



เลขที่อนุสิทธิบัตร 21334

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

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

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ชื่อสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ 1903001882
วันขอรับอนุสิทธิบัตร 24 ตุลาคม 2561
ผู้ประดิษฐ์ นางสาวรัชนีวรรณ อุ่นแพทย์ และ นางสาวณัฐภรณ์ กลับทวี
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น

21334

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 5 เดือน เมษายน พ.ศ. 2566
หมดอายุ ณ วันที่ 23 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2567



รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

- หมายเหตุ
- ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรนี้จะสิ้นสุดอายุ
 - ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
 - ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นสุดอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 ครั้ง มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
 - การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่



Ref.256601024352600

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

5 เทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนได้ทวีความรุนแรงมากขึ้นและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกลายเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขของโลก วิกฤตการณ์การติดเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพได้คร่าชีวิตประชากรโลกในแต่ละปีสูงถึง 700,000 คน หากไม่เร่งดำเนินการแก้ไขคาดว่าในปี 10 พ.ศ. 2593 จะมีอัตราการเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาสูงถึง 10 ล้านคน ซึ่งคิดเป็นผลกระทบทางเศรษฐกิจสูงถึง 3.5 พันล้านล้านบาท ในประเทศไทยมีผู้ป่วยติดเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพปีละมากกว่า 100,000 ราย และมีอัตราการเสียชีวิตมากกว่า 30,000 ราย นอกจากนี้ยังทำให้ผู้ป่วยต้องใช้เวลาในการรักษาในโรงพยาบาลนานขึ้น ซึ่งทำให้สูญเสียทรัพยากรจากการติดเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพมากกว่า 40,000 ล้านบาทหรือมากกว่าร้อยละ 0.6 ของผลิตภัณฑ์มวลรวมในประเทศ

15 เชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ (antimicrobial resistance) คือ เชื้อแบคทีเรียที่เคยไวต่อยาปฏิชีวนะมาก่อนเกิดการกลายพันธุ์ เมื่อเชืวดังกล่าวสัมผัสกับยาปฏิชีวนะแล้ว ยาไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียนั้นได้เหมือนเดิม ทำให้การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะไม่มีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องให้ยาหลายชนิดร่วมกันหรือใช้ในปริมาณมากขึ้น ทำให้เกิดพิษต่อผู้ป่วยและมีผลข้างเคียงมากอีกด้วย สาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาด้านจุลชีพมาจากการใช้ยาด้านจุลชีพที่มากขึ้น ทั้งการใช้เกินความจำเป็นและไม่ถูกต้อง ซึ่งเร่งให้เชื้อจุลชีพมีการกลายพันธุ์ที่เร็วขึ้น รวมไปถึงการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในสัตว์จากการใช้ยาปฏิชีวนะในภาคการผลิตอาหารสัตว์ ตลอดจนการสะสมบนเบื่อนในแหล่งน้ำ เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยได้แก่ 1) เชื้อซูโดโมนาส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) เป็นกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคที่พบได้บ่อยที่สุด เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง ทำให้เกิดโรคติดเชื้อหลายระบบของร่างกาย ได้แก่ การติดเชื้อในกระแสเลือด ภาวะปอดติดเชื้อ การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อ 25 บริเวณแผลผ่าตัด การติดเชื้อเหล่านี้มักส่งผลกระทบต่อผู้ที่กำลังป่วยอยู่ในโรงพยาบาลโดยเฉพาะในกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือการรักษาระยะยาว นอกจากนี้ เชื้อดังกล่าวมีการพัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น ได้แก่ ดื้อต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides), กลุ่มเซฟาโลสปอริน (cephalosporins), กลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolones), และกลุ่มคาร์บาเพเนม (carbapenems) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะตัวสุดท้ายที่ใช้ในการรักษา 2) เชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส อี피เดอร์มิติส (*Staphylococcus epidermidis*) ปกติพบเป็นเชื้อประจำ 30 ถิ่น (normal flora) ที่ผิวหนัง โพรงงูม รูขุมและทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย ในอดีตไม่ค่อยเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ แต่ในปัจจุบันมีการใช้สายสวน (catheters) และ อวัยวะเทียม (prosthesis) กันมากขึ้น จึงพบว่าเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิติส มีความสำคัญในการก่อการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้น ส่วนมากมักพบเชื้อบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือก (mucosa) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 35 ผู้ป่วยที่ใส่สายสวนปัสสาวะเป็นเวลานาน และติดเชื้อบริเวณลิ้นหัวใจ (endocarditis) ในผู้ใช้ลิ้นหัวใจเทียม (prosthetic valves) และผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น (intravenous drug abuser) นอกจากนี้ยากต่อการรักษา เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอน โดยพบการดื้อยาต่อกลุ่ม penicillinase-resistant penicillin และ cephalosporin มากกว่าเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส

ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) อีกด้วย จะเห็นได้ว่า การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพที่มีอยู่ลดลงและไม่มียาต้านจุลชีพชนิดใหม่มาทดแทน ทำให้ปัญหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนดื้อยาทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการคิดค้นและพัฒนายาต้านจุลชีพชนิดใหม่ เพื่อใช้เป็นยารักษาหรือใช้ร่วมในการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5

เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) เป็นเปปไทด์ที่มีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันตัวของร่างกายต่อการบุกรุกของเชื้อจุลชีพก่อโรคในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมถึงมนุษย์ เปปไทด์ต้านจุลชีพเปรียบเสมือนเป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกที่สามารถทำลายเชื้อจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมที่มีประสิทธิภาพและมีกลไกการทำลายเชื้อจุลชีพแตกต่างจากยาปฏิชีวนะ ดังนั้นเปปไทด์จึงเป็นความหวังใหม่ในการนำไปพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพ เพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อและลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลชีพชนิดต่าง ๆ เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 10 ถึง 100 กรดอะมิโน ซึ่งสามารถสร้างได้ตั้งแต่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงทั้งที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง พืช และสัตว์อื่น ๆ รวมไปถึงเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรียอีกด้วย ส่วนใหญ่เปปไทด์ต้านจุลชีพจะมีฤทธิ์แบบกว้าง (broad spectrum) สามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรียแกรมบวกและลบ, เชื้อรา และไวรัส แม้กระทั่งแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียถือเป็นหน้าที่หลักของเปปไทด์ต้านจุลชีพในการปกป้องร่างกายจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม โดยกลไกในการทำลายเชื้อมาจากคุณสมบัติของเปปไทด์ที่มีลักษณะแอมฟิพาธิค (amphipathic) กล่าวคือ มีทั้งด้านมีขั้ว (polar) ชอบน้ำ ซึ่งมักมีประจุรวมเป็นบวก จึงเหมาะสมต่อการเกิดแรงดึงดูดระหว่างขั้ว (electrostatic interaction) ที่แตกต่างกันกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลชีพที่ประกอบด้วยไขมันชนิดที่เป็นประจุลบ และด้านไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่สามารถแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลชีพได้ ทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์อย่างรวดเร็วจนทำให้เชื้อตายในที่สุด เนื่องจากเปปไทด์มีคุณสมบัติอันโดดเด่นในการทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรคที่มีประสิทธิภาพ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเปปไทด์เป็นยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา นอกจากนี้ยังสามารถนำเปปไทด์ต้านจุลชีพไปประยุกต์ใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วยลง และช่วยในการป้องกันการเกิดภาวะดื้อยาที่อาจเกิดขึ้นได้หลังจากมีการใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานานได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

10

15

20

25

การประดิษฐ์นี้ได้ออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซูโดโมแนส แอรจิโนซา ที่มีผลทำให้เกิดโรคติดเชื้อหลายระบบของร่างกาย เช่น กระแสเลือด ปอด ทางเดินปัสสาวะ แผลผ่าตัด เป็นต้น และเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิติส ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ติดเชื้อบริเวณลิ้นหัวใจในผู้ใช้ลิ้นหัวใจเทียมและผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น เปปไทด์ต้านจุลชีพเหล่านี้จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการนำไปใช้เป็นยาร่วมและ/หรือยารักษาโรคติดเชื้อ และลดภาวะดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อไปในอนาคต

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรีย โดยออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้นที่มีความสามารถในการทะลุทะลวงและทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนตายในที่สุด การออกแบบเปปไทด์ที่ใช้การเชื่อมต่อกันของเปปไทด์ 2 ชนิด (hybridization) คือ เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน

35

(Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ลิวซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine) และอาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 12 ตามลำดับ เชื่อมต่อกับเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 11 ตัว ได้แก่ อาร์จินีน (Arginine), ลิวซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine), วาลีน (Valine), ไลซีน (Lysine), ไลซีน (Lysine), วาลีน (Valine), อะลานีน (Alanine) และไกลซีน (Glycine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 11 ตามลำดับ และใช้การตัดลดจำนวนกรดอะมิโน (truncation) โดยคงลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญต่อโครงสร้างอัลฟาไว้ เปปไทด์ที่ปรับปรุงลำดับกรดอะมิโนจากเปปไทด์ดั้งเดิมเรียกว่า เปปไทด์อนุพันธ์ (peptide derivatives) ซึ่งจะนำมาทำการศึกษาโครงสร้างจำลองแบบ 3 มิติ (3D structure) โดยใช้โปรแกรมไอ-แทซเซอร์ (I-TASSER) การศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของเปปไทด์และการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (antimicrobial activity) และ/หรือดีอียา เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมยาต่อไป

โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบันทำการรักษาได้ยากและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตสูงมาก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยา บางสายพันธุ์ยังไม่มียาในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อเหล่านั้นได้ ซึ่งการประดษณนี้ได้มุ่งเน้นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรียอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการใช้เป็นยาด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและ/หรือเพื่อใช้เป็นยาร่วมในการรักษาโรคติดเชื้อ และลดภาวะดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ทำให้มีประโยชน์ทางการแพทย์เป็นอย่างมาก

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 23 ตัว ดังนี้ K1 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 1, I2 คือ ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ อะลานีน (Alanine) ตำแหน่งที่ 3, K4 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, R5 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 5, I6 คือ ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 6, W7 คือ ทริปโตแฟน (Tryptophan) ตำแหน่งที่ 7, K8 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, L10 คือ ลิวซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 10, R11 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 11, R12 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 12, R13 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 13, L14 คือ ลิวซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 14, F15 คือ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 15, R16 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 16, R17 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 17, V18 คือ วาลีน (Valine) ตำแหน่งที่ 18, K19 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 19, K20 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 20, V21 คือ วาลีน (Valine) ตำแหน่งที่ 21, A22 คือ อะลานีน (Alanine) ตำแหน่งที่ 22, และ G23 คือ ไกลซีน (Glycine) ตำแหน่งที่ 23

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 18 ตัว ดังนี้ K1 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 1, I2 คือ ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ อะลานีน (Alanine) ตำแหน่งที่ 3, K4 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, R5 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 5, I6 คือ ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 6, W7 คือ ทริปโตแฟน (Tryptophan) ตำแหน่งที่ 7, K8 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, L10 คือ ลิวซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 10, R11 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 11, R12 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 12, R13 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 13, L14 คือ ลิวซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 14, F15 คือ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 15, R16 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 16, R17 คือ อาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 17 และ V18 คือ วาลีน (Valine) ตำแหน่งที่ 18

รูปที่ 3 แสดงโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 17 ตัว ดังนี้ K1 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 1, I2 คือ ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ อะลานีน (Alanine)

- (Leucine) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 15 ตามลำดับ, เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine) และลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 14 ตามลำดับ และเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine) และอาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2 ถึง 7 ตามลำดับ
- 10 เปปไทด์ที่ออกแบบดังกล่าวข้างต้นถูกสังเคราะห์ขึ้นมาด้วยวิธีการทางเคมี โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยวิทยาศาสตร์ของแข็ง (solid phase peptide synthesis) โดยทำการควบรวมกับเอ็น-9-ฟลูออโรนิลเมทอกซีคาร์บอนิล (Fmoc) และกรดอะมิโนที่ต้องการเข้าด้วยกัน ทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับ (reversed-phase high-performance liquid chromatography) จากนั้น นำไปหาลำดับกรดอะมิโนและทำการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงด้วยวิธีอิเล็กโตรสเปย์ไอออนเซชัน
- 15 แมสสเปกโตรเมทรี (electrospray ionization mass spectrometry) ซึ่งเป็นการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลต่อประจุของไอออนสารตัวอย่างในสถานะไอออน (ionization)

การศึกษาคุณลักษณะของเปปไทด์เกลียวอัลฟาสายสั้น

- เปปไทด์ที่ได้จากการออกแบบในการประดิษฐ์นี้มีลำดับกรดอะมิโน จำนวนกรดอะมิโน สูตรทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล คุณลักษณะความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) และประจุรวมของเปปไทด์ แสดงดังตารางที่ 20
- 20 1 ซึ่งศึกษาโดยใช้โปรแกรมแอนติไมโครเบียลเปปไทด์ แคลคูลเอเตอร์แอนด์พรีดิกเตอร์ (antimicrobial peptide calculator and predictor) ส่วนลักษณะโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ ศึกษาโดยใช้โปรแกรมโอ-แทชเชอร์ แสดงดังรูปที่ 1 ถึง 7 ตามลำดับ

นอกจากนี้ เปปไทด์ที่ได้จากการออกแบบในการประดิษฐ์นี้ไปเชื่อมอยู่กับหมู่เอไมด์ ($-NH_2$) หรือกรดอะมิโนที่เป็นดีเอมิโนเอซิด (D-amino acid) เพื่อให้มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพได้ดียิ่งขึ้น

- 25 การศึกษาคุณสมบัติของเปปไทด์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ
1. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อซูโดโมแนส แอรูจินินา และเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส อีพีเดอร์มิดิสของเปปไทด์ต้านจุลชีพ โดยวิธีไมโคร ไดลูชัน (micro-dilution assay)

- โดยทำการผสมเปปไทด์ 50 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 0.98-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบบเจือจาง 2 เท่า (2-fold dilution) กับเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^6-10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ลงในเพลทเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม (96-well plate) นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที และบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แผลผลโดยดูค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ด้วยตาเปล่า (สังเกตจากในหลุมใส) เรียกว่า Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC
- 30

- การทดสอบนี้พบว่า เปปไทด์อนุพันธ์ทุกตัวที่ได้จากการประดิษฐ์นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งประเภทแกรมลบและแกรมบวก ซึ่งจะเห็นได้ว่าเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว
- 35 ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine) และอาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13

ตามลำดับ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อชิวโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิติส ได้ดีที่สุดในแง่การใช้ความเข้มข้นเพียง 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ที่ได้จากการประดิษฐ์นี้

ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโน จำนวนกรดอะมิโน สูตรทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล ความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) และประจุรวมของเปปไทด์

5

เปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	จำนวนกรดอะมิโน	สูตรทางเคมี	น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมล)	ความไม่ชอบน้ำ	ประจุรวม
10	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 23 ตัว	23	$C_{134}H_{240}N_{47}O_{24}S_0$	2892.659	47%	+11
	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 18 ตัว	18	$C_{112}H_{199}N_{40}O_{19}S_0$	2409.055	50%	+9
15	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 17 ตัว	17	$C_{107}H_{190}N_{39}O_{18}S_0$	2309.922	47%	+9
	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 16 ตัว	16	$C_{101}H_{178}N_{35}O_{17}S_0$	2153.734	50%	+8
20	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว	15	$C_{95}H_{166}N_{31}O_{16}S_0$	1997.546	53%	+7
	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว	14	$C_{86}H_{157}N_{30}O_{15}S_0$	1850.369	50%	+7
25	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว	13	$C_{80}H_{146}N_{29}O_{14}S_0$	1737.209	46%	+7

30

ตารางที่ 2 ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

35

เชื้อแบคทีเรีย	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 23 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 18 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 17 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 16 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	3.91

ATCC 27853							
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91

5 2. การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อซูโดโมนัส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิติสของเปปไทด์ต้านจุลชีพ โดยวิธีการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (colony count assay)

 โดยนำตัวอย่างจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ต้านจุลชีพทุกความเข้มข้นที่มีลักษณะใส หรือความเข้มข้นตั้งแต่ค่า MIC เป็นต้นไป ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มากระจาย (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง

10 เพื่อหาความเข้มข้นของเปปไทด์ต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เรียกว่า Minimum Bactericidal Concentration หรือ MBC แปลผลโดยสังเกตได้จากไม่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงถึงการไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

 การทดสอบนี้พบว่า เปปไทด์ต้านจุลชีพที่ได้จากการประดิษฐ์นี้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งประเภทแกรมลบและแกรมบวกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 7.81 ถึง 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้ เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ลิวซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine) และอาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ มีความสามารถในการฆ่าเชื้อซูโดโมนัส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิติส ได้ดีที่สุดในแง่ของความเข้มข้นเพียง 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ที่ได้จากการประดิษฐ์นี้

15 20

ตารางที่ 3 ค่าการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

เชื้อแบคทีเรีย	ค่า MBC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน
	จำนวน	จำนวน	จำนวน	จำนวน	จำนวน	จำนวน	จำนวน
	23 ตัว	18 ตัว	17 ตัว	16 ตัว	15 ตัว	14 ตัว	13 ตัว
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15.63	15.63	62.5	62.5	15.63	15.63	7.81
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	15.63	7.81	7.81	15.63	7.81	7.81	7.81

25 30

 เนื่องจากเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ลิวซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine) และอาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ มีความสามารถในการยับยั้งการ

35

เจริญเติบโตและฆ่าเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส อีพีเดอร์มิติส ได้ดีที่สุดในเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์อนุพันธ์ตัวอื่นๆ จึงนำเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ดังกล่าวข้างต้นมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เรื้อรังต่อไป

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคือยา ได้แก่ เชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา สายพันธุ์
 5 ต้อยยา และเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส อีพีเดอร์มิติส สายพันธุ์สร้างเยื่อเมือก (ATCC 35984) ของเปปไทด์ที่มี
 กรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน
 (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลิว
 ซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine) และอาร์จินีน (Arginine)
 ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ โดยวิธีไมโคร ไดลูชัน (micro-dilution assay) ตามการทดสอบในข้อที่ 1
 10 การทดสอบนี้พบว่า เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน
 (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ทริปโต
 แฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์
 จินีน (Arginine) และอาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ มีความสามารถในการยับยั้งการ
 15 เจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคือยาได้ดีทั้งเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา สายพันธุ์ต้อยยา และเชื้อสแตฟ
 ฟีโลค็อกคัส อีพีเดอร์มิติส (ATCC 35984) สายพันธุ์สร้างเยื่อเมือก ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 7.81 ไมโครกรัมต่อ
 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine),
 ไอโซลิวซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine),
 ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine),
 อาร์จินีน (Arginine) และอาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ มีความเหมาะสมในการพัฒนา
 20 เป็นทางเลือกใหม่ในการใช้เป็นยาด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคือยาและ/หรือเพื่อใช้เป็นยาร่วมในการรักษาโรค
 ตืดเชื้อต่อไป

ตารางที่ 4 ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคือยาของเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13
 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine),
 ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ลูซีน
 25 (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine) และอาร์จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13
 ตามลำดับ

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคคือยา	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
Multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.81
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	7.81

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์



นายสุรชัย บุญอารี

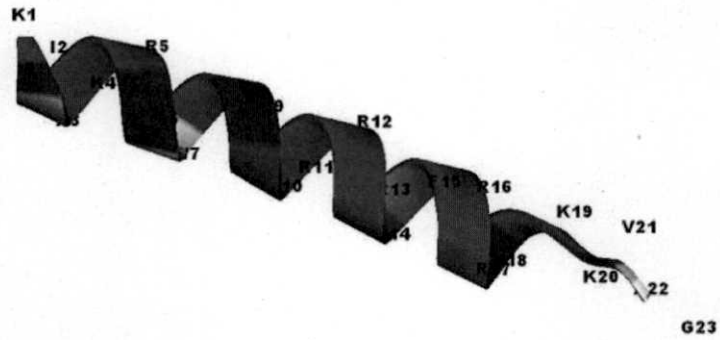
ข้อถ้อยสัญญา

1. เปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ที่ซึ่ง เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตเฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine) และลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 14 ตามลำดับ

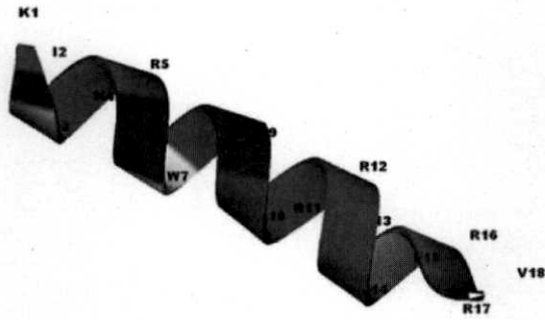
2. เปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ตามข้อถ้อยสัญญา 1 ที่ซึ่ง เปปไทด์ด้านจุลชีพแบบเกลียวอัลฟาสายสั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งเชื้อชูดิโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) และเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส อีพีเดอร์มิติส (*Staphylococcus epidermidis*)

3. เปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ตามข้อถ้อยสัญญา 1 ถึง 2 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง เปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น เชื่อมอยู่กับหมู่เอไมด์ ($-NH_2$) หรือกรดอะมิโนที่เป็นดีอะมิโนเอซิด (D-amino acid)

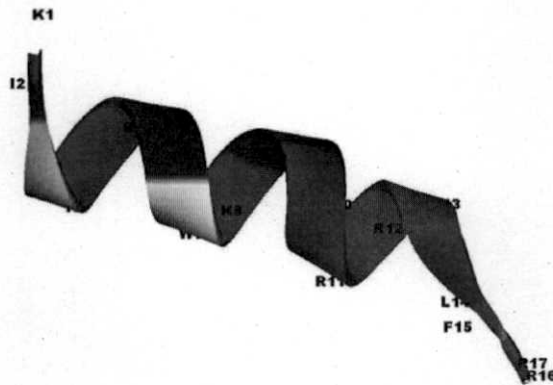
21334



รูปที่ 1

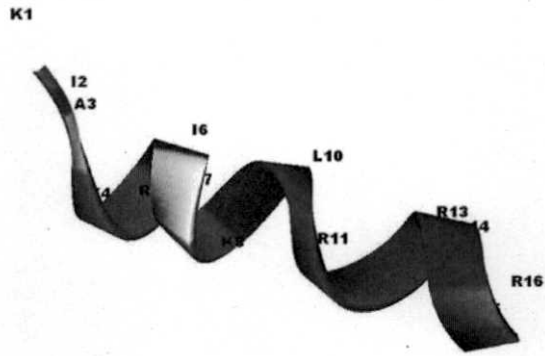


รูปที่ 2

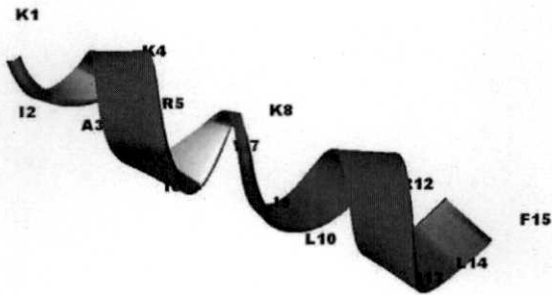


รูปที่ 3

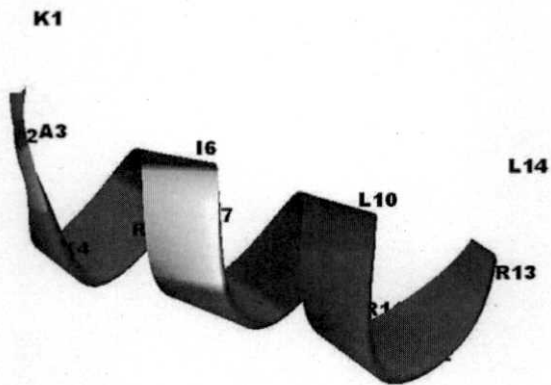
21334



รูปที่ 4



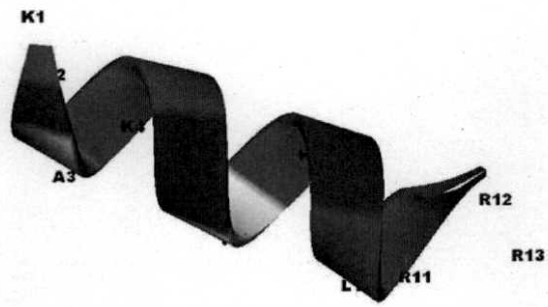
รูปที่ 5



รูปที่ 6

21334

หน้า 3 ของจำนวน 3 หน้า



รูปที่ 7

21334

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบเปปไทด์ด้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรีย โดย ออกแบบเปปไทด์ด้านจุลชีพให้มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้นที่มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ของ แบคทีเรียจนตายในที่สุด การออกแบบเปปไทด์ในการประดิษฐ์นี้ใช้การเชื่อมต่อกันของเปปไทด์ 2 ชนิด (hybridization) คือ เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), 5 อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตเฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine) และอาร์ จินีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 12 ตามลำดับ เชื่อมต่อกับเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 11 ตัว ได้แก่ อาร์ จินีน (Arginine), ลูซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน 10 (Arginine), วาลีน (Valine), ไลซีน (Lysine), ไลซีน (Lysine), วาลีน (Valine), อะลานีน (Alanine) และ ไกลซีน (Glycine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 11 ตามลำดับ และใช้การตัดลดจำนวนกรดอะมิโน (truncation) โดยคง ลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญต่อโครงสร้างอัลฟาไว้ จึงได้เปปไทด์อนุพันธ์ ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จินีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตเฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลู 15 ซีน (Leucine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine), อาร์จินีน (Arginine) และลูซีน (Leucine) ตำแหน่ง ที่ 1 ถึง 14 ตามลำดับ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งประเภทแกรมลบและแกรม บวกรวมทั้งเชื้อก่อโรคคือยาได้ ซึ่งสามารถนำประยุกต์ใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและ/หรือใช้เป็นยา ร่วมในการรักษาโรคติดเชื้อ เพื่อลดภาวะคือยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ จึงทำให้มีประโยชน์ทางด้าน การแพทย์เป็นอย่างมากในอนาคต

