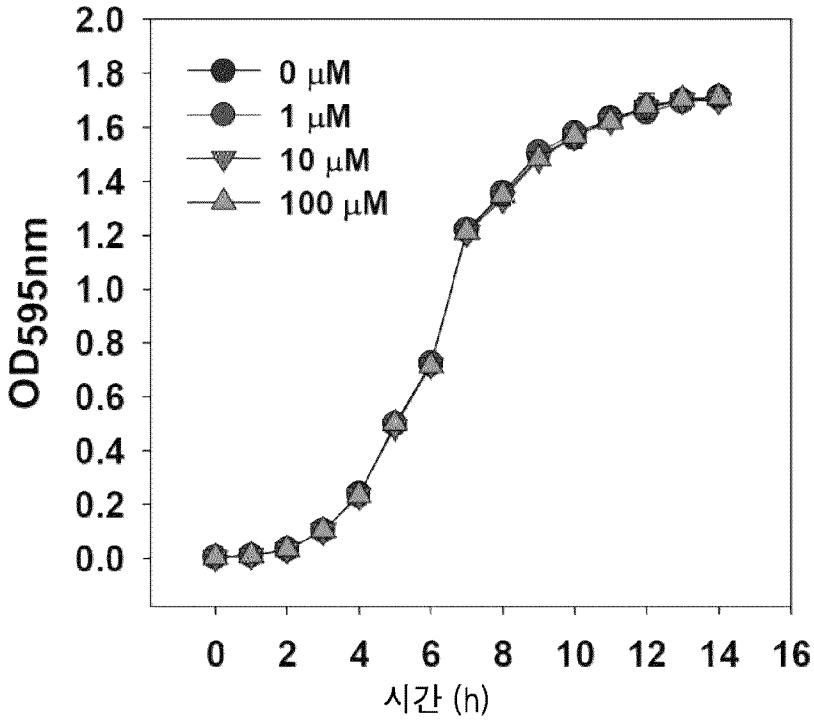


라피노스

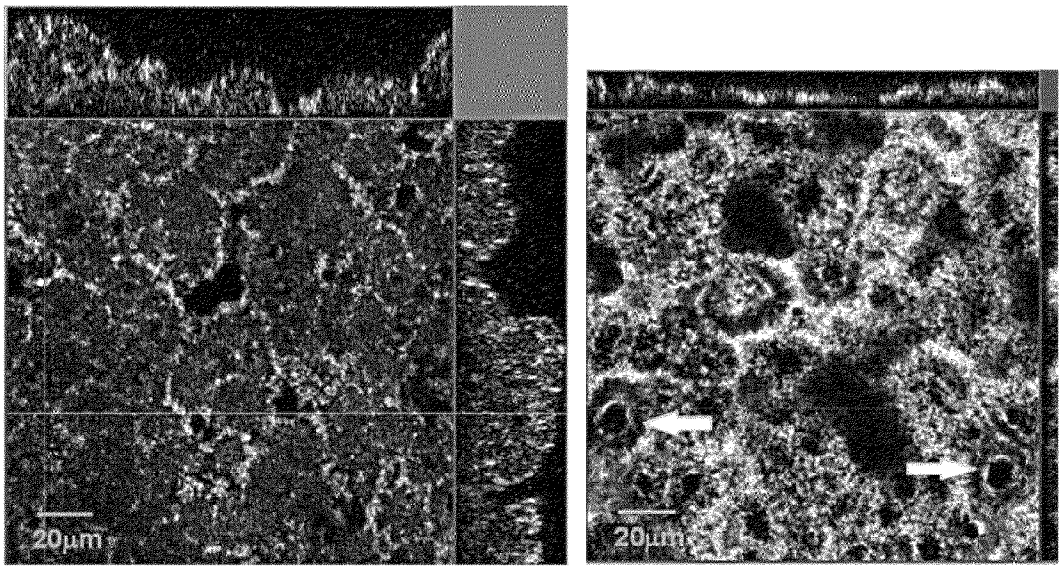
[도1b]


정규화된 바이오필름 형성 정도
(OD545nm/OD595nm)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
**
**
미처리
푸라논 C-30
6-진저롤
파네솔
L-아스코르브산
마이리세틴
라피노스

[도2a]

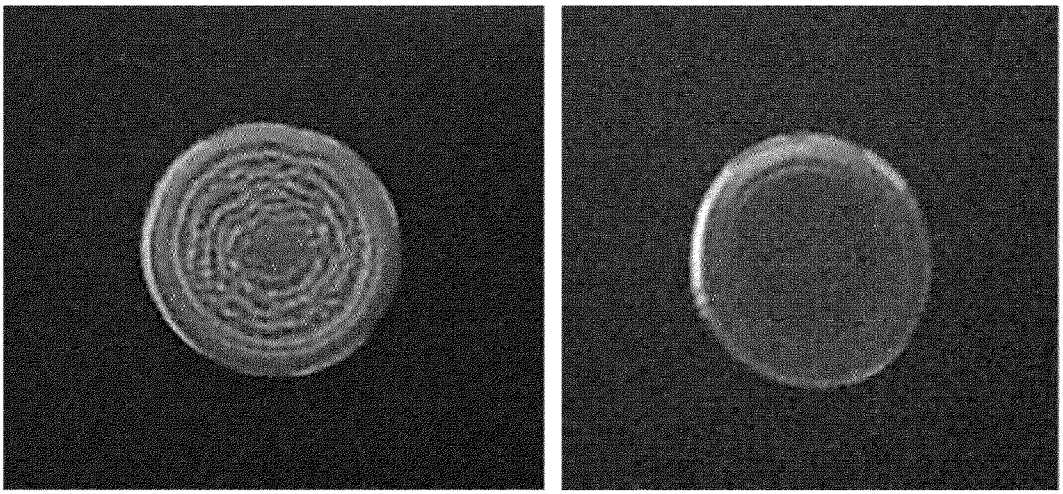

OD595nm
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0 μM
1 μM
10 μM
100 μM
0
2
4
6
8
10
12
14
16
시간 (h)

[도2b]



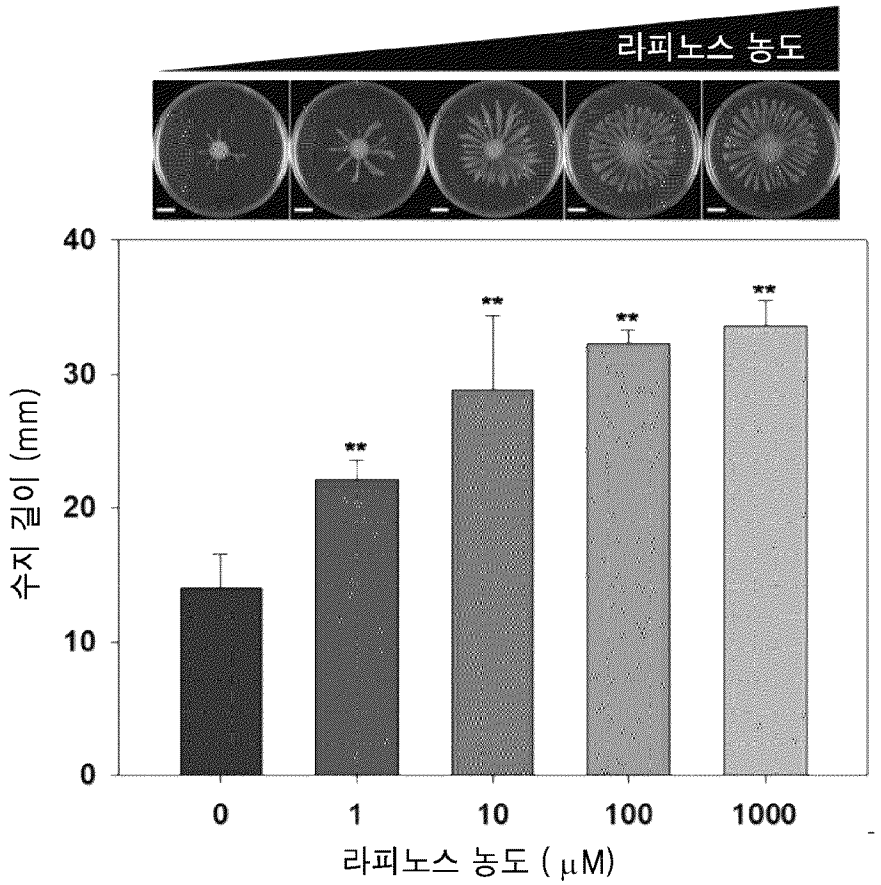
0 μM Raffinose 10 μM Raffinose

[도2c]

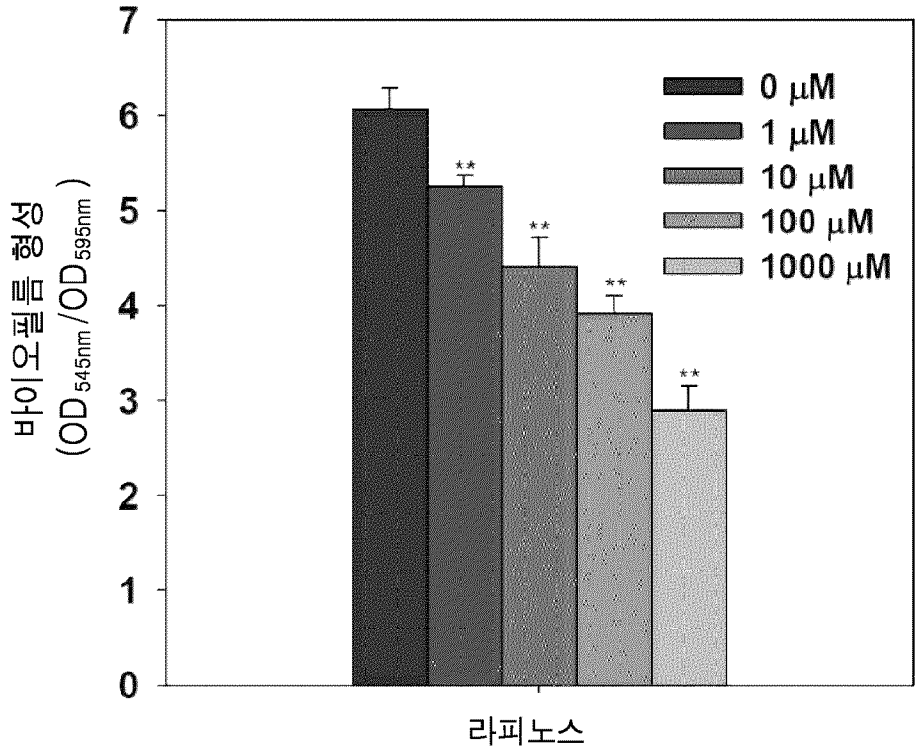


0 μM Raffinose 10 μM Raffinose

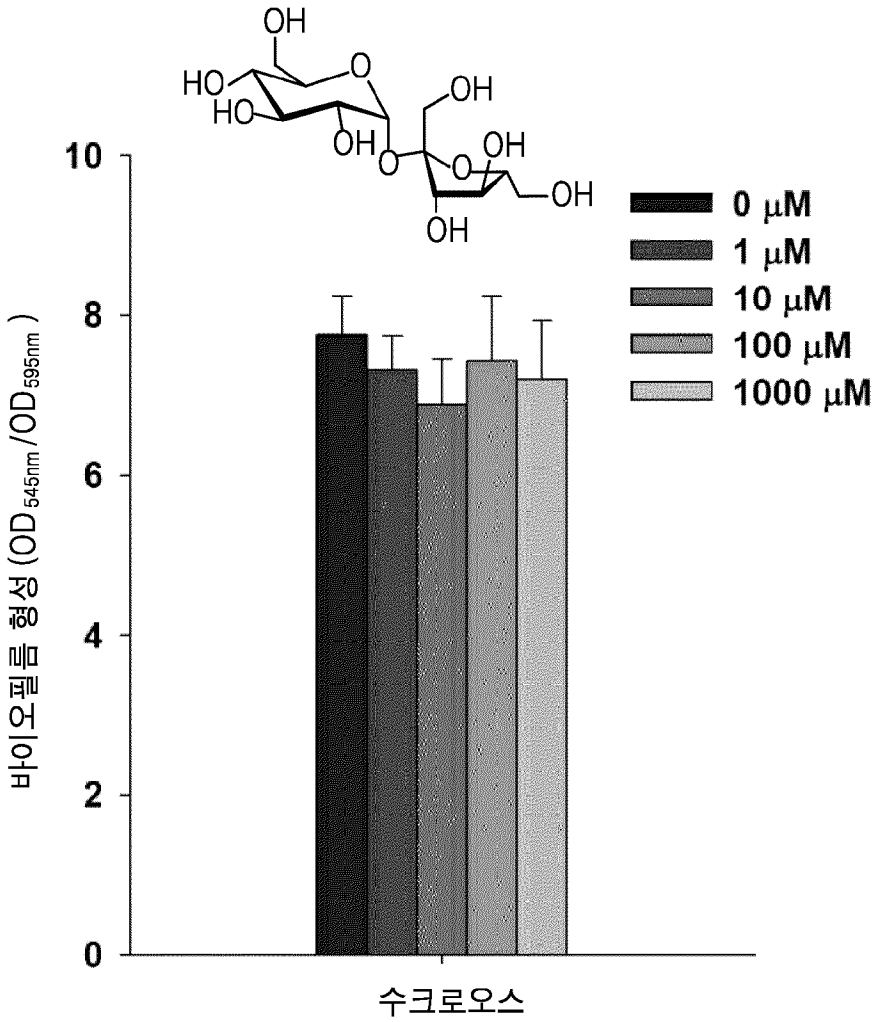
[도2d]


라피노스 농도
수지 길이 (mm)
40
30
20
10
0
**
0
1
10
100
1000
라피노스 농도 (μM)

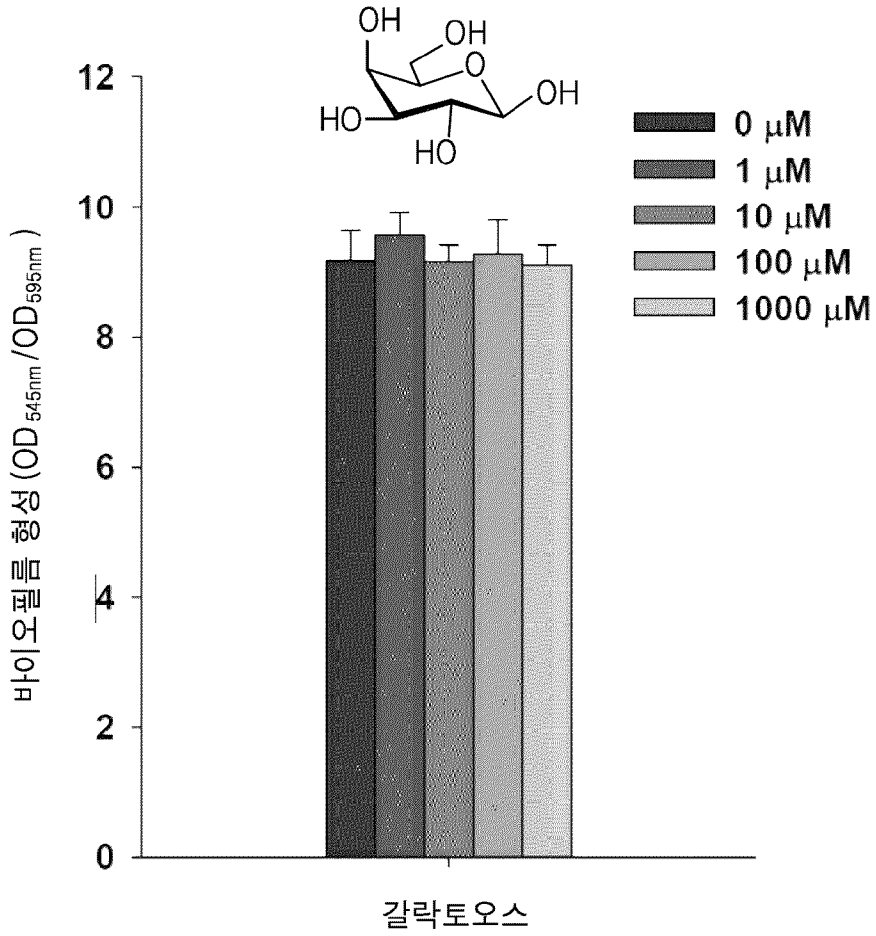
[도3a]


바이오필름 형성
(OD545nm/OD595nm)
7
6
5
4
3
2
1
0
0 μM
1 μM
10 μM
100 μM
1000 μM
**
라피노스

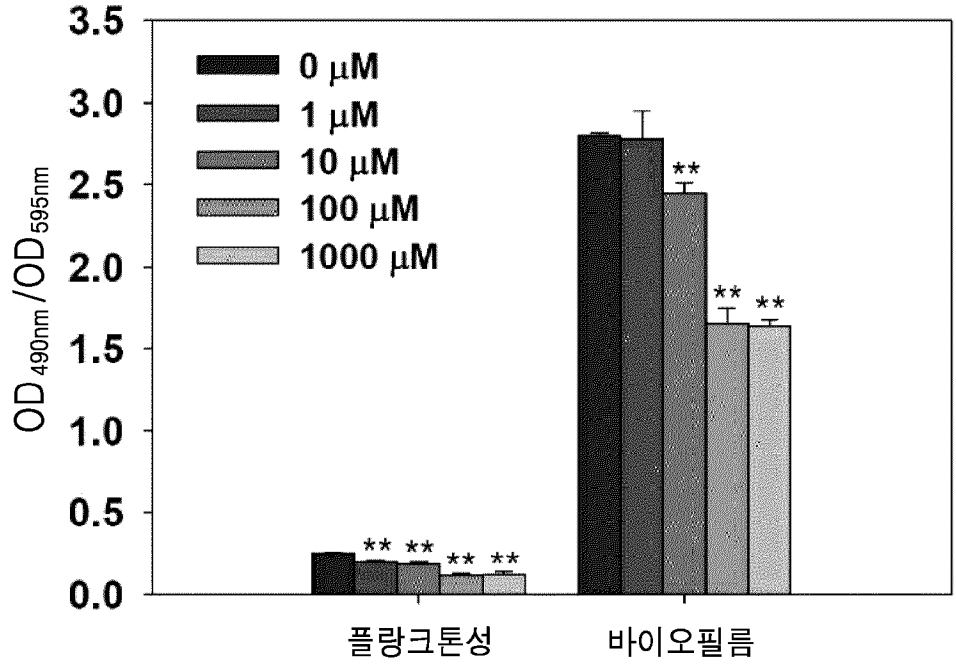
[도3b]


OH
HO
HO
O
OH
OH
O
O
OH
OH
OH
0 μM
1 μM
10 μM
100 μM
1000 μM
바이오필름 형성 (OD545nm /OD595nm)
10
8
6
4
2
0
수크로오스

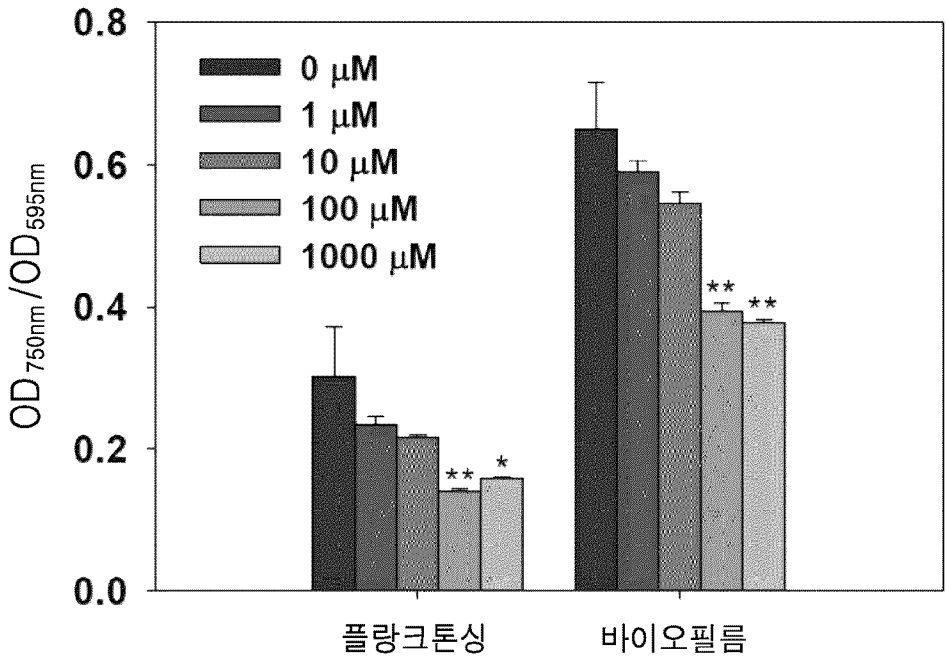
[도3c]


OH
OH
O
OH
HO
HO
0 μM
1 μM
10 μM
100 μM
1000 μM
바이오필름 형성 (OD545nm/OD595nm)
12
10
8
6
4
2
0
갈락토오스

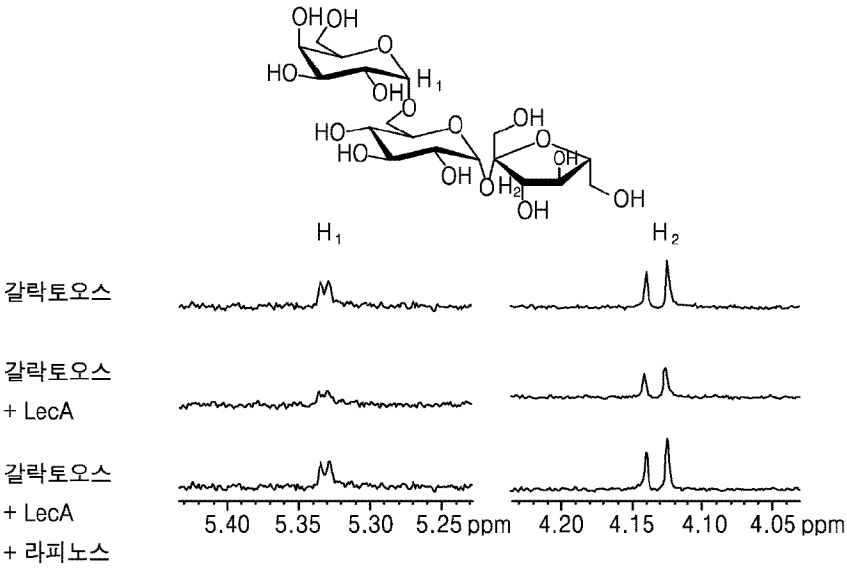
[도4a]


0 μM
1 μM
10 μM
100 μM
1000 μM
OD490nm/OD595nm
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
**
**
**
**
플랑크톤성
바이오필름

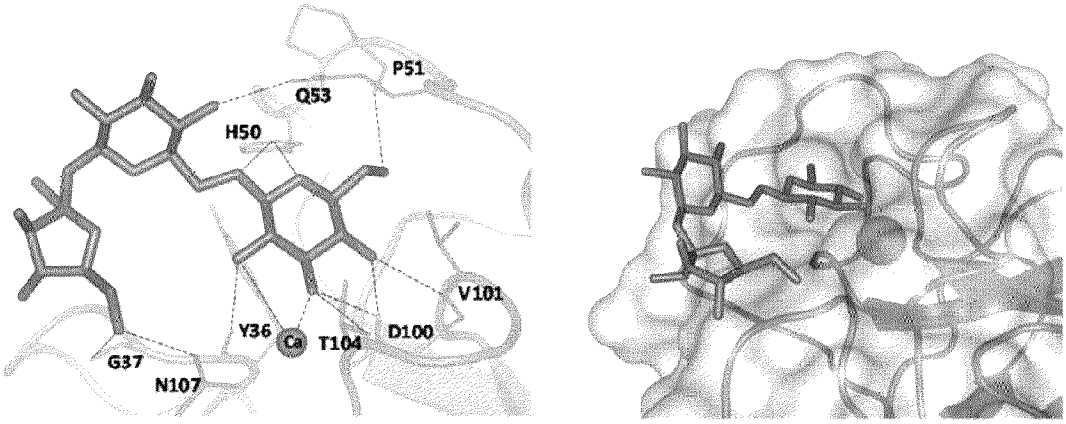
[도4b]


0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD750nm/OD595nm
0 μM
1 μM
10 μM
100 μM
1000 μM
**
*
**
**
플랑크톤성
바이오필름

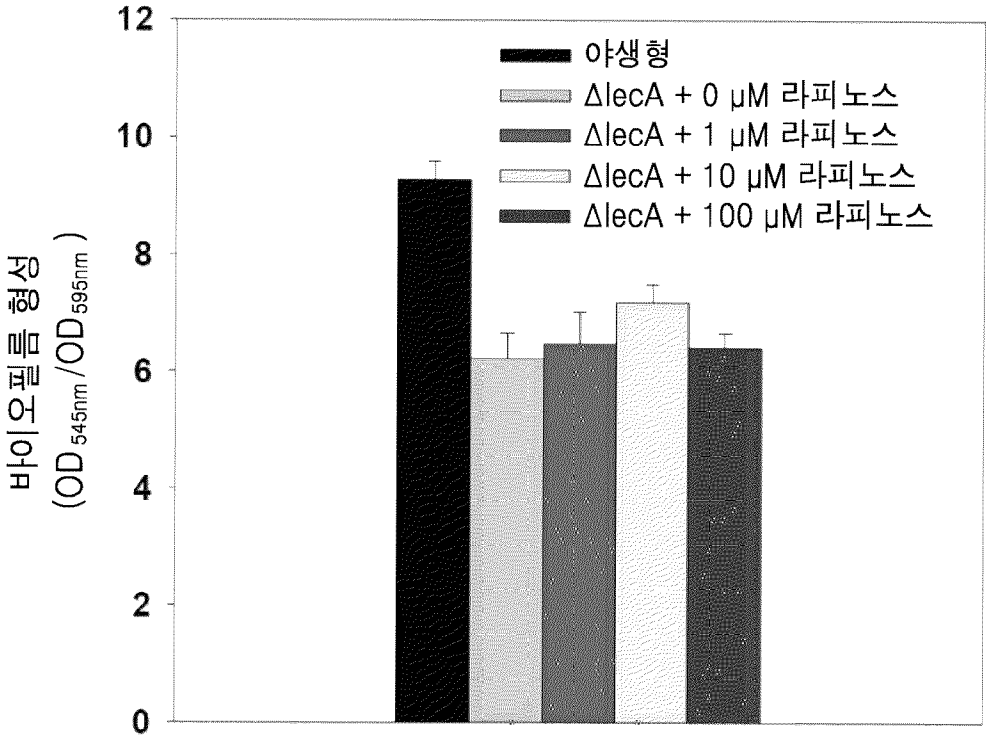
[도5a]


H1
H2
갈락토오스
갈락토오스
+ LecA
갈락토오스
+ LecA
+ 라피노스
5.40 5.35 5.30 5.25 ppm
4.20 4.15 4.10 4.05 ppm

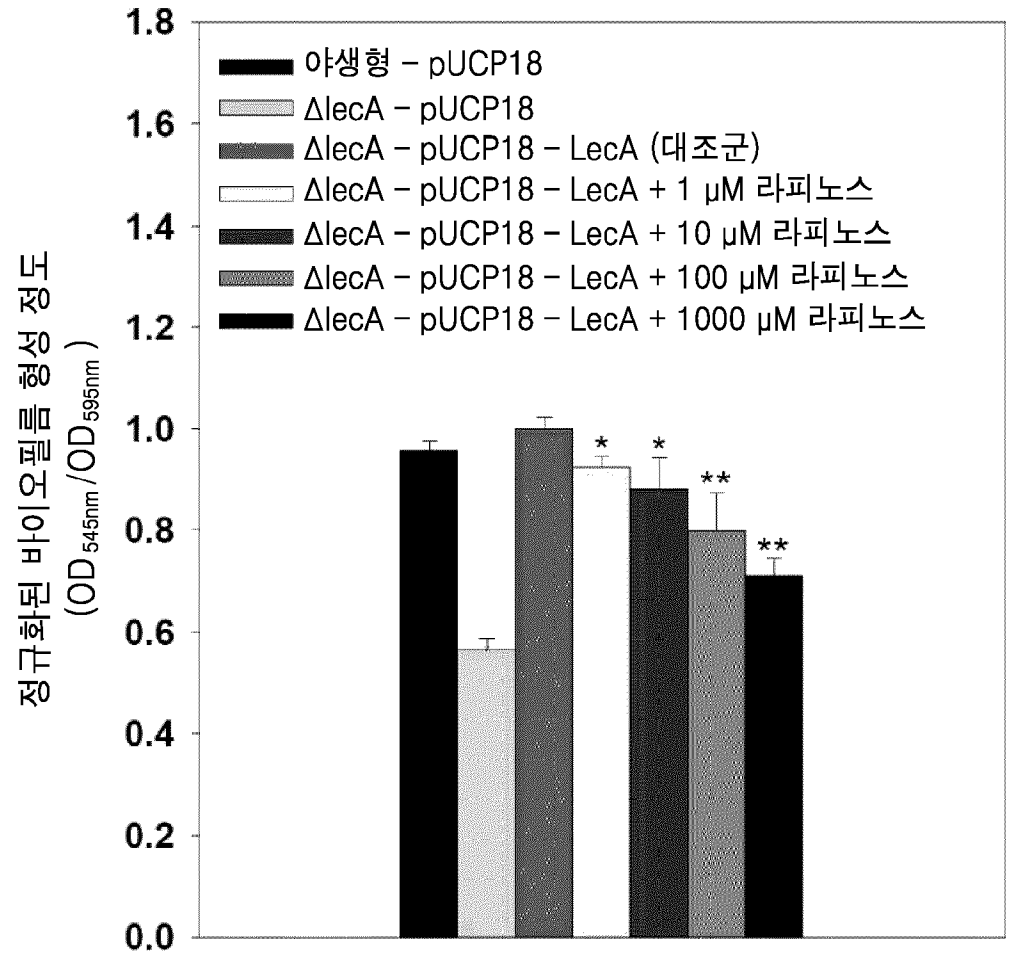
[도5b]


P51
Q53
H50
V101
Y36
Ca
T104
D100
G37
N107

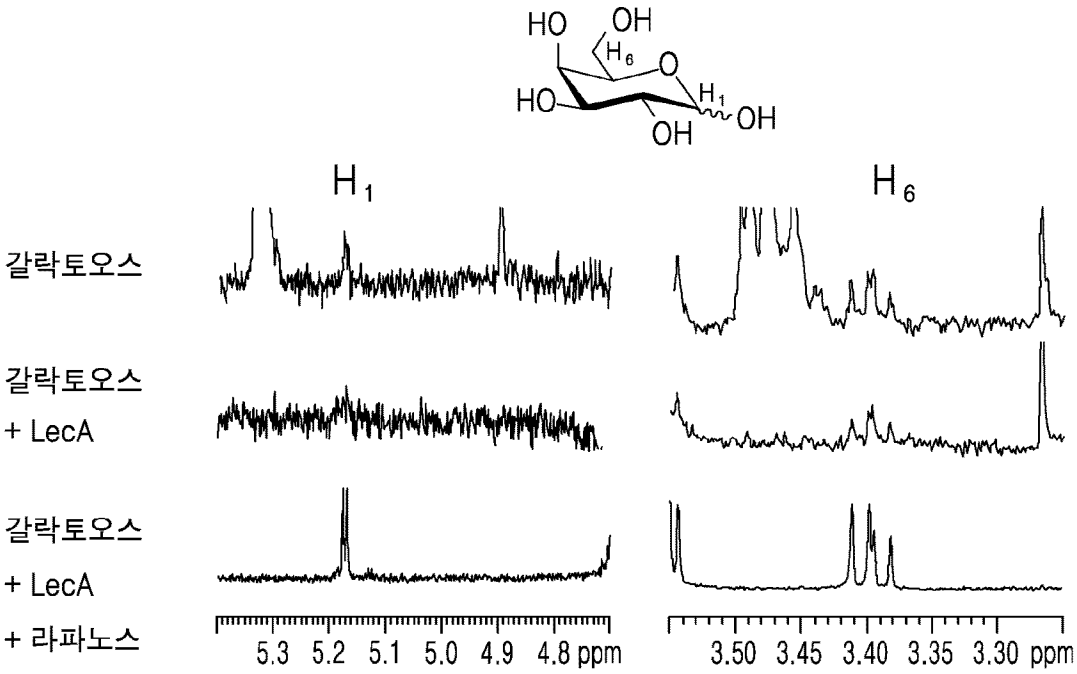
[도5c]


바이오필름 형성
(OD545nm/OD595nm)
12
10
8
6
4
2
0
야생형
ΔlecA + 0 μM 라피노스
ΔlecA + 1 μM 라피노스
ΔlecA + 10 μM 라피노스
ΔlecA + 100 μM 라피노스

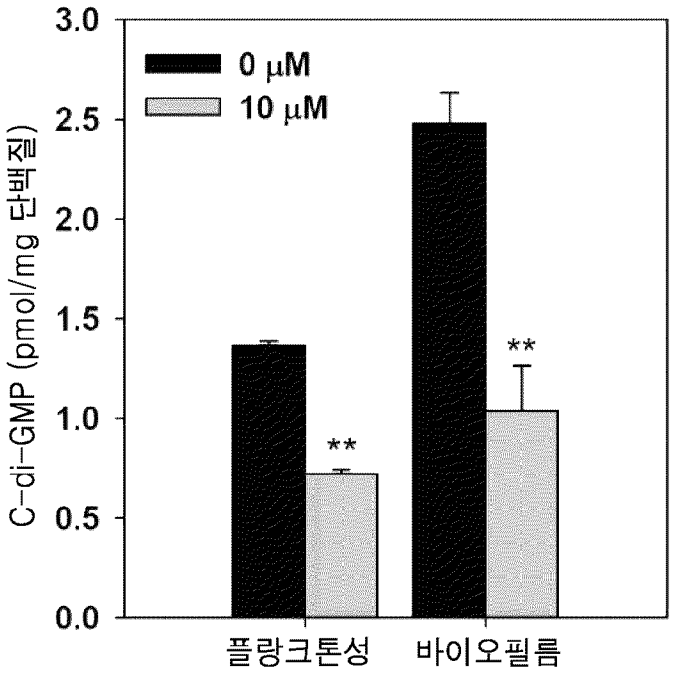
[도5d]


정규화된 바이오필름 형성 정도
(OD545nm/OD595nm)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
야생형 – pUCP18
ΔlecA – pUCP18
ΔlecA – pUCP18 – LecA (대조군)
ΔlecA – pUCP18 – LecA + 1 μM 라피노스
ΔlecA – pUCP18 – LecA + 10 μM 라피노스
ΔlecA – pUCP18 – LecA + 100 μM 라피노스
ΔlecA – pUCP18 – LecA + 1000 μM 라피노스
*
*
**
**

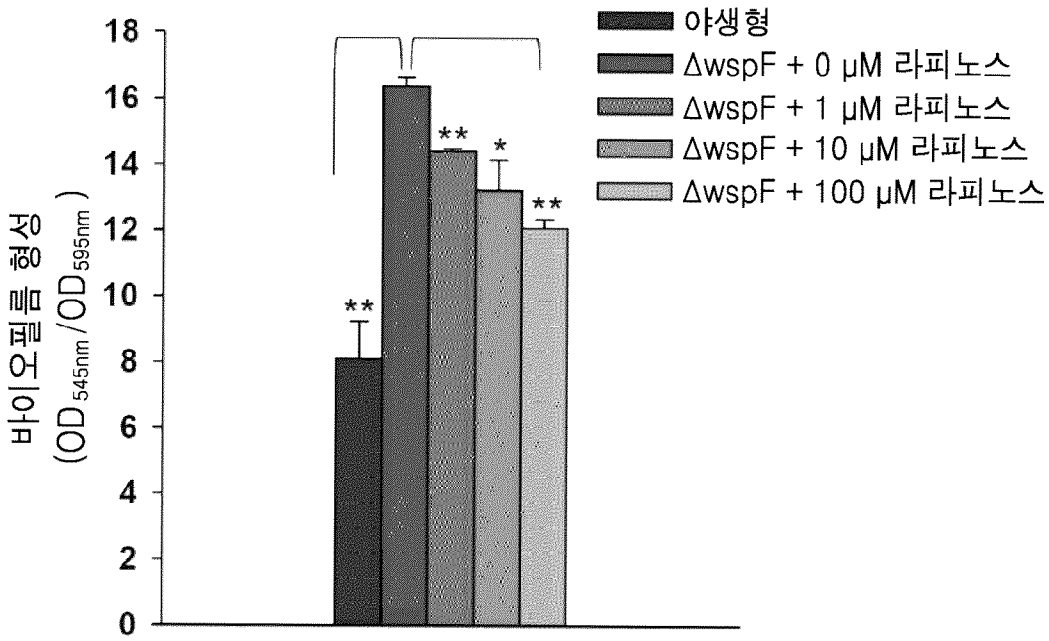
[도6]


HO
OH
H6
O
HO
H1
OH
OH
H1
H6
갈락토오스
갈락토오스
+ LecA
갈락토오스
+ LecA
+ 라파노스
5.3 5.2 5.1 5.0 4.9 4.8 ppm
3.50 3.45 3.40 3.35 3.30 ppm

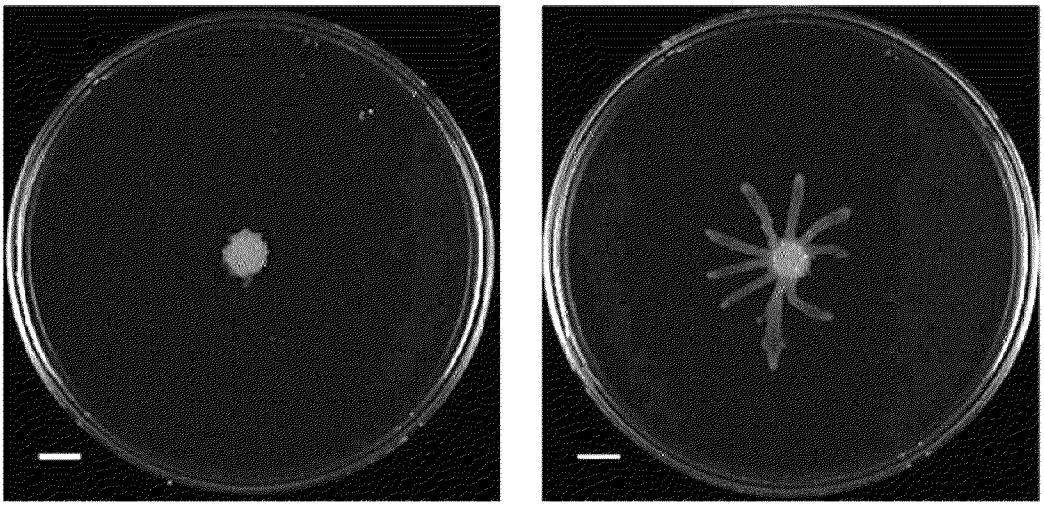
[도7a]


3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C-di-GMP (pmol/mg 단백질)
0 μM
10 μM
**
**
플랑크톤성
바이오필름

[도7b]

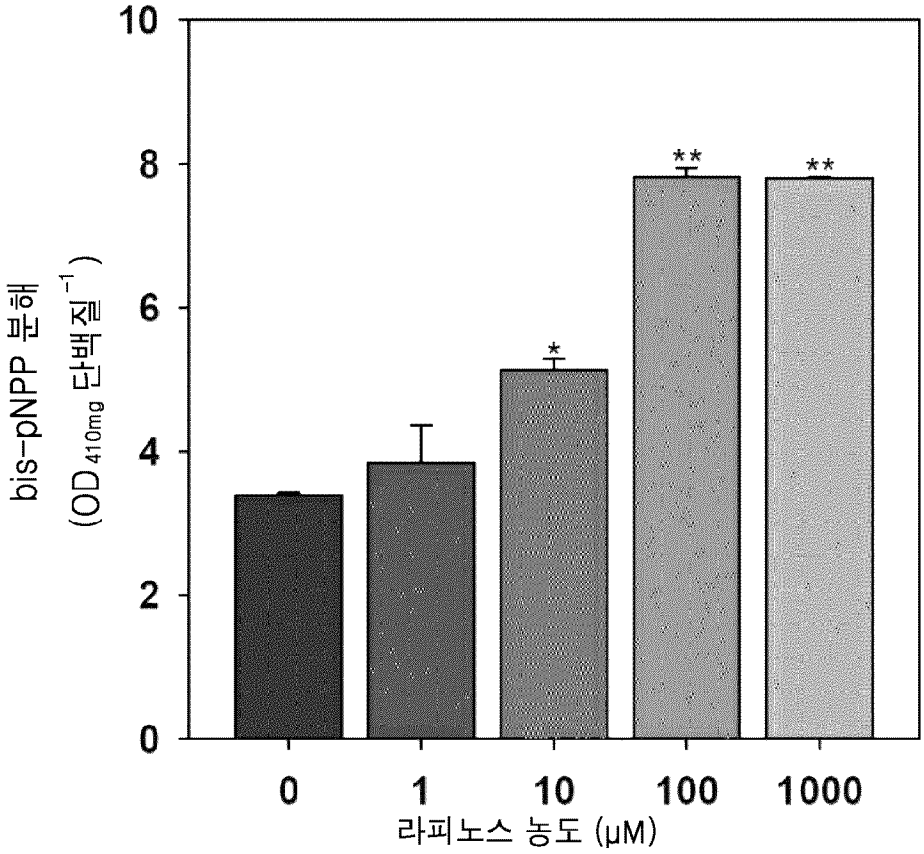


[도7c]

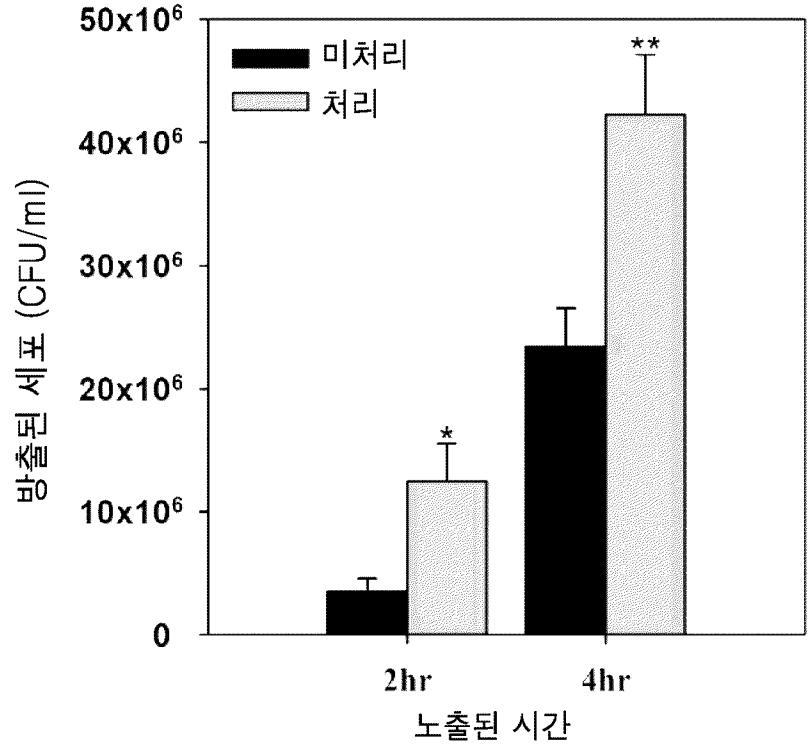


ΔwspF 0 μM 라피노스 ΔwspF 10 μM 라피노스

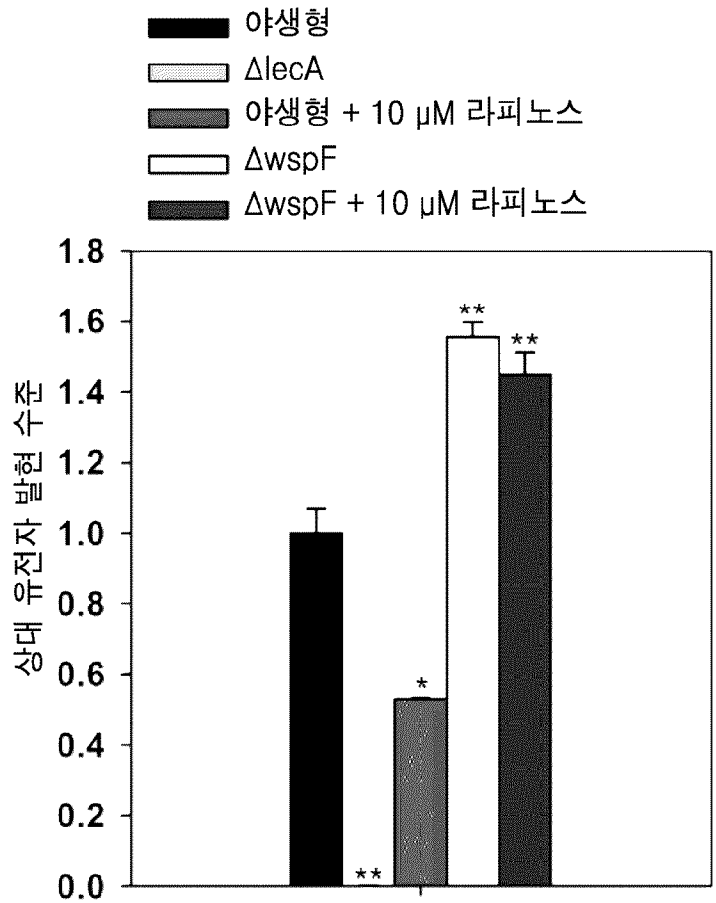
[도7d]


10
8
6
4
2
0
bis-pNPP 분해
(OD410mg 단백질-1)
**
**
*
0
1
10
100
1000
라피노스 농도 (μM)

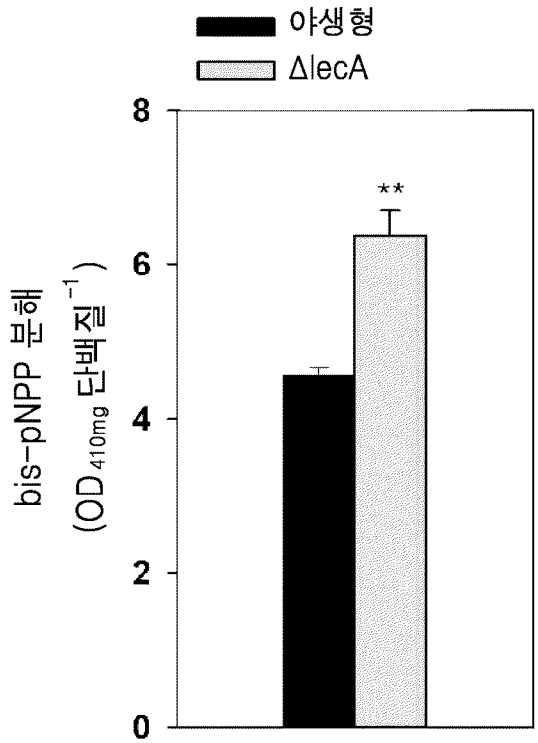
[도8]


50x10^6
40x10^6
30x10^6
20x10^6
10x10^6
0
방출된 세포 (CFU/ml)
미처리
처리
**
*
2hr
4hr
노출된 시간

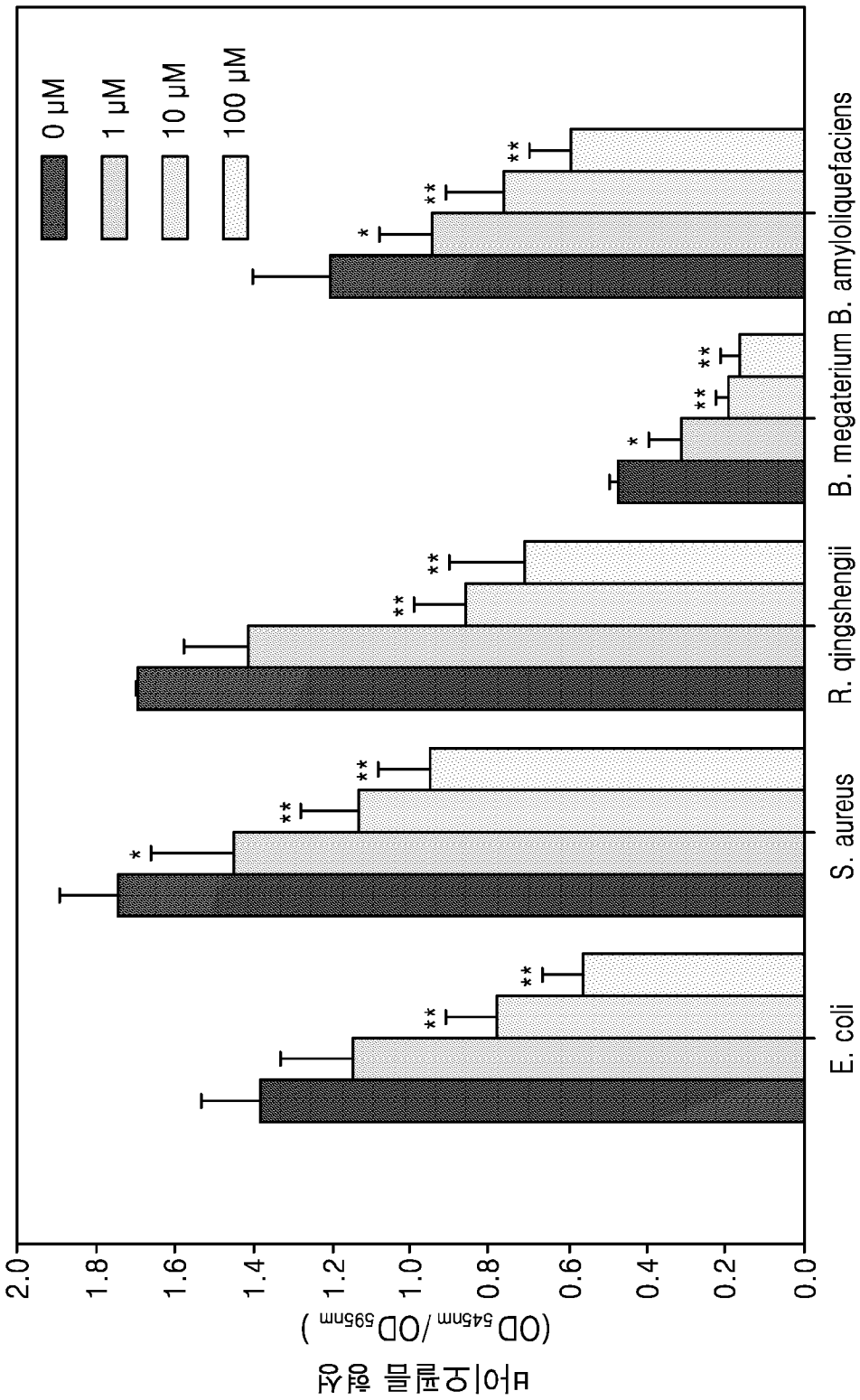
[도9a]


야생형
ΔlecA
야생형 + 10 μM 라피노스
ΔwspF
ΔwspF + 10 μM 라피노스
상대 유전자 발현 수준
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
**
*
**

[도9b]


야생형
ΔlecA
bis-pNPP 분해
(OD410mg 단백질-1)
8
6
4
2
0
**

[도10]


0 μM
1 μM
10 μM
100 μM
E. coli
S. aureus
R. qingshengii
B. megaterium
B. amyloliquefaciens
바이오필름 형성
(OD545nm/OD595nm)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/010913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/702(2006.01)i, A61K 31/70(2006.01)i, A61P 31/04(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)

A61K 31/702; A61K 31/341; C09D 5/00; A01N 65/00; A61K 31/198; A61K 31/02; A61P 31/04

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: raffinose, bio film, inhibition, medical device, medical material, medical implant, water treatment membrane, food, daily supplies

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-156308 A (LION CORP.) 10 July 2008 See abstract; paragraphs [0019], [0039]; claim 1.	1-4
A	KR 10-2013-0063887 A (RESEARCH COOPERATION FOUNDATION OF YEUNGNAM UNIVERSITY) 17 June 2013 See abstract; claims 1-3, 6-8.	1-4
A	US 2013-0108819 A1 (GUEZENNEC, Jean) 02 May 2013 See abstract; claims 18-19, 38-39.	1-4
A	KR 10-2013-0116440 A (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 24 October 2013 See abstract; claims 4-5.	1-4
A	ALI, AFSAR et al., "Sugars inhibit expression of the rugose phenotype of Vibrio cholerae", Journal of clinical microbiology, 2005, vol. 43, no. 3, pages 1426-1429 See abstract; page 1427.	1-4

☐ 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	Date of mailing of the international search report
26 JANUARY 2016 (26.01.2016)	**27 JANUARY 2016 (27.01.2016)**

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/010913

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **5**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 5 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/010913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2008-156308 A	10/07/2008	NONE	
KR 10-2013-0063887 A	17/06/2013	KR 10-1333339 B1	27/11/2013
US 2013-0108819 A1	02/05/2013	AU 2011-273425 A1	31/01/2013
		CA 2804193 A1	05/01/2012
		EP 2402403 A1	04/01/2012
		EP 2588544 A1	08/05/2013
		JP 2013-532161 A	15/08/2013
		WO 2012-001164 A1	05/01/2012
KR 10-2013-0116440 A	24/10/2013	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/010913

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/702(2006.01)i, A61K 31/70(2006.01)i, A61P 31/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/702; A61K 31/341; C09D 5/00; A01N 65/00; A61K 31/198; A61K 31/02; A61P 31/04

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: 라피노스, 바이오필름, 억제, 의료기기, 의료용 재료, 의료용 이식물, 수처리막, 식품, 생활용품

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2008-156308 A (LION CORP.) 2008.07.10 요약; 단락 [0019], [0039]; 청구항 1 참조.	1-4
A	KR 10-2013-0063887 A (영남대학교 산학협력단) 2013.06.17 요약; 청구항 1-3, 6-8 참조.	1-4
A	US 2013-0108819 A1 (GUEZENNEC, JEAN) 2013.05.02 요약; 청구항 18-19, 38-39 참조.	1-4
A	KR 10-2013-0116440 A (동국대학교 산학협력단) 2013.10.24 요약; 청구항 4-5 참조.	1-4
A	ALI, AFSAR 등, "Sugars inhibit expression of the rugose phenotype of Vibrio cholerae", Journal of clinical microbiology, 2005, 43권, 3호, 페이지 1426-1429 요약; 페이지 1427 참조.	1-4

☐ 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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 01월 26일 (26.01.2016)	2016년 01월 27일 (27.01.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
이정아
전화번호 +82-42-481-8740

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/010913

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 5
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제5항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 해당하는 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/010913

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2008-156308 A	2008/07/10	없음	
KR 10-2013-0063887 A	2013/06/17	KR 10-1333339 B1	2013/11/27
US 2013-0108819 A1	2013/05/02	AU 2011-273425 A1	2013/01/31
		CA 2804193 A1	2012/01/05
		EP 2402403 A1	2012/01/04
		EP 2588544 A1	2013/05/08
		JP 2013-532161 A	2013/08/15
		WO 2012-001164 A1	2012/01/05
KR 10-2013-0116440 A	2013/10/24	없음	