



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1107182-6 A2



* B R P I 1 1 0 7 1 8 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 29/12/2011

(43) Data da Publicação: 03/12/2013

(RPI 2239)

(51) Int.Cl.:

A61K 38/11

A61K 9/127

A61P 35/04

(54) Título: COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS
CONTENDO ANG-(1-7) OU OUTRO AGONISTA DE
RECEPTOR MAS EM COMBINAÇÃO COM
INIBIDORES DE PI3K/AKT PARA TRATAMENTO
TERAPÊUTICO ANTICÂNCER

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
Minas Gerais - FAPEMIG, Syndansk Universitet, Universidade Federal
de Minas Gerais.

(72) Inventor(es): Danielle Gomes Passos Silva, Frederic Jean
Georges Frezard, Peter Roepstorff, Robson Augusto Souza dos
Santos, Thiago Verano Braga

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO
ANG-(1-7) OU OUTRO AGONISTA DO RECEPTOR MAS EM
COMBINAÇÃO COM INIBIDORES DE PI3K/AKT PARA
TRATAMENTO TERAPÊUTICO ANTICÂNCER A presente invenção
descreve composições farmacêuticas contendo uma combinação de
Ang-(1-7) ou outro agonista do receptor Mas com inibidores de
PI3K/Akt, para o tratamento terapêutico anticâncer. A combinação de
Ang-(1-7) e inibidores de PI3K/Akt acarreta a inibição da progressão
do câncer através da inibição do crescimento ou proliferação celular ou
ativação da morte celular por apoptose em mamíferos, particularmente
em humanos.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ANG-(1-7) OU OUTRO AGONISTA DO RECEPTOR MAS EM COMBINAÇÃO COM INIBIDORES DE PI3K/AKT PARA TRATAMENTO TERAPÊUTICO ANTICÂNCER

5 A presente invenção descreve composições farmacêuticas contendo uma combinação de Ang-(1-7) ou outro agonista do receptor Mas com inibidores de PI3K/Akt, para o tratamento terapêutico anticâncer. A combinação de Ang-(1-7) e inibidores de PI3K/Akt acarreta a inibição da progressão do
10 câncer através da inibição do crescimento ou proliferação celular ou a ativação da morte celular por apoptose em mamíferos, particularmente em humanos.

 A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um heptapeptídeo endógeno, componente do sistema renina-angiotensina. Esse peptídeo é gerado principalmente através da clivagem de angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (Tipnis SR et al., 2000. A human
15 homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* Oct 27;275(43):33238-43. PubMed PMID: 10924499; Santos RA et al., 2008. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol.* May;93(5):519-27. Epub 2008 Feb 29. Review. PubMed
20 PMID: 18310257).

 A Ang-(1-7) contrabalança os efeitos fisiológicos de Ang II, como a vasoconstrição, através de sua ligação com o receptor Mas acoplado à proteína G. Também há alguns relatos da possível interação da Ang-(1-7) com os receptores ATR1 e ATR2. Além disso, recentemente foram descritos
25 agonistas de Ang-(1-7) capazes de ativar o receptor Mas, sendo alguns deles denominados CGEN-856S, CGEN-857 e AVE0991 (Santos RA et al., 2003. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jul 8;100(14):8258-63. Epub 2003 Jun 26. PubMed PMID: 12829792; PubMed Central PMCID: PMC166216; Schmaier AH, 2003. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a
30 multilayered interaction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*

- Jul;285(1):R1-13. Review. PubMed PMID: 12793984; Savergnini SQ et al., 2010. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. *Hypertension*. Jul;56(1):112-20. Epub 2010 May 17. PubMed PMID: 20479330; Santos RA, Ferreira AJ, 2006. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. *Cardiovasc Drug Rev*. Fall-Winter;24(3-4):239-46. Review. PubMed PMID: 17214600).

A Ang-(1-7) possui papel central na regulação da pressão sanguínea e na melhora da função cardíaca, através de uma ação antiarrítmica, anti-hipertrófica e antifibrótica. Além desses papéis, a Ang-(1-7) possui ação antiangiogênica, através da inibição de crescimento vascular, e ação antimitogênica, como exemplificado pela inibição da proliferação de células pulmonares cancerígenas. Dessa forma, a Ang-(1-7) possui um grande potencial para a inibição de crescimento tumoral, como, inclusive, já demonstrado experimentalmente em pacientes (Santos RA, Frézard F, Ferreira AJ, 2005. Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. Oct;3(4):383-91. Review. PubMed PMID: 16250869; Schindler C et al., 2007. Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc Health Risk Manag*. 3(1):125-37. Review. PubMed PMID: 17583183; PubMed Central PMCID: PMC1994039; Trask AJ, Ferrario CM, 2007. Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments. *Cardiovasc Drug Rev*. Summer;25(2):162-74. Review. PubMed PMID: 17614938; Petty WJ et al., 2009. Phase I and pharmacokinetic study of angiotensin-(1-7), an endogenous antiangiogenic hormone. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 1;15(23):7398-404. Epub Nov 17. PubMed PMID: 19920106; Loot AE et al., 2002. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*. Apr 2;105(13):1548-50. PubMed PMID: 11927520; Santos RA et al., 2006. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*. May;47(5):996-1002. Epub 2006 Mar 27. PubMed PMID: 16567589; Machado RD, Santos RA, Andrade SP, 2001. Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am*

J Physiol Regul Integr Comp Physiol. Apr;280(4):R994-R1000. PubMed PMID: 11247819; Gallagher PE et al., 2011. Angiotensin peptides and lung cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* May; 11(4):394-404. PubMed PMID: 21395552; Tallant EA, Clark MA, 2003. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 2003 Oct;42(4):574-9. Epub 2003 Sep 2. PubMed PMID: 12953014; Gallagher PE, Tallant EA, 2004. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis.* Nov;25(11):2045-52. Epub 2004 Jul 29. PubMed PMID: 15284177; Rodgers et al., 2006. Phase I/II dose escalation study of angiotensin 1-7 [A(1-7)] administered before and after chemotherapy in patients with newly diagnosed breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* May;57(5):559-68. Epub 2005 Aug 12. PubMed PMID: 16096787, Soto-Pantoja DR et al, 2009. Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. *Mol Cancer Ther.* Jun; 8(6):1676-83. Epub 2009 Jun 9. PubMed PMID: 19509262).

Por outro lado, a inibição da via de sinalização da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) classe I vem sendo amplamente estudada como alternativa para o tratamento de câncer. A ativação dessa via aumenta a concentração de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, que desloca Akt para a membrana, recrutando outras cinases e culminando na ativação de genes relacionados ao crescimento, proliferação celular, metabolismo, e outros mecanismos biológicos. Muitos componentes dessa via estão relacionados à mitogênese e à transformação maligna de células. Existem vários trabalhos que descrevem inibidores de PI3K e de Akt com atividade anticâncer (Bowles DW, Jimeno A, 2011. New phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* Apr;20(4):507-18. Review. PubMed PMID: 21395485; Vivanco I, Sawyers CL, 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* Jul;2(7):489-501. Review. PubMed PMID: 12094235; Yang, L, 2004).

Exemplos de inibidores de PI3K e/ou Akt incluem, de forma não limitante, wortmannin, LY294002, FTY720, UCN-01, celecoxib e seus análogos, como OSU-03012 e OSU-03013, Akt-1-1, Akt-1-1,2 e API-2 (Yano, H et al., *J.*

Biol. Chem., 263, 16178, 1993; Vlahos et al., *J. Biol. Chem.*, 269, 5241, 1994; Lee et al., *Carcinogenesis*, 25(12):2397-2405, 2004; Amornphimoltham et al., *Clin Cancer Res.*, 10(12 Pt 1):4029-37, 2004; Zhu et al., *Cancer Res.*, 64(12):4309-18, 2004; Barnett et al., *Biochem. J.*, 385 (Pt.2):399-408, 2005; 5 Barnett et al., *Biochem. J.*, 385 (Pt.2):399-408, 2005; Yang et al., *Cancer Res.*, 64:4394-9, 2004).

Vários documentos de patente descrevem o método de inibição da PI3K ou Akt, através de compostos inibidores específicos da PI3K ou Akt como tratamento para câncer. Dentre eles, citam-se os seguintes: US 2006058321, 10 US 5378725, US 2004242631 e US 2008188482.

O documento US 2008167251, intitulado "*Angiotensin-(1-7) and Angiotensin-(1-7) Agonists for Inhibition of Cancer Cell Growth*" descreve o uso de Ang-(1-7) ou agonistas do receptor de Ang-(1-7) em composições para o tratamento de câncer de mama e pulmão, não limitante.

15 O documento US 2009192127, intitulado "*Combination therapy comprising a diaryl urea compound and a PI3, Akt kinase or mTOR inhibitors (rapamycins) for cancer treatment*", descreve composições farmacêuticas e combinações para o tratamento de câncer, compreendendo um composto de diaril uréia e um inibidor da via de sinalização PI3K/Akt.

20 O documento WO 2005046678, intitulado "*Cancer treatment method*", descreve combinações farmacêuticas e método para o tratamento de câncer incluindo administração de um inibidor da família erb e um inibidor de PI3K e/ou Akt.

25 O documento WO 2005110477, intitulado "*Combination therapies for cancer and proliferative angiopathies*", descreve composições e métodos para tratamento de câncer e angiopatias proliferativas incluindo um inibidor da via de sinalização Jak2/Stat3 e um inibidor da via de sinalização PI3K/Akt.

30 O documento WO 2010037892, intitulado "*Composition comprising silibinin at determined concentrations and combined preparation comprising silibinin and a PI3K/Akt pathway inhibitor for the treatment of cancer*", descreve o uso de uma composição compreendendo silibinina ou alternativamente

silibinina e um inibidor de Akt, para a preparação de um medicamento para tratamento de câncer, e uma preparação combinada de, pelo menos, silibinina e um inibidor de PI3K/Akt, para uso separadamente, simultaneamente ou sequencialmente no tratamento do câncer.

- 5 Desta forma, não foi descrito no estado da técnica o uso de composições farmacêuticas contendo inibidores de PI3K/Akt em combinação com agonistas do receptor Mas, preferencialmente Ang-(1-7), para tratamento de neoplasias, como descrito na presente invenção.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

- 10 Figura 1. A Figura 1 mostra o agrupamento de perfis de (des)fosforilação tempo-dependente. Essa figura descreve os resultados do procedimento de agrupamento fuzzy c-means. Os agrupamentos foram divididos em quatro principais grupos baseados na cinética de fosforilação. As proteínas contendo fosfossítios com valores de agrupamento maiores que 0,3 estão mostradas
15 abaixo de cada agrupamento

- Figura 2. A Figura 2 mostra a porcentagem de sobrevivência de células tumorais quando tratadas com a combinação de Angiotensina 1-7 (10^{-6}) e inibidores de PI3K (wortmannin e LY294002) relativa a células sem tratamento. (A) Células tumorais de pulmão (A549) tratadas somente com Wortmaninn (Wort) em diferentes concentrações (62,50 μ M, 31,25 μ M, 15,63 μ M, 7,81 μ M e 3,91 μ M) ou em combinação com angiotensina 1-7 (10^{-6}) (Wort + Ang-(1-7)).
20 (B) Células tumorais de próstata (Du145) tratadas somente com LY294002 (LY) em diferentes concentrações (250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,25 μ M e 15,63 μ M) ou em combinação com angiotensina 1-7 (10^{-6}) (LY + Ang-(1-7)). Foi utilizado o
25 software GraphPad para a análise estatística two-way ANOVA com correção de Bonferroni. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ e ***: $p < 0.001$.

- Figura 3. A figura 3 mostra a localização de FoxO1 em células tumorais A549 através da imunofluorescência antes (A) e após o tratamento com angiotensina 1-7 (10^{-7}) (B). As células forma marcadas com DAPI e com anticorpos anti-FoxO1 (Cellsignalling) detectados com anti-IgG de coelho
30 conjugado com Alexa 488.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

A presente invenção descreve composições farmacêuticas anticâncer, caracterizadas por compreenderem agonistas do receptor Mas, preferencialmente a Angiotensina-(1-7), em combinação com inibidores de PI3K/Akt e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis são selecionados de um grupo que compreende água, solução salina, soluções tamponadas com fosfato, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank, soluções salinas biocompatíveis contendo ou não polietilenoglicol, veículos não aquosos, como óleos fixos, óleo de sésamo, oleato de etila ou triglicerídeos, isolados ou em mistura, incluindo nanopreparações; podendo conter aditivos, como tampões, conservantes, aglutinantes, desintegrantes, diluentes, lubrificantes e/ou tensoativos.

O agonista do receptor Mas e os inibidores de PI3K/Akt podem ser administrados simultaneamente ou dentro de um intervalo de 10 minutos entre um e outro. Além disto, o agonista do receptor Mas e os inibidores de PI3K/Akt podem ser administrados em uma formulação que compreende ciclodextrinas, derivados de ciclodextrinas, lipossomos, polímeros biodegradáveis, derivados de polímeros biodegradáveis ou misturas destes sistemas; podendo ser apresentados nas formas sólida, semi-sólida ou líquida; e podendo ser administrados pelas vias oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados. O agonista do receptor Mas e os inibidores de PI3K/Akt podem ser administrados usando a mesma forma ou formas diferentes de aplicação.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser usadas para preparar um medicamento para tratar indivíduos acometidos por neoplasias.

A presente invenção demonstra que o tratamento de células endoteliais com Ang-(1-7) altera o estado de fosforilação de alguns componentes da via de sinalização PI3K/Akt e de diversas proteínas envolvidas em processos anti-tumorigênicos, como a regulação da proliferação celular e da angiogênese.

Demonstra também que o tratamento anti-cancerígeno utilizando Ang-(1-7) pode apresentar um efeito mais significativo quando utilizado em conjunto com inibidores da via PI3K/Akt.

5 A identificação dos compostos cujo estado de fosforilação foi alterado pelo tratamento com Ang-(1-7) foi realizada através da utilização de uma metodologia fosfoproteômica quantitativa baseada em espectrometria de massa (MS).

10 A eficácia do tratamento anti-cancerígeno utilizando a combinação de Ang-(1-7) e inibidores de PI3K foi avaliada através da comparação entre a inibição do crescimento de células tumorais após o tratamento com essa combinação e o tratamento com cada uma dessas drogas isoladamente.

15 A localização de FoxO1, uma proteína chave no controle da proliferação celular e alvo da cascata de sinalização mediada pela via PI3K/AKT e pela via desencadeada pela angiotensina 1-7, foi realizada através de imunofluorescência em células tumorais.

A presente invenção pode ser melhor compreendida, de forma não limitante, através dos exemplos que se seguem.

20 **Exemplo 1 - Estimulação de células endoteliais com Ang-(1-7), obtenção dos peptídeos, marcação dos peptídeos e enriquecimento de fosfopeptídeos**

Células endoteliais da aorta humana (HAEC - *Human Aortic Endothelial Cells* – Lonza - Basel, Switzerland) foram crescidas em quatro placas de 100 mm a 37°C em meio de cultivo celular Clonetics® EGM®-2 BulletKit (Lonza - Basel, Switzerland), de acordo com especificações do fabricante, até atingirem 25 confluência de 65%. As células foram, então, incubadas com Ang-(1-7) na concentração final de 10^{-7} M por 3, 5 e 20 minutos. Células não tratadas foram utilizadas como controle (tempo = 0 minutos). As células foram lisadas para extração de proteínas utilizando-se 400µL de uma solução contendo 7M uréia; 2M tiouréia; 200mM bicarbonato de trietilamônia; 0.05% RapiGest™ (Waters - 30 Milford, USA); 0,1M pervanadato; protease e coquetéis de inibidores de fosfatase (Roche - Mannheim, Germany)]. Após redução das pontes dissulfeto

com 10mM de DTT e alquilação de grupos tióis livres com 40mM de iodoacetamida, as proteínas foram digeridas overnight (RT) com tripsina (1:50).

Os peptídeos (100µg) foram marcados com reagentes iTRAQ® (Applied Biosystems - Foster City, USA), e combinados na proporção de 1:1:1:1.

5 Posteriormente, os fosfopeptídeos presentes na amostra foram enriquecidos utilizando-se TiO₂ e SIMAC (Larsen, MR et al., 2005. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4, 873-886; Thingholm, TE et al., 2008. SIMAC (sequential elution from IMAC), a

10 phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteomics* 7, 661-671).

Em torno de 99% dos peptídeos identificados na presente invenção contêm fosforilação, indicando um alto grau de enriquecimento desta modificação pós-traducional.

15 **Exemplo 2 - Análise de fase reversa nanoLC-ESI MS/MS**

Os fosfopeptídeos enriquecidos foram ressuspensos em ácido fórmico (FA) 0,1% e purificados em cromatografia líquida de fase-reversa em uma coluna de 17 cm X 100 µm Reprosil-Pur C18-AQ (3 µm; Dr. Maisch GmbH - Ammerbuch, Germany) usando um Easy-LC nanoHPLC (Proxeon - Odense,

20 Denmark). O gradiente de cromatografia foi de 0-34% de solvente B (ACN 90%, FA 0,1%) por 200 min a uma taxa de fluxo de 250 nL/min. O instrumento LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher – Waltham, USA) foi operado em um modo positivo e usando ativação multiestágio (MSA) para fragmentação MSMS (Schroeder, MJ et al., 2004. A neutral loss activation method for improved

25 phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry. *Analytical chemistry* 76, 3590-3598). No total, foram identificados 2243 fosfopeptídeos únicos com 99% de confiança (1% FDR).

Exemplo 3 - Processamento de dados e busca no banco de dados

Os espectros de MS/MS foram submetidos à busca no banco de dados

30 de biblioteca de sequências humanas no banco de dados de sequências proteicas (Sprot 2010_12 version: 523,151 sequences; 184,678,199 residues)

usando um servidor *in-house* Mascot (version 2.2.04, Matrix Science Ltd. - London, UK).

Normalização de dados e análise de significância – Duas replicatas biológicas com duas replicatas técnicas cada, foram consideradas como quatro
 5 experimentos para análise estatística. Os dados quantitativos foram normalizados utilizando a mediana. Múltiplas medidas de fosfopeptídeos foram agrupadas utilizando a função Rollup do pacote DanteR (<http://www.omics.pnl.com>). Regulações significativas para baixo ou para cima entre estágios experimentais foram determinadas pelas médias de valores de
 10 p. Os valores foram calculados utilizando o método estatístico “one-way ANOVA” do software DanteR e corrigidos por Benjamini-Hochberg (Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57, 289-300.).

Todos os peptídeos, independentemente de seus valores-p específicos,
 15 foram utilizados para detectar tendências comuns nos perfis de fosforilação induzidos pela Ang-(1-7) utilizando o algoritmo *fuzzy c-means* que permitiram a identificação de tendências comuns. (Xie, XL, Beni, G, 1991. A validity measure for fuzzy clustering. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on* 13, 841-847; Schwammle, V; Jensen, ON, 2010. A simple and
 20 fast method to determine the parameters for fuzzy c-means cluster analysis. *Bioinformatics* 26, 2841-2848).

Exemplo 4 - Localização do sítio de fosforilação

Com o objetivo de identificar os sítios de fosforilação com 99% de certeza, foram utilizados dois parâmetros, o *mascot delta score* (Savitski, MM
 25 et al., 2011. Confident phosphorylation site localization using the mascot delta score. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, M110 003830) e o algoritmo Ascore (Beausoleil, AS et al., 2006. A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nature biotechnology* 24, 1285-1292). Foram utilizados os parâmetros MD-score ≥ 9 e
 30 Ascore ≥ 19 como pontos de corte. Os sítios de fosforilação que ainda não

foram descritos na literatura foram ainda validados manualmente por inspeção de seus respectivos espectros de MSMS.

Foram identificados 1516 sítios de fosforilação localizados em 699 proteínas. Deste total, 121 sítios localizados em 79 proteínas apresentaram 5 regulação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) (Tabelas I e II).

Tabela I - Proteínas (des-)fosforiladas após estimulação por Ang-(1-7)

Gene	Código de Acesso	Nome da Proteína	Sítio de fosforilação
ADAM9	Q13443	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9 precursor	*S758, *T761
AFAP1L1	Q8TED9	Actin filament-associated protein 1-like 1 isoform 1	S603
AHNAK	Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	*S559, *S5448
AHSG	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	S135 , *S138
AKAP12	Q02952	A-kinase anchor protein 12 isoform 1	*S696, *S697, *S698
AKAP2	Q9Y2D5	A-kinase anchor protein 2 isoform 2	S135
AKT1	P31749	RAC-alpha Ser/Thr-protein kinase	*S124
AKT1S1	Q96B36	Proline-rich AKT1 substrate 1	*T246
ANP32B	Q92688	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	*T244
ARPP19	P56211	cAMP-regulated phosphoprotein 19	*S62
BAG3	Q95817	BAG family molecular chaperone regulator 3	S264
CALD1	Q05682	Caldesmon	*S789**
CANX	P27824	Calnexin precursor	*S583
CAV1	Q03135	Caveolin-1 isoform alpha	*S37
CFL1	P23528	Cofilin-1	*S3
CTNND1	O60716	Catenin delta-1 isoform 1ABC	*S252, *S349, *S352
CYBRD1	Q53TN4	Cytochrome b reductase 1 isoform 1	*T285
DPYSL2	Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 2	*T514
DYNC1LI2	O43237	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	*S194
DYRK1B	Q9Y463	Dual specificity Tyr-phosphorylation-regulated kinase 1B isoform a	*Y273
EIF5B	O60841	Eukaryotic translation initiation factor 5B	*S214
ERC1	Q8IUD2	ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1 isoform epsilon	S37
ESAM	Q96AP7	Endothelial cell-selective adhesion molecule precursor	S359
FAM129B	Q96TA1	Niban-like protein 1 isoform 2	*S679, *S683
FLNA	P21333	Filamin-A isoform 2	*S1459
FMNL2	Q96PY5	Formin-like protein 2	*S171
FOXO1	Q12778	Forkhead box protein O1	*S256
FRMD4A	Q9P2Q2	FERM domain-containing protein 4A	S711
HDAC1	Q13547	Histone deacetylase 1	*S421, *S423
HIST1H1B	P16401	Histone H1.5	*T11, *S18
HIST1H1C	P16403	Histone H1.2	*S173
HIST1H1E	P10412	Histone H1.4	*T4, *S187
HNRNPA3	P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	*Y360
HNRNPC	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 isoform a	*S233
HNRNPH1	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	*S104
HSPB1	P04792	Heat shock protein beta-1	*S82
LARP1	Q6PKG0	La-related protein 1	*T782, *T788
LMNA	P02545	Prelamin-A/C isoform 1 precursor	*S390, *S406, *S407, *S414
LMNB1	P20700	Lamin-B1 isoform 1	*S391, *S393
LOC100129307	A8MX80	Putative UPF0607 protein ENSP00000383144	S237
LSM14A	Q8ND56	Protein LSM14 homolog A isoform a	*S219
LUZP1	Q86V48	Leucine zipper protein 1	S233
MAP4	P27816	Microtubule-associated protein 4 isoform 1	*S787, *S1073

MAPK1	P28482	Mitogen-activated protein kinase 1	*Y187
MARCKS	P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	*S170
MARCKSL1	P49006	MARCKS-related protein	*S104
MOBK1A	Q7L9L4	mps one binder kinase activator-like 1A	*T35
MYCT1	Q8N699	myc target protein 1	S149
NDRG1	Q92597	Protein NDRG1	*S336
NUCKS1	Q9H1E3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate	*S19
OSBPL10	Q9BXB5	Oxysterol-binding protein-related protein 10 isoform 1	*S30
PAK2	Q13177	Ser/Thr-protein kinase PAK 2	*S2
PDCD4	Q53EL6	Programmed cell death protein 4 isoform 1	*S457
PDLIM4	P50479	PDZ and LIM domain protein 4 isoform 1	*S112
PEA15	Q15121	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	*S116
PGM2	Q96G03	Phosphoglucomutase-2	*S165
PGM2L1	Q6PCE3	Glucose 1,6-bisphosphate synthase	*S175
PHLDB1	Q86UU1	Pleckstrin homology-like domain family B member 1 isoform a	*S430
PIK3C2A	O00443	Phosphatidylinositol-4-P 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha	*S338
PLEC	Q15149	Plectin isoform 1	*S720, *S4386
PML	P29590	Protein PML isoform 1	*S518, *S527
PXN	P49023	Paxillin isoform 1	S258
RASIP1	Q5U651	Ras-interacting protein 1	*S331
SEPT2	Q15019	Septin-2	*S218
SHANK3	Q9BYB0	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3	*T1235
SMARCA4	P51532	Transcription activator BRG1 isoform B	T1423
SRRM1	Q8IYB3	Ser/Arg repetitive matrix protein 1	*S450, S646 , *S653, *S675, *S696, *S738, *S740
SRSF11	Q05519	Ser/Arg-rich splicing factor 11 isoform 1	*S483
TBC1D4	O60343	TBC1 domain family member 4	*S341, *S344, *S588
TCOF1	Q13428	Treacle protein isoform d	*S1350
THRAP3	Q9Y2W1	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	*S248, *S253
TJP2	Q9UDY2	Tight junction protein ZO-2 isoform 1	*S130, *S415, *S986
TPR	P12270	Nucleoprotein TPR	*S2073
VIM	P08670	Vimentin	*S39, *S56, *Y61, *S144, *S430
WWP2	O00308	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2 isoform 1	*S211
YTHDC1	Q96MU7	YTH domain-containing protein 1 isoform 1	*S146, *T148
ZC3H18	Q86VM9	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	*S893
ZC3HC1	Q86WB0	Nuclear-interacting partner of ALK	*S344
ZFYVE19	Q96K21	Zinc finger FYVE domain-containing protein 19	*S354

*Sítio de fosforilação já descrito na literatura. **Sítio de fosforilação relocado manualmente pelos autores. Em **negrito**, novos sítios de fosforilação.

Tabela II - Lista de todos os peptídeos apresentando alterações significativas nos níveis de fosforilação

ID	Gene	Peptídeos	MD-score (Ascore)	Quantificação - log2(valor p)		
				3min.	5min.	20min.
A8MX80	LOC100129307	pSSPPK	14(17)	-0,238(0,009)	-0,221(0,013)	-0,064(0,461)
O00308	WWP2	TTPATGEQpSPGAR	16(20)	0,278(0,009)	0,117(0,234)	0,243(0,018)
O00443	PIK3C2A	SQpSLNIR	10(20)	0,516(<0,001)	0,460(<0,001)	0,203(0,029)
O43237	DYNC1LI2	DFQDYMEPEGCGpSPQRR	35(9)	-0,614(0,021)	-0,605(0,021)	-0,050(0,738)
O60343	TBC1D4	HApSAPSHVQPSDSEK	11(24)	-0,335(0,058)	-0,496(0,010)	-0,400(0,029)
O60343	TBC1D4	LGpSVDSFER	21(35)	-0,869(0,021)	-0,638(0,063)	-0,547(0,101)
O60716	CTNND1	APpSRQDVYGPQPQVR	15(28)	-0,214(0,145)	-0,117(0,441)	-0,294(0,046)
O60716	CTNND1	GSLApSLDpSLRK	14(3)	0,208(0,153)	0,425(0,008)	0,040(0,828)
O60841	EIF5B	NKPGPNIEpSGNEDDDASFK	18(42)	-0,949(0,012)	-0,910(0,010)	-0,953(0,008)
O95817	BAG3	AApSPFR	22(N/A)	0,180(0,120)	-0,010(0,956)	0,353(0,006)
P02545	LMNA	ASSHpSpSQTQGGGpSVTK	14(11)	0,222(0,247)	0,728(0,023)	0,675(0,027)
P02545	LMNA	ASSHSSQTQGGGpSVTK	14(5)	-0,326(0,040)	-0,092(0,586)	0,053(0,773)
P02545	LMNA	LRLpSPSPTSQR	7(29)	-0,033(0,508)	0,114(0,023)	0,201(0,001)
P02765	AHSG	CDSpSPDSAEDVRK	22(11)	-0,107(0,236)	-0,855(<0,001)	-0,957(<0,001)
P02765	AHSG	CDSSPDpSAEDVR	3(28)	-0,531(<0,001)	-0,376(0,003)	-0,916(<0,001)
P02765	AHSG	CDSSPDpSAEDVRK	22(38)	-0,224(0,094)	-0,698(<0,001)	-0,744(<0,001)

P04792	HSPB1	QLpSSGVSEIR	2(20)	0,529(0,002)	0,675(<0,001)	0,985(<0,001)
P07910	HNRNPC	NDKpSEEEQSSSSVK	1(40)	0,345(0,053)	0,508(0,023)	0,520(0,022)
P08670	VIM	ETNLDpSLPLVDTHSK	13(2)	0,309(0,018)	0,215(0,081)	0,421(0,003)
P08670	VIM	ETNLDpSLPLVDTHSKR	12(12)	0,517(<0,001)	0,306(0,004)	0,434(<0,001)
P08670	VIM	ILLAELEQLKGQKpSR	1(N/A)	0,094(0,464)	0,285(0,039)	0,383(0,012)
P08670	VIM	SLYASpSPGGVpYATRSSAVR	11(0)	-0,363(0,033)	-0,275(0,065)	0,239(0,088)
P08670	VIM	TYpSLGSALRPSTSR	19(16)	0,037(0,771)	-0,223(0,040)	0,143(0,183)
P10412	HIST1H1E	KAPKpSPAK	12(N/A)	-0,254(0,008)	0,025(0,543)	0,276(0,007)
P10412	HIST1H1E	SEpTAPAAPAPAEKTPVKK	24(9)	-0,328(0,040)	-0,063(0,513)	-0,162(0,141)
P12270	TPR	APQpSPR	22(N/A)	-0,257(0,033)	-0,083(0,449)	-0,038(0,750)
P16401	HIST1H1B	SETAPAEApTPAPVEKpSPAK	43(40)	-0,145(0,082)	0,011(0,926)	0,259(0,006)
P16403	HIST1H1C	VAKpSPK	20(N/A)	0,115(0,262)	0,324(0,005)	0,473(<0,001)
P20700	LMNB1	LKLpSPpSPSSR	22(11)	-0,087(0,298)	0,072(0,407)	0,206(0,019)
P21333	FLNA	CSGpGLpSPGMVR	23(23)	0,194(0,108)	0,275(0,033)	0,355(0,012)
P23528	CFL1	ApSGVAVSDGVKVFNDMK	29(17)	0,533(0,027)	0,577(0,020)	0,568(0,021)
P27816	MAP4	RApSPSKPASAPASR	13(5)	-0,227(0,005)	-0,119(0,088)	0,014(0,877)
P27816	MAP4	VGpSLDNVGHLPAGGAVK	19(N/A)	-0,123(0,618)	-0,556(0,020)	-0,293(0,194)
P27824	CANX	AEDEILNRpSPR	24(N/A)	-0,118(0,122)	0,083(0,286)	0,244(0,005)
P28482	MAPK1	VADPDHDTGFLTEpYVATR	14(20)	-1,441(0,034)	-0,778(0,215)	0,329(0,613)
P29590	PML	AVpSPPHLDGPPpSPR	35(N/A)	-0,228(0,024)	-0,094(0,336)	0,037(0,738)
P29966	MARCKS	LSGFPpFKK	14(9)	0,631(0,018)	0,997(0,001)	0,025(0,947)
P31749	AKT1	SGpSPSDNSGAEMEVSIAKPK	11(8)	0,315(0,043)	0,142(0,218)	0,116(0,292)
P31943	HNRNP1	HTGPNpSPDTANDGFVR	17(26)	-0,419(0,008)	-0,146(0,319)	0,064(0,695)
P49006	MARCKSL1	LSGLpSFKR	18(14)	-0,471(0,055)	-0,278(0,234)	-0,842(0,006)
P49023	PXN	lpSASSATR	22(19)	0,024(0,719)	0,156(0,011)	0,120(0,038)
P50479	PDLIM4	IHIDPEIQDGpSPTTSR	7(36)	-0,436(0,012)	-0,346(0,035)	-0,107(0,532)
P51532	SMARCA4	DSDAGSSpTPTTSTR	10(0)	-0,024(0,656)	-0,080(0,184)	0,284(0,012)
P51991	HNRNPA3	SSGSPpYGGGYGGGGSGGYGSR	22(8)	-0,169(0,044)	0,0001(0,998)	-0,011(0,926)
P56211	ARPP19	GQKYFDpSGDYNMAK	23(8)	-0,411(0,087)	-0,342(0,145)	-0,587(0,026)
Q02952	AKAP12	pSPSPVER	1(35)	-0,160(0,001)	0,006(0,891)	0,108(0,007)
Q02952	AKAP12	RGpSpSpSDEEGGPK	5(N/A)	-1,251(0,056)	-1,681(0,030)	-1,064(0,082)
Q02952	AKAP12	RGSpSpSDEEGGPK	5(21)	0,147(0,326)	0,373(0,018)	0,436(0,008)
Q03135	CAV1	AMADELPpSEK	56(N/A)	-0,704(0,001)	-0,366(0,027)	-0,261(0,083)
Q05519	SRSF11	VNGDDHHEEDMDpSD	11(N/A)	-0,504(0,033)	-0,439(0,046)	-0,093(0,531)
Q05682	CALD1**	QSVDKVTpSPTKV	17(9)	-0,601(0,048)	-0,660(0,039)	-0,387(0,127)
Q09666	AHNAK	GPRlpSAPNVDFNLEGPK	48(N/A)	-0,433(0,026)	-0,494(0,013)	-0,056(0,805)
Q09666	AHNAK	LGpSPSGK	13(54)	0,452(<0,001)	0,506(<0,001)	0,549(<0,001)
Q12778	FOXO1	AApSMDNNSK	42(49)	-0,540(0,043)	-0,321(0,190)	-0,289(0,237)
Q13177	PAK2	pSDNGELEDKPPAPPVR	47(N/A)	-0,405(0,032)	0,153(0,415)	0,176(0,340)
Q13428	TCOF1	KLpSGDQPAAR	31(N/A)	0,051(0,759)	0,200(0,160)	0,361(0,018)
Q13443	ADAM9	HVpSPVpTPPREVPIYANR	22(12)	0,469(0,015)	0,378(0,039)	0,697(0,001)
Q13547	HDAC1	IACEEEFpSDpSEEEGEGGRK	36(N/A)	-0,387(0,035)	-0,305(0,083)	-0,360(0,046)
Q15019	SEPT2	IYHLPDAEpSDEDEDFKEQTR	23(42)	-0,233(0,609)	1,604(0,031)	0,923(0,104)
Q15121	PEA15	QpPSEEEIK	30(N/A)	-1,329(0,003)	-0,755(0,029)	-1,098(0,006)
Q15149	PLEC	SDEGQLpSPATR	17(19)	0,729(0,006)	0,502(0,029)	0,625(0,012)
Q15149	PLEC	SSpSVGSSSSYPISPAVSR	19(15)	0,833(0,033)	0,201(0,425)	0,689(0,052)
Q16555	DPYSL2	TvpTPASSAK	28(9)	0,521(0,045)	0,243(0,314)	0,624(0,025)
Q53EL6	PDCD4	FVpSEGDDGGR	36(N/A)	-0,002(0,988)	0,217(0,039)	-0,234(0,029)
Q53TN4	CYBRD1	NLALDEAGQSRSpTM	44(10)	0,134(0,425)	0,287(0,078)	0,486(0,007)
Q5U651	RASIP1	pSVSELpSLQGR	11(2)	0,344(0,034)	0,342(0,035)	0,168(0,298)
Q6PCE3	PGM2L1	AVAGVMITApSHNR	9(8)	-0,171(0,120)	-0,224(0,049)	-0,171(0,120)
Q6PKG0	LARP1	pTPRTPRpTPQLK	10(11)	-0,210(0,113)	0,598(0,010)	0,545(0,013)
Q7L9L4	MOBK1A	HAEApTLGSGNLR	15(12)	0,215(0,103)	0,234(0,077)	0,445(0,004)
Q86UU1	PHLDB1	TFpSDGLATR	11(16)	0,565(<0,001)	0,363(0,001)	0,362(0,001)
Q86V48	LUZP1	NApSNLER	12(N/A)	-0,060(0,635)	-0,330(0,009)	-0,134(0,251)
Q86VM9	ZC3H18	QLpSPQSK	17(41)	-0,204(0,046)	-0,082(0,435)	-0,028(0,826)
Q86WB0	ZC3HC1	SQDATFSPGSEQAEKpSPGPVSR	22(10)	-0,130(0,470)	-0,091(0,630)	-0,389(0,029)
Q8IUD2	ERC1	RTNpSTGGSSGSSVGGGSGK	11(14)	0,792(0,031)	0,279(0,425)	0,443(0,163)
Q8IYB3	SRRM1	APQTSSpSPPVR	9(17)	-0,228(0,049)	-0,142(0,224)	-0,027(0,854)
Q8IYB3	SRRM1	EARpSPQPNK	17(N/A)	-0,319(0,032)	-0,125(0,353)	0,010(0,962)
Q8IYB3	SRRM1	KAApSPpSPQSVR	4(29)	-0,161(0,041)	-0,037(0,673)	0,081(0,304)
Q8IYB3	SRRM1	REpSPSPAPKPR	23(8)	-0,211(0,016)	-0,118(0,152)	-0,101(0,228)
Q8IYB3	SRRM1	RRpSPSLSSK	1(23)	0,158(0,471)	0,461(0,047)	0,364(0,104)
Q8IYB3	SRRM1	SpSPVTK	11(17)	0,047(0,829)	0,399(0,042)	0,491(0,021)
Q8N699	MYCT1	QApSLEQANSFPR	18(57)	-0,344(0,022)	0,027(0,885)	-0,087(0,568)
Q8ND56	LSM14A	SPVpSTRPLPSASQK	20(14)	-0,394(0,010)	-0,174(0,158)	-0,121(0,328)
Q8TED9	AFAP1L1	HApSSANQYK	16(17)	0,283(0,035)	0,224(0,081)	-0,021(0,894)
Q92597	NDRG1	TASGSSVTPSLDGTR	11(11)	0,804(0,040)	0,186(0,470)	0,725(0,050)
Q92688	ANP32B	KREpTDEGEDD	31(N/A)	-0,035(0,877)	0,170(0,335)	0,361(0,039)
Q96AP7	ESAM	LPTTDGAHPQIPiPGVSSSGLSR	36(52)	0,602(0,079)	0,764(0,034)	0,726(0,040)
Q96B36	AKT1S1	LNpTSDFAQK	14(17)	-0,287(0,045)	0,131(0,372)	-0,284(0,047)

Q96G03	PGM2	LCAGIMITApSHNPK	10(18)	-0,276(0,033)	0,112(0,216)	0,198(0,073)
Q96K21	ZFYVE19	LPDpSDDDEDEETAQR	78(79)	-0,828(0,027)	-0,549(0,065)	-0,343(0,162)
Q96MU7	YTHDC1	AKpSPpTPDGSER	19(11)	0,019(0,903)	0,220(0,065)	0,257(0,033)
Q96PY5	FMNL2	pSIEDLHR	24(N/A)	-0,181(0,037)	-0,075(0,405)	-0,044(0,638)
Q96TA1	FAM129B	AAPEASpSPPApSPLQHLLPGK	14(7)	-0,282(0,003)	-0,028(0,767)	0,019(0,860)
Q98XB5	OSBPL10	ATSAGSpSPSCSLAGR	13(5)	0,114(0,464)	-0,010(0,966)	0,550(0,031)
Q9BYB0	SHANK3	LGGAEEERPGpTPELAPAPMQSAVAEPLPpSPR	13(38)	-0,969(0,044)	-0,476(0,289)	-0,169(0,733)
Q9H1E3	NUCKS1	VVDYSQFQEpSDDADEDYGR	25(27)	-0,281(0,003)	-0,028(0,760)	-0,099(0,214)
Q9P2Q2	FRMD4A	SSpSLESQGK	20(12)	0,193(0,145)	0,376(0,009)	0,426(0,005)
Q9UDY2	TJP2	AASSDQLRDNPSPPPAFKPEPPK	16(2)	0,503(0,029)	0,389(0,072)	0,661(0,010)
Q9UDY2	TJP2	KVQVAALQApSPPLDQDDR	54(N/A)	-0,458(0,004)	-0,143(0,311)	-0,201(0,151)
Q9UDY2	TJP2	SFPsPEER	14(26)	-0,172(0,026)	-0,099(0,180)	-0,013(0,898)
Q9Y2D5	AKAP2	TNGHpSPSQPR	10(23)	-0,033(0,614)	0,128(0,036)	0,169(0,010)
Q9Y2W1	THRAP3	ERpSPALKpSPLQSVVVR	10(24)	-0,199(0,158)	0,351(0,028)	0,253(0,083)
Q9Y2W1	THRAP3	ERpSPALKSPLQSVVVR	10(20)	-0,113(0,404)	0,030(0,858)	0,342(0,013)
Q9Y463	DYRK1B	IYQpYIQSR	26(23)	0,209(0,034)	0,265(0,011)	0,392(0,001)

N/A, não aplicável. **Sítio de fosforilação relocado manualmente pelos autores.

Exemplo 5 – Determinação de padrões no perfil de (des)fosforilação dependentes do tempo e identificação dos fosfossítios regulados por Ang-(1-7)

5 Diversos sítios de fosforilação foram regulados pela Ang-(1-7). Por exemplo, pS124 na Akt1 como também pS338 na PIK3C2A atingiram seu estado máximo de fosforilação após 3 minutos (Figura 1 e Tabela II).

Estudos anteriores baseados em *Western Blot* demonstraram que PIK3 classe I como também Akt1 são componentes da via de sinalização do receptor Mas e envolvidos na ativação de eNOS. Além disso, essas cinases também são componentes da via de sinalização da insulina/fator de crescimento. No entanto, identificou-se na presente invenção uma isoforma de PIK3 que pertence à classe II e não é um componente *upstream* da via de sinalização da Akt1. Os efeitos celulares da PIK3C2A ainda não foram elucidados completamente, mas foi descrito que essa cinase induz a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática em resposta a estimulação por insulina. (Sampaio WO et al., 2007. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. Hypertension. Jan;49(1):185-92. Epub 2006 Nov 20. PubMed PMID: 17116756, Giani et al, 2007; Kohn, AD; Kovacina, KS; Roth, RA, 1995. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J* 14, 4288-4295; Hara, K et al., 1994. 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7415-7419; Okano,

J et al., 2000. Falasca, M et al., 2007. The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *The Journal of biological chemistry* 282, 28226-28236;).

A fosforilação da S124 da Akt1 leva à sua ativação. No entanto, somente
 5 após a fosforilação da T308 e da S473 desta cinase sua ativação se completa, permitindo sua translocação para o núcleo, onde fosforila FOXO1 na T24, S256 e S319, e inativa esse fator de transcrição, o que leva à proliferação celular. A fosforilação da Ser124 da Akt1 pode contribuir para a resposta da proteína Akt aos subsequentes eventos de ativação. Dado que Sampaio e colaboradores
 10 (2007) mostraram que Ang-(1-7) pode estimular a ativação da Akt através da fosforilação da Ser473, a fosforilação da Ser124 da Akt1 nas células tratadas com Ang-(1-7) provavelmente estimula a ativação da Akt1 através da facilitação da sua total ativação através da fosforilação da Thr308 e da Ser473, portanto, estimulando as funções endoteliais. Dessa forma, para que o tratamento anti-
 15 cancerígeno utilizando Ang-(1-7) apresente um efeito mais significativo, a presente invenção sugere o uso concomitante de inibidores da via PI3K/Akt, o que silenciaria a ativação de Akt1 por Ang-(1-7), aumentando, portanto, a inibição do crescimento tumoral (Ackah E et al., 2005. Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest.* 2005 Aug;115(8):2119-27. PubMed PMID: 16075056; PubMed Central PMCID: PMC1180542; Bellacosa A et al., 1998. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene.* Jul 23;17(3):313-25. PubMed PMID:9690513; Sampaio WO et al., 2007. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via
 20 Akt-dependent pathways. *Hypertension.* Jan;49(1):185-92. Epub 2006 Nov 20. PubMed PMID: 17116756).

Um dos sítios de fosforilação regulatórios de FoxO1, Ser256, foi encontrado desfosforilado nos dados experimentais da presente invenção, o que leva à ativação de FoxO1. Portanto, a Ang-(1-7) pode inibir o crescimento
 30 de tumores através da ativação de FoxO1, um fator de transcrição envolvido, entre outros mecanismos, na supressão de tumores e na inibição da angiogênese. A via de sinalização PI3K/Akt regula o fator de transcrição

FoxO1, através da fosforilação pela Akt da Ser256, Ser319 e Thr24, induzindo a translocação de FoxO1 para o citoplasma, o que leva à inibição da transcrição dependente de FoxO1 e permite a proliferação celular. Em contraste, o tratamento com Ang-(1-7) estimula a desfosforilação da Ser256 de FoxO1, provavelmente ativando-a. Além de inibir a proliferação celular, FoxO1 ativo pode inibir a migração de células endoteliais e a consequente formação de vasos sanguíneos. A desfosforilação de FoxO1 em células estimuladas com Ang-(1-7) contrasta com a ativação da via de PI3K pela angiotensina-(1-7), que levaria à fosforilação de FoxO1. Provavelmente, a Ang-(1-7) ativa FoxO1 por uma via independente da via PI3K/Akt. Desta forma, a presente invenção demonstra que seria interessante estimular as células com Ang-(1-7), para ativação de FoxO1 e suas propriedades anti-cancerígenas, mas inibir simultaneamente a via de PI3K/Akt, potencializando a inibição da progressão do tumor (Singh A et al 2011. Harnessing the tumor suppressor function of FOXO as an alternative therapeutic approach in cancer. *Curr Drug Targets*. 2011 Aug;12(9):1311-21. PubMed PMID: 21443464.; Potente M et al., 2005. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2005 Sep;115(9):2382-92. Epub 2005 Aug 11. PubMed PMID: 16100571; PubMed Central PMCID: PMC1184037; Zhang X et al., 2002. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem*. Nov 22;277(47):45276-84. Epub 2002 Sep 12. PubMed PMID: 12228231).

A promoção do crescimento celular é uma das funções-chave da Akt. Uma das principais proteínas efetoras *downstream* dessa via é o complexo 1 mTOR. O substrato de Akt rico em prolina de 40 kDa (PRAS40 ou Akt1S1) é um parceiro de ligação de mTOR, o qual inibe a atividade de mTOR através de sua ligação. Akt fosforila Akt1S1 na Thr246, resultando na dissociação de Akt1S1 de mTORC1 e ligação de Akt1S1 à proteína 14-3-3. Células tratadas com Ang-(1-7) apresentam um aumento na desfosforilação da Thr246 de Akt1S1 comparado a células controle. Esse resultado indica que a Ang-(1-7) induz a desfosforilação de PRAS40 que irá estimular sua ligação ao mTOR e

consequentemente inibí-lo. Portanto, a Ang-(1-7) está implicada na inibição do crescimento celular através do bloqueio de atividade de mTOR (Wullschlegler S, Loewith R, Hall MN, 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. Feb 10;124(3):471-84. Review. PubMed PMID: 16469695; Vander Haar E et al., 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*. Mar;9(3):316-23. Epub 2007 Feb 4. PubMed PMID: 17277771).

Além de FoxO1 e Akt1S1, Ang-(1-7) também pode inibir o crescimento tumoral através da regulação das proteínas MAP cinases. O fosfoproteoma de células endoteliais estimuladas com Ang-(1-7) revelou que nas células tratadas ocorre a desfosforilação de Y187 da MAPK1. A desfosforilação da MAPK1, também demonstrada por Sampaio (2007) induz a inativação da MAPK1, uma vez que esse fosfossítio regula a atividade dessa cinase. (Sampaio WO, 2007. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. 2007 Dec;50(6):1093-8. Epub 2007 Nov 5. PubMed PMID: 17984366., Payne, DM et al., 1991. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10, 885-892).

Além disso, Ang-(1-7) regula HDAC1, que possui papel chave na tumorigênese. Inclusive, inibidores de HDAC estão sendo testados para terapia contra o câncer humano. HDAC1 é uma enzima nuclear que desacetila resíduos de lisina na parte N-terminal de histonas H2A, H2B, H3 e H4, induzindo proliferação celular e reduzindo expressão gênica. A fosforilação da serina 421 e 423 de HDAC1 promove a sua ativação. O tratamento com Ang-(1-7) induz uma rápida desfosforilação desses sítios, o que provavelmente diminui a atividade de HDAC1 (Figura 1 e Tabela II). Como consequência, os níveis gerais de acetilação das histonas irá aumentar, tendendo, em muitos casos, a favorecer a expressão gênica e parada do ciclo celular nas fases G1 e G2 (Pflum, MK et al., 2001 Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J Biol Chem* 276, 47733-47741; Di Marcotullio, L et al., 2011. Protected from the inside: endogenous histone

deacetylase inhibitors and the road to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1815, 241-252).

O tratamento de células endoteliais com a Ang-(1-7) induz a fosforilação da Ser338 da PI3K-C2 α , fosforilação da Ser326 de Rasip 1 e fosforilação da Tyr273 de DYRK1B. Essas proteínas modulam processos em que a Ang-(1-7) também está envolvida. PI3K-C2 α e DYRK1B estão envolvidos na sobrevivência celular, enquanto Rasip 1 é uma proteína essencial para a morfogênese de vasos sanguíneos. Apesar de alguns trabalhos descreverem a ação antitumorigênica de Ang-(1-7), esses autores não indicaram os mecanismos dessa ação de Ang-(1-7), que pode ser mediada pela regulação da fosforilação de proteínas como FoxO1, Akt1S1, HDAC1, PI3K-C2 α , Rasip 1 e DYRK1B. (Elis W et al., 2008. Down-regulation of class II phosphoinositide 3-kinase alpha expression below a critical threshold induces apoptotic cell death. *Mol Cancer Res.* Apr;6(4):614-23. PubMed PMID: 18403640; Mercer SE, Friedman E, 2006. Mirk/Dyrk1B: a multifunctional dual-specificity kinase involved in growth arrest, differentiation, and cell survival. *Cell Biochem Biophys.* 45(3):303-15. Review. PubMed PMID: 16845176; Xu K et al., 2009. Rasip1 is required for endothelial cell motility, angiogenesis and vessel formation. *Dev Biol.* May 15;329(2):269-79. Epub 2009 Mar 6. PubMed PMID: 19272373; PubMed Central PMCID: PMC2683470; Xu K et al., 2011. Blood vessel tubulogenesis requires Rasip1 regulation of GTPase signaling. *Dev Cell.* Apr 19;20(4):526-39. Epub 2011 Mar 10. PubMed PMID: 21396893; PubMed Central PMCID: PMC3078994;; Gallagher PE et al, 2004. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis.* 2004 Nov;25(11):2045-52. Epub 2004 Jul 29. PubMed PMID: 15284177.; Menon J et al, 2007. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. *Cancer Res.* 2007 Mar 15;67(6):2809-15. PubMed PMID: 17363603.).

A aplicação de Ang-(1-7) em células endoteliais também afeta o estado de fosforilação de outras proteínas não mencionadas anteriormente, alterando, provavelmente a execução de suas atividades. Foram identificadas proteínas envolvidas nos mecanismos de supressão de tumor, crescimento celular,

metabolismo, apoptose e outros. As proteínas que apresentaram um aumento da fosforilação de determinados resíduos (assinalados em parênteses) compreendem: ADAM9 (pS758/pT761), AHNAK (pS559), AKAP12 (pS697/698), AKAP2 (pS135), Akt1 (pS124), ANP32B (pT244), BAG3 (pS264),
 5 CANX (pS583), CFL1 (pS3), CYBRD1 (pT285), DYRK1B (pY273), ERC1 (pS37), ESAM (pS359), FLNA (pS1459), FRMD4A (pS711), HIST1H1B (pT11), HIST1H1C (pS173), HIST1H1E (pS187), HNRNPC (pS233), HSPB1 (pS82), LARP1 (pT782/788), LMNA (pS390), LMNA (pS406/407), LMNB1 (pS391/393), MOBKL1A (pT35), NDRG1 (pS336), OSBPL10 (pS30), PAK2 (pS2), PGM2
 10 (pS165), PHLDB1 (pS430), PIK3C2A (pS338), PLEC (pS720/4386), PXN (pS258), RASIP1 (pS326/331), SEPT2 (pS218), SMARCA4 (pT1423), SRRM1 (pS646), SRRM1 (pS653), TCOF1 (pS1350), THRAP3 (pS248/253), TJP2 (pS986), VIM (pS144), VIM (pS39), VIM (pS430), WWP2 (pS211) e YTHDC1 (pS146/pT148).

15 Por outro lado, o tratamento com Ang-(1-7) em células endoteliais também induziu um aumento na desfosforilação de determinados resíduos (assinalados em parênteses) de algumas proteínas, as quais compreendem: AHNAK (pS5448), AHSG (pS135) CTNND1 (pS349/352), AHSG (pS138), AKAP12 (pS1328), AKAP12 (pS696/697/698), Akt1S1 (pT246), ARPP19
 20 (pS62), CALD1 (pS789), CAV1 (pS37), CTNND1 (pS252), DYNC1LI2 (pS194), EIF5B (pS214), FAM129B (pS679/683), FMNL2 (pS171), FOXO1 (pS256), HDAC1 (pS421/423), HIST1H1E (pT4), HNRNPA3 (pY360), HNRNPH1 (pS104), LMNA (pS414), LOC100129307 (pS237), LSM14A (pS219), LUZP1 (pS233), MAP4 (pS1073), MAP4 (pS787), MAPK1 (pY187), MARCKSL1
 25 (pS104), MYCT1 (p149), NUCKS1 (pS19), PDCD4 (pS457), PDLIM4 (pS112), PEA15 (pS116), PGM2L1 (pS175), PML (pS518/527), SHANK3 (pT1235/pS1254), SRRM1 (pS450), SRRM1 (pS675/696/738/740), SRSF11 (pS483), TBC1D4 (pS341/588), TJP2 (pS130), TJP2 (pS415), TPR (pS2073), VIM (pS56/pY61), ZC3H18 (pS893), ZC3HC1 (pS344) e ZFYVE19 (pS354).

30 Em conjunto, esses dados mostram que Ang-(1-7) regula a fosforilação e, conseqüentemente, a atividade de proteínas envolvidas em diversos processos anti-tumorigênicos, como a regulação da proliferação celular e da

angiogênese, o que não havia sido anteriormente descrito no estado da técnica.

Exemplo 6 - Sobrevivência de células tumorais submetidas a tratamento com a combinação de Angiotensina 1-7 (10^{-6}) e inibidores de PI3K (wortmannin e LY294002).

As linhagens celulares de adenocarcinoma alveolar humana (A549) e de câncer de próstata humana (Du145) foram crescidas em meio DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino e os antibióticos penicilina e estreptomicina, e incubadas a 37°C e 5%CO₂. Após contagem das células utilizando câmara citométrica, as linhagens foram diluídas para uma concentração de 2×10^4 células.ml⁻¹ em meio DMEM-F12 contendo soro. 250 µl dessa preparação foram distribuídos em cada um dos poços da placa de 96 poços (Nunc), com exceção de metade da última linha, na qual foram adicionados somente 250 µl do meio. Após dois dias de crescimento, durante sua fase logarítmica, na presença de meio DMEM-F12, as células A549 foram tratadas com wortmannin isolado ou em combinação com angiotensina 1-7 (10^{-6}); enquanto as células Du145 foram tratadas com LY294002 isolado ou em combinação com angiotensina 1-7 (10^{-6}). Após aspiração do meio, foram adicionados 125 µl de DMEM-F12, na ausência ou presença de angiotensina 1-7 (10^{-6}). Para a primeira coluna, 125 µl de Wortmannin foram adicionados (250 µM) para as células A549 e 125 µl de LY294002 foram adicionados (1000 µM) para as células Du145. Foram feitas diluições seriadas: 125 µl da primeira coluna foram misturados com a próxima coluna. Em seguida, 125 µl da segunda coluna foram adicionados à terceira coluna e homogeneizados, e assim sucessivamente. Após dois dias de tratamento, essas células foram incubadas por 3 horas na presença de 25 µl de Alamar blue (Invitrogen). Após esse período, a placa foi lida por um espectrômetro utilizando filtro de 570 nm de excitação e 585 nm de emissão e os dados foram analisados usando o MS Excel e GraphPrism.

As células tumorais A549 tratadas com as doses de 31,25 µM e 7,81 µM de wortmannin em combinação com angiotensina-(1-7) apresentaram uma

significativamente menor sobrevivência, quando comparadas com essas mesmas células tratadas somente com a dose correspondente de wortmannin. Para as doses de 62,50 μ M, 15,63 μ M e 3,91 μ M, as células não apresentaram diferença significativa de porcentagem de sobrevivência, quando tratadas em conjunto com Ang-(1-7). De forma similar, foi verificado que as células Du145 tratadas com as concentrações de 125 μ M, 62,5 μ M e 31,25 μ M de LY294002 conjuntamente com angiotensina 1-7 apresentaram uma menor sobrevivência significativa, quando comparadas com as células Du145 submetidas ao tratamento somente com a dose correspondente de LY294002. Essas células, tratadas com as doses de 250 μ M e 15,63 μ M, não apresentaram diferença significativa quando tratadas em combinação com Ang-(1-7). Em ambos os experimentos, o tratamento somente com angiotensina-(1-7) diminuiu a sobrevivência em cerca de 5-10% nas condições experimentais descritas (Figura 2).

Dessa forma, os resultados indicam que a combinação de angiotensina (1-7) com inibidores de PI3K, como wortmannin e LY294002, em determinadas doses, aumenta a eficácia dessas drogas na inibição de crescimento de células tumorais.

Exemplo 7. Localização de FoxO1 em células tumorais A549 após o tratamento com angiotensina-(1-7).

As linhagens celulares de adenocarcinoma alveolar humana (A549) foram crescidas em meio DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino e os antibióticos penicilina e estreptomicina, e incubadas a 37°C e 5%CO₂. Essas células foram incubadas somente com DMEM-F12, sem soro ou na presença de angiotensina 1-7 (10^{-7}) por 10 min. A localização de FoxO1 em células da linhagem A549 foi realizada através de imunolocalização com anticorpo anti-FoxO1. As células foram crescidas em lamínulas tratadas com poli-lisina e depositadas em placas de 6 poços. Primeiramente, as células foram tratadas com solução de PBS suplementada com 4% de paraformaldeído durante 15 minutos à temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS, e as células foram incubadas com PBS + Triton X-100 0,5% por 10

minutos, lavadas novamente, e bloqueadas com PBS + BSA 4% por 1 hora. Anticorpos policlonais primários anti-FoxO1 (Cellsignaling) foram diluídos na proporção 1:100 em PBS e aplicados na lâmina por 16 horas. No dia seguinte, a lâmina foi lavada e incubada com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen), durante 1 hora. Após uma última lavagem com PBS, as lamínulas foram viradas em lâminas e seladas com VectaShield contendo DAPI. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio confocal equipado com uma câmera DXM 1200 F. As imagens foram analisadas através do Programa Image J.

As células A549, após o tratamento com angiotensina 1-7, apresentaram uma maior intensidade de fluorescência de FoxO1 no núcleo em comparação com essas células não tratadas. Esse resultado indica que ocorre uma maior localização de FoxO1 no núcleo de células tratadas com Ang-(1-7). Dessa forma, o tratamento com Ang-(1-7) provavelmente causa a desfosforilação de FoxO1 em células A549, como demonstrado para células HAEC no exemplo 5, o que leva à migração dessa proteína para o núcleo das células tumorais, onde ela irá inibir a transcrição de genes envolvidos no crescimento e proliferação celular e ativação de genes apoptóticos. Portanto, a angiotensina 1-7 através da indução da mudança de localização de FoxO1 pode inibir o crescimento tumoral (Figura 3).

REIVINDICAÇÕES

1. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ANTICÂNCER,**
caracterizadas por compreenderem agonistas do receptor Mas em
combinação com inibidores de PI3K/Akt e excipientes farmaceuticamente
5 aceitáveis.
2. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ANTICÂNCER, de acordo**
com a reivindicação 1, caracterizadas pelo agonista do receptor Mas ser,
preferencialmente, a Angiotensina-(1-7).
3. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ANTICÂNCER, de acordo**
10 **com as reivindicações 1 e 2, caracterizadas pelo** agonista do receptor Mas e
os inibidores de PI3K/Akt serem administrados simultaneamente ou dentro de
um intervalo de 10 minutos entre um e outro.
4. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ANTICÂNCER, de acordo**
15 **com as reivindicações 1 a 3, caracterizadas pelo** agonista do receptor Mas e
os inibidores de PI3K/Akt poderem ser administrados em uma formulação que
compreende ciclodextrinas, derivados de ciclodextrinas, lipossomos, polímeros
biodegradáveis, derivados de polímeros biodegradáveis, nanossistemas ou
misturas destes sistemas.
5. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTICÂNCER, de acordo**
20 **com a reivindicação 1, caracterizada pelos** excipientes serem selecionados
de um grupo que compreende água, solução salina, soluções tamponadas com
fosfato, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank, soluções
salinas biocompatíveis contendo ou não polietilenoglicol, veículos não aquosos,
como óleos fixos, óleo de sésamo, oleato de etila ou triglicerídeos, isolados ou
25 em mistura, incluindo nanopreparações.
6. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTICÂNCER, de acordo**
com a reivindicação 5, caracterizada pelos excipientes poderem conter
aditivos, como tampões, conservantes, aglutinantes, desintegrantes, diluentes,
lubrificantes e/ou tensoativos.
7. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTICÂNCER, de acordo**
30 **com as reivindicações 1 a 6, caracterizada por** ser administrada pelas vias

oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados.

5 8. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ANTICÂNCER, de acordo com as reivindicações 1 a 7, caracterizadas pelo agonista do receptor Mas e os inibidores de PI3K/Akt poderem ser administrados usando a mesma forma ou formas diferentes de administração.**

9. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ANTICÂNCER, de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizadas por serem apresentadas nas formas sólida, semi-sólida ou líquida.**

10 10. **USO DAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ANTICÂNCER, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar indivíduos acometidos por neoplasias.**

FIGURAS

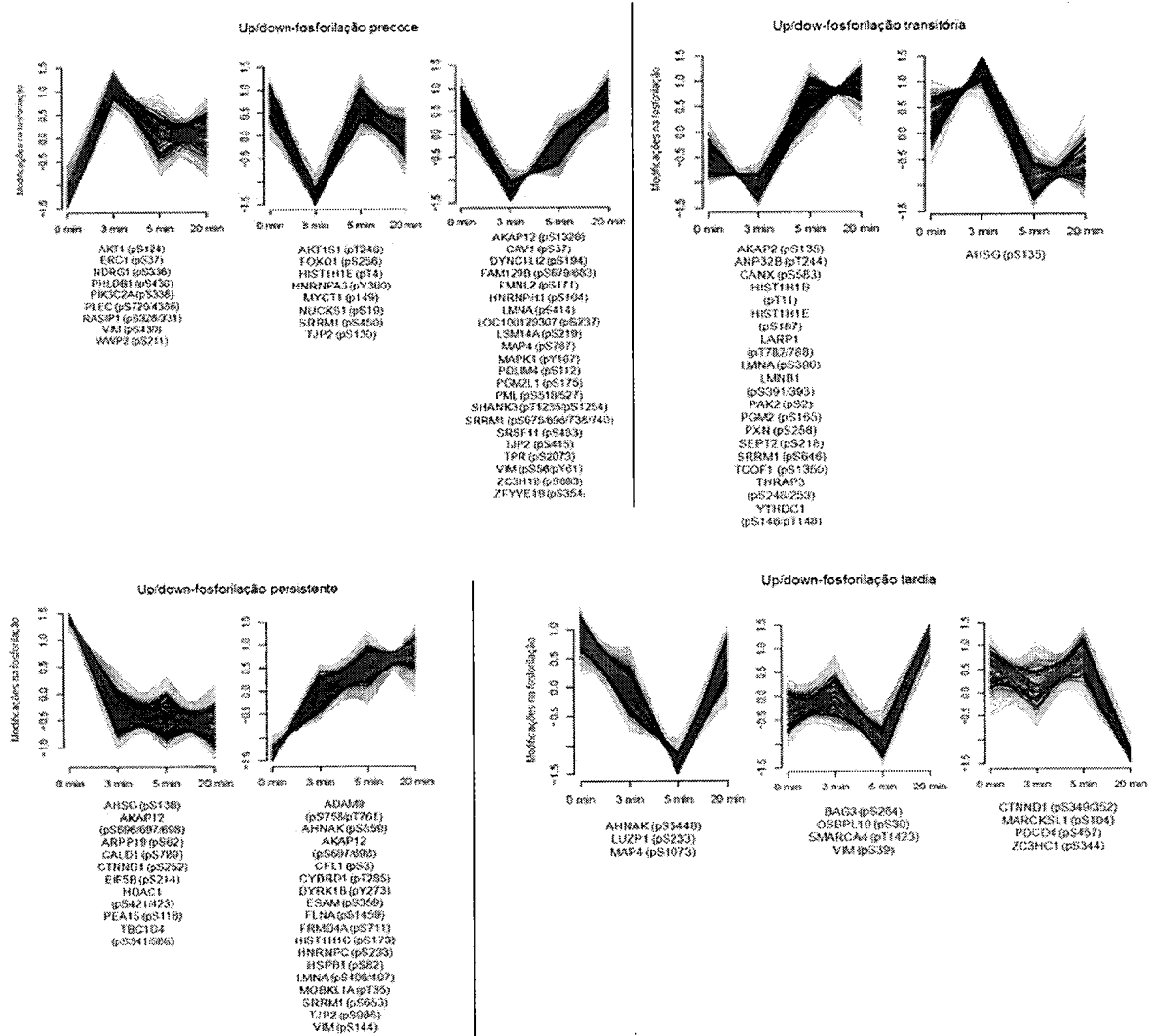


Figura 1

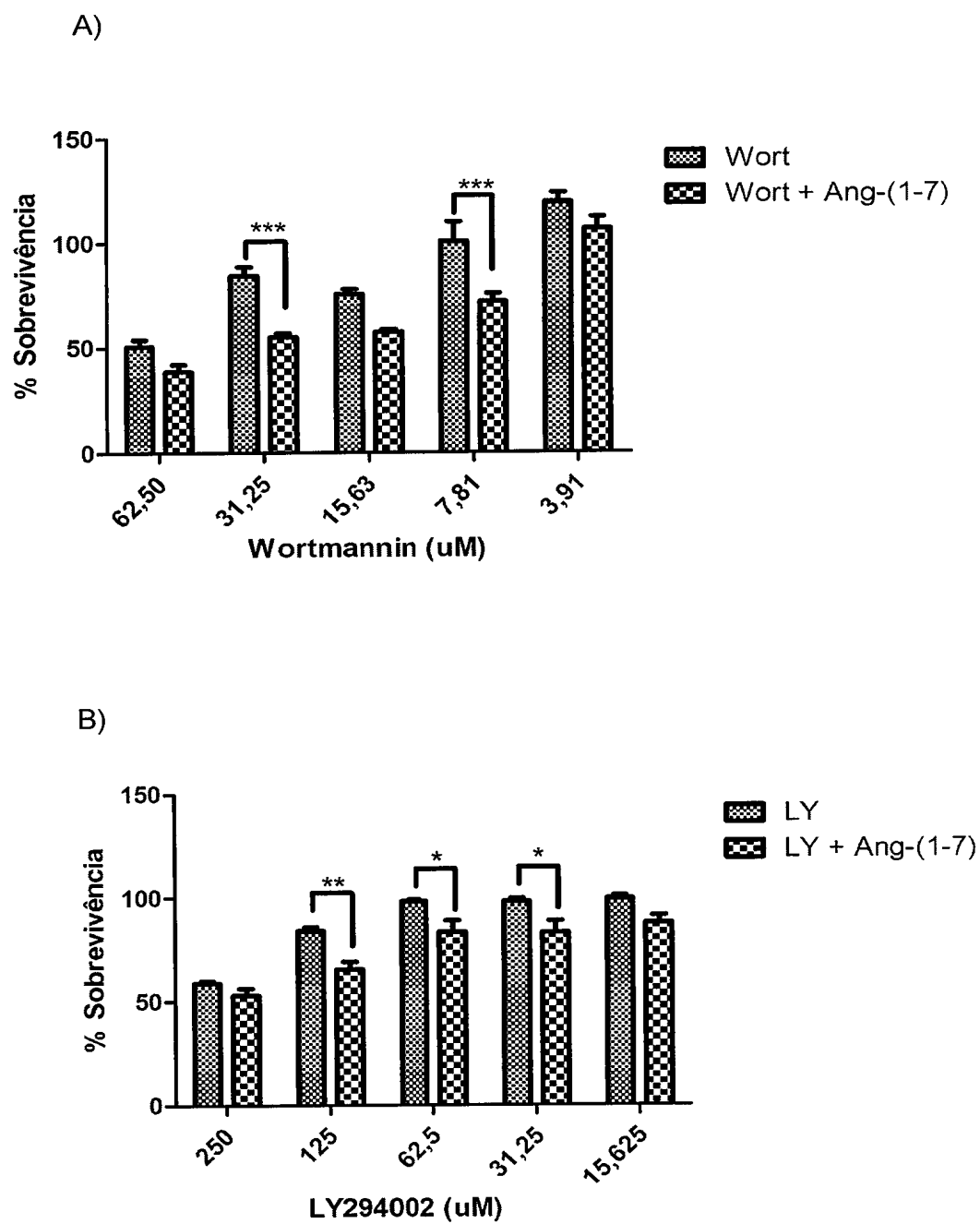
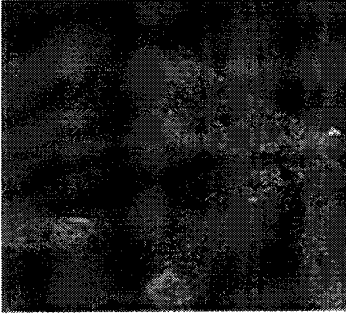


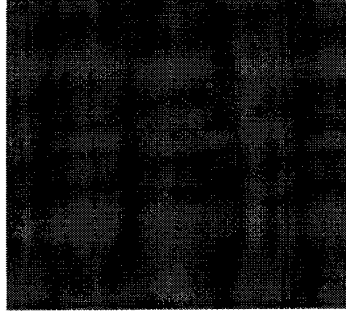
Figura 2

A)

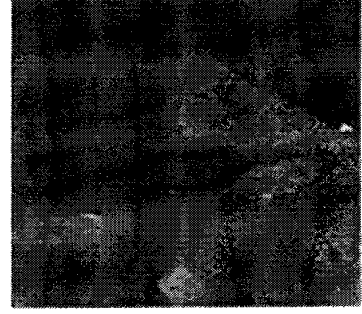
FoxO1



Dapi

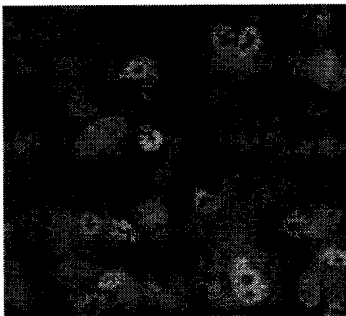


Merge

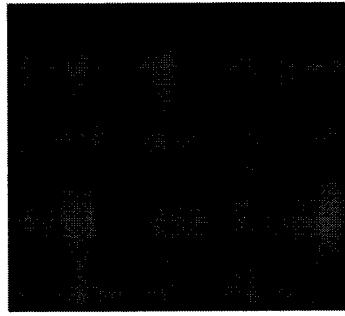


B)

FoxO1



Dapi



Merge



Figura 3

RESUMO**COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ANG-(1-7) OU
OUTRO AGONISTA DO RECEPTOR MAS EM COMBINAÇÃO COM
INIBIDORES DE PI3K/AKT PARA TRATAMENTO TERAPÊUTICO
5 ANTICÂNCER**

A presente invenção descreve composições farmacêuticas contendo uma combinação de Ang-(1-7) ou outro agonista do receptor Mas com inibidores de PI3K/Akt, para o tratamento terapêutico anticâncer. A combinação de Ang-(1-7) e inibidores de PI3K/Akt acarreta a inibição da progressão do
10 câncer através da inibição do crescimento ou proliferação celular ou a ativação da morte celular por apoptose em mamíferos, particularmente em humanos.