(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-6105
(P2016-6105A)
(43)公開日　平成28年1月14日(2016.1.14)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 31/4412	***(2006.01)***	A61K	31/4412	
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	43/00	111
A61P 17/00	***(2006.01)***	A61P	17/00	
A61P 31/10	***(2006.01)***	A61P	31/10	
A61K 31/4745	***(2006.01)***	A61K	31/4745	

審査請求 有　請求項の数 3　ＯＬ　外国語出願　（全 20 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-160847 (P2015-160847)
(22)出願日　平成27年8月18日 (2015.8.18)
(62)分割の表示　特願2013-536864 (P2013-536864)の分割
原出願日　平成23年10月28日 (2011.10.28)
(31)優先権主張番号　61/407,757
(32)優先日　平成22年10月28日 (2010.10.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　590005058
ザ　プロクター　アンド　ギャンブル　カンパニー
アメリカ合衆国オハイオ州，シンシナティー，ワン　プロクター　アンド　ギャンブル　プラザ　（番地なし）
(74)代理人　100110423
弁理士　曾我　道治
(74)代理人　100111648
弁理士　梶並　順
(74)代理人　100122437
弁理士　大宅　一宏
(74)代理人　100161115
弁理士　飯野　智史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アコニターゼ阻害による微生物増殖の阻害

(57)【要約】　（修正有）
【課題】個人における真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法の提供。
【解決手段】個人における真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法であって、前記真菌細胞によるアコニターゼの活性を阻害するのに有効な量で、アコニターゼ活性の阻害物質を含む組成物を前記真菌細胞に投与する工程を含み、該アコニターゼ活性の阻害物質が、１，１０－フェナントロリン、Ｎ－ヒドロキシ－６－オクチルオキシピリジン－２（１Ｈ）オン、エタノールアミン塩、ピロクトンオラミン、８－ヒドロキシキノリン及びこれらの混合物から選択される方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
個人における真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法であって、前記真菌細胞によるアコニターゼの活性を阻害するのに有効な量で、アコニターゼ活性の阻害物質を前記真菌細胞に投与する工程を含む、方法。
【請求項２】
前記個人がふけ症患者である、請求項１に記載の真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法。
【請求項３】
前記アコニターゼ活性の阻害物質が、フルオロクエン酸塩、４－ヒドロキシ－トランス－アコニターゼ、オキサロマラート、アルファ－ヒドロキシ－ベーター－オキサロコハク酸、活性酸素種又は酸化種、過酸化亜硝酸、一酸化窒素、過酸化水素、超酸化物、１，２，３－Ｄ，Ｌ－トリカルボキシシクロペンテン－１、トリメシン酸（１，３，５－トリカルボキシベンゼン）、トリメリット酸（１，２，４－トリカルボキシベンゼン）、ピロメリット酸（１，２，４，５－テトラカルボキシベンゼン）、１，２，３，４－テトラカルボキシシクロペンタン、クレブス回路物質、オキサロスクシナート、トランス－アコニターゼ、シス－アコニターゼ、アルファ－ケトグルタル酸、２－オキソグルタレート、オキサロアセテート、アロキサン、１－メチル－４－フェニルピリジン、マンガン、ロンプロテアーゼ、Ｎ－ヒドロキシ－６－オクチルオキシピリジン－２（１Ｈ）オン、エタノールアミン塩、ピリチオン及びピリチオンの金属塩、ジンクピリチオン、並びにこれらの混合物からなる群から選択される、請求項１又は２に記載の真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法。
【請求項４】
前記アコニターゼ活性の阻害物質が、ジンクピリチオンである、請求項１～３のいずれか一項に記載の真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法。
【請求項５】
前記アコニターゼの阻害物質が、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する、請求項１～４のいずれか一項に記載の真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法。
【請求項６】
抗真菌効果のためにアコニターゼ活性を阻害する方法であって、
ａ）細胞を物質に曝露する工程と、
ｂ）細胞を開き、アコニターゼ活性を測定する工程と、
ｃ）ベースライン又は対照／未処理の試料と比較してアコニターゼ活性の減少を測定する工程と、を含む、方法。
【請求項７】
真菌細胞の増殖を阻害する方法であって、前記真菌細胞を、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する物質と接触させる工程を含み、それによって前記真菌細胞の増殖の阻害を引き起こす、方法。
【請求項８】
アコニターゼ酵素に対する阻害活性を有する物質のうちの１つ以上を含むパーソナルケア組成物であって、前記物質が、抗真菌薬が媒介する症状を処置する有効性の増強をもたらすように、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する、パーソナルケア組成物。
【請求項９】
前記物質が、抗真菌薬が媒介する頭皮の症状を処置する有効性の増強をもたらすように、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する、請求項８に記載のパーソナルケア組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、個人において真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法を目的とし、本方

法は、前記真菌細胞によるアコニターゼ活性を阻害するのに有効な量で、アコニターゼ活性の阻害物質を真菌細胞に投与する工程を含む。

【背景技術】

【０００２】

理論に束縛されるものではないが、ピリチオン含有の抗真菌薬の、抗真菌性の作用メカニズムは、アコニターゼ及び他のミトコンドリアの鉄イオウタンパク質の阻害に関与すると考えられる。阻害のメカニズムは、アービング－ウィリアムズ系列に従って、外因性又は内因性の銅のいずれか及びレート交換（transchelation）との関連によって、細胞中の銅ピリチオンの化成に関与すると考えられる。銅ピリチオンは、次いで、ミトコンドリア膜を横断し、アコニターゼなどの鉄イオウタンパク質と相互作用することが可能であり、鉄イオウ活性部位の変化及び結果として生じる活性の阻害をもたらす。

【０００３】

本発明において、ＺＰＴ感度は、高い銅濃度からの保護において欠陥のあるＣＵＰ２欠失菌株で増加することが分かった。この観察結果及び他の観察結果から、銅は増殖阻害を誘発するＺＰＴの効果を増大させるが、メカニズムは未知であったということが理解されるだろう。

【０００４】

本発明を通じて、サッカロマイセス欠失ライブラリー菌株のＺＰＴ感度の結果を含み、ミトコンドリアの鉄イオンタンパク質の成熟がＺＰＴの重要な標的であることが分かる。このことは、最小限の媒質において、ＺＰＴは、ミトコンドリアの鉄イオウタンパク質アコニターゼの活性を必要とするグルタメート及びリジンの合成の阻害によって増殖を阻害するという本発明の実証試験によって確証される。更に、ＺＰＴの存在下での細胞の培養はアコニターゼ阻害をもたらす。本発明は、ＺＰＴの作用メカニズムの理解を重要な標的酵素の識別まで拡大する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

個人における真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法であって、本方法は、前記真菌細胞によるアコニターゼ活性を阻害するのに有効な量で、アコニターゼの阻害物質を真菌細胞に投与する工程を含む。

【発明を実施するための形態】

【０００６】

本明細書は、本発明を特に指摘し明確に請求する特許請求の範囲で完結するが、本発明は、以下の説明により、より良く理解されると考えられる。

【０００７】

本発明は、本明細書に記載した本発明の必須要素及び制限事項、並びに本明細書に記載した追加若しくは任意の成分、構成成分又は制限事項のいずれも含むことができ、これらからなることができ、又はこれらから本質的になることができる。

【０００８】

特に断らない限り、比率、部、及び比はすべて、本発明の組成物の総重量に基づく。提示された成分に関するこのような重量はすべて、活性物質の濃度に基づいており、したがって、市販材料に含まれる可能性があるキャリア又は副生成物は含まない。

【０００９】

本発明の様々な実施形態の構成成分及び／又は工程を、任意に加えてもよいものを含めて、以下で詳細が記載される。

【００１０】

引用されるすべての文献は、その関連部分において参照により本明細書に組み込まれるが、いずれの文献の引用もそれが本発明に関連する先行技術であることの容認として解釈されるべきではない。

【００１１】

特に記載のない限り、すべての比率は重量比である。
【００１２】
特に記載のない限り、すべての温度は摂氏である。
【００１３】
特に指摘される場合を除き、分量、百分率、部分、及び割合を含むすべての量は、「約」という単語により修正されると理解され、量は有効数字を示すことを意図しない。
【００１４】
特に指摘される場合を除き、冠詞「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、「１つ以上の」を意味する。
【００１５】
本明細書において「含む」とは、最終結果に影響を与えない他の工程及び他の成分を追加できることを意味する。この用語には、「からなる」及び「から本質的になる」という用語が含まれる。本発明の組成物及び本発明の方法／プロセスは、本明細書に記載した発明の必須要素及び制限事項、並びに本明細書に記載した追加若しくは任意の成分、構成成分、工程、又は制限事項のいずれをも含むことができ、これらからなることができ、及びこれらから本質的になることができる。
【００１６】
本明細書において「有効な」とは、処置する症状の著しく好ましい改善をもたらすのに十分高い対象活性物質の量を意味する。対象活性物質の有効量は、処置する特定の症状、症状の重さ、処置期間、併用している処置の性質及び同様の要因により変化する。
【００１７】
本明細書において「アコニターゼ阻害」とは、溶解細胞から回収され得るアコニターゼ活性の減少を意味する。そのようなアコニターゼ阻害は、酵素の直接的な阻害又は活性アコニターゼの合成の阻止を含んでもよい。活性アコニターゼの合成は、アコニターゼタンパク質の合成の不足、アコニターゼタンパク質の適切な折り畳みの不足、機能的鉄イオウクラスタの、アコニターゼへの取り込みの不足、又はアコニターゼ中のダメージを受けた鉄イオウクラスタの存在に起因するものであってもよい。
【００１８】
本明細書において「パーソナルケア組成物」とは、脱色、着色、染色、コンディショニング、育毛、脱毛、育毛遅延、シャンプー、整髪を含む、毛髪（ヒト、イヌ、及び／又はネコ）の処理のための製品及び／又はそれに関連する方法；デオドラント剤及び制汗剤；パーソナルクレンジング；カラー化粧料；クリーム、ローション、及び他の局所に適用される消費者用製品の適用を含む、皮膚（ヒト、イヌ、及び／又はネコ）の処置に関する製品及び／又は方法；並びに毛髪、皮膚、及び／又は爪（ヒト、イヌ、及び／又はネコ）の外観を向上させるために経口投与される物質に関する製品及び／又は方法、並びにシェービング剤を意味する。
【００１９】
Ａ．ピリチオン又はピリチオンの多価金属塩
一実施形態において、本発明は、ピリチオン又はピリチオンの多価金属塩を含んでもよい。血小板状及び針構造などの、いかなる形態の多価金属のピリチオン塩も用いてよい。更なる実施形態において、本明細書に用いる塩は、多価金属マグネシウム、バリウム、ビスマス、ストロンチウム、銅、亜鉛、カドミウム、ジルコニウム及びこれらの混合物から形成されるものを含み、更なる実施形態においては、亜鉛から形成されるものを含む。また更なる実施形態において、本明細書に用いるのは、１－ヒドロキシ－２－ピリジンチオンの亜鉛塩（「ジンクピリチオン」又は「ＺＰＴ」として既知）であり、別の実施形態においては、血小板状粒子形態のＺＰＴであり、その中で、粒子は最大約２０μｍの平均粒径を有し、一実施形態では、最大約５μｍの平均粒径を有し、また更なる実施形態では、最大約２．５μｍの平均粒径を有する。
【００２０】
ピリジンチオン抗菌剤及び抗ふけ剤は、例えば、米国特許第２，８０９，９７１号、同

第３，２３６，７３３号、同第３，７５３，１９６号、同第３，７６１，４１８号、同第４，３４５，０８０号、同第４，３２３，６８３号、同第４，３７９，７５３号、及び同第４，４７０，９８２号に記載されている。

【００２１】

ＺＰＴを本明細書の抗菌組成物中の抗菌粒子として使用すると、付加的な効果である育毛若しくは再生が促進若しくは調節される場合があり、又はその両方である場合があり、又は脱毛が減少若しくは抑制される場合があり、又は毛髪がより濃く見える若しくはより豊かに見える場合があることが更に考えられる。

【００２２】

ジンクピリチオンは、米国特許第２，８０９，９７１号に記載のように、１－ヒドロキシ－２－ピリジンチオン（すなわちピリチオン酸）又はそれらの可溶性の塩と、亜鉛塩（例えば、硫酸亜鉛）とを反応させて、ジンクピリチオン沈殿物を形成させることによって生成できる。

【００２３】

本発明の一実施形態は、約０．０１％～約５％の、及び更なる実施形態では、約０．１％～約２％の、ピリチオン又はピリチオンの多価金属塩を含む。

【００２４】

方法

サッカロマイセス・セレヴィシエ菌株ＢＹ４７４１の培養菌を、３０°で一晩、ＹＰＤ（グルコース２０グラム、ペプトン２０グラム、酵母抽出物１リットルあたり１０グラム）ブロス中で増殖させる。培養菌を、光学濃度０．１（６００ｎｍ）で全容積１００ｍＬまでＹＰＤで希釈する。培養菌を、光学濃度０．２に達するまで振盪させながらインキュベートし、それに試験物質を添加する。培養菌を一晩インキュベートし、細胞を遠心分離によって沈殿させる。細胞ペレットを、１００ｍＭのＮａＣｌ、２０ｍＭのトリスｐＨ７．４で洗浄し、１００ｍＭのＮａＣｌ　５ｍＬ、２０ｍＭのトリスｐＨ　７．４中で再懸濁する。ガラスビーズ（０．５ｍｍ）を添加する。試料に、１分間のボルテックスと１分間氷上のインキュベートとを交互にかけ、合計１０回処理する。遠心分離の後、上澄みを収集する。９６ウェルプレート（紫外線透過性Ｃｏｒｎｉｎｇ　３６７９プレート）中で、３０μＬの細胞可溶化物を１００ｍＭのＮａＣｌ　２０μＬ、２０ｍＭのトリスｐＨ７．４と混合し、説明書に従ってＢｉｏｘｙｔｅｃｈ　Ａｃｏｎｉｔａｓｅ－３４０キット（ＯｘｉｓＲｅｓｅａｒｃｈ）を使用してアッセイする。

【００２５】

アコニターゼアッセイのために、試料は３７°で６分間インキュベートする。反応率は、反応開始１分後に着手して５分間隔で、光学濃度（３４０ｎｍ）の増分に基づいて算出する。処理された試料の可溶化液中のアコニターゼ活性を、未処理の試料の可溶化液中のアコニターゼ活性で割る。反復が試料に実施される場合、報告されるデータは、処理された細胞の個々の可溶化液のアコニターゼ活性の測定値の平均値を、未処理の細胞の個々の可溶化液のアコニターゼ活性の測定値の平均値で割ったものである。処理された細胞の可溶化液中において、アコニターゼ活性がネガティブであるように思われる場合、アコニターゼ活性に対して「０」の値が報告される（表１）。

【００２６】

【表１】

材料	濃度、ppm	アコニターゼ活性、未処理の対照の%
ジンクピリチオン(ZPT)	5	0
銅ピリチオン(CuPT)	5	0
1，10－フェナントロリン	50	2
N－ヒドロキシ－6－オクチルオキシピリジン－2(1H)オン、エタノールアミン塩(1)	50	0
ピロクトンオラミン(オクトピロックス)	50	0
8－ヒドロキシキノリン	50	15
EDTA	50	36
硫酸亜鉛	50	110

（１）Ａｒｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．製

【００２７】

望ましい物質は、特定の条件下で７０％以上のアコニターゼ活性を阻害する。（表１における３０％以下の残存活性を意味する）。実証されているように、ジンクピリチオン及び銅ピリチオンの双方が、提唱される作用メカニズムから予期されたとおり、予期された阻害を有する。表１で例示された他の物質は、同様に金属イオンに対する親和性を有し、ピリチオンと同様の方法で、鉄イオウタンパク質活性部位に潜在的に影響を与える。比較として、ＥＤＴＡなど、ある特定の古典的なキレート剤は、おそらく乏しい細胞膜透過のため有効でない。

【００２８】

アコニターゼ阻害は、これまでは真菌類の制御のための標的として認識されていない。したがって、限定されることを意味しないが、以下のリストなどのアコニターゼ阻害物質が、抗真菌薬として含まれる。

【００２９】

フルオロクエン酸－フルオロ酢酸由来

ニトロイソクエン酸（nitroisocitrate）

４－ヒドロキシ－トランス－アコニターゼ

オキサロマラート（oxalomalate）（ＯＭＡ、アルファ－ヒドロキシ－ベーター－オキサロコハク酸）

【００３０】

活性酸素種又は酸化種

過酸化亜硝酸

一酸化窒素

過酸化水素

超酸化物

【００３１】

ある１つの論文に基づく有機分子

１，２，３－Ｄ，Ｌ－トリカルボキシシクロペンテン－１

トリメシン酸（１，３，５－トリカルボキシベンゼン）

トリメリット酸（１，２，４－トリカルボキシベンゼン）

ピロメリット酸（１，２，４，５－テトラカルボキシベンゼン）

１，２，３，４－テトラカルボキシシクロペンタン

【００３２】

クレブス回路物質

オキサロスクシナート（oxalosuccinate）

トランス－アコニターゼ

シス－アコニターゼ

アルファ－ケトグルタル酸

２－オキソグルタレート
オキサロアセテート
【００３３】
その他
アロキサン
１－メチル－４－フェニルピリジン
マンガン
ロンプロテアーゼ
デフェリプロン
ピリチオン又はピリチオンの金属塩
ジンクピリチオン
【００３４】
Ａｒｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．より供給されるようなＮ－ヒドロキシ－６－オクチルオキシピリジン－２（１Ｈ）オン、エタノールアミン塩、（ＨＰ－１０１）は、Ｎ－ヒドロキシピリドンの一部である。Ｎ－ヒドロキシピリドンは、遊離酸として６位にアルキルエーテル置換、エタノールアミン塩、及び亜鉛、Ｎ－ヒドロキシ－６－オクチルオキシピリジン－２（１Ｈ）オン、亜鉛塩などの金属塩を有する。アルキルエーテル置換基は、直鎖又は分枝鎖のいずれかの、長さ２～２２の炭素である。
【００３５】
本発明の一実施形態において、更なる鉄イオウ酵素は、アコニターゼに見られるのと同様の方法で、有用な標的であり得る。そのような酵素の非限定的な例は、ビオチンシンターゼ、リポ酸シンターゼ、及びホモアコニターゼを含む。
【００３６】
本発明において、アコニターゼ阻害物質は、単独、又は追加のアコニターゼ阻害物質及びこれらの混合物と組み合わせて使用されてもよい。例えば、ジンクピリチオンは、１つ以上の追加のアコニターゼ阻害物質と組み合わせて使用されてもよい。
【００３７】
本発明の一実施形態において、本発明は、真菌細胞又は微生物細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法を含み、本方法は、前記真菌細胞によるアコニターゼ活性を阻害するのに有効な量で、アコニターゼ活性の阻害物質、又はアコニターゼ阻害物質を、個人における真菌又は微生物細胞に投与する工程を含む。
【００３８】
本発明の一実施形態において、本発明は、個人における真菌細胞又は微生物細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法を含み、本方法は、前記真菌細胞によるアコニターゼ活性を阻害するのに有効な量で、アコニターゼ活性の阻害物質、又はアコニターゼ阻害物質を、個人における真菌又は微生物細胞に投与する工程を含む。
【００３９】
更なる実施形態において、本発明は、真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法を含み、個人とはふけ症患者である。
【００４０】
また更なる実施形態において、本発明は、アコニターゼの阻害物質が、フルオロクエン酸塩、４－ヒドロキシ－トランス－アコニターゼ、オキサロマラート、アルファ－ヒドロキシ－ベーター－オキサロコハク酸）、活性酸素種又は酸化種、過酸化亜硝酸、一酸化窒素、過酸化水素、超酸化物、１，２，３－Ｄ，Ｌ－トリカルボキシシクロペンテン－１、トリメシン酸（１，３，５－トリカルボキシベンゼン）、トリメリット酸（１，２，４－トリカルボキシベンゼン）、ピロメリット酸（１，２，４，５－テトラカルボキシベンゼン）、１，２，３，４－テトラカルボキシシクロペンタン、クレブス回路物質、オキサロスクシナート、トランス－アコニターゼ、シス－アコニターゼ、アルファ－ケトグルタル酸、２－オキソグルタレート、オキサロアセテート、アロキサン、１－メチル－４－フェニルピリジン、マンガン、ロンプロテアーゼ、Ｎ－ヒドロキシ－６－オクチルオキシピリジ

ン－２（１Ｈ）オン、エタノールアミン塩、ピリチオン及びピリチオンの金属塩、ジンクピリチオン、並びにこれらの混合物からなる群から選択される、真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法を含む。

【００４１】

更なる実施形態において、本発明は、アコニターゼ活性の阻害物質がジンクピリチオンである、真菌類のアコニターゼ（aconistase）活性を阻害する方法を含む。

【００４２】

一実施形態において、本発明は、アコニターゼの阻害物質が、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する、真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法を含む。

【００４３】

更なる実施形態において、本発明は、ａ）細胞を物質に曝露する工程と、ｂ）細胞を開き、アコニターゼ活性を測定する工程と、ｃ）ベースライン又は対照／未処理の試料と比較してアコニターゼ活性の減少を測定する工程とを含む、抗真菌効果のためにアコニターゼ活性を阻害する方法を含む。

【００４４】

更に別の実施形態において、本発明は、真菌細胞の増殖を阻害する方法を開示し、前記方法は、前記真菌細胞を、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する物質と接触させる工程を含み、それによって前記真菌細胞の増殖の阻害を引き起こし、及び／又は細胞死を引き起こす。

【００４５】

更なる実施形態において、本発明は、アコニターゼ酵素に対する阻害活性を有する物質のうちの１つ以上を含むパーソナルケア組成物を開示し、この物質は、抗真菌薬が媒介する頭皮の症状など、抗真菌薬が媒介する症状を処置する有効性の増強をもたらすように、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する。

【００４６】

本明細書に開示した寸法及び値は、記載された正確な数値に厳密に限定されるものとして理解されるべきでない。むしろ、特に断らない限り、そのような寸法はそれぞれ、記載された値及びその値周辺の機能的に同等の範囲の両方を意味するものとする。例えば、「４０ｍｍ」として開示された寸法は、「約４０ｍｍ」を意味するものとする。

【００４７】

本発明の「発明を実施するための形態」で引用したすべての文献は、関連部分において本明細書に援用するが、いずれの文献の引用もそうした文献が本発明に対する先行技術であることを容認するものとして解釈されるべきではない。本書における用語の任意の意味又は定義が、参照により組み込まれた文献における同一の用語の任意の意味又は定義と相反する限りにおいては、本書においてその用語に与えられた意味又は定義が適用されるものとする。

【００４８】

以上、本発明の特定の実施形態を例示、記載したが、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく他の様々な変更及び改変を行いうる点は、当業者には明らかであろう。したがって、本発明の範囲に含まれるそのようなすべての変更及び改変を添付の特許請求の範囲において網羅するものとする。

【手続補正書】

【提出日】平成27年8月20日(2015.8.20)

【手続補正１】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０００５

【補正方法】変更

【補正の内容】

【０００５】

個人における真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法（但し、ヒトに対する医療行

為を除く）であって、本方法は、前記真菌細胞によるアコニターゼ活性を阻害するのに有効な量で、アコニターゼ活性の阻害物質を含む組成物を真菌細胞に投与する工程を含み、前記アコニターゼ活性の阻害物質が１，１０－フェナントロリン、Ｎ－ヒドロキシ－６－オクチルオキシピリジン－２（１Ｈ）オン，エタノールアミン塩、ピロクトンオラミン、８－ヒドロキシキノリン及びこれらの混合物からなる群から選択され、且つ前記アコニターゼの阻害物質が、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する。

【手続補正２】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
個人における真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）であって、前記真菌細胞によるアコニターゼの活性を阻害するのに有効な量で、アコニターゼ活性の阻害物質を含む組成物を前記真菌細胞に投与する工程を含み、前記アコニターゼ活性の阻害物質が１，１０－フェナントロリン、Ｎ－ヒドロキシ－６－オクチルオキシピリジン－２（１Ｈ）オン，エタノールアミン塩、ピロクトンオラミン、８－ヒドロキシキノリン及びこれらの混合物からなる群から選択され、且つ前記アコニターゼの阻害物質が、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する、方法。
【請求項２】
前記個人がふけ症患者である、請求項１に記載の真菌細胞のアコニターゼ活性を阻害する方法。
【請求項３】
個人における真菌細胞の増殖を阻害する方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）であって、前記方法が、前記真菌細胞によるアコニターゼの活性を阻害するのに有効な量で、アコニターゼ活性の阻害物質を含む組成物を前記個人に接触させる工程を含み、前記アコニターゼ活性の阻害物質が１，１０－フェナントロリン、Ｎ－ヒドロキシ－６－オクチルオキシピリジン－２（１Ｈ）オン，エタノールアミン塩、ピロクトンオラミン、８－ヒドロキシキノリン及びこれらの混合物からなる群から選択され、且つ前記アコニターゼの阻害物質が、アコニターゼ活性を少なくとも７０％阻害する、方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　31/47	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/47	
Ａ６１Ｑ　5/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｑ	5/00	

(72)発明者　ジェイムズ　ロバート　シュウォルツ
アメリカ合衆国　４５０６９　オハイオ州　ウェスト　チェスター　バーリントン　ドライブ　６５８０
(72)発明者　チャールズ　ウィンストン　サウンダース
アメリカ合衆国　４５０１４　オハイオ州　フェアフィールド　パーク　プレイス　１８７４
(72)発明者　ロバート　スコット　ヤングクイスト
アメリカ合衆国　４５０４０　オハイオ州　メーソン　チャールストン　ノール　コート　８５１１

【外国語明細書】

INHIBITION OF MICROBIAL GROWTH BY ACONITASE INHIBITION

FIELD OF THE INVENTION

The present invention is directed to a method of inhibiting aconitase activity of fungal cells in an individual, the method comprising administering an inhibitor of aconitase activity to the fungal cell in an amount effective to inhibit activity of aconitase by said fungal cells.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Without being bound by theory, it is believed that the anti-fungal mechanism of action of pyrithione-containing antifungals involves the inhibition of aconitase and other mitochondrial iron-sulfur proteins. The mechanism of inhibition is believed to involve the formation of copper pyrithione within the cell by either association with exogenous or endogenous copper and transchelation according to the Irving-Williams series. The copper pyrithione can then traverse the mitochondrial membrane and interact with iron-sulfur proteins such as aconitase resulting in alteration of the iron-sulfur active site and resultant inhibition of activity.

In the present invention it was found that the ZPT sensitivity increased with a *CUP2* deletion strain that is defective in protection from high copper levels. From this and other observations, it is appreciated that copper is augmenting the effect of ZPT induced growth inhibition, but the mechanism was unknown.

Through the present invention, including the results of ZPT sensitivity of the *Saccharomyces* deletion library strains, it is found that mitochondrial iron sulfur protein maturation is a key target of ZPT. This is confirmed by the present invention's demonstration that, in minimal medium, ZPT inhibits growth by inhibition of glutamate and lysine synthesis, which require the activity of the mitochondrial iron-sulfur protein aconitase. Moreover, culturing of cells in the presence of ZPT has led to aconitase inhibition. The present invention has extended the understanding of the ZPT mechanism of action to identification of a key target enzyme.

SUMMARY OF THE INVENTION

A method of inhibiting aconitase activity of fungal cells in an individual, the method comprising administering an inhibitor of aconitase to the fungal cell in an amount effective to inhibit the activity of aconitase by said fungal cell.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

While the specification concludes with claims which particularly point out and distinctly claim the invention, it is believed the present invention will be better understood from the following description.

The present invention can comprise, consist of, or consist essentially of the essential elements and limitations of the invention described herein, as well any of the additional or optional ingredients, components, or limitations described herein.

All percentages, parts and ratios are based upon the total weight of the compositions of the present invention, unless otherwise specified. All such weights as they pertain to listed ingredients are based on the active level and, therefore do not include carriers or by-products that may be included in commercially available materials.

The components and/or steps, including those which may optionally be added, of the various embodiments of the present invention, are described in detail below.

All documents cited are, in relevant part, incorporated herein by reference; the citation of any document is not to be construed as an admission that it is prior art with respect to the present invention.

All ratios are weight ratios unless specifically stated otherwise.

All temperatures are in degrees Celsius, unless specifically stated otherwise.

Except as otherwise noted, all amounts including quantities, percentages, portions, and proportions, are understood to be modified by the word "about", and amounts are not intended to indicate significant digits.

Except as otherwise noted, the articles "a", "an", and "the" mean "one or more".

Herein, "comprising" means that other steps and other ingredients which do not affect the end result can be added. This term encompasses the terms "consisting of" and "consisting essentially of". The compositions and methods/processes of the present invention can comprise, consist of, and consist essentially of the essential elements and limitations of the invention described herein, as well as any of the additional or optional ingredients, components, steps, or limitations described herein.

Herein, "effective" means an amount of a subject active high enough to provide a significant positive modification of the condition to be treated. An effective amount of the subject active will vary with the particular condition being treated, the severity of the condition, the duration of the treatment, the nature of concurrent treatment, and like factors.

Herein, "aconitase inhibition" means a reduction in aconitase activity that can be recovered from lysed cells. Such aconitase inhibition may include direct inhibition of the enzyme or prevention of synthesis of active aconitase. Synthesis of active aconitase may be due to the lack of synthesis of aconitase protein, the lack of proper folding of the aconitase protein, the lack of incorporation of a functional iron-sulfur cluster into aconitase, or the presence of a damaged iron-sulfur cluster in aconitase.

Herein, "personal care composition" means products for and/or methods relating to treating hair (human, dog, and/or cat), including, bleaching, coloring, dyeing, conditioning, growing, removing, retarding growth, shampooing, styling; deodorants and antiperspirants; personal cleansing; color cosmetics; products, and/or methods relating to treating skin (human, dog, and/or cat), including application of creams, lotions, and other topically applied products for consumer use; and products and/or methods relating to orally administered materials for enhancing the appearance of hair, skin, and/or nails (human, dog, and/or cat); and shaving.

A. Pyrithione or a Polyvalent metal salt of Pyrithione

In an embodiment, the present invention may comprise pyrithione or a polyvalent metal salt of pyrithione. Any form of polyvalent metal pyrithione salts may be used, including platelet and needle structures. In a further embodiment, salts for use herein include those formed from the polyvalent metals magnesium, barium, bismuth, strontium, copper, zinc, cadmium, zirconium and mixtures thereof, and in further embodiment, zinc. In yet a further embodiment, for use herein is the zinc salt of 1-hydroxy-2-pyridinethione (known as "zinc pyrithione" or "ZPT"); in another embodiment, ZPT in platelet particle form, wherein the particles have an average size of up to about 20μm, and in an embodiment have an average size of up to about 5μm, and yet in a further embodiment have an average size of up to about 2.5μm.

Pyridinethione anti-microbial and anti-dandruff agents are described, for example, in U.S. Pat. No. 2,809,971; U.S. Pat. No. 3,236,733; U.S. Pat. No. 3,753,196; U.S. Pat. No. 3,761,418; U.S. Pat. No. 4,345,080; U.S. Pat. No. 4,323,683; U.S. Pat. No. 4,379,753; and U.S. Pat. No. 4,470,982.

It is further contemplated that when ZPT is used as the anti-microbial particulate in the anti-microbial compositions herein, that an additional benefit of hair growth or re-growth may be stimulated or regulated, or both, or that hair loss may be reduced or inhibited, or that hair may appear thicker or fuller.

Zinc pyrithione may be made by reacting 1-hydroxy-2-pyridinethione (i.e., pyrithione acid) or a soluble salt thereof with a zinc salt (e.g. zinc sulfate) to form a zinc pyrithione precipitate, as illustrated in U.S. Patent No. 2,809,971.

An embodiment of the present invention includes from about 0.01% to about 5% of a pyrithione or polyvalent metal salt of a pyrithione; and in a further embodiment from about 0.1% to about 2%.

Method

Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strain BY4741 are grown in YPD (20 grams glucose, 20 grams peptone, 10 grams yeast extract per liter) broth overnight at 30°. The cultures are diluted with YPD to a total volume of 100 mls with an optical density (600 nm) of 0.1. The cultures are incubated with shaking until reaching an optical density of 0.2, whereupon the test material is added. The cultures are incubated overnight, and the cells are pelleted by centrifugation. The cell pellet is washed with 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4 and resuspended in 5 ml of 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4. Glass beads (0.5 mm) is added. The sample is alternately vortexed for one minute and incubated on ice for one minute, with a total of ten treatments. After centrifugation, the supernatant is collected. In a 96-well plate (UV-transparent Corning 3679 plate), 30 µl of cell lysate is mixed with 20 µl 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4 and assayed using a Bioxytech Aconitase-340 kit (OxisResearch) according to instructions.

For the aconitase assay, samples are incubated for six minutes at 37°. The reaction rate is calculated based on the increase in optical density (340 nm) in the five-minute interval beginning one minute after the reaction started. The aconitase activity in lysates of treated samples is divided by the aconitase activity in lysates of untreated samples. If replicates were performed on samples, the reported data are a mean of the aconitase activity measurements of individual lysates of treated cells divided by the mean of the aconitase activity measurements of individual lysates of untreated cells. If the aconitase activity appears to be negative in lysates of treated cells, the value "0" is reported for aconitase activity (Table 1).

Table 1.

Material	Concentration, ppm	Aconitase Activity, % of Untreated Control
Zinc pyrithione (ZPT)	5	0
Copper Pyrithione (CuPT)	5	0
1,10-Phenanthroline	50	2
N-Hydroxy-6-octyloxypyridine-2(1H)one, ethanolamine salt (1)	50	0
Piroctone Olamine (Octopirox)	50	0
8-Hydroxyquinoline	50	15
EDTA	50	36
Zinc Sulfate	50	110

(1) From Arch Chemicals, Inc.

Desirable materials inhibit aconitase activity under the specified conditions by 70% or more (meaning in Table 1 residual activities of 30% or less). As demonstrated, both zinc and copper pyrithiones have the expected inhibition, as expected from the proposed mechanism of action. Other materials exemplified in Table 1 have affinity for metal ions as well, potentially influencing the iron-sulfur protein active site in a similar manner to the pyrithiones. For comparison, certain classical chelators, such as EDTA, are not effective, presumably due to poor cellular membrane permeation.

Aconitase inhibition has not previously been appreciated as a target for control of fungi. Thus, aconitase inhibitors such as the following list, while not intended to be limiting, are included as anti-fungal;

Fluorocitrate – from fluoroacetate
nitroisocitrate
4-hydroxy-trans-aconitate
oxalomalate (OMA, alpha-hydroxy-beta-oxalosuccinic acid)

ROS species or Oxidizing Species
- Peroxynitrite
- Nitric Oxide
- Hydrogen peroxide
- superoxide

Organic molecules from one paper
- 1,2,3-D,L -Tricarboxycyclopentene-1
- Trimesic acid (1,3,5-tricarboxybenzene)
- Trimellitic acid (1,2,4-tricarboxybenzene)
- Pyromellitic acid (1,2,4,5-tetracarboxybenzene)
- 1,2,3,4-Tetracarboxycyclopentane

Kreb Cycle Materials
- oxalosuccinate
- trans-aconitate
- cis-aconitate
- alpha-ketoglutaric
- 2-oxoglutarate
- oxaloacetate

Others
- alloxan
- 1-methyl-4-phenylpyridine
- Manganese
- Lon protease
- Deferiprone
- Pyrithione or metal salts of pyrithione
- Zinc pyrithione

N-Hydroxy-6-octyloxypyridine-2(1H)one, ethanolamine salt, (HP-101) as supplied from Arch Chemicals, Inc., is part of the N-Hydroxypyridones. The N-Hydroxypyridones have alkyl ether substitutions at the 6-position as free acids, ethanolamine salts and metal salts such as zinc, N-Hydroxy-6-octyloxypyridine-2(1H)one, zinc salt. The alkyl ether substituent is from 2-22 carbons in length, either linear or branched.

In an embodiment of the present invention, further iron-sulfur enzymes may be useful targets in a similar manner as is aconitase. Non-limiting examples of such enzymes include biotin synthase, lipoic acid synthase, and homoaconitase.

In the present invention, an aconitase inhibitor may be used alone, or in combination with additional aconitase inhibitors and mixtures thereof. For example, zinc pyrithione may be used in combination with one or more additional aconitase inhibitors.

In an embodiment of the present invention, the present invention comprises a method of inhibiting aconitase activity of fungal cells or microbial cells, the method comprising administering an inhibitor of aconitase activity, or an aconitase inhibitor to the fungal or microbial cell in an individual in an amount effective to inhibit activity of aconitase by said fungal cells.

In an embodiment of the present invention, the present invention comprises a method of inhibiting aconitase activity of fungal cells or microbial cells, in an individual, the method comprising administering an inhibitor of aconitase activity, or an aconitase inhibitor to the fungal or microbial cell in an individual in an amount effective to inhibit activity of aconitase by said fungal cells.

In a further embodiment, the present invention comprises a method of inhibiting aconitase activity of fungal cells wherein the individual is a dandruff sufferer.

In yet a further embodiment, the present invention comprises a method of inhibiting aconitase activity of fungal cells wherein the inhibitor of aconitase is selected from the group consisting of fluorocitrate, 4-hydroxy-trans-aconitate, oxalomalate, alpha-hydroxy-beta-oxalosuccinic acid), ROS species or oxidizing Species, peroxynitrite, nitric oxide, hydrogen peroxide, superoxide, 1,2,3-D,L -tricarboxycyclopentene-1, trimesic acid (1,3,5-tricarboxybenzene), trimellitic acid (1,2,4-tricarboxybenzene), pyromellitic acid (1,2,4,5-tetracarboxybenzene), 1,2,3,4-tetracarboxycyclopentane, , kreb cycle materials, oxalosuccinate, trans-aconitate, cis-aconitate, alpha-ketoglutaric, 2-oxoglutarate, oxaloacetate, alloxan, 1-methyl-4-phenylpyridine, manganese, Lon protease, N-Hydroxy-6-octyloxypyridine-2(1H)one, ethanolamine salt pyrithione and metal salts of pyrithione, zinc pyrithione and mixtures thereof.

In a further embodiment, the present invention comprises a method of inhibiting aconitase activity of fungal wherein the inhibitor of aconistase activity is zinc pyrithione.

In an embodiment, the present invention comprises a method of inhibiting aconitase activity of fungal cells wherein the inhibitor of aconitase inhibits aconitase activity by at least 70%.

In a further embodiment, the present invention comprises a method of inhibiting aconitase activity for an antifungal benefit comprising the steps of: a) exposing a cell to a material; b) opening of cell and measuring an aconitase activity and c) measuring the reduction in aconitase activity compared to a baseline or a control/uutreated sample.

In a yet another embodiment, the present invention discloses a method of inhibiting the growth of a fungal cell, said method comprising contacting said fungal cell with a material which inhibits aconitase activity by at least 70%, thereby causing an inhibition of growth of said fungal cell and/or causing death of the cell.

In a further embodiment, the present invention discloses a personal care composition comprising one or more of a material having inhibitory activity against an aconitase enzyme, wherein the material inhibits aconitase activity, by at least 70%, to provide enhanced efficacy to treat anti-fungal mediated conditions, such as anti-fungal mediated scalp conditions.

The dimensions and values disclosed herein are not to be understood as being strictly limited to the exact numerical values recited. Instead, unless otherwise specified, each such dimension is intended to mean both the recited value and a functionally equivalent range surrounding that value. For example, a dimension disclosed as "40 mm" is intended to mean "about 40 mm."

All documents cited in the Detailed Description of the Invention are, in relevant part, incorporated herein by reference; the citation of any document is not to be construed as an admission that it is prior art with respect to the present invention. To the extent that any meaning or definition of a term in this document conflicts with any meaning or definition of the same term in a document incorporated by reference, the meaning or definition assigned to that term in this document shall govern.

While particular embodiments of the present invention have been illustrated and described, it would be obvious to those skilled in the art that various other changes and modifications can be made without departing from the spirit and scope of the invention. It is therefore intended to cover in the appended claims all such changes and modifications that are within the scope of this invention.

1. A method of inhibiting aconitase activity of fungal cells in an individual, the method comprising administering an inhibitor of aconitase activity to the fungal cell in an amount effective to inhibit activity of aconitase by said fungal cells.

2. A method of inhibiting aconitase activity of fungal cells according to Claim 1 wherein the individual is a dandruff sufferer.

3. A method of inhibiting aconitase activity of fungal cells according to any preceding claims wherein the inhibitor of aconitase activity is selected from the group consisting of fluorocitrate, 4-hydroxy-trans-aconitate, oxalomalate, alpha-hydroxy-beta-oxalosuccinic acid), ROS species or oxidizing Species, peroxynitrite, nitric oxide, hydrogen peroxide, superoxide, 1,2,3-D,L -tricarboxycyclopentene-1, trimesic acid (1,3,5-tricarboxybenzene), trimellitic acid (1,2,4-tricarboxybenzene), pyromellitic acid (1,2,4,5-tetracarboxybenzene), 1,2,3,4-tetracarboxycyclopentane, kreb cycle materials, oxalosuccinate, trans-aconitate, cis-aconitate, alpha-ketoglutaric, 2-oxoglutarate, oxaloacetate, alloxan , 1-methyl-4-phenylpyridine, manganese, Lon protease, N-Hydroxy-6-octyloxypyridine-2(1H)one, ethanolamine salt, pyrithiones and metal salts of pyrithiones, zinc pyrithione and mixtures thereof.

4. A method of inhibiting aconitase activity of fungal cells according to any preceding claims wherein the inhibitor of aconitase activity is zinc pyrithione.

5. A method of inhibiting aconitase activity of fungal cells according to any preceding claims wherein the inhibitor of aconitase inhibits aconitase activity by at least 70%.

6. A method of inhibiting aconitase activity for an antifungal benefit comprising the steps of:
   a) exposing a cell to a material;
   b) opening of cell and measuring an aconitase activity;

c) measuring the reduction in aconitase activity compared to a baseline or a control/untreated sample.

7. A method of inhibiting the growth of a fungal cell, said method comprising contacting said fungal cell with a material which inhibits aconitase activity by at least 70%, thereby causing an inhibition of growth of said fungal cell.

8. A personal care composition comprising one or more of a material having inhibitory activity against an aconitase enzyme, wherein the material inhibits aconitase activity by at least 70% to provide enhanced efficacy to treat anti-fungal mediated conditions.

9. A personal care composition according to Claim 8 wherein the material inhibits aconitase activity by at least 70% to provide enhanced efficacy to treat anti-fungal mediated scalp conditions.

ABSTRACT

The present invention is directed to a method of inhibiting aconitase activity of fungal cells in an individual, the method comprising administering an inhibitor of aconitase activity to the fungal cell in an amount effective to inhibit activity of aconitase by said fungal cells.

Representative Drawing
None