ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา
เลขรับ 00122
วันที่ 25 มี.ค. 2564
เวลา 13 30 น

ที่ พณ 0706.1/21109-004915

กองสิทธิบัตร กรมทรัพย์สินทางปัญญา
563 ถนนนนทบุรี
ต.บางกระสอ อ.เมืองนนทบุรี
จ.นนทบุรี 11000

18 มีนาคม 2564

เรื่อง ส่งหนังสือสำคัญการจดทะเบียนอนุสิทธิบัตร

เรียน อธิการบดีมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ที่อยู่ 99 หมู่ที่ 18 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

สิ่งที่ส่งมาด้วย 1. หนังสือสำคัญการจดทะเบียน 1 ฉบับ
2. ตารางอัตราค่าธรรมเนียมรายปี 1 ฉบับ

โดยหนังสือนี้กองสิทธิบัตร ได้ส่งหนังสือสำคัญการจดทะเบียนอนุสิทธิบัตร เลขที่ 17014 ตามสิ่งที่ส่งมาด้วย และขอเรียนให้ทราบว่า ท่านมีหน้าที่ตามกฎหมายที่จะต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีทุกปี เริ่มต้นปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร ซึ่งนับแต่วันยื่นคำขอเป็นต้นไปตามบัญชีอัตราค่าธรรมเนียมที่กำหนดโดยกฎกระทรวงด้านหลังหนังสือนี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(นางสิริณัฏฐ์ อนุพันธ์)
นักวิชาการพาณิชย์ชำนาญการพิเศษ

กลุ่มหนังสือสำคัญและกำกับการจดทะเบียน
โทร. 0-2547-4639
โทรสาร. 0-2547-4639

หมายเหตุ : ขอให้ท่านตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลที่อยู่ในหนังสือสำคัญที่ส่งมานี้
หากพบว่ามีการพิมพ์ผิดในส่วนใด ขอได้โปรดติดต่อกลุ่มหนังสือสำคัญฯโดยด่วน

ข้อควรรู้ที่สำคัญสำหรับผู้ทรงสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
การชำระค่าธรรมเนียมรายปี

ผู้ทรงสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร มีหน้าที่ ที่จะต้องดำเนินการเพื่อคงไว้ซึ่งสิทธิในสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร นั้น ตามกฎหมาย ซึ่งกำหนดให้มีการชำระค่าธรรมเนียมรายปี เริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และต้องชำระภายใน 60 วันนับแต่วันเริ่มต้นระยะเวลาของ ปีที่ 5 และของทุก ๆ ปีต่อไป หากไม่ชำระภายในกำหนดเวลาข้างต้น ต้องเสียค่าธรรมเนียมเพิ่มร้อยละ 30 โดยต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีพร้อมทั้งค่าธรรมเนียมเพิ่มภายในหนึ่งร้อยยี่สิบวัน นับแต่วันสิ้นกำหนดเวลาชำระ

เมื่อกำหนดเวลาอีก 120 วันแล้ว ถ้ายังไม่ชำระค่าธรรมเนียมรายปีและค่าธรรมเนียมเพิ่ม ถือว่าสิ้นอายุการคุ้มครอง และจะถูกเพิกถอนสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนั้น

ตัวอย่างการนับวันชำระค่าธรรมเนียมรายปี

การนับระยะเวลาชำระค่าธรรมเนียมรายปี **ให้นับตั้งแต่วันที่ยื่นคำขอ** เช่น ยื่นคำขอไว้เมื่อวันที่ 20 เมษายน 2550 จะต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีตั้งแต่วันเริ่มต้นของปีที่ 5 คือ **เริ่มชำระวันที่ 20 เมษายน 2554** และของปีต่อ ๆ ไปจนครบกำหนดอายุการคุ้มครอง โดย**วันสุดท้ายของการชำระภายใน 60 วันคือ 19 มิถุนายน 2554** หาก**ไม่ชำระในช่วงแรก** จะต้องเสียค่าธรรมเนียมเพิ่มร้อยละ 30 ของยอดที่ต้องชำระ และจะ**ต้องชำระ**ภายใน 120 วัน คือ**ภายในวันที่ 17 กันยายน 2554**

ตารางอัตราค่าธรรมเนียมรายปี

ปีที่	สิทธิบัตร (ประดิษฐ์)	สิทธิบัตร (ออกแบบ)	อนุสิทธิบัตร	ปีที่	สิทธิบัตร (ประดิษฐ์)	สิทธิบัตร (ออกแบบ)	อนุสิทธิบัตร
5	1000	500	750	13	8200		
6	1200	650	1500	14	10000		
7	1600	950	เมื่อครบ	15	12000		
8	2200	1400	อายุปีที่ 6	16	14200		
9	3000	2000	แล้ว	17	16600		
10	4000	2750	สามารถ	18	19200		
11	5200		ต่ออายุได้	19	22000		
12	6600		2 ครั้ง	20	25000		
ชำระคราวเดียว		7500	2000	ชำระคราวเดียว	140000		

การต่ออายุอนุสิทธิบัตร ครั้งที่ 1 (สำหรับ ปีที่ 7-8) 6000 บาท
การต่ออายุอนุสิทธิบัตร ครั้งที่ 2 (สำหรับ ปีที่ 9-10) 9000 บาท

กลุ่มคัดค้านและเปลี่ยนแปลง (ติดต่อฝ่ายค่าธรรมเนียมรายปี)
โทร 0-2547-4711

เลขที่อนุสิทธิบัตร 17014

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
ึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
ิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี)
ากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

ลขที่คำขอ	1803002448
ันขอรับอนุสิทธิบัตร	24 ตุลาคม 2561
ระดิษฐ์	รองศาสตราจารย์รัชนีวรรณ อุ่นแพทย์ และ นางสาวณัฐภรณ์ กลับทวี
แสดงถึงการประดิษฐ์	เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น

ให้ผู้ทรงอนุ ิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 3 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2563

หมดอายุ ณ วันที่ 23 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2567

(ลงชื่อ).....

(นางสาวนุสรา กาญจนกูล)

รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน

อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา

ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ

1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรจะสิ้นอายุ
2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวก็ได้
3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 คราว มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

048468

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา การเกิดและการแพร่กระจายเชื้อดื้อยามีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยมีปัจจัยเร่งต่างๆ เช่น การขยายการเติบโตของเมือง การอยู่อาศัยอย่างแออัด ทำให้สุขลักษณะของการอยู่อาศัยต่ำลง การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม สภาพภูมิอากาศ การเพิ่มขึ้นของประชากรที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น การเพิ่มสัดส่วนของผู้สูงอายุ รวมถึงการเดินทางระยะไกลเป็นไปได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น ทำให้เชื้อดื้อยาจากอีกที่หนึ่งแพร่กระจายไปยังอีกสถานที่หนึ่งได้โดยง่าย และสิ่งที่สำคัญที่สุดคือ การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสม อันเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดเชื้อดื้อยา

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), และกลุ่ม คาร์บาเพเนม (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) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่ใส่สายสวนปัสสาวะเป็นเวลานาน และติดเชื้อบริเวณลิ้นหัวใจ (endocarditis) ใน

Signed by DIP-CA

พ.ศ. 2562 คำขอเลขที่ 1803002448

ผู้ใช้ลิ้นหัวใจเทียม (prosthetic valves) และผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น (intravenous drug abuser) นอกจากนี้ยากต่อการรักษา เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอน โดยพบการดื้อยาต่อกลุ่ม penicilinase-resistant penicillin และ cephalosporin มากกว่าเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส 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

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา ที่มีผลทำให้เกิดโรคติดเชื้อหลายระบบของร่างกาย เช่น กระแสเลือด ปอด ทางเดินปัสสาวะ แผลผ่าตัด เป็นต้น และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ติดเชื้อบริเวณลิ้นหัวใจในผู้ใช้ลิ้นหัวใจเทียมและผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น เปปไทด์ต้านจุลชีพ

Signed by DIP-CA

เหล่านี้จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการนำไปใช้เป็นยาร่วมและ/หรือยารักษาโรคติดเชื้อ และลดภาวะดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อไปในอนาคต

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดใหม่ให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรียอย่างมีประสิทธิภาพ โดยออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้นที่มีความสามารถในการทะลุทะลวงและทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนตายในที่สุด การออกแบบเปปไทด์ใช้โปรแกรมคลัสตัลเอ็กซ์ (ClustalX) ในการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (multiple sequence alignment) ของเปปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มแคธีลิซิดิน (cathelicidin) ที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาในฐานข้อมูล (antimicrobial peptide database) และเลือกลำดับกรดอะมิโนที่เป็นแบบอนุรักษ์ (conserved sequence) มาเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนเดิมเพื่อให้เปปไทด์มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพดียิ่งขึ้น โดยการตัดลดจำนวนกรดอะมิโน (truncation)โดยคงลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญต่อโครงสร้างอัลฟาไว้ และแทนที่กรดอะมิโนเดิมด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น (amino acid substitution) เปปไทด์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากเปปไทด์ดั้งเดิม เรียกว่า เปปไทด์อนุพันธ์ (peptide derivatives) ซึ่งจะนำมาทำการศึกษาโครงสร้างจำลองแบบ 3 มิติ (3D structure) โดยใช้โปรแกรมไอ-แทซเซอร์ (I-TASSER) ศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของ เปปไทด์ และศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (antimicrobial activity) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมยาต่อไป

โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบันทำการรักษาได้ยากและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตสูงมาก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยา บางสายพันธุ์ยังไม่มียาในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อเหล่านั้นได้ ซึ่งการประดิษฐ์นี้ได้มุ่งเน้นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรียอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและ/หรือเพื่อใช้เป็นยาร่วมในการรักษาโรคติดเชื้อทำให้มีประโยชน์ทางด้านการแพทย์เป็นอย่างมาก

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (multiple sequence alignment) ของเปปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มแคธีลิซิดิน (cathelicidin) ที่มีลักษณะโครงสร้างแบบเกลียวอัลฟา จำนวน 45 เปปไทด์จากฐานข้อมูลเปปไทด์

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ดั้งเดิมที่ได้จากลำดับกรดอะมิโนแบบอนุรักษ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มแคธีลิซิดิน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว ได้แก่ R1 คือ กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1, K2 คือ กรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 2, E3 คือ กรดอะมิโนกลูตามิก แอซิด (Glutamic acid) ตำแหน่งที่ 3, K4 คือ กรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, I5 คือกรดอะมิโนไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 5, K6 คือ กรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 6, K7 คือกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 7, R8 คือ กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ

Signed by DIP-CA

กรดอะมิโนไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, G10 คือ กรดอะมิโนไกลซีน (Glycine) ตำแหน่งที่ 10, K11 คือ กรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 11, I12 คือ กรดอะมิโนไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 12, D13 คือ กรดอะมิโนแอสปาร์ติก แอซิด (Aspartic acid) ตำแหน่งที่ 13, R14 คือ กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 14 และ L15 คือ กรดอะมิโนลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 15

รูปที่ 3 แสดงโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์อนุพันธ์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัว ได้แก่ K1 คือ กรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 1, I2 คือ กรดอะมิโนไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 2, A3 คือ กรดอะมิโนอะลานีน (Alanine), K4 คือ กรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 4, R5 คือ กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 5, I6 คือ กรดอะมิโนไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 6, W7 คือ กรดอะมิโนทริปโตแฟน (Tryptophan) ตำแหน่งที่ 7, K8 คือ กรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ตำแหน่งที่ 8, I9 คือ กรดอะมิโนไอโซลูซีน (Isoleucine) ตำแหน่งที่ 9, L10 คือ กรดอะมิโนลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 10, R11 คือ กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 11 และ R12 คือ กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 12

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้นเป็นการประดิษฐ์เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งประเภทแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ เชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส

การออกแบบเปปไทด์ใช้โปรแกรมคลัสตัลเอ็กซ์ (ClustalX) ในการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาในฐานข้อมูลเปปไทด์ การประดิษฐ์นี้ใช้ลำดับกรดอะมิโนที่เป็นแบบอนุรักษ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มแคธีลิซิดิน ดังแสดงในรูปที่ 1 เพื่อเป็นตัวตั้งต้นของโครงสร้าง (scaffold) แบบเกลียวอัลฟา เปปไทด์ที่ได้จากลำดับกรดอะมิโนแบบอนุรักษ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มแคธีลิซิดิน มีกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว ประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine), ไลซีน (Lysine), กลูตามิก แอซิด (Glutamic acid), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ไลซีน (Lysine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ไกลซีน (Glycine), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), แอสปาร์ติก แอซิด (Aspartic acid), อาร์จีนีน (Arginine) และลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 15 ตามลำดับ เปปไทด์อนุพันธ์ (peptide derivatives) ที่ได้มีกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัว ประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีน (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 โดยปรับปรุงลำดับกรดอะมิโนเดิมด้วยการตัดลดจำนวนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 ถึง 3 ได้แก่ กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine), ไลซีน (Lysine) และกลูตามิก แอซิด (Glutamic acid) และแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6, 10, 13 และ 15 ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน (Alanine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ลูซีน (Leucine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งใช้โปรแกรมเฮลิคัล เวล โปรเจ็คชั่น (helical wheel projection) ในการเลือกตำแหน่ง

Signed by DIP-CA

2562 คำขอเลขที่ 1803002448

ที่จะแทนที่ โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนให้ด้านหนึ่งของเกลียวอัลฟาเป็นกรดอะมิโนชนิดมีขั้ว ประจุบวก ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้ว ไม่ชอบน้ำ เพื่อให้ได้เปปไทด์อนุพันธ์ที่มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี

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

การศึกษาคุณลักษณะของเปปไทด์เกลียวอัลฟาสายสั้น

เปปไทด์ที่ได้จากการออกแบบในการประดิษฐ์นี้มีลำดับกรดอะมิโน จำนวนกรดอะมิโน สูตรทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล คุณลักษณะความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) และประจุรวมของเปปไทด์ แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งศึกษาโดยใช้โปรแกรมแอนติไมโครเบียลเปปไทด์ แคลคูเลเตอร์แอนด์พรีดิกเตอร์ (antimicrobial peptide calculator and predictor) ส่วนลักษณะโครงสร้าง 3 มิติแบบจำลองของเปปไทด์ ศึกษาโดยใช้โปรแกรมไอ-แทชเชอร์ แสดงดังรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

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

ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโน จำนวนกรดอะมิโน สูตรทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล ความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) และประจุรวมของเปปไทด์

เปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	จำนวนกรดอะมิโน	สูตรทางเคมี	น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมล)	ความไม่ชอบน้ำ	ประจุรวม
เปปไทด์ดั้งเดิม	RKEKIKKRIGKIDRL	15	$C_{83}H_{157}N_{29}O_{20}S_0$	1881.326	26%	+6
เปปไทด์อนุพันธ์	KIAKRIWKILRR	12	$C_{54}H_{91}N_{13}O_{14}S_0$	1581.021	50%	+6

การศึกษาคุณสมบัติของเปปไทด์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ

1. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ 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 เป็น

Signed by DIP-CA

เวลา 24 ชั่วโมง แปลผลโดยดูค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ด้วยตาเปล่า (สังเกตจากในหลุมใส) เรียกว่า Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC

การทดสอบนี้พบว่า เปปไทด์ต้านจุลชีพที่ได้จากการประดิษฐ์นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ ซึ่งเปปไทด์อนุพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดีกว่าเปปไทด์ดั้งเดิมมาก โดยความเข้มข้นเพียง 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส และความเข้มข้น 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์อนุพันธ์ที่ได้จากการประดิษฐ์นี้

ตารางที่ 2 ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	เปปไทด์ดั้งเดิม	เปปไทด์อนุพันธ์
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	>250	7.81
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	>250	3.91

2. การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิสของเปปไทด์สังเคราะห์ 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 เปปไทด์ต้านจุลชีพที่ได้จากการประดิษฐ์นี้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดี ซึ่งเปปไทด์อนุพันธุ์มีความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดีกว่าเปปไทด์ดั้งเดิม โดยความเข้มข้นเพียง 15.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถฆ่าเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์อนุพันธ์ที่ได้จากการประดิษฐ์นี้

ตารางที่ 3 ค่าการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	ค่า MBC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	เปปไทด์ดั้งเดิม	เปปไทด์อนุพันธ์
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	>250	15.63
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	>250	15.63

Signed by DIP-CA

พ.ศ. 2562 คำขอเลขที่ 1803002448

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

Signed by DIP-CA

2562 คำขอเลขที่ 1803002448

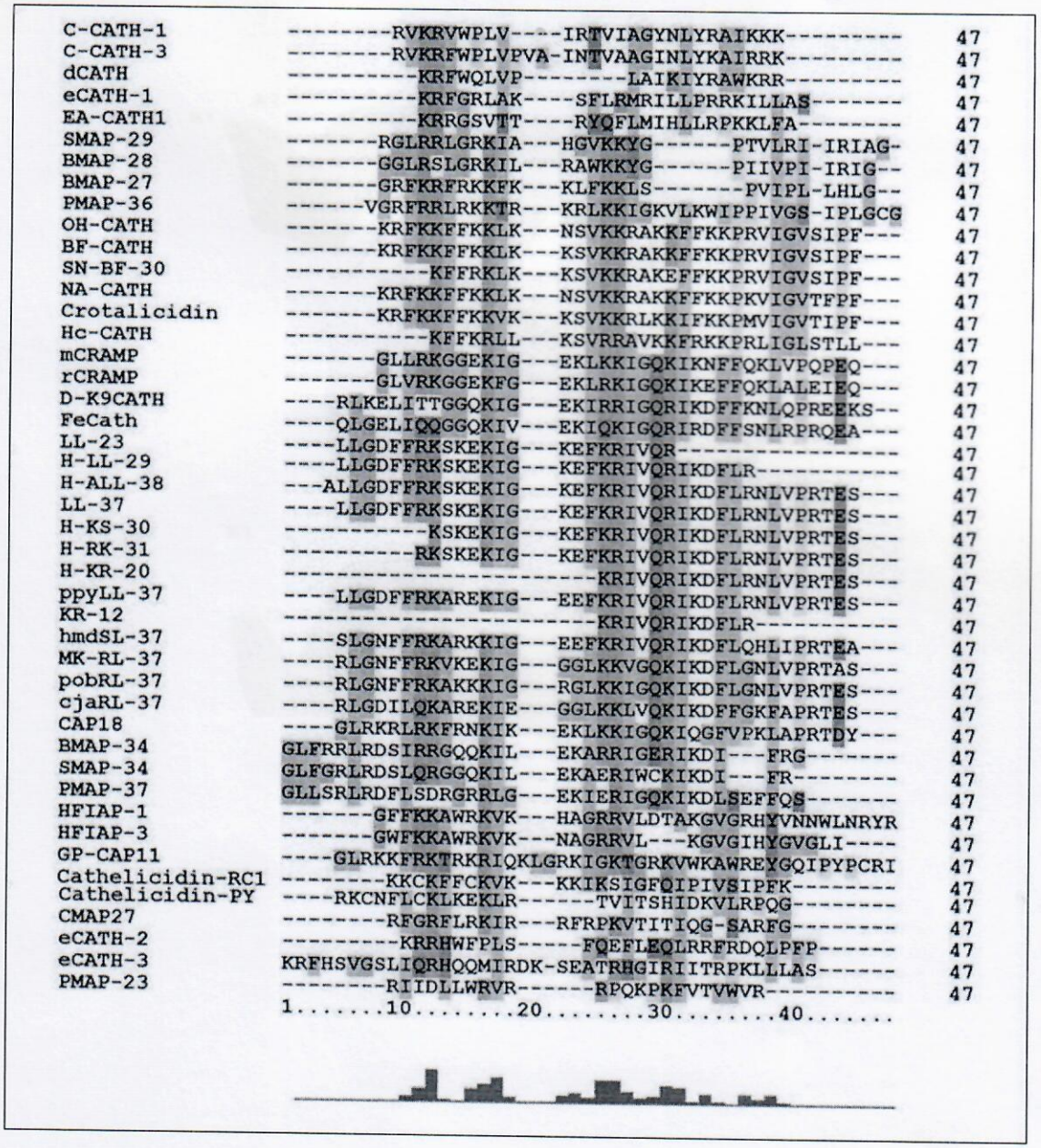
ข้อถือสิทธิ

1. เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ประกอบด้วย 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 ที่ได้จากการปรับปรุงลำดับกรดอะมิโนเดิมของเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว ได้แก่ อาร์จีนีน (Arginine), ไลซีน (Lysine), กลูตามิก แอซิด (Glutamic acid), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ไลซีน (Lysine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ไกลซีน (Glycine), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), แอสปาร์ติก แอซิด (Aspartic acid), อาร์จีนีน (Arginine) และลูซีน (Leucine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 15 ตามลำดับ ด้วยการตัดลดจำนวนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 ถึง 3 ได้แก่ กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine), ไลซีน (Lysine) และกลูตามิก แอซิด (Glutamic acid) และแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6, 10, 13 และ 15 ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน (Alanine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ลูซีน (Leucine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตามลำดับ ซึ่งใช้โปรแกรมเฮลิคัล เวล โปรเจ็คชั่น (helical wheel projection)

2. เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่ง เปปไทด์ต้านจุลชีพแบบเกลียวอัลฟาสายสั้นเชื่อมอยู่กับหมู่เอไมด์ ($-NH_2$) หรือกรดอะมิโนที่เป็นดีอะมิโนเอซิด (D-amino acid)

Signed by DIP-CA

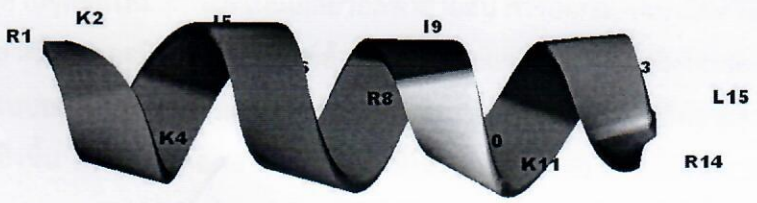
2562 คำขอเลขที่ 1803002448



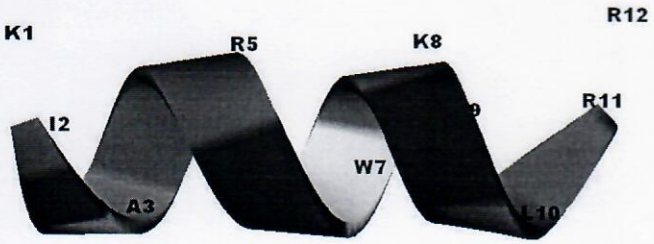
รูปที่ 1

Signed by DIP-CA

พฤศจิกายน 2562 คำขอเลขที่ 1803002448



รูปที่ 2



รูปที่ 3

Signed by DIP-CA

... พฤษภาคม 2562 คำขอเลขที่ 1803002448

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรีย โดยออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น การออกแบบเปปไทด์ในการประดิษฐ์นี้ใช้การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มแคธีลิซิดิน (cathelicidin) และเลือกลำดับกรดอะมิโนที่เป็นแบบอนุรักษ์มาเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนเดิมเพื่อให้เปปไทด์มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพดียิ่งขึ้น โดยการตัดลดจำนวนกรดอะมิโน (truncation) และแทนที่กรดอะมิโนเดิมด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น (amino acid substitution) ทำให้ได้เปปไทด์อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ได้ ซึ่งสามารถนำประยุกต์ใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียและ/หรือใช้เป็นยาร่วมในการรักษาโรคติดเชื้อได้ในอนาคต

Signed by DIP-CA