



เลขที่อนุสิทธิบัตร 25657

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

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

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ 2203000011
วันขอรับอนุสิทธิบัตร 4 มกราคม 2565
ผู้ประดิษฐ์ นางสาวธีรกุล อารณสุวรรณ และคณะ

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2-His6 ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโต
ของเซลล์มะเร็งและเซลล์แบคทีเรีย

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ



ออกให้ ณ วันที่ 13 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2568
หมดอายุ ณ วันที่ 3 เดือน มกราคม พ.ศ. 2571

(นายกิตติวัฒน์ ปัจฉิมนันท์)
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.256801040183022

หน้า 1 ของจำนวน 9 หน้า

รายละเอียดการประดิษฐ์ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2-His6 ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเซลล์แบคทีเรีย

5 ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การศึกษาค้นคว้าออกแบบโครงสร้างโมเลกุลของเปปไทด์สังเคราะห์ดังกล่าวเพื่อเพิ่มฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์แบคทีเรีย เป็นแนวทางในการพัฒนารักษาการติดเชื้อแบคทีเรียและโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศ อีกทั้งไม่มีฤทธิ์ข้างเคียง ปลอดภัยต่อสุขภาพ การดัดแปลงโครงสร้างของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 โดยเชื่อมต่อดำวยหมู่ฮิสติดีน 6 ตำแหน่งที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงฤทธิ์ทางชีวภาพของสายเปปไทด์สังเคราะห์ต้นแบบ BmKn2 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kato cell III), มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) และด้านการเจริญของแบคทีเรีย โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell)

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

15 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2-His6 ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเซลล์แบคทีเรีย

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์แบคทีเรียของสายเปปไทด์อย่างแพร่หลาย มีการค้นพบเปปไทด์กลุ่มนี้มากมายทั้งในแบคทีเรีย รา พืช สัตว์ และคน มีความนิยมพัฒนาโมเลกุลของเปปไทด์เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะหรือยาต้านมะเร็ง เนื่องจากยาแผนปัจจุบันอาจกระตุ้นให้เชื้อจุลชีพมีการดื้อยา เป็นพิษต่อเซลล์ปกติและมีผลข้างเคียงต่ออวัยวะสำคัญ เช่น ตับ ในขณะที่เปปไทด์ไม่ทำให้เชื้อดื้อยา และยังมีฤทธิ์ข้างเคียงต่อเซลล์ปกติหรืออวัยวะสำคัญ อีกทั้งไม่ตกค้าง ทุกวันนี้มีการใช้เปปไทด์หรืออนุพันธ์ของเปปไทด์ในการรักษาโรคหลายชนิดเช่น เบาหวาน เยื่อช่องปากอักเสบ ปอดติดเชื้อร่วมกับมะเร็ง (cystic fibrosis) และการติดเชื้อที่ผิวหนัง เป็นต้น

25 เปปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides) คือ ส่วนของโปรตีนที่มีขนาดเล็ก พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดโดยเฉพาะตามผิวหนังและเยื่อเมือก เป็นส่วนประกอบในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด มีประโยชน์ในการต่อต้านเชื้อจุลชีพได้อย่างกว้างขวาง ทั้งแบคทีเรีย ไวรัสหรือเชื้อรา และช่วยส่งเสริมความสามารถในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย ยีนที่สังเคราะห์โปรตีนเปปไทด์เหล่านี้พบได้ในเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์ฟาโกไซติก (phagocytic cell) และเซลล์เยื่อบุผิวของเยื่อเมือก (mucosal epithelial cell) รวมทั้งเกล็ดเลือด



นายสุวิทย์ บุญอารี

Signed by DIP-CA

จากการศึกษาของ Zeng และคณะ พบว่า เปปไทด์ BmKn2 ที่สกัดได้จากพิษแมงป่อง *Buthus martensii* Kasch มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* AB94004, 4 สายพันธุ์ของ *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Micrococcus luteus* AB93113, *Bacillus subtilis* 5 AB91021, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* AB94012 และ 6 สายพันธุ์ของ *Pseudomonas aeruginosa* โดยความเข้มข้นที่ทำให้แบคทีเรียตายที่ 50% (MIC50) เท่ากับ 0.41-14.7 ไมโครโมล (μM) (Zeng et al., 2004)

ในขณะที่ Cao และคณะ รายงานว่า เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2-7 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเปปไทด์ BmKn2 มีฤทธิ์สูงกว่าเปปไทด์ต้นแบบ BmKn2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 10 หลายชนิด อีกทั้งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยความเข้มข้นที่ทำให้แบคทีเรียตายที่ 50% (MIC50) เท่ากับ 3.13-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) (Cao et al., 2012)

จากการศึกษาของ อีรกุล และคณะ (Arpornsuwan et al., 2014a) พบว่า เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis*, 15 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* โดยความเข้มข้นที่ทำให้แบคทีเรียตายที่ 50% (MIC50) เท่ากับ 4.83-5.87 ไมโครโมล (μM) (Arpornsuwan et al., 2014a) นอกจากนี้ เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาที่แยกได้จากผู้ป่วย 20 จำนวน 18 สายพันธุ์ โดยความเข้มข้นที่ทำให้แบคทีเรียตายที่ 50% (MIC50) เท่ากับ 6.9-27.6 ไมโครโมล (μM) (Arpornsuwan et al., 2014b)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ทั้งจากเต้านม กระเพาะปัสสาวะ รังไข่และปอด (Hoskin and Ramamoorthy 2008) งานวิจัยที่น่าสนใจคือ เปปไทด์เหล่านี้มีกลไกการออกฤทธิ์และเป้าหมายการออกฤทธิ์ต่างจากยาต้านมะเร็งที่ใช้ 25 ในปัจจุบัน และยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าอีกด้วย จากการการศึกษาของอีรกุล และคณะ พบว่า เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุช่องปากใน 30 มนุษย์ (human oral squamous carcinoma, HSC4) และ มะเร็งลำไส้ (human colon cancer, SW620) โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งตายที่ 50% (IC50) เท่ากับ 17.26 และ 40 ไมโครโมล (μM) ตามลำดับ (Arpornsuwan et al., 2014a)

การจดสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์ BmKn2 ได้แก่ สิทธิบัตรเลขที่ CN 101063102 A 30 เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมและผลิตเปปไทด์ BmKn2 จากแบคทีเรีย และการนำไปใช้ประโยชน์ (East-Asia scorpion antibiotic peptide gene and preparation method and application)



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

สิทธิบัตรเลขที่ CN101914140B เกี่ยวข้องกับ เปปไทด์สกัดจากพิษแมงป่องใช้ในการป้องกันไวรัสและการประยุกต์ใช้

สิทธิบัตรเลขที่ CN 102382839A เกี่ยวข้องกับวิธีการสกัดเปปไทด์จากพิษแมงป่อง ได้เป็นเปปไทด์หลายชนิด รวมทั้ง BmKn2 ที่มีความสามารถในการป้องกันเชื้อไวรัส herpes simplex 5 (HSV)

ยังไม่มีการจดสิทธิบัตรของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 ในด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเซลล์แบคทีเรีย

จากองค์ความรู้ที่ค้นพบโดยกลุ่มวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านมะเร็งของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 รวมทั้งแนวทางการปรับปรุงฤทธิ์ทางชีวภาพของสายเปปไทด์สังเคราะห์ จึงเกิดเป็นต้นแบบการดัดแปลงโครงสร้างของสายเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 โดยเชื่อมต่อกับหมู่ฮิสติดีน 6 ตำแหน่งที่ปลาย C (BmKn2-His₆) ซึ่งเปปไทด์สังเคราะห์ชนิดใหม่นี้ จะมีคุณสมบัติทั้งยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และต้านแบคทีเรียได้ดียิ่งขั้นกว่าสายเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 ต้นแบบ

ดังนั้นเปปไทด์ชนิดใหม่นี้จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการประยุกต์ใช้สำหรับเป็นสารต้านการติดเชื้อแบคทีเรียและรักษามะเร็งไปพร้อมกัน อีกทั้งยังไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

15 คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของ มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kato cell III), มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) และเซลล์ปกติ (Vero cell) โดยเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วย หมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) 5% DMSO เป็นตัวควบคุมผลบวก

20 รูปที่ 2 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 ด้วยวิธีการวัดความขุ่นของ แบคทีเรีย (turbidity) โดยเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) และ แบคทีเรียที่ไม่ได้สัมผัสกับเปปไทด์ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง เป็นตัวควบคุม (control)

25 การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2-His₆ ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเซลล์แบคทีเรีย เกิดจาก การดัดแปลงโครงสร้างของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 โดยเชื่อมต่อด้วยหมู่ฮิสติดีน 6 ตำแหน่งที่ปลาย C (BmKn2-His₆) โมเลกุลของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 ต้นแบบประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 13 กรดอะมิโน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ไอโซลูซีน ไกลซีน อะลานีน ไอโซลูซีน อะลานีน อาร์จินีน ลูซีน ลูซีน เซอรีน ไลซีน ไอโซลูซีน ฟีนิลอะลานีน (FIGAIARLLSKIF)


นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

หน้า 4 ของจำนวน 9 หน้า

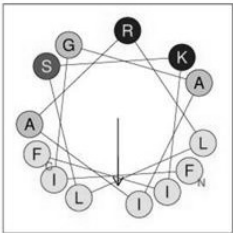
จากนั้นทำการเพิ่มกรดอะมิโนฮิสติดีนเข้าไปอีกจำนวน 6 กรดอะมิโนที่ปลาย C ของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 ได้เป็นโมเลกุลเปปไทด์ใหม่ BmKn2-His₆ มีฮิสติดีนเชื่อมต่อที่ปลาย C

เปปไทด์สังเคราะห์อีกสายหนึ่ง BmKn2-His₆ ประกอบด้วย ฟีนอลอะลานีน ไอโซลูซีน ไกลซีน อะลานีน ไอโซลูซีน อะลานีน อาร์จินีน ลูซีน ลูซีน เซอรีน โกลซีน ไอโซลูซีน ฟีนอลอะลานีน ฮิสติดีน ฮิสติดีน ฮิสติดีน ฮิสติดีน ฮิสติดีน (FIGAIARLLSKIFHHHHHH)

5

ตารางที่ 1 ภาพแสดงโครงสร้างและคุณสมบัติของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 เชื่อมต่อกับหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆)

10

ชื่อเปปไทด์สังเคราะห์	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว (อะมิโน)	ประจุรวม	pI	คุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity)	การทำนายโครงสร้าง (Structure Prediction)
BmKn2	FIGAIARLLSKIF	13	+2	11.39	69.23	
BmKn2-His ₆	FIGAIARLLSKIFHHHHHH	19	+2.6	11.39	47.37	

คุณสมบัติของเปปไทด์สังเคราะห์ใหม่นี้ได้ถูกวิเคราะห์โดยใช้

- โปรแกรม Lifetein (<http://lifetein.com/peptide-analysis-tool.html>) เพื่อทราบประจุและ pI
- โปรแกรม Peptide 2.0 (https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php) เพื่อทราบสมบัติ hydrophobicity
- โปรแกรม Heliquist (<https://heliquist.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>) เพื่อทราบโครงสร้างของเปปไทด์ ดังแสดงในตารางที่ 1

15


นายสุวิชัย นุญจारी

Signed by DIP-CA

1. การทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ทำการสั่งซื้อเปปไทด์จากบริษัท Chinapeptides เซี่ยงไฮ้ ประเทศจีน จากนั้นทำการเตรียมเปปไทด์สังเคราะห์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย DMSO จากนั้นเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และนำไปทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kato cell III), มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) และเซลล์ปกติ (Vero cell) ด้วยวิธี MTT โดยใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของแผ่นเพลตไมโครไทเทอร์ (microtiter plate) ที่มีปริมาณของเซลล์ประมาณ 30,000-40,000 เซลล์ต่อหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเติมสาร MTT ลงไปในเซลล์ นำเซลล์กลับไปไว้ในตู้บคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องอ่านค่าจากแผ่นเพลตไมโครไทเทอร์ (microtiter plate reader) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร หาความสัมพันธ์ของปริมาณของสารเปปไทด์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ug/ml) กับปริมาณของเซลล์ที่ถูกฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโต (% inhibition) เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับเปปไทด์

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของ มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kato cell III), , มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) และเซลล์ปกติ (Vero cell) โดยเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วย หมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) 5%DMSO เป็นตัวควบคุมผลบวก

	BmKn2 (100 µg/ml)	BmKn2-His ₆ (100 µg/ml)
ตัวควบคุมบวก (5% DMSO)	72	72
เซลล์ปกติ (Vero)	2	7.5
เซลล์มะเร็งตับ (HepG2)	23	70
เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kato III)	30	88
มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231)	6	106

จากผลการวิจัยพบว่า เปปไทด์ทั้งสามชนิด ได้แก่ เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และ BmKn2-His₆ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ Vero โดยที่ความเข้มข้นของเปปไทด์เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ Vero ได้น้อยกว่า 10% เมื่อเปรียบเทียบกับ 5% DMSO ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) ให้ผลยับยั้งการ

2023


นายสุวิชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

- เจริญเติบโตเท่ากับ 72% สำหรับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และ BmKn2-His₆, มีค่าเท่ากับ 23% และ 70% ตามลำดับ แสดงว่า เปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่อิสติตินที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากเปปไทด์ต้นแบบ BmKn2 ที่มีค่าเท่ากับ 23% เป็น 70% ส่วนการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kato III) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และ BmKn2-His₆ มีค่าเท่ากับ 30% และ 88% ตามลำดับ แสดงว่า เปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่อิสติตินที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นจากเปปไทด์ต้นแบบ BmKn2 ที่มีค่าเท่ากับ 30% ส่วนการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ของเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และ BmKn2-His₆ มีค่าเท่ากับ 6% และ 106% ตามลำดับ แสดงว่า เปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่อิสติตินที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นจากเปปไทด์ต้นแบบ BmKn2 ที่มีค่าเท่ากับ 6% เป็น 106% จากผลการทดลองทั้งหมด จะเห็นได้ว่า เปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่อิสติตินทางปลาย C (BmKn2-His₆) เป็นเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2, Kato, MDA (70-106%) เปรียบเทียบกับ 5% DMSO ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) มีค่ายับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเท่ากับ 50-76% และเปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่อิสติตินที่ปลาย C (BmKn2-His₆) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ Vero cell ด้วย (ดังแสดงในรูปที่ 1)

2. การทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

- ทำการทดสอบคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 ด้วยวิธีการวัดความขุ่นของ แบคทีเรีย (turbidity) โดยทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงบน ทีเอสเอ (TSA) แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลี้ยงเชื้อจาก ทีเอสเอ (TSA) ลงใน ทีเอสบี (TSB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ใส่ใน 96 หลุม แผ่นเพลตไมโครไทเทอร์ (microtiter plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.05 จากนั้นผสมเปปไทด์สังเคราะห์ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับแบคทีเรียความเข้มข้นมาตรฐานในแต่ละหลุมของแผ่นเพลตไมโครไทเทอร์ (microtiter plate) วัดความขุ่นของแบคทีเรียด้วยเครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่เวลา (contact time) 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมงตามลำดับ อ่านค่า


นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ความขุ่นของเชื้อที่ ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ความเข้มข้นของเปปไทด์เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) % ค่ายับยั้ง (% inhibition) โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับเปปไทด์ (control cell) ที่เวลาต่างๆ ดังกล่าวมาแล้ว ตามลำดับ

- 5 ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 ด้วยวิธีการวัดความขุ่นของ แบคทีเรีย (turbidity) โดยเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) ที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยมีแบคทีเรียที่ไม่ได้สัมผัสกับเปปไทด์ เป็นตัวควบคุม (control)

	BmKn2 (100 $\mu\text{g/ml}$)	BmKn2-His ₆ (100 $\mu\text{g/ml}$)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	90	90
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	50	68
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	97	97
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	96	96
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	95	92

- 15 จากผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ทั้งสามชนิด ได้แก่ เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และ BmKn2-His₆ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633) %ค่ายับยั้ง (% inhibition) เท่ากับ 90% ที่เวลา 6 ชั่วโมง แสดงว่าเปปไทด์ทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้เหมือนกัน

- 25 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ที่เวลาสัมผัสกับเปปไทด์เท่ากับ 2 ชั่วโมง เปปไทด์สังเคราะห์ทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้เท่ากับ 80% ในขณะที่เปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีค่ายับยั้งเท่ากับ 68% ส่วนเปปไทด์ต้นแบบ BmKn2 มีค่ายับยั้งเท่ากับ 50% แสดงว่า เปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีประสิทธิภาพดีขึ้นมากกว่าเปปไทด์ต้นแบบ

- 30 *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และ BmKn2-His₆ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 $\mu\text{g/ml}$ มีค่ายับยั้งเท่ากับ 80-100% ทุกเวลาที่สัมผัสกับเปป



นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ไทด์ แสดงว่า เปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีประสิทธิภาพดีเท่ากับเปปไทด์ต้นแบบ

Staphylococcus aureus ATCC 25923 เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 และ BmKn2-HIS ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (μg/ml) มีค่ายับยั้งเท่ากับ 80-100% ทุกเวลาที่สัมผัสกับเปปไทด์ เช่นเดียวกับผลการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) แสดงว่า

5 เปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีประสิทธิภาพดีเท่ากับเปปไทด์ต้นแบบ ผลที่ได้เช่นเดียวกับผลของ *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA)

Escherichia coli ATCC 25922 เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2-His₆ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (μg/ml) มีค่ายับยั้งเท่ากับ 90-100% ทุกเวลาที่สัมผัสกับเปปไทด์ เช่น

10 เดียวกับเปปไทด์ต้นแบบ แสดงว่า เปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีประสิทธิภาพดีเท่ากับเปปไทด์ต้นแบบ (รูปที่ 2)

สรุปผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 ด้วยวิธีการวัดความขุ่น

15 ของแบคทีเรีย (turbidity) พบว่าเปปไทด์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วยหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดตั้งที่กล่าวมาข้างต้น และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีกว่าเปปไทด์ต้นแบบ BmKn2

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

20 รายการเอกสารอ้างอิง

Arpornsuwan T, Sriwai W, Jaresitthikunchai J, Phaonakrop N, Sritanaudomchai H, Roytrakul S. Anticancer Activities of Antimicrobial BmKn2 Peptides Against Oral and Colon Cancer Cells. Int J Pept Res Ther. 2014 (a) 20:501-509: DOI 10.1007/s10989-014-9417-9.

25 Arpornsuwan T, Buasakul B, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S. Potent and rapid antigenococcal activity of the venom peptide BmKn2 and its derivatives against different Maldi biotype of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. Peptides. 2014 (b) Mar;53:315-20. doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.020. Epub 2013 Oct 31. PMID: 24184420.

30 Cao L, Dai C, Li Z, Fan Z, Song Y, Wu Y, Cao Z, Li W. Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative *in vitro* and *in vivo*. PLoS One. 2012;7(7):e40135. doi: 10.1371/journal.pone.0040135. Epub 2012 Jul 5.


นายสุวิทย์ ชัยภูมิ

Signed by DIP-CA

Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Feb;1778(2):357-75. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.11.008. Epub 2007 Nov 22. PMID: 18078805; PMCID: PMC2238813.

- 5 Zeng XC, Wang SX, Zhu Y, Zhu SY, Li WX. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*. 2004 Feb;25(2):143-50. doi: 10.1016/j.peptides.2003.12.003. PMID: 15062994.

25657

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

ข้อถ้อยสัญญา

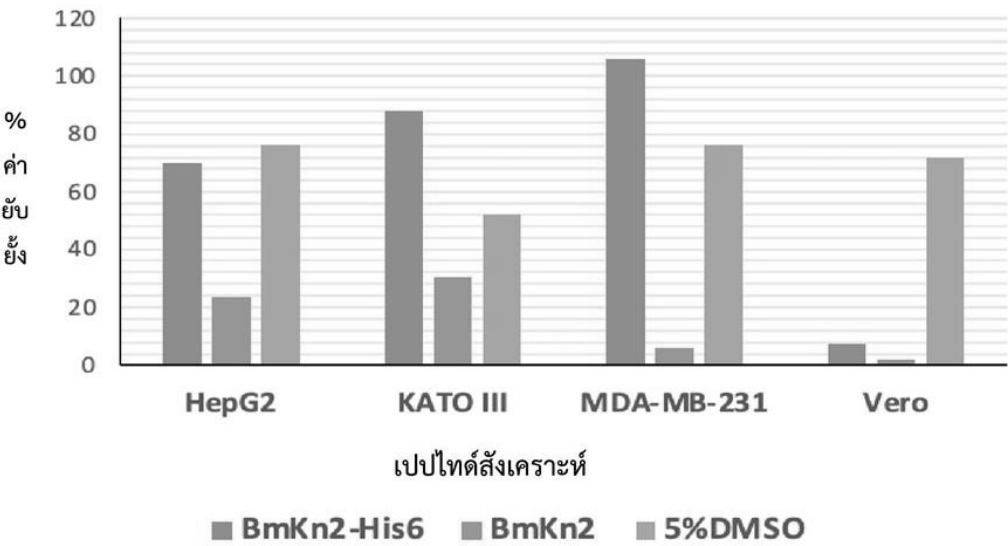
1. เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2-His6 ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเซลล์
 แบคทีเรียที่ซึ่ง มีจำนวนกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันเป็นสาย ประกอบด้วย ฟีนีลอะลานีน
 (Phenylalanine) F 2 กรดอะมิโน, ไอโซลิวซีน (Isoleucine) I 3 กรดอะมิโน, ไกลซีน (Glycine) G 1
 5 กรดอะมิโน, อะลานีน (Alanine) A 2 กรดอะมิโน, อาร์จินีน (Arginine) R 1 กรดอะมิโน, ลิวซีน
 (Leucine) L 2 กรดอะมิโน, เซอรีน (Serine) S 1 กรดอะมิโน, ไลซีน (Lysine) K 1 กรดอะมิโน **ที่มี**
ลักษณะพิเศษ คือ เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วย (Histidine) H 6 กรดอะมิโน ที่ตำแหน่งที่
 ปลาย C (BmKn2-His6) โดยมีลำดับกรดอะมิโนเป็น FIGAIARLLSKIFHHHHHHH
2. เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2-His6 ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเซลล์
 10 แบคทีเรีย ตามข้อถ้อยสัญญา 1 ที่ซึ่ง เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 เชื่อมต่อด้วย (Histidine) H 6 กรดอะ
 มิโน ที่ตำแหน่งที่ปลาย C (BmKn2-His6) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ
 เซลล์มะเร็ง ได้แก่ มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kato cell III), มะเร็งเต้านม (MDA-
 MB-231) และเซลล์ปกติ (Vero cell) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

25657



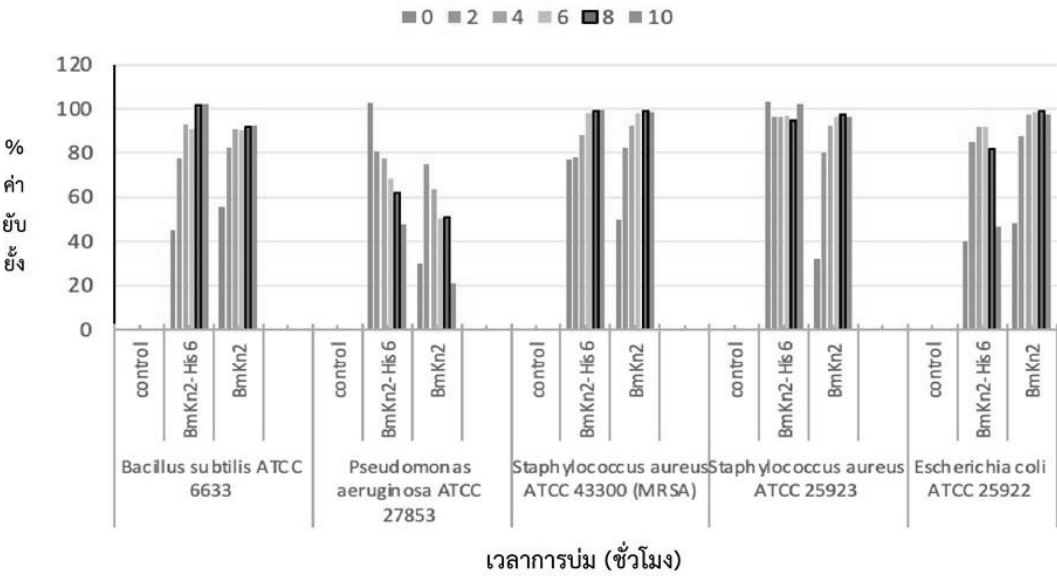
นายสุวิชัย ปญญาสี

Signed by DIP-CA



รูปที่ 1

25657



เวลาการบ่ม (ชั่วโมง)

รูปที่ 2

25657

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

บทสรุปการประดิษฐ์

- เปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2-His6 ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเซลล์แบคทีเรีย เป็นเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ไม่เป็นพิษต่อ Vero พบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ BmKn2 ที่เชื่อมต่อกับหมู่ฮิสติดีนที่ปลาย C (BmKn2-His₆) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง ได้แก่ มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kato cell III), มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้ดียิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ต้นแบบ BmKn2

25657


 นายสุวิชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA