เลขที่อนุสิทธิบัตร 21335

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

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

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	**1903001883**
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	**24 ตุลาคม 2561**
ผู้ประดิษฐ์	**นางสาวรัชนีวรรณ อุ่นแพทย์ และ นางสาวณัฐภรณ์ กลับทวี**
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	**เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น**

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ **5** **เดือน** **เมษายน** **พ.ศ.** **2566**

หมดอายุ ณ วันที่ **23** **เดือน** **ตุลาคม** **พ.ศ.** **2567**

(นายกิตติวัฒน์ ปัจฉิมนันท์)
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.256601024492634

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

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

เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ (antimicrobial resistance) คือ เชื้อแบคทีเรียที่เคยไวต่อยาปฏิชีวนะมาก่อนเกิดการกลายพันธุ์ เมื่อเชื้อดังกล่าวสัมผัสกับยาปฏิชีวนะแล้ว ยาไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียนั้นได้เหมือนเดิม ทำให้การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะไม่มีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องใช้ยาหลายชนิดร่วมกันหรือใช้ในปริมาณมากขึ้น ทำให้เกิดพิษต่อผู้ป่วยและมีผลข้างเคียงมากอีกด้วย สาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพมาจากการใช้ยาต้านจุลชีพที่มากขึ้น ทั้งการใช้อย่างเกินความจำเป็นและไม่ถูกต้อง ซึ่งเร่งให้เชื้อจุลชีพมีการกลายพันธุ์ที่เร็วขึ้น รวมไปถึงการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในสัตว์จากการใช้ยาปฏิชีวนะในภาคการผลิตอาหารสัตว์ ตลอดจนการสะสมปนเปื้อนในแหล่งน้ำ เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยได้แก่ 1) เชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) เป็นกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคที่พบได้บ่อยที่สุด เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง ทำให้เกิดโรคติดเชื้อหลายระบบของร่างกาย ได้แก่ การติดเชื้อในกระแสเลือด ภาวะปอดติดเชื้อ การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด การติดเชื้อเหล่านี้มักส่งผลกระทบต่อผู้ที่กำลังป่วยอยู่ในโรงพยาบาลโดยเฉพาะในกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือการรักษาระยะยาว นอกจากนี้ เชื้อดังกล่าวมีการพัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น ได้แก่ ดื้อต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides), กลุ่มเซฟาโลสปอริน (cephalosporins), กลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolones), และกลุ่มคาร์บาเพเนม (carbapenems) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะตัวสุดท้ายที่ใช้ในการรักษา 2) เชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส (*Staphylococcus epidermidis*) ปกติพบเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่ผิวหนัง โพรงจมูก รูหูและทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย ในอดีตไม่ค่อยเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ แต่ในปัจจุบันมีการใช้สายสวย (catheters) และ อวัยวะเทียม (prosthesis) กันมากขึ้น จึงพบว่าเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส มีความสำคัญในการก่อการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้น ส่วนมากมักพบเชื้อบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือก (mucosa) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่ใส่สายสวนปัสสาวะเป็นเวลานาน และติดเชื้อบริเวณลิ้นหัวใจ (endocarditis) ในผู้ใช้ลิ้นหัวใจเทียม (prosthetic valves) และผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น (intravenous drug abuser) นอกจากนี้ยากต่อการรักษา เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอน โดยพบการดื้อยาต่อกลุ่ม penicilinase-resistant penicillin และ cephalosporin มากกว่าเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

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

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 แม้กระทั่งแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียถือเป็นหน้าที่หลักของเปปไทด์ต้านจุลชีพในการปกป้องร่างกายจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม โดยกลไกในการทำลายเชื้อมาจากคุณสมบัติของเปปไทด์ที่มีลักษณะแอมฟิพาธิค (amphipathic) กล่าวคือ มีทั้งด้านมีขั้ว (polar) ชอบน้ำ ซึ่งมักมีประจุรวมเป็นบวก จึงเหมาะสมต่อการเกิดแรงดึงดูดระหว่างขั้ว (electrostatic interaction) ที่แตกต่างกันกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลชีพที่ประกอบด้วยไขมันชนิดที่เป็นประจุลบ และด้านไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่สามารถแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลชีพได้ ทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์อย่างรวดเร็วจนทำให้เชื้อตายในที่สุด เนื่องจากเปปไทด์มีคุณสมบัติอันโดดเด่นในการทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรคที่มีประสิทธิภาพ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเปปไทด์เป็นยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา นอกจากนั้นยังสามารถนำเปปไทด์ต้านจุลชีพไปประยุกต์ใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วยลง และช่วยในการป้องกันการเกิดภาวะดื้อยาที่อาจเกิดขึ้นได้หลังจากมีการใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานานได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

การประดิษฐ์นี้ได้ออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา ที่มีผลทำให้เกิดโรคติดเชื้อหลายระบบของร่างกาย เช่น กระแสเลือด ปอด ทางเดินปัสสาวะ แผลผ่าตัด เป็นต้น และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ติดเชื้อบริเวณลิ้นหัวใจในผู้ใช้ลิ้นหัวใจเทียมและผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น เปปไทด์ต้านจุลชีพเหล่านี้จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการนำไปใช้เป็นยาร่วมและ/หรือยารักษาโรคติดเชื้อ และลดภาวะดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อไปในอนาคต

<u>ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์</u>

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรีย โดยออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟ่าสายสั้นที่มีความสามารถในการทะลุทะลวงและทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนตายในที่สุด การออกแบบเปปไทด์ใช้การเชื่อมต่อกันของเปปไทด์ 2 ชนิด (hybridization) คือ เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

(Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 12 ตามลำดับ เชื่อมต่อกับเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 11 ตัว ได้แก่ อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), วาลีน (Valine), ไลซีน (Lysine), ไลซีน (Lysine), วาลีน (Valine), อะลานิน (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) ของเปปไทด์ และการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (antimicrobial activity) และ/หรือดื้อยา เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมยาต่อไป

โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบันทำการรักษาได้ยากและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตสูงมาก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยา บางสายพันธุ์ยังไม่มียาในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อเหล่านั้นได้ ซึ่งการประดิษฐ์นี้ได้มุ่งเน้นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรียอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและ/หรือเพื่อใช้เป็นยาร่วมในการรักษาโรคติดเชื้อ และลดภาวะดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ทำให้มีประโยชน์ทางด้านการแพทย์เป็นอย่างมาก

<u>คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ</u>

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 23 ตัว ดังนี้ K1 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 1, I2 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ อะลานีน (Alanine) ตำแหน่งที่ 3, K4 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, R5 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 5, I6 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 6, W7 คือ ทริปโตแฟน (Tryptophan) ตำแหน่งที่ 7, K8 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, L10 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 10, R11 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 11, R12 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 12, R13 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 13, L14 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 14, F15 คือ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 15, R16 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 16, R17 คือ อาร์จีนีน (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 ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ อะลานีน (Alanine) ตำแหน่งที่ 3, K4 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, R5 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 5, I6 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 6, W7 คือ ทริปโตแฟน (Tryptophan) ตำแหน่งที่ 7, K8 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, L10 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 10, R11 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 11, R12 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 12, R13 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 13, L14 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 14, F15 คือ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 15, R16 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 16, R17 คือ อาร์จีนีน (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 ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ อะลานีน (Alanine)

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ตำแหน่งที่ 3, K4 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, R5 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 5, I6 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 6, W7 คือ ทริปโตแฟน (Tryptophan) ตำแหน่งที่ 7, K8 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, L10 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 10, R11 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 11, R12 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 12, R13 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 13, L14 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 14, F15 คือ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 15, R16 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 16 และ R17 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 17

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

รูปที่ 5 แสดงโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว ดังนี้ K1 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 1, I2 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ อะลานีน (Alanine) ตำแหน่งที่ 3, K4 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, R5 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 5, I6 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 6, W7 คือ ทริปโตแฟน (Tryptophan) ตำแหน่งที่ 7, K8 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, L10 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 10, R11 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 11, R12 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 12, R13 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 13, L14 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 14 และ F15 คือ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 15

รูปที่ 6 แสดงโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว ดังนี้ K1 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 1, I2 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ อะลานีน (Alanine) ตำแหน่งที่ 3, K4 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, R5 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 5, I6 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 6, W7 คือ ทริปโตแฟน (Tryptophan) ตำแหน่งที่ 7, K8 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, L10 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 10, R11 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 11, R12 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 12, R13 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 13 และ L14 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 14

รูปที่ 7 แสดงโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ดังนี้ K1 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 1, I2 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ อะลานีน (Alanine) ตำแหน่งที่ 3, K4 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, R5 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 5, I6 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 6, W7 คือ ทริปโตแฟน (Tryptophan) ตำแหน่งที่ 7, K8 คือ ไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ ไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, L10 คือ ลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 10, R11 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 11, R12 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 12 และ R13 คือ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 13

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น เป็นการประดิษฐ์เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งประเภทแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ เชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยา ได้แก่ เชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา สายพันธุ์ดื้อยา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส สายพันธุ์สร้างเยื่อเมือก (ATCC 35984) อีกด้วย

การออกแบบเปปไทด์นั้นใช้เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 12 ตามลำดับ ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ได้มาจากการปรับปรุงลำดับกรดอะมิโนแบบอนุรักษ์ของเปปไทด์กลุ่มแคธีลิซิดิน (cathelicidin) เชื่อมต่อกับเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 11 ตัว ได้แก่ อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), วาลีน (Valine), ไลซีน (Lysine), ไลซีน (Lysine), วาลีน (Valine), อะลานีน (Alanine) และไกลซีน (Glycine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 11 ตามลำดับ ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ได้มาจากการปรับปรุงลำดับกรดอะมิโนแบบอนุรักษ์ของเปปไทด์กลุ่มอูเรอิน (aurein) ดังนั้น เปปไทด์อนุพันธ์ที่ได้มีกรดอะมิโนจำนวน 23 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), วาลีน (Valine), ไลซีน (Lysine), ไลซีน (Lysine), วาลีน (Valine), อะลานีน (Alanine) และไกลซีน (Glycine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 23 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 1 จากนั้นทำการตัดลดจำนวนกรดอะมิโน (truncation) ทีละตำแหน่งจนถึงตำแหน่งที่ 13 เพื่อหาเปปไทด์อนุพันธ์ที่สั้นที่สุดที่ยังคงมีความสามารถในการต้านแบคทีเรียได้ดี

เปปไทด์อนุพันธ์ที่ได้จากการตัดลดจำนวนกรดอะมิโน ประกอบด้วย 6 สาย ได้แก่ เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 18 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และวาลีน (Valine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 18 ตามลำดับ, เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 17 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 17 ตามลำดับ, เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 16 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 16 ตามลำดับ, เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

(Leucine) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 15 ตามลำดับ, เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 14 ตามลำดับ และเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2 ถึง 7 ตามลำดับ

เปปไทด์ที่ออกแบบดังกล่าวข้างต้นถูกสังเคราะห์ขึ้นมาด้วยวิธีการทางเคมี โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis) โดยทำการควบรวมกับเอ็น-9-ฟลูออโรนิลเมทอกซีคาร์บอนิล (Fmoc) และกรดอะมิโนที่ต้องการเข้าด้วยกัน ทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟเหลวความดันสูงแบบผันกลับ (reversed-phase high-performance liquid chromatography) จากนั้น นำไปหาลำดับกรดอะมิโนและทำการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงด้วยวิธีอิเล็กโทรสเปรย์ไอออไนเซชันแมสสเปกโทรเมทรี (electrospray ionization mass spectrometry) ซึ่งเป็นการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลต่อประจุของไอออนสารตัวอย่างในสภาวะไอออไนซ์ (ionization)

การศึกษาคุณลักษณะของเปปไทด์เกลียวอัลฟ่าสายสั้น

เปปไทด์ที่ได้จากการออกแบบในการประดิษฐ์นี้มีลำดับกรดอะมิโน จำนวนกรดอะมิโน สูตรทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล คุณลักษณะความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) และประจุรวมของเปปไทด์ แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งศึกษาโดยใช้โปรแกรมแอนติไมโครเบียลเปปไทด์ แคลคูเลเตอร์แอนด์พรีดิกเตอร์ (antimicrobial peptide calculator and predictor) ส่วนลักษณะโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ ศึกษาโดยใช้โปรแกรมไอ-แทซเซอร์ แสดงดังรูปที่ 1 ถึง 7 ตามลำดับ

นอกจากนี้ เปปไทด์ที่ได้จากการออกแบบในการประดิษฐ์นี้นำไปเชื่อมอยู่กับหมู่เอไมด์ ($-NH_2$) หรือกรดอะมิโนที่เป็นดีอะมิโนเอซิด (D-amino acid) เพื่อให้มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพได้ดียิ่งขึ้น

การศึกษาคุณสมบัติของเปปไทด์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ

1. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิสของเปปไทด์ต้านจุลชีพ โดยวิธีไมโคร ไดลูชั่น (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 แปลผลโดยดูค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ด้วยตาเปล่า (สังเกตจากในหลุมใส) เรียกว่า Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC

การทดสอบนี้พบว่า เปปไทด์อนุพันธ์ทุกตัวที่ได้จากการประดิษฐ์นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งประเภทแกรมลบและแกรมบวก ซึ่งจะเห็นได้ว่าเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ตามลำดับ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ได้ดีที่สุด โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ที่ได้จากการประดิษฐ์นี้

ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโน จำนวนกรดอะมิโน สูตรทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล ความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) และประจุรวมของเปปไทด์

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

ตารางที่ 2 ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

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
Pseudomonas aeruginosa	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	3.91	3.91

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ATCC 27853							
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91

2. การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อชูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ โดยวิธีการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (colony count assay)

โดยนำตัวอย่างจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ต้านจุลชีพทุกความเข้มข้นที่มีลักษณะใส หรือความเข้มข้นตั้งแต่ค่า MIC เป็นต้นไป ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มากระจาย (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นของเปปไทด์ต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เรียกว่า Minimum Bactericidal Concentration หรือ MBC แปลผลโดยสังเกตุได้จากไม่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงถึงการไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบนี้พบว่า เปปไทด์ต้านจุลชีพที่ได้จากการประดิษฐ์นี้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งประเภทแกรมลบและแกรมบวกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 7.81 ถึง 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้ เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ มีความสามารถในการฆ่าเชื้อชูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ได้ดีที่สุด โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ที่ได้จากการประดิษฐ์นี้

<u>ตารางที่ 3</u> ค่าการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

เชื้อแบคทีเรีย	**ค่า MBC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**						
	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 23 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 18 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 17 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 16 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว	เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	15.63	15.63	62.5	62.5	15.63	15.63	7.81
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	15.63	7.81	7.81	15.63	7.81	7.81	7.81

เนื่องจากเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ มีความสามารถในการยับยั้งการ

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

เจริญเติบโตและฆ่าเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์อนุพันธ์ตัวอื่นๆ จึงนำเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ดังกล่าวข้างต้นมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต่อไป

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยา ได้แก่ เชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา สายพันธุ์ดื้อยา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส สายพันธุ์สร้างเยื่อเมือก (ATCC 35984) ของเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ โดยวิธีไมโคร ไดลูชั่น (micro-dilution assay) ตามการทดสอบในข้อที่ 1

การทดสอบนี้พบว่า เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยาได้ดีทั้งเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา สายพันธุ์ดื้อยา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส (ATCC 35984) สายพันธุ์สร้างเยื่อเมือก ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ มีความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นทางเลือกใหม่ในการใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยาและ/หรือเพื่อใช้เป็นยาร่วมในการรักษาโรคติดเชื้อต่อไป

<u>ตารางที่ 4</u> ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยาของเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 13 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 ตามลำดับ

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยา	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*	7.81
Staphylococcus epidermidis ATCC 35984	7.81

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ข้อถือสิทธิ

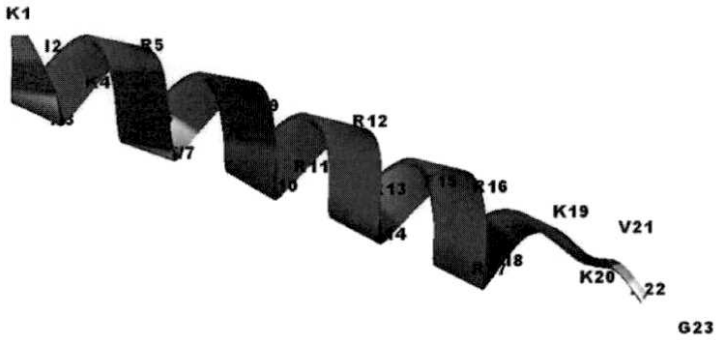
1. เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ที่ซึ่ง เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 15 ตามลำดับ

2. เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่ง เปปไทด์ต้านจุลชีพแบบเกลียวอัลฟาสายสั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส (*Staphylococcus epidermidis*)

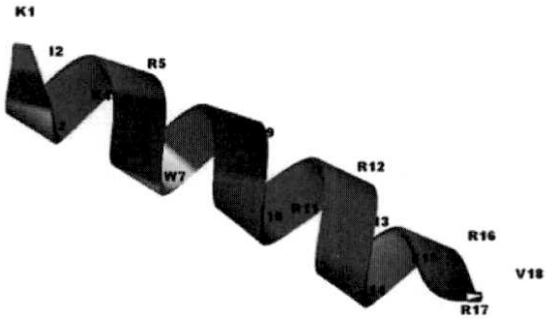
3. เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ตามข้อถือสิทธิ 1 ถึง 2 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น เชื่อมอยู่กับหมู่เอไมด์ ($-NH_2$) หรือกรดอะมิโนที่เป็นดีอะมิโนเอซิด (D-amino acid)

Signed by DIP-CA

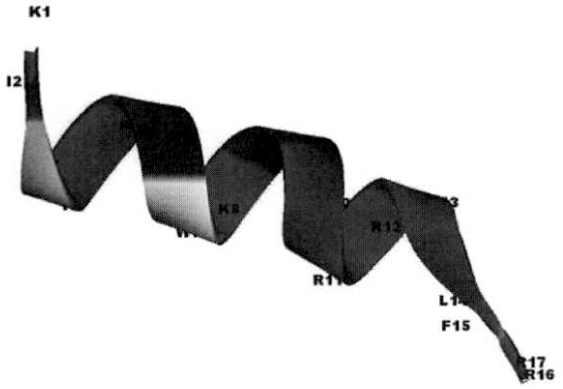
นายสุวัจชัย บุญอารี



รูปที่ 1



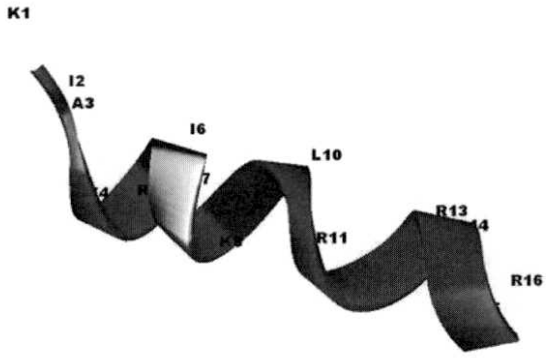
รูปที่ 2



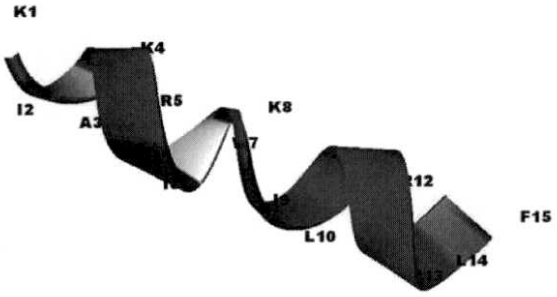
รูปที่ 3

Signed by DIP-CA

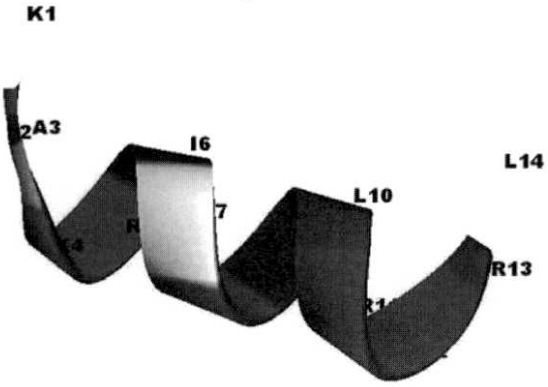
นายสุวัจชัย บุญอารี



รูปที่ 4



รูปที่ 5



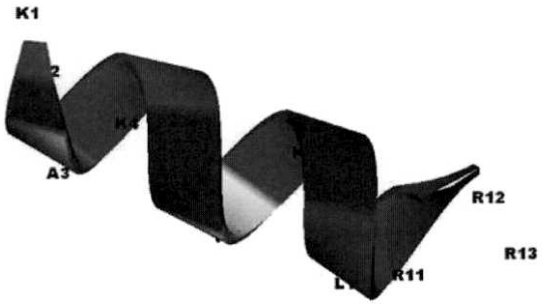
รูปที่ 6

21335

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

หน้า 3 ของจำนวน 3 หน้า



รูปที่ 7

21335

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรีย โดยออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้นที่มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนตายในที่สุด การออกแบบเปปไทด์ในการประดิษฐ์นี้ใช้การเชื่อมต่อกันของเปปไทด์ 2 ชนิด (hybridization) คือ เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัว ได้แก่ ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 12 ตามลำดับ เชื่อมต่อกับเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 11 ตัว ได้แก่ อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), วาลีน (Valine), ไลซีน (Lysine), ไลซีน (Lysine), วาลีน (Valine), อะลานิน (Alanine) และไกลซีน (Glycine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 11 ตามลำดับ และใช้การตัดลดจำนวนกรดอะมิโน (truncation) โดยคงลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญต่อโครงสร้างอัลฟาไว้ จึงได้เปปไทด์อนุพันธ์ ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 15 ตามลำดับ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งประเภทแกรมลบและแกรมบวกรวมทั้งเชื้อก่อโรคดื้อยาได้ ซึ่งสามารถนำประยุกต์ใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและ/หรือใช้เป็นยาร่วมในการรักษาโรคติดเชื้อ เพื่อลดภาวะดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ จึงทำให้มีประโยชน์ทางด้านการแพทย์เป็นอย่างมากในอนาคต

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี