

รายละเอียดการประดิษฐ์

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

อนุภาคนาโนโพลีเมอร์ ชนิดโพลีดีแอลแลคไทด์โคไกลโคไลด์ (PLGA) ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า
5 (*Pleurotus sajor-caju*) ในการใช้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกันและเพื่อการผลิตวัคซีน

2. สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

ภูมิคุ้มกันวิทยา, วิทยาศาสตร์การแพทย์ และเทคนิคการแพทย์

3. ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

เห็ดนางฟ้า มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus sajor-caju* เป็นเห็ดที่สามารถนำมารับประทานได้ พบ
10 มากในเขตร้อนชื้น ซึ่งเห็ดเหล่านี้มักเป็นเห็ดทางการแพทย์ที่มีฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory)
เนื่องจากมีสารโพลีแซคคาไรด์ซึ่งพบได้ในไวรัสจำพวกงา และส่วนใหญ่จะพบเป็นสารจำพวกเบตากลูแคนและอัล
ฟากลูแคน (β - and α -glucans) (1) ซึ่งสารโพลีแซคคาไรด์ที่พบในเห็ดนางฟ้านี้ มีรายงานพบว่าสามารถกระตุ้น
ระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยมีฤทธิ์กระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด helper T cells และเพิ่มจำนวน CD4+/CD8+ T-cells
(2) จึงมีการใช้สารนี้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกันร่วมกับโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ใช้เป็นวัคซีน (2).

15 เนื่องการผลิตวัคซีนชนิดเปปไทด์จากเชื้อไวรัสมีข้อเสียคือ โปรตีนจะเสถียรภาพง่ายและมีความเป็น
แอนติเจนต่ำ จึงทำให้วัคซีนชนิดเปปไทด์มีประสิทธิภาพที่ต่ำลงได้ง่าย (3) ดังนั้นในการพัฒนาวัคซีนจึงควรพัฒนา
ระบบนำส่งวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งในปัจจุบันสารโพลีเมอร์ Poly D, L lactide-co-glycolide (PLGA) เป็นโพลี
เมอร์ชนิดย่อยสลายได้ ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในระบบนำส่งวัคซีนและพบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีในการรักษา
สภาพโปรตีนแอนติเจนและช่วยให้เกิดการนำเสนอแอนติเจนที่ดียิ่งขึ้น เนื่องจากอนุภาค PLGA จะช่วยเสริม
20 โครงสร้างของเปปไทด์ให้จับกับอนุภาค จึงทำให้วัคซีนชนิดเปปไทด์มีโครงสร้างเป็นอนุภาคที่คล้ายคลึงเชื้อจุลชีพใน
ธรรมชาติมากยิ่งขึ้น และทำให้เซลล์ฟาโกไซต์ (phagocytes) มาจับกินอนุภาคของโปรตีนแอนติเจนได้มากขึ้น จึง
เป็นการปรับปรุงความเป็นแอนติเจนของวัคซีนชนิดเปปไทด์ (4) (5)

อย่างไรก็ตามเนื่องจากอนุภาคนาโนชนิด PLGA ที่นำมาใช้ในงานวัคซีนนั้นยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดสำหรับ
การเพิ่มจำนวนทั้ง helper T-cells และ cytotoxic T-cells (CD4+/CD8+ T-cells) ที่ช่วยกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อ

25 หน้าที่ 2 ของจำนวน 12 หน้า

ไวรัสและเซลล์มะเร็ง (6) (7) ดังนั้นควรมีการเพิ่มสารเสริมภูมิคุ้มกันที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้ง helper T-cells
และ cytotoxic T-cells

ดังนั้นในการประดิษฐ์นี้ จึงได้พัฒนาอนุภาคนาโนโพลีเมอร์ ชนิดโพลีดีแอลแลคโตดีโคไกลโคไลด์ (poly D, L lactide-co-glycolide nanoparticles) หรือ อนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (Pleurotus sajor-caju) โดยใช้เทคนิค encapsulation แบบ double emulsion (water-in-oil-in-water) ในการใช้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกัน (adjuvant) และเพื่อการผลิตวัคซีน ซึ่งพบว่ามียฤทธิ์เป็น adjuvant ที่ดี เมื่อนำ adjuvant ชนิดนี้มาฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองร่วมกับวัคซีนชนิดเปปไทด์ของไวรัสพบว่าสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ดีและเป็นการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพ โดยสามารถเพิ่มระดับของแอนติบอดีต่อไวรัสและเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocytes (CD4+/CD8+ T-cells) ในหนูทดลองได้มากกว่าการฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนชนิดเปปไทด์ของไวรัสที่ฉีดร่วมกับอนุภาคนาโนชนิด PLGA เพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนทั้ง helper T-cells และ cytotoxic T-cells ที่ช่วยกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

1. Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clin Microbiol Rev. 2000;13(4):523-33.
 2. Kim YH, Jung EG, Han KI, Patnaik BB, Kwon HJ, Lee HS, et al. Immunomodulatory Effects of Extracellular beta-Glucan Isolated from the King Oyster Mushroom *Pleurotus eryngii* (Agaricomycetes) and Its Sulfated Form on Signaling Molecules Involved in Innate Immunity. International journal of medicinal mushrooms. 2017;19(6):521-33.
 3. Ma W, Chen M, Kaushal S, McElroy M, Zhang Y, Ozkan C, et al. PLGA nanoparticle-mediated delivery of tumor antigenic peptides elicits effective immune responses. Int J Nanomedicine.7:1475-87.
- หน้าที่ 3 ของจำนวน 12 หน้า
4. Hamdy S, Haddadi A, Hung RW, Lavasanifar A. Targeting dendritic cells with nanoparticulate PLGA cancer vaccine formulations. Adv Drug Deliv Rev.63(10-11):943-55.
 5. Sharma C, Khan MA, Mohan T, Shrinet J, Latha N, Singh N. A synthetic chimeric peptide harboring human papillomavirus 16 cytotoxic T lymphocyte epitopes shows therapeutic potential in a murine model of cervical cancer. Immunol Res.58(1):132-8.

- 55 6. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*.12(2):136-48.
7. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, et al. Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive
60 cervical cancer. *J Virol*. 1999;73(7):5402-10.
8. Luo L, Qin T, Huang Y, Zheng S, Bo R, Liu Z, et al. Exploring the immunopotential of Chinese yam polysaccharide poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in an ovalbumin vaccine formulation in vivo. *Drug Deliv*. 2017;24(1):1099-111.

4. ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- 65 การประดิษฐ์นี้มุ่งเน้นผลิต อนุภาคนาโนโพลีเมอร์ ชนิดโพลีดีแอลแลคไทด์โคไกลโคไลด์ (poly D, L lactide-co-glycolide nanoparticles) หรือ PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) โดยใช้เทคนิค encapsulation แบบ double emulsion (water-in-oil-in-water) เพื่อการใช้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกัน หรือ adjuvant และเพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีน

5. การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

งานด้านเคมี

1. การสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า

75 นำเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) มาสับและบดให้ละเอียดจากนั้นนำมาต้มด้วยน้ำร้อนและใช้การสกัดด้วยเทคนิค Percolation and Soxhlet techniques (2) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาแช่แข็งแล้วทำการระเหยแห้งให้เป็นผง แล้วนำมาละลายใน carboxymethylcellulose เมื่อต้องการใช้ [(2)]

2. การสังเคราะห์อนุภาค PLGA และ อนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า

80 การเตรียมอนุภาค PLGA โดยนำสารโพลีเมอร์ PLGA (poly D, L lactide-co-glycolide) มาละลายในสาร Dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นทำการขึ้นรูปด้วยเทคนิค double emulsion (water-in-oil-in-water) (8) โดยการเตรียมอนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า ด้วยการนำสารละลายโพลีแซคคาไรด์จากข้อ 1 มาละลายในน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลาย internal water phase จากนั้นนำไปเติมลงในสารละลาย PLGA ซึ่งเป็นสารละลาย organic phase จะได้สารละลาย double emulsion (water-in-oil-in-water) แล้วนำไปยิงด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเพื่อให้โมเลกุลของสารนั้นแยกออกเป็นส่วน ๆ (sonication) และทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) โดยเติมลงในสารละลาย Poloxamer 188 (F68) solution (external water phase) ตามด้วยการใช้ probe ที่ยิงด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเพื่อให้โมเลกุลของสารนั้นแยกออกเป็นส่วน ๆ (probe sonication) จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายเคมีอินทรีย์ออกไป โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ (8).

3. การทดสอบคุณสมบัติของอนุภาค PLGA และ อนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า

90 การวัดขนาดของอนุภาค PLGA และ อนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า โดยการนำอนุภาคมาเจือจางให้เป็นสารแขวนลอยในน้ำปราศจากไอออน จากนั้นทำการ ultrasonication ที่อุณหภูมิห้องก่อนการทดสอบ จากนั้นนำมาวัดขนาดด้วยเครื่อง Malvern Mastersizer 2000 พบว่า อนุภาค PLGA และ อนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า มีขนาด 532.88 และ 679.73 nm ตามลำดับ (รูปที่ 1).

หน้าที่ 5 ของจำนวน 12 หน้า

95 และมีค่า Polydispersion (PDI) ที่ 0.232 และ 0.486 จากนั้นนำอนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้ามาทดสอบสารเบต้ากลูแคนด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป (β - glucan kit) พบว่าในอนุภาคนาโนมีสารโพลีแซคคาไรด์ที่ต้องการ

4. การวัดระดับแอนติบอดีและจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีเซลล์ (CD4+, CD8+ T-cell)

หนูทดลองได้แบ่งเป็นสี่กลุ่มๆละ สามตัวโดยกลุ่มที่หนึ่งได้รับสารละลายน้ำเกลือ (Normal Saline) กลุ่มที่
100 สองได้รับวัคซีนแบบโปรตีนจากไวรัส กลุ่มที่สามได้รับอนุภาค PLGA และวัคซีนแบบโปรตีนจากไวรัส กลุ่มที่สี่ได้รับ
อนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าและวัคซีนแบบโปรตีนจากไวรัส เมื่อครบหนึ่งเดือนได้ทำ
การเจาะเลือดจากหนูทดลองแล้วนำไปตรวจวัดจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ และ CD8+ T-cell surface
marker โดยเทคนิค flow cytometer และนำส่วนของซีรัมมาตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยเทคนิค mice serum
105 โดยเทคนิค Indirect ELISA ผลการทดลองพบว่า อนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าเมื่อฉีด
ร่วมกับวัคซีนแบบโปรตีนจากไวรัส สามารถเพิ่มระดับของแอนติบอดีต่อไวรัสและจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด T-
lymphocytes (CD4+/CD8+ T-cells) ในหนูทดลองได้มากกว่าการฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนชนิดเปปไทด์ของไวรัสที่
ฉีดร่วมกับอนุภาคนาโนชนิด PLGA เพียงอย่างเดียว

6. คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงถึง การวัดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค PLGA (A) และ อนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลี
110 แซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (B)

รูปที่ 2 คือ การวัดปริมาณสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าที่บรรจุในอนุภาค PLGA ด้วยเทคนิค
encapsulation

รูปที่ 3 การวัดระดับแอนติบอดีของหนูทดลองโดยเทคนิค Indirect ELISA. ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย อนุภาค
PLGA และ อนุภาค PLGA ที่บรรจุและสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าร่วมกับโปรตีนจากไวรัส

115 **รูปที่ 4** การวัดระดับ CD4+ และ CD8+ T cells โดยเทคนิค flow cytometry ในหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้น
ด้วย อนุภาค PLGA และ อนุภาค PLGA ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า โดยฉีดร่วมกับโปรตีนจาก
ไวรัส

120 7. วิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ดังที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

บทสรุปการประดิษฐ์

- 125 อนุภาคนาโนชนิด poly D, L lactide-co-glycolide nanoparticles (PLGA) ที่มีลักษณะเฉพาะคือด้านในของอนุภาคจะมีการบรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) ในการบรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้านี้มีคุณสมบัติสารเสริมภูมิคุ้มกันหรือ adjuvant สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนได้ โดยสามารถเพิ่มการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ทั้งในระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำและระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ จึงสามารถนำมาใช้เพื่อการผลิตวัคซีนหรือใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีน

ข้อถ้อยสิทธิ

1.อนุภาคนาโนโพลีเมอร์ ชนิดโพลีดีแอลแลคไทด์โคไกลโคไลด์ (PLGA) ที่มีลักษณะเฉพาะคือด้านในของอนุภาคจะมีการบรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*)

135

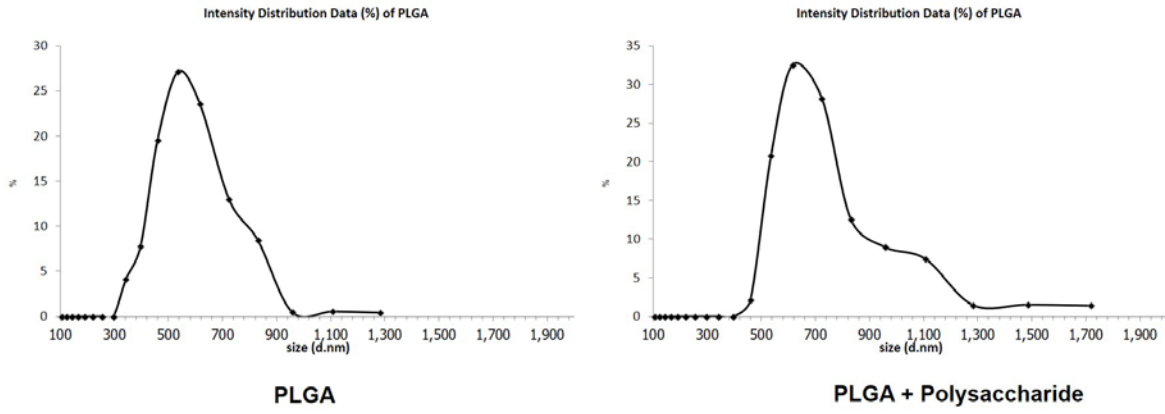
2.อนุภาคนาโนโพลีเมอร์ ชนิดโพลีดีแอลแลคไทด์โคไกลโคไลด์ (PLGA) ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) ตามข้อถ้อยสิทธิ 1 หรือ 2 เพื่อการผลิตวัคซีนหรือใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีน

140

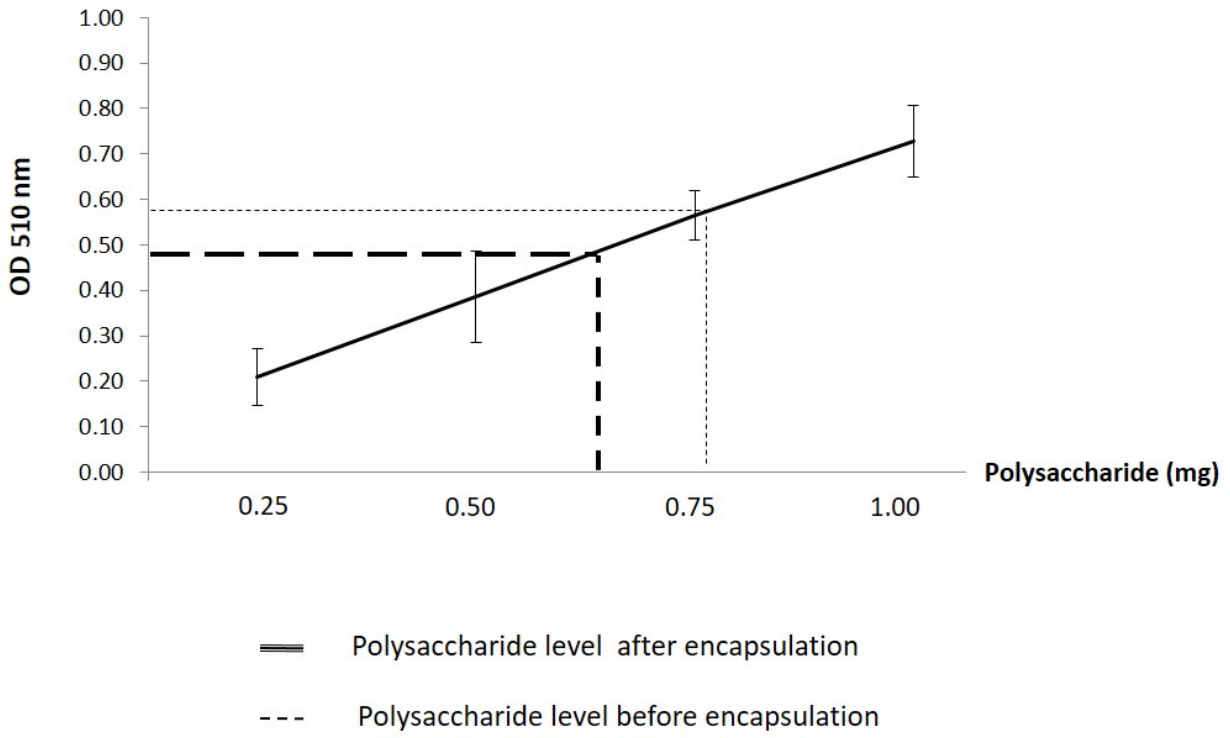
3.อนุภาคนาโนโพลีเมอร์ ชนิดโพลีดีแอลแลคไทด์โคไกลโคไลด์ (PLGA) ที่บรรจุสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) ตามข้อถ้อยสิทธิ 1 เพื่อการใช้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกันหรือ adjuvant

รูปที่ 1

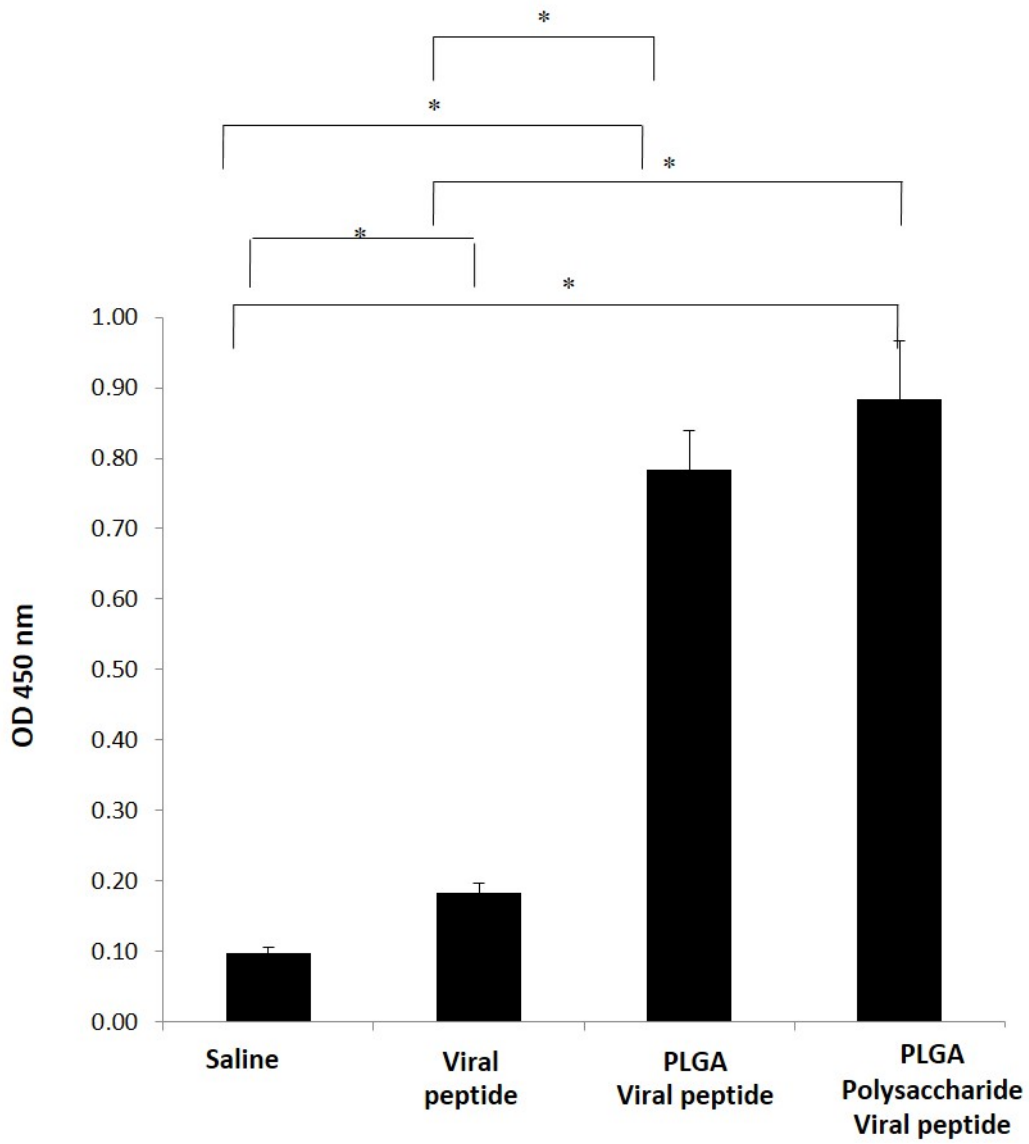
145



รูปที่ 2



รูปที่ 3



รูปที่ 4

