(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2010-31006
(P2010-31006A)
(43)公開日　平成22年2月12日(2010.2.12)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K 45/00		4C084
A61P 9/04	(2006.01)	A61P 9/04		4C206
A61P 3/10	(2006.01)	A61P 3/10		
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00	111	
A61K 31/165	(2006.01)	A61K 31/165		

審査請求 未請求　請求項の数 16　ＯＬ　外国語出願　（全 67 頁）

(21)出願番号　特願2009-165467(P2009-165467)
(22)出願日　平成21年7月14日(2009.7.14)
(31)優先権主張番号　61/081,469
(32)優先日　平成20年7月17日(2008.7.17)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504389991
ノバルティス　アーゲー
スイス国　ツェーハー－４００２　バーゼル，リヒトシュトラーセ　３５
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100101454
弁理士　山田　卓二
(74)代理人　100067035
弁理士　岩崎　光隆
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100144923
弁理士　中川　将之

最終頁に続く

(54)【発明の名称】有機化合物の使用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】レニン阻害剤又は薬学的に許容されるその塩を含む、糖尿病性心筋症の処置用医薬組成物の提供。
【解決手段】２型又は１型糖尿病患者の糖尿病性心筋症の処置用医薬の製造のため、レニン阻害剤例えばアリスキレン又は薬学的に許容されるその塩の、単独で、又は、他の活性成分、例えばＡＣＥＩ、ベータブロッカー、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、及びインスリンのような１型糖尿病治療剤から成る群から選択される１種以上の活性成分と組み合わせた組成物。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
糖尿病性心筋症の処置用医薬の製造のためのレニン阻害剤または薬学的に許容されるその塩の使用。
【請求項２】
２型または１型糖尿病患者の処置のための、請求項１に記載の使用。
【請求項３】
レニン阻害剤がアリスキレンまたはその塩である、請求項１または２に記載の使用。
【請求項４】
レニン阻害剤または薬学的に許容されるその塩を含む、糖尿病性心筋症の処置用医薬組成物。
【請求項５】
２型または１型糖尿病患者の処置のための、請求項４に記載の医薬組成物。
【請求項６】
レニン阻害剤がアリスキレンまたはその塩である、請求項４または５に記載の医薬組成物。
【請求項７】
レニン阻害剤または薬学的に許容されるその塩を、１種以上、例えば１～３種の活性成分と組み合わせて使用する、請求項１から３のいずれかに記載の使用。
【請求項８】
他の活性成分がＡＣＥＩ、ベータブロッカー、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、およびインスリンのような１型糖尿病治療剤、またはいずれの場合も独立してその塩から成る群から選択される、請求項７に記載の使用。
【請求項９】
他の活性成分が
－　アラセプリル、ベナゼプリル、ベナゼプリラート、カプトプリル、セロナプリル、シラザプリル、デラプリル、エナラプリル、エナプリラート、フォシノプリル、イミダプリル、リシノプリル、モベルトプリル、ペリンドプリル、キナプリル、ラミプリル、スピラプリル、テモカプリルおよびトランドラプリルから成る群から選択されるＡＣＥＩ、またはいずれの場合も独立してその塩；
－　バルサルタン、ロサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、テルミサルタン、カンデサルタンおよびサプリサルタンから成る群から選択されるアンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、またはいずれの場合も独立してその塩；
－　トログリタゾン、ロシグリタゾン、シグリタゾン；ダルグリタゾン；エングリタゾン；イサグリタゾンおよびピオグリタゾンから成る群から選択される２型糖尿病治療剤、またはいずれの場合も独立してその塩；および／または
－　インスリンのような１型糖尿病性治療剤、またはその塩
である、請求項７または８に記載の使用。
【請求項１０】
同時、別々または連続使用のための、請求項７～９のいずれかに記載の使用。
【請求項１１】
さらに、１種以上、例えば１～３種の活性成分を含む、請求項４～６のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項１２】
さらなる活性成分がＡＣＥ阻害剤、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、ベータブロッカー、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、およびインスリンのような１型糖尿病治療剤から成る群から選択される、請求項１１に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
さらなる活性成分が
－　アラセプリル、ベナゼプリル、ベナゼプリラート、カプトプリル、セロナプリル、シ

ラザプリル、デラプリル、エナラプリル、エナプリラート、フォシノプリル、イミダプリル、リシノプリル、モベルトプリル、ペリンドプリル、キナプリル、ラミプリル、スピラプリル、テモカプリルおよびトランドラプリルから成る群から選択されるＡＣＥＩ、またはいずれの場合も独立してその塩；
－　バルサルタン、ロサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、テルミサルタン、カンデサルタンおよびサプリサルタンから成る群から選択されるアンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、またはいずれの場合も独立してその塩；
－　トログリタゾン、ロシグリタゾン、シグリタゾン；ダルグリタゾン；エングリタゾン；イサグリタゾンおよびピオグリタゾンから成る群から選択される２型糖尿病性治療剤、またはいずれの場合も独立してその塩；および／または
－　インスリンのような１型糖尿病性治療剤、またはその塩
である、請求項１１または１２に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
　請求項４、５、６、１１、１２または１３に記載の医薬組成物を、糖尿病性心筋症の処置における同時、別々または連続的使用の指示書と共に含む、商業用包装物。
【請求項１５】
　糖尿病性心筋症の処置用キットであって：
ａ）　第一の単位投与形態で、レニン阻害剤または薬学的に許容されるその塩；
ｂ）　第二の単位投与形態などで、ＡＣＥ阻害剤、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト(例えば、バルサルタン)、ベータブロッカー、２型糖尿病治療剤、１型糖尿病治療剤、または、いずれの場合も、独立して薬学的に許容されるその塩から成る群から選択される、少なくとも１種の治療剤；
ｃ）　該第一、第二などの単位形態を含む、容器
を含む、キット。
【請求項１６】
　糖尿病性心筋症の処置方法であって、ヒトを含む温血動物、治療的有効量のアリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩を単独で、または、例えば、ＡＣＥＩ、ベータブロッカー、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト(antagoniss)、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、インスリンのような１型糖尿病治療剤、またはいずれの場合も独立してその塩のような１種以上の活性成分と組み合わせて投与することを含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
　本発明は、糖尿病性心筋症の処置用医薬の製造のための、レニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩の、単独で、または、１種以上の活性成分と組み合わせた使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
　レニン－アンギオテンシン系(ＲＡＳ)の酵素カスケードは一連の生化学事象を含み、それ自体よく知られており、例えば高血圧の処置の可能性を開くための、制御的介入を使用するための種々のアプローチが存在する。アンギオテンシン変換酵素(ＡＣＥ)阻害および／またはアンギオテンシン受容体遮断を介したＲＡＳの薬理学的抑制は、広範な心血管疾患(ＣＶＤ)の処置のための、証明された有効な治療的アプローチである。レニンの酵素活性の阻害剤は、アンギオテンシンＩの形成の低下をもたらす。その結果、産生されるアンギオテンシンIIの量が減る。その活性ペプチドホルモンの濃度減少は、例えば、レニン阻害剤の抗高血圧効果の直接の原因である。従って、レニン阻害剤またはその塩を、例えば、降圧剤としてまたは鬱血性心不全の処置に用い得る。さらなる評価が、レニン阻害剤が遙かに広い範囲の適応症(therapeutic indication)に対しても用い得ることも明らかにする可能性がある。

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
Hayat et al (Clinical Science 2004, 1007, 539)により記載されている通り、糖尿病患者は心不全を発症するリスクが増大しており、それは、糖尿病性心筋症と呼ばれる別の疾患経過である。それ故、心筋症の発症は、真性糖尿病患者における重大な合併症を代表する。糖尿病患者における糖尿病性心筋症を予防しまたは遅延させるための医薬を提供する必要がある。驚くべきことに、本発明者らは、アリスキレンのようなレニン阻害剤が、単独でまたは組み合わせで、糖尿病性心筋症の処置に有益な効果を有し得ることを発見した。それ故、本発明は糖尿病性心筋症の処置のための治療的アプローチを提供する。
【課題を解決するための手段】
【０００４】
発明の要約
一つの局面において、本発明は、レニン阻害剤、例えばアリスキレン、または薬学的に許容されるその塩の、単独で、または、例えば、ＡＣＥＩ、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、ベータブロッカー、ＴＺＤ(チアゾリジンジオン類)のような２型糖尿病治療剤、インスリンのような１型糖尿病治療剤、またはいずれの場合も独立してその塩のような、１種以上の活性成分と組み合わせた、糖尿病性心筋症の処置に使用するための医薬の製造のための使用に関する。
【０００５】
一つの態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置のための、レニン阻害剤、例えばアリスキレン、または薬学的に許容されるその塩の使用に関する。それ故、一つの態様において、レニン阻害剤、例えばアリスキレン、または薬学的に許容されるその塩を、糖尿病性心筋症の処置用単剤療法として投与する。
【０００６】
他の局面において、本発明は、レニン阻害剤、例えばアリスキレン、または薬学的に許容されるその塩を、単独で、または、例えば、ＡＣＥＩ、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、ベータブロッカー、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、インスリンのような１型糖尿病治療剤、またはいずれの場合も独立してその塩のような１種以上の活性成分と組み合わせて含む、糖尿病性心筋症処置用医薬組成物に関する。
【０００７】
さらに他の態様において、本発明は、レニン阻害剤、例えばアリスキレン、または薬学的に許容されるその塩を含み、さらなる活性成分を何等含まない、糖尿病性心筋症の処置用医薬組成物に関する。それ故、一つの態様において、レニン阻害剤、例えばアリスキレン、または薬学的に許容されるその塩を糖尿病性心筋症の単剤療法として投与する。
【０００８】
さらなる態様において、本発明は、レニン阻害剤、例えばアリスキレン、または薬学的に許容されるその塩を、例えば、いずれの場合も、単位投与形態の、ＡＣＥ阻害剤、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、ベータブロッカー、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、およびインスリンのような１型糖尿病治療剤、またはいずれの場合も独立してその塩から選択される、１種以上の活性成分と組み合わせて、薬学的に許容される担体と共に含む、糖尿病性心筋症の処置に同時に、別々にまたは連続的に使用するための、医薬組成物に関する。
【０００９】
本発明は、さらに、ヒトを含む温血動物に、治療的有効量のレニン阻害剤、例えばアリスキレン、または薬学的に許容されるその塩を、単独で、または、例えば、ＡＣＥＩｓ、ベータブロッカー、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト(antagoniss)、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、インスリンのような１型糖尿病治療剤、またはいずれの場合も独立してその塩のような１種以上の活性成分と組み合わせて投与することを含む、糖尿病性心筋症の処置方法に関する。

【発明を実施するための形態】
【００１０】
本発明による態様
本発明が適用されるレニン阻害剤は、インビボでレニン阻害活性を有し、それ故に、例えば、高血圧(例えば、悪性高血圧、本態性高血圧、孤立性収縮期高血圧、または他の二次的高血圧の何れであるかを問わない)の予防、発症遅延および／または処置用治療剤として、薬学的有用性を有する全てのものである。レニン阻害剤が有用であり得るさらなる適応症は、例えばＷＯ２００４／００２５４９、ＷＯ２００５／０８９７３１、ＷＯ２００６／０４１７６３、ＷＯ２００６／０４１９７４、ＷＯ２００６／１１６４３５、ＷＯ２００２／４０００７およびＰＣＴ出願番号２００７／０６５５６４に記載されている。
【００１１】
例えば、本発明は、下記に開示されたレニン阻害剤から成る群から選択される、レニン阻害剤、特にその化合物請求項および実施例の最終生成物に関する：
米国特許５５５９１１１、６１９７９５９、６３７６６７２、６０５１７１２、６１９７９５９、６２６８４９９および６２７４７３５；米国特許出願２００４／０２０４４５５、２００２／０８７００２；ＷＯ２００３／０９９７６７、ＷＯ２００５／０５４１７７、ＷＯ２００５／０５１８９５、ＷＯ２００５／０５１９１１、ＷＯ２００６／０６６８９６、ＷＯ２００６／０６９７８８、ＷＯ２００６／０７４９２４、ＷＯ２００６／０９４７６３、ＷＯ２００６／１０００３６、ＷＯ２００６／０１１７１８３、ＷＯ２００６／１２５６２１、ＷＯ２００６／１２８６５９、ＷＯ２００７／００６５３４、ＷＯ２００７／０７７００５；ＷＯ２００３／０９３２６７、ＷＯ２００４／００２９５７、ＷＯ２００４／０９６１１６、ＷＯ２００４／０９６７９９、ＷＯ２００４／０９６８０３、ＷＯ２００４／０９６８０４、ＷＯ２００５／０４０１２０、ＷＯ２００５／０４０１６５、ＷＯ２００５／０４０１７３、ＷＯ２００５／０５４２４３、ＷＯ２００５／０５４２４４、ＷＯ２００６／０２１３９９、ＷＯ２００６／０２１４０１、ＷＯ２００６／０２１４０２、ＷＯ２００６／０２１４０３、ＷＯ２００６／０５８５４６、ＷＯ２００６／０５９３０４、ＷＯ２００６／０６１７９１、ＷＯ２００６／０６３６１０、ＷＯ２００６／０６４４８４、ＷＯ２００６／０７９９８８、ＷＯ２００６／０９２２６８、ＷＯ２００６／１２９２３７、ＷＯ２００６／１３１８８４、ＷＯ２００７／０３４４０６、ＷＯ２００７／０３４４４５、ＷＯ２００７／０４９２２４、ＷＯ２００３／１０３６５２、ＷＯ２００３／１０３６５２、ＷＯ２００７／０４５５５１、ＷＯ２００４／０８９９１５、ＷＯ２０００／６３１７３、ＷＯ２０００／６４８７３、ＷＯ２０００／６４８８７、ＷＯ１９９７／０９３１１、ＷＯ２００５／０３７８０３、ＷＯ２００５／０６１４５７、ＷＯ２００５／０７０８７０、ＷＯ２００５／０７０８７１、ＷＯ２００５／０７０８７７、ＷＯ２００５／０９０３０４、ＷＯ２００５／０９０３０５、ＷＯ２００６／００５７４１、ＷＯ２００６／０６１４２６、ＷＯ２００６／０６１４２７、ＷＯ２００６／０９５０２０、ＷＯ２００６／１０３２７３、ＷＯ２００６／１０３２７５、ＷＯ２００６／１０３２７７、ＷＯ２００７／０３１５５７およびＷＯ２００７／０３１５５８；ＰＣＴ出願２００７／００５１３０および２００７／００５１３１；欧州特許出願０７１１１２９０.８および欧州特許０８６３８７５。
【００１２】
レニン阻害剤は、例えば、ジテキレン(ditekiren)、テルラキレン(terlakiren)、ザンキレン、アリスキレンおよびその塩から成る群から選択される。一つの態様において、レニン阻害剤は、アリスキレンまたはその塩、例えばヘミフマル酸塩、硝酸塩、硫酸水素塩およびオロト酸塩、特にそのヘミフマル酸である。遊離塩基形のアリスキレンは、２(Ｓ),４(Ｓ),５(Ｓ),７(Ｓ)－Ｎ－(３－アミノ－２,２－ジメチル－３－オキソプロピル)－２,７－ジ(１－メチルエチル)－４－ヒドロキシ－５－アミノ－８－[４－メトキシ－３－(３－メトキシ－プロポキシ)フェニル]－オクタンアミドと化学的に定義され、ＥＰ６７８５０３Ａに実施例８３として開示されている。
【００１３】

他の態様において、本発明は、レニン阻害剤または薬学的に許容されるその塩と、１種以上の活性成分の組み合わせの、糖尿病性心筋症の処置用医薬の製造のための使用に関する。

【００１４】

一つの態様において、他の活性成分は、ＡＣＥＩ、ベータブロッカー、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、およびインスリンのような１型糖尿病治療剤、またはいずれの場合も独立してその塩から成る群から選択される。

【００１５】

他の態様において、レニン阻害剤、またはその塩と組み合わせて使用すべき他の活性成分は、ＡＣＥ阻害剤、またはその塩である。

【００１６】

本発明に従い使用し得る適当なＡＣＥＩは、種々の構造特性を有するＡＣＥＩ、例えばアラセプリル、ベナゼプリル、ベナゼプリラート、カプトプリル、セロナプリル、シラザプリル、デラプリル、エナラプリル、エナプリラート(enaprilat)、フォシノプリル、イミダプリル、リシノプリル、モベルトプリル、ペリンドプリル、キナプリル、ラミプリル、スピラプリル、テモカプリル、トランドラプリルおよびその塩から成る群のメンバーを含む。一つの態様において、ＡＣＥ阻害剤は、ベナゼプリル、ベナゼプリラート、カプトプリル、エナラプリル、エナプリラートおよびその塩から成る群から選択され；他の態様において、ＡＣＥ阻害剤はベナゼプリル、ベナゼプリラートまたはその塩である。

【００１７】

さらに別の態様において、本発明は、アリスキレン、またはその塩と、アラセプリル、ベナゼプリル、ベナゼプリラート、カプトプリル、セロナプリル、シラザプリル、デラプリル、エナラプリル、エナプリラート、フォシノプリル、イミダプリル、リシノプリル、モベルトプリル、ペリンドプリル、キナプリル、ラミプリル、スピラプリル、テモカプリル、トランドラプリルまたはその塩、特にベナゼプリル、ベナゼプリラート、カプトプリル、エナラプリル、エナプリラートまたはその塩、特にベナゼプリル、ベナゼプリラートまたはその塩のようなＡＣＥＩ、またはその塩の組合せの、同時の、別々のまたは連続的な使用に関する。

【００１８】

なおさらに別の態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置用医薬の製造のための、レニン阻害剤または薬学的に許容されるその塩とアンギオテンシンII受容体アンタゴニストの組合せの、同時の、別々のまたは連続的な使用に関する。

【００１９】

本発明において使用し得る適当なアンギオテンシンII受容体アンタゴニストは、種々の構造特性を有するアンギオテンシンII受容体アンタゴニストを含む。例えば、出願番号４４３９８３を有する欧州特許出願および欧州特許１１４６８７２Ｂ１に上げられている化合物；特に化合物の請求項および実施例の最終生成物、例えば、(Ｓ)－Ｎ－(１－カルボキシ－２－メチルプロプ－１－イル)－Ｎ－ペンタノイル－Ｎ－[２’(１Ｈ－テトラゾール－５－イル)ビフェニル－４－イルメチル]アミン[バルサルタン]およびその薬学的に許容される塩を特記し得る。さらに、公開番号２５３３１０を有する欧州特許出願、公開番号４０３１５９を有する欧州特許出願、公開番号ＷＯ９１／１４６７９を有するＰＣＴ特許出願、公開番号４２０２３７を有する欧州特許出願、公開番号５０２３１４を有する欧州特許出願、公開番号４５９１３６を有する欧州特許出願、公開番号５０４８８８を有する欧州特許出願、公開番号５１４１９８を有する欧州特許出願、公開番号４７５２０６を有する欧州特許出願、公開番号ＷＯ１９９３／２０８１６を有するＰＣＴ特許出願に表記されているもの；特にその中の化合物の請求項および実施例の最終生成物に上げられている化合物も引用される。一つの態様において、アンギオテンシンII受容体アンタゴニストは、バルサルタン、ロサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、テルミサルタン、カンデサルタン、サプリサルタン、オルメサルタンおよびその塩；好ましくはバルサルタン、ロサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、テルミサルタン、カンデサルタン、サ

プリサルタンおよびその塩から成る群から選択し；特にアンギオテンシンII受容体アンタゴニストはバルサルタンまたはその塩である。

【００２０】

具体的態様において、本発明は、アリスキレン、またはその塩と、バルサルタン、ロサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、テルミサルタン、カンデサルタン、サプリサルタンまたはその塩；特にバルサルタンまたはその塩のようなアンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、またはその塩の組合せの、同時の、別々の、または連続的使用に関する。

【００２１】

さらに別の態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置用医薬の製造のための、レニン阻害剤または薬学的に許容されるその塩とβ－ブロッカーの組合せの、同時の、別々の、または連続的な使用に関する。

【００２２】

本発明における使用に適当なβ－ブロッカーは、β－アドレナリン受容体に関してエピネフリンと競合し、エピネフリンの作用を妨害する、β－アドレナリン遮断剤(β－ブロッカー)を含む。特に、β－ブロッカーは、アルファ(α)－アドレナリン受容体と比較してβ－アドレナリン受容体に選択的であり、それ故、顕著なα－遮断効果を有しない。適当なβ－ブロッカーは、例えば、アセブトロール、アテノロール、ベタキソロール、ビソプロロール、カルテオロール、カルベジロール、エスモロール、ラベタロール、メトプロロール、ナドロール、オクスプレノロール、ペンブトロール、ピンドロール、プロプラノロール、ソタロール、チモロールおよびその塩；特にアテノロール、メトプロロール、プロプラノロールおよびその塩から選択される化合物である。一つの態様において、本発明において使用するβ－ブロッカーは、アテノロール、メトプロロール、プロプラノロールおよびその塩である。

【００２３】

さらに他の態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置用医薬の製造のための、レニン阻害剤(例えばアリスキレン)または薬学的に許容されるその塩と、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤の組合せの、同時の、別々の、または連続的な使用に関する。

【００２４】

本発明において使用するのに適当なＴＺＤは、例えば、トログリタゾン、ロシグリタゾン、シグリタゾン；ダルグリタゾン；エングリタゾン；イサグリタゾン、ピオグリタゾンを含むチアゾリジンジオン類(ＴＺＤ)から選択される化合物、およびその塩を含む。一つの態様において、ＴＺＤはトログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、およびその塩を含む。

【００２５】

さらに他の態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置用医薬の製造のための、レニン阻害剤(例えばアリスキレン)または薬学的に許容されるその塩と、インスリンのような１型糖尿病剤、またはその塩の組合せの、同時の、別々の、または連続的な使用に関する。

【００２６】

さらなる態様において、本発明は、アリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩と、ＡＣＥ阻害剤またはその塩を組み合わせて含む、糖尿病性心筋症の処置用医薬組成物に関する。この態様のＡＣＥＩは、例えば、上記のＡＣＥＩの群から選択され；ＡＣＥＩは、例えば、ベナゼプリルまたはその塩である。

【００２７】

なおさらに別の態様において、本発明は、アリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩と、アンギオテンシンII受容体アンタゴニストまたはその塩を組み合わせて含む、糖尿病性心筋症の処置用医薬組成物に関する。この態様のアンギオテンシンII受容体アンタゴニストは、例えば、上記のアンギオテンシンII受容体アンタゴニストの群から選択され；アンギオテンシンII受容体アンタゴニストは、例えば、バルサル

タンまたはその塩である。

【００２８】

さらに別の態様において、本発明は、アリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩と、β－ブロッカーまたはその塩を組み合わせて含む、糖尿病性心筋症の処置用医薬組成物に関する。この態様のβ－ブロッカーは、例えば、上記のβ－ブロッカーの群から選択される。

【００２９】

なお別の態様において、本発明は、アリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩と、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、またはその塩を組み合わせて含む、糖尿病性心筋症の処置用医薬組成物に関する。この態様のＴＺＤは、例えば、上記のＴＺＤの群から選択される。

【００３０】

なおさらなる態様において、本発明は、アリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩と、インスリンのような１型糖尿病治療剤、またはその塩を組み合わせて含む、糖尿病性心筋症の処置用医薬組成物に関する。

【００３１】

さらに別の態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置方法であって、それを必要とするヒトを含む温血動物に、治療的有効量のアリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩を、ＡＣＥＩ、またはその塩と組み合わせて含む医薬組成物を投与することを含む、方法に関する。この態様のＡＣＥＩは、例えば、上記のＡＣＥＩ群から選択され；ＡＣＥＩは、例えば、ベナゼプリルまたはその塩である。

【００３２】

他の態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置方法であって、それを必要とするヒトを含む温血動物に、治療的有効量のアリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩を、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、またはその塩と組み合わせて含む医薬組成物を投与することを含む、方法に関する。この態様のアンギオテンシンII受容体アンタゴニストは、例えば、上記のアンギオテンシンII受容体アンタゴニストから成る群から選択され；アンギオテンシンII受容体アンタゴニストは、例えば、バルサルタンまたはその塩である。

【００３３】

さらに他の態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置方法であって、それを必要とするヒトを含む温血動物に、治療的有効量のアリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩を、β－ブロッカー、またはその塩と組み合わせて含む医薬組成物を投与することを含む、方法に関する。この態様のβ－ブロッカーは、例えば、上記のβ－ブロッカーの群から選択される。

【００３４】

さらに別の態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置方法であって、それを必要とするヒトを含む温血動物に、治療的有効量のアリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩を、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、またはその塩と組み合わせて含む医薬組成物を投与することを含む、方法に関する。この態様のＴＺＤは、例えば、上記のＴＺＤの群から選択される。

【００３５】

さらに別の態様において、本発明は、糖尿病性心筋症の処置方法であって、それを必要とするヒトを含む温血動物に、治療的有効量のアリスキレンのようなレニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩を、インスリンのような１型糖尿病治療剤、またはその塩と組み合わせて含む医薬組成物を投与することを含む、方法に関する。

【００３６】

下記は、本明細書を通して使用する種々の用語の定義である：

用語“アリスキレン”は、具体的に定義されていない限り、遊離塩基としておよびその塩、特にそのヘミフマル酸塩、硝酸塩、硫酸水素塩およびオロト酸塩、特にそのヘミフマ

ル酸塩としての両態様を含むと理解すべきである。

【００３７】

用語“バルサルタン”、具体的に定義されていない限り、遊離塩基としておよびその塩、特に以下に記載の薬学的に許容されるその塩としての両方であると理解すべきである。

【００３８】

バルサルタン、または薬学的に許容されるその塩は、例えば、それ自体既知の方法で製造できる。塩形態は、酸付加塩を含む。少なくとも１個の酸基(例えば、ＣＯＯＨまたは５－テトラゾリル)を有する化合物は、塩基とも塩を形成できる。塩基との適当な塩は、例えば、アルカリ金属またはアルカリ土類金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウムまたはマグネシウム塩のような金属塩、またはアンモニアまたはモルホリン、チオモルホリン、ピペリジン、ピロリジン、モノー、ジーまたはトリー低級アルキルアミン、例えば、エチルー、ｔｅｒｔ－ブチルー、ジエチルー、ジイソプロピルー、トリエチルー、トリブチルーまたはジメチルプロピルアミン、またはモノー、ジーまたはトリヒドロキシ低級アルキルアミン、例えば、モノー、ジーまたはトリーエタノールアミンのような有機アミンとの塩である。対応する内部塩を、さらに形成してよい。医薬使用に不適当であるが、例えば、遊離化合物またはその薬学的に許容される塩の単離または精製に使用できる塩も含む。一つの態様において、塩は、例えば、次のものから選択されるから選択される；バルサルタンの一ナトリウム塩の非晶形；二ナトリウム塩の非晶形またはその結晶形、特に水和物形。バルサルタンの一カリウム塩の非晶形；バルサルタンの二カリウム塩の非晶形またはその結晶形、特に水和物形。バルサルタンのカルシウム塩の結晶形、特にその水和物形、主に四水和物；バルサルタンのマグネシウム塩の結晶形、特にその水和物形、主に六水和物；バルサルタンのカルシウム／マグネシウム混合塩の結晶形、特に水和物形；バルサルタンのビスージエチルアンモニウム塩の結晶形、特に水和物形；バルサルタンのビスージプロピルアンモニウム塩の結晶形、特に水和物形；バルサルタンのビスージブチルアンモニウム塩の結晶形、特にその水和物形、主にヘミ水和物；バルサルタンのモノーＬ－アルギニン塩の非晶形；バルサルタンのビスーＬ－アルギニン塩の非晶形；バルサルタンのモノーＬ－リシン塩の非晶形；バルサルタンのビスーＬ－リシン塩非晶形。

【００３９】

一つの態様において、バルサルタンを遊離酸として使用する。

【００４０】

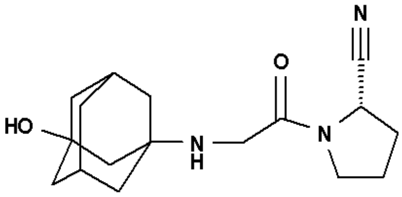
β－ブロッカーが、酸または塩基または他の方法で薬学的に許容される塩またはプロドラッグを形成できるとき、これらの形は本発明に包含されると見なされ、本化合物はまた、遊離形の形でまたは薬学的に許容される塩または生理学的に加水分解され、かつ許容されるエステルのようなプロドラッグの形で投与し得ることは理解すべきである。例えば、メトプロロールは、その酒石酸塩として適切に投与され、プロプラノロールは塩酸塩として適切に投与されるなど。

【００４１】

２型および１型糖尿病治療剤は、抗糖尿病剤を意味し、例えば、インスリン、インスリン誘導体および模倣剤；インスリン分泌促進物質、例えばスルホニルウレア類、例えばグリソキセピド、グリブリド、グリベンクラミド、アセトヘキサミド、クロロプロパミド、グリボルヌリド、トルブタミド、トラザミド、グリピジド、カルブタミド、グリキドン、グリヘキサミド、フェンブタミドミドまたはトルシクラミド(tolcyclamide)；および好ましくはグリメピリド、グリクラジド、およびアマリール；インスリン分泌性スルホニルウレア受容体リガンド、例えばメグリチナイド、例えば、ナテグリニドおよびレパグリニド；抗糖尿病性Ｄ－フェニルアラニン誘導体；チアゾリジンジオン誘導体、例えばグリタゾン類、例えば、ピオグリタゾン、トログリタゾンまたはロシグリタゾン、特にピオグリタゾンまたはロシグリタゾン；グルコキナーゼアクティベーター；タンパク質チロシンホスファターゼ－１Ｂ(ＰＴＰ－１Ｂ)阻害剤、例えばＰＴＰ－１１２；ベーター３ＡＲ(アドレナリン受容体)のアゴニスト、ＵＣＰ(脱共役タンパク質)のアゴニスト、ＰＥＰＣＫ(ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ)の阻害剤、ＰＤＨＫ(ピルビン酸デヒドロゲ

ナーゼキナーゼ)阻害剤、ＧＳＫ３(グリコーゲンシンターゼキナーゼ－３)阻害剤、例えばＳＢ－５１７９５５、ＳＢ－４１９５０５２、ＳＢ－２１６７６３、ＮＮ－５７－０５４４１およびＮＮ－５７－０５４４５；ＧＦＡＴ(グルタミンフルクトース－６－ホスフェートアミドトランスフェラーゼ)の阻害剤、Ｇ６Ｐａｓｅ(グルコース－６－ホスファターゼ)の阻害剤、Ｆ－１,６－ＢＰａｓｅ(フルクトース－１,６－ビスホスファターゼ)の阻害剤、ＧＰ(糖タンパク質)の阻害剤、ＲＸＲ(レチノイドＸ受容体)リガンドまたはアゴニスト、例えばＧＷ－０７９１およびＡＧＮ－１９４２０４；ナトリウム依存性グルコース共輸送体阻害剤、例えばＴ－１０９５；グリコーゲンホスホリラーゼＡ阻害剤、例えばＢＡＹ　Ｒ３４０１；アルドースレダクターゼ阻害剤；ソルビトールデヒドロゲナーゼ阻害剤；ビグアナイド、例えばメトホルミン；アルファーグルコシダーゼ阻害剤、例えばアカルボース、アジポシン、ボグリボース、ミグリトール、エミグリテート、カミグリボース、デンダミステート(tendamistate)、トレスタチン、プラディマイシン－Ｑおよびサルボスタチン；グルカゴン受容体アンタゴニスト、ＧＳＫ－３の阻害剤、ＧＬＰ－１(グルカゴン様ペプチド－１)、ＧＬＰ－１類似体、例えばエキセンディン－４およびＧＬＰ－１模倣剤；ＧＬＰ－１アゴニスト；ＰＰＡＲ(ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体)のモジュレーター、例えば、非グリタゾン型ＰＰＡＲγアゴニスト、例えばＮ－(２－ベンゾイルフェニル)－Ｌ－チロシン類似体、例えばＧＩ－２６２５７０、およびＪＴＴ５０１またはデュアルＰＰＡＲγ／ＰＰＡＲαアゴニスト；抗糖尿病性バナジウム；抗糖尿病性フェニル酢酸誘導体、β細胞イミダゾリン受容体アンタゴニスト、エストロゲン関連受容体ガンマ(ＥＲＲγ)アゴニスト、例えばＧＳＫ４７１６またはＧＳＫ９０８９；エストロゲン関連受容体(ＥＲＲ)、例えばＥＲＲα、ＥＲＲβ、およびＥＲＲγ受容体のアゴニストまたはアンタゴニスト；ＤＰＰIV(ジペプチジルペプチダーゼIV)阻害剤、例えば式

【化１】



の(Ｓ)－１－[(３－ヒドロキシ－１－アダマンチル)アミノ]アセチル－２－シアノ－ピロリジン(ＬＡＦ２３７またはビルダグリプチンとしても既知)、およびＬ－ｔｈｒｅｏ－イソロイシルチアゾリジン(Probiodrugに従う化合物コード：上記の通りＰ３２／９８)、シタグリプチン(ＭＫ－０４３１としても既知)、(２Ｓ)－１－{(２－(５－メチル－２－フェニル－オキサゾール－４－イル)－エチルアミノ)－アセチル}－ピロリジン－２－カルボニトリル、または(２Ｓ)－１－{(１,１－ジメチル－３－(４－ピリジン－３－イル－イミダゾール－１－イル)－プロピルアミノ)－アセチル}－ピロリジン－２－カルボニトリル、(Ｓ)－１－((２Ｓ,３Ｓ、１１ｂＳ)－２－アミノ－９、１０－ジメトキシ－１,３,４,６,７,１１ｂ－ヘキサヒドロ－２Ｈ－ピリド(２,１－ａ)イソキノリン－３－イル)－４－フルオロメチル－ピロリジン－２－オン、または(Ｓ,Ｓ,Ｓ,Ｓ)－１－(２－アミノ－９、１０－ジメトキシ－１,３,４,６,７,１１ｂ－ヘキサヒドロ－２Ｈ－ピリド(２,１－ａ)イソキノリン－３－イル)－４－メチル－ピロリジン－２－オン、ＧＳＫ２３Ａ、サクサグリプチン、３－(アミノメチル)－２－イソブチル－１－オキソ－４－フェニル－１,２－ジヒドロ－６－イソキノリンカルボキサミドおよび２－{[３－(アミノメチル)－２－イソブチル－４－フェニル－１－オキソ－１,２－ジヒドロ－６－イソキノリル]オキシ}アセトアミド；ＳＣＤ－１(ステアロイル－ＣｏＡデサチュラーゼ－１)阻害剤；ＤＧＡＴ１およびＤＧＡＴ２(ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ１および２)阻害剤；ＡＣＣ２(アセチルＣｏＡカルボキシラーゼ２)阻害剤；タンパク質チロシンホスファターゼ(ＰＴＰａｓｅ)阻害剤、特に、ＰＴＰａｓｅ－１Ｂ(ＰＴＰ－１Ｂ)阻害剤およびＴ細胞ＰＴＰａｓｅ(ＴＣ　ＰＴＰ)、胃内容物排泄阻害剤、およびＡＧＥ(糖化最終産物)のブレーカー、またはいずれの場合も薬学的に許容されるその塩を含む。

【００４２】

ＴＺＤ(チアゾリジンジオン)のような２型糖尿病治療剤が、酸または塩基または他の方法で薬学的に許容される塩またはプロドラッグを形成できるとき、これらの形は本発明に包含されると見なされ、本化合物はまた、遊離形の形でまたは薬学的に許容される塩または生理学的に加水分解され、かつ許容されるエステルのようなプロドラッグの形で投与し得ることは理解すべきである。

【００４３】

塩は、特に薬学的に許容される塩である。それらは、塩基性または酸性基のような塩形成基が存在するときに形成でき、それは、例えば４～１０のｐＨ範囲の水性溶液中に、少なくとも部分的に解離した形で存在でき、または特に固体形、特に結晶形で単離できる。このような塩は、例えば、酸付加塩として、例えば有機または無機酸と、塩基性窒素原子(例えばイミノまたはアミノ)を有する化合物から形成され、特に薬学的に許容される塩である。適当な無機酸は、例えば、ハロゲン酸、例えば塩酸、硫酸、またはリン酸である。適当な有機酸は、例えば、カルボン酸、ホスホン酸、スルホン酸またはスルファミン酸、例えば酢酸、プロピオン酸、乳酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸、アミノ酸、例えばグルタミン酸またはアスパラギン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、メチルマレイン酸、安息香酸、メタン－またはエタン－スルホン酸、エタン－１,２－ジスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、２－ナフタレンスルホン酸、１,５－ナフタレン－ジスルホン酸、Ｎ－シクロヘキシルスルファミン酸、Ｎ－メチル－、Ｎ－エチル－またはＮ－プロピル－スルファミン酸、または他の有機プロトン酸、例えばアスコルビン酸である。カルボキシまたはスルホニルのような負に荷電したラジカルの存在下で、塩はまた塩基と形成され、例えば金属またはアンモニウム塩、例えばアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウムまたはカルシウム塩、またはアンモニアまたは適当な有機アミン、例えば、３級モノアミン、例えばトリエチルアミンまたはトリ(２－ヒドロキシエチル)アミン、またはヘテロ環式塩基、例えばＮ－エチル－ピペリジンまたはＮ,Ｎ’－ジメチルピペラジンとのアンモニウム塩である。塩基性基および酸基が同一分子に存在するとき、化合物はまた内部塩も形成し得る。

【００４４】

これらの活性剤は、プロドラッグ形で存在してよい。本発明は、本発明の活性医薬種(pharmaceutical species)のプロドラッグを含み、例えばここで、インビボで遊離酸に変換可能なカルボン酸のエステルの場合、または遊離アミノ基に変換可能な保護アミンの場合のように、１個以上の官能基が保護されているか、または誘導体化されているが、インビボで官能基に変換できる。ここで使用する用語“プロドラッグ”は、特にインビボで、例えば、血中での加水分解により、速やかに親化合物に変換する化合物を意味する。詳細な記載は、T. Higuchi and V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987; H Bundgaard, ed, Design of Prodrugs, Elsevier, 1985;およびJudkins, et al. Synthetic Communications, 26(23), 4351-4367 (1996)において提供され、その各々を引用により本明細書に包含させる。

【００４５】

プロドラッグは、それ故に可逆性誘導体に変換されている官能基を有する医薬を含む。典型的に、このようなプロドラッグは、加水分解により活性医薬に変換される。例として、以下のものを挙げ得る：

【表１】

官能基	可逆性誘導体
カルボン酸	例えばアシルオキシアルキルエステルを含むエステル、アミド
アルコール	例えば硫酸、リン酸ならびにカルボン酸エステルを含む、エステル
アミン	アミド、カルバメート、イミン、エナミン、
カルボニル(アルデヒド、ケトン)	イミン、オキシム、アセタール／ケタール、エノールエステル、オキサゾリジンおよびチアゾリジン(thiazoxolidines)

【００４６】
プロドラッグはまた、酸化的または還元的反応により活性剤に変換可能な化合物も含む。例として、次のものを記載し得る：
酸化的活性化
Ｎ－およびＯ－脱アルキル化
酸化的脱アミノ化
Ｎ－酸化
エポキシド化
還元的活性化
アゾ還元
スルホキシド還元
ジスルフィド還元
生体還元的アルキル化
ニトロ還元。
【００４７】
プロドラッグの代謝的活性化としてまた言及すべきは、ヌクレオチド活性化、リン酸化活性化および脱カルボキシル化活性化である。さらなる情報に関しては、“The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action”, R B Silverman(特にChapter 8, 497～546頁参照)。
【００４８】
本発明の化合物の保護された誘導体はそれ自体薬理学的活性を有しないかもしれないが、それらを、例えば非経腸的または経口で投与し、その後体内で代謝されて、薬理学的に活性な本発明の化合物を形成し得る。このような誘導体は、それ故に“プロドラッグ”の例である。記載の化合物の全てのプロドラッグが本発明の範囲内に含まれる。保護基の使用は、‘Protective Groups in Organic Chemistry’, edited by J W F McOmie, Plenum Press (1973), and ‘Protective Groups in Organic Synthesis’, 2nd edition, T W Greene & P G M Wutz, Wiley-Interscience (1991)に充分に記載されている。
【００４９】
化合物、塩、医薬組成物、疾患、障害等について複数表現を使用するとき、これは、１個以上の単一化合物、塩、医薬組成物、疾患、障害等を意味し、単数表現を使用するとき、これは、複数(例えばまた同一化合物の異なる立体異性体、例えばラセミ体におけるエナンチオマー等)または単数(“一”)を含むことを意図する。
【００５０】
用語“有効量”または“治療的有効量”は、糖尿病性心筋症の進行を停止するか、または遅延させる、または、そうでなければ完全にもしくは一部寛解させるか、または該状態に対して軽減的に作用する、活性成分または活性剤の量を意味する。
【００５１】
用語“予防的有効量”は、糖尿病性心筋症の発症を予防する活性成分または活性剤の量

を意味する。
【００５２】
用語“医薬”、“活性物質”、“活性成分”、“活性剤”は、遊離形または薬学的に許容される塩の形の化合物、特にここに特定したタイプの化合物を意味するとして理解すべきである。
【００５３】
用語“温血動物”または“患者”は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ウシ、サル、ウサギ、マウスおよび実験動物を含み、これに限定されない。一つの態様において、哺乳動物はヒトである。
【００５４】
用語“処置”は、該疾患、状態または障害の予防、制圧(combating)または進行遅延の目的のために、好ましくは疾患、状態または障害の制圧の目的のための患者の管理およびケアを意味し、および特にまた予防処置でもある。
【００５５】
用語“予防”／“予防する”は、該疾患、状態または障害の発生を予防するために、健常患者に組み合わせ製剤または医薬組成物のような医薬を予防投与することを意味するとして理解すべきである。
【００５６】
用語“進行遅延”／“進行を遅延する”は、該疾患、状態または障害の全段階にある患者に、組み合わせ製剤または医薬組成物のような医薬を予防投与することを意味するとして理解すべきである。
【００５７】
用語“糖尿病”は１型および２型糖尿病の両方を含む。用語“１型糖尿病”は、インスリン依存性真性糖尿病(ＩＤＤＭ)と呼ばれ、膵臓ランゲルハンス島内のインスリン産生細胞(β細胞)が選択的に、免疫学的細胞の標的となり、その浸潤により破壊される、慢性自己免疫疾患である。ＩＤＤＭは、一方でのベータ細胞を標的とする破壊的自己免疫過程と、他方でのこれらの細胞の再生能の間の好ましくないバランスによる、膵臓ベータ細胞の進行性損失により特徴付けられる。このアンバランスは最終的にベータ細胞および内因性インスリン分泌の完全な欠失を導く。用語“２型糖尿病”は、２型真性糖尿病を意味し、これは、膵臓が、膵臓ベータ(β)細胞機能の障害により充分なインスリンを分泌しないおよび／またはインスリン産生に対する非感受性(インスリン抵抗性)が存在する、疾患である。典型的に、空腹時血漿グルコースは１２６mg／dL未満であるが、前糖尿病は、例えば、次の状態の一つにより特徴付けられる状態である：空腹時血糖異常(１１０－１２５mg／dL)および耐糖能障害(空腹時グルコースレベル１２６mg／dL未満および食後グルコースレベル１４０mg／dL～１９９mg／dL)。２型真性糖尿病は高血圧を伴うことも伴わないこともある。真性糖尿病は、例えば、アフリカ系アメリカ人、ラテン／ヒスパニック系アメリカ人、ネイティブアメリカン、アジア系アメリカ人および太平洋諸島系人に頻繁に起こる。インスリン抵抗性のマーカーは、ＨｂＡ１Ｃ、ＨＯＭＡ　ＩＲ、コラーゲンフラグメント測定、尿中ＴＧＦ－β、ＰＡＩ－１およびプロレニンを含む。
【００５８】
糖尿病患者は心不全を発症するリスクが増加しており、これは“糖尿病性心筋症”と名付けられる明確な疾患過程である。用語“糖尿病性心筋症”(Hayat et al in Clinical Science 2004, 1007, 539により定義されている通り)は、最終的にＬＶＨ[左室肥大]ならびに拡張期および収縮期不全またはこれらの組み合わせに至る、広範な構造異常を引き起こす、糖尿病患者の心筋に影響する疾患過程である。糖尿病性心筋症は、筋細胞肥大および心筋線維症により特徴付けられる(Bell, Diabetes Care, 2003, 26, 2433)。Scognamiglio (The American Journal of Cardiology, 2004, 93, 17A)により記載の通り、糖尿病性心筋症は、顕著な冠動脈疾患または全身性高血圧が存在しない、収縮機能の欠如により特徴付けられる状態である。Bell (Diabetes Care, 2003, 26, 2433)が指摘の通り、糖尿病患者における心不全(ＨＦ)の疫学は次の通り、要約できる：

１)ＨＦは、年齢適合非糖尿病対象よりも糖尿病男性で２倍多く、そして糖尿病女性で５倍多い。
２)２型糖尿病対象の約３.３％が、各年にＨＦを発症する。
３)高齢糖尿病対象は、非糖尿病対象よりもＨＦを発症するリスクが１.３倍高い。
４)高齢糖尿病対象のＨＦの有病率は３９％である。
５)高齢糖尿病患者におけるＨｂＡ１ｃの１％上昇は、ＨＦのリスクの１５％上昇と関連する。
６)糖尿病患者は、大規模ＨＦ治験参加全患者の２５％を占める。

【００５９】

一般名、商標名またはコード番号で同定した活性剤の構造は、標準要約書“The Merck Index”の現行版から、またはデータベース、例えば、Life Cycle Patents International(例えばIMS World Publications)から取り得る。当業者はこれらの引用文献を参照して、活性剤を充分に同定することが可能であり、同様に、それを製造し、標準試験モデルで、インビトロおよびインビボの両方で医薬適応症および特性を試験することが可能である。

【００６０】

本発明の医薬組成物は、ヒトを含む哺乳動物への経腸、例えば経口または経直腸、経皮および非経腸投与に適するものであり、組成物は、薬理学的活性化合物を単独で、または慣用的な医薬補助剤と共に含む。例えば、医薬組成物は、約０.１％～１００％、例えば約１％～約８０％の活性化合物から成る。経腸または非経腸投与用医薬組成物は、例えば、単位投与形態、例えば被覆錠、錠剤、カプセル剤または坐薬およびまたアンプル剤である。これらは、それ自体既知の方法で、例えば慣用の混合、造粒、コーティング、溶解または凍結乾燥工程により製造する。それ故、経口使用のための医薬組成物は、活性化合物と固体賦形剤を合わせ、所望により得られた混合物を造粒し、そして、望むならばまたは必要であるならば、該混合物または顆粒を、適当な補助剤を添加後、錠剤または被覆錠コアに加工することにより得ることができる。経口投与のために、レニン阻害剤、特に、例えばそのヘミフマル酸塩の形の、アリスキレン；および所望によりＡＣＥ阻害剤、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、ベーターブロッカー、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、インスリンのような１型糖尿病治療剤、および薬学的に許容されるその塩から成る群から選択される少なくとも１種の治療剤を含む医薬組成物は、例えば、溶液、懸濁液、錠剤、ピル、カプセル、粉末、マイクロエマルジョンおよび単位投与量小包の形を取り得る。一つの態様において、本医薬組成物は、活性成分を：ａ)希釈剤、例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび／またはグリシン；ｂ)平滑剤、例えば、シリカ、タルク、ステアリン酸、そのマグネシウムまたはカルシウム塩および／またはポリエチレングリコール；錠剤についてはまたｃ)結合剤、例えば、ケイ酸アルミニウム・マグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロースおよびまたはポリビニルピロリドン；望むならばｄ)崩壊剤、例えば、デンプン、寒天、アルギン酸またはそのナトリウム塩、または起沸性混合物；および／またはｅ)吸収剤、着色剤、香味剤および甘味剤と共に含む、錠剤またはゼラチンカプセルである。注射用組成物は、例えば、水性等張溶液または懸濁液であり、および坐薬は有利に脂肪エマルジョンまたは懸濁液から製造する。

【００６１】

該組成物は滅菌してもよくおよび／またはアジュバント、例えば防腐剤、安定化剤、湿潤剤または乳化剤、溶解促進剤、浸透圧調整用塩および／または緩衝剤を含んでよい。

【００６２】

活性化合物の投与量は、投与形態、恒温動物種、年齢および／または個々の状態のような種々の因子に依存し得る。特に、医薬組み合わせの投与は、治療的有効量、特に商業的に入手可能な量である。一つの態様において、投与は、低投与量組み合わせである。

【００６３】

通常、経口投与の場合、１mg～約３６０mの大凡の１日量が、例えば、体重約７５kgの患者に対して概算される。

【００６４】

通常、小児は成人量の大凡半量を摂取するか、または成人と同量を摂取してもよい。各個体について必要な投与量は、例えば、活性成分の血清濃度を測定することによりモニターでき、最適レベルに調節する。全ての投与量は、活性剤に基づき、すなわちアリスキレンについては、投与量は遊離塩基に基づく。

【００６５】

例えば、体重約７０kgの温血動物、例えばヒトに投与すべきレニン阻害剤、例えばアリスキレン、特に酵素レニンの阻害、例えば血圧低下に有効な投与量は、３mg～３ｇ、例えば１０mg～１ｇ、例えば２０mg～６００mg(例えば１５０mg～３００mg)／人／日であり；例えば、同じサイズであり得る１～４個の単一用量に、例えば、分割する。例えばアリスキレンの単一用量は、例えば、７５、１００、１５０、２００、２５０、３００または６００mg／成人患者を含む。

【００６６】

一つの態様において、単位投与形態のアンギオテンシンII受容体アンタゴニストは、例えば１０～約３６０mg、例えば、バルサルタン、特に４０mg、８０mg、１６０mgまたは３２０mgの、例えば治療的有効量を含む、例えば、錠剤またはカプセルであり得る。活性成分の適用は、１日３回行い、例えば２０mgまたは４０mgの、例えば、バルサルタンの１日量から開始して、１日８０mgを介して、さらに１日１６０mgから１日３２０mgに増やしてよい。一つの態様において、バルサルタンは、１日２回、各々、各８０mgまたは１６０mgの投与量で適用する。対応する投与量を、例えば、朝、昼または晩に摂取し得る。一つの態様において、投与は１日２回(ｂ．ｉ．ｄ．)である。

【００６７】

単位投与形態のＡＣＥ阻害剤は、例えば5mg～２０mg、例えば5mg、１０mgまたは２０mgの、例えば、ベナゼプリル；６．5mg～１００mg、例えば６．２５mg、１２．5mg、２５mg、５０mg、７５mgまたは１００mgの、例えば、カプトプリル；２．5mg～２０mg、例えば２．5mg、5mg、１０mgまたは２０mgの、例えば、エナラプリル；１０mg～２０mg、例えば１０mgまたは２０mgの、例えば、フォシノプリル；２．５mg～４mg、例えば2mgまたは４mgの、例えば、ペリンドプリル；5mg～２０mg、例えば5mg、１０mgまたは２０mgの、例えば、キナプリル；または１．２５mg～5mg、例えば１．２５mg、２．5mg、または5mgの、例えば、ラミプリルを含む、例えば、錠剤またはカプセルである。一つの態様において、投与は１日３回(ｔ．ｉ．ｄ．)である。

【００６８】

β－ブロッカーの経口投与用の適当な１日量(成人)は、例えば：２００～１２００mgの、例えば、アセブトロール；２５～１００mgの、例えば、アテノロール；１０～２０mgの、例えば、ベタキソロール；５～１０mgの、例えば、ビソプロロール；２．５～１０mgの、例えば、カルテオロール；１００～１,８００mgの、例えば、ラベタロール；５０～４５０mgの、例えば、メトプロロール；４０～２４０mgの、例えば、ナドロール；６０～４８０mgの、例えば、オクスプレノロール；２０～８０mgの、例えば、ペンブトロール；１０～６０mgの、例えばピンドロール；４０～３２０mgまたは６０～３２０mg(長時間作用型製剤)の、例えば、プロプラノロール；１６０～３２０mgの、例えば、ソタロール；２０～６０mgの、例えば、チモロールである。

【００６９】

ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤の経口投与のための適当な１日量は、例えば：０．００１mg／kg～約１００mg／kg、例えば０．０１mg～２０００mg／日、例えば０．０１、０．０５、０．１、０．２、０．５、１．０、２．５、５、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、５００、７５０、８５０、１,０００および２,０００ミリグラムである。

【００７０】

最終的に、投与すべき活性剤および特定の製剤の正確な投与量は、多くの因子、例えば、活性剤の放出速度に依存する。例えば、必要な活性剤の量およびその放出速度は、決定し得る、どの程度の時間、血漿中の特定の活性剤の濃度が、治療効果のために許容されるレベルで残るかを測定する、既知インビトロまたはインビボ技術に基づき決定し得る。

【００７１】

特に、市販されている本発明による医薬組合せの複数活性成分については、特に治療的に有効な市販の投与量である。

【００７２】

大型哺乳動物について、指示される総１日量は約０．０１～１００mg／kgの化合物であり、簡便には、例えば徐放形態で約０．１～約４００mgの本化合物を含む単位投与形態で１日１～４回投与する。

【００７３】

本発明が、別々に投与し得る複数化合物の組合せでの処置方法に関する局面を含むため、本発明はまた、キットの形態の別々の医薬組成物の組み合わせにも関する。本キットは、例えば、２または３種の別々の医薬組成物：(１)レニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩、および薬学的に許容される担体または希釈剤および(２)ＡＣＥ阻害剤、または薬学的に許容されるその塩、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、例えば、バルサルタンまたは薬学的に許容されるその塩、ベータブロッカーまたは薬学的に許容されるその塩、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、または薬学的に許容されるその塩、インスリンのような１型糖尿病治療剤、または薬学的に許容されるその塩から成る群から選択される少なくとも１種の治療剤、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含み得る。(１)および(２)の量は、別々に併用投与したときに、有益な治療効果が達成されるような量である。本キットは、別々の組成物を含むための容器、例えば、各区画が、例えば、(１)または(２)を含む、複数の投与形態(例えば、錠剤)を含む、分割された瓶または分割されたホイル小包を含む。あるいは、活性成分含有投与形態を分けるよりむしろ、本キットは、各々が全投与量を含み、それが別々の投与形態を含む、別々の区画を含み得る。このタイプのキットの例は、各個々のブリスターが２個または３個(またはそれ以上)の錠剤を含み、１個(またはそれ以上の)錠剤が医薬組成物(１)を含み、第二の(またはそれ以上の)錠剤が医薬組成物(２)を含む、ブリスターパックである。典型的に本キットは、別々の成分の投与の指示を含む。キット形態は、別々の成分を別々の投与形態(例えば、経口と非経腸)で投与するとき、異なる投与間隔で投与するとき、または組合せの個々の成分のタイトレーションが処方医により望まれるときに、有益である。本発明の場合、キットは、例えば：

(１)第一の投与形態で、レニン阻害剤、特に、例えば、そのヘミフマル酸塩の形の、アリスキレン、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、治療的有効量の組成物、および

(２)第二の投与形態で、ＡＣＥ阻害剤または薬学的に許容されるその塩、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト(例えば、バルサルタン)または薬学的に許容されるその塩、ベータブロッカーまたは薬学的に許容されるその塩、ＴＺＤのような２型糖尿病治療剤、または薬学的に許容されるその塩、インスリンのような１型糖尿病治療剤、または薬学的に許容されるその塩から成る群から選択される少なくとも１種の治療剤、および薬学的に許容される担体または希釈剤、および

(３)該第一および第二投与形態を含む、容器

を含み得る。

【００７４】

Bell(Diabetes Care, 2003, 26, 2433)により記載されている通り、糖尿病性心筋症は、筋細胞肥大および心筋線維症により特徴付けられる。糖尿病性心不全の病因は、それ故多パラメータ性である。アリスキレンのようなレニン阻害剤の糖尿病性心筋症の処置における適性を示すここに記載の試験は、ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおける心不全マーカーの分析に焦点を当てる。以下のパラメータを分析する：

１)形態計測学的および血行力学的パラメータの分析：心エコーおよびＬＶカテーテル法により行われる分析は、糖尿病が引き起こす、拡張期および収縮期不全のような心臓病理学に対する試験薬の効果を同定する。

【００７５】

２)組織学および遺伝子発現による増強された活性酸素種(ＲＯＳ)産生、筋細胞アポトーシス、および心臓線維症の分析：ＲＯＳ産生、アポトーシス、および線維症は、特異的染色を使用した免疫組織化学により、および、これらの状態に関与する遺伝子(例えばＮＡＤＰＨオキシダーゼ、Ｂｃｌ２、Ｂａｘ、ＴＧＦ－β、およびコラーゲン)の発現を測定することにより、検出する。これらの測定は、心臓線維症、アポトーシス、およびＲＯＳ産生に対する試験薬の効果を同定する。ＲＯＳの産生は、糖尿病性心不全の主原因因子であることが提案されており、それはまた心臓筋細胞アポトーシスももたらす。心臓線維症は拡張期不全に関与すると見なされている。

【００７６】

３)Ａｎｇ　II測定および遺伝子発現による心臓ＲＡＳの分析：この測定は、糖尿病における心臓ＲＡＳの活性化に対する試験薬の効果を同定する。ＲＡＳは、糖尿病性心不全の病因に関与する。インビトロおよびインビボでの細胞内ＲＡＳの活性化が当分野で証明されている。Ａｎｇ　IIレベルおよびＡＧＴ、レニン、およびＡＣＥの発現を測定することにより、循環しているおよび局所的な心臓ＲＡＳの活性化が決定される。

【００７７】

４)確立された心臓リモデリングのマーカー、例えばＡＮＰ、β－ＭＨＣ、およびＴＧＦ－βの分析；そして糖尿病性心筋症に関与する新たに同定された遺伝子、例えば、筋小胞体Ｃａ$^{2+}$　ＡＴＰａｓｅ(ＳＥＲＣＡ２)、ｐ９０リボソームＳ６キナーゼ(ｐ９０ＲＳＫ)、およびプロレニン変換酵素(ＰＲＥＣＥ)ＡＮＰ、β－ＭＨＣ、ＳＥＲＣＡ２、ｐ９０ＲＳＫ、およびＰＲＥＣＥは、心臓リモデリングの確立されたマーカーである。ＡＮＰおよびβ－ＭＨＣは、心臓リモデリングの確立されたマーカーである。ＳＥＲＣＡ２の発現減少が、糖尿病における拡張期不全を担うＣａ$^{2+}$恒常性を変化させることがシメされている。より最近、ｐ９０ＲＳＫおよびＰＲＥＣＥが、糖尿病性心不全に強く関係付けられている。

【００７８】

５)炎症誘発性心臓サイトカイン(ＴＮＦ－α、ＩＬ６、およびＩＬ１－β)の分析：糖尿病性心筋症と関連する異常の一つは心臓炎症であり、それは、サイトカイン、例えばＴＮＦ－α、ＩＬ６、およびＩＬ１－βのレベル上昇を伴う。試験薬によるサイトカインレベルの正常化は、心臓機能の改善を示し得る。

【００７９】

６)心臓における試験薬の組織および細胞濃度の測定：アリスキレンが、心臓内のＡｎｇ　IIの局所産生を阻害することにより心保護的効果を生じ得るため、この薬剤で処置している動物におけるアリスキレンの心臓濃度を測定することが望まれる。

【００８０】

Ａｎｇ　IIにより調節される、数パラメータがこの試験には包含されている。上記パラメータのいくつかは糖尿病初期(１週間)で明白であるが、より長い試験(４および８週間)が、種々のＲＡＳブロッカーの効果をより説得力をもって区別するであろう。

【００８１】

驚くべきことに、本発明により、レニン阻害剤が糖尿病性心筋症の処置に使用し得ることが判明した。

【００８２】

特に、本発明者らは、アリスキレンのようなレニン阻害剤が、単独でまたは組み合わせで、糖尿病性心筋症の処置において有益な効果を有し得ることを発見した。

【００８３】

ｉＡｎｇ　II(細胞内Ａｎｇ　II)は、心肥大(Kumar R at al in Trends Endocrinol Metab 18:208-214, 2007; Baker KM at al in Regul Pept 120:5-13, 2004)を含む種々の生

物学的作用を引き起こすことが示されている。マウスにおけるＳＴＺ誘発糖尿病(１型糖尿病の模倣)の使用により、糖尿病ラット心臓における細胞内レニン－アンギオテンシン系(ＲＡＳ)の活性化が存在することが判明している。本発明は、高血糖がインビボで心臓細胞内レニン－アンギオテンシン系を活性化することを示し、ｉＡｎｇ　IIが糖尿病と関連する心血管の病的状態に関与することを証明する。重大なことに、糖尿病ラットにおける、レニン阻害剤によるＲＡＳの遮断が、ＡＴ$_1$アンタゴニストまたはＡＣＥ阻害剤での阻害と比べて、心臓線維症および酸化的ストレスからのより大きな保護を提供することが判明している。例えば、ｉＡｎｇ　II合成はアリスキレンで遮断されるが、ベナゼプリルではされず、糖尿病誘発心臓線維症はカンデサルタンおよびベナゼプリルで一部阻止されるが、アリスキレンは完全な阻止を生じる。レニン阻害剤は、それ故糖尿病状態における顕著な心血管への恩恵を提供する。

【００８４】

高グルコースは、細胞内ＲＡＳ活性化の主要な刺激である。１型および２型糖尿病両方とも高血糖を伴う。それ故、１型糖尿病における細胞内ＲＡＳに関する観察は、２型糖尿病にも適用できる。

【００８５】

この仮説は、新生児ラット心臓筋細胞において、インスリンの存在下でさえ高グルコースにより細胞内ＲＡＳが活性化されることを証明したインビトロ試験の結果により支持される。さらに、２型糖尿病患者からの心臓組織の組織学的分析は、Ａｎｇ　IIに関して増強された細胞内染色を示している(Frustaci A at al in Circ Res 87:1123-1132, 2000)。

【００８６】

レニン阻害剤の投与によりまたは本発明に従い使用する複数治療剤の組合せの投与により発揮される薬理活性は、例えば、当分野で既知の対応する薬理学的モデルの使用により、証明し得る。当業者は、前記および後記で示す治療適応症および有益な効果を証明するための関連試験モデルを選択することが充分に可能である。

【００８７】

レニン阻害剤、または薬学的に許容されるその塩を含む本発明の組み合わせは、種々の投与経路により投与できる。各薬剤は、最大応答を発揮するための特異的組み合わせおける各治療剤の最適薬剤レベルを決定するために、広範囲の投与量にわたり試験し得る。これらの試験のために、群あたり少なくとも６匹の動物から成る処置群を使用することが好ましい。各試験は、個々の成分の評価と同時に、組み合わせ処置群の効果が測定される、方法で行うのが最良である。

【００８８】

レニン阻害剤の、単独での、またはここに記載の通りのさらなる活性成分との組み合わせでの、糖尿病性心筋症の処置のための有用性は、例えば、Ｃ５７／ＢＬ６マウスでの試験の実施により、および後記のパラメータの測定により実験的に証明し得る。

【実施例】

【００８９】

<u>方法</u>

【表２】

略語		
ＲＡＳ	＝	レニン－アンギオテンシン系
ＡＧＴ	＝	アンギオテンシノーゲン
Ａｎｇ　II	＝	アンギオテンシンII
ｉＡｎｇ　II	＝	細胞内Ａｎｇ　II
ＡＲＢ	＝	アンギオテンシン受容体ブロッカー
ＷＴ	＝	野生型
ＩＶＳＴｄ	＝	拡張終期心室中隔
ＩＶＳＴｓ	＝	収縮末期心室中隔
ＰＷＴｄ	＝	拡張期後壁肥厚
ＰＷＴｓ	＝	収縮期後壁肥厚
ＡＷＴｄ	＝	前壁肥厚
ＬＶＤｄ	＝	拡張期左室内部直径
ＬＶＤｓ	＝	収縮期左室内部直径
ＦＳ	＝	左室径短縮率
ＲＷＴ	＝	相対的壁厚
ＬＶ	＝	左心室
ＬＶＭ	＝	左室容積
ｄＰ／ｄｔ	＝	経時的な左室(ＬＶ)圧の一次微分
ＰＢＳ	＝	リン酸緩衝化食塩水
ＤＮＡ	＝	デオキシリボ核酸
ＤＨＥ	＝	ジヒドロエチジウム
ＲＯＳ	＝	活性酸素種
ＥＬＩＳＡ	＝	酵素結合免疫吸着検定法
ＲＴ－ＰＣＲ	＝	逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応
ＡＧＴ	＝	アンギオテンシノーゲン
ＡＣＥ	＝	アンギオテンシン変換酵素
ＴＧＦ－β	＝	トランスフォーミング増殖因子－β
ＡＮＰ	＝	心房性ナトリウム利尿ペプチド
β－ＭＨＣ	＝	β－ミオシン重鎖
ＳＥＲＣＡ２	＝	筋小胞体Ｃａ２＋－ＡＴＰａｓｅ
ｐ９０ＲＳＫ	＝	ｐ９０リボソームＳ６キナーゼ
ＰＲＥＣＥ	＝	プロレニン変換酵素
ＧＡＰＤＨ	＝	グリセルアルデヒド３リン酸脱水素酵素
ＲＮａｓｅ	＝	リボヌクレアーゼ
ＲＮＡ	＝	リボ核酸
ｃＤＮＡ	＝	相補的ＤＮＡ
ＴＮＦ－α	＝	腫瘍壊死因子－α
ＩＬ６	＝	インターロイキン６
ＩＬ１－β	＝	インターロイキン１－β
ＳＴＺ	＝	ストレプトゾトシン
ｓ．ｃ．	：	皮下
ｂ．ｉ．ｄ．(投与)	：	１日２回
ｔ．ｉ．ｄ．(投与)	：	１日３回
ｗｋ	：	週
ＨｂＡ１ｃ	＝	ヘモグロビンＡ１ｃ
ＨＦ	＝	心不全

【００９０】

下記の試験法を使用する：
方法１
１型糖尿病：
８群の８週齢雄マウス　Ｃ５７／ＢＬ６を使用する：対照、糖尿病、ならびにアンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、例えば、カンデサルタン、ＡＣＥＩ、例えばベナゼプリル、およびレニン阻害剤、例えばアリスキレンで処置する対照および糖尿病マウス。各群は１５匹の動物を含む。糖尿病を、低用量(例えば５０mg／kg／日で５日間)のストレプトゾトシン(Sigma)の１０mMクエン酸緩衝液の反復腹腔内投与により誘発する。対照群の動物は緩衝液のみ受ける。この工程は、マウスにおいて確固たるそして一貫した高血糖を引き起こす。糖尿病の確立を、グルコメータを使用した、＞２５０の血中グルコース測定値により確認する。血中グルコースレベルを、週に２回モニターして、糖尿病の持続を確認する。皮下インスリン処置によりグルコースレベルが正常化された対照糖尿病群も包含させる。アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、例えばカンデサルタン、ＡＣＥＩ、例えばベナゼプリル、およびレニン阻害剤、例えばアリスキレンを、浸透圧ミニポンプにより投与する。動物を、糖尿病の確立から１、４および８週目に心臓機能、形態学、組織学、および遺伝子発現について試験する。浸透圧ミニポンプを、８週群において４週後に交換する。これらの時点で、心臓収縮期および拡張期機能、線維症、酸化的ストレス、および遺伝子発現に対する糖尿病の顕著な影響が測定される。
【００９１】
２型糖尿病：
Ｃ５７ＢＬＫＳ／ｊ背景の、８群の６週齢雄マウス、糖尿病(ｄｂ／ｄｂ)および非糖尿病同腹子対照を使用する：対照、糖尿病、ならびに、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、例えば、カンデサルタン；ＡＣＥＩ、例えばベナゼプリル；およびレニン阻害剤、例えばアリスキレンで処置された対照および糖尿病マウス。各群は１５匹の動物を含む。糖尿病を、グルコメータを使用して、＞２５０の血中グルコース測定値により確認する。アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、例えばカンデサルタン；ＡＣＥＩ、例えばベナゼプリル；およびレニン阻害剤、例えばアリスキレンを浸透圧ポンプにより投与する。動物を、処置１、４および８週目に心臓機能、形態学、組織学、および遺伝子発現について試験する。浸透圧ミニポンプを、８週群において４週後に交換する。これらの時点で、糖尿病誘発心臓収縮期および拡張期機能、線維症、酸化的ストレス、および遺伝子発現に対する処置の効果が測定される。
【００９２】
パラメータ試験：
ｉ)形態計測学的および血行力学的分析：
収縮期血圧を、毎週、尾加圧帯(tail-cuff)プレチスモグラフィーにより測定する。心エコー分析を、麻酔下の動物(例えば４０－５０mg／kgケタミンおよび例えば腹腔内５mg／kgキシラジンで)で、１２MHzトランスデューサーを備えたAgilent 5500 Sono S心エコーを使用して行う。左心室の二次元短軸画像を乳頭筋レベルで得た後、Ｍモード静止画を得る。拡張終期および収縮末期心室中隔(ＩＶＳＴｄ、ＩＶＳＴｓ)、後壁肥厚(ＰＷＴｄ、ＰＷＴｓ)、前壁肥厚(ＡＷＴｄ)および左室内部直径(ＬＶＤｄ、ＬＶＤｓ)を、コンピュータ分析システムを使用して測定する。左室径短縮率パーセント(％ＦＳ)、相対的壁厚(ＲＷＴ)、および左室容積(ＬＶＭ)を、当分野で標準的な式を使用して計算する。心エコー分析を、最初のストレプトゾトシン注射日およびその後毎週行う。６匹のマウスの群は、糖尿病誘導１、４、および８週後４０－５０mg／kgの例えばケタミンおよび５mg／kgの例えばキシラジン、腹腔内で麻酔下する。変力および変弛緩機能を、右総頚動脈カニューレ挿入を介して左心室に位置する、マイクロナノメーター・カテーテル(Millar 1.4 F, SPR 671, Millar Instruments, Texas)で、左室圧展開(ｄＰ／ｄｔ　ｍａｘ)および左室圧減衰(ｄＰ／ｄｔ　ｍｉｎ)を測定することにより評価する。マウスを殺し、心臓を摘出し、秤量し、組織学的分析のために処理する。
【００９３】

ii)線維症についての組織学的分析：

組織学的分析を、上記試験(ｉ)で糖尿病誘導１、４、および８週目に得た心臓を使用して行う。摘出した心臓をＰＢＳで濯ぎ、続いてＣａ$^{2+}$を欠くKrebs-Hanseleit溶液中で、インキュベートして、心臓筋肉を弛緩させ、その後１０％ホルマリンに固定する。エタノールで脱水し、パラフィンにマウント後、５μm厚切片を切る。切片を形態学的分析用にヘマトキシリンおよびエオシンで、および線維症検出用にpicrosirius red(Fluka)で染色する。筋細胞面積を測定するために、１０個の別々の切片からのほぼ円形の毛細血管プロファイルおよび核を有する横断面を使用する。

【００９４】

iii)心臓筋細胞アポトーシス：

これらの心臓においてTUNEL陽性心臓筋細胞数が増加するかどうかを測定するために、５μm厚パラフィン切片をキシレンに浸漬し、再水和し、プロテイナーゼＫ(２０μg／ml)とインキュベートすることにより脱パラフィン化する。内因性ペルオキシダーゼを３％H_2O_2のメタノール溶液で不活性化後、切片を末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼおよびビオチニル化デオキシウリジン５－トリホスフェートと共に、In Situ Cell Death Detection Kit(Roche)を使用してインキュベートする。標識をストレプトアビジン－ＨＲＰおよびジアミノベンジンにより検出し、顕微鏡的に観察する。陽性対照として、切片を小球菌Ｄｎａｓｅ　Ｉ(1mg／ml)で前処理して、ＤＮＡ鎖破壊を誘発する。心臓切片を、心臓筋細胞特異的筋節α－アクチンに関してモノクローナル抗体ＥＡ－５３(Sigma)で共染色し、心臓筋細胞と線維芽細胞を区別する。無作為視野から、平均１０００個のＥＡ－５３陽性細胞が分析される。

【００９５】

iv)ＲＯＳ測定を凍結心臓切片で、スーパーオキサイドにより、ＤＮＡへの挿入により細胞内に捕捉されるエチジウムブロマイドに酸化される、細胞透過性蛍光色素であるジヒドロエチジウム(ＤＨＥ)で染色することにより行う。凍結心臓切片(２０μM)を、１０μM ＤＨＥと、３７℃で４５分間、光から保護された加湿チャンバー内でインキュベートする。挿入された色素の蛍光画像を蛍光顕微鏡を使用して得る。

【００９６】

ｖ)ｉＡｎｇ　II測定：

心臓を取り出す１０分前にマウスを麻酔し、ヘパリン(５０００単位／体重Kg、ＩＰ)で処理する。胸部を胸骨で開き、心臓を２０Ｇ　屈曲性(phalanged)　ステンレススチールカニューレで上行大動脈内にカニューレ挿入し、直ちに摘出する。心臓を、８０mmHg一定圧のKrebs-Henseleit緩衝液を使用して、大動脈を通して逆行性に灌流する。コラゲナーゼ溶液(０．１％ｗ／ｖ)を灌流緩衝液に添加し、心臓を４５分間灌流する。灌流後、心室を小片に切り、コラゲナーゼ溶液を含むスピナー・フラスコに移す。分散した細胞を、各５分間のインキュベーション後にデカントにより回収する。不連続percoll勾配上で筋細胞を非筋細胞と分ける。Ａｎｇ　IIを精製細胞から抽出し、濃度をＥＬＩＳＡにより測定する。

【００９７】

vi)遺伝子発現：

リアルタイムＲＴ－ＰＣＲを使用してＡＧＴ、レニン、ＡＣＥ、ＴＧＦ－β、ＡＮＰ、β－ＭＨＣ、ＳＥＲＣＡ２、ｐ９０ＲＳＫ、およびＰＲＥＣＥ発現を測定する。ＧＡＰＤＨを、相対的定量のためにハウスキーピング遺伝子として測定する。プライマーおよびプローブを文献に記載の通り、例えばNaito et al, Hypertension, 2002, 40, 827; Itoh et al Circulation, 2006, 113, 1787およびHu et al, Circulation Research, 2005, 96, 1006に記載の通り合成する。簡単に言うと、心臓をＰＢＳで洗浄し、－８０℃で貯蔵するために直ぐにRNase Later(Ambion)溶液に移す。ＲＮＡ単離(AmbionのToTally RNAキット)およびｃＤＮＡ合成(Applied Biosystemsからの大容量cDNA逆転写キット)を、市販のキットを使用して実施する。

【００９８】

vii)タンパク質発現：

上記遺伝子の発現を、ウェスタン分析でタンパク質レベルで確認する。タンパク質を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロース膜に移す。その膜を、標的タンパク質に特異的な一次抗体でプローブする。化学ルミネセンスまたは蛍光のいずれかで検出用に標識された二次抗体を使用して膜に結合した一次抗体を定量し、これは標的タンパク質の量に対応する。

【００９９】

vii)サイトカイン：

炎症誘発性心臓サイトカインＴＮＦ－α、ＩＬ６、およびＩＬ１－βを、市販のＥＬＩＳＡキット(Pharmingen/BD Biosciences)により、製造者の指示に従って測定する(Westermann et al Diabetologia 2006, 49, 2507)。

【０１００】

本実験研究は以下の通り要約できる：

【表３】

処置		Ｎ／群	処置期間(週)	関連情報
処置なし	対照	１５	１、４および８	形態学的、血液学的因子は全動物で測定する。 各群から６匹の動物を組織学ベースのパラメータのために使用する。 ６匹の動物を遺伝子およびタンパク質発現試験およびＡｎｇ II測定に使用する。 糖尿病または取り扱いによる死亡を勘定して、３匹の余分の動物を包含させる。
	糖尿病	１５		
カンデサルタン	対照	１５	１、４および８	
	糖尿病	１５		
ベナゼプリル	対照	１５	１、４および８	
	糖尿病	１５		
アリスキレン	対照	１５	１、４および８	
	糖尿病	１５		
インスリン	糖尿病	１５	１、４および８	ＳＴＺの毒性効果を除外するための対照

【０１０１】

方法２

糖尿病の誘導および動物の処置

糖尿病を、成熟雄Sprague Dawleyラット(２５０－３００ｇ)において、０．１Ｍクエン酸ナトリウム緩衝化食塩水(ｐＨ４．５)に溶解したストレプトゾトシン(ＳＴＺ、６５mg／体重kg、ＩＰ)の１回注射により誘導する。対照動物は、緩衝化食塩水のみを受ける。糖尿病を、ＳＴＺ注射４８時間後およびその後１日おきに測定して、持続する血中グルコースレベル＞１５mmol／Ｌにより確認する。９匹の動物の群の糖尿病ラットを、インスリン(２－５Ｕ、ＢＩＤ、ＳＣ)、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、例えば、カンデサルタン(１mg／kg、ＩＰ)、レニン阻害剤、例えばアリスキレン(３０mg／kg、経口)、またはＡＣＥＩ、例えばベナゼプリル(１０mg／kg、経口)のいずれかで、ＳＴＺ注射４８時間後に開始して毎日７日間処置する。７日後、動物を秤量し、ケタミン／キシラジン(５０／５mg／kg)を使用して麻酔する。心臓を単離し、秤量し、その後灌流し、後者はLangendorff法を使用する。

【０１０２】

心臓筋細胞の単離およびｉＡｎｇ　IIの測定

心臓を単離し、Krebs-Henseleit重炭酸緩衝液で灌流し、続いてコラゲナーゼII(０．１％ｗ／ｖ)で消化させる。筋細胞を、２５×ｇでｎ遠心分離により非筋細胞から分ける。この方法を使用した筋細胞調製物の純度は、抗筋節ミオシン(ＭＦ－２０)および抗筋節アクチン抗体を使用したＦＡＣＳで分析して、＞９０％である。筋細胞含有ペレットを、Si

ngh et al in Am J Physiol Heart Circ Physiol 293:H939-H948, 2007に記載の通り、Ａｎｇ　II抽出のために処理する。細胞をプロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma)含有氷冷１Ｍ酢酸中に、超音波処理(各５秒間の２パルス)を使用して溶解した。この溶解物を２０,０００×ｇで１０分間沈降させ、上清をvacufugeで乾燥させ、続いて１％酢酸に再構成する。このサンプルを、条件化ＤＳＣ－１８カラム(Supelco)に適用し、メタノールで溶出する。溶出したサンプルを乾燥させ、ＥＬＩＳＡ用にＰＢＳ中に再構成する。血漿からのＡｎｇ　IIの単離のために、等容量の２％酢酸を血漿に添加し、続いてAmicon Ultra-15フィルターを通して濾過する。この濾液をＤＳＣ－１８カラムに適用し、Ａｎｇ　IIを、細胞溶解物について記載の通り溶出する。上記方法を使用して、外的に添加したＡｎｇ　IIを＞９０％回収率で回収できる。Ａｎｇ　IIを、定量的、競合的ＥＬＩＳＡにより、Am J Physiol Heart Circ Physiol 293:H939-H948, 2007に先に記載の通り、特異的抗Ａｎｇ　II抗体(Peninsula Labs)を使用して測定する。ＥＬＩＳＡをプロテインＡおよび抗Ａｎｇ　II抗体コート９６ウェル皿で行う。合成ビオチニル化Ａｎｇ　IIの、本抽出ペプチド存在下での競合的結合を、ストレプトアビジン－ホースラディッシュペルオキシダーゼ接合体存在下で検出する。定量のビオチニル化Ａｎｇ　IIと共に、非ビオチニル化合成Ａｎｇ　IIの濃度を増加させて作成した標準曲線を使用して、サンプル中のペプチド濃度医を計算する。細胞溶解物中のＡｎｇ　II濃度は、心臓重量あたりのfmoleとして、そして血漿中は血漿タンパク質ミリグラムあたりfmoleとして表す。

【０１０３】

心臓灌流および酵素的分散後単離した心臓筋細胞中のＡｎｇ　IIレベルは、細胞内に存在するＡｎｇ　IIに対応する。ｉＡｎｇ　II供給源、すなわち、細胞内合成であるのか、$ＡＴ_1$介在内在化であるのかを決定するために、糖尿病動物の一群を$ＡＴ_1$アンタゴニストであるカンデサルタンで処置して、受容体介在取り込みを防止する。糖尿病ラット心臓からの心臓筋細胞は、対照動物(０．０６±０．０１fmole／心臓重量mg)と比較して、ｉＡｎｇ　IIレベルの９．９倍上昇を示す(０．５９±０．０１fmole／心臓重量mg)。ＳＴＺ処置ラットにおけるインスリンによる血中グルコースレベルの正常化は、ｉＡｎｇ　IIレベルの上昇を完全に遮断し(０．１６±０．０２fmole／心臓重量mg)、後者が高血糖の特異的作用であることを示す。糖尿病ラットのカンデサルタンでの処置はｉＡｎｇ　IIレベルを０．４３±０．０５fmole／心臓重量mgまで低下させ、これはｉＡｎｇ　IIの主供給源が細胞内合成であることを示す。糖尿病ラットのアリスキレンでの処置はｉＡｎｇ　IIレベルを標準化させるが(０．１２±０．０２fmole／心臓重量mg)、一方ベナゼプリルはなんの効果もない(０．５５±０．０２fmole／心臓重量mg)。

【０１０４】

心臓筋細胞アポトーシス

アポトーシス心臓筋細胞を、パラフィン包埋心臓切片において、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ介在ｄＵＴＰニック末端標識(TUNEL)アッセイおよび開裂カスパーゼー３染色を使用して検出する。TUNELアッセイを、製造者の指示に従ってアッセイキット(Millipore Corporation, Temecula, CA)を使用して行う。筋細胞からの細胞質および核をα－筋節アクチン抗体およびＤＡＰＩを各々使用して対比染色する。開裂カスパーゼー３染色について、脱パラフィン化切片を、マイクロ波処理(microwaving)による０．０１Ｍクエン酸緩衝液(ｐＨ６．０)中の抗原回収に付す。５％ＢＳＡで遮断後、切片をウサギモノクローナル抗開裂カスパーゼー３抗体(１：２００；Cell Signaling Technology, Danvers, MA)と、一晩、４℃で、続いてフルオレッセインイソチオシアネートー接合ヤギ抗ウサギＩｇＧ(１：２００；Molecular Probes)とインキュベートする。陽性に染色された核の数を２０視野／心臓および３心臓／処置群から計測する。

【０１０５】

アポトーシス細胞の定量は、TUNELアッセイおよびカスパーゼー３染色の両方で、対照と比較して糖尿病心臓で３倍の増加を示す。インスリンでの血中グルコースの正常化または３種の異なる阻害剤でのＲＡＳの遮断はアポトーシス細胞の数を減らすが、アポトーシスを完全には防止しない。

【表４】

	カスパーゼ－３染色			TUNELアッセイ	
	(陽性細胞／mm^2)				
	平均	ＳＥ		平均	ＳＥ
対照	７	０．１６		８．５	０．３４
糖尿病					
処置せず	２８	０．３５		３３	０．７
インスリン	１４	０．１８		２０	０．２１
アリスキレン	１８	０．４８		２１．３	０．８３
カンデサルタン	１８．５	０．４２		２４	０．３４
ベナゼプリル	２１	０．２８		２７	０．６

【０１０６】
心臓における活性酸素種(ＲＯＳ)検出
心臓におけるスーパーオキサイド産生を、ジヒドロエチジウム染色(ＤＨＥ、Sigma-Aldrich)により検出する。凍結心臓切片(２０μm厚)を１０μＭ　ＤＨＥと、３７℃で４５分間、光から保護された加湿チャンバー内でインキュベートする。Olympus FV300共焦点顕微鏡で得た蛍光画像をSlide Book 4.2で分析する。筋細胞核の平均DHE蛍光強度は、同一のレーザーと光電子増倍管設定で観察される１５個の無作為に選ばれた視野における、ピクセルの総数によってピクセルの合わせた蛍光値を割ることによって計算する。糖尿病心臓は、対照動物と比較して増強されたスーパーオキサイド産生を示し、これはインスリン処置動物において防止される。糖尿病ラットのカンデサルタンまたはベナゼプリルでの処置は酸化的ストレスを減らすが、一方アリスキレンはそれを完全に遮断する。
【表５】

ＤＨＥ蛍光		
(任意単位)		
	平均	ＳＥ
対照	１７．６５	０．５
糖尿病		
処置せず	６８．６	１．９
インスリン	２６．７	２
アリスキレン	２２．７	０．３５
カンデサルタン	３７．７	１．３
ベナゼプリル	５１．４	１．９

【０１０７】
心臓線維症
心臓間質性線維症は、５μmパラフィン包埋切片上のMassonのトリクローム染色により検定する。線維症の広がりおよび程度は０－４のスケールで評価される。グレード０は、毛細血管周囲の線維性組織の小島およびコラーゲン状組織の細胞間単層以外、正常心筋のようにコラーゲン線維増殖がないことを意味する。限局的および極小線維症が１として評価され、軽いパッチ状線維症がグレード２として、中程度の散在性線維症がグレード３として評価し、そして切片の大部分を覆う最も顕著な線維症を４として評価する。最低心臓あたり３切片、切片あたり５視野、および実験群あたり３匹の動物を分析して、結果を平均グレードとして示す。

【０１０８】
糖尿病経過１週間で、線維症に対する全体的染色は、対照動物(グレード０)と比較して、糖尿病ラットの心臓で増強される(グレード１.５)。インスリン処置は線維症の増加を完全に防止する(グレード０.０４)。糖尿病ラット心臓において、カンデサルタンおよびベナゼプリルは線維症の程度を減少させ(各々グレード０.４３および０.８８)、一方アリスキレンは線維症をより明白に低下させる(グレード０.２５)。

【０１０９】

統計学的解析

値を平均±ＳＥとして表す。テューキーのpost hoc検定を伴うＡＮＯＶＡを統計学的解析に使用した。Ｐ＜０.０５を統計学的有意と見なす。

【０１１０】
上記は、好ましい態様を含み、本発明を完全に開示する。ここに具体的に開示の態様の修飾および改善は、添付の特許請求の範囲の範囲内である。さらなる困難を要せず、当業者は、前述の記載を使用して、本発明を完全に実施できるはずである。

【０１１１】
上記の結果は、アリスキレンのようなレニン阻害剤が、単独で、または他の活性剤との組合せのいずれかで、糖尿病性心筋症の処置に有用であることを証明する。

フロントページの続き

(74)代理人　100156144
弁理士　落合　康
(72)発明者　ケネス・ベーカー
アメリカ合衆国７６５３４テキサス州ホラント、サリバン・ロード１３７４１番
(72)発明者　ラジェシュ・クマール
アメリカ合衆国７６５０２テキサス州テンプル、キングズベリー・ドライブ２５１１番
(72)発明者　ヴィヴェク・シン
アメリカ合衆国７６５０４テキサス州テンプル、アパートメント１０１０、サウス・フライヤーズ・クリーク・サークル４０４番

Ｆターム(参考)　4C084 AA17 NA14 ZA362 ZA372 ZC022 ZC202 ZC351
4C206 AA01 AA02 GA07 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA37 ZC02 ZC20
ZC35 ZC75

【外国語明細書】

USE OF ORGANIC COMPOUNDS

Field of the Invention

The invention relates to the use of a renin inhibitor, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, alone or in combination with one or more active ingredient, for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

Background of the Invention

The enzyme cascade of the renin-angiotensin system (RAS) comprises a series of biochemical events and, as it is well known, there are a variety of approaches for using regulatory intervention to open up treatment possibilities, for example treatment of hypertension. Pharmacological suppression of the RAS, through angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition and/or angiotensin receptor blockade, is a proven effective therapeutic approach for the treatment of a wide range of cardiovascular diseases (CVDs). Inhibitors of the enzymatic activity of renin bring about a reduction in the formation of angiotensin I. As a result a smaller amount of angiotensin II is produced. The reduced concentration of that active peptide hormone is the direct cause of, e.g., the antihypertensive effect of renin inhibitors. Accordingly, renin inhibitors, or salts thereof, may be employed, e.g., as antihypertensives or for treating congestive heart failure. Further evaluations may reveal that renin inhibitors may also be employed for a much broader range of therapeutic indications.

As described by Hayat et al (Clinical Science 2004, 1007, 539), diabetic patients have an increased risk of developing heart failure, which is a distinct disease process named diabetic cardiomyopathy. The development of cardiomyopathy represents thus a major complication in patients with diabetes mellitus. There is a need to provide drugs to prevent or delay diabetic cardiomyopathy in diabetic patients. Surprisingly, the present inventors have found that renin inhibitors, such as aliskiren, either alone or in combination, can have a beneficial effect in the treatment of diabetic cardiomyopathy. The present invention provides thus a therapeutic approach for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

Summary of the Invention

In one aspect, the present invention relates to the use of a renin inhibitor, for example aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, either alone or in combination with one or more active ingredient, such as, for instance, ACEIs, angiotensin II receptor antagonists, beta blockers, type 2 diabetes therapeutic agents such as a TZDs (thiazolidinediones), type 1 diabetes therapeutic agents such as insulin, or in each case independently a salt thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

In one embodiment, the present invention relates to the use of a renin inhibitor, for example aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, alone for the treatment of diabetic cardiomyopathy. Thus, in one embodiment the renin inhibitor, for example aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, is administered as monotherapy for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

In another aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of diabetic cardiomyopathy, which comprises a renin inhibitor, for example aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, either alone or in combination with one or more active ingredient, such as, for example, ACEIs, angiotensin II receptor antagonists, beta blockers, type 2 diabetes therapeutic agents such TZDs, type 1 diabetes therapeutic agents such as insulin, or in each case independently a salt thereof.

In still another embodiment, the present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of diabetic cardiomyopathy, which comprises a renin inhibitor, for example aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, without any further active ingredient. Thus, in one embodiment the renin inhibitor, for example aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, is administered as monotherapy for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

In a further embodiment, the present invention relates to a pharmaceutical composition for simultaneous, separate or sequential use for the treatment of diabetic cardiomyopathy, comprising a renin inhibitor, for example aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with one or more active ingredient e.g. selected from the group consisting of ACE inhibitors, angiotensin II receptor antagonists, beta-blockers, type 2 diabetes therapeutic agents such as TZDs, and type 1 diabetes therapeutic agents such as insulin, or in each case independently a salt thereof, in each case in a unit dosage form, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.

The invention furthermore relates to a method for the treatment of diabetic cardiomyopathy, which comprises administering to a warm-blooded animal, including human, a therapeutically effective amount of a renin inhibitor, for example aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, either alone or in combination with one or more active ingredient, such as, for example, ACEIs, beta blockers, angiotensin II receptor antagoniss, type 2 diabetes therapeutic agents such as TZDs, type 1 diabetes therapeutic agents such as insulin, or in each case independently a salt thereof.

Embodiments according to the invention

The renin inhibitors to which the present invention applies are any of those having renin inhibitory activity *in vivo* and, therefore, pharmaceutical utility, such as therapeutic agents for the prevention of, delay the onset of and/or treatment of e.g., hypertension (whether, for example, for malignant, essential, isolated systolic, or other secondary type of hypertension). Further indications for which renin inhibitors can be useful are described e.g. in WO2004/002549, WO2005/089731, WO2006/041763, WO2006/041974, WO2006/116435, WO2002/40007 and in PCT application No. 2007/065564.

For example, the present invention relates to renin inhibitors selected from the group consisting of the renin inhibitors disclosed in:
U.S. Patents No. 5559111, 6197959, 6376672, 6051712, 6197959, 6268499 and 6274735; in US patent applications 2004/0204455, 2002/087002; in WO2003/099767, WO2005/054177, WO2005/051895, WO2005/051911, WO2006/066896, WO2006/069788, WO2006/074924, WO2006/094763, WO2006/100036, WO2006/0117183, WO2006/125621, WO2006/128659, WO2007/006534, WO2007/077005; in WO2003/093267, WO2004/002957, WO2004/096116, WO2004/096799, WO2004/096803, WO2004/096804, WO2005/040120, WO2005/040165, WO2005/040173, WO2005/054243, WO2005/054244, WO2006/021399, WO2006/021401, WO2006/021402, WO2006/021403, WO2006/058546, WO2006/059304, WO2006/061791, WO2006/063610, WO2006/064484, WO2006/079988, WO2006/092268, WO2006/129237, WO2006/131884, WO2007/034406, WO2007/034445, WO2007/049224, WO2003/103652, WO2003/103652, WO2007/045551, WO2004/089915, WO2000/63173, WO2000/64873, WO2000/64887, WO1997/09311, WO2005/037803, WO2005/061457, WO2005/070870, WO2005/070871,

WO2005/070877, WO2005/090304, WO2005/090305, WO2006/005741, WO2006/061426, WO2006/061427, WO2006/095020, WO2006/103273, WO2006/103275, WO2006/103277, WO2007/031557 and WO2007/031558; in PCT applications 2007/005130 and 2007/005131; in European patent application 07111290.8 and in European patent No. 0863875;
in particular in the compound claims and the final products of the working examples.

Renin inhibitors are selected, for example, from the group consisting of ditekiren, terlakiren, zankiren, aliskiren and salts thereof. In one embodiment, the renin inhibitor is aliskiren or a salt thereof, such as the hemi-fumarate, nitrate, hydrogen sulfate and orotate, in particular the hemi-fumarate salt thereof. Aliskiren in form of the free base is chemically defined as 2(*S*),4(*S*),5(*S*),7(*S*)-*N*-(3-amino-2,2-dimethyl-3-oxopropyl)-2,7-di(1-methylethyl)-4-hydroxy-5-amino-8-[4-methoxy-3-(3-methoxy-propoxy)phenyl]-octanamide and is specifically disclosed in EP 678503 A as Example 83.

In another embodiment, the present invention relates to the simultaneous, separate or sequential use of a renin inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof in combination with one or more active ingredient for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

In one embodiment, other active ingredients are selected from the group consisting of ACEIs, beta blockers, angiotensin II receptor antagonists, type 2 diabetes therapeutic agents such as TZD, and type 1 diabetes therapeutic agents such as insulin, or in each case independently a salt thereof.

In another embodiment, other active ingredients to be used in a combination with renin inhibitors, or salts thereof, are ACE inhibitors, or salts thereof.

Suitable ACEIs which may be employed according to the present invention include ACEIs having differing structural features, for example a member of the group consisting of alacepril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, trandolapril and salts thereof. In one embodiment, the ACE inhibitor is selected from the group consisting of benazepril, benazeprilat, captopril, enalapril, enaprilat and salts thereof; in another embodiment the ACE inhibitor is benazepril, benazeprilat or salts thereof.

In yet another embodiment, the present invention relates to the simultaneous, separate or sequential use of aliskiren, or a salt thereof, in combination with an ACEI, or salt thereof, such as alacepril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, trandolapril or salts thereof, in particular benazepril, benazeprilat, captopril, enalapril, enaprilat or salts thereof, particularly benazepril, benazeprilat or salts thereof.

In a still further embodiment, the present invention relates to the simultaneous, separate or sequential use of a renin inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof in combination with an angiotensin II receptor antagonist for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

Suitable angiotensin II receptor antagonists which may be employed according to the present invention include angiotensin II receptor antagonists having differing structural features. For example, mention may be made of the compounds which are listed in the European Patent Application having the No. 443983 and in the European Patent No. 1146872B1; in particular in the compound claims and the final products of the working examples, for example, (S)-N-(1-carboxy-2-methylprop-1-yl)-N-pentanoyl-N-[2'(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-ylmethyl]amine [Valsartan] and its pharmaceutically acceptable salts. Furthermore, reference is made to the compounds which are listed in: European Patent Application having the publication No. 253310, European Patent Application having the publication No. 403159, PCT Patent Application having the publication No. WO 91/14679, European Patent Application having the publication No. 420237, European Patent Application having the publication No. 502314, European Patent Application having the publication No. 459136, European Patent Application having the publication No. 504888, European Patent Application having the publication No. 514198, European Patent Application having the publication No. 475206, PCT Patent Application having the publication No. WO 1993/20816; in particular in the compound claims and the final products of the working examples therein. In one embodiment, the angiotensin II receptor antagonists selected from the group consisting of valsartan, losartan, eprosartan, irbesartan, telmisartan, candesartan, saprisartan, olmesartan and salts thereof, preferably valsartan, losartan, eprosartan, irbesartan, telmisartan, candesartan, saprisartan and salts thereof, in particular the angiotensin II receptor antagonists is valsartan or salt thereof.

In a particularl embodiment, the present invention relates to the simultaneous, separate or sequential use of aliskiren, or a salt thereof, in combination with an angiotensin II receptor antagonist, or a salt thereof, such as valsartan, losartan, eprosartan, irbesartan, telmisartan, candesartan, saprisartan or salts thereof, particularly valsartan or salt thereof.

In a yet further embodiment, the present invention relates to the simultaneous, separate or sequential use of a renin inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof in combination with a β-blocker for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

β-blockers suitable for use in the present invention include β-adrenergic blocking agents (β-blockers) which compete with epinephrine for β-adrenergic receptors and interfere with the action of epinephrine. In particular, the β-blockers are selective for the β-adrenergic receptor as compared to the alpha (α)-adrenergic receptors, and so do not have a significant α-blocking effect. Suitable β-blockers include, for example, compounds selected from acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carteolol, carvedilol, esmolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol and salts thereof, particularly atenolol, metoprolol, propranolol and salts thereof. In one embodiment,, β-blockers for use in the present invention are atenolol, metoprolol, propranolol and salts thereof.

In still another embodiment, the present invention relates to the simultaneous, separate or sequential use of a renin inhibitor (eg. aliskiren) or a pharmaceutically acceptable salt thereof in combination with a type 2 diabetes therapeutic agent, such as TZDs, for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

TZDs suitable for use in the present invention include, for example, compounds selected from thiazolidinediones (TZDs), including troglitazone, rosiglitazone, ciglitazone; darglitazone; englitazone; isaglitazone, pioglitazone, and salts thereof. In one embodiment, the TZD is selected from troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, and salts thereof.

In still another embodiment, the present invention relates to the simultaneous, separate or sequential use of a renin inhibitor (eg. aliskiren) or a pharmaceutically

acceptable salt thereof in combination with a type 1 diabetes agent, such as insulin, or salt thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

In a further embodiment, the present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of diabetic cardiomyopathy comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with an ACE inhibitor or salt thereof. ACEIs of this embodiment are selected, for example, from the group of ACEIs above mentioned; the ACEI is, for example, benazepril or salt thereof.

In a still further embodiment, the present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of diabetic cardiomyopathy comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with an angiotensin II receptor antagonist or salt thereof. Angiotensin II receptor antagonists of this embodiment are selected, for example, from the group of angiotensin II receptor antagonists above mentioned; the angiotensin II receptor antagonist is for example, valsartan or salt thereof.

In a yet further embodiment, the present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of diabetic cardiomyopathy comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with a β-blocker or salt thereof. β-blockers of this embodiment are selected, for example, from the group of β-blockers above mentioned.

In a even further embodiment, the present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of diabetic cardiomyopathy comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with a type 2 diabetes therapeutic agent, such as TZD, or salt thereof. TZDs of this embodiment are selected, for example, from the group of TZDs above mentioned.

In yet a further embodiment, the present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of diabetic cardiomyopathy comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with a type 1 diabetes therapeutic agent, such as insulin, or salt thereof.

In yet another embodiment, the present invention relates to a method for treatment of diabetic cardiomyopathy, which method comprises administering to a warm-blooded

animal, including man, in need thereof, a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with an ACEI, or salt thereof. ACEIs of this embodiment are selected, for example, from the group of ACEIs above mentioned; the ACEI is, for example, benazepril or salt thereof.

In another embodiment, the present invention relates to a method for treatment of diabetic cardiomyopathy, which method comprises administering to a warm-blooded animal, including man, in need thereof, a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with an angiotensin II receptor antagonist, or a salt thereof. Angiotensin II receptor antagonists of this embodiment are selected, for example, from the group of angiotensin II receptor antagonists above mentioned; the angiotensin II receptor antagonist is, for example, valsartan or salt thereof.

In still another embodiment, the present invention relates to a method for treatment of diabetic cardiomyopathy, which method comprises administering to a warm-blooded animal, including man, in need thereof, a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with a β-blocker, or salt thereof. β-blockers of this embodiment are selected, for example, from the group of β-blockers above mentioned.

In yet another embodiment, the present invention relates to a method for treatment of diabetic cardiomyopathy, which method comprises administering to a warm-blooded animal, including man, in need thereof, a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with a type 2 diabetes therapeutic agent, such as TZD, or salt thereof. TZDs of this embodiment are selected, for example, from the group of TZDs above mentioned.

In yet another embodiment, the present invention relates to a method for treatment of diabetic cardiomyopathy, which method comprises administering to a warm-blooded animal, including man, in need thereof, a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a renin inhibitor, such as aliskiren, or a

pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination with a type 1 diabetes therapeutic agent, such as insulin, or salt thereof.

Listed below are definitions of various terms used throughout the specification:

The term "aliskiren", if not defined specifically, is to be understood both as the free base and as a salt thereof, especially the hemi-fumarate, nitrate, hydrogen sulfate and orotate salt thereof, in particular the hemi-fumarate salt thereof.

The term "valsartan", if not defined specifically, is to be understood both as the free base and as a salt thereof, especially a pharmaceutically acceptable salt thereof, as described below.

Valsartan , or a pharmaceutically acceptable salt thereof, can, e.g., be prepared in a manner known *per se*. Salts forms include acid addition salts. The compounds having at least one acid group (e.g., COOH or 5-tetrazolyl) can also form salts with bases. Suitable salts with bases are, e.g., metal salts, such as alkali metal or alkaline earth metal salts, e.g., sodium, potassium, calcium or magnesium salts, or salts with ammonia or an organic amine, such as morpholine, thiomorpholine, piperidine, pyrrolidine, a mono-, di- or tri-lower alkylamine, e.g., ethyl-, tert-butyl-, diethyl-, diisopropyl-, triethyl-, tributyl- or dimethylpropylamine, or a mono-, di- or trihydroxy lower alkylamine, e.g., mono-, di- or tri-ethanolamine. Corresponding internal salts may furthermore be formed. Salts which are unsuitable for pharmaceutical uses but which can be employed, e.g., for the isolation or purification of free compounds I or their pharmaceutically acceptable salts, are also included. In one embodiment, salts are, e.g., selected from the mono-sodium salt in amorphous form; di-sodium salt of Valsartan in amorphous or crystalline form, especially in hydrate form, thereof. Mono-potassium salt of Valsartan in amorphous form; di-potassium salt of Valsartan in amorphous or crystalline form, especially in hydrate form, thereof.
Calcium salt of Valsartan in crystalline form, especially in hydrate form, primarily the tetrahydrate thereof; magnesium salt of Valsartan in crystalline form, especially in hydrate form, primarily the hexahydrate thereof; calcium/magnesium mixed salt of Valsartan in crystalline form, especially in hydrate form; *bis*-diethylammonium salt of Valsartan in crystalline form, especially in hydrate form; *bis*-dipropylammonium salt of Valsartan in crystalline form, especially in hydrate form; *bis*-dibutylammonium salt of Valsartan in crystalline form, especially in hydrate form, primarily the hemihydrate

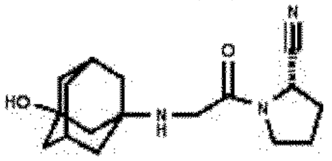
thereof; mono-*L*-arginine salt of Valsartan in amorphous form; *bis*-*L*-arginine salt of Valsartan in amorphous form; mono-*L*-lysine salt of Valsartan in amorphous form; *bis*-*L*-lysine salt of Valsartan in amorphous form.

In one embodiment, Valsartan is used as the free acid.

Where the β-blocker is an acid or base or otherwise capable of forming pharmaceutically acceptable salts or prodrugs, these forms are considered to be encompassed herein, and it is understood that the compounds may be administered in free form or in the form of a pharmaceutically acceptable salt or a prodrug, such as a physiologically hydrolizable and acceptable ester. For example, metoprolol is suitably administered as its tartrate salt, propranolol is suitably administered as the hydrochloride salt, and so forth.

Type 2 and type 1 diabetes therapeutic agents refer to anti-diabetic agents and include, for example, insulin, insulin derivatives and mimetics; insulin secretagogues such as the sulfonylureas e.g. glisoxepid, glyburide, glibenclamide, acetohexamide, chloropropamide, glibornuride, tolbutamide, tolazamide, glipizide, carbutamide, gliquidone, glyhexamide, phenbutamide or tolcyclamide; and preferably glimepiride, gliclazide, and Amaryl; insulinotropic sulfonylurea receptor ligands such as meglitinides, e.g., nateglinide and repaglinide; antidiabetic D-phenylalanine derivative; thiazolidinedione derivatives such as glitazones, e.g., pioglitazone, troglitazone or rosiglitazone, in particular pioglitazone or rosiglitazone; glucokinase activators; protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) inhibitors such as PTP-112; agonists of Beta-3 AR (adrenergic receptor), agonists of UCP (uncoupling protein), inhibitors of PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), PDHK (pyruvate dehydrogenase kinase) inhibitors, GSK3 (glycogen synthase kinase-3) inhibitors such as SB-517955, SB-4195052, SB-216763, NN-57-05441 and NN-57-05445; inhibitors of GFAT (glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase), inhibitors of G6Pase (glucose-6-phosphatase), inhibitors of F-1,6-BPase (fructose-1,6-bisphosphatase), inhibitors of GP (glycoprotein), RXR (retinoid X receptor) ligands or agonists such as GW-0791 and AGN-194204; sodium-dependent glucose co-transporter inhibitors such as T-1095; glycogen phosphorylase A inhibitors such as BAY R3401; aldose reductase inhibitors; sorbitol dehydrogenase inhibitors;

biguanides such as metformin; alpha-glucosidase inhibitors such as acarbose, adiposine, voglibose, miglitol, emiglitate, camiglibose, tendamistate, trestatin, pradimicin-Q and salbostatin; glucagon receptor antagonists, inhibitors of GSK-3, GLP-1 (glucagon like peptide-1), GLP-1 analogs such as Exendin-4 and GLP-1 mimetics; GLP-1 agonists; modulators of PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), e.g., non-glitazone type PPARγ agonists such as *N*-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosine analogues, e.g. GI-262570, and JTT501 or dual PPARγ/PPARα agonists; antidiabetic vanadium; antidiabetic phenylacetic acid derivative, β-cell imidazoline receptor antagonists, Estrogen-related receptor gamma (ERRγ) agonist e.g. GSK4716 or GSK9089; agonists or antagonists of the estrogen-related receptors (ERR) e.g. of the ERRα, ERRβ, and ERRγ receptors; DPPIV (dipeptidyl peptidase IV) inhibitors such as (S)-1-[(3-hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl-2-cyano-pyrrolidine (also known as LAF237 or vildagliptin) of formula



and L-threo-isoleucyl thiazolidine (compound code according to Probiodrug: P32/98 as described above), Sitagliptin (also known as MK-0431), (2S)-1-{(2-(5-Methyl-2-phenyl-oxazol-4-yl)-ethylamino)-acetyl}-pyrrolidine-2-carbonitrile, or (2S)-1-{(1,1-Dimethyl-3-(4-pyridin-3-yl-imidazol-1-yl)-propylamino)-acetyl}-pyrrolidine-2-carbonitrile, (S)-1-((2S,3S,11bS)-2-Amino-9,10-dimethoxy-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrido (2,1-a) isoquinolin-3-yl)-4-fluoromethyl-pyrrolidin-2-one, or (S,S,S,S)-1-(2-Amino-9,10-dimethoxy-1,3,4,6,7,11 11b-hexahydro-2H-pyrido (2,1-a) isoquinolin-3-yl)-4-methyl-pyrrolidin-2-one, GSK23A, saxagliptin, 3-(aminomethyl)-2-isobuthyl-1-oxo-4-phenyl-1,2-dihydro-6-isoquinolinecarboxamide and 2-{[3-(aminomethyl)-2-isobuthyl-4-phenyl-1-oxo-1,2-dihydro-6-isoquinolyl]oxy}acetamide; SCD-1 (stearoyl-CoA desaturase-1) inhibitors; DGAT1 and DGAT2 (diacylglycerol acyltransferase 1 and 2) inhibitors; ACC2 (acetyl CoA carboxylase 2) inhibitors; inhibitors of protein tyrosine phosphatases (PTPases), in particular, inhibitors of PTPase-1B (PTP-1B) and T-cell PTPase (TC PTP), inhibitors of gastric emptying, and breakers of AGE (advanced glycation end products), or in any case a pharmaceutically accepted salt thereof.

Where the type 2 diabetes therapeutic agent, such as a TZD (thiazolidinedione), is an acid or base or otherwise capable of forming pharmaceutically acceptable salts or prodrugs, these forms are considered to be encompassed herein, and it is understood that the compounds may be administered in free form or in the form of a pharmaceutically acceptable salt or a prodrug, such as a physiologically hydrolizable and acceptable ester.

Salts are especially the pharmaceutically acceptable salts. They can be formed where salt forming groups, such as basic or acidic groups, are present that can exist in dissociated form at least partially, e.g. in a pH range from 4 to 10 in aqueous solutions, or can be isolated especially in solid, especially crystalline, form. Such salts are formed, for example, as acid addition salts, for example with organic or inorganic acids, from compounds with a basic nitrogen atom (e.g. imino or amino), especially the pharmaceutically acceptable salts. Suitable inorganic acids are, for example, halogen acids, such as hydrochloric acid, sulfuric acid, or phosphoric acid. Suitable organic acids are, for example, carboxylic, phosphonic, sulfonic or sulfamic acids, for example acetic acid, propionic acid, lactic acid, fumaric acid, succinic acid, citric acid, amino acids, such as glutamic acid or aspartic acid, maleic acid, hydroxymaleic acid, methylmaleic acid, benzoic acid, methane- or ethane-sulfonic acid, ethane-1,2-disulfonic acid, benzenesulfonic acid, 2-naphthalenesulfonic acid, 1,5-naphthalene-disulfonic acid, N-cyclohexylsulfamic acid, N-methyl-, N-ethyl- or N-propyl-sulfamic acid, or other organic protonic acids, such as ascorbic acid. In the presence of negatively charged radicals, such as carboxy or sulfonyl, salts may also be formed with bases, e.g. metal or ammonium salts, such as alkali metal or alkaline earth metal salts, for example sodium, potassium, magnesium or calcium salts, or ammonium salts with ammonia or suitable organic amines, such as tertiary monoamines, for example triethylamine or tri(2-hydroxyethyl)amine, or heterocyclic bases, for example N-ethyl-piperidine or N,N'-dimethylpiperazine. When a basic group and an acid group are present in the same molecule, a compound may also form internal salts.

The active agents may be present in prodrug form. The invention includes prodrugs for the active pharmaceutical species of the invention, for example in which one or more functional groups are protected or derivatised but can be converted *in vivo* to the functional group, as in the case of esters of carboxylic acids convertible *in vivo* to

the free acid, or in the case of protected amines, to the free amino group. The term "prodrug," as used herein, represents in particular compounds which are rapidly transformed *in vivo* to the parent compound, for example, by hydrolysis in blood. A thorough discussion is provided in T. Higuchi and V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987; H Bundgaard, ed, Design of Prodrugs, Elsevier, 1985; and Judkins, et al. Synthetic Communications, 26(23), 4351-4367 (1996), each of which is incorporated herein by reference.

Prodrugs therefore include drugs having a functional group which has been transformed into a reversible derivative thereof. Typically, such prodrugs are transformed to the active drug by hydrolysis. As examples may be mentioned the following:

Functional Group	***Reversible derivative***
Carboxylic acid	*Esters, including e.g. acyloxyalkyl esters, amides*
Alcohol	*Esters, including e.g. sulfates and phosphates as well as carboxylic acid esters*
Amine	*Amides, carbamates, imines, enamines,*
Carbonyl (aldehyde, ketone)	*Imines, oximes, acetals/ketals, enol esters, oxazolidines and thiazoxolidines*

Prodrugs also include compounds convertible to the active drug by an oxidative or reductive reaction. As examples may be mentioned:

Oxidative activation

- N- and O- dealkylation
- Oxidative deamination
- N-oxidation
- Epoxidation

Reductive activation

- Azo reduction
- Sulfoxide reduction
- Disulfide reduction
- Bioreductive alkylation
- Nitro reduction.

Also to be mentioned as metabolic activations of prodrugs are nucleotide activation, phosphorylation activation and decarboxylation activation. For additional information, see "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action", R B Silverman (particularly Chapter 8, pages 497 to 546).

Although protected derivatives of compounds of the invention may not possess pharmacological activity as such, they may be administered, for example parenterally or orally, and thereafter metabolised in the body to form compounds of the invention which are pharmacologically active. Such derivatives are therefore examples of "prodrugs". All prodrugs of the described compounds are included within the scope

of the invention. The use of protecting groups is fully described in `Protective Groups in Organic Chemistry`, edited by J W F McOmie, Plenum Press (1973), and `Protective Groups in Organic Synthesis`, 2nd edition, T W Greene & P G M Wutz, Wiley-Interscience (1991).

Where the plural form is used for compounds, salts, pharmaceutical compositions, diseases, disorders and the like, this is intended to mean one or more single compound(s), salt(s), pharmaceutical composition(s), disease(s), disorder(s) or the like, where the singular or the indefinite article ("a", "an") is used, this is intended to include the plural (for example also different configuration isomers of the same compound, e.g. enantiomers in racemates or the like) or the singular ("one").

The terms "effective amount" or "therapeutically effective amount" refers to the amount of the active ingredient or agent which halts or reduces the progress of diabetic cardiomyopathy, or which otherwise completely or partly cures or acts palliatively on the condition.

The term "prophylactically effective amount" refers to the amount of the active ingredient or agent prevents the onset of diabetic cardiomyopathy.

The terms "drug", "active substance", "active ingredient", "active agent" are to be understood as meaning a compound in free form or in the form of a pharmaceutically acceptable salt, in particular compounds of the type specified herein.

The term "warm-blooded animal or patient" are used interchangeably herein and include, but are not limited to, humans, dogs, cats, horses, pigs, cows, monkeys, rabbits, mice and laboratory animals. In one embodiment, the mammals are humans.

The term "treatment" means the management and care of a patient for the purpose of preventing, combating or delaying progression of the disease, condition or disorder, preferably for the purpose of combating the disease, condition or disorder, and in particular it also prophylactic treatment.

The terms "prevention"/"preventing" are to be understood as meaning the prophylactic administration of a drug, such as a combined preparation or pharmaceutical composition, to healthy patients to prevent the outbreak of the disease, condition or disorder.

The terms "delay of progression"/"delaying progression" are to be understood as meaning the administration of a drug, such as a combined preparation or pharmaceutical composition, to patients being in a pre-stage of the disease, condition or disorder.

The term "diabetes" embraces both type 1 and type 2 diabetes. The term "type 1 diabetes" refers to insulin dependent diabetes mellitus (IDDM), which is a chronic autoimmune disease in which insulin-producing cells (P cells) within the pancreatic islets of Langerhan are selectively targeted and destroyed by an infiltrate of immunological cells. IDDM is characterized by a progressive loss of pancreatic beta cells due to an unfavorable balance between the destructive autoimmune processes targeting beta cells on the one hand and the regenerative capacity of these cells on the other hand. This imbalance eventually leads to total loss of beta cells and endogenous insulin secretion. The term "type 2 diabetes" means type 2 diabetes mellitus and it is a disease in which the pancreas does not secrete sufficient insulin due to an impairment of pancreatic beta (ß)-cell function and/or in which there is insensitivity to produce insulin (insulin resistance). Typically, the fasting plasma glucose is less than 126 mg/dL, while pre-diabetes is, e.g., a condition which is characterized by one of following conditions: impaired fasting glucose (110-125 mg/dL) and impaired glucose tolerance (fasting glucose levels less than 126 mg/dL and post-prandial glucose level between 140 mg/dL and 199 mg/dL). Type 2 diabetes mellitus can be associated with or without hypertension. Diabetes mellitus occurs frequently, e.g., in African American, Latino/Hispanic American, Native American, Native American, Asian American and Pacific Islanders. Markers of insulin resistance include HbA1C, HOMA IR, measuring collagen fragments, TGF-ß in urine, PAI-1 and prorenin.

Diabetic patients have an increased risk of developing heart failure, which is a distinct disease process named "diabetic cardiomyopathy". The term "diabetic cardiomyopathy" (as defined by Hayat et al in Clinical Science 2004, 1007, 539) is a disease process which affects the myocardium in diabetic patients causing a wide range of structural abnormalities eventually leading to LVH [left ventricular hypertrophy] and diastolic and systolic dysfunction or a combination of these. Diabetic cardiomyopathy is characterized by myocellular hypertrophy and myocardial fibrosis (Bell, *Diabetes Care*, 2003, 26, 2433). As described by Scognamiglio (The American Journal of Cardiology, 2004, 93, 17A), diabetic cardiomaopathy is a condition characterized by defects of the contractile function in the absence of significant coronary artery disease or systemic hypertension. As pointed out by Bell (Diabetes Care, 2003, 26, 2433), the epidemiology of heart failure (HF) in diabetic patients can be summarized as follows:
1) HF is two times as common in diabetic men and five times as common in diabetic women as in age-matched non-diabetic subjects.
2) About 3.3% of type 2 diabetic subjects develop HF each year.
3) Elderly diabetic subjects have a 1.3-fold greater risk of developing HF than nondiabetic subjects.
4) Prevalence of HF in elderly diabetic subjects is 39%.
5) 1% rise in HbA1c is associated with a 15% increased risk of HF in elderly diabetic patients.
6) Diabetic patients account for 25% of all patients enrolled in large HF trials.

The structure of the active agents identified by generic or tradenames or code numbers may be taken from the actual edition of the standard compendium "The Merck Index" or from databases, e.g., Life Cycle Patents International (e.g. IMS World Publications). Any person skilled in the art is fully enabled to identify the active agents and, based on these references, likewise enabled to manufacture and test the pharmaceutical indications and properties in standard test models, both *in vitro* and *in vivo*.

The pharmaceutical compositions according to the invention are those suitable for enteral, such as oral or rectal, transdermal and parenteral administration to mammals, including man, with the compositions comprising the pharmacological active compound either alone or together with customary pharmaceutical auxiliary substances. For example, the pharmaceutical compositions consist of from about

0.1 % to 100 %, such as of from about 1 % to about 80 %, of the active compound. Pharmaceutical compositions for enteral or parenteral administration are, for example, in unit dose forms, such as coated tablets, tablets, capsules or suppositories and also ampoules. These are prepared in a manner which is known per se, for example using conventional mixing, granulation, coating, solubulizing or lyophilizing processes. Thus, pharmaceutical compositions for oral use can be obtained by combining the active compound with solid excipients, if desired granulating a mixture which has been obtained, and, if required or necessary, processing the mixture or granulate into tablets or coated tablet cores after having added suitable auxiliary substances. For oral administration, the pharmaceutical composition comprising a renin inhibitor, in particular, aliskiren, for example in the form of the hemi-fumarate salt thereof, and optionally at least one therapeutic agent selected from the group consisting of an ACE inhibitor, an angiotensin II receptor antagonist, a beta-blocker, a type 2 diabetes therapeutic agent, such as a TZD, a type 1 diabetes therapeutic agent, such as insulin, and pharmaceutically acceptable salts thereof, can take the form, for example, of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, powders, microemulsions and unit dose packets. In one embodiment, the pharmaceutical composition is in the form of tablets or gelatin capsules comprising the active ingredient together with: a) diluents, e.g., lactose, dextrose, sucrose, mannitol, sorbitol, cellulose and/or glycine; b) lubricants, e.g., silica, talcum, stearic acid, its magnesium or calcium salt and/or polyethyleneglycol; for tablets also c) binders, e.g., magnesium aluminum silicate, starch paste, gelatin, tragacanth, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose and or polyvinylpyrrolidone; if desired d) disintegrants, e.g., starches, agar, alginic acid or its sodium salt, or effervescent mixtures; and/or e) absorbants, colorants, flavors and sweeteners. Injectable compositions are, for example, aqueous isotonic solutions or suspensions, and suppositories are advantageously prepared from fatty emulsions or suspensions.

Said compositions may be sterilized and/or contain adjuvants, such as preserving, stabilizing, wetting or emulsifying agents, solution promoters, salts for regulating the osmotic pressure and/or buffers.

The dosage of the active compound can depend on a variety of factors, such as mode of administration, homeothermic species, age and/or individual condition. In particular, dosages for pharmaceutical combinations are therapeutically effective dosages, especially those which are commerically available. In one embodiment, the doses are low dose combinations.

Normally, in the case of oral administration, an approximate daily dose of from 1 mg to about 360 mg is to be estimated, e.g., for a patient of approximately 75 kg in weight.

Usually, children receive about half of the adult dose or they can receive the same dose as adults. The dose necessary for each individual can be monitored, e.g., by measuring the serum concentration of the active ingredient, and adjusted to an optimum level. All doses are based on the active agent, i.e. for aliskiren, the doses are based on the free base.

The doses of renin inhibitor, for example aliskiren, to be administered to warm-blooded animals, for example human beings, of, for example, approximately 70 kg body weight, especially the doses effective for the inhibition of the enzyme renin, e.g. in lowering blood pressure, may be of from 3 mg to 3 g, such as of from 10 mg to 1 g, for example of from 20 mg to 600 mg (e.g. 150 mg to 300 mg), per person per day, divided, for example, into 1 to 4 single doses which may, e.g., be of the same size. Single doses, of for example aliskiren, comprise, for example, 75, 100, 150, 200, 250, 300 or 600 mg per adult patient.

In one embodiment, dosage unit forms of angiotensin II receptor antagonist may be, for example, tablets or capsules comprising e.g. a therapeutically effective amount, e.g. of from 10 to about 360 mg of, for example, valsartan, in particular 40 mg, 80 mg, 160 mg or 320 mg. The application of the active ingredient may occur up to three times a day, starting e.g. with a daily dose of 20 mg or 40 mg of, for example, valsartan, increasing via 80 mg daily and further to 160 mg daily up to 320 mg daily. In one embodiment, valsartan is applied twice a day with a dose of 80 mg or 160 mg, respectively, each. Corresponding doses may be taken, for example, in the morning, at mid-day or in the evening. In one embodiment, administration is b.i.d.

Dosage unit forms of ACE inhibitors are, for example, tablets or capsules comprising e.g. of from 5 mg to 20 mg, such as 5 mg, 10 mg or 20 mg of, for example, benazepril; of from 6.5 mg to 100 mg, such as 6.25 mg, 12.5 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg or 100 mg of, for example, captopril; of from 2.5 mg to 20 mg, such as 2.5 mg, 5 mg, 10 mg or 20 mg of, for example, enalapril; of from 10 mg to 20 mg, such as 10 mg or 20 mg of, for example, fosinopril; of from 2.5 mg to 4 mg, such as 2 mg or 4 mg of, for example, perindopril; of from 5 mg to 20 mg, such as 5 mg, 10 mg or 20 mg of, for example, quinapril; or of from 1.25 mg to 5 mg, such as 1.25 mg, 2.5 mg, or 5 mg of, for example, ramipril. In one embodiment, administration is t.i.d..

Suitable daily dosages of β-blockers (for adults) for oral administration are, for example: of from 200 to 1200 mg of, for example, acebutolol; of from 25 to 100 mg of, for example, atenolol; of from 10 to 20 mg of, for example, betaxolol; of from 5 to 10 mg of, for example, bisoprolol; of from 2.5 to 10 mg of, for example, carteolol; of from 100 to 1,800 mg of, for example, labetalol; of from 50 to 450 mg of, for example, metoprolol; of from 40 to 240 mg of, for example, nadolol; of from 60 to 480 mg of, for example, oxprenolol; of from 20 to 80 mg of, for example, penbutolol; of from 10 to 60 mg of, for example pindolol; of from 40 to 320 mg or of from 60 to 320 mg (for long-acting formulation) of, for example, propranolol; of from 160 to 320 mg of, for example, sotalol; of from 20 to 60 mg of, for example, timolol.

Suitable daily dosages of a type 2 diabetes therapeutic agent, such as a TZD, for oral administration are, for example: of from 0.001 mg/kg to about 100 mg/kg, such as of from 0.01 mg to 2000 mg per day. e.g. 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 500, 750, 850, 1,000 and 2,000 milligrams.

Ultimately, the exact dose of the active agent and the particular formulation to be administered depend on a number of factors, e.g., the rate of release of the active agent. For example, the amount of the active agent required and the release rate thereof may be determined on the basis of known *in vitro* or *in vivo* techniques, determining how long a particular active agent concentration in the blood plasma remains at an acceptable level for a therapeutic effect.

In particular, for those active ingredients of the pharmaceutical combination according to the present invention that are commercially available, are especially therapeutically effective commercially available dosages.

For the larger mammals, an indicated total daily dosage is in the range from about 0.01 to 100mg/kg of the compound, conveniently administered in divided doses 1 to 4 times a day in unit dosage form containing for example from about 0.1 to about 400 mg of the compound in sustained release form.

Since the present invention has an aspect that relates to methods for treatment with a combination of compounds which may be administered separately, the invention also relates to combining separate pharmaceutical compositions in a kit form. The kit

may comprise, e.g., two or three separate pharmaceutical compositions: (1) a composition comprising a renin inhibitor, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent and (2) at least one therapeutic agent selected from the group consisting of an ACE inhibitor, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, an angiotensin II receptor antagonist, e.g., valsartan or a pharmaceutically acceptable salt thereof, a beta blocker or a pharmaceutically acceptable salt thereof, a type 2 diabetes therapeutic agent, such as a TZD, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, a type 1 diabetes therapeutic agent, such as insulin, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. The amounts of (1) and (2) are such that, when co-administered separately a beneficial therapeutic effect(s) is achieved. The kit comprises a container for containing the separate compositions such as a divided bottle or a divided foil packet, wherein each compartment contains a plurality of dosage forms (e.g., tablets) comprising, e.g., (1) or (2). Alternatively, rather than separating the active ingredient-containing dosage forms, the kit may contain separate compartments each of which contains a whole dosage which in turn comprises separate dosage forms. An example of this type of kit is a blister pack wherein each individual blister contains two or three (or more) tablets, one (or more) tablet(s) comprising a pharmaceutical composition (1), and the second (or more) tablet(s) comprising a pharmaceutical composition (2). Typically the kit comprises directions for the administration of the separate components. The kit form is particularly advantageous when the separate components are administered in different dosage forms (e.g., oral and parenteral), are administered at different dosage intervals, or when titration of the individual components of the combination is desired by the prescribing physician. In the case of the instant invention a kit may, e.g., comprise:

(1) a therapeutically effective amount of a composition comprising a renin inhibitor, in particular, aliskiren, for example in the form of the hemi-fumarate salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent, in a first dosage form, and
(2) at least one therapeutic agent selected from the group consisting of an ACE inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof, an angiotensin II receptor antagonist (e.g., valsartan) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, a beta blocker or a pharmaceutically acceptable salt thereof, a type 2 diabetes therapeutic agent, such as a TZD, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, a type 1 diabetes therapeutic agent, such as insulin, or a pharmaceutically acceptable salt

thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent, in a second dosage form, and
(3) a container for containing said first and second and dosage forms.

As described by Bell (Diabetes Care, 2003, 26, 2433), diabetic cardiomyopathy is characterized by myocellular hypertrophy and myocardial fibrosis. The etiology of diabetic cardiac dysfunction is thus multiparametric. The study as described herein to show the suitability of a renin inhibitor such as aliskiren in the treatment of diabetic cardiomyopathy focuses on the analysis of the markers of cardiac dysfunction, in streptozotocin-induced diabetic mice. The following parameters are analyzed:

1) Analysis of morphometric and hemodynamic parameters: analysis performed by echocardiography and LV catheterization identifies the effect of the test agents on cardiac pathology, such as diastolic and systolic dysfunction, caused by diabetes.

2) Analysis of enhanced reactive oxygen species (ROS) generation, myocyte apoptosis, and cardiac fibrosis by histology and gene expression: ROS generation, apoptosis, and fibrosis are detected by immunohistochemistry using specific staining and by measuring expression of genes (such as NADPH oxidase, Bcl2, Bax, TGF-β, and collagen), which contribute to these conditions. These measurements identify the effect of the test agents on cardiac fibrosis, apoptosis, and ROS production. Production of ROS has been proposed as the main causative factor of diabetic cardiac dysfunction, which also results in cardiac myocyte apoptosis. Cardiac fibrosis is considered to contribute to diastolic dysfunction.

3) Analysis of the cardiac RAS by Ang II measurement and gene expression: this measurement identifies the effect of the test agents on activation of the cardiac RAS in diabetes. The RAS is implicated in the pathogenesis of diabetic cardiac dysfunction. Activation of the intracellular RAS in vitro and in vivo has been demonstrated in the art. By measuring Ang II levels and expression of AGT, renin, and ACE, activation of the circulating and local cardiac RAS is determined

4) Analysis of the established markers of cardiac remodeling, such as ANP, β-MHC, and TGF-β; and newly identified genes that contribute to diabetic cardiomyopathy, such as sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2), p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK), and prorenin converting enzyme (PRECE)

ANP, β-MHC, SERCA2, p90RSK, and PRECE. ANP and β-MHC are established markers of cardiac remodeling. Decreased expression of SERCA2 has been shown to cause alteration in Ca^{2+} homeostasis responsible for diastolic dysfunction in diabetes. More recently, p90RSK and PRECE have been strongly implicated in diabetic cardiac dysfunction.

5) Analysis of pro-inflammatory cardiac cytokines (TNF-α, IL6, and IL1-β): One of the abnormalities associated with diabetic cardiomyopathy is cardiac inflammation, which is accompanied by elevated levels of cytokines, such as TNF-α, IL6, and IL1-β. Normalization of the cytokine levels by test agents can indicate improvement in cardiac function.

6) Measurement of tissue and cellular concentration of the test agents in the heart: Since aliskiren can produce cardioprotective effects by inhibiting local generation of Ang II in the heart, it is desirable to determine the cardiac concentration of aliskiren in animals treated with this agent.

Several parameters have been included in this study, which are modulated by Ang II. Though some of the above parameters are evident early in diabetes (1 wk), longer studies (4 and 8 wk) would likely differentiate the effects of different RAS blockers more convincingly.

It has surprisingly been found that renin inhibitors may be used for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

Specifically, the present inventors have found that renin inhibitors, such as aliskiren, either alone or in combination, can have a beneficial effect in the treatment of diabetic cardiomyopathy.

iAng II has been shown to produce multiple biological actions, including cardiac hypertrophy (Kumar R at al in *Trends Endocrinol Metab* 18:208-214, 2007; Baker KM at al in *Regul Pept* 120:5-13, 2004). It has been found, by the use of a STZ-induced diabetes in mice (representative of type-1 diabetes), that there is activation of the intracellular renin-angiotensin system (RAS) in diabetic rat hearts. The present invention shows that hyperglycemia activates the cardiac intracellular renin-angiotensin system *in vivo* and demonstrates that iAng II (intracellular Ang II)

participates in the development of cardiovascular pathological conditions associated with diabetes. Significantly, it has been found that blockade of the RAS by a renin inhibitor, in diabetic rats, provides greater protection from cardiac fibrosis and oxidative stress, compared to inhibition with an AT_1 antagonist or an ACE inhibitor. For example, iAng II synthesis is blocked by aliskiren but, not benazepril and, diabetes-induced cardiac fibrosis is partially inhibited by candesartan and benazepril, whereas aliskiren produces complete inhibition. Renin inhibitors provide thus a significant cardiovascular benefit in diabetic conditions.

High glucose is the major stimulus for activation of the intracellular RAS. Both type 1 and type 2 diabetes are accompanied by hyperglycemia. Thus, the observations regarding the intracellular RAS in type 1 diabetes can apply to type 2 diabetes.

This assumption is supported by the results of in vitro studies that have demonstrated activation of the intracellular RAS in neonatal rat cardiac myocytes by high glucose even in the presence of insulin. Furthermore, histological analysis of cardiac tissue from type 2 diabetes patients has shown enhanced intracellular staining for Ang II (Frustaci A at al in *Circ Res* 87:1123-1132, 2000).

The pharmaceutical activities as effected by administration of a renin inhibitor or by administration of a combination of therapeutic agents used according to the present invention may be demonstrated, e.g., by using corresponding pharmacological models well-known in the pertinent art. A person skilled in the art is fully enabled to select a relevant test model to prove the hereinbefore and hereinafter indicated therapeutic indications and beneficial effects.

A combination according to the present invention comprising a renin inhibitor, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, can be administered by various routes of administration. Each agent can be tested over a wide-range of dosages to determine the optimal drug level for each therapeutic agent in the specific combination to elicit the maximal response. For these studies, it is preferred to use treatment groups consisting of at least 6 animals per group. Each study is best performed in a way

wherein the effects of the combination treatment group are determined at the same time as the individual components are evaluated.

The usefulness of a renin inhibitor, either alone or in combination with a further active ingredient as described herein, for the treatment of diabetic cardiomyopathy may be demonstrated experimentally, for example, by carrying out a study with C57/BL6 mice and by measuring the parameters hereinafter.

Methods

Abbreviations

RAS = renin-angiotensin system
AGT = angiotensinogen
Ang II = angiotensin II
iAng II = intracellular Ang II
ARB = angiotensin receptor blocker
WT= wild type
IVSTd = end-diastolic interventricular septum
IVSTs = end-systolic interventricular septum
PWTd = posterior wall thickness diastolic
PWTs = posterior wall thickness systolic
AWTd = anterior wall thickness
LVDd = left ventricular internal diameters diastolic
LVDs = left ventricular internal diameters systolic
FS = fractional shortening
RWT = relative wall thickness
LV = left ventricle
LVM = left ventricular mass
dP/dt = first derivative of left ventricular (LV) pressure over time
PBS = phosphate buffered saline
DNA = deoxyribonucleic acid
DHE = dihydroethidium
ROS = reactive oxygen species
ELISA = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
RT-PCR = reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Case: 52765A 26

AGT = angiotensinogen
ACE = angiotensin converting enzyme
TGF-β = transforming growth factor-β
ANP = atrial natriuretic peptide
β-MHC = β-myosin heavy chain
SERCA2 = sarco-endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase
p90RSK = p90 ribosomal S6 kinase
PRECE = prorenin converting enzyme
GAPDH = Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
RNase = ribonuclease
RNA = ribonucleic acid
cDNA = complimentary DNA
TNF-α = Tumor necrosis factor-α
IL6 = interleukin 6
IL1-β = interleukin 1-β
STZ = streptozotocin
s.c.: subcutaneous
b.i.d. (administration): bis in a day
t.i.d. (administration): tris in a day
wk: week
HbA1c = hemoglobin A1c
HF = heart failure

The following study procedures are used:

Method 1

Type 1 diabetes:

Eight groups of eight wk old male mice C57/BL6 are utilized: control, diabetic, and control and diabetic mice treated with an angiotensin II receptor antagonist, for example, candesartan, with an ACEI, for example benazepril, and with a renin inhibitor, for example aliskiren. Each group includes 15 animals. Diabetes is induced by multiple intraperitoneal injections of low dose (for example 50 mg/kg/day for 5 days) streptozotocin (Sigma) in 10 mM citrate buffer. Animals in control groups receive buffer alone. This protocol produces robust and consistent hyperglycemia in mice. Establishment of diabetes is confirmed by blood glucose measurements of

>250 using a glucometer. Blood glucose levels are monitored twice a week to confirm sustained diabetes. A control diabetic group in which glucose levels are normalized by subcutaneous insulin treatment is also included. The angiotensin II receptor antagonist, for example candesartan, the ACEI, for example benazepril, and the renin inhibitor, for example aliskiren is administered by osmotic minipump. The animals are studied for cardiac function, morphology, histology, and gene expression at 1, 4 and 8 weeks of establishment of diabetes. The osmotic minipumps are replaced after 4 weeks in 8 week groups. At these time points, significant effects of diabetes on cardiac systolic and diastolic function, fibrosis, oxidative stress, and gene expression are determined.

Type 2 diabetes:

Eight groups of six wk old male mice, diabetic (db/db) and non-diabetic littermate control on a C57BLKS/j background are utilized: control, diabetic, and control and diabetic mice treated with an angiotensin II receptor antagonist, for example, candesartan; with an ACEI, for example benazepril; and with a renin inhibitor, for example aliskiren. Each group includes 15 animals. Diabetes is confirmed by blood glucose measurements of >250, using a glucometer. The angiotensin II receptor antagonist, for example candesartan; the ACEI, for example benazepril; and the renin inhibitor, for example aliskiren are administered by osmotic minipump. The animals are studied for cardiac function, morphology, histology, and gene expression following 1, 4 and 8 weeks of treatment. The osmotic minipumps are replaced after 4 weeks in 8 week groups. At these time points, the effects of treatment on diabetes-induced cardiac systolic and diastolic function, fibrosis, oxidative stress, and gene expression are determined.

Parameters Studies:

i) Morphometric and hemodynamic analyses:

Systolic blood pressure is determined weekly by tail-cuff plethysmography. Echocardiographic analysis are performed on anesthetized animals (with for example 40-50 mg/kg ketamine and for example 5 mg/kg xylazine intraperitoneally) using an Agilent 5500 Sono S echocardiograph equipped with a 12 MHz transducer. After obtaining two-dimensional short-axis images of the left ventricle at the level of the papillary muscle, M-mode freeze frames are obtained. End-diastolic and end-systolic

interventricular septum (IVSTd, IVSTs), posterior wall thickness (PWTd, PWTs), anterior wall thickness (AWTd) and left ventricular internal diameters (LVDd, LVDs) are measured using a computer analysis system. Percent fractional shortening (%FS), relative wall thickness (RWT), and left ventricular mass (LVM) are calculated using standard formulas in the art. Echocardiographic analyses are performed the day of the first streptozotocin injection and weekly thereafter. A group of 6 mice are anesthetized at 1, 4, and 8 wk after diabetes induction, with 40-50 mg/kg of for example ketamine and 5 mg/kg of for example xylazine, intraperitoneally. Inotropic and lusitropic function are evaluated by measuring the maximum rate of left ventricular pressure developed (dP/dt max) and left ventricular pressure decay (dP/dt min) with a micromanometer catheter (Millar 1.4 F, SPR 671, Millar Instruments, Texas), positioned in the left ventricle via right common carotid artery cannulation. Mice are killed, and hearts excised, weighed, and processed for histological analyses.

(ii) Histological analysis for fibrosis:

Histological analysis are performed using the hearts obtained in the above study (i) at 1, 4, and 8 wk after diabetes induction. Excised hearts are rinsed in PBS, followed by incubation in Krebs-Hanseleit solution, lacking Ca2+, to relax the cardiac muscle before fixation in 10% formalin. After dehydration in ethanol, and mounting in paraffin, 5 µm thick sections are cut. Sections are stained with hematoxylin and eosin for morphological analysis, and with picrosirius red (Fluka) for detection of fibrosis. To measure the myocyte area, cross-sections with nearly circular capillary profile and nuclei are used, from 10 separate sections.

iii) Cardiac myocyte apoptosis:

To determine if there is an increase in the number of TUNEL-positive cardiac myocytes in these hearts, 5 µm thick paraffin sections are deparaffinized by immersing in xylene, rehydrated, and incubated with proteinase K (20 µg/ml). After inactivation of endogenous peroxidases with 3% H_2O_2 in methanol, sections are incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase and biotinylated deoxyuridine 5-triphosphate, by using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche). The labeling is detected by streptavidin-HRP and diaminobenzine and observed microscopically. As a positive control, sections are pretreated with micrococcal Dnase I (1 mg/ml) to induce DNA strand breaks. Sections of the heart are co-stained for cardiac myocyte-

specific sarcomeric α-actinin with the monoclonal antibody EA-53 (Sigma), to distinguish cardiac myocytes from fibroblasts. An average of 1000 EA-53 positive cells, from random fields, are analyzed.

iv) ROS measurement are performed in frozen heart sections by staining with dihydroethidium (DHE), a cell-permeable fluorescent dye that is oxidized by superoxide to ethidium bromide, which is trapped intracellularly by intercalation into the DNA. Frozen heart sections (20 μM) are incubated with 10 μM DHE at 37 °C for 45 min in a humidified chamber protected from light. Fluorescent images of intercalated dye are obtained using a fluorescent microscope.

v) iAng II measurement:

Mice are anesthetized and treated with heparin (5000 units/Kg body weight, IP), 10 min prior to harvesting hearts. The chest are opened at the sternum and the heart cannulated with a 20 G phalanged stainless steel cannula into the ascending aorta, and quickly removed. The heart are perfused retrograde through the aorta, using in a Krebs-Henseleit buffer at a constant pressure of 80 mm Hg. Collagenase solution (0.1% w/v) are added to the perfusion buffer and hearts perfused for 45 min. After perfusion, ventricles are cut into small pieces and transferred to a spinner flask containing collagenase solution. Dispersed cells are harvested by decantation, after each 5 min of incubation. Myocytes are separated from non-myocytes on a discontinuous percoll gradient. Ang II is extracted from the purified cells and concentration determined by ELISA.

vi) Gene expression:

Real time RT-PCR are used to measure expression of AGT, renin, ACE, TGF-β, ANP, β-MHC, SERCA2, p90RSK, and PRECE. GAPDH are measured as a housekeeping gene for relative quantification. Primers and probes are synthesized as described in the literature, for example as described in Naito et al, Hypertension, 2002, 40, 827; Itoh et al Circulation, 2006, 113, 1787 and in Hu et al, Circulation Research, 2005, 96, 1006. Briefly, hearts are washed in PBS and quickly transferred to RNase Later (Ambion) solution for storage at -80 °C. RNA isolation (ToTally RNA kit from Ambion) and cDNA synthesis (High capacity cDNA reverse transcription kit from Applied Biosystems) are performed using commercially available kits.

vii) Protein expression:

Expression of the above genes are confirmed at protein level by Western analysis. Proteins are separated by polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane is probed with a primary antibody specific to the target protein. A secondary antibody, labeled for detection with either chemiluminescence or fluorescence, is used to quantitate the primary antibody bound to the membrane, which corresponds to the amount of the target protein.

vii) Cytokines:

Pro-inflammatory cardiac cytokines TNF-α, IL6, and IL1-β are measured by commercially available ELISA kits (Pharmingen/BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions (Westermann et al Diabetologia 2006, 49, 2507).

The experimental study can be summarized as follows:

Treatment		N/group	Duration of Treatment (weeks)	Relevant Information
No treatment	Control	15	1, 4, and 8	Morphometric, hemodynamic parameters are measured in all animals. 6 animals from each group are used for histology-based parameters. 6 animals are used for gene and protein expression studies and Ang II measurement. 3 extra animals are included to account for mortality due to diabetes or handling.
	Diabetic	15		
Candesartan	Control	15	1, 4, and 8	
	Diabetic	15		
Benazepril	Control	15	1, 4, and 8	
	Diabetic	15		
Aliskiren	Control	15	1, 4, and 8	
	Diabetic	15		
Insulin	Diabetic	15	1, 4, and 8	Control to exclude toxic effects of STZ

Method 2

Induction of diabetes and treatment of animals

Diabetes is induced by a single injection of streptozotocin (STZ, 65 mg/kg body weight, IP) dissolved in 0.1 M sodium citrate buffered saline (pH 4.5), in adult male Sprague Dawley rats (250-300 g). Control animals receive buffered saline alone. Diabetes is confirmed by sustained blood glucose levels >15 mmol/L, as determined 48 h after STZ injection and on alternate days thereafter. Diabetic rats, in groups of nine animals, are treated with either insulin (2-5 U, BID, SC), treated with an

angiotensin II receptor antagonist, for example, candesartan (1 mg/kg, IP), with a renin inhibitor, for example aliskiren (30 mg/kg, oral), or with an ACEI, for example benazepril (10 mg/kg, oral), daily for 7 days, beginning 48 h after STZ injection. After 7 days, animals are weighed and anesthetized using ketamine/xylazine (50/5 mg/kg). Hearts are isolated and weighed before perfusion, the latter using the Langendorff methodology.

Isolation of cardiac myocytes and measurement of iAng II

Hearts are isolated and perfused with Krebs-Henseleit bicarbonate buffer, followed by digestion with collagenase II (0.1 % w/v). Myocytes are separated from non-myocytes by differential centrifugation at 25 X g. The purity of the myocyte preparations using this procedure is >90%, as analyzed by FACS, using anti-sarcomeric myosin (MF-20) and anti-sarcomeric actin antibody. The pellet containing myocytes is processed for Ang II extraction, as described by Singh et al in *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H939-H948, 2007. Cells were lysed in ice-cold 1 M acetic acid, containing a protease inhibitor cocktail (Sigma), by sonication (2 pulses of 5 sec each). The lysate is sedimented at 20,000 X g for 10 min and the supernatant is dried in a vacufuge, followed by reconstitution in 1% acetic acid. The samples are applied to a conditioned DSC-18 column (Supelco), washed, and eluted with methanol. The eluted samples are dried and reconstituted in PBS for ELISA. For isolation of Ang II from plasma, an equal volume of 2% acetic acid is added to plasma, followed by filtration through Amicon Ultra-15 filters. The filtrate is applied to DSC-18 columns and Ang II is eluted, as described for the cell lysates. Using the above procedure, >90% recovery of exogenously added Ang II can be recovered. Ang II is measured by quantitative, competitive ELISA, using a specific anti-Ang II antibody (Peninsula Labs), as previously described in *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H939-H948, 2007. ELISA is performed on protein-A and anti-Ang II antibody-coated 96-well dishes. Competitive binding of synthetic biotinylated Ang II,

in the presence of the extracted peptide, is detected with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. A standard curve, generated from binding of a constant amount of biotinylated Ang II with increasing concentrations of non-biotinylated synthetic Ang II, is used to calculate the concentration of the peptide in the sample. The concentration of Ang II in the cell lysates is expressed as fmoles per milligram of heart wt and in plasma as fmoles per milligram of plasma proteins.

Ang II levels in cardiac myocytes, which are isolated after perfusion of the hearts and enzymatic dispersion, correspond to Ang II present intracellularly. To determine the source of iAng II, i.e., intracellular synthesis or AT_1-mediated internalization, one group of diabetic animals is treated with the AT_1 antagonist candesartan to prevent receptor-mediated uptake. Cardiac myocytes from diabetic rat hearts show a 9.9-fold elevation in the levels of iAng II (0.59 ± 0.01 fmole/mg heart wt), compared to cells from control animals (0.06 ± 0.01 fmole/mg heart wt). Normalization of blood glucose levels by insulin, in STZ-treated rats, completely blocks the rise in iAng II levels (0.16 ± 0.02 fmole/mg heart wt), indicating that the latter is a specific effect of hyperglycemia. Treatment of diabetic rats with candesartan, reduces iAng II levels to 0.43 ± 0.05 fmole/mg heart wt, which indicates that the major source of iAng II is intracellular synthesis. Treatment of diabetic rats with aliskiren normalizes iAng II levels (0.12 ± 0.02 fmole/mg heart wt), while benazepril does not have any effect (0.55 ± 0.02 fmole/mg heart wt.

Cardiac myocyte apoptosis

Apoptotic cardiac myocytes are detected in paraffin-embedded heart sections using the terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay and cleaved caspase-3 staining. TUNEL assay is performed using an assay kit (Millipore Corporation, Temecula, CA), as per the manufacturer's instructions. Cytoplasm and nuclei from the myocytes are counter-stained using α-sarcomeric actin antibody and DAPI, respectively. For cleaved caspase-3 staining,

deparaffinized sections are subjected to antigen retrieval in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0), by microwaving. After blocking with 5% BSA, the sections are incubated with rabbit monoclonal anti–cleaved caspase-3 antibody (1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) overnight at 4 °C, followed by fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200; Molecular Probes). The number of positively stained nuclei is counted from twenty fields/heart and three hearts/treatment group.

Quantification of apoptotic cells shows a 3-fold increase in diabetic hearts, compared to control, by both TUNEL assay and caspase-3 staining. Normalization of blood glucose by insulin or blockade of the RAS with the three different inhibitors, reduces the number of apoptotic cells, but does not prevent apoptosis completely.

	Caspase-3 staining			TUNEL assay	
	(positive cells/mm^2)				
	Mean	SE		Mean	SE
Cont	7	0.16		8.5	0.34
Diabetic					
No treatment	28	0.35		33	0.7
Ins	14	0.18		20	0.21
Alsk	18	0.48		21.3	0.83
Cand	18.5	0.42		24	0.34
Bnz	21	0.28		27	0.6

<u>Reactive oxygen species (ROS) detection in the heart</u>

Superoxide production in the hearts is detected by dihydroethidium staining (DHE, Sigma-Aldrich). Frozen heart sections (20 µm thick) are incubated with 10 µM DHE, at 37 °C for 45 min, in a humidified chamber protected from light. Fluorescent images,

obtained with an Olympus FV300 confocal microscope, are analyzed with Slide Book 4.2. The mean DHE fluorescence intensity of myocyte nuclei is calculated by dividing the combined fluorescence value of the pixels by the total number of pixels, in fifteen randomly selected fields observed with identical laser and photomultiplier settings. Diabetic hearts show enhanced superoxide production, compared to control animals, which is prevented in insulin treated animals. Treatment of diabetic rats with candesartan or benazepril, reduces oxidative stress, while aliskiren blocks it completely.

DHE fluorescence (Arbitrary units)		
	Mean	SE
Cont	17.65	0.5
Diabetics		
No treatment	68.6	1.9
Ins	26.7	2
Alsk	22.7	0.35
Cand	37.7	1.3
Bnz	51.4	1.9

Cardiac Fibrosis

Cardiac interstitial fibrosis is determined by Masson's trichrome staining on 5 μm paraffin-embedded sections. The extent and degree of fibrosis is graded on a scale of 0-4. Grade 0 signifies no apparent collagen fiber proliferation except for small islets of fibrous tissue around the capillaries, as well as an intercellular single layer of collagenous tissue, as in normal myocardium. Focal and minimal fibrosis is graded as 1, mild patchy fibrosis as grade 2, moderate diffuse fibrosis as grade 3 and the most prominent fibrosis, covering major area of the specimen, is classified as 4. A minimum of three sections per heart, with five fields per section, and three animals per experimental group, are analyzed and results presented as an average grade.

After one week of diabetes, the overall staining for fibrosis is enhanced in hearts from diabetic rats (grade 1.5), compared to control animals (grade 0). Insulin treatment completely prevents the increase in fibrosis (grade 0.04). Candesartan and benazepril reduces the degree of fibrosis (grade 0.43 and 0.88, respectively), whereas aliskiren has a more pronounced reduction of fibrosis (grade 0.25) in diabetic rat hearts.

Statistical analysis

Values are expressed as the means ± SE. ANOVA with Tukey's post hoc test was used for statistical analysis. $P < 0.05$ is considered statistically significant.

The above description fully discloses the invention including preferred embodiments thereof. Modifications and improvements of the embodiments specifically disclosed herein are within the scope of the following claims. Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent.

The above results demonstrate that renin inhibitors, such as aliskiren, either alone or in combination with other active agents can be useful in the treatment of diabetic

cardiomyopathy.

CLAIMS:

1. Use of a renin inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

2. Use according to claim 1 for the treatment of type 2 or type 1 diabetic patients.

3. Use according to claims 1 or 2 wherein the renin inhibitor is aliskiren or a salt thereof.

4. A pharmaceutical composition for the treatment of diabetic cardiomyopathy comprising a renin inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5. A pharmaceutical composition according to claim 4 for the treatment of type 2 or type 1 diabetic patients.

6. A pharmaceutical composition according to claims 4 or 5 wherein the renin inhibitor is aliskiren or a salt thereof.

7. Use according to any one of claims 1 to 3 wherein the renin inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof is used in combination with one or more, for example one to three, active ingredients.

8. Use according to claim 7 wherein the other active ingredient is selected from the group consisting of ACEIs, beta blockers, angiotensin II receptor antagonists, type 2 diabetes therapeutic agents, such as TZDs, and type 1 diabetes therapeutic agents, such as insulin, or in each case independently a salt thereof.

9. Use according to claims 7 or 8 wherein the other active ingredient is

- an ACEI selected from the group consisting of alacepril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril and trandolapril, or in each case independently a salt thereof;

- an angiotensin II receptor antagonist selected from the group consisting of valsartan, losartan, eprosartan, irbesartan, telmisartan, candesartan and saprisartan, or in each case independently a salt thereof;

- a type 2 diabetic therapeutic agent selected from the group consisting of troglitazone, rosiglitazone, ciglitazone; darglitazone; englitazone; isaglitazone and pioglitazone, or in each case independently a salt thereof; and/or

- a type 1 diabetic therapeutic agent, such as insulin, or a salt thereof.

10. Use according to any one of claims 7 to 9 for simultaneous, separate or sequential use.

11. A pharmaceutical composition according to any one of claims 4 to 6 comprising further, one or more, for example one to three, active ingredient.

12. A pharmaceutical composition according to claim 11 wherein the further active ingredient is selected from the group consisting of ACE inhibitors, angiotensin II receptor antagonists, beta-blockers, type 2 diabetes therapeutic agents, such as TZDs, and type 1 diabetes therapeutic agents, such as insulin.

13. A pharmaceutical composition according to claims 11 or 12 wherein the further active ingredient is

- an ACEI selected from the group consisting of alacepril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril and trandolapril, or in each case independently a salt thereof;

- an angiotensin II receptor antagonist selected from the group consisting of valsartan, losartan, eprosartan, irbesartan, telmisartan, candesartan and saprisartan, or in each case independently a salt thereof;

- a type 2 diabetic therapeutic agent selected from the group consisting of troglitazone, rosiglitazone, ciglitazone; darglitazone; englitazone; isaglitazone and pioglitazone, or in each case independently a salt thereof; and/or

- a type 1 diabetic therapeutic agent, such as insulin, or a salt thereof.

14. A commercial package comprising a pharmaceutical composition according to any one of claims 4, 5, 6, 11, 12 or 13, together with instructions for simultaneous, separate or sequential use thereof in the treatment of diabetic cardiomyopathy.

15. A kit for the treatment of diabetic cardiomyopathy, which comprises:

a) a renin inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof in a first unit dosage form;

b) at least one therapeutic agent selected from the group consisting of an ACE inhibitor, an angiotensin II receptor antagonist (e.g., valsartan), a beta blocker, a type 2 diabetes therapeutic agent, a type 1 diabetes therapeutic agent, or in each case independently a pharmaceutically acceptable salt thereof, in a second etc. unit dosage form;

c) a container for containing said first, second etc. unit forms.

16. A method for the treatment of diabetic cardiomyopathy, which comprises administering to a warm-blooded animal, including human, a therapeutically effective amount of a renin inhibitor, for example aliskiren, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, either alone or in combination with one or more active ingredient, such as, for example, ACEIs, beta blockers, angiotensin II receptor antagoniss, type 2 diabetes therapeutic agents such as TZDs, type 1 diabetes therapeutic agents such as insulin, or in each case independently a salt thereof.

Abstract of the Disclosure

The invention relates to the use of a renin inhibitor, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, alone or in combination with one or more active ingredient, for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic cardiomyopathy.