เลขที่อนุสิทธิบัตร 26800

อสป/200 - ข

# อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร ( ฉบับที่ 3 ) พ.ศ. 2542
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

## มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

| | |
|---|---|
| เลขที่คำขอ | **2303000219** |
| วันขอรับอนุสิทธิบัตร | **27 มกราคม 2566** |
| ผู้ประดิษฐ์ | **นางสาวอมรรัตน์ เกิดแก้ว เคร็นซ์ และคณะ** |
| ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ | **แอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวี (scFv) ที่โมเลกุลเป็นของหนูจับจำเพาะกับแอนติเจนที่เป็นเปปไทด์ของโปรตีนรอฟฟิลินจากพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ คัดเลือกด้วยวิธีการไบโอแพนนิ่งจากคลังแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์** |

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ **25 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2568**

หมดอายุ ณ วันที่ **26 เดือน มกราคม พ.ศ. 2572**

(นายอาวุธ วงศ์สวัสดิ์)
รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรนี้จะสิ้นอายุ
2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 คราว มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

Ref.256801090574382

## รายละเอียดการประดิษฐ์

### ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

แอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวี (scFv) ที่โมเลกุลเป็นของหนูจับจำเพาะกับแอนติเจนที่เป็นเปปไทด์ของโปรตีนรอฟฟิลินจากพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ คัดเลือกด้วยวิธีการไบโอแพนนิ่งจากคลังแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์

### ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

ลักษณะของการประดิษฐ์ที่คิดขึ้นพอสังเขป คือ ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวี (scFv; single-chain variable fragment) ที่โมเลกุลเป็นของหนูและมีเฉพาะส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนคือวีเอช (VH; variable domain of heavy-chain) และวีแอล (VL; variable domain of light-chain) ต่อกันด้วยเปปไทด์ลิ้งเก้อร์ (VH-linker-VL) ที่จับจำเพาะกับแอนติเจนชนิดเปปไทด์สายสั้นซึ่งเป็นส่วนหนึ่งบนโปรตีนรอฟฟิลินของพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ (*Opisthorchis viverrini*) โดยมีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ ลิวซีน-วาลีน-แอสพาราจีน-กรดแอสปาร์ติก-โปรลีน-ไทโรซีน-ไทโรซีน-ซีสเทอีน-ฮีสทีดีน-กรดกลูตามิก-กลูตามีน (Leucine-Valine-Asparagine-Aspartic acid-Proline-Tyrosine-Tyrosine-Cysteine-Histidine-Glutamic-acid-Glutamine) ซึ่งมีความแตกต่างจากลำดับโปรตีนชนิดเดียวกันที่พบในพยาธิปากขอ พยาธิลำไส้ขนาดเล็ก พยาธิตืด และพยาธิปอด โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ ได้ถูกคัดเลือกมากจากคลังฟาจ (Phage) ที่มีโมเลกุลของแอนติบอดีชนิด เอสซีเอฟวี (เรียกว่าฟาจเอสซีเอฟวี; scFv-phage) ด้วยวิธีไบโอแพนนิ่ง (Biopanning)

ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้ คือ นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวีที่จับจำเพาะกับเปปไทด์สายสั้นของโปรตีนรอฟฟิลิน ไปตรวจหาพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิจากอุจจาระของสัตว์หรือคนที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ

### สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

วิทยาภูมิคุ้มกันระดับโมเลกุล ปรสิตวิทยา และอณูชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวีที่โมเลกุลเป็นของหนู

### ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

พยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ เป็นปรสิตของคนโดยตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีของตับ ก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่บริเวณตับและท่อน้ำดี เช่น ท่อน้ำดีอักเสบ นิ่วในถุงน้ำดี เป็นต้น ในกรณีที่มีการติดเชื้อรุนแรงและเป็นระยะเวลานานสามารถนำไปสู่มะเร็งท่อน้ำดีได้ สาเหตุของการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้มาจากการรับประทานปลาน้ำจืดมีเกล็ดแบบสุกๆ ดิบๆ เช่น ลาบ ก้อย ปลาร้า เป็นต้น อาหารเหล่านี้เป็นอาหารพื้นบ้านของประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งจากรายงานพบว่าประชาชนในแถบนี้มีอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสูงสุด การรักษาสามารถทำได้โดยการให้ยาชนิดพราซิควอนเทล มีรายงานการใช้ยาพราซิควอนเทลซ้ำๆ เป็นระยะเวลานานๆ สามารถกระตุ้นการเกิดมะเร็งได้เช่นกัน การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสามารถทำได้โดยการตรวจหาไข่ของ

26800



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

พยาธิในอุจจาระภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ความชำนาญของผู้ตรวจวินิจฉัย เนื่องจากไข่ของพยาธิใบไม้ตับนี้มีความคล้ายคลึงอย่างมากกับไข่ของพยาธิในลำไส้ขนาดเล็ก การติดเชื้อพยาธิในปริมาณน้อยๆ อาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบไข่ของพยาธิในอุจจาระได้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยอื่นๆ ดังนี้

การตรวจหาดีเอ็นเอของพยาธิด้วยวิธีโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นวิธีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของพยาธิให้เพิ่มขึ้นในหลอดทดลอง โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของพยาธิ ทำให้สามารถตรวจหาปริมาณของดีเอ็นเอของพยาธิได้แม้มีปริมาณน้อย ซึ่งมีงานวิจัยอย่างหลากหลายในการเลือกหาบริเวณของยีนที่มีความจำเพาะกับพยาธิใบไม้ตับ เช่น ยีนไอทีเอสทู (ITS-2) ยีนค็อกวัน (COX-1) ยีนไซโตโครมบี (cytochrome b) เป็นต้น ข้อจำกัดของการตรวจด้วยวิธีนี้ คือ การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่ตรวจพบในอุจจาระ เนื่องจากไพรเมอร์ไม่สามารถแยกความจำเพาะได้ หรือสารยับยั้งที่พบในอุจจาระทำให้ขัดขวางปฏิกิริยาในหลอดทดลองทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพยาธิได้

การตรวจด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การตรวจหาแอนติเจนและการตรวจหาแอนติบอดี การตรวจหาแอนติเจนสามารถบ่งบอกได้ว่าเป็นการติดเชื้อในปัจจุบันซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการรักษามากกว่าการตรวจหาแอนติบอดี (แอนติบอดีไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นการติดเชื้อในปัจจุบัน) มีงานวิจัยอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับชนิดของโปรตีนเป้าหมายที่นำมาใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยด้วยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น โปรตีนจากเปลือกไข่ โปรตีนจากสารคัดหลั่งของพยาธิ หรือโปรตีนที่อยู่บนผิวของพยาธิ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นการนำซีรัมของคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อมาทดสอบการจับกับโปรตีนเป้าหมายดังกล่าว การให้ได้มาซึ่งซีรัมต้องมีการเจาะเลือดและนำมาปั่นแยกเพื่อให้ได้ส่วนของซีรัมสำหรับการทดสอบ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความเจ็บปวดเกิดขึ้น จากการพัฒนางานวิจัยของเราพบว่ามีโปรตีนรอฟฟิลินของพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ ถูกพบในอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิ โปรตีนรอฟฟิลินเป็นโปรตีนที่พบบริเวณสเปิร์มของพยาธิและถูกหลั่งออกมาพร้อมกับสเปิร์มรวมกับน้ำดีผ่านเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ที่ติดเชื้อและถูกตรวจพบในอุจจาระ โปรตีนรอฟฟิลินสามารถจับกับแอนติบอดีของคนที่ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ได้ซึ่งบ่งบอกถึงความเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ที่ดี โดยจากงานวิจัยของเราพบว่าบริเวณของโปรตีนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการนำไปพัฒนาการตรวจวินิจฉัย คือ บริเวณปลายด้านเริ่มต้นของโปรตีน (N-terminus) ซึ่งสามารถระบุความแตกต่างของซีรัมจากคนที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิออกจากคนที่ติดเชื้อพยาธิปากขอ พยาธิลำไส้ขนาดเล็ก พยาธิตืด และพยาธิปอด ได้ ด้วยเทคนิคอินไอเร็คอิไรซา (indirect ELISA) ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนรอฟฟิลินที่นำมาทดสอบกับซีรัมของคนที่ติดเชื้อพยาธิ คือ ลิวซีน-วาลีน-แอสพาราจีน-กรดแอสปาร์ติก-โปรลีน-ไทโรซีน-ไทโรซีน-ซีสเทอีน-ฮีสทีดีน-กรดกลูตามิก-กลูตามีน (Leucine-Valine-Asparagine-Aspartic acid-Proline-Tyrosine-Tyrosine-Cysteine-Histidine-Glutamic-acid-Glutamine) จึงนำไปสู่การผลิตโมโนโคลนอล

NSC 00000



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

แอนติบอดีที่มีเฉพาะส่วนที่จับกับกับเปปไทด์สายสั้นดังกล่าว และนำไปพัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิจากอุจจาระด้วยเทคนิคอินไอเร็คอิไรซา

คลังแอนติบอดี (antibody library) ที่ใช้คัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวีที่จับจำเพาะกับเปปไทด์สายสั้นของโปรตีนรอฟฟิลิน เป็นผลงานประดิษฐ์โดย อ.ดร.จีระพงษ์ ทะนงศักดิ์ศรีกุล, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจนีย์ ศรีมาโนชญ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ผ่องศรี ทองทวี ชื่อผลงาน "การผลิตแอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวีที่โมเลกุลเป็นของหนูจับจำเพาะกับอิพิโทปตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 131 ถึง 161 บนโปรตีนวีพีสองของเชื้อไวรัสเอนเทอโร 71 คัดเลือกด้วยวิธีการไบโอแพนนิ่งจากคลังแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์" ซึ่งได้ยื่นขอสิทธิบัตรเมื่อ วันที่ 4 มกราคม 2560 เลขที่คำขอ 1701000012 คลังแอนติบอดีนี้ประกอบไปด้วยแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) หรือเรียกแบบย่อว่า ฟาจ (phage) ชนิดเอ็มสิบสาม (M13) ซึ่งเป็นไวรัสของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) ที่ผ่านการปรับปรุงทางพันธุวิศกรรม (genetic engineering) ให้บนผิวของอนุภาคฟาจแสดงโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวี โดยที่แอนติบอดีเอสซีเอฟวีเชื่อมติดบนผิวฟาจโดยยึดกับโปรตีนจีสาม (gIII) ที่ปกคลุมบนผิวฟาจ ฟาจแต่ละอนุภาคจะแสดงแอนติบอดีเอสซีเอฟวีที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน จำนวนอนุภาคฟาจทั้งหมดในคลังแอนติบอดีนี้รวมความหลากหลายของแอนติบอดี (antibody diversity) ไว้สูงถึง $10^8$ ชนิด เทียบเท่ากับคลังแอนติบอดีที่เคยมีการศึกษามาและเพียงต่อการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวีที่จับจำเพาะกับแอนติเจน (antigen) ที่หลากหลายได้แม้ว่าจะใช้คลังแอนติบอดีเดียวกัน ทั้งนี้แอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวีที่จับจำเพาะกับเปปไทด์สายสั้นของโปรตีนรอฟฟิลินของพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินียังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

<u>คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ</u>

**รูปที่ 1ก** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอสซีเอฟวีแอนติบอดีโคลนหมายเลข 19 (scFv#19) ประกอบไปด้วยส่วนของวีเอช (VH) ลิงเกอร์ (linker) และวีแอล (VL)

**รูปที่ 1ข** แสดงกรดอะมิโนของเอสซีเอฟวีแอนติบอดีโคลนหมายเลข 19 (scFv#19) ประกอบไปด้วยส่วนของวีเอช (VH) และวีแอล (VL)

**รูปที่ 2** การทดสอบเอสซีเอฟวีแอนติบอดีกับอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ ด้วยเทคนิคอินไอเร็คอิไรซา

อุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ก่อนติดเชื้อ (กลุ่ม 0 สัปดาห์) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมลบ และอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ 12 สัปดาห์ อย่างละจำนวน 3 ตัวอย่าง ถูกนำมาสกัดเพื่อให้ได้แอนติเจนที่ละลายน้ำ (coproantigen) และเคลือบบนหลุมของเพลทอีไลซ่า จากนั้นเติมฟาจเอสซีเอฟวีแอนติบอดีที่ผลิตได้ลงไป และตามด้วยแอนติบอดีตัวที่สองที่มีเอนไซม์จับอยู่ เติมสับสเตรตที่จำเพาะต่อเอนไซม์แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น โดยค่าการดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์กับปริมาณของการจับกันระหว่างแอนติเจน (โปรตีนสกัดจากอุจจาระ) และฟาจเอสซีเอฟวีแอนติบอดี โดย



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ค่าการดูดกลืนแสงของของแอนติบอดีกับโปรตีนสกัดจากอุจจาระของกลุ่ม 12 สัปดาห์มีค่าเฉลี่ยมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม 0 สัปดาห์ (กลุ่มควบคุมลบ)

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

การผลิตแอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวีที่โมเลกุลเป็นของหนูจับจำเพาะกับแอนติเจนที่เป็นเปปไทด์จากโปรตีนรอฟฟิลินของพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ (ลำดับกรดอะมิโน คือ ลิวซีน-วาลีน-แอสพาราจีน-กรดแอสปาร์ติก-โปรลีน-ไทโรซีน-ไทโรซีน-ซีสเทอีน-ฮีสทีดีน-กรดกลูตามิก-กลูตามีน) คัดเลือกด้วยวิธีการไบโอแพนนิ่ง (biopanning) จากคลังแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์ มีขั้นตอน ดังนี้

1. เตรียมโปรตีนสกัดจากอุจจาระ (coproantigen) ของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ ได้ดัดแปลงมาจากวิธีที่เปิดเผยมาก่อน (Mazidur Rahman et al, 2012) กล่าวคือ นำอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ก่อนติดเชื้อ (กลุ่ม 0 สัปดาห์) และ อุจจาระหนูที่ติดเชื้อพยาธิเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ (กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง) มาปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นบด (homogenizer) ในสารละลายที่มีส่วนประกอบของ 0.01 โมลาร์ พีบีเอส (PBS) และ 0.05% ทะวีน (Tween) โดยมีอัตราส่วนอุจจาระต่อสารละลาย เป็น 1 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเฉพาะส่วนใสด้านบนสำหรับการทดสอบ โดยสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลา 2 เดือน

2. การทำฟาจไบโอแพนนิง (biopanning) แบบหลายรอบเพื่อคัดเลือกโคลนของฟาจที่แสดงเอสซีเอฟวีแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนเปปไทด์ **เป็นวิธีที่ผู้ประดิษฐ์ออกแบบเอง** มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำสารละลายอุจจาระของของหนูแฮมสเตอร์ก่อนติดเชื้อ (กลุ่ม 0 สัปดาห์) สารละลายอุจจาระของของหนูแฮมสเตอร์ติดเชื้อพยาธิเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ และเปปไทด์ อย่างละปริมาณ 1 ไมโครกรัม (microgram) แยกผสมกับสารละลายพีบีเอส (PBS) รวมปริมาตร 100 ไมโครลิตร (microliter) แล้วใส่ลงในแต่ละหลุมของเพลทอีไลซ่า (ELISA plate) จากนั้นนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสารลายแห้งและเคลือบอยู่บนหลุมของเพลทอีไลซ่า

2.2 ล้างหลุมด้วยสารละลายพีบีเอสที (PBS-T) คือสารละลายพีบีเอสที่มีทะวีนยี่สิบ (Tween-20) ผสมอยู่ 0.05% โดยเติมสารละลายพีบีเอสทีปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วดูดขึ้นลง 20 ครั้ง ทำซ้ำ 1 รอบแล้วดูดสารละลายทิ้ง จากนั้น เติมสารละลายโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องคือ โปรตีนไข่ขาวจากซีรัมวัว (bovine serum albumin) หรือเรียกว่าโปรตีนบีเอสเอ (BSA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อคลุมพื้นที่ว่างไม่ให้มีการยึดเกาะด้วยแอนติบอดีที่จะใส่ในขั้นตอนต่อไป (Blocking)

2.3 เติมคลังแอนติบอดีซึ่งมีฟาจจำนวน $10^{9}$ อนุภาคลงไปหลุมที่เคลือบด้วยสารละลายอุจจาระของของหนูแฮมสเตอร์ก่อนติดเชื้อ แล้วนำเพลาอีไลซ่านี้ไปไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

2.4 ดูดคลังแอนติบอดีซึ่งมีฟาจเอสซีเอฟวีที่ไม่จับกับแอนติเจนอุจจาระไปเติมลงในหลุมที่เคลือบด้วยเปปไทด์แล้วนำเพลาอีไลซ่านี้ไปไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.5 ดูดคลังแอนติบอดีซึ่งมีฟาจเอสซีเอฟวีที่ไม่จับกับแอนติเจนเปปไทด์ทิ้ง ล้างหลุมด้วยสารละลายพีบีเอสที 3 ครั้ง

2.6 ทำให้ฟาจที่จับกับแอนติเจนเปปไทด์ที่เคลือบบนหลุมเพลทอีไลซ่าหลุดออกมาด้วยสารละลายทริปซิน (trypsin) ซึ่งจะไปตัดตรงจุดตัดจำเพาะเอนไซม์บริเวณระหว่างเอสซีเอฟวี และโปรตีนของฟาจชนิดจีสาม (gIII phage protein)

2.7 นำฟาจเอสซีเอฟวีที่หลุดออกมาไปใส่ *E. coli* สายพันธุ์เอ็กซ์แอล-1 บลู (XL-1 Blue) ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียลูเรียเบอร์ทานีชนิดเหลว จนถึงระยะล็อกเฟส (log-phase) ของการเพิ่มจำนวน ปล่อยให้ฟาจนำเอาฟาจมิดพีเอสอีเอ็กซ์ 81 (pSEX81) ที่มียีนเอสซีเอฟวีเข้าเซลล์แบคทีเรีย ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.8 จากนั้นนำแบคทีเรียไปกระจายบนผิวของอาหารเพาะเลี้ยงชนิดลูเรียเบอร์ทานีครึ่งแข็งครึ่งเหลว (อะการ์) ที่มีแอมพิซิลลินผสมอยู่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ถูกทรานซฟอร์ม (transformants) จะสามารถเจริญเติบโตเป็นโคโลนีบนอาหารชนิดนี้ได้

2.9 นำแบคทีเรียแต่ละโคโลนีไปตรวจกรองเพื่อหาว่าโคโลนีใดมีฟาจมิดที่มียีนของแอนติบอดีเอสซีเอฟวีเชื่อมอยู่ในฟาจมิดพีเอสอีเอ็กซ์ 81 (pSEX81) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (พีซีอาร์) โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จับจำเพาะกับลำดับนิวคลิโอไทด์ฟาจมิดพีเอสอีเอ็กซ์ 81 (pSEX81) ซึ่งเป็นบริเวณที่คร่อมลำดับนิวคลิโอไทด์ของเอสซีเอฟวีคือ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์พีอีแอลบี (pelB) และรีเวอร์สไพรเมอร์จีสาม (gIII) จากนั้นนำแอมพลิคอนของพีซีอาร์ไปตรวจหาผลิตภัณฑ์ของลำดับนิวคลิโอไทด์ของเอสซีเอฟวี (*scfv* sequences) ด้วยอีเล็คโทรโฟเรซีสในเจลชนิดอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) ซึ่งเมื่อรวมกับส่วนของฟาจมิดที่ติดมาด้วยแล้วจะมีขนาด 900 ถึง 1000 เบสคู่สม (base pairs)

2.10 นำ *E. coli* สายพันธุ์เอ็กซ์แอล-1 บลู (XL-1 Blue) ที่ถูกทรานซฟอร์ม (transformed) ด้วยฟาจมิดพีเอสอีเอ็กซ์ 81 (pSEX81) ที่มียีนของแอนติบอดีเอสซีเอฟวีเชื่อมต่ออยู่ไปเลี้ยงในอาหารลูเรียเบอร์ทานีชนิดเหลวที่มีแอมพิซิลลิน (ampicillin) ผสมอยู่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จนถึงระยะล็อกเฟส (log-phase) ของการเพิ่มจำนวน จากนั้นเติมฟาจชนิดทั่วไป (wild-type) เอ็มสิบสามเคโอเจ็ด (M13KO7) ลงไปให้เป็นสัดส่วนของจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่ออนุภาคฟาจ 1 ต่อ 20 เลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

จากนั้นปั่นตกแบคทีเรียแล้วดูดอาหารเก่าทิ้ง จากนั้นใส่อาหารลูเรียเบอร์ทานีชนิดเหลว ที่มีแอมพิซิลลิน ผสมอยู่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ กานามัยซิน (kanamycin) ผสมอยู่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลับเข้าไป แล้วเลี้ยงต่อไปที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เพื่อให้ *E. coli* ผลิตอนุภาคฟาจเอสซีเอฟวีออกมา เรียกขั้นตอนนี้ว่า การกู้ฟาจ (phage rescuing)

2.11 ปั่นเก็บแยกสารละลายที่มีอนุภาคฟาจเอสซีเอฟวีจากเซลล์ *E. coli* ด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.12 นำฟาจเอสซีเอฟวีที่เตรียมได้จากแต่ละโคลนด้วยวิธีการกู้ฟาจที่ไปวัดปริมาณอนุภาคฟาจโดยเจือจางสารละลายฟาจเอสซีเอฟวีเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า จากนั้นนำสารละลายฟาจเอสซีเอฟวีแต่ละการเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปผสมกับ 200 ไมโครลิตรของแบคทีเรียสายพันธุ์เอ็กซ์แอล-1 บลู (XL-1 Blue) ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงชนิดเหลวจนถึงระยะล็อกเฟส (log-phase) ของการเพิ่มจำนวน ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดกระจายบนผิวของอาหารเพาะเลี้ยงชนิดลูเรียเบอร์ทานีครึ่งแข็งครึ่งเหลว (อะการ์) ที่มีแอมพิซิลลินผสมอยู่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ถูกติดเชื้อด้วยฟาจเอสซีเอฟวีจะสามารถเจริญเติบโตเป็นโคโลนีบนอาหารชนิดนี้ได้ จากนั้นนับและคำนวณไตเตอร์ (titers) ฟาจเอสซีเอฟวีเป็นโคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร (colony forming unit/mL) ผสมฟาจเอสซีเอฟวีในสารละลายที่มีกลีเซอรัลร้อยละ 30 จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

2.13 วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของสายดีเอนเอที่เป็นรหัสพันธุกรรมของเอสซีเอฟวีแอนติบอดี การทำนายส่วนอิมมิวโนโกลบูลินเฟรมเวิร์ค (immunoglobulin frameworks) หรือ เอฟอาร์ (FRs) และส่วนคอมพลีเมนทาริทีดีเทอร์มินิงรีเจียน (complementarity-determining regions) หรือ ซีดีอาร์ (CDRs) โดยใช้ฐานข้อมูลเซิร์ฟเวอร์ของระบบนานาชาติ อิมมูโนเจนีติกส์อินฟอร์เมชัน (international ImMunoGeneTics information system; IMGT) ทำการทำนายเอฟอาร์ (FRs) และซีดีอาร์ (CDRs) ทำให้ทราบลำดับกรดอะมิโนของส่วนที่เป็นอิมมิวโนโกลบูลินเฟรมเวิร์คและซีดีอาร์ของแอนติบอดีสายเดี่ยวที่จับแอนติเจนเปปไทด์จากแบคทีเรียแต่ละโคลน

3. การทดสอบการจับของฟาจเอสซีเอฟวีแอนติบอดีโคลนหมายเลข 19 กับโปรตีนสกัดจากอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ กลุ่ม 0 สัปดาห์ (กลุ่มควบคุมลบ) และ 12 สัปดาห์ ด้วยเทคนิคอินไอเร็คอิไรซา ซึ่งผู้ประดิษฐ์ได้ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน โดยเป็นสภาวะที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดสอบ

3.1 เคลือบหลุมเพลทสำหรับทดสอบด้วยโปรตีนสกัดจากอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์แต่ละตัวอย่าง ที่อัตราส่วน 1:5 ในสารละลายบัฟเฟอร์ (coating buffer) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.2 เทสารละลายในหลุมทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 400 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลายบีเอสเอ (BSA) ความเข้มข้น 0.25% น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

3.3 เทสารละลายในหลุมทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 400 ไมโครลิตร จากนั้นเติมฟาจเอสซีเอฟวีแอนติบอดีซึ่งมีฟาจจำนวน $10^9$ อนุภาค ผสมในสารละลายพีบีเอสรวมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4 เทสารละลายในหลุมทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 400 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลายแอนติบอดีตัวที่สอง คือ Anti-mouse antibody conjugated HRP ที่อัตราส่วน 1:4,000 ในสารละลายสารละลายบีเอสเอ ตามข้อ (4.2) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.5 เทสารละลายในหลุมทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 400 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สับสเตรด TMB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

**<u>ผลการประดิษฐ์มีดังนี้</u>**

1. มีวิธีคัดเลือกฟาจที่มีความสามารถในการผลิตเอสซีเอฟวีแอนติบอดีต่อกับเปปไทด์ของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis vivierrini* ได้ โดยใช้เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* XL-1blue เป็นโฮสต์ ลำดับดีเอ็นเอและลำดับกรดอะมิโนของแอนติบอดีดังแสดงในรูป 1ก และ 1ข โดยทราบลำดับยีนวีเอช (*vh*) และวีแอล (*vl*) ของเอสซีเอฟวี (scFv) จากฟาจเอสซีเอฟวี (scFv-phage) หมายเลข 19 (scFv#19) ซึ่งมีความสมบูรณ์ของการเป็นอิมมิวโนโกลบูลิน (immunoglobulin) กล่าวคือ มีส่วนอิมมิวโนโกลบูลินเฟรมเวิร์ค (framework; FR) ครบทั้ง 4 ส่วนและส่วนคอมพลีเมนทาริทีดีเทอร์มินิงรีเจียน (complementarity determining region, CDR) ครบทั้ง 3 ส่วน

2. มีฟาจเอสซีเอฟวี (scFv-phage) จำนวน 1 โคลนคือเอสซีเอฟวีหมายเลข 19 (scFv#19) ที่จับกับเปปไทด์ที่ใช้เป็นแอนติเจน และสามารถจับกับตัวอย่างโปรตีนสกัดจากอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ เปรียบเทียบกับโปรตีนสกัดจากอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ที่ไม่ติดเชื้อพยาธิ จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยมีความแตกต่างกันมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เท่า จำนวนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 2

**<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>**

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

## ข้อถือสิทธิ

1. แอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวี (scFv) ที่โมเลกุลเป็นของหนูจับจำเพาะกับแอนติเจนที่เป็นเปปไทด์ของโปรตีนรอฟฟิลินจากพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ คัดเลือกด้วยวิธีการไบโอแพนนิ่งจากคลังแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์ ที่ซึ่งได้แอนติบอดีเอสซีเอฟวีโคลนเอสซีเอฟวีหมายเลข 19 (scFv#19) ทั้งที่อยู่ในรูปแบบฟาจเอสซีเอฟวีหรือแอนติบอดีรูปแบบอื่น ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ

gaggtgaagctggtggaatctgggggaggcttagtgcagcctggagggtcccggaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtgactacgg
aatggcgtgggttcgacaggctccagggaaggggcctgagtgggtagcattcattagtaatttggcatatagtatctactatgcagacactgtgacggg
ccgattcaccatctctagagagaatgccaagaacaccctgtacctggaaatgagcagtctgaggtctgaggacacagccatgtactactgtgcaaggg
ggggaaactactttgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcagggagtgcatccgccccaaagcttgaagaaggtgaattttcagaa
gcacgcgtagatattgtgataacccagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgtaagtt
acatgcactggtaccagcagaagtcaggcacctcccccaaaagatggatttatgacacatccaaactggcttctggagtccctgctcgcttcagtggca
gtgggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtggagtagtaacccgctcacgtt
cggtgctgggaccaagctggagctgaaa

และกรดอะมิโนคือ

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMAWVRQAPGKGPEWVAFISNLAYSIYY
ADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCARGGNYFDYWGQGTTLTVSSGSAS
APKLEEGEFSEARVDIVITQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRW
IYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

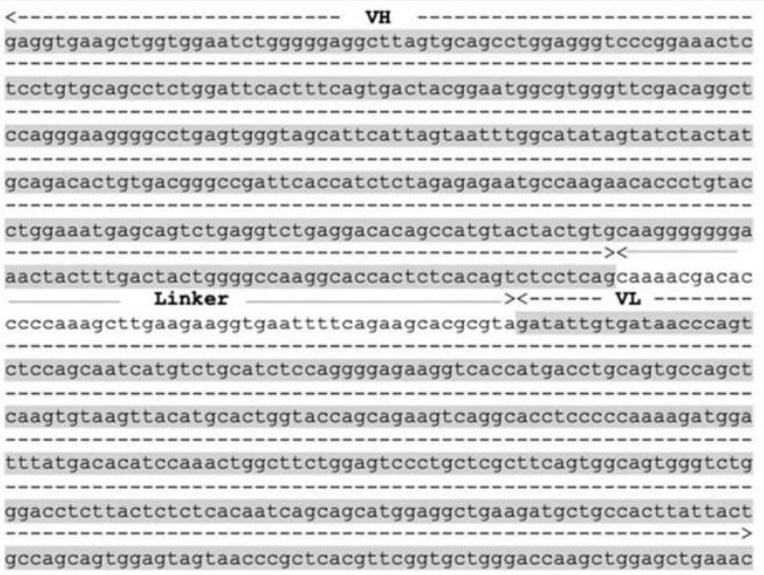
NOOOO



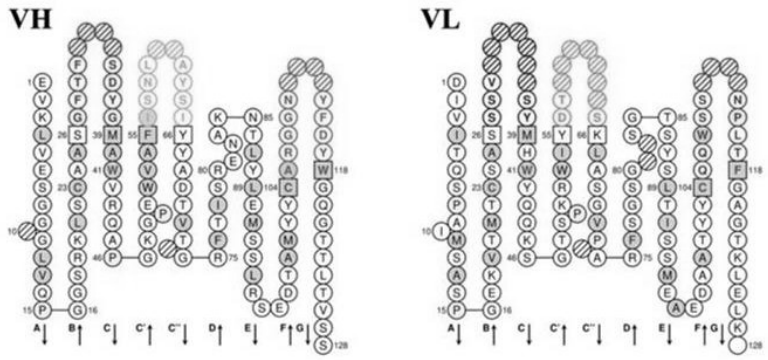
นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ก




ข




รูปที่ 1

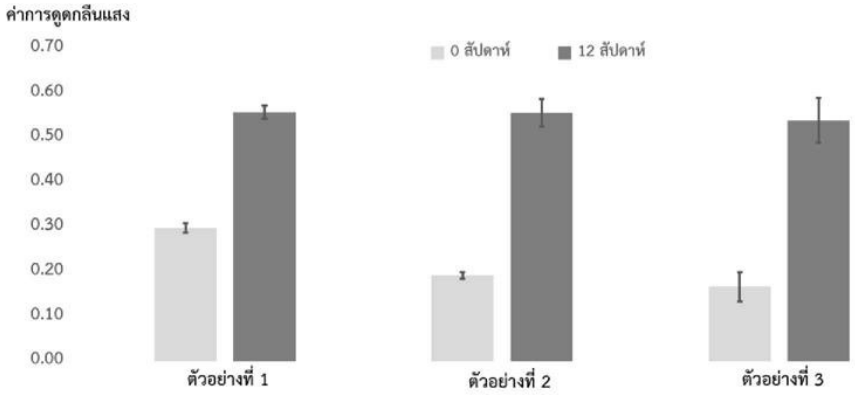
2303000219



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

หน้า 2 ของจำนวน 2 หน้า




รูปที่ 2

2303000219



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

## บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้ใช้เปปไทด์ของโปรตีนรอฟฟิลินจากพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ ที่มีลำดับกรดอะมิโน เป็น ลิวซีน-วาลีน-แอสพาราจีน-กรดแอสปาร์ติก-โปรลีน-ไทโรซีน-ไทโรซีน-ซีสเทอีน-ฮีสทีดีน-กรดกลูตามิก-กลูตามีน เป็นแอนติเจนเป้าหมายไปคัดเลือกฟาจที่อนุภาคชูโมเลกุลเอสซีเอฟวีแอนติบอดี (single-chain variable fragment; scFv, antibody) ที่โมเลกุลเป็นของหนูและมีเฉพาะส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนคือวีเอช (VH; variable domain of heavy-chain) และวีแอล (VL; variable domain of light-chain) ต่อกันด้วยเปปไทด์ลิ้งเก้อร์ ด้วยวิธีการไบโอแพนนิ่งจากคลังแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์ ฟาจเอสซีเอฟวีที่คัดเลือกมาได้สามารถจับจำเพาะกับแอนติเจนซึ่งอยู่ในโปรตีนสกัดจากอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิ ซึ่งจะได้นำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อพัฒนาการตรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิสวิเวอร์รินิในอุจจาระ

26800

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA