



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 20 745 T2** 2004.02.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 928 200 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 20 745.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/15155**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 939 631.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/008546**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.08.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **05.03.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.07.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **09.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.02.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **A61K 45/06**

**A21B 1/48, B29C 31/08, A61P 17/00,  
A23L 1/10, A61P 17/12, C23C 28/00,  
A61K 31/70**

(30) Unionspriorität:

**24772 P                      28.08.1996                      US**

(73) Patentinhaber:

**Institut National de la Santé et de la Recherche  
Médicale (INSERM), Paris, FR; Centre National de  
la Recherche Scientifique (C.N.R.S.), Paris, FR;  
Universite Louis Pasteur (Strasbourg I),  
Straßburg/Strasbourg, FR; Bristol-Myers Squibb  
Co., Princeton, N.J., US**

(74) Vertreter:

**Schneiders & Kollegen, 81479 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**CHAMBON, Pierre, F-67113 Blaesheim, FR;  
GRONEMEYER, Hinrich, D-77704 Oberkirch, DE;  
RECZEK, R., Peter, Buffalo, US; OSTROWSKI,  
Jacek, Buffalo, US**

(54) Bezeichnung: **THERAPEUTISCHE KOMBINATIONEN VON RAR-ANTAGONISTEN UND RXR-AGONISTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****HINTERGRUND DER ERFINDUNG****Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Gebiete der Retinoid-Rezeptor-Biologie und Therapien von Säugetierkrankheiten. Die vorliegende Erfindung stellt insbesondere Zusammensetzungen und die Verwendung dieser Zusammensetzungen bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung eines Tiers, vorzugsweise eines Menschen, bereit, der an Krebs, einem Hautleiden, rheumatischer Arthritis oder einer prämaligen Läsion leidet oder dazu prädisponiert ist, wobei bei der Behandlung dem Tier eine wirksame Menge einer Zusammensetzung verabreicht wird, welche mindestens einen RAR-Antagonisten, vorzugsweise einen RAR $\alpha$ -Antagonisten, und mindestens einen RXR-Agonisten enthält.

**Verwandte Technik****Retinoide**

[0002] Eine Reihe von Studien hat belegt, dass Retinoide (Derivate von Vitamin A) für normales Wachstum, Sehvermögen, Gewebe-Homöostase, Fortpflanzung und allgemeines Überleben wesentlich sind (zwecks Überblick und Verweise siehe Sporn et al., *The Retinoids*, Band 1 und 2, Sporn et al., Hrsg. Academic Press, Orlando, Florida (1984)). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Retinoide für die Erhaltung der Haut-Homöostase und Sperrfunktion in Säugetieren von vitaler Bedeutung sind (Fisher, G. J., und Voorhees, J. J., *FASEB J.* 10: 1002–1013 (1996)). Retinoide sind anscheinend auch während der Embryogenese von entscheidender Bedeutung, da die Nachkommen von Muttertieren mit Vitamin-A-Mangel (VAD) eine Reihe von Entwicklungsstörungen aufweisen (Wilson, J. G., et al., *Am. J. Anat.* 92: 189–217 (1953); Morriss-Kay, G. M. und Sokolova, N., *FASEB J.* 10: 961–968 (1996)). Mit Ausnahme der Auswirkungen auf das Sehvermögen (Wald, G., et al., *Science* 162: 230–239 (1968)) und die Spermatogenese bei Säugetieren (van Pelt, H. M. M. und De Rooij, D. G., *Endocrinology* 128: 697–704 (1991)), können die meisten Auswirkungen, die durch VAD bei Tieren und deren Föten hervorgerufen werden, durch die Verabreichung von Retinolsäure (RA) vermieden und/oder umgekehrt werden (Wilson, J. G., et al., *Am. J. Anat.* 92: 189–217 (1953); Thompson et al., *Proc. Royal Soc.* 159: 510–535 (1964); Morriss-Kay, G. M. und Sokolova, N., *FASEB J.* 10: 961–968 (1996)). Die dramatischen teratogenen Auswirkungen maternaler RA-Verabreichung bei Säugetierembryonen (Shenefelt, R. E., *Teratology* 5, 103–108 (1972); Kessel, M., *Development* 115: 487–501 (1992); Creech Kraft, J., in *Retinoids in Normal Development and Teratogenesis*, G. M. Morriss-Kay, Hrsg. Oxford University Press, Oxford, UK, Seiten 267–280 (1992)) und die spürbaren Auswirkungen lokaler Verabreichung von Retinoiden auf die embryonale Entwicklung von Wirbeltieren und die Regeneration von Gliedmaßen bei Amphibien (Mohanty-Hejmadi et al., *Nature* 355: 352–353 (1992); Tabin, C. J., *Cell* 66: 199–217 (1991)), haben zu der Auffassung beigetragen, dass RA eine entscheidende Rolle bei der Morphogenese und Organogenese spielen könnte.

**Retinoid-Rezeptoren**

[0003] Abgesehen von den molekularen Mechanismen, die beim Sehen (Wald, G. et al., *Science* 162: 230–239 (1968)) involviert sind, sind die molekularen Mechanismen, die den sehr unterschiedlichen Auswirkungen von Retinoiden zugrunde liegen, bis vor kurzem unklar geblieben. Die Entdeckung von nuklearen Rezeptoren für RA (Petkavich et al., *Nature* 330: 444–450 (1987); Giguère et al., *Nature* 330: 624–629 (1987)) hat das Verständnis dafür, wie die Retinoide ihre pleiotropen Auswirkungen ausüben, entscheidend verbessert (Leid et al., *TIBS* 17: 427–433 (1992); Linney, E., *Current Topics in Dev. Biol.* 27: 309–350 (1992)). Seit dieser Entdeckung wurde deutlich, dass die genetischen Aktivitäten des RA-Signals durch zwei Rezeptorfamilien – die RAR-Familie und die RXR-Familie – herbeigeführt werden, die zur Superfamilie der Ligand-induzierbaren transkriptionalen regulatorischen Faktoren zählen, welche Steroid-/Schilddrüsen-Hormon- und Vitamin-D3-Rezeptoren einschließen (Rezensionen siehe Leid et al., *TIBS* 17: 427–433 (1992); Chambon, P., *Semin. Cell Biol.* 5: 115–125 (1994); Chambon, P., *FASEB J.* 10: 940–954 (1996); Giguère, V., *Endocrinol. Rev.* 15: 61–79 (1994); Mangelsdorf, D. J., und Evans, R. M., *Cell* 83: 841–850 (1995); Gronemeyer, H., und Laudet, V., *Protein Profile* 2: 1173–1236 (1995)). RAR-Rezeptoren Rezeptoren der RAR-Familie (RAR $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  und ihre Isoformen) werden sowohl von all-trans- als auch 9-Cis-RA aktiviert (Leid et al., *TIBS* 17: 427–433 (1992); Chambon, P., *Semin. Cell Biol.* 5: 115–125 (1994); Dollé, P., et al., *Mech. Dev.* 45: 91–104 (1994); Chambon, P., *FASEB J.* 10: 940–954 (1996)). Innerhalb einer bestimmten Spezies sind die DNA-bindenden (C) und die Ligand-bindenden (E) Domänen der drei RAR-Typen sehr ähnlich, während die C-terminale Domäne F und die Mitteldomäne D keine oder nur geringe Ähnlichkeit aufweisen. Die Aminosäuresequenzen der drei RAR-Typen

unterscheiden sich ebenfalls in ihren B-Regionen deutlich voneinander, und ihre Haupt-Isoformen ( $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  bis  $\beta 4$  und  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$ ) unterscheiden sich ferner in ihren N-terminalen A-Regionen (Leid et al., TIBS 17: 427–433 (1992)). Aminosäuresequenz-Vergleiche haben ergeben, dass die Interspezies-Erhaltung eines bestimmten RAR-Typs größer ist als die Ähnlichkeit, die zwischen den drei RAR-Typen innerhalb einer bestimmten Spezies festzustellen ist (Leid et al., TIBS 17: 427–433 (1992)). Diese Interspezies-Erhaltung ist insbesondere in den N-terminalen A-Regionen der verschiedenen RAR $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoformen auffällig, deren A-Regionen-Aminosäuresequenzen ziemlich abweichend sind. Gemeinsam mit den ausgeprägten spatio-temporalen Expressionsmustern, die für die Transkripte jedes RAR- und RXR-Typs im sich entwickelnden Embryo und in verschiedenen Geweben erwachsener Mäuse festgestellt wurden (Zelent, A., et al., Nature 339: 714–717 (1989); Dollé, P., et al., Nature 342: 702–705 (1989); Dollé et al., Development 110: 1133–1151 (1990); Ruberte et al., Development 108: 213–222 (1990); Ruberte et al., Development 111: 45–60 (1991); Mangelsdorf et al., Genes & Dev. 6: 329–344 (1992)), hat diese Interspezies-Erhaltung zur Annahme geführt, dass jeder RAR-Typ (und Isoform) einzigartige Funktionen erfüllt. Diese Hypothese wird ferner durch die Erkenntnis untermauert, dass die verschiedenen RAR-Isoformen zwei transkriptionale Aktivierungsfunktionen (AFs) enthalten, die in der N-terminalen A/B-Region (AF-1) und in der C-terminalen E-Region (AF-2) angeordnet sind, die synergistisch – und bis zu einem gewissen Grad differential – verschiedene RAansprechende Promotoren aktivieren können (Leid et al., TIBS 17: 427–433 (1992); Nagpal, S., et al., Cell 70: 1007–1019 (1992); Nagpal, S., et al., EMBO J. 12: 2349–2360 (1993)).

### RXR-Rezeptoren

[0004] Im Gegensatz zu den RARs werden Mitglieder der Retinoid-X-Rezeptor-Familie (RXR $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) ausschließlich durch 9-cis-RA aktiviert (Chambon, P., FASEB J. 10: 940–954 (1996); Chambon, P., Semin. Cell Biol. 5: 115–125 (1994); Dollé, P., et al., Mech. Dev. 45: 91–104 (1994); Linney, E., Current Topics in Dev. Biol. 27: 309–350 (1992); Leid et al., TIBS 17: 427–433 (1992); Kastner et al., in Vitamin A in Health and Disease, R. Blomhoff, ed., Marcel Dekker, New York (1993)). Die bis dato charakterisierten RXRs sind jedoch den RARs insofern ähnlich, als sich die unterschiedlichen RXR-Typen auch in ihren N-terminalen A/B-Regionen deutlich unterscheiden (Leid et al., TIBS 17: 427–433 (1992); Leid et al., Cell 68: 377–395 (1992); Mangelsdorf et al., Genes and Dev. 6: 329–344 (1992)) und sie dieselben transkriptionalen Aktivierungsfunktionen in ihrer N-terminalen A/B-Region und C-terminalen E-Region enthalten (Leid et al., TIBS 17: 427–433 (1992); Nagpal, S., et al., Cell 70: 1007–1019 (1992); Nagpal, S., et al., EMBO J. 12: 2349–2360 (1993)).

[0005] RXR $\alpha$  und RXR $\beta$  weisen ein weit verbreitetes (möglicherweise allgegenwärtiges) Expressionsmuster während der Mausentwicklung und im erwachsenen Tier auf, das bei allen fötalen und Erwachsenengeweben festzustellen ist, die bisher überprüft wurden (Mangelsdorf D. J., et al., Genes & Devel. 6: 329–344 (1992); Dollé, P., et al., Mech. Devel. 45: 91–104 (1994); Nagata, T., et al., Gene 142: 183–189 (1994)). RXR $\gamma$ -Transkripte scheinen aber eine eingeschränkere Verbreitung aufzuweisen, wobei sie in sich entwickelnden Skelettmuskeln im Embryo (wo ihre Expression das ganze Leben hindurch aufrecht bleibt), im Herzen (nach der Geburt), in Sinnesepithelen des Seh- und des Hörsystems, in spezifischen Strukturen des zentralen Nervensystems und in Geweben exprimiert sind, die in Schilddrüsenhormon-Homöostase involviert sind, z. B. die Schilddrüsenzellen und thyreotropen Zellen in der Pituitaria (Mangelsdorf, D. J., et al., Genes & Devel. 6: 329–344 (1992); Dollé, P., et al., Mech. Devel. 45: 91–104 (1994); Sugawara, A., et al., Endocrinology 136: 1766–1774 (1995); Liu, Q., und Linney, E., Mol. Endocrinol. 7: 651–658 (1993)).

[0006] Zur Zeit ist nicht klar, ob alle molekularen Eigenschaften von RXRs, die in vitro charakterisiert wurden, für deren physiologischen Funktionen in vivo relevant sind. Insbesondere ist nicht bekannt, unter welchen Bedingungen diese Rezeptoren als 9-cis-RAabhängige transkriptionale Regulatoren agieren (Chambon, P., Semin. Cell Biol. 5: 115–125 (1994)). Die Knockouts von RXR $\alpha$  und RXR $\beta$  in der Maus haben einen gewissen Einblick in die physiologischen Funktionen dieser Rezeptoren ermöglicht. So sind zum Beispiel die okularen und kardialen Fehlbildungen, die bei RXR $\alpha^{-/-}$  Föten festgestellt wurden (Kastner, P., et al., Cell 78: 987–1003 (1994); Sucov, H. M., et al., Genes & Devel. 8: 1007–1018 (1994)) ähnlich wie jene, die beim fötalen VAD-Syndrom festgestellt wurden, was eine wichtige Funktion von RXR $\alpha$  bei der Transduktion eines Retinoidsignals während der Entwicklung nahe legt. Die Einbindung von RXRs bei der Retinoidsignalisierung wird ferner durch Studien von zusammengesetzten RXR $\alpha$ /RAR-Mutanten unterstützt, welche Defekte aufweisen, die bei den einzelnen Mutanten entweder fehlen oder weniger stark: ausgeprägt sind (Kastner, P., et al., Cell 78: 987–1003 (1994); Kastner, P., et al., Cell 83: 859–869 (1995)). Interessanterweise führt aber das Knockout von RXR $\gamma$  in der Maus zu keinen offensichtlichen schädlichen Auswirkungen, und RXR $\gamma^{-/-}$  Homozygoten, die auch RXR $\alpha^{-/-}$  oder RXR $\beta^{-/-}$  sind, weisen abgesehen von jenen Anomalitäten, die bei RXR $\alpha^{-/-}$ , RXR $\beta^{-/-}$  und fötalen VAD-Syndrom-Föten festgestellt wurden (Krezel, W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(17): 9010–9014 (1996)), keine zusätzlichen Anomalitäten auf, was die Vermutung nahe legt, dass RXR $\gamma$  – trotz seines stark gewebespezifischen Expressionsmusters im sich entwickelnden Embryo – für die embryonale Entwicklung und das postnatale Leben in der Maus entbehrlich ist. Die Beobachtung, dass lebendgeborene RXR $\gamma^{-/-}$ /RXR $\beta^{-/-}$ /RXR $\alpha^{-/-}$  Mu-

tanten bis zum Erwachsenenalter heranwachsen können (Krezel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(17): 9010–9014 (1996)), zeigt, dass ein einzelnes RXR $\alpha$ -Allel ausreicht, um alle vitalen Entwicklungs- und postnatalen Funktionen der RXR-Rezeptorfamilie auszuführen, insbesondere alle Entwicklungsfunktionen, die von RARs abhängen und eine RXR-Partnerschaft erfordern können (Dollé, P., et al., Mech. Dev. 45: 91–104 (1994); Kastner, P., et al., Cell 83: 859–869 (1995)). Ferner zeigt die Erkenntnis, dass RXR $\alpha^{-/-}$ /RXR $\gamma^{-/-}$  Doppelmutant-Embryonen nicht stärker betroffen sind als einzelne RXR $\alpha^{-/-}$  Mutanten (Krezel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(17): 9010–9014 (1996)) deutlich, dass RXR $\beta$  alleine auch einige dieser Funktionen ausführen kann. Daher belegt die Tatsache, dass RXR $\alpha$  alleine und – bis zu einem gewissen Grad – RXR $\beta$  alleine für die Durchführung einer Reihe von Entwicklungs-RXR-Funktionen ausreichen, deutlich die Existenz eines großen Ausmaßes von funktioneller Redundanz unter RXRs. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die RXR-Situation von jener der RARs, da alle Arten von RAR-Doppelmutanten wesentlich breitere Gruppen von Defekten aufwiesen als einzelne Mutanten (Rowe, A., et al., Develop. 111: 771–778 (1991); Lohnes, D., et al., Develop. 120: 2723–2748 (1994); Mendelsohn C., Develop. 120: 2749–2771 (1994)).

#### Retinoid-Bindung an RAR- und RXR-Rezeptoren

[0007] Die Kristallstrukturen der Ligand-bindenden Domänen (LBDs) der RARs und RXRs wurden vor kurzem geklärt (Bourget, W., et al., Nature 375: 377–382 (1995); Renaud, J. P., et al., Nature 378: 681–689 (1995); Wurtz, J. M. et al., Nature struct. Biol. 3: 87–94 (1996)). Unter den verschiedenen RAR-Typen wird eine wesentliche Aminosäuresequenzidentität in diesen Domänen festgestellt: Ein Vergleich der LBDs von RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  und RAR $\gamma$  zeigt, dass nur drei Aminosäurerückstände in der Ligand-bindenden Tasche dieser Rezeptoren variabel sind. Diese Rückstände sind anscheinend dafür verantwortlich, dass die verschiedenen RAR-Typen eine gewisse Selektivität beim Binden bestimmter synthetischer Retinoide aufweisen (Chen, J.-Y., et al., EMBO J. 14(6): 1187–1197 (1995); Renaud, J. P., et al., Nature 378: 681–689 (1995)), wobei die Berücksichtigung dieser divergierenden Rückstände dazu verwendet werden kann, RAR typenspezifische synthetische Retinoide zu konstruieren, die agonistisch oder antagonistisch sind (Chambon, P., FASEB J. 10: 940–954 (1996)). Dieser Konstruktionsansatz kann im Allgemeinen auf andere nukleare Rezeptoren ausgeweitet werden, wie den Schilddrüsenrezeptor  $\alpha$  (Wagner, R. L., et al., Nature 378: 690–697 (1995)), deren Ligand-bindenden Taschen chemisch und strukturell jenen der RARs ähneln können (Chambon, P., FASEB J. 10: 940–954 (1996)). Umgekehrt zeigt die Molekularmodellierung der Ligand-bindenden Tasche der RXRs, dass es keine offensichtlichen Unterschiede bei der Aminosäurezusammensetzung zwischen RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  und RXR $\gamma$  gibt (Bourguet, W., et al., Nature 375: 377–382 (1995); Wurtz, J. M., et al., Nature Struct. Biol. 3: 87–94 (1996)), was vermuten lässt, dass die Konstruktion von typenspezifischen synthetischen Liganden für die RXRs schwieriger sein kann als für die RARs (Chambon, P., FASEB J. 10: 940–954 (1996)).

#### Retinoidsignalisierung durch RAR : RXR Heterodimere

[0008] Nukleare Rezeptoren (NRs) sind Mitglieder einer Superfamilie von Ligandinduzierbaren transkriptionalen regulatorischen Faktoren, die Rezeptoren für Steroid-Hormone, Schilddrüsenhormone, Vitamin D3 und Retinoide einschließen (Leid, M., et al., Trends Biochem. Sci. 17: 427–433 (1992); Leid, M., et al., Cell 68: 377–395 (1992); und Linney, E. Curr. Top. Dev. Biol., 27: 309–350 (1992)). NRs weisen eine modulare Struktur auf, welche die Existenz von mehreren autonomen funktionellen Domänen widerspiegelt. Basierend auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zwischen dem Huhn-Estrogenrezeptor, dem menschlichen Estrogen-Rezeptor und dem Glucocorticoid-Rezeptor und dem v-erb-A-Onkogen haben (Krust, A., et al., EMBO J. 5: 891–897 (1986)) sechs Regionen – A, B, C, D, E und F – definiert, die unterschiedliche Grade evolutionärer Konservierung unter verschiedenen Mitgliedern der Superfamilie der nuklearen Rezeptoren aufweisen. Die hoch konservierte Region C enthält zwei Zinkfinger und entspricht dem Kern der DNA-bindenden Domäne (DBD), die für die spezifische Erkennung der verwandten Ansprechelemente verantwortlich ist. Region E ist funktionell komplex, da sie zusätzlich zur Ligand-bindenden Domäne (LBD) eine Ligand-abhängige Aktivierungsfunktion (AF-2) und eine Dimerisierungsschnittstelle enthält. Eine autonome transkriptionale Aktivierungsfunktion (AF-1) ist in den nicht-erhaltenen N-terminalen A/B-Regionen der Steroid-Rezeptoren anwesend. Interessanterweise weisen sowohl AF-1 als auch AF-2 der Steroid-Rezeptoren unterschiedliche transkriptionale Aktivierungseigenschaften auf, welche sowohl zelltypenspezifisch als auch promotorkontextspezifisch erscheinen (Gronemeyer, H. Annu. Rev. Genet. 25: 89–123 (1991)).

[0009] Wie oben beschrieben, werden die all-trans (T-RA) und 9-cis (9C-RA) Retinolsäuresignale durch zwei Familien von nuklearen Rezeptoren transduziert, RAR $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  (und deren Isoforme) werden sowohl durch T-RA als auch 9C-RA aktiviert, wobei RXR $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  ausschließlich durch 9C-RA aktiviert werden (Allenby, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 30–34 (1993)). Die drei RAR-Typen unterscheiden sich in ihren B-Regionen, und ihre Haupt-Isoformen ( $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ –4 und  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$ ) weisen unterschiedliche N-terminale A-Regionen auf (Leid, M. et al., Trends Biochem. Sci. 17: 427–433 (1992)). Ebenso unterscheiden sich die RXR-Ty-

pen in deren A/B-Regionen (Mangelsdorf, D. J. et al, Genes Dev. 6: 329–344 (1992)).

[0010] Es wurde auch gezeigt, dass die E-Region von RARs und RXRs eine Dimerisierungsschnittstelle enthält (Yu, V. C. et al., Curr. Opin. Biotechnol. 3: 597–602 (1992)). Am interessantesten ist, dass demonstriert wurde, dass RAR/RXR-Heterodimere in vitro wesentlich effizienter an eine Reihe von RA-Ansprechelementen (RAREs) binden als Homodimere von einem der Rezeptoren ((Yu, V. C. et al., Cell 67: 1251–1266 (1991); Berrodin, T. J. et al., Mol. Endocrinol 6: 1468–1478 (1992); Bugge, T. H. et al., EMBO J. 11: 1409–1418 (1992); Hall, R. K. et al., Mol. Cell. Biol. 12: 5527–5535 (1992); Hallenbeck, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5572–576 (1992); Husmann, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 187: 1558–1564 (1992); Kliewer, S. A. et al., Nature 355: 446–449 (1992); Leid, M. et al., Cell 68: 377–395 (1992); Marks, M. S. et al., EMBO J. 11: 1419–1435 (1992); Zhang, X. K. et al., Nature 355: 441–446 (1992)). RAR- und RXR-Heterodimere werden auch bevorzugt in Lösung in vitro gebildet (Yu, V. C. et al., Cell 67: 1251–1266 (1991); Leid, M. et al., Cell 68: 377–395 (1992); Marks, M. S. et al., EMBO J. 11: 1419–1435 (1992)), obwohl die Zugabe von 9C-RA die Bildung von RXR-Homodimeren in vitro zu verstärken erscheint (Lehman, J. M. et al., Science 258: 1944–1946 (1992); Zhang, X. K. et al., Nature 358: 587–591 (1992b)).

[0011] Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von RA-ansprechenden Promotern wahrscheinlich durch RAR-RXR-Heterodimere anstatt durch Homodimere auftritt (Yu, V. C. et al., Cell 67: 1251–1266 (1991); Leid et al., Cell 68: 377–395 (1992b); Durand et al., Cell 71: 73–85 (1992); Nagpal et al., Cell 70: 1007–1019 (1992); Zhang, X. K., et al., Nature 355, 441–446 (1992); Kliewer et al., Nature 355: 446–449 (1992); Bugge et al., EMBO J. 11: 1409–1418 (1992); Marks et al., EMBO J. 11: 1419–1435 (1992); You, V. C. et al., Cur. Op. Biotech. 3: 597–602 (1992); Leid et al., TIBS 17: 427–433 (1992); Laudet und Stehelin, Curr. Biol. 2: 293–295 (1992); Green, S., Nature 361: 590–591 (1993)). Es wurde vorgeschlagen, dass der RXR-Abschnitt dieser Heterodimere bei der Retinoid-induzierten Signalisierung stumm ist (Kurokawa, R., et al., Nature 371: 528–531 (1994); Forman, B. J., et al., Cell 81: 541–550 (1995); Mangelsdorf, D. J., und Evans, R. M., Cell 83: 835–850 (1995)), obwohl zu diesem Thema einander widersprechende Ergebnisse berichtet wurden (Apfel, C. M., et al., J. Biol. Chem. 270(51): 30765–30772 (1995); siehe Chambon, P. FASEB J. 10: 940–954 (1996) zwecks Rezension). Obwohl die Ergebnisse dieser Studien die Vermutung deutlich nahe legen, dass RAR/RXR-Heterodimere tatsächlich funktionelle Einheiten sind, welche das RA-Signal in vivo transduzieren, ist unklar, ob alle der vorgeschlagenen heterodimeren Kombinationen in vivo auftreten (Chambon, P., Semin. Cell Biol. 5: 115–125 (1994)). Daher kann die Basis für die hoch pleiotrope Wirkung von Retinoiden, zumindest teilweise, in der Kontrolle von unterschiedlichen Untergruppen an Retinoid-ansprechenden Promotern durch zellspezifisch exprimierte heterodimere Kombinationen von RAR : RXR-Typen (und Isoformen) liegen, deren Aktivität wiederum durch zellspezifische Pegel von all-trans- und 9-cis-RA geregelt werden kann (Leid et al., TIBS 17: 427–433 (1992)).

[0012] Die RXR-Rezeptoren können auch in RA-unabhängige Signalisierung involviert sein. So lässt zum Beispiel die Beobachtung von abweichendem Lipid-Metabolismus in den Sertoli-Zellen von RXR $\beta^{-/-}$  Mutanten-Tieren vermuten, dass es auch zwischen RXR $\beta$  und dem Peroxisom-Proliferator-aktiviertem Rezeptorsignalfaden zu funktionellen Interaktionen kommen kann (WO 94/26100; Kastner, P., et al., Genes & Devel. 10: 80–92 (1996)).

## Therapeutische Verwendungen von Retinoiden

### Überblick

[0013] Da bekannt ist, dass Retinolsäure die proliferierenden und differenzierenden Fähigkeiten von einigen Säugetierzelltypen reguliert (Gudas, L. J., et al., in The Retinoids, zweite Ausgabe, Sporn, M. B., et al., Hrsg., New York: Raven Press, Seiten 443–520 (1994)); werden Retinoide in verschiedenen chemopräventiven und chemotherapeutischen Situationen eingesetzt. Es wurde über die Prävention von Mundhöhlenkrebs, Hautkrebs und Hals-Nasen-Ohrenkrebs bei Patienten berichtet, bei denen ein Risiko bestand, an diesen Tumoren zu erkranken (Hong, W. K. et al., N. Engl. J. Med. 315: 1501–1505 (1986); Hong, W. K. et al., N. Engl. J. Med. 323: 795–801 (1990); Kraemer, K. H. et al., N. Engl. J. Med. 318: 1633–1637 (1988); Bollag, W. et al., Ann. Oncol. 3: 513–526 (1992); Chiesa, F. et al., Eur. J. Cancer B. Oral Oncol. 28: 97–102 (1992); Costa, A et al., Cancer Res. 54: Suppl. 7, 2032–2037 (1994)). Retinoide wurden auch verwendet, um das Plattenepithelkarzinom des Nackens und der Haut (Verma, A. K. Cancer Res. 47: 5097–5101 (1987); Lippman S. M. et al., J. Natl Cancer Inst. 84: 235–241 (1992); Lippman S. M. et al., J. Natl Cancer Inst. 84: 241–245 (1992)) und Kaposi-Sarkom zu behandeln (Bonhomme, L. et al., Ann. Oncol. 2: 234–235 (1991)) und wurden in beträchtlichem Ausmaß bei der Therapie von akuter Promyelozytenleukämie eingesetzt (Huang, M. E. et al., Blood 72: 567–572 (1988); Castaigne, S. et al., Blood 76: 1704–1709 (1990); Chomienne, C. et al., Blood 76: 1710–1717 (1990); Chomienne C. et al., J. Clin. Invest. 88: 2150–2154 (1991); Chen Z. et al., Leukemia 5: 288–292 (1991); Lo Coco, F. et al., Blood 77: 1657–1659 (1991); Warrell, R. P., et al., N. Engl. J. Med. 324: 1385–1393 (1991); Chomienne, C., et al., FASEB J. 10: 1025–1030 (1996)).

## Akute Promyelozytenleukämie (APL)

[0014] Eine ausgeglichene chromosomale Translokation t(15; 17) wurde in den meisten Zellen akuter Promyelozytenleukämie (APL) festgestellt (Larson, A. R., et al., Am. J. Med. 76: 827–841 (1984)). Der Bruchpunkt für diese Translokation tritt innerhalb des zweiten Introns des RAR $\alpha$ -Gens (Alcalay, M. D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1977–1981 (1991); Chang, K. S., et al., Leukemia 5: 200–204 (1991); Chen, S., et al., Blood 78: 2696–2701 (1991) und innerhalb zweier Stellen des Gens ein, das den putativen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor PML codiert (Goddard, A., et al., Science 254: 1371–1374 (1991)). Diese reziproke t(15; 17) Translokation führt zur Erzeugung eines PML-RAR $\alpha$ -Fusionsproteins, das mit PML und RAR $\alpha$  in APL-Zellen co-exprimiert wird (zwecks Überblick und Verweisen siehe Warrell, R. P., et al., N. Engl. J. Med. 329: 177–189 (1993); Grignani, F., et al., Blood 83: 10–25 (1994); Lavau, C., und Dejean, A., Leukemia 8: 1615–1621 (1994); de Thé, H., FASEB J. 10: 955–960 (1996)). Die PML-RAR $\alpha$ -Fusion ist augenscheinlich für den Differenzierungsblock im promyelozytischen Stadium verantwortlich, da (i) sie bei beinahe allen APL-Patienten festgestellt wird (Warrell, R. P., et al., N. Engl. J. Med. 329: 177–189 (1993); Grignani, F., et al., Blood 83: 10–25 (1994); Lavau, C., und Dejean, A., Leukemia 8: 1615–1621 (1994)), (ii) sie bei Überexprimierung in U937 oder HL60 myeloblastischen Leukämiezellen Myeloiddifferenzierung hemmt ((Grignani, F., et al., Cell 74: 423–431 (1993)) und (iii) vollständige klinische Remission auf Grund von . Differenzierung der Leukämiezellen zu ausgereiften Granulozyten bei Behandlung mit all-trans-Retinolsäure (T-RA) eng mit der PML-RAR $\alpha$ -Expression verbunden ist (Warrell, R. P., et al., N. Engl. J. Med. 324: 1385–1393 (1991); Lo Coco, R., et al., Blood 77: 1657–1659 (1991); Chomienne, C., et al., FASEB J. 10: 1025–1030 (1996)). Mehrere Studien haben sich mit der möglichen Auswirkung von PML-RAR $\alpha$ -Fusionsproteinbildung auf die Zellenproliferation (Mu, X. M., et al., Mol. Cell. Biol. 14: 6858–6867 (1994)) und Apoptose (Grignani, F., et al., Cell 74: 423–431 (1993)), AP1-Transrepression (Ducas, V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9345–9349 (1993)) und Vitamin-D3-Signalisierung (Perez, A., et al., EMBO J. 12: 3171–3182 (1993)) beschäftigt, aber der Mechanismus/die Mechanismen, mit dessen/deren Hilfe PML-RAR $\alpha$  die Myeloidzellenausreifung blockiert, ist weiterhin schwer zu bestimmen. In Übereinstimmung mit der abweichenden nuklearen Kompartimentierung von PML-RAR $\alpha$ , der den „PML-Typ“-Standort bei RA-Behandlung einnimmt (Dyck, J. A., et al., Cell 76: 333–343 (1994); Weis, K., et al., Cell 76: 345–358 (1994); Koken, M. H., et al., EMBO J. 13: 1073–1083 (1994)), lautet die zur Zeit vorherrschende Hypothese, dass PML-RAR $\alpha$  veränderte transkriptionale Eigenschaften im Vergleich zu PML oder RAR $\alpha$  besitzt und/oder auf dominant-negative Weise agieren kann (Perez, A., et al., EMBO J. 12: 3171–3182 (1993); de Thé, H., et al., Cell 66: 675–684 (1991); Kastner, P., et al., EMBO J. 11: 629–642 (1992)).

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die Erfindung stellt pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, die mindestens einen RAR-Antagonisten, der vorzugsweise ein RAR $\alpha$ -Antagonist und am meisten bevorzugt Verbindung A oder Verbindung B ist, mindestens einen RXR-Agonisten, der am meisten bevorzugt SR11237 ist, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder ein Arzneibindemittel dafür umfassen. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen bei der Herstellung eines Medikamentes zur Verwendung bei der Behandlung eines Tieres, vorzugsweise eines Menschen, das an Krebserkrankungen (vorzugsweise an Hautkrebs, Mundhöhlenkrebs, Lungenkrebs, Brustdrüsenkrebs, Prostatakrebs, Blasenkrebs, Leberkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Eierstockkrebs, Krebs des Kopf- und Halsbereiches, Darmkrebs, Keimzellenkrebs, wie Teratokarzinom oder einer Leukämie, und am meisten bevorzugt akuter Promyelozytenleukämie), einer Hauterkrankung (vorzugsweise Psoriasis, aktinische Keratose, Akne, Ichthyosis, Lichtalterung oder kortikoid-induzierte Hautatrophie), rheumatischer Arthritis und einer prämaligen Läsion leidet oder dazu prädisponiert ist.

## KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0016] **Fig. 1:** Zusammenfassung agonistischer und antagonistischer Aktivitäten der verschiedenen BMS synthetischen Retinoide. "+" steht beim jeweiligen Rezeptor für agonistisch, "(+)" für schwach agonistisch, "–" für antagonistisch und "0" für keine Aktivität.

[0017] **Fig. 2:** Falschfarbendarstellung einer einzelnen Photon-Kameraanalyse von Retinoidinduzierter Luciferase-Aktivität, die aus HeLa-Reporterzellen hervorgeht, die nur mit RARspezifischen Liganden (Lane a) oder mit 10 nM all-trans-RA (Lane b) behandelt wurden.

[0018] **Fig. 3:** Synergie zwischen RAR $\alpha$ -Agonisten oder Antagonisten und RXR-Agonisten für die Induktion von NB4-Zelldifferenzierung. Mikrofotografien von Zellen, die mit Nitroblau-Tetrazolium (a–d) gefärbt wurden oder Immunofluoreszenz-Mikrofotografien von Zellen, die nach 4-tägiger Behandlung mit Ethanol oder den/dem angeführten Retinoid(en) mit Anti-PML-Antisera (e–h) gefärbt wurden.

[0019] **Fig. 4:** Synergie zwischen RAR $\alpha$ -Agonisten oder Antagonisten und RXR-Agonisten für die Induktion

von NB4-Zellenapoptose. Auswirkungen von Retinoiden auf die Zellzyklusverteilung und Auftreten von „sub-2N“ apoptotischen Zellen und Partikeln, so wie durch Flusszytometrie-Analyse gezeigt. Die Horizontalachse bei den Histogrammen zeigt die integrierte Fluoreszenzintensität und die vertikale Achse die Anzahl an Partikeln an. In jedem Histogramm werden ungefähr 20.000 Partikel dargestellt; Histogramme, welche die Anzahl der Zellen anzeigen, die eine 2N, 4N oder Zwischenmenge von DNA für unbehandelte NB4-Zellen (a) enthalten, Zellen, die mit 1 mM T-RA über einen Zeitraum von 4, 6 oder 8 Tagen (b–d) behandelt werden, 1 nM Am80 über einen Zeitraum von 4 oder 8 Tagen (e, f) oder die Kombination aus 100 nM von Verbindung A und 100 nM von SR11237 über einen Zeitraum von 4 oder 8 Tagen (g, h).

[0020] **Fig. 5:** Retinoid-Induktion von Apoptose in NB4-Zellen. Mikrofotografie eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gels in einem DNA-Fragmentations-Assay, ausgeführt mit Zellen, die in Abwesenheit (Lanes 2–4) oder Gegenwart (Lanes 5–13) der angeführten Retinoide in folgenden Konzentrationen gezüchtet werden: T-RA; 100 nM; Am80, 1 nM; SR11237, 100 nM; Verbindung A, 10 nM (Lanes 9 und 10) und 100 nM (Lanes 12 und 13).

[0021] **Fig. 6:** Fotografien von sequenzierenden Gels, welche Synergismus von RAR $\alpha$  und RXR zeigen. Zellen wurden mit Agonisten, so wie angeführt, behandelt, dann wie unten beschrieben für Ligations-herbeigeführte PCR (a, b) oder Umkehr-Transkriptase PCR (c) verarbeitet und auf einem Sequenzierungsgel aufgelöst. (a) NB4-Zellen, Autoradiogramm; (b) P19-Zellen, Autoradiogramm; (c) NB4-Zellen, Ethidiumbromid-gefärbtes Gel (RNA-Transkripte des  $\beta$ -Aktin-Gens wurden als Kontrolle verwendet).

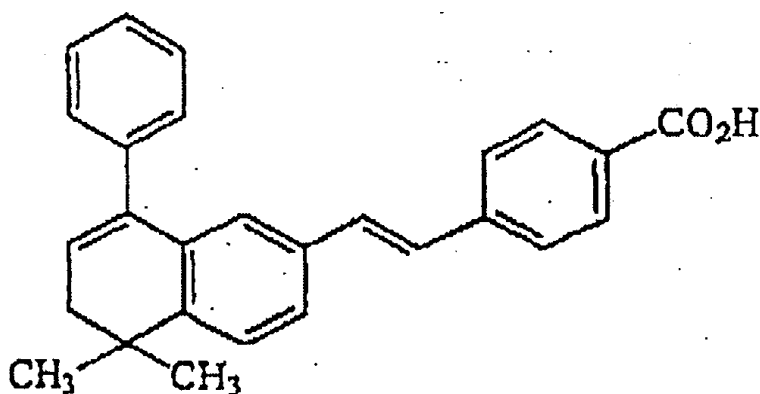
## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

### Synthese von RAR und RXR-Agonisten und Antagonisten

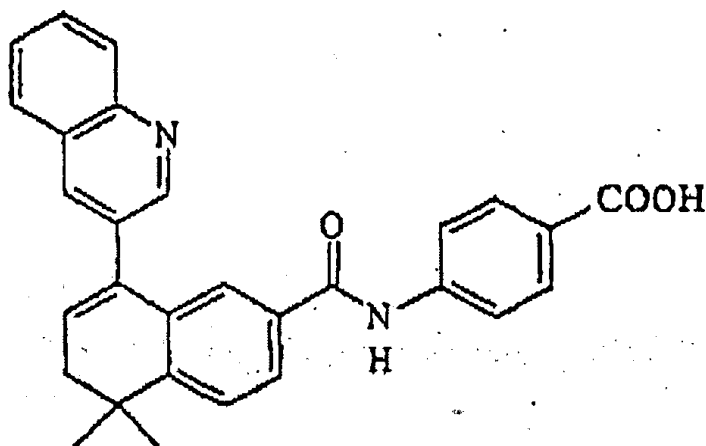
[0022] Die in der vorliegenden Erfindung zu verwendenden Wirkstoffe können – ohne darauf beschränkt zu sein – natürliche oder synthetische Peptide, Kohlenhydrate, Steroide und Vitaminderivate (sein (deren Herstellung zum Beispiel unter Anwendung von Verfahren der synthetischen, organischen und anorganischen Chemie erfolgt, die auf dem Fachgebiet weithin bekannt sind). Gemäß der Erfindung können die Wirkstoffe nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und gescrēent werden. Für Zufalls-Screening werden Wirkstoffe wie Peptide, Kohlenhydrate, Steroide oder Vitaminderivate (z. B. RA-Derivate) zufällig ausgewählt und untersucht, unter Verwendung direkter oder indirekter Verfahren, die auf dem Fachgebiet als Routinevorgang gelten, um ihre Fähigkeit, an einen RAR- oder RXR-Rezeptor oder ein funktionelles Retinoid-RAR : RXR-Rezeptorheterodimer zu binden, zu untersuchen. So schließen zum Beispiel mögliche RAR-Agonisten gemäß der vorliegenden Erfindung synthetische Retinoide wie Am580, Verbindung 1 und Verbindung 2 (deren Strukturen in Ostrowski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1812–1816 (1995) offenbart sind) und Am80 (Roy et al., Mol. Cell. Biol. 15(12): 6481–6487 (1995) ein. Mögliche RXR-Agonisten gemäß der vorliegenden Erfindung schließen synthetische Retinoide wie SR11237 (deren Struktur in Lehman, J. M., et al., Science 258: 1944–1946 (1992) offenbart ist) ein. Mögliche RAR-Antagonisten schließen – ohne darauf beschränkt zu sein – die zuvor beschriebenen (Chen et al., EMBO J. 14: 1187–1197 (1995); Roy et al., Mol. Cell. Biol. 15(12): 6481–6487 (1995); Chen et al., EMBO J. 14: 1187–1197 (1995) und Verbindung A und Verbindung B, wie unten im Detail beschrieben, ein.

[0023] Somit sind auf dem Fachgebiet Verfahren bekannt, um mögliche RAR-Antagonisten und RXR-Agonisten für das Screening, so wie unten beschrieben, zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung zu entwickeln. Die Erfindung kann insbesondere mit den RAR-Antagonisten-Verbindungen ausgeführt werden, die hierin als „Verbindung A“ und „Verbindung B“ bezeichnet werden und folgende Strukturen aufweisen:

Verbindung A:



## Verbindung B:



[0024] Diese Verbindungen können, so wie in der US-Patentschrift Nr. 5,559,248 beschrieben, hergestellt werden. Andere nützliche RAR-Antagonisten werden zum Beispiel in Eyrolles et al., Med. Chem. Res. 2: 361–367 (1992) und Apfel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7129–7133 (1992) beschrieben. Die Erfindung kann auch mit dem RXR-Agonisten LG1069 ausgeführt werden, dessen Struktur und Herstellung in Boehm et al., J. Med. Chem. 37: 2930–2941 (1994) beschrieben sind. Andere nützliche RXR-Agonisten sind zum Beispiel in Lehman et al., Science 258: 1944–1946 (1992) beschrieben. Andere RAR-Antagonisten und RXR-Agonisten, die sich zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung eignen, können durch die oben genannten Verfahren und andere Verfahren hergestellt werden, die für einen Durchschnittsfachmann als Routine gelten.

Screening-Verfahren Eine Reihe von Verfahren für das Screening von möglichen RAR-Antagonisten und

[0025] RXR-Agonisten, die durch rationales Design oder Computermodellierung wie oben beschrieben erzeugt werden, sind auf dem Fachgebiet weithin bekannt und ermöglichen es einem Durchschnittsfachmann, festzustellen, ob eine Verbindung im Rahmen der vorliegenden Erfindung nützlich ist. Zum Beispiel wurden in Chen et al., EMBO J. 14(6): 1187–1197 (1995) drei „Reporter“-Zelllinien verwendet, um eine Reihe von RAR $\alpha$ -, RAR $\beta$ - oder RAR $\gamma$ -spezifischen dissoziierenden synthetischen Retinoiden zu charakterisieren, die selektiv die AF-2-Aktivierungsfunktion induzieren, welche in der LBD von RAR $\beta$  (BAF-2) vorhanden ist (Chen, J.-Y., et al., EMBO J. 14(6): 1187–1197 (1995)). Diese Zelllinien exprimieren auf stabile Weise chimäre Proteine, welche die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transaktivators GAL4 enthalten, der an die EF-Regionen (welche die LBD und die AF-2-Aktivierungsfunktion enthalten) von RAR $\alpha$  (GAL-RAR $\alpha$ ), RAR $\beta$  (GAL-RAR $\beta$ ) oder RAR $\gamma$  (GAL-RAR $\gamma$ ) fusioniert ist, und ein Luciferase-Reportergen, das durch ein Pentamer der GAL4-Erkennungssequenz ('17m') vor dem  $\beta$ -Globinpromotor (17m)5-GAL-Luc) getrieben wird. In diesen Zelllinien induzieren die RAR- Liganden somit Luciferase-Aktivität, die in den intakten Zellen unter Verwendung einer Einzel-Photon-Zählungs-Kamera gemessen werden kann. Dieses Reportersystem ist endogenen Rezeptoren gegenüber, welche die GAL4-Bindungsstelle nicht erkennen können, unempfindlich. Bei Verwendung von analogen Screening-Assays wurde festgestellt, dass diese synthetischen Retinoide, wie RA, das verankerungsunabhängige Wachstum von Onkogen-transformierten 3T3-Zellen hemmen, während in Bezug auf den Promotor des menschlichen Interleukin-6 (IL-6) Gens, dessen Produkt in die Regulierung der Hämatopoese, Immunreaktionen und Entzündung (Kishimoto, T. et al., Science 258: 593–597 (1992)) involviert ist, festgestellt wurde, dass er durch RA induziert wird und nicht durch die synthetischen dissoziierenden Retinoide, welche seine Aktivität unterdrücken. Auf ähnliche Weise wurden RXR-Agonisten identifiziert, unter Verwendung von Zelllinien, die einen RXR-Rezeptor exprimieren, der mit einem TREpal-tk-Reportergen verbunden ist, das sowohl durch RAR-RXR-Heterodimere als auch RXR-Homodimere aktiviert wird (Lehmann, J. M., et al., Science 258: 1944–1946 (1992)). Somit können Reporterzelllinien, die durch Verfahren, die für einen Durchschnittsfachmann Routine sind, leicht herzustellen sind, nicht nur dazu verwendet werden, die spezifischen RAR- oder RXR-Typen, an die ein möglicher Ligand binden wird, zu unterscheiden, sondern auch um festzustellen, ob dieses Binden einen aktivierenden (d. h. agonistischen) oder repressiven (d. h. antagonistischen) Effekt induziert. Obwohl die oben angeführten Reporterzelllinien die Luciferase- oder Thymidinkinase-Gene als Reporter umfassten, sind andere Reporter wie Neo, CAT,  $\beta$ -Galactosidase oder Grünes Fluoreszierendes Protein auf dem Fachgebiet weithin bekannt und können auf ähnliche Weise verwendet werden, um die vorliegende Erfindung auszuführen. Zu den Referenzen, die Reporterplasmide offenbaren, welche ein Reportergen und Expressionsvektoren enthalten, die eine LBD eines nuklearen Rezeptors codieren, gehören zum Beispiel Meyer et al., Cell 57: 433–442 (1989); Meyer et al., EMBO J. 9(12): 3923–3932 (1990); Tasset et al., Cell 62: 1177–1187



(1990); Gronemeyer, H., und Laudet, V., Protein Profile 2: 1173–1308 (1995); Webster et al., Cell 54: 199–207 (1988); Strähle et al., EMBO J. 7: 3389–3395 (1988); Seipel et al., EMBO J. 11: 4961–4968 (1992); und Nagpal et al., EMBO J. 12: 2349–2360 (1993).

[0026] Andere routinemäßige Untersuchungen wurden verwendet, um Verbindungen auf deren agonistische oder antagonistische Auswirkungen auf Funktionen von anderen nuklearen Rezeptoren, wie Steroid-Rezeptoren, zu untersuchen. So wurde zum Beispiel ein transientes Expressions-/Gelverzögerungssystem verwendet, um die Auswirkungen der synthetischen Steroide RU486 und R5020 auf die Glucocorticoid- und Progesteronrezeptorfunktion zu untersuchen (Meyer, M-E., et al., EMBO J. 9(12): 3923–3932 (1990)). Ähnliche Untersuchungen wurden verwendet, um zu zeigen, dass Tamoxifen Estradiol-induziertes ERAP160-Binden an den Estrogenrezeptor kompetitiv hemmt; was einen Mechanismus für seine wachstumshemmenden Wirkungen bei Brustkrebs vermuten lässt (Halachimi, S., et al., Science 264: 1455–1458 (1994)). Da die RAR- und RXR-Rezeptoren anscheinend anderen nuklearen Rezeptoren wie den Steroidrezeptoren strukturell ähnlich sind (wie in Chambon, P., FASEB J. 10: 940–954 (1996) besprochen), können routinemäßige Untersuchungen dieser Art bei der Bewertung von Verbindungen im Hinblick auf deren agonistisches oder antagonistisches Wirken auf RAR- oder RXR-Rezeptoren nützlich sein.

[0027] Als alternatives, routinemäßiges Verfahren kann die Auswirkung eines möglichen Agonisten oder Antagonisten auf das Binden des Ligand-abhängigen AF-2 Modulators TIF1 an eine RAR oder RXR LBD unter Verwendung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Interaktionsassays durch Markieren der LBDs mit GST untersucht werden, wie im Detail in Le Douarin et al., EMBO J. 14: 2020–2033 (1995) beschrieben.

[0028] In einer anderen Screening-Untersuchung können transgene Mäuse und Zelllinien, die in ihrer Expression eines oder mehrerer RAR- oder RXR-Rezeptoren verändert werden, so wie zuvor beschrieben hergestellt (Krezel, W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(17): 9010–9014 (1996) und verwendet werden, um Agonisten und Antagonisten spezifischer Mitglieder der RAR/RXR-Klasse von Rezeptoren unter Anwendung der zuvor beschriebenen Verfahren (WO 94/26100) zu identifizieren. Bei einer solchen Untersuchung wird der Wirkstoff, der zu testen ist, mit einer oder mehreren der transgenen Zelllinien oder Mäuse oder Geweben, die davon entnommen sind, inkubiert. Danach wird der Grad der Bindung des Wirkstoffes bestimmt, oder die Auswirkung, welche der Wirkstoff auf die Entwicklung oder Genexpression hat, wird mit Hilfe von Techniken überwacht, die für einen Durchschnittsfachmann als Routine gelten. So wie hierin verwendet, ist der Begriff „inkubieren“ so zu verstehen, dass die Verbindung oder der Wirkstoff, die untersucht werden, mit der geeigneten Zelle oder dem geeigneten Gewebe in Kontakt gebracht werden, oder dass der Wirkstoff oder die Verbindung der geeigneten Maus über einen der weithin bekannten Verabreichungswege, einschließlich enterale, intravenöse, subkutane und intramuskuläre Verabreichung, verabreicht wird.

[0029] Es können auch andere Untersuchungen, so wie jene, die im Detail unten in Beispiel 1 und 2 beschrieben werden, verwendet werden, um die agonistischen oder antagonistischen Auswirkungen von RAR- und RXR-Liganden zu bestimmen. Zum Beispiel werden bestimmte agonistische Retinoide die Assoziation von endogenem PML/PML-RAR $\alpha$ -Fusionsprotein mit nuklearen Körpern in Zellen von APL-Patienten (Dyck, J. A., et al., Cell 76: 333–343 (1994); Weis, K., et al., Cell 76: 345–356 (1994); Koken, M. H. M., et al., EMBO J. 13(5): 1073–1083 (1994)) oder in verwandten etablierten Zelllinien wie NB4 (Lanotte, M., et al., Blood 77(5): 1080–1086 (1991)) induzieren. Diese Auswirkungen von RAR- oder RXR-Agonisten oder Antagonisten können zum Beispiel durch verschiedene immunologische Techniken wie Immunofluoreszenz- oder Immunoelektronmikroskopie unter Verwendung von Antikörpern bestimmt werden, die für PML, RAR und/oder PML-RAR $\alpha$ -Fusionsproteine spezifisch sind. RAR- oder RXR-Agonisten oder Antagonisten können auch durch ihre Fähigkeit, die in vitro Differenzierung (Ausreifung) von bestimmten etablierten Zelllinien wie HL-60 myeloblastische Leukämiezellen (Nagy, L., et al., Mol. Cell. Biol. 15(7): 3540–3551 (1995)), NB4 promyelozytische Zellen (Lanotte, M., et al., Blood 77(5): 1080–1086 (1991), P19 oder P9 embryonale Karzinomzellen (Roy, B., et al., Mol. Cell. Biol. 15(12): 6481–6487 (1995); Horn, V., et al., FASEB J. 10: 1071–1077 (1996)) oder ras-transformierte 3T3-Zellen (Chen et al., EMBO J. 14(6): 1187–1197 (1995)) zu induzieren, identifiziert werden. Ligand-induzierte Differenzierung in diesen und anderen Zelllinien kann bestimmt werden, indem Ligand-behandelte oder Ligand-unbehandelte Zellen für die Expression einer Vielzahl von weithin bekannten Differenzierungsmarkern einer Untersuchung unterzogen werden, wie in den oben genannten Referenzen im Allgemeinen beschrieben.

[0030] Ebenso können die möglichen Antagonisten oder Agonisten durch Messen ihrer Fähigkeit, Apoptose (programmierter Zelltod) in zum Beispiel HL-60 Zellen Nagy, L., et al., Mol. Cell. Biol. 15(7): 3540–3551 (1995)) oder P19-Zellen (Horn, V., et al., FASEB J. 10: 1071–1077 (1996)) oder in anderen primären Zellen oder etablierten Zelllinien zu induzieren, gescreent werden. Apoptose wird typischerweise durch Messung von Ligand-induzierter DNA-Fragmentation bewertet, die durch Verfahren wie Gel-Elektrophorese (Auftreten von kleinen Molekulargewichtbanden), Mikroskopie (Veränderungen bei der Plasmamembranmorphologie, wie z. B. Bildung von Oberflächenausstülpungen („Blasen“), oder bei der nuklearen Morphologie, wie z. B. Pyknose oder Fragmentation) oder Expression des putativen Apoptose-Suppressiv-Proteins BCL-2 (in apoptotischen Zellen verringert) durchgeführt wird; zwecks allgemeiner Verfahren und Besprechungen dieser Assays, soweit

diese sich auf die RAR- und RXR-Biologie beziehen, siehe Nagy, L., et al., *Mol. Cell. Biol.* 15(7): 3540–3551 (1995); Horn, V., et al., *FASEB J.* 10: 1071–1077 (1995)). Andere Verfahren für eine Untersuchung von Ligand-induzierter Apoptose in primären Zellen und etablierten Zelllinien, wie Flusszytometrie oder Partikelanalyse (Auftreten von kleineren Partikeln mit unterschiedlichem Lichtstreuungs- und/oder DNA-Inhaltsprofil) sind auf dem Fachgebiet weithin bekannt (Telford; W. G., et al., *J. Immunol. Meth.* 172(1): 1–16 (1994); Campana, D. et al., *Cytometry* 18(2): 68–74 (1994); Sgonc, R., und Wick, G., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105(4): 327–332 (1994); Fraker, P. J., et al., *Meth. Cell. Biol.* 46: 57–76 (1995); Sherwood, S. W., und Schimke, R. T., *Meth. Cell. Biol.* 46: 77–97 (1995); Carbonari, M., et al., *Cytometry* 22(3): 161–167 (1995); Mastrangelo, A. J. und Betenbaugh, M. J., *Curr. Opin. Biotechnol.* 6(2): 198–202 (1995)). Schließlich kann das Screening von Agonisten oder Antagonisten durch eine Untersuchung erfolgen, die als „in vivo Footprinting“ bekannt ist (Mueller, P. R., und Wold, B., *Science* 246: 780–786 (1989); Garrity, P. A., und Wold, B. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1021–1025 (1992)), wie unten detaillierter in Beispiel 1 und 2 beschrieben, wobei sich diese Untersuchung für die Analyse von RA-induzierter Transkription von RAR $\beta$ 2 als nützlich erwiesen hat (Dey, A., et al., *Mol. Cell. Biol.* 14(12): 8191–8201 (1994)).

[0031] Andere Verfahren zur Bestimmung der agonistischen oder antagonistischen Aktivitäten eines möglichen Liganden, die auf dem Fachgebiet als Routine gelten, können auch bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Bei der Durchführung solcher Untersuchungen wird ein Fachmann in der Lage sein, zu bestimmen, an welchen RAR- oder RXR-Rezeptortyp ein Wirkstoff bindet, welcher) spezifische(n) Rezeptoren) von einer bestimmten Verbindung verwendet wird (werden) und ob der Wirkstoff ein Agonist oder Antagonist des (der) bestimmten Rezeptors (Rezeptoren) ist.

#### Klinische Indikationen

[0032] Somit sind Verfahren zur Identifikation, Synthetisierung und zum Screening von RAR-Antagonisten und RXR-Agonisten auf dem Fachgebiet weithin bekannt. Diese Liganden können dann gemäß der vorliegenden Erfindung bei der Behandlung einer Reihe von physischen Beschwerden bei Tieren, insbesondere Säugetieren – einschließlich Menschen – eingesetzt werden. Wie oben beschrieben, ist bekannt, dass Retinolsäure die proliferierenden und differenzierenden Fähigkeiten von mehreren Säugetierzelltypen reguliert (Gudas, L. J. et al., (1994), In Sporn, M. B., Roberts, A. B. und Goodman, D. S. (Hrsg), *The Retinoids*. 2. Ausgabe, Raven Press, New York, Seiten 443–520). Retinoide wurden somit in einer Reihe von chemopräventiven und chemotherapeutischen Anwendungen eingesetzt. Zu diesen klinischen Ansätzen gehören die Prävention und/oder Behandlung einer Reihe von Krebsleiden und prämaligen Läsionen davon, wie zum Beispiel jene der Mundhöhle, Haut (einschließlich Plattenepithelkarzinom, Melanom und Kaposi-Sarkom), Kopf- und Halsbereich, Gebärmutterhals, Eierstock, Lunge, Brustdrüse, Blase, Prostata, Leber und Bauchspeicheldrüse (Hong, W. K., et al., *N. Engl. J. Med.* 315: 1501–1505 (1986); Verma, A. K., *Cancer Res.* 47: 5097–5101 (1987); Hong, W. K., et al., *N. Engl. J. Med.* 323: 795–801 (1990); Kraemer, K. H., et al., *N. Engl. J. Med.* 318: 1633–1637 (1988); Bonhomme, L., et al., *Ann. Oncol.* 2: 234–235 (1991); Bollag, W., et al., *Ann. Oncol.* 3: 513–526 (1992); Chiesa, F., et al., *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.* 28: 97–102 (1992); Lippman, S. M., et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 235–241 (1992); Lippman, S. M., et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 241–245 (1992); Costa, A., et al., *Cancer Res.* 54(Suppl. 7): 2032–2037 (1994); de Thé, H., *FASEB J.* 10: 955–960 (1996); Lotan, R., *FASEB J.* 11: 1031–1039 (1996); Bérard, J., et al., *FASEB J.* 10: 1091–1097 (1996)). Retinoide wurden insbesondere dazu verwendet, Patienten zu behandeln, die unter bestimmten Leukämiearten litten, insbesondere unter akuter Promyelozytenleukämie (Huang, M. E., et al., *Blood* 72: 567–572 (1988); Castaigne, S., et al., *Blood* 76: 1704–1709 (1990); Chomienne, C., et al., *Blood* 76: 1710–1717 (1990); Chomienne, C., et al., *J. Clin. Invest.* 88: 2150–2154 (1991); Chen, Z., et al., *Leukemia* 5: 288–292 (1991); Lo Coco, F., et al., *Blood* 77: 1657–1659 (1991); Warrell, R. P., et al., *N. Engl. J. Med.* 324: 1385–1393 (1991); Chomienne, C., et al., *FASEB J.* 10: 1025–1030 (1996)). Retinoide haben sich auch bei der Behandlung von bestimmten Hautleiden wie Psoriasis, Akne, Ichthyosis, Lichtalterung und Corticoid-induzierter Hautatropie wie jener, die bei lokaler Verwendung von Kortikosteroiden im Rahmen der Behandlung von Hautentzündungen auftritt, als wirksam erwiesen (Fisher, G. J. und Voorhees, J. J., *FASEB J.* 10: 1002–1013 (1996)).

[0033] Somit können die Kombinationen von RAR-Antagonisten und RXR-Agonisten der vorliegenden Erfindung bei der Herstellung eines Medikamentes zur Verwendung bei der Behandlung eines Tieres, vorzugsweise eines Säugetieres – einschließlich eines Menschen – verwendet werden, das an einer Reihe von physischen Beschwerden leidet oder dafür prädisponiert ist. So wie hierin verwendet, wird ein Tier, das für ein physisches Leiden „prädisponiert“ ist, als ein Tier definiert, das nicht eine Vielzahl an offensichtlichen physischen Beschwerdesymptomen aufweist, das aber genetisch, physiologisch oder aus anderen Gründen Gefahr läuft, ein Leiden zu entwickeln. Die Kombinationen aus RAR-Antagonisten und RXR-Agonisten können somit prophylaktisch als chemopräventive Wirkstoffe für solche Leiden eingesetzt werden. Bei der Behandlung des Tieres mit den Kombinationen der vorliegenden Erfindung kann der RXR-Agonist dem Tier vor, gleichzeitig mit oder nach der Verabreichung des RAR-Antagonisten verabreicht werden.

[0034] Zu den physischen Leiden, die mit den Kombinationen und Verfahren der vorliegenden Erfindung behandelt werden können, zählen eine Reihe von Krebserkrankungen wie Hautkrebs (einschließlich Melanom und Kaposi-Sarkom), Mundhöhlenkrebs, Lungenkrebs, Brustdrüsenkrebs, Prostatakrebs, Blasenkrebs, Leberkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Eierstockkrebs, Krebs des Kopf- und Halsbereiches, Darmkrebs, Keimzellenkrebs (einschließlich Teratokarzinom) und Leukämie, am meisten bevorzugt akute Promyelozytenleukämie. Andere physische Leiden, die mit den Kombinationen und Verfahren der vorliegenden Erfindung behandelt werden können, schließen Hautleiden wie Psoriasis, aktinische Keratose, Akne, Ichthyosis, Lichtalterung und corticoid-induzierte Hautatrophie und rheumatische Arthritis ein. Die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung können auch bei der Prävention des Krankheitsfortschritts eingesetzt werden, wie zum Beispiel in der Chemoprävention des Fortschritts einer prämaligen Läsion zu einer malignen Läsion. Die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung können auch verwendet werden, um ein Tier zu behandeln, das an anderen physischen Beschwerden leidet oder für solche prädisponiert ist, die auf Behandlung mit Retinoiden ansprechen.

#### Formulierung und Verfahren zur Verabreichung

[0035] Wie oben angeführt, ist bekannt, dass RAR- und RXR-selektive Liganden eine große Bandbreite an Zellreaktionen hervorrufen, von denen einige in Form klinischer Anwendungen bei der Behandlung eines Patienten eingesetzt werden. Der Begriff „Patient“ steht im vorliegenden Dokument für ein Tier, vorzugsweise ein Säugetier, einschließlich eines Menschen. Durch die Erfindung kann die Dosis von einem oder mehreren RAR-Antagonisten deutlich reduziert werden, wenn sie gemeinsam mit mindestens einem RXR-Agonisten verabreicht wird. Wie hierin verwendet, wird „eine wirksame Menge eines RAR(oder RXR-)Antagonisten“ als eine Menge definiert, die so wirkt, dass sie eine Zellreaktion in Zellen hervorruft, die einen RAR- (oder RXR)-Rezeptor exprimieren. Weiter unten werden beispielhafte klinische Therapien, bei denen einem Patienten Zusammensetzungen verabreicht werden, die mindestens einen RAR-Antagonisten und mindestens einen RXR-Agonisten umfassen, näher beschrieben.

[0036] Kombinationen aus RAR-Agonisten und RXR-Agonisten mit potentieller Verwendung bei der Therapie von Menschen sind auf dem Fachgebiet bekannt (Lehmann, J. M., et al., Science 258: 1944–1946 (1992); Durand, B., et al., EMBO J. 13: 5370–5382 (1994); Lotan, R., et al., Cancer Res. 55: 232–236 (1995); Roy, B., et al., Mol. Cell. Biol. 15(12): 6481–6487 (1995); Horn, V., et al., FASEB J. 10: 1071–1077 (1996)). Keine dieser vorhergehenden Offenbarungen hat jedoch die unerwartete Erkenntnis aus der vorliegenden Erfindung beschrieben oder vorhergesehen, die darin besteht, dass Kombinationen aus RAR-Antagonisten und RXR-Agonisten bei der Behandlung einer Reihe von physischen Leiden nützlich sind.

[0037] Somit werden pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt, die mindestens einen RAR-Antagonisten (wie jene, die oben beschrieben wurden), mindestens einen RXR-Agonisten (wie jene, die oben beschrieben wurden) und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder ein Arzneibindemittel umfassen und die oral, rektal, parenteral, intrasystemisch, intravaginal, intraperitoneal, lokal (beispielsweise in Form von Pulvern, Salben, Tropfen oder transdermalen Kissens oder Pflaster), bukkal oder als Mund- oder Nasenspray verabreicht werden können. Wichtig ist dabei, dass durch gemeinsames Verabreichen eines RAR-Antagonisten und eines RXR-Agonisten die klinischen Nebenwirkungen durch Verwendung geringerer Dosen des RAR-Antagonisten und des RXR-Agonisten reduziert werden können. Wie angeführt, wird erkannt werden, dass der RXR-Agonist entweder vor, nach oder gleichzeitig mit dem RAR-Antagonisten „gemeinsam verabreicht“ werden kann, je nach Anforderungen einer speziellen therapeutischen Anwendung. Unter „pharmazeutisch annehmbarem Träger“ ist ein nicht-toxisches, festes, halbfestes oder flüssiges Füllmaterial, Verdünnungsmittel, Einkapselungsmaterial oder Formulierungshilfsmittel jeglicher Art zu verstehen. Der Begriff „parenteral“ bezieht sich in der hierin verwendeten Weise auf die Arten der Verabreichung, zu denen intravenöse, intramuskuläre, intraperitoneale, intrasternale, subkutane und intraartikuläre Injektion und Infusion gehören.

[0038] Pharmazeutische Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zur Verwendung bei parenteraler Injektion können pharmazeutisch annehmbare, sterile, wässrige: oder nichtwässrige Lösungen, Dispersionen, Suspensionen oder Emulsionen sowie sterile Pulver für die Rekonstitution in sterile injizierbare Lösungen oder Dispersionen unmittelbar vor der Verwendung umfassen. Beispiele geeigneter wässriger und nicht-wässriger Träger, Verdünnungsmittel, Lösemittel oder Vehikel schließen Wasser, Ethanol, Polyole (wie Glycerin, Propylenglycol, Polyethylenglycol und dergleichen), Carboxymethylcellulose und geeignete Mischungen davon, pflanzliche Öle (wie Olivenöl) und injizierbare organische Ester wie Ethyloleat ein. Eine geeignete Fließfähigkeit kann zum Beispiel durch die Verwendung von Beschichtungsmaterial wie Lecithin, durch Aufrechterhaltung der erforderlichen Partikelgröße im Falle von Dispersionen und durch die Verwendung von oberflächenaktiven Stoffen gewährleistet werden.

[0039] Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch Hilfsstoffe wie Konservierungsmittel; Benetzungsmittel, Emulgiermittel und Dispersionsmittel enthalten. Die Prävention der Wirkung von Mikroorganismen kann durch das Einschließen verschiedener antibakterieller Wirkstoffe und Fungizide wie zum

Beispiel Paraben, Chlorobutanol, Phenolsorbinsäure und dergleichen gewährleistet werden. Es kann auch wünschenswert sein, isotonische Wirkstoffe wie Zucker, Natriumchlorid und dergleichen einzuschließen. Eine verlängerte Absorption der injizierbaren pharmazeutischen Form kann durch das Einschließen von Wirkstoffen erfolgen, welche die Absorption verzögern, wie Aluminiummonostearat und Gelatine.

[0040] In einigen Fällen ist es wünschenswert, die Absorption von subkutaner oder intramuskulärer Injektion zu verlangsamen, um die Wirkung der Arzneimittel zu verlängern. Dies kann durch die Verwendung einer flüssigen Suspension von kristallinem oder amorphem Material mit geringer Wasserlöslichkeit erfolgen. Die Absorptionsrate des Arzneimittels hängt dann von seiner Auflösungsrate ab, die wiederum von der Kristallgröße und der kristallinen Form abhängen kann. Alternativ dazu wird eine verzögerte Absorption einer parenteral verabreichten Arzneimittelform durch Auflösen oder Suspendieren des Arzneimittels in einem Ölvehikel erzielt.

[0041] Injizierbare Depotformen werden durch Bilden von Mikroinkapselungsmatrizen des Arzneimittels in biologisch abbaubaren Polymeren wie Polylactid-Polyglycolid hergestellt. In Abhängigkeit vom Verhältnis des Arzneimittels zum Polymer und der Natur des jeweiligen Polymers, das eingesetzt wird, kann die Rate der Arzneimittelfreigabe gesteuert werden. Beispiele anderer biologisch abbaubarer Polymere schließen Poly(orthoester) und Poly(anhydride) ein. Depot-injizierbare Formulierungen werden auch durch Einschluss des Arzneimittels in Liposome oder Mikroemulsionen hergestellt, die mit Körpergeweben kompatibel sind.

[0042] Die injizierbaren Formulierungen können zum Beispiel mittels Filtrierung durch einen Bakterienrückhaltefilter oder durch Aufnahme von sterilisierenden Wirkstoffen in der Form von sterilen, festen Zusammensetzungen sterilisiert werden, die in sterilem Wasser oder in einem anderen sterilen, injizierbaren Medium unmittelbar vor der Verwendung aufgelöst oder dispergiert werden können.

[0043] Feste Dosierungsformen für die orale Verabreichung schließen Kapseln, Tabletten, Pillen, Pulver und Granulate ein. Bei solchen festen Dosierungsformen werden die aktiven Verbindungen mit mindestens einem pharmazeutisch annehmbaren Arzneibindemittel oder Träger wie Natriumcitrat oder Dicalciumphosphat und/oder a) Füllmitteln oder Streckmitteln wie Stärken, Lactose, Sucrose, Glucose, Mannitol und Kieselsäure (b) Bindemitteln wie zum Beispiel Carboxymethylcellulose, Alginaten, Gelatine, Polyvinylpyrrolidon, Sucrose und Acacia, c) Anfeuchtern wie Glycerin, d) Aufbrechmitteln wie Agar-Agar, Calciumcarbonat, Kartoffel- oder Tapioka-Stärke, Alginsäure, bestimmte Silikate und Natriumcarbonat, (e) Lösungsverzögerungsmitteln wie Paraffin, (f) Absorptionsbeschleunigern wie quaternäre Ammoniumverbindungen, (g) Benetzungsmitteln wie zum Beispiel Cetylalkohol und Glycerinmonostearat, (h) Absorptionsmitteln wie Kaolin und Bentonit-Ton und i) Schmiermitteln wie Talk, Calciumstearat, Magnesiumstearat, festen Polyethylenglycolen, Natriumlaurylsulfat und Mischungen davon gemischt. Im Falle von Kapseln, Tabletten und Pillen können die Dosierformen auch Pufferungsmittel umfassen.

[0044] Feste Zusammensetzungen eines ähnlichen Typs können auch als Füllmittel in Weich- und Hart-Gelatinekapseln unter Verwendung von Arzneibindemitteln wie Lactose oder Milchzucker als auch Polyethylenglycolen mit hohem Molekulargewicht und dergleichen eingesetzt werden.

[0045] Die festen Dosierungsformen von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pillen und Granulaten können mit Beschichtungen und Hüllen wie enterischen Beschichtungen und anderen auf dem Fachgebiet der pharmazeutischen Formulierung weithin bekannten Beschichtungen hergestellt werden. Sie können gegebenenfalls undurchsichtig machende Mittel enthalten und auch aus einer Zusammensetzung bestehen, bei der sie nur oder bevorzugterweise die aktiven Inhaltsstoffe/den aktiven Inhaltsstoff in einen bestimmten Teil des Darmtraktes, optional in verzögerter Weise, freisetzen. Beispiele einbettender Zusammensetzungen, die verwendet werden können, schließen polymere Substanzen und Wachse ein.

[0046] Die aktiven Zusammensetzungen können auch in mikroeingekapselter Form vorkommen, falls geeignet, mit einem oder mehreren der oben angeführten Arzneibindemittel.

[0047] Flüssige Dosierungsformen für die orale Verabreichung schließen pharmazeutisch annehmbare Emulsionen, Lösungen, Suspensionen, Sirups und Elixiere ein. Zusätzlich zu den aktiven Verbindungen können die flüssigen Dosierungsformen inerte Verdünnungsmittel enthalten, die auf dem Fachgebiet häufig verwendet werden, zum Beispiel Wasser oder andere Lösemittel, löslich machende Mittel und Emulgiermittel wie Ethylalkohol, Isopropylalkohol, Ethylcarbonat, Ethylacetat, Benzylalkohol, Benzylbenzoat, Propylenglycol, -1,3-Butylenglycol, Dimethylformamid, Öle (insbesondere Baumwollkern-, Erdnuss-, Mais-, Keim-, Oliven-, Rizinus- und Sesamöl), Glycerin, Tetrahydrofurfurylalkohol, Polyethylenglycole und Sorbitanfettsäureester und Mischungen davon.

[0048] Abgesehen von inerten Verdünnungsmitteln können die oralen Zusammensetzungen auch Hilfsstoffe wie Benetzungsmittel, Emulgier- und Suspendiermittel, Süßstoffe, Geschmacksmittel und Parfümierungsmittel einschließen.

[0049] Zusätzlich zu den aktiven Verbindungen können Suspensionen Suspensionsmittel wie zum Beispiel ethoxylierte Isostearylalkohole, Polyoxyethylensorbitol und Sorbitanester, Mikrokristallincellulose, Aluminiummetahydroxid, Bentonit, Agar-Agar und Tragacanth und Mischungen davon enthalten.

[0050] Lokale Verabreichung schließt die Verabreichung an die Haut oder Schleimhaut, einschließlich Oberflächen der Lunge und des Auges ein. Zusammensetzungen für die lokale Verabreichung, einschließlich jener

für Inhalation, können als ein Trockenpulver hergestellt werden, das unter Druck stehend oder nicht unter Druck stehend sein kann. In nicht unter Druck stehenden Pulverzusammensetzungen können die aktiven Inhaltsstoffe in fein zerteilter Form in Beimengung mit einem größeren pharmazeutisch annehmbaren inerten Träger verwendet werden, der Partikel mit einer Größe von zum Beispiel bis zu 100 µm im Durchmesser umfasst. Geeignete inerte Träger schließen Zucker wie zum Beispiel Lactose ein. Wünschenswerterweise weisen mindestens 95 Gewichtsprozent der Partikel des aktiven Inhaltsstoffes eine effektive Partikelgröße im Bereich von 0,01 bis 10 µm auf.

[0051] Alternativ dazu kann die Komposition unter Druck stehen und ein Druckgas enthalten, wie Stickstoff oder ein verflüssigtes Gastreibmittel. Das verflüssigte Treibmittelmedium, und in der Tat die gesamte Zusammensetzung, ist vorzugsweise so gestaltet, dass die aktiven Inhaltsstoffe sich darin in keinem wesentlichen Ausmaß auflösen. Die unter Druck stehende Zusammensetzung kann auch einen oberflächenaktiven Stoff enthalten. Der oberflächenaktive Stoff kann ein flüssiger oder fester nicht-ionischer oberflächenaktiver Stoff oder ein fester anionischer oberflächenaktiver Stoff sein. Es wird bevorzugt, den festen anionischen oberflächenaktiven Stoff in Form eines Natriumsalzes zu verwenden.

[0052] Eine weitere Form der lokalen Verabreichung ist die Verabreichung ins Auge. Die RAR-Antagonisten/Der RAR-Antagonist und die RXR-Agonisten/der RXR-Agonist werden in einem pharmazeutisch annehmbaren ophthalmischen Vehikel verabreicht, so dass die Verbindungen mit der okularen Oberfläche über einen Zeitraum in Kontakt gehalten werden, der ausreicht, damit die Verbindungen die kornealen und internen Regionen des Auges durchdringen, wie zum Beispiel die vordere Augenkammer, hintere Augenkammer, den Glaskörper, das Kammerwasser, Humor vitreus, die Hornhaut, Iris/Ziliar, Linsen, Aderhaut/Netzhaut und Lederhaut. Das pharmazeutisch annehmbare ophthalmische Vehikel kann zum Beispiel eine Salbe, ein pflanzliches Öl oder ein inkapselndes Material sein.

[0053] Zusammensetzungen für rektale oder vaginale Verabreichung sind vorzugsweise Zäpfchen, die durch Mischen des/der RAR-Antagonisten und RXR-Agonisten mit geeigneten nicht-reizenden Arzneibindemitteln oder Trägern wie Kakaobutter, Polyethylenglycol oder einem Zäpfchenwachs hergestellt werden können, die bei Raumtemperatur fest, aber bei Körpertemperatur flüssig sind und daher im Rektum oder im Scheidenhohlraum schmelzen und die Arzneimittel freisetzen.

[0054] Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch in Form von Liposomen verabreicht werden. Wie auf dem Fachgebiet bekannt ist, werden Liposome im Allgemeinen von Phospholipiden oder anderen lipiden Substanzen abgeleitet. Liposome werden durch mono- oder multi-lamelläre hydrierte Flüssigkristalle gebildet, die in einem wässrigen Medium dispergiert sind. Es kann jedes nicht-toxische, physiologisch annehmbare und metabolisierbare Lipid verwendet werden, das imstande ist, Liposome zu bilden. Die vorliegenden Zusammensetzungen in Liposomform können – zusätzlich zum/zu den RAR-Antagonisten und dem/den RXR-Agonisten Stabilisatoren, Konservierungsstoffe, Arzneibindemittel und dergleichen enthalten. Die bevorzugten Lipide sind Phospholipide und Phosphatidylcholine(Lecithine), sowohl natürliche als auch synthetische. Verfahren zur Bildung von Liposomen sind auf dem Fachgebiet bekannt (siehe zum Beispiel Prescott, Ed., Meth. Cell Bio. 14: Seiten 33 ff (1976)). Dosierung Durch die Erfindung kann ein RXR-Agonist in vitro, ex vivo oder in vivo an Zellen verabreicht werden, um die zelluläre Reaktion auf einen RAR-Antagonisten zu verstärken. Ein Durchschnittsfachmann wird anerkennen, dass wirksame Mengen eines RAR-Antagonisten und eines RXR-Agonisten empirisch ermittelt und in purer Form oder – wo solche Formen existieren – in Form eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes, Esters oder als Pro-Arzneimittel eingesetzt werden können. Der/die RAR-Antagonisten) und der/die RXR-Agonisten) kann können einem Patienten, der diese benötigt, als pharmazeutische Zusammensetzungen) in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Arzneibindemitteln verabreicht werden. Es wird verstanden werden, dass bei Verabreichung an einen menschlichen Patienten die tägliche Gesamtmenge der Verbindungen und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung vom behandelnden Arzt auf der Basis eines fundierten medizinischen Urteils festgelegt wird. Die spezifische, therapeutisch wirksame Dosis für einen bestimmten Patienten hängt von einer Reihe von Faktoren ab, einschließlich des Typs und Grads der zellulären Reaktion, die es zu erreichen gilt; der Aktivität des jeweiligen RAR-Antagonisten und RXR-Agonisten, die eingesetzt werden; der jeweiligen, eingesetzten Verbindung; des Alters, Körpergewichts, des allgemeinen Gesundheitszustands, des Geschlechts und der Ernährung des Patienten; der Zeit der Verabreichung, des Verabreichungsweges und der Ausscheidungsrate des RAR- Antagonisten und/oder des RXR-Agonisten; der Dauer der Behandlung; der in Kombination oder gleichzeitig mit dem jeweiligen RAR-Antagonisten und/oder dem RXF-Agonisten verwendeten Arzneimittel; und ähnlicher Faktoren, die auf dem Fachgebiet der Medizin weithin bekannt sind. Zum Beispiel ist es auf dem Fachgebiet üblich, die Dosen von RAR-Antagonisten und/oder RXR-Agonisten bei Mengen zu beginnen, die unter jenen liegen, die erforderlich sind, um die gewünschte therapeutische Wirkung zu erzielen, um dann die Dosen allmählich zu steigern, bis die gewünschte Wirkung erzielt wird.

[0055] Zum Beispiel werden zufriedenstellende Ergebnisse durch orale Verabreichung eines RAR-Antagonisten und eines RXR-Agonisten bei Dosierungen in der Größenordnung von 0,05 bis 10 mg/kg/Tag, bevorzugt 0,1 bis 7,5 mg/kg/Tag, mehr bevorzugt 0,1 bis 2 mg/kg/Tag erzielt, bei einmaliger Verabreichung oder – in auf-

geteilten Dosierungen – 2 bis 4 Mal pro Tag. Bei parenteraler Verabreichung, zum Beispiel durch intravenöses Tropfen oder Infusion, können Dosierungen in der Größenordnung von 0,01 bis 5 mg/kg/Tag, bevorzugt 0,05 bis 1,0 mg/kg/Tag und mehr bevorzugt 0,1 bis 1,0 mg/kg/Tag; verwendet werden. Geeignete Tagesdosierungen für Patienten liegen somit in der Größenordnung von 2,5 bis 500 mg p. o., vorzugsweise 5 bis 250 mg p. o., bevorzugt 5 bis 100 mg p. o. oder in der Größenordnung von 0,5 bis 250 mg intravenös, bevorzugt 2,5 bis 125 mg intravenös und mehr bevorzugt 2,5 bis 50 mg intravenös. Die Dosierung des RAR-Antagonisten kann so erfolgen wie in EP 0 661 259 A1 beschrieben.

[0056] Die Dosierung kann auch in einer patientenspezifischen Weise erfolgen, um eine vorbestimmte Konzentration eines RAR-Antagonisten und/oder eines RXR-Agonisten im Blut bereitzustellen, wie durch auf dem Fachgebiet akzeptierte und als Routine geltende Techniken bestimmt (HPLC wird bevorzugt). Somit kann die Dosierung bei Patienten eingestellt werden, um reguläre fortgehende Blutwerte zu erhalten, wie durch HPLC gemessen und in der Größenordnung von 50 bis 1000 ng/ml, vorzugsweise 1.50 bis 500 .

[0057] ng/ml.

## Beispiele

### Materialien und Verfahren

[0058] Folgende Materialien und Verfahren wurden im Allgemeinen in allen Beispielen verwendet, sofern nicht anders angeführt.

[0059] Bestimmung agonistischer/antagonistischer Aktivitäten von RAR-spezifischen Liganden. HeLa-Reporterzelllinien, die ein Retinoid-induzierbares Luciferase-Reportergen (17m)5-globin-Luc in den stabil transfektierten Reporterkonstrukten GAL-RAR $\alpha$ , GAL-RAR $\beta$  oder GAL-RAR $\gamma$  enthalten, wurden wie zuvor beschrieben konstruiert und verwendet (Chen, J. Y., et al., EMBO J. 14: 1187–1197 (1995)). Zellen wurden mit RAR-spezifischen Liganden behandelt und Luciferase-induzierte Biolumineszenz wurde in vivo unter Verwendung einer Einzel-Photon-Zählungs-Kamera (Hamamatsu) durch Pflanzen von gleichen Mengen an Zellen in 24-Mulden-Gewebekulturplatten und deren Inkubieren mit steigenden Konzentrationen an Retinoiden alleine oder in Gegenwart von T-RA überwacht, um das antagonistische Potential der Liganden zu bestimmen.

[0060] Bestimmung der NB4-Zelldifferenzierung. NB4-Zellen wurden aus ATCC erhalten und in RPMI-1640 (plus 2 mM L-Glutamin) gezüchtet, das 100 Einheiten/Mikroliter Penicillin und Streptomycin und 8% fötales Rinderserum(FBS) enthält. Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen mit Retinoid(en) oder Ethanol-vehikel behandelt, danach gewaschen und erneut bei einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml suspendiert. 50 Mikroliter Aliquote dieser Suspension wurden über poly-L-lysin-beschichtete Slides gestrichen (Sigma, St. Louis, Missouri). Nach dem Waschen mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM N<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KHP<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) wurden die Zellen 10 Minuten lang in 2% Formalin (37% Formaldehyd in 15% Methanol in Wasser) bei Raumtemperatur fixiert.

[0061] Bestimmung von Nitroblau-Tetrazolium: Nach dem Fixieren wurden die Zellen drei Mal in PBS gewaschen und durch TPA(12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat, 200 ng/ml)induzierte Nitroblau-Tetrazolium-Reduktion (Sigma Fast BCIP/NBT) 30 Minuten lang bei 37°C bewertet. Proben wurden auf zelluläre und nukleare Morphologie hin mit einem optischen Mikroskop (Diavert Leitz) untersucht. Der Prozentsatz an differenzierten Zellen wurde bestimmt, indem mindestens 300 Zellen für jede Behandlung gezählt wurden.

[0062] Bestimmung der Anti-PML-Immunofluoreszenz: Nach dem Fixieren wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS (Puffer A) permeabilisiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Zellen in 0,5 mg/ml normalem Ziegen-IgG (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) in PBS 30 Minuten lang bei Raumtemperatur blockiert und danach über Nacht bei 4°C mit einem polyklonalen Anti-PML-Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Anne Dejean) inkubiert, verdünnt in Puffer A, der 0,5 mg/ml normales Ziegen-IgG (Puffer B) enthält, bei 4°C. Nach drei Waschungen in Puffer A wurden die Zellen mit Esel-Anti-Kaninchen-IgG (H + L) inkubiert, konjugiert mit Cyanin 3 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) in Puffer B über einen Zeitraum von 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach den Waschungen in PBS wurden die zusammengesetzten Proben mit einem konfokalen Lasermikroskop (TCS, Leica) untersucht, das mit Cyaninoptik für PML-Lokalisierung ausgestattet war:

### Bestimmung der NB4-Zellapoptose

[0063] Flusszytometrische Analyse. Die Zellzyklusverteilung und die Gegenwart von „sub-2N“-Zellen und Partikeln in Kontrolle und Retinoid-behandelten NB4-Zellen wurden durch Zellzyklusflusszytometrie basierend auf dem DNA-Gehalt unter Verwendung eines EPICS Profile II Zell-Sortierers (Coulter Electronics, Inc., Hialeah, Florida) bestimmt, der mit einem 15-Watt-Argonlaser, der auf eine Anregungswellenlänge von 488 nm eingestellt war, und Filtersets ausgestattet gewesen ist, die eine Emissionswellenlänge von 575 nm bereitstellen. Kulturen von unbehandelten oder Retinoid-behandelten Zellen wurden zentrifugiert (250 × g) und in 70%

Ethanol fixiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gespeichert. Nach zwei Waschungen in PBS wurden die Zellen und subzellulären Partikel in 1 mg/ml RNase A (59 Kunitz Einheiten/mg, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) 30 Minuten lang bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, zentrifugiert und in PBS mit einer Konzentration von ungefähr  $10^6$  Zellen pro ml resuspendiert. Ethidiumbromid wurde zu einer endgültigen Konzentration von 50 Mikrogramm/ml unmittelbar vor der Probenanalyse hinzugefügt.

[0064] DNA-Fragmentationsanalyse. Die Induktion von Apoptose durch Retinoide wurde auch durch das Auftreten einer „Leiter“ von fragmentierter DNA bestimmt, wie zuvor beschrieben (Nagy, L., et al., Mol. Cell. Bio1. 15: 3540–3551 (1995)). Die Zellen wurden alle zwei Tage neu mit frischen Medien und Retinoiden versorgt, und die Zelldichte wurde deutlich unter der Sättigung gehalten, um Zelltod auf Grund von Nährstoff und/oder Mitogenschöpfung zu vermeiden. Pro DNA-Spur wurden fünf Mikrogramm in einem 1,5 % Agarosegel elektrophoresiert, danach mit Ethidiumbromid gefärbt, und DNA-Banden wurden visualisiert und via Ultraviolettbeleuchtung von Ethidiumbromidfluoreszenz fotografiert.

#### In vivo RAR $\beta$ 2 Footprinting und RAR $\beta$ , $\gamma$ Expression

[0065] Ligation-vermittelte PCR. NB4-Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert. P19,6-Zellen wurden aus ATCC erhalten und in Dulbeccos modifiziertem Eagles Medium kultiviert, das 5% normales FBS und 5% delipidiertes FBS enthält. NB4-Zellen wurden 24 Stunden lang entweder mit Ethanol oder den angeführten Retinoiden (**Fig. 6**) behandelt. Nach dem Waschen in PBS wurden die Zellen 5 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 0,1 % Dimethylsulfat (DMS; Aldrich) behandelt. DNA mit hohem Molekulargewicht wurde extrahiert und mit Piperidin gespalten. DMS-Behandlung in vitro von nackter DNA erfolgte wie beschrieben (Mueller, P. R., und Wold, B., Science 246: 780–786 (1989)). Ligationvermittelte Polymerasekettenreaktion (LM-PCR) wurde wie beschrieben ausgeführt (Garritty, P. A., und Wold, B.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1021–1025 (1992)), außer, dass DEEPVENT™ (exo) DNA-Polymerase (New England BioLabs, Beverly, Massachusetts) verwendet wurde. Oligonukleotide, die in der LM-PCR verwendet wurden, um Interaktionen auf dem kodierenden Strang zu erfassen, waren:

##### a) menschlicher RAR $\beta$ 2-Promotor:

Primer 1: 5'-CCCCCTTTGGCAAAGAATAGAC-3' (SEQ-ID. Nr. 1)

Primer 2: 5'-AGAATAGACCCTCCTGCCTCTGAAC-3' (SEQ-ID. Nr. 2)

Primer 3: 5'-ACCCTCCTGCCTCTGAACAGCTCACTTC (SEQ-ID. Nr. 3)

##### b) Maus-RAR $\beta$ 2-Promotor:

Primer 1: 5'-CCCCCTTTGGCAAAGAATAGAC-3' (SEQ-ID. Nr. 1)

Primer 2: 5'-AGAATAGACCCTCCTGCCTCGGAG-3' (SEQ-ID. Nr. 4)

Primer 3: 5'-ACCCTCCTGCCTCGGAGCAGCTCACTT-3' (SEQ-ID. Nr. 5)

[0066] Jeder Primer 3 (SEQ-ID. Nr. 3 und 5) wurde bei dem 5' Ende mit [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP unter Verwendung von T4 Polynukleotidkinase markiert. Nach der PCR wurden die markierten Produkte in einem 4,8% Sequenziergel aufgelöst, und die Gels wurden getrocknet und einem Röntgenfilm zur Produktion von Autoradiogrammen ausgesetzt.

[0067] Umkehr-Transkriptase-PCR: Die gesamte RNA wurde isoliert und umgekehrt in eine Pufferlösung transkribiert, die 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM von allen vier Desoxynukleosidtriphosphaten umfasst, unter Verwendung von 25 Einheiten von AMV Umkehr-Transkriptase in der Gegenwart von 50 Einheiten von RNasin 60 Minuten lang bei  $42^{\circ}\text{C}$ . Zur Umkehr-Transkription wurden 25 Picomol pro Reaktion des allgemeinen Antisense-Primers 5'-GACATGCCCACTTCAAAGCACTTC-3' (SEQ-ID. Nr. 6) für RAR $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$  verwendet. Für jede PCR-Reaktion wurden der allgemeine Antisense-Primer, ein Viertel des Umkehr-Transkriptionsproduktes und folgende spezifischen Sense-Primer verwendet:

menschlicher RAR $\alpha$ : 5'-ACCCCTCTACCCCGCATCTACAAG-3' (SEQ-ID. Nr. 7)

menschlicher RAR $\beta$ : 5'-CTCGTCCCAAGCCCCCATCT-3' (SEQ-ID. Nr. 8)

menschlicher RAR $\gamma$ : 5'-ACAAGCCATGCTTCGTGTGCAAT-3' (SEQ-ID. Nr. 9)

[0068] Die Amplifikation wurde in einem endgültigen Volumen von 0,1 ml unter Verwendung von Taq DNA Polymerase (Perkin Elmer Cetus) gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Achtzehn PCR-Zyklen (30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 65°C und 30 Sekunden bei 72°C) wurden ausgeführt, und ein Aliquot von 10 Mikrolitern jeder Reaktion wurde durch Elektrophorese auf einem 6% nativen Polyacrylamidgel analysiert, welches dann mit Ethidiumbromid gefärbt und durch Ultraviolettbeleuchtung untersucht wurde.

#### Beispiel 1: RAR- und RXR-induzierte Aktivierung

[0069] Rezeptor-selektive synthetische Retinoide (Chen, J.-Y., et al., EMBO J. 14: 1187-1197 (1995)) (**Fig. 1**) wurden verwendet, um die Beiträge von RAR $\alpha$ /PML-RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  und RXRs zu den molekularen und zellulären Ereignissen zu untersuchen, die bei T-RA-Behandlung (Lanotte, M., et al., Blood 77: 1080-1086 (1991)) zu NB4-Zelldifferenzierung führen. Wie in Tabelle 1 dargestellt, hat der Agonist Am80, der bei  $\leq 1$  nM (Chen, J.-Y., et al., EMBO J. 14: 1187-1197 (1995)) RAR $\alpha$ -spezifisch ist, auf effiziente Weise eine Differenzierung induziert. Retinoide ohne RAR $\alpha$ -agonistische Aktivität (Verbindung A und Verbindung C; Chen, J.-Y., et al., EMBO J. 14: 1187-1197 (1995)), Verbindung B und Verbindung D, **Fig. 1**, SR11237 (Lehmann, J. M., et al., Science 258: 1944-1946 (1992)) waren alleine ineffizient (Tabelle 1, **Fig. 3b, c**). Verbindung C ist die in Beispiel 23 der Europäischen Patentanmeldung Nr. EP 0 661 259 beschriebene Verbindung. Verbindung D ist die in Beispiel 1 der Europäischen Patentanmeldung Nr. EP 0 747 347 beschriebene Verbindung. Darüber hinaus wurde die durch 1 nM Am80 induzierte Differenzierung durch einen Überschuss an Verbindung B, einem reinen RAR $\alpha$ -Antagonisten (nicht dargestellt), vollständig blockiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Induzieren der transkriptionalen Aktivität von AF-2 des nicht-fusionierten RAR $\alpha$ -Allels und/oder des RAR $\alpha$ -Anteils von PML-RAR $\alpha$  ausreichend ist, um den Differenzierungsblock zu entlasten, der aus der Bildung eines PML-RAR $\alpha$ -Fusionsproteins resultiert. Dabei ist zu beachten, dass es nicht wahrscheinlich ist, dass die AP1-Transrepression durch RAR $\alpha$  eine entscheidende Rolle bei RA-induzierter NB4-Zelldifferenzierung spielt, da „dissoziierte“ Retinoide, wie Verbindung A, obwohl sie die AP1-Aktivität über alle drei RARs effizient unterdrücken (Chen, J.-Y., et al., EMBO J. 14: 1187-1197 (1995)), selbst keine Differenzierung induzierten (**Fig. 2b** und nicht dargestellt).

[0070] Nach viertägiger Behandlung mit T-RA oder RAR $\alpha$ -Agonisten hat eine FACS-Analyse gezeigt, dass NB4-Zellen die mitotische Aktivität reduziert und sich in G1/G0 (**Fig. 4b** und **e**) akkumuliert hatten. Am Tag 6 haben sich Sub-2N-Partikel in T-RA-behandelten Kulturen (**Fig. 4c**) akkumuliert und am Tag 8 zeigte massive DNA-Fragmentation extensive Apoptose an (**Fig. 4d, f** und **Fig. 5**, Lanes 6, 7). Dabei ist zu beachten, dass Vorwärts- und Seitwärtsstreuungsanalyse derselben Zellpräparationen diese Ergebnisse bestätigten (nicht dargestellt). Wie im Fall der Differenzierung konnten nur RAR $\alpha$  (aber nicht RAR $\beta$  oder RAR $\gamma$ )-Agonisten diese Ereignissequenz induzieren (Tabelle 1 und nicht dargestellt).

[0071] Vor der Differenzierung und wie zuvor (Dyck, J. A., et al., Cell 76: 333-343 (1994); Weis, K., et al., Cell 76: 345-358 (1994); Koken, M. H., et al., EMBO J. 13: 1073-1083 (1994)) für T-RA berichtet, induzierten RAR $\alpha$ -Agonisten die Assoziation von endogenen PML/PML-RAR $\alpha$  mit nuklearen Körpern (**Fig. 3e**), während RAR $\alpha$ -Antagonisten dies nicht taten (**Fig. 3f**, und nicht dargestellte Daten). Darüber hinaus zeigte in vivo DNA-Footprinting, dass die Belegung der DR-5-Typen Retinolsäurereaktionselemente (DR5-RAREs), die im RAR $\beta$ 2-Promotor anwesend waren, und die Rekrutierung anderer promotorbindender Faktoren durch RAR $\alpha$ -Agonisten, aber nicht Antagonisten (**Fig. 5**, Lanes 3, 5 und 6), induziert wurden. Abgesehen von geringen Unterschieden waren diese Footprints beinahe nicht von jenen zu unterscheiden, die ursprünglich für Maus P19 embryonale Karzinomzellen berichtet wurden (Dey, A., et al., Mol. Cell: Biol. 14: 8191-8201 (1994)) (**Fig. 6b**, Lanes 3, 6, 7). Die Am80-induzierte Expression von RAR $\beta$ 2 (und RAR $\gamma$ ) wurde durch RT-PCR (nicht dargestellt) bestätigt; bei RAR $\alpha$ -Antagonisten alleine (Verbindung A in **Fig. 6c** und nicht dargestellt) wurde keine Induktion festgestellt.



Tabelle 1

Retinoid (nM)	Prozentsatz differenzierter NB4-Zellen										
	T-RA	9C-RA	Am80	Verb. A	Verb. B	Verb. C	Verb. D	SR11237	+100 nM SR 11237		
									Am80	Verb. A	Verb. B
0,1	-	-	<1	-	-	-	-	-	<1	-	-
0,3	-	-	<1	-	-	-	-	-	20	-	-
0,5	-	-	<1	-	-	-	-	-	40	-	-
1	<1	<1	80	-	-	-	-	-	80	<1	<1
10	<1	4	81	-	-	-	-	-	-	65	3
100	81	65	80	-	-	-	-	-	-	78	5
1000	80	70	-	<1	<1	<1	<1	<2	-	-	10

\* „-“ = nicht durchgeführt.

Beispiel 2: Synergismus zwischen RAR- und RXR-spezifischen Liganden

[0072] Die mögliche Rolle von RXR in den oben genannten Ereignissen, abgesehen von jener eines bloßen

Partners für die Heterodimerisierung, wurde untersucht, indem analysiert wurde, ob RAR- und RXR-spezifische Liganden synergisieren konnten. In der Tat war Am80 in der Gegenwart des RXR-spezifischen Agonisten SR11237 beim Induzieren von Differenzierung bei geringen Konzentrationen deutlich effizienter (Tabelle 1; dabei gilt es zu beachten, dass SR11237 alleine keine Differenzierung induzierte; **Fig. 3c**). Überraschender und unerwarteter Weise hat in Kombination mit SR11237 sogar der RAR $\alpha$ -Antagonist Verbindung A eine Differenzierung mit höherer Effizienz induziert als T-RA oder 9C-RA (Tabelle 1, **Fig. 3d**). Es ist unwahrscheinlich, dass diese Differenzierung auf eine Autoinduktion von RAR $\beta$ 2 durch die RAR $\beta$ -agonistische Aktivität (**Fig. 1**) von Verbindung A in der Gegenwart von SR11237 zurückzuführen ist, da Verbindung C (**Fig. 1**), ein stärkerer RAR $\beta$ -Agonist als Verbindung A (Chen, J-Y., et al., *EMBO J.* 14: 1187–1197 (1995)), nicht mit SR11237 synergisierte, um RAR $\beta$ 2-Promotorbelegung (**Fig. 6a, b**), RAR $\beta$ 2 mRNA-Produktion oder Differenzierung zu induzieren (nicht dargestellt). Außerdem hat Verbindung B, ein „reiner“ RAR $\alpha$ -Antagonist, der kein RAR $\beta$  oder RAR $\gamma$  bindet (**Fig. 1**), auch Differenzierung in Gegenwart von SR11237 induziert, während Verbindung D, der RAR $\gamma$ ( $\beta$ ) Agonist, der kein RAR $\alpha$  binden kann, das nicht getan hat (Tabelle 1 und nicht dargestellt). Die geringere Effizienz von Verbindung B im Vergleich zu Verbindung A kann auf ihre geringere Bindungsaffinität für RAR $\alpha$  zurückzuführen sein (**Fig. 2** und nicht dargestellt).

[0073] Gemeinsam zeigen die oben erwähnten Ergebnisse deutlich, dass RAR $\alpha$  (oder PML-RAR $\alpha$ ) insbesondere in die synergistische Induktion von Differenzierung in Gegenwart des RXR-Agonisten involviert ist. Die Synergie zwischen RAR $\alpha$ - und RXR-Liganden wurde nicht nur für die Differenzierung, sondern auch für nachfolgende Apoptose beobachtet. Dies wurde durch die starke antiproliferierende und apoptotische Wirkung einer Kombination aus dem RAR $\alpha$ -Antagonisten Verbindung A und dem RXR-Agonisten SR11237 demonstriert, von denen jeder alleine ineffizient gewesen ist (**Fig. 4g und h**, **Fig. 5**; und Vorwärts- und Seitwärtsstreuungsanalyse, nicht dargestellt). Vor der Verbindung A/SR11237-induzierten Differenzierung und Apoptose kam es zu einer Assoziation von PML-RAR $\alpha$  mit nuklearen Körpern, die von jener, die in Gegenwart von RAR $\alpha$ -Agonisten (**Fig. 3g und h**) beobachtet wurde, nicht zu unterscheiden war. Darüber hinaus wurden die Belegung von RAR $\beta$ 2 RARE und die Faktorrekutierung (Dey, A., et al., *Mol. Cell. Biol.* 14: 8191–8201 (1994)) zum RAR $\beta$ 2-Promotor in vivo auch induziert, wenn Zellen mit Verbindung A und SR11237 induziert wurden (**Fig. 6a**). Diese Behandlung führte zu einer effizienten Akkumulation von RAR $\beta$  und RAR $\gamma$  mRNA (**Fig. 6c**). Gemäß ihrer Unfähigkeit, mit SR11237 zwecks Differenzierung zu synergisieren, war der andere RAR $\alpha$ -Antagonist/RAR $\beta$ -Agonist Verbindung C weder imstande, eine nukleare Körperassoziation von PML-RAR $\alpha$  (nicht dargestellt), noch eine RAR $\beta$ 2-Promotorbelegung (**Fig. 6a**) zu induzieren.

#### Allgemeine Besprechung

[0074] Es wurde früher darauf hingewiesen, dass die RXR Ligand-abhängige Transkriptionsaktivierungsfunktion AF-2 in RAR-RXR-Rezeptor heterodimerischen Signalisierungskomplexen stumm ist (Kurokawa, R., et al., *Nature* 371: 528–531 (1994); Forman, B. M., et al., *Cell* 81: 541–550 (1995); Mangelsdorf, D. J. und Evans, R. M., *Cell* 83: 835–850 (1995)). Im Gegensatz dazu zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass in kultivierten menschlichen NB4-Zellen akuter Promyelozytenleukämie – (APL) in vivo Footprints des RAR $\beta$ 2-Promotor-RA-Reaktionselements und RAR $\beta$ 2 mRNA-Expression nicht nur durch Behandlung mit RAR $\alpha$ - (und nicht RAR $\beta$ -, RAR $\gamma$ - oder RXR-)spezifischen Retinoiden alleine, sondern auch durch die Kombination aus bestimmten RAR $\alpha$ -Antagonisten mit einem reinen RXR-Agonisten induziert werden können. Außerdem induzieren solche Kombinationen die Relokation von PML zu nuklearen Körpern und NB4-Zelldifferenzierung vor der Apoptose. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Auswirkungen, die durch die Retinoide auf die APL-Zellen ausgeübt werden, durch Heterodimere zwischen RAR $\alpha$  (oder PML-RAR $\alpha$  und RXRs) vermittelt werden, wobei die AF-2 wobei nur einem Partner transkriptional kompetent sein muss. Somit induzieren RAR $\alpha$ -Agonisten zwei trennbare Ereignisse. Ein Ereignis, das für das Binden von RXR-RAR $\alpha$ -Heterodimeren an DNA in vivo erforderlich ist und es ermöglicht, dass die RXR AF-2 durch Agonisten aktiviert wird, kann entweder durch einen RAR $\alpha$ -Agonisten oder durch bestimmte RAR $\alpha$ -Antagonisten induziert werden, wobei das andere Ereignis, das RAR $\alpha$  AF-2-Aktivität induziert, nur durch RAR $\alpha$ -Agonisten ausgeübt werden kann.

[0075] Der Synergismus zwischen RAR- und RXR-Liganden ist mit der Schlussfolgerung vorheriger Berichte schwer in Einklang zu bringen (Kurokawa, R., et al., *Nature* 371: 528–531 (1994); Forman, B. M., et al., *Cell* 81: 541–550 (1995)), die da lautet, dass RXR ein transkriptional stummer Partner in RXR-RAR-Heterodimeren sowohl bei DR1 als auch DR5 RAREs ist (besprochen in Mangelsdorf, D. J. und Evans, R. M., *Cell* 83: 835–850 (1995)). Im Besonderen stellt sich die Frage, wie ein Heterodimer, das einen Antagonist-gebundenen RAR $\alpha$  und einen Agonist-gebundenen RXR umfasst, an den RAR $\beta$ 2-Promotor binden und Transkription vom RAR $\beta$ 2-Promotor aktivieren konnte, wenn RXR nicht imstande wäre, seinen Liganden bei einer Assoziation mit DNA zu binden? In der Tat unterscheidet einer der obigen Berichte (Forman, B. M., et al., *Cell* 81: 541–550 (1995)) zwischen den hemmenden Wirkungen von Ligand-freiem und Ligand-gebundenem RAR auf RXR-Aktivität. Außerdem haben, im Gegensatz zu obigen Berichten (Kurokawa, R., et al., *Nature* 371: 528–531 (1994); Forman, B. M., et al., *Cell* 81: 541–550 (1995)), neuere Studien (Kersten, S., et al., *Biochemistry* 35:

3816–3824 (1996); Apfel, R., et al., J. Biol. Chem. 270: 30765–30772 (1995)) ergeben, dass beide Partner von RXR-RAR-Heterodimeren ihren verwandten Liganden binden, unabhängig von ihrer Bindung an DNA, wodurch die frühere Schlussfolgerung, die aus Transfektionsexperimenten gezogen wurde und der zufolge beide Partner transkriptional aktiv sein können, unterstützt wird (Durand, B., et al., Cell 71: 73–85 (1992)). Ungeachtet der Grundlage für die einander widersprechenden in vitro Ergebnisse ist klar, dass bei in vivo der RXR-Partner von RXR-RAR-Dimeren auf einen agonistischen Liganden ansprechen kann und daher diesen binden muss. Gemäß dieser Schlussfolgerung wurde in vivo Synergismus zwischen RAR- und RXR-Agonisten zuvor berichtet (Roy, B., et al., Mol. Cell. Biol. 15: 6481–6487 (1995); Apfel, R., et al., J. Biol. Chem. 270: 30765–30772 (1995)).

[0076] Die vorliegenden Studien zeigen, dass bei hohen Pegeln RAR-Agonisten alleine ausreichen, um die genetischen Programme, welche zu Differenzierung und Apoptose von NB4-Zellen führen, sowie Transkription vom RAR $\beta$ 2-Promotor zu induzieren. Im Gegensatz dazu war ein RXR-Agonist inaktiv, es sei denn, er wird mit einem RAR-Agonisten oder bestimmten RAR-Antagonisten assoziiert. Es erscheint daher, dass (i) die apo-RAR-Struktur im RXR-RAR-Heterodimer mit Ereignissen inkompatibel ist, die eine Voraussetzung für die Transaktivierung in vivo darstellen; und dass (ii) die Transaktivierung durch ein RXR-RAR-Heterodimer zwei getrennte RAR-vermittelte Ereignisse umfasst. Ein Ereignis, das für das Binden von RXR-RAR $\alpha$ -Heterodimeren an DNA in vivo erforderlich ist und es ermöglicht, dass die RXR AF-2 durch Agonisten aktiviert wird kann entweder durch einen RAR $\alpha$ -Agonisten oder bestimmte RAR $\alpha$ -Antagonisten induziert werden. Das andere Ereignis induziert RAR $\alpha$  AF-2 Aktivität und kann nur durch RAR $\alpha$ -Agonisten ausgeübt werden.

[0077] Bei Ausweitung der vorliegenden Ergebnisse auf andere RA-Zielgene hat die Schlussfolgerung, dass eine der zwei Funktionen, die von RAR-Liganden in RXR-RAR-Heterodimeren ausgeübt wird, eine Voraussetzung dafür ist, dass RXR-Liganden die Zielgen-Transkription in vivo aktivieren, wichtige Implikationen. RARs werden ihre RXR-Partner „dominieren“ und die Gegenwart von RXR-Agonisten würde die Auswirkung von RAR-Liganden verstärken, aber diese nicht ersetzen. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass der RXR-spezifische Ligand SR11237 alleine nicht imstande war, die Differenzierung und Expression von RA-Zielgenen in F9 und P 19 Zellen zu induzieren (Roy, B., et al., Mol. Cell. Biol. 15: 6481–6487 (1995)). Dasselbe mag auf die RXR heterodimer-vermittelten Signalisierungspfade zutreffen, die Schilddrüsenhormone und Vitamin D3 involvieren, während für andere RXR-Heterodimere (Mangelsdorf, D. J. und Evans, R. M., Cell 83: 835–850 (1995)) RXR-Liganden als unabhängige Signalisierungsmoleküle agieren können. Die Konstruktion und die Untersuchung von zusätzlichen RAR- und RXR-Agonisten und Antagonisten durch die hierin offenbarten Verfahren werden zeigen, ob dieses Konzept der „Dominanz“ von RAR gegenüber RXR verallgemeinert werden kann und in welchem Ausmaß andere synthetische Liganden diese „Dominanz“ überwinden oder ändern könnten.

[0078] Weder die RAR $\alpha$ -Spezifität noch der Synergismus zwischen RAR $\alpha$ /Verbindung A und RXR/SR11237 sind NB4-Zell- oder PML-RAR $\alpha$ -spezifisch. Menschliche HL-60 myeloblastische Leukämiezellen, die kein PML-RAR $\alpha$ -Fusionsprotein aufwiesen, sprachen wie NB4-Zellen auf die verschiedenen Ligandkombinationen in Bezug auf die RAR $\beta$ 2-Promotor-Belegung, RAR $\beta$ 2 mRNA-Akkumulierung und Differenzierung (nicht dargestellt) an. Es wurde jedoch berichtet, dass – im Gegensatz zu NB4-Zellen – die Apoptose von HL-60 Zellen nicht mit einem RAR-Agonisten alleine erzielt werden kann und insbesondere die Gegenwart eines RXR-Agonisten erfordert (Nagy, L., et al., Mol. Cell. Biol. 15: 3540–3551 (1995)). RAR $\beta$ 2-Promotorbelegung und RAR $\beta$ 2 mRNA-Akkumulierung wurden auch in P19 embryonalen Karzinom (EC)-Zellen beobachtet, die mit einer Kombination aus einem RAR $\alpha$ -Antagonisten und einem RXR-Agonisten behandelt wurden (Roy, B., et al., Mol. Cell. Biol. 15: 6481–6487 (1995)) (**Fig. 3b**). In starkem Gegensatz dazu steht, dass dieselbe Liganden-Kombination in F9 EC-Zellen weder RAR $\beta$ 2-Expression noch Differenzierung (Daten nicht dargestellt) induzierte. Somit legen die vorliegenden Ergebnisse – unter Berücksichtigung der Fähigkeit „dissoziierter“ Retinoide (Chen, J.-Y., et al., EMBO J. 14: 1187–1197 (1995)) AP1-Aktivität zu unterdrücken – nahe, dass es möglich sein kann, komplexe Genprogramme in einer zellspezifischen Weise durch entsprechende Auswahl von synthetischen Retinoiden (oder einer Kombination davon) mit vorbestimmten Eigenschaften zu initiieren. Die Selektivität und das synergistische Potential von RAR- und RXR-Liganden, welche drastisch reduzierte Konzentrationen der individuellen Verbindungen ermöglichen, um biologische Aktivität zu erreichen, sind in Bezug auf die Ausweitung der therapeutischen Anwendungen von natürlichen und synthetischen Retinoiden und Retinoidanaloga vielversprechend.

## SEQUENZLISTEN

## (1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

## i) ANMELDER

- (A) NAME: Institut National de la Santé et de la Recherche Medical
- (B) STRASSE: 101 Rue Tolbiac
- (C) STADT: Paris Cedex 13
- (D) BUNDESSTAAT:
- (E) LAND: Frankreich
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ): 75654

## i) ANMELDER:

- (A) NAME: Centre National de la Recherche Scientifique
- (B) STRASSE: 3 Rue Michel Ange
- (C) STADT: Paris Cedex 16
- (D) BUNDESSTAAT:
- (E) LAND: Frankreich
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ): 75794

## i) ANMELDER:

- (A) NAME: University Louis Pasteur
- (B) STRASSE: 4 Rue Blaise Pascal
- (C) STADT: Straßburg Cedex
- (D) BUNDESSTAAT:
- (E) LAND: Frankreich
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ): 67070

## i) ANMELDER:

- (A) NAME: Bristol-Myers Squibb Company
- (B) STRASSE: Route 206 & Provinceline Road
- (C) STADT: Princeton
- (D) BUNDESSTAAT: New Jersey

- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ) : 08543-4000

i) ERFINDER:

- (A) NAME: Pierre Chambon
- (B) STRASSE: 4 Rue A. Schweitzer
- (C) STADT: Blaesheim
- (D) BUNDESSTAAT:
- (E) LAND: Frankreich
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ): 67113

i) ERFINDER:

- (A) NAME: Hinrich Gronemeyer
- (B) STRASSE: 1A Uhlandstrasse
- (C) STADT: Oberkirch
- (D) BUNDESSTAAT:
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ): 77704

i) ERFINDER:

- (A) NAME: Peter R. Reczek
- (B) STRASSE: 100 Forest Avenue, Department 842
- (C) STADT: Buffalo
- (D) BUNDESSTAAT: New York
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ): 14213-1091

i) ERFINDER:

- (A) NAME: Jacek Ostrowski
- (B) STRASSE: 100 Forest Avenue, Department 842
- (C) STADT: Buffalo
- (D) BUNDESSTAAT: New York
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ): 14213-1091

ii) TITEL DER ERFINDUNG: Therapeutische Kombinationen von  
RAR-Antagonisten und RXR-Agonisten und ihre Verwendung

iii) ANZAHL AN SEQUENZEN: 9

iv) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) ART DES DATENTRÄGERS: Diskette

(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

vi) VORHERIGE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: US 60/024,772

(B) ANMELDETAG: 28. August 1996

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID. NR.1:

i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR.1:

CCCCCTTTGG CAAAGAATAG AC

22

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR.2:

i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR.2:

AGAATAGACC CTCCTGCCTC TGAAC

25

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR.3:

i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR.3:

ACCCTCCTGC CTCTGAACAG CTCACTTC

28

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR.4:

i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR.4:

AGAATAGACC CTCCTGCCTC GGAG

24

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR.5:

i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR.5:

ACCCTCCTGC CTCGGAGCAG CTCACTT 27

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR.6:

i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR.6:

GACATGCCCA CTTCAAAGCA CTTC 24

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR.7:

i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR.7:

ACCCCCTCTA CCCCGCATCT ACAAG 25

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR.8:

i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear



ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR.8:

CTCGTCCCAA GCCCCCATC T 21

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID NR.9:

i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR.9:

ACAAGCCATG CTTCGTGTGC AAT 23

#### Patentansprüche

1. Verwendung von mindestens einem RAR-Antagonisten und mindestens einem RxR-Agonisten bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung bei der Behandlung eines Tieres, das an einer Krebserkrankung, einem Hautleiden, rheumatischer Arthritis oder einer prämaligen Läsion leidet oder dazu prädisponiert ist.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen RAR-Antagonisten, mindestens einen RXR-Agonisten und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Exzipienten dafür umfasst.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei der RAR-Antagonist ein RAR $\alpha$ -Antagonist ist.

4. Verwendung oder pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei der RAR $\alpha$ -Antagonist Verbindung A oder Verbindung B ist.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1, 3 oder 4, oder pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei der RxR-Agonist SR11237 ist.

6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Krebserkrankung aus jener Gruppe ausgewählt ist, die aus Hautkrebs, Mundhöhlenkrebs, Lungenkrebs, Brustdrüsenkrebs, Prostatakrebs, Blasenkrebs, Leberkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Eierstockkrebs, Hals-Nasen-Ohrenkrebs, Darmkrebs, Keimzellenkrebs und -Leukämie besteht.

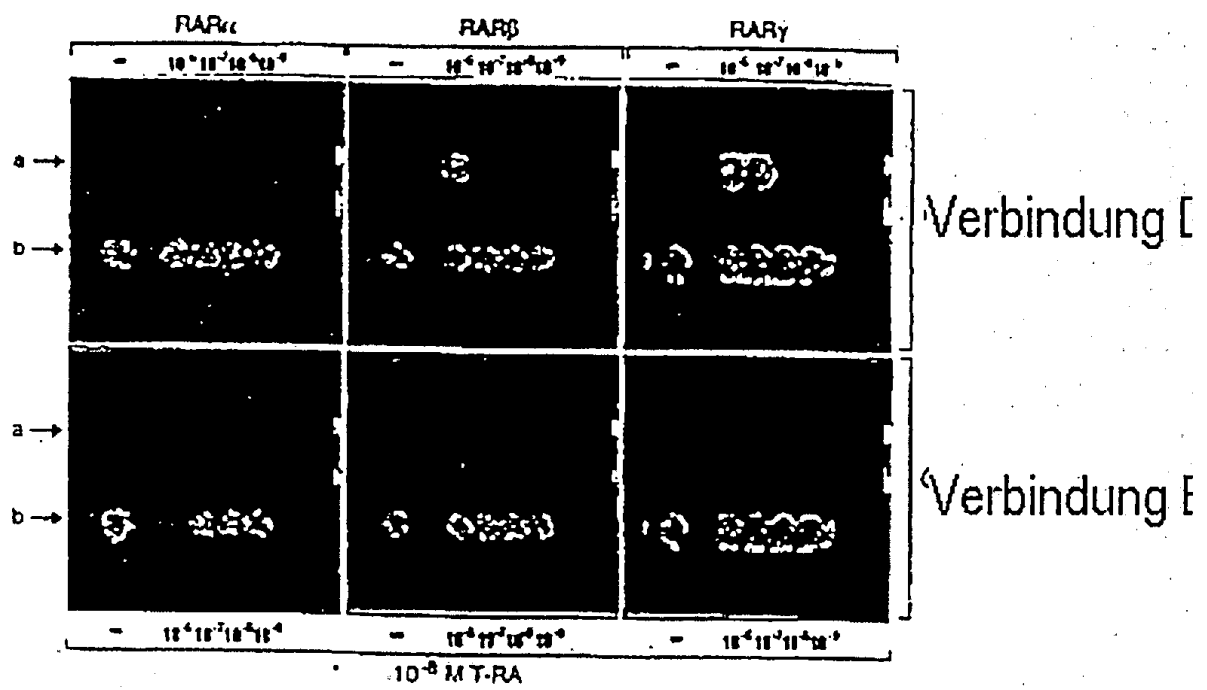
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei der Hautkrebs ein Melanom oder ein Karposi-Sarkom ist.

8. Verwendung nach Anspruch 6, wobei der Keimzellenkrebs ein Teratokarzinom ist.
9. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die Leukämie akute Promyelozytenleukämie ist.
10. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Hautleiden aus jener Gruppe ausgewählt ist, die aus Psoriasis, aktinischer Keratose, Akne, Ichthyosis, Lichtalterung und kortikoid-induzierte Hautathropie besteht.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 3 bis 10, wobei das Tier ein Mensch ist.

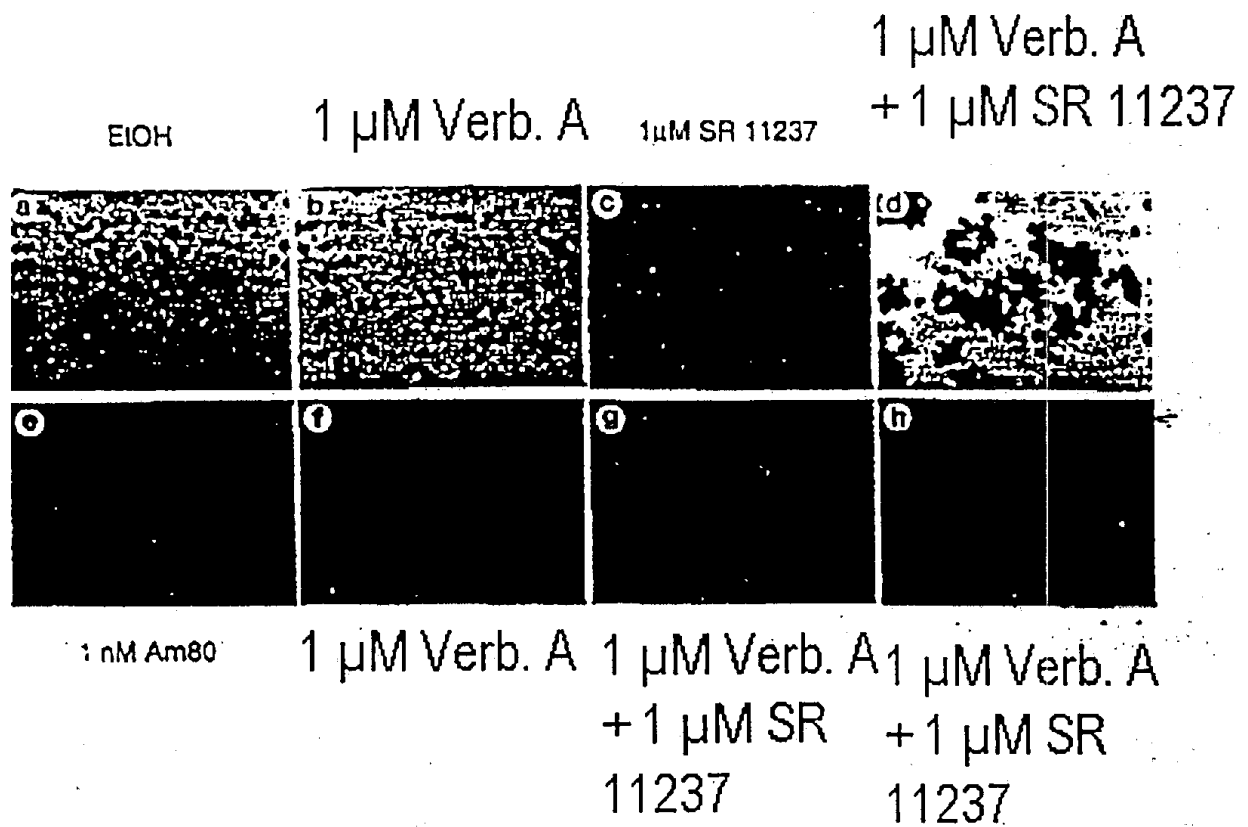
Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Retinoid	RAR		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Verbindung A	-	+	-
Verbindung B	-	o	o
Verbindung C	-	+	(+)
Verbindung D	o	(+)	+

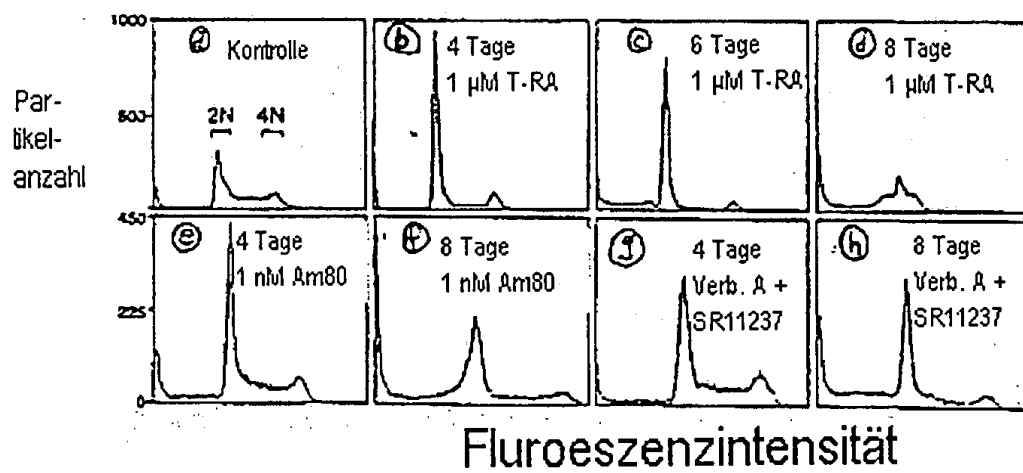
Fig. 1



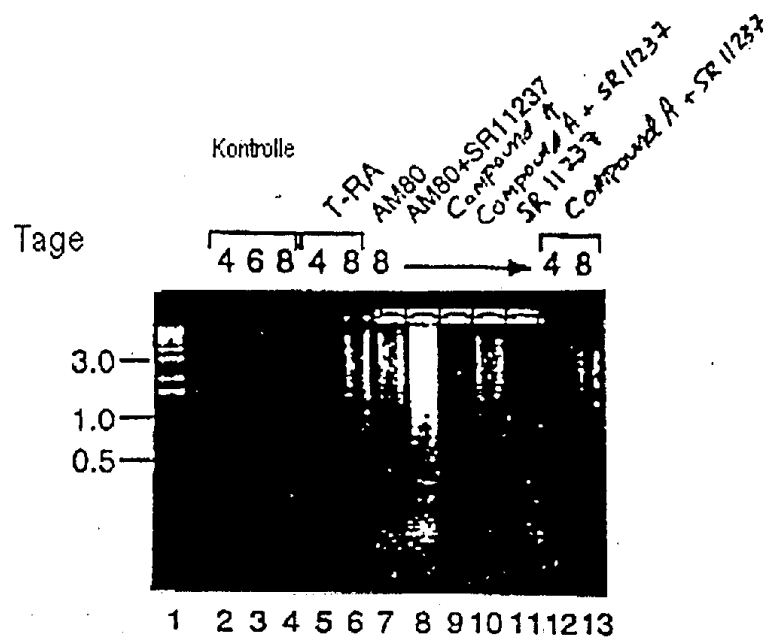
FIGUR 2



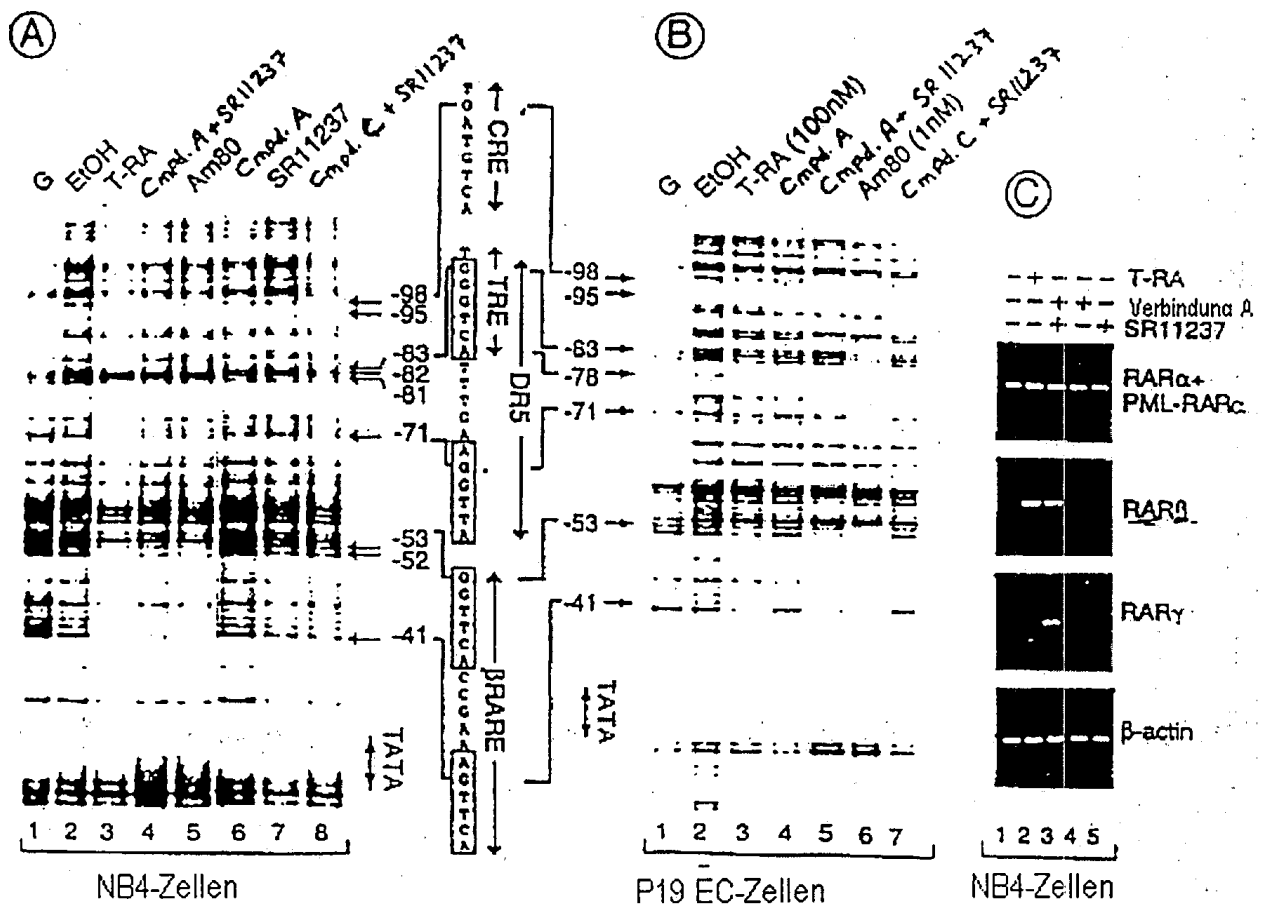
FIGUR 3



FIGUR 4



FIGUR 5



FIGUR 6