ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญาฯ
เลขรับ 00227
วันที่ 27 พ.ค. 2564
เวลา 15:25

ที่ พณ 0706.1/21109-007448

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

29 เมษายน 2564

เรื่อง ส่งหนังสือสำคัญการจดทะเบียนอนุสิทธิบัตร

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

สิ่งที่ส่งมาด้วย 1. หนังสือสำคัญการจดทะเบียน 1 ฉบับ
2. ตารางอัตราค่าธรรมเนียมรายปี 1 ฉบับ

โดยหนังสือนี้กองสิทธิบัตร ได้ส่งหนังสือสำคัญการจดทะเบียนอนุสิทธิบัตร เลขที่ 17327 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 17327

อสป/200 – ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
ที่แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
กรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี)
ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	1803002449
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	24 ตุลาคม 2561
ชื่อผู้ประดิษฐ์	นางสาวรัชนีวรรณ อุ่นแพทย์ และ นางสาวณัฐภรณ์ กลับทวี
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 11 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564

หมดอายุ ณ วันที่ 23 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2567

(ลงชื่อ).....

(นางสาวนุสรา กาญจนกุล)
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 049089

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 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อย ได้แก่ 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 ส่วนมากมักพบเชื้อ

Signed by DIP-CA

ปัสสาวะ แผลผ่าตัด เป็นต้น และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ติดเชื้อบริเวณลิ้นหัวใจในผู้ใช้ลิ้นหัวใจเทียมและผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น เปปไทด์ต้านจุลชีพเหล่านี้จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการนำไปใช้เป็นยาร่วมและ/หรือยารักษาโรคติดเชื้อ และลดภาวะดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อไปในอนาคต

<u>ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์</u>

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรีย โดยออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้นที่มีความสามารถในการทะลุทะลวงและทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนตายในที่สุด การออกแบบเปปไทด์ใช้การเชื่อมต่อกันของเปปไทด์ 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 เปปไทด์ที่ปรับปรุงลำดับกรดอะมิโนจากเปปไทด์ดั้งเดิมเรียกว่า เปปไทด์อนุพันธ์ (peptide derivatives) ซึ่งจะนำมาทำการศึกษาโครงสร้างจำลองแบบ 3 มิติ (3D structure) โดยใช้โปรแกรมไอ-แทชเชอร์ (I-TASSER) การศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของเปปไทด์และการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (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

Signed by DIP-CA

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) 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

Signed by DIP-CA

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

<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) และ อาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 12 ตามลำดับ ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ได้มาจากการปรับปรุงลำดับกรดอะมิโนแบบอนุรักษ์ของเปปไทด์กลุ่มแคธีลิซิดิน (cathelicidin) เชื่อมต่อกับเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 11 ตัว

Signed by DIP CA

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 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 (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

Signed by DIP-CA

(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)

การศึกษาคุณลักษณะของเปปไทด์เกลียวอัลฟาสายสั้น

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

Signed by DIP-CA

ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine) และอาร์จีนีน (Arginine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 13 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

Signed by DIP-CA

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 ATCC 27853	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	3.91	3.91
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91

2. การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิสของเปปไทด์ต้านจุลชีพ 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 มีความสามารถในการฆ่าเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส ได้ดีที่สุด โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ที่ได้จากการประดิษฐ์นี้

Signed by DIP-CA

ตารางที่ 3 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 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อซูโดโมแนส 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 ไมโครกรัมต่อ

Signed by DIP-CA

มิลลิลิตร 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

ตารางที่ 4 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

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

Signed by DIP CA

ข้อถือสิทธิ

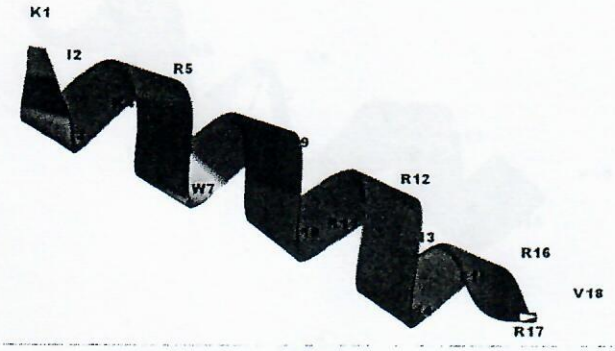
1. เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ที่ซึ่ง เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 23 ตัว ประกอบด้วย ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), อะลานีน (Alanine), ไลซีน (Lysine), อาร์จีนีน (Arginine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ทริปโตแฟน (Tryptophan), ไลซีน (Lysine), ไอโซลูซีน (Isoleucine), ลูซีน (Leucine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), ลูซีน (Leucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), อาร์จีนีน (Arginine), อาร์จีนีน (Arginine), วาลีน์ (Valine), ไลซีน (Lysine), ไลซีน (Lysine), วาลีน (Valine), อะลานีน (Alanine) และไกลซีน (Glycine) ตำแหน่งที่ 1 ถึง 23 ตามลำดับ

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

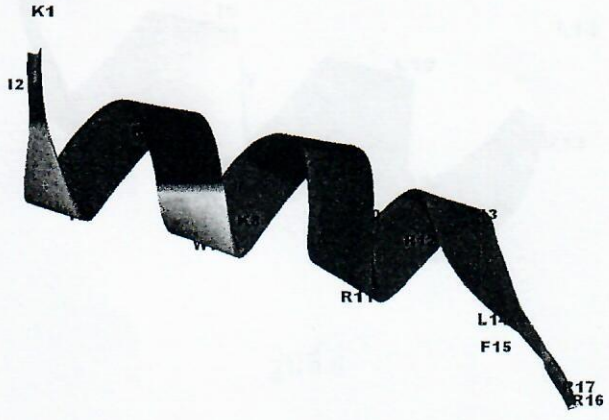
3. เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ตามข้อถือสิทธิ 1 หรือ 2 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) และเชื้อสแตฟฟิโลค็อกคัส อีพิเดอร์มิดิส (*Staphylococcus epidermidis*)

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

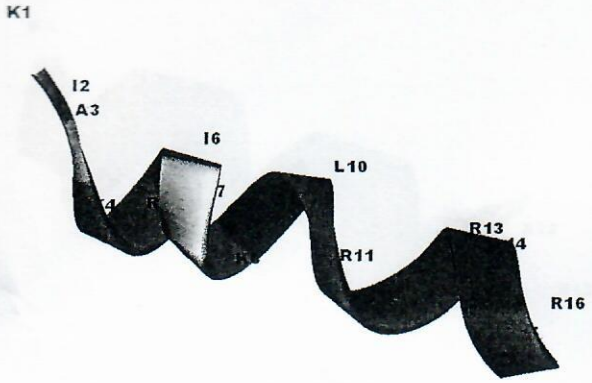
รูปที่ 1



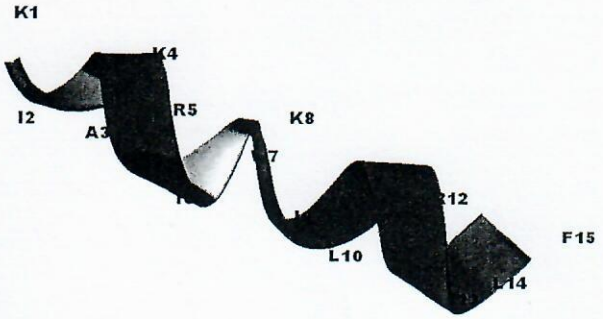
รูปที่ 2



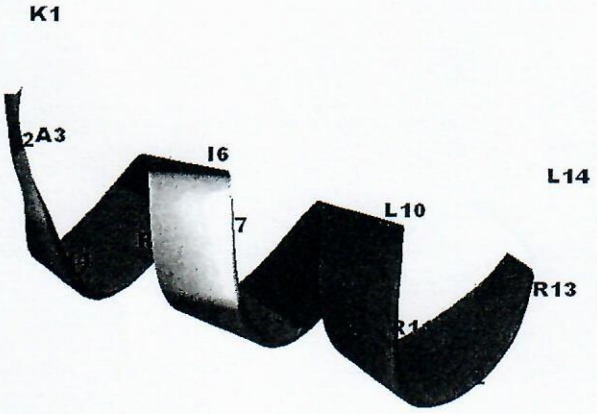
รูปที่ 3



รูปที่ 4

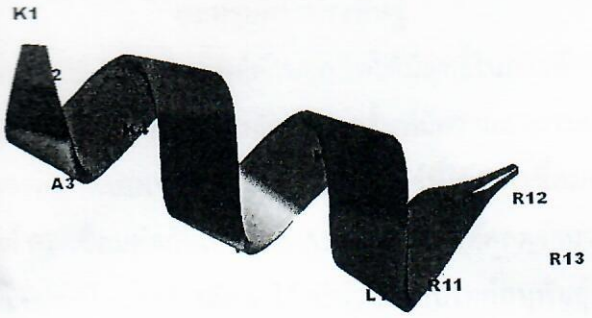


รูปที่ 5



รูปที่ 6

Signed by DIP-CA



รูปที่ 7

Signed by DIP-CA

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคแบคทีเรีย โดยออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้นที่มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนตายในที่สุด การออกแบบเปปไทด์ในการประดิษฐ์นี้ใช้การเชื่อมต่อกันของเปปไทด์ 2 ชนิด (Hybridization) คือ เปปไทด์ P7 เชื่อมต่อกับเปปไทด์ A3 และใช้การตัดลดจำนวนกรดอะมิโน (truncation) โดยคงลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญต่อโครงสร้างอัลฟาไว้ ทำให้ได้เปปไทด์อนุพันธุ์จำนวน 7 เปปไทด์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งประเภทแกรมลบและแกรมบวกรวมทั้งเชื้อก่อโรคดื้อยาได้ ซึ่งสามารถนำประยุกต์ใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและ/หรือใช้เป็นยาร่วมในการรักษาโรคติดเชื้อ เพื่อลดภาวะดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ จึงทำให้มีประโยชน์ทางด้านการแพทย์เป็นอย่างมากในอนาคต