



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019018912-2 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 1 8 9 1 2 A 2 *

(22) Data do Depósito: 14/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/04/2020

(54) Título: YAP ATIVO DOMINANTE, UM HIPOEFETOR, INDUZ ACESSIBILIDADE DE CROMATINA E RENOVAÇÃO DE CARDIOMIÓCITO

(51) Int. Cl.: A61K 9/50; A61K 9/127; A61K 38/00; C12N 5/02.

(30) Prioridade Unionista: 14/03/2017 US 62/471,204.

(71) Depositante(es): BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE.

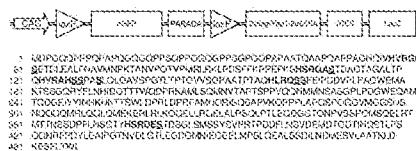
(72) Inventor(es): TANNER MONROE; JOHN LEACH; JAMES F. MARTIN.

(86) Pedido PCT: PCT US2018022496 de 14/03/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/170172 de 20/09/2018

(85) Data da Fase Nacional: 12/09/2019

(57) Resumo: A presente refere-se a métodos para gerar células ou tecidos de células existentes com uma ou mais variantes mutadas de Yap. Em modalidades específicas, a divulgação se refere ao tratamento de cardiomiócitos existentes com uma ou mais variantes mutadas de Yap que faz com que eles se dividam e gerem novos cardiomiócitos. Em casos específicos, a variante mutada de Yap tem substituições de serina para alanina em 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais serinas de Yap.



Mário de Fáverode, 2001, etc: HYPERYS

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "YAP ATIVO DOMINANTE, HIPOEFETOR, INDUZ ACESSIBILIDADE DE CROMATINA E RENOVAÇÃO DE CARDIOMIÓCITO".

[001] O presente pedido reivindica prioridade do pedido de patente provisório US 62/471.204, depositado em 14 de março de 2017, que é incorporado por referência aqui em sua íntegra.

DECLARAÇÃO REFERENTE À PESQUISA OU DESENVOLVIMENTO COM PATROCÍNIO FEDERAL

[002] A presente invenção foi feita com apoio do governo de acordo com HL 127717 concedida por National Institutes of Health (NIH). O governo tem certos direitos na invenção.

CAMPO TÉCNICO

[003] As modalidades da descrição se referem pelo menos aos campos de biologia de célula, biologia molecular, bioquímica, cardiologia e medicina.

ANTECEDENTES

[004] Experimentos de datação C¹⁴ indicaram que o fornecimento completo de cardiomiócitos humanos é estabelecido no primeiro mês de vida e cardiomiócitos adultos se renovam em aproximadamente 1% por ano¹. Cardiomiócitos de camundongos adultos têm similarmente baixas taxas de renovação². A via Hippo é uma cascata de cinase de modo evolucionário conservada que resulta na fosforilação e inibição do co-ativador de transcrição. Yap, pelo Supressor de tumor grande (Lats)1 e 2 cinase³, deleção Pós-natal de componentes de via Hippo podem aumentar de modo modesto renovação de CM, visto que pode expressar uma forma ativa de Yap com uma Serina única (S) para mutação de Alanina (A)⁴⁻⁷.

[005] Lats 1/2 inibe Yap por fosforilar resíduos S em cinco motivos de família cinase NDR (relacionada a Dbf2 nuclear) de consenso, HXRXXS. Ensaios de repórter in vitro mostraram que

embora grande parte de inibição de Hippo seja através de fosforilação S127 (S127 em seres humanos, S112 em camundongos), os outros eventos de fosforilação S também contribuem para inibição de Yap⁸.

[006] A presente descrição atende uma necessidade sentida há muito tempo na técnica de renovação de cardiomiócito incluindo para reparo cardíaco.

BREVE SUMÁRIO

[007] As modalidades da descrição incluem métodos e composições para renovação de tecido de qualquer tipo, incluindo no coração, retina, neurônios do sistema nervoso central e células ciliadas do ouvido, por exemplo. As modalidades da descrição incluem métodos e composições relacionadas à regeneração de células incluindo para a terapia para uma ou mais condições em um indivíduo mamífero como um ser humano, cão, gato, cavalo etc. As modalidades da descrição incluem métodos e composições para regenerar células em um ou mais indivíduos em necessidade do mesmo. O indivíduo pode ter qualquer tipo de condição em necessidade de regeneração celular ou é suscetível ou está em risco da mesma. Em modalidades específicas, são fornecidos métodos e composições relacionadas à regeneração de cardiomiócitos, células da retina, neurônios do sistema nervoso central, ou células ciliadas do ouvido (incluindo interno ou externo) incluindo para a terapia para uma ou mais condições em um indivíduo mamífero. Em casos específicos para a retina, mutante Yap é exposto a células gliais Muller de modo que diferenciarão em neurônios da retina. No caso de regeneração de cardiomiócitos o indivíduo pode ter ou estar em risco de uma condição cardíaca. Um indivíduo pode estar em risco de uma condição cardíaca devido a um histórico pessoal e/ou familiar, porque é fumante, porque é obeso ou com sobrepeso, uma combinação dos mesmos etc.

[008] Em modalidades específicas, os métodos e composições

se referem a um ou mais mutantes de Yap. Em certas modalidades, um ou mais mutantes de Yap têm uma atividade de promover renovação de células (incluindo células de retina cardiomiócito, neurônios do sistema nervoso central ou células ciliadas do ouvido) que leva à melhora de qualquer condição médica relacionada. Em modalidades alternativas, um ou mais mutantes Yap melhoram uma condição médica, porém não promovem de modo detectável a renovação de células. Em modalidades específicas, entretanto, um ou mais mutantes Yap estimulam reorganização de cromatina global para promover renovação de células. Em casos específicos, o mutante é um mutante Yap tendo 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais substituições de aminoácidos. A substituição pode ou não estar em uma serina e em alguns casos a substituição é aquela de um aminoácido por alanina. Em aspectos específicos, um mutante tendo cinco substituições de serina ou alanina nos sítios de fosforilação principais para Lats cinases, Yap5SA, em cardiomiócitos adultos estimula reorganização de cromatina global para promover renovação de cardiomíocito, como exemplo. Tal mutante Yap ou outros mutantes Yap podem ser usados analogamente para promover renovação de célula ciliadas ou de retina. O mutante Yap pode ser fornecido a um indivíduo como um polinucleotídeo ou um polipeptídio.

[009] O acima delineou bem amplamente as características e vantagens técnicas da presente invenção para que a descrição detalhada da invenção que se segue possa ser mais bem entendida. Características e vantagens adicionais da invenção serão descritas a seguir que formam o tema das reivindicações da invenção. Deve ser reconhecido por aqueles versados na técnica que a concepção e modalidades específicas reveladas podem ser prontamente utilizadas como base para modificar ou projetar outras estruturas para realizar as mesmas finalidades da presente invenção. Deve ser também

percebido por aqueles versados na técnica que tais construções equivalentes não se afastam do espírito e escopo da invenção como exposto nas reivindicações apensas. Os aspectos novos que se acredita serem característicos da invenção, tanto com relação a sua organização como método de operação, juntamente com objetivos e vantagens adicionais serão mais bem entendidos a partir da seguinte descrição quando considerada com relação às figuras em anexo. Deve ser expressamente entendido, entretanto, que cada das figuras é fornecida para fins de ilustração e descrição somente e não é destinada como definição dos limites da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0010] Para um entendimento mais completo da presente invenção, é feita agora referência às seguintes descrições tomadas em combinação com o desenho em anexo, no qual:

[0011] As figuras 1A-1E. Design e expressão do transgene Yap5SA. Figura 1A. (topo) Estrutura do alelo Yap5SA condicional. (Parte inferior) sequência de proteína humana da variante Yap que foi superexpressa com os resíduos de serina sublinhados mudados para alanina. Figura 1B. e9.5 Tg representativo (Jojo_flag::Yap5SA)5JFM camundongo com expressão de GFP no coração em desenvolvimento. Figura 1C. Imagens de fluorescência GFP em corações transgênicos e de controle tomados de neonatos P0. Figura 1D. (topo esquerdo) Estratégia de criação e indução para expressar o Yap5SA em CMs adultos. (Parte inferior esquerda). Western blot mostrando expressão Yap5SA de flag. Marcadores de peso molecular à esquerda. (Direita) Quantificação de expressão Yap por western blot é mostrada como média +/- SEM, n = 3 camundongos/genótipo. Figura 1E. imagens imunofluorescentes de cardiomiócitos Yap5SA OE e de controle isolados coloridos com um anticorpo anti-Yap e DAPI. (Direita) Quantificação de razão nuclear/citosólica de imunofluorescência de

Yap mostrada como média +/- SEM. Todas as estatísticas por ANOVA com testes post-hoc Bonferroni. Controle n = 3 corações, 60 células. Yap5SA n = 3 corações, 67 células;

[0012] Figuras 2A-2J. Insuficiência cardíaca concêntrica e morte em camundongos Yap5SA OE. Figura 2A. Análise de sobrevida Kaplan Meier representando controle (n = 8) e Yap5SA OE (n = 7) camundongos. Estatísticas computadas por teste Mantel-Cox. Figura 2B. Tricroma de Masson a partir de corações Yap5SA de estágio moribundo e controle (dia 7). Figura 2C. Imagens Modo-B representativas de ventrículo esquerdo no mesmo animal antes e um dia após a quarta injeção de tamoxifeno. Figuras 2D-2E. Espessura de parede livre posterior de ventrículo esquerdo, em sístole (figura 2D) e diástole (figura 2E). Figuras 2F-2G. Mostrados como média +/- SEM. Antes Yap5SA n = 7, antes Com n = 6, Pós Yap5SA n = 10, Pós com n = 9) estatísticas computadas por ANOVA com testes Bonferroni pós hoc. Figura 2F Ecocardiografia de modo-M representativo de controle e corações Yap5SA OE, antes e um dia após a quarta injeção de tamoxifeno. Figura 2G. diâmetro de câmara ventricular esquerda sistólica extrema. Figura 2H. Diâmetro de câmara ventricular esquerda diastólica extrema. Figura 2I. Encurtamento fracional. Figura 2J. Fração de ejeção. Figuras 2G-2J Dados mostrados como média +/- SEM. (Antes de Yap5SA n = 4, antes de Com n = 3, pós Yap5SA n = 7, após Com n = 7) estatísticas computadas por ANOVA com testes Bonferroni post-hoc.

[0013] Figuras 3A-3K. Proliferação de cardiomiócitos diferenciados. Figura 3A. Histogramas indicando área de CMs isolados. n = 3 camundongos/grupo ~100 células/coração. Figura 3B. Seções e área de LV em profundidades de tecido diferentes. n = 6/grupo. Média +/- SEM . * indica P < 0,05. Figura 3C. volume LV. Figura 3D. Volume de câmara LV n = 6/grupo. Média +/- SEM. Figura

3E. Razão de Peso LV para peso corpóreo ($n = 6$ /condição). Média +/- SEM Figura 3F. (Esquerda) número de miócito em LV ($n = 5$ /grupo) média +/- SEM. (direita) (PCM1) (+) núcleos CM (exemplos indicados com setas amarelas). Figura 3G. Nucleação CM. 6 corações/grupo. 400-500 CMs/coração. Média +/- SEM. Figura 3H. (Esquerda). Exemplo CMs contendo EdU. (Direita) estratégia de rotulação EdU/indução e Quantificação de incorporação EdU. Média +/- SEM. $n = 4$ corações/grupo. 200-300 CMs/coração. Figura 3I. Seções coloridas de AuroraB representativas (células positivas indicadas com setas amarelas). (Direita) Quantificação de AuroraB(+) CMs média +/- SEM. $n = 3$ camundongos/grupo. 200-300 CMs/coração. Figura 3J. Exemplo de seções coloridas PHH3 (células positivas indicadas com setas amarelas). (Direita) Quantificação de PHH3(+) CMs. Média +/- SEM. $n=3$ camundongos/grupo 200-300 CMs/coração. FIGS. 3A-3J estatísticas por ANOVA com testes Bonferroni post-hoc. Figuras 3A-3J de camundongos 2 dias após o protocolo de tamoxifeno. Figura 3K. Número de Yap5SA OE (lacZ(+)) CMs após tamoxifeno de dose baixa única em pontos de tempo diferentes. Mostrado em forma log2 (esquerda) e bruta (direita). Média +/- SEM. $N(t)$ = número de lacZ(+) células/área miocárdio. t = tempo (dias. tD = tempo em dobro. $n = 3$ camundongos/ponto de tempo. Encaixe linear $R^2 = 0.96$ após transformação log 2;

[0014] Figuras 4A-4G. ativação epigenética do programa de gene de proliferação CM. Figura 4A. (topo) protocolo de enriquecimento nuclear CM. (Esquerda inferior) gráfico Volcano de Yap5SA RNA-seq relativa a controle. 1352 genes para cima, 748 para baixo (valor-P ajustado < 0.1). (Direita inferior) gráfico Volcano de Yap5SA ATAC seq em comparação com o controle. 16.189 picos para cima. 13.353 para baixo por alteração de dobra de logs significativa em Yap5SA. Duas amostras/genótipo. Reprodutibilidade na figura 9. Figura 4B.

(esquerda) topo Yap5SA enriquecido AT AC seq motivos. (direita) sinal de nucleosoma para todos os picos de motivo TEAD, normalizados entre 0 e 1 (figura 4C). Proporções de intensificador e promotor de: seq ATAC intergênico total picos (figura 12). Seq ATAC intergênica enriqueça Yap5SA picos; e picos Yap5SA ChIP-Seq. *P < 0,001 em relação a proporções de controle teste de Chi-quadrado. Correção de Yates. Figura 4D. cobertura de fragmento de H3K27Ac a partir de corações adultos e em desenvolvimento centrados em torno dos picos de seq-ATAC de topo (ajustados $p \leq 0.035$) em controle ou Yap5SA OE CMs. n para número de picos interrogados. Figura 4E. (Esquerda) genes regulados para cima Yap5SA OE de alta confiança (valor-p ajustado seq-RNA < 0,01) mapeado para picos de seq ATAC regulados para cima Yap5SA (valor p ajustado < 1e-5) e a picos seq-ChIP Yap5SA (corte de marcação de pico HOMER de 20). (Direita) Termos GO altamente enriquecidos de cada categoria. Figura 4F. sinal seq ATAC através de genes regulados para cima Yap5SA (motivos TEAD de marcas T; picos seq-ChIP Yap de marcas Y). Figura 4G. sinal seq ATAC e seq ChIP em promotores de genes regulados para cima Yap5SA. Picos de seq-Chip em promotores indicados por setas verdes.

[0015] Figuras 5A-5F. miócitos Yap5SA OE têm fisiologia normal e acoplam com CMs que não expressam o transgene. Figura 5A. Traços de ECG representativos de controle e camundongos Yap5SA OE antes e após tamoxifeno. Onda-T invertida indicada. Figura 5B. (Topo) Proporções de onda T invertida de camundongos *P = 0.286 (teste exato de Fisher). (Parte inferior) área relativa sob a curva de onda-T. Médias +/- SEM. Estatísticas computadas por ANOVA com teste Bonferroni post hoc. Controle n = 3, Yap5SA n = 4. Figura 5C. Imunocoloração de β -galactosidase (aqua) e Connexin 43(vermelho) mostrando β -gal recombinado (+) CMs acoplando com CMs não

recombinados (sem coloração, preto) através de junções de folga. Setas amarelas indicam β -gal(-) CMs em sincício com Yap5SA OE CMs. Início é uma vista em close-up. Figura 5D. (esquerda) Gráfico representativo de encurtamento de sarcômero (Meio). Comprimento de sarcômero CM em descanso. Mostrado como percentagem média (direita) de encurtamento de sarcômero. Figuras 5E-5F. Mostrado como média +/- SEM. Sem diferença estatística. Controle n = 5 animais, 27 células. Yap5SA OE n = 5 animais. 31 células. ANOVA com teste Bonferroni post-hoc.

[0016] Figuras 6A-6C. Análise de citometria de fluxo de estágio de ciclo de célula. Figura 6A. Histogramas representativos de citometria de fluxo de núcleos cardíacos isolados de controle e corações Yap5SA OE, coloridos com DAPI. Controle de gráficos pic n = 4. Yap5SA OE n = 4. Dados em gráficos pic mostrados como média, valores P computados por ANOVA, seguido por teste post-hoc Bonferronic. P < 0,05 é indicado como um asterisco. Figura 6B. gráficos de Ponto representativos de teor de DNA CM por FACS mencionado em A. Figura 6C. análise de teor de DNA FACS média e SEM, n = 4/genótipo. Estatísticas computadas por ANOVA seguida por testes Bonferroni host-hoc.

[0017] Figura 7. Nenhuma evidência de apoptose celular aumentada em Yap5SA OE CMs. A coloração de TUNEL não mostra nenhuma diferença significativa entre o controle e os Corações de Yap5SA OE (n = 4 corações/genótipo). Dados como estatísticas médias +/- SEM computadas por ANOVA pareado, seguido por teste post-hoc Bonferroni.

[0018] Figura 8. Não há evidência de fibrose em corações de Yap 5 SA OE. A Mancha vermelha de Picosirius mostra que nem os Corações de Yap5SA OE nem o controle têm um fenótipo de fibrose. Um coração representativo com dano fibrótico também é mostrado

para comparação.

[0019] Figura 9. Controle de Qualidade de Sequenciamento. (Topo) Alta reprodutibilidade em ambos os conjuntos de ATAC-seq. (Parte inferior) Alta reprodutibilidade entre os conjuntos de RNA-seq. As leituras de cada experimento indicado foram transformadas com uma transformação de logaritmo regularizado e exibidas como gráficos de dispersão para mostrar a relação de conjuntos de dados replicados. Nota: os conjuntos de dados são combinados com amostra (por exemplo, Controle-1 ATAC-seq e RNA nuclear de controle-1 vindos da mesma amostra biológica).

[0020] Figuras 10A-10B. Figura 10A. Análise de ontologia de genes sobre genes regulados para cima e para baixo em corações de Yap5SA OE ($p < 0,01$). Figura 10B. Mapa de calor de genes selecionados a partir da RNA-seq.

[0021] Figuras 11A-11B. Yap5SA induz um laço de realimentação negativo inútil. Figura 11A. Análise de enriquecimento de via em genes regulados para cima em Yap5SA OE CMs indicadas por RNA-seq. É Realçada a via de Hippo. (Análise de Via realizada com g:Perfilador). Figura 11B. (Esquerda) Western blot que mostra fosforilação de Yap endógena aumentada em corações de Yap5SA OE. (Direita) Quantificação das intensidades de faixa, mostrada como média +/- SEM (controle n = 4, Yap5SA OE n = 3, P <0,01 Por ANOVA com testes de Bonferroni post-hoc).

[0022] Figuras 12A-12B. Gráficos de pontos geométricos de picos de ATAC-seq intergênicos relativos TSS. Figura 12A. Distância de pico de ATAC-seq intergênica Total Para TSS através de ambos os genótipos (Controle: 34738 picos; Yap5SA OE: 40.333 picos). Figura 12B. Distância dos Picos intergênicos ATAC-seq e ChIP-seq regulados para cima para TSS.

[0023] Figuras 13A.1-13A.3 e 13B-13D. Alvos de Yap5SA de alta

Confiança (figuras 13 A1-13 A3) (Esquerda). Lista de 97 genes diretamente regulados para cima por Yap5SA em regiões onde a cromatina já estava aberta. Lista (Média) de 106 genes com cromatina recém-aberta e RNA regulado para cima. (Direita) Lista de 76 genes diretamente regulados para cima por Yap5SA com cromatina aberta aumentada. Figura B. Os termos de ontologia de genes mais enriquecidos para as listas em A.C. Leituras de RNA-seq e ATAC seq mediadas centralizadas no TSS dos genes alvos de 76 Yap que mostram a cromatina aberta aumentada. Figura C. Cobertura de fragmento H3K27Ac ChIP-seq centralizada nos picos ATAC-seq mapeando para os genes alvos de 76 Yap que mostram a cromatina aberta aumentada.

[0024] Figuras 14A-14C. Modelo de ativação de Yap5SA de proliferação de Cardiomiócitos. Figura 14A. Em certos casos, Yap se liga diretamente a promotores abertos de genes alvos, aumentando a transcrição. Tal processo não resulta em novas leituras da cromatina aberta. Figura 14B. Principalmente, Yap5SA liga-se a regiões intensificadoras, recrutando fatores de remodelagem de cromatina, como o complexo SWI/SNF para abrir a vizinhança genômica de genes alvos. O próprio Yap ou outros fatores de transcrição são então livres para promover a transcrição. Figura 14C. (painel esquerdo) Entre aqueles dois esquemas de ativação direta, Yap5SA facilita a proliferação através de três processos: 1. Ativação do ciclo de células através fatores como Knuppel, fatores de transcrição E2F, ciclinas e cinase semelhantes a Polo. 2. Reorganização do citoesqueleto e promoção de citocinese através de Formin, proteína cinase C iota, Ect2, Incenp. E Ephexin4. 3. Re-emergência de genes associados a desenvolvimento de coração fetal, por exemplo, Proteína cinase D1, alciam, e Homólogo desabilitado 2. (Painel direito) independentemente, esses três processos têm função mínima ou prejudicial. Para

brevidade, somente alvos seq ChIP direto são incluídos no painel esquerdo, indicado por cor. O painel direito inclui genes diretamente regulados para cima, bem como transcritos regulados indiretamente (para cima ou para baixo) indicados por cores (genes incluídos de acordo com as figuras 4A e 4D).

[0025] Figuras 15A-15B. Yap K265R é menos estável do que WT Yap. Figura 15A. Células P19 WT e células P19 com mutação YapK265R (no. 13) tratadas com 20 ug/ml de ciclo-hexamida por 0, 2, 4 e 6 horas, e colhidas com tampão de lise NP40 a 0,5%. Imunomanchado para os anticorpos como indicado. Figura 15B. Lisados de células P19 e duas colônias P19 diferentes com imunoblot de mutação YapK265R analisadas com os anticorpos indicados.

[0026] Figura 16. Demonstra determinação de estabilidade de proteína mutante Yap. Células P19 WT e células P19 com mutação YapK265R tratadas com 20 ug/ml ciclo-hexamida por 0, 2, 4 e 8 horas e colhidas com tampão de lise NP40 a 0,5%. Imunomanchado para os anticorpos como indicado.

[0027] Figuras 17A-17B. determinação de estabilidade de proteína mutante Yap. Figura 17A, células P19 WT e células P19 com mutação YapK265R (no. 11) tratadas com 20 ug/ml de ciclo-hexamida por 0, 2, 4 e 8 horas e colhidas com tampão de lise NP40 a 0,5%. Imunomanchado para os anticorpos como indicado. Figura 17B, quantidade relativa de Yap foi quantificada por densitometria, normalizado para GAPDH e traçadas.

[0028] Figuras 18A-18C. Determinação de taxa de rendimento de proteína mutante Yap. FIG. 18A Células P19 WT e células P19 com mutação YapK265R (no. 11) tratadas com 20 uM/ml Mg132 para 0, 1 2 e 4 horas, e colhidas com tampão de lise NP40 a 0,5%. Imunomanchado para os anticorpos como indicado. Figura 18B e figura 18C. Quantidade relativa de Yap e β -catenin foram

quantificadas por densitometria, normalizado para GAPDH e traçada.

[0029] Figuras 19A-19D. Determinação de localização nuclear de proteína mutante Yap. Figura 19A e figura 19B, $2,0 \times 10^6$ células foram semeadas em pratos de 10 cm 18 horas após, células foram colhidas e fracionadas para análise de western blotting. Figura 19C e figura 19D. quantidade relativa de Yap foi quantificada por densitometria, normalizada para HDAC2 (para fração nuclear) ou GAPDH (para fração de citosol) e traçada.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0030] De acordo com a convenção de lei de patentes de longa duração, as palavras "um" e "uma" quando usadas no presente relatório descritivo em conjunto com a palavra compreendendo, incluindo as reivindicações, indicam "um ou mais". Algumas modalidades da descrição podem consistir em ou consistir essencialmente em um ou mais elementos, etapas de método e/ou métodos da descrição. Considera-se que qualquer método ou composição aqui descrita pode ser implementado com relação a qualquer método ou composição aqui descrito.

[0031] Como usado aqui, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" refere-se a uma quantidade, nível, valor, número, frequência, porcentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento que varia tanto quanto 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1% a uma quantidade de referência, valor, valor, número, frequência, percentual, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento. Em modalidades particulares, os termos "cerca de" ou "aproximadamente" quando antes de um valor numérico indicam o valor mais ou menos uma faixa de 15%, 10%, 5% ou 1%.

[0032] Em todo este relatório descritivo, a menos que o contexto exija de outra forma, as palavras "compreendem", "compreende" e "compreendendo" serão entendidas como implicando na inclusão de

uma etapa ou elemento ou grupo de etapas ou elementos estabelecidos, mas não a exclusão de qualquer outra etapa ou elemento ou grupo de etapas ou elementos. Por "consistindo em" indica que, e limitado a, qualquer que se segue, a frase "consistindo em". Assim, a frase "consistindo em" indica que os elementos listados são requeridos ou obrigatórios, e que nenhum outro elemento pode estar presente. O termo "consistindo essencialmente em" significa que inclui quaisquer elementos listados após a expressão, e limitado a outros elementos que não interferem ou contribuem para a atividade ou ação especificada na descrição dos elementos listados. Assim, a frase "consistindo essencialmente em" indica que os elementos listados são exigidos ou obrigatórios, mas que nenhum outro elemento é opcional e pode ou não estar presente dependendo de ou não afetar a atividade ou ação dos elementos listados.

[0033] Referência do início ao fim desse relatório descritivo a "uma modalidade", uma modalidade", "uma modalidade específica," "uma modalidade relacionada," "certa modalidade," "uma modalidade adicional" ou "uma modalidade adicional" ou combinações das mesmas significa que uma característica específica, estrutura ou aspecto descrito com relação à modalidade é incluída pelo menos em uma modalidade da presente invenção. Desse modo, os aparecimentos das frases acima em vários lugares em todo esse relatório descritivo não estão necessariamente todos se referindo à mesma modalidade. Além disso, os aspectos, estruturas ou características específicas podem ser combinadas em qualquer modo adequado em uma ou mais modalidades.

[0034] Como usado aqui, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" é sinônimo de "dose terapeuticamente eficaz" ou "dose eficaz" e se refere à quantidade de proteína mutante Yap ou polipeptídio que eliciará a resposta biológica ou clínica sendo buscada pelo médico em

um indivíduo necessitando da mesma. Como exemplo não limitador, uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para regenerar células ou tecido.

I. Exemplos de mutantes Yap

[0035] As modalidades da descrição incluem um ou mais mutantes de Yap e seu uso para fins clínicos e/ou pesquisa. O(s) mutante(s) pode(m) compreender um ou mais dos seguintes, por exemplo: substituição(ões) de aminoácido; deleção(ões); inserção(ões); uma combinação dos mesmos; e etc. em modalidades específicas, um ou mais aminoácidos de Yap são substituídos com outro um ou mais aminoácidos. Uma ou mais mutações específicas podem ser empregadas para diminuir a atividade biológica do mutante Yap. Tal mutação pode ou não ser usada em combinação com outra mutação na mesma proteína Yap mudada. Qualquer proteína Yap mudada abrangida na descrição pode ser não natural. Qualquer proteína ou DNA relacionada a qualquer mutante Yap pode ser isolado da natureza.

[0036] Uma proteína mutante Yap pode ter substituição em uma ou mais serinas na proteína. Em casos específicos, 1, 2, 3, 4, ou 5 serinas que são os sítios de fosforilação principal para Lats cinases são substituídas. Embora qualquer serina possa ser substituída com qualquer outro aminoácido, em casos específicos são substituídas com alanina.

[0037] Como usado aqui, em modalidades específicas uma variante mudada de Yap humano compreende uma mutação pelo menos em uma das serinas sublinhadas nessa sequência de tipo selvagem abaixo. Esses resíduos de serina sublinhados são conhecidos como sendo fosforilados por Lats, ou preditos como sendo. (SEQ ID NO: 1);

```

1 MDPGQQQQPPPOPAPQGQGQPPSQPPQGQGPPSGPGQPAATQAAPQAPPAGHQIVHVRGD
61 SETDLEALFNAVMNPKTANVPQTVPMLRLKLPDSFFKPPPEPKSHSROAATDAGTAGALTP
121 QHVRRAHAAPAALQLGAVSPGTLTPTGVVSGPAATPTAOHLRQAAFEIPDOVPLPAGWEMA
181 KTSSGORYFLNHIDQTTTQDPRKAMLSQMNVTAPTSPPVQQNMMNSASGPLPDGWEQAM
241 TQDGEIYYINHKNKTTSWLDPRLDPRFAMNQRISQSAPVKQOPPLAPQSPQGGVMMGSNS
301 NQQQOMRLQQLQMEKERLRLKQELLRQELALRSQPLTLEQDGGGTQNPVSSPGMSQELRT
361 MTTNNSDPPFLNSGTYHSRDEATDSGLSMSSYSVPRTPDDFLNSVDEMOTGDTINQSTLPS
421 QQNRFPDYLEAIPGTNVDLGTLEGDMNIEGEELIMPSLOEALSSOILNDMESVLAATKLD
481 KESFLTWL

```

[0038] Além de, ou alternativamente a, uma ou mais mutações em uma ou mais serinas na sequência acima, pode haver uma ou mais mutações na sequência que não estão em uma serina. Tal mutação pode ser uma substituição de aminoácido (quer conservativa ou não), deleção e/ou inversão etc. Em modalidades específicas, a versão mudada de Yap tem cinco mutações, cada em uma serina como uma substituição de aminoácido única. Em casos específicos uma ou mais serinas são mudadas para alanina, embora a(s) serina(s) possa(m) ser mudada para um aminoácido diferente, como histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenil alanina, treonina, triptofano, valina, arginina, cisteína, glutamina, glicina, prolina, tirosina, alanina, asparagina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Em qualquer caso, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais serinas podem ser mudadas em uma proteína Yap mutante única.

[0039] Um exemplo de uma proteína Yap mutante é como a seguir (o sublinhado indica sítios onde serinas são substituídas com alaninas e negrito indica a sequência de reconhecimento de Lats):

```

1 MDPGQQQQPPPOPAPQGQGQPPSQPPQGQGPPSGPGQPAATQAAPQAPPAGHQIVHVRGD
61 AETDLEALFNAVMNPKTANVPQTVPMLRLKLPDSFFKPPPEPKSHSROAATDAGTAGALTP
121 QHVRRAAAPAALQLGAVSPGTLTPTGVVSGPAATPTAOHLRQAAFEIPDOVPLPAGWEMA
181 KTSSGORYFLNHIDQTTTQDPRKAMLSQMNVTAPTSPPVQQNMMNSASGPLPDGWEQAM
241 TQDGEIYYINHKNKTTSWLDPRLDPRFAMNQRISQSAPVKQOPPLAPQSPQGGVMMGSNS
301 NQQQOMRLQQLQMEKERLRLKQELLRQELALRSQPLTLEQDGGGTQNPVSSPGMSQELRT
361 MTTNNSDPPFLNSGTYHSRDEATDSGLSMSSYSVPRTPDDFLNSVDEMOTGDTINQSTLPS
421 QQNRFPDYLEAIPGTNVDLGTLEGDMNIEGEELIMPSLOEALSSOILNDMESVLAATKLD
481 KESFLTWL (SEQ ID NO:2)

```

[0040] SEQ ID NO: 2: não tem nenhuma versão de um tag, como Flag-tag.

[0041] Um exemplo de uma proteína mutante Yap com flag-tag (SEQ ID NO:3) é como a seguir:

M D Y K D D D D K L A A A N S S L A T M D Y K D D D D K A R L E S V P
K D P G Q Q P P P Q P A P Q G Q G Q P P S Q P P Q G Q G P P S G P G Q P A P A A T Q A
A P Q A P P A G H Q I V H V R G D A E T D L E A L F N A V M N P K T A N V P Q T V P
M R L R K L P D S F F K P P E P K S H S R Q A A T D A G T A G A L T P Q H V R A H A
A P A A L Q L G A V S P G T L T P T G V V S G P A A T P T A Q H L R Q A A F E I P D D
V P I L P A G W E M A K T S S G Q R Y F L N H I D Q T T W Q D P R K A M L S Q M N V
T A P T S P P V Q Q N M M N S A S G P L P D G W E Q A M T Q D G E I Y Y I N H K N K
T T S W L D P R L D P R F A M N Q R I S Q S A P V K Q P P P L A P Q S P Q G G V M G G
S N S N Q Q Q Q M R L Q Q L Q M E K E R L R L K Q Q E L L R Q E L A L R S Q L P T L
E Q D G G T Q N P V S S P G M S Q E L R T M T T N S S D P F L N S G T Y H S R D E A T
D S G L S M S S Y S V P R T P D D F L N S V D E M D T G D T I N Q S T L P S Q Q N R F
P D Y L E A I P G T N V D L G T L E G D G M N I E G E E L M P S L Q E A L S S D I L N
D M E S V L A A T K L D K E S F L T W L

[0042] Um exemplo de DNA que codifica uma proteína mutante Yap é como a seguir (SEQ ID NO: 4).

ATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTGCAGCCCGAATTCAAGCTTAG
 CCACCATGGACTACAAAGACGATGACGATAAGCAAGGCTGAATCGGTACCTAAG
 GATCCCCGGCAGCAGCCGCCCTCAACCGGCCCCCAGGGCAAGGGCAGCCGCC
 TTGCAAGCCCCCGCAGGGCAGGGCCCGTCCGGACCCGGCAACCGGCACCCG
 CGCGACCCAGGCAGCCGCCAGGGCACCCCGCCGACATCAGATCGTCACGTC
 CGCGGGACCGGGAGACCGACCTGGAGGGCGCTTTCAACCGCTCATGAACCCAA
 GACGGCCAACGTGCCCCAGACCGATGAGGCTCCAGCTGAGCTGGAGCTGCCCCGACTCCT
 TCTTCAAGCCGCCGGAGCCAAATCCCACCTCCGACAGGCGCTACTGATGCAGGC
 ACTOCAAGGAGCCCTGACTCCACAGCATGTTGAGCTCATGCCGCTCCAGCTGCTG
 CAGTTGGGAGCTGTTCTCTGGACACTGACCCCCACTGGAGTAGTCTCTGGCCA
 GCAGCTACACCCACAGCTCAAGCATCTTGACAGGCTGCTTTGAGATACCTGATGAT
 GTACCTCTGCCAGCAGGTTGGGAGATGGCAAAGACATCTCTGGTCAGAGATACTTC
 TTAAATCACATCGATCAGACAACAATGGCAGGACCCAGGAAGGCCATGCTGTC
 CCAGATGAACGTCACAGCCCCACCACTCCACCAGTGCAGCAGAATATGATGAACT
 CGGCTTCAGGTCTCTTCTGATGGATGGAAACAAGCCATGACTCAGGATGGAGAA
 ATTACTATATAAACCATAAGAACAAAGACCACCTCTGGCTAGACCCAAGGCTTGAC
 CCTGGTTGCCATGAACCAGAGAAATCAGTCAGAGTGCTCCACTGAAACAGCCACC
 ACCCCCTGGCTCCCCAGAGCCCACAGGGAGGGCGTCACTGGGTGGCAGCAACTCCAACC
 AGCAGCAACAGATGCGACTGCAGCAACTGCAGATGGAGAAGGAGAGGCTGGGCT
 GAAACAGCAAGAACGCTTCGGCAAGGAGTTAGCCCTGCGTAGCCAGTTACCAACAC
 TGGAGCAGGATGCTGGACTAAAATCCAGTGTCTTCTCCGGATGTCTCAGGAAT
 TGAGAACAAATGACGACCAATAGCTCAAGATCTTCTTAACAGTGGCACCTATCACT
 CTGGAGATGAGGCTACAGACAGTGGACTAAGCATGAGCAGCTACAGTGTCCCTCGA
 ACCCCAGATGACTTCCTGAACAGTGTGGATGAGATGGATACAGGTGATACTATCAA
 CCAAAGCACCCCTGCCCTCACAGCAGAACCGTTCCAGACTACCTGAAGCCATTCC
 TGGGACAAATGTGGACCTTGGAACACTGGAAAGGAGATGGAAATGAACATAGAAGGA
 GAGGAGCTGATGCCAAGTCTGCAGGAAGCTTGGAGTTCTGACATCCTTAATGACATG
 GAGTCTGTTTGGCTGCCACCAAGCTAGATAAAAGAAAGCTTCTTACATGGTTATAG

[0043] Em algumas modalidades, um mutante Yap tem uma ou mais mutações de modo que seja menos estável em comparação com falta daquelas uma ou mais mutações.

[0044] Em uma modalidade, um mutante Yap tem uma mutação na posição 265, como uma lisina na posição 265 (lisina humana 280). Em modalidades específicas a lisina na posição 265 (humano 280) é mudada para outro aminoácido que pode ser qualquer outro

aminoácido, porém em casos específicos a mutação é K265R, que é análogo a lisina 280 na sequência humana.

[0045] A presente descrição abrange proteínas e ácidos nucleicos que codificam as mesmas, incluindo uma variante mudada de Yap. Em alguns casos, a(s) proteína(s) Yap mutante é fornecida em forma de polipeptídio, e em alguns casos a(s) proteína(s) Yap mutante é fornecida como um polinucleotídeo que codifica a proteína. Quando fornecida em forma de polinucleotídeo, o polinucleotídeo pode compreender uma construção de expressão em um vetor adequado. O vetor pode ser de qualquer tipo adequado, como não viral ou viral. Em casos onde o vetor é não viral, o vetor pode ser um plasmídeo ou sequência linear de RNA. Em casos onde o vetor é viral, o vetor pode ser adenoviral, lentiviral, adeno-associado, retroviral etc. Quando regulado por um promotor em uma construção de expressão, o promotor pode ser constitutivo, induzível, ou específico de tecido, por exemplo. Em modalidades específicas, a variante mutante de Yap será fornecida em uma construção de vírus adenoassociado ou como um RNA modificado⁹.

II. Exemplos de Métodos de Uso

[0046] As modalidades da descrição incluem métodos de renovação de tecido em um tecido de interesse, incluindo pelo menos no coração, retina e células ciliadas do ouvido. Em modalidades específicas, um indivíduo necessitando de regeneração de célula ou renovação de tecido é fornecido uma quantidade eficaz de uma ou mais variantes de Yap.

[0047] A renovação de cardiomiócito de mamífero adulto (CM) é ineficiente. CMs lesionados falham em proliferar, e ao invés ativam endo-reduplicação que aumenta ploidia. Como resultado, o coração é propenso à falha, a causa principal de morte de seres humanos. Em modalidades específicas, os inventores expressaram uma versão do

efetor Hippo Yap, chamado Yap5SA, em CMs adultos que é impermeável a inibição de Hippo. YaP5SA induziu proliferação de CM com um tempo de duplicação de 33 horas, paredes ventriculares hiperplásicas e maiores que 15% de mitose reiniciada por CMs. Caracterização ampla de genoma de acessibilidade de cromatina revelou que Yap5SA promoveu a abertura de intensificadores distais e expressão de um programa de gene mitótico robusto. Os genes e intensificadores revelados na presente invenção, promovendo proliferação de CM, são -uteis para estimular regeneração cardíaca. Desse modo, as modalidades da descrição incluem métodos e composições para a renovação de cardiomiócitos, incluindo por direcionar a via Hippo. Em modalidades específicas, um indivíduo necessitando de renovação de cardiomiócito é fornecido uma quantidade eficaz de uma ou mais variantes mudadas de Yap. Em certas modalidades, há um método de regenerar células em um local desejado em um indivíduo compreendendo as etapas de fornecer ao local uma quantidade eficaz de proteína(s) mutante(s) de Yap e/ou polinucleotídeo(s) codificando proteína mutante de Yap.

[0048] Em modalidades específicas há métodos de tratar uma condição médica por fornecer uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ou mais variantes mudadas de Yap ao indivíduo. Pelo menos um sintoma de qualquer condição médica pode ser melhorado após administração de uma ou mais proteína(s) Yap mutante(s) e/ou ácido(s) nucleico(s) codificando a(s) mesma(s).

[0049] Certas modalidades da descrição incluem métodos de regenerar cardiomiócitos em um indivíduo por fornecer ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ou mais variantes mudadas de Yap. Pelo menos em alguns casos, a variante mudada compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais substituições de aminoácido em uma serina, e as substituições podem ou não ser em

uma alanina. Outras mutações não serina podem ser incluídas no Yap mudado. Certos métodos podem ser executados em um ou mais indivíduos que necessitam de regeneração de cardiomiócitos, como indivíduos com dano no coração ou em risco de dano no coração. O indivíduo pode ter danificado tecido de músculo cardíaco necessitando de regeneração de cardiomiócitos. Em modalidades específicas, a administração de uma ou ais proteínas Yap mudadas e/ou ácido(s) nucleico(s) codificando as mesmas resulta em regeneração de cardiomiócitos a partir de cardiomiócitos existentes no indivíduo.

[0050] As modalidades da descrição incluem métodos e/ou composições para regeneração de músculo cardíaco e reversão de lesão isquêmica miocárdica, por exemplo. Em modalidades específicas, há métodos para estimular proliferação de células de músculo cardíaco ou progenitoras cardíacas adultas residentes em corações de mamíferos que tiveram uma condição cardíaca, como lesão isquêmica aguda, por exemplo. Em certas modalidades, tais métodos são obtidos com composições compreendendo uma ou mais variantes mudadas de Yap para o indivíduo.

[0051] As modalidades da presente descrição são dirigidas a métodos e/ou composições relacionadas à terapia e/ou prevenção de uma ou mais condições cardíacas. As modalidades da presente descrição se referem à regeneração de tecido, incluindo tecido muscular, como tecido de miocárdio. Certas modalidades se refere à reversão de uma condição cardíaca (ou melhora de pelo menos um sintoma da mesma), incluindo pelo menos doença cardíaca, cardiomiopatia, problemas de válvula do coração, pericardite, arritmia, parada cardíaca, defeito congênito do coração, insuficiência cardíaca, doença cardíaca, cardiotoxicidade, insuficiência cardíaca congestiva, doença cardíaca isquêmica, infarto de miocárdio agudo, fibrilação atrial, doença de artéria coronária, doença de coração isquêmico,

doença de coração valvular, doença de coração hipertenso e arritmias. Tipos específicos de doença cardiovascular podem ser tratados ou evitados, como doença de artéria coronária (também conhecida como doença coronária de coração e doença cardíaca isquêmica); cardiomiopatia (doenças de músculo cardíaco); insuficiência cardíaca; cor pulmonale; disritmias cardíacas; doença inflamatória do coração; endocardite; cardiomegalia inflamatória; miocardite; doença cardíaca valvular; doença cerebrovascular; doença arterial periférica; doença congênita do coração; e doença cardíaca reumática. Indicações específicas, porém exemplificadoras de modalidades da descrição incluem pelo menos aplicações para 1) insuficiência congestiva cardíaca; 2) prevenção de remodelagem ventricular ou aneurisma de infarto de miocárdio; e/ou 3) cardiomiopatia. Em modalidades específicas, métodos e composições da descrição fornecem regeneração de cardiomiócito que é suficiente para reverter condição cardíaca estabelecida ou prevenção de uma condição cardíaca ou retardo de início ou redução em gravidade.

[0052] Em casos de cardiomiopatia, a condição pode ser induzida por uma droga, como uma droga de quimioterapia (como Adriamicina) ou um anticorpo monoclonal^{10,11}. A cardiomiopatia pode ser cardiomiopatia isquêmica ou não isquêmica. A cardiomiopatia pode ser causada por pressão sanguínea alta de longa duração, problemas de válvula do coração, dano ao tecido cardíaco de um ataque cardíaco anterior, frequência cardíaca rápida crônica, distúrbios metabólicos, deficiências nutricionais, gravidez, abuso de álcool, abuso de droga, drogas de quimioterapia, infecção viral, hemocromatose, condição genética, níveis elevados de colesterol, hipertensão pulmonar, ou uma combinação dos mesmos.

[0053] Aspectos específicos da descrição se referem ao fornecimento de um polinucleotídeo mutante de Yap, proteína,

peptídeo ou mistura dos mesmos a um certo tecido para proliferação, inibição de morte de célula (apoptose), e/ou diferenciação de certas células no tecido. A tecido pode ser de qualquer tipo, porém em casos específicos é tecido de músculo, incluindo tecido cardíaco, tecido retinal, ou células ciliadas do ouvido. Em modalidades específicas, métodos e composições da descrição permitem regeneração de células de músculo cardíaco adultas preexistentes. Em alguns casos, o fornecimento da(s) composição(ões) inventiva(s) resulta nas células serem mais resistentes a remodelagem patológica e resistem a dano adicional após um insulto inicial.

[0054] As modalidades da descrição incluem fornecimento de um ou mais polinucleotídeos mutantes Yap e/ou polipeptídeos que estimulam regeneração de células (como células de músculo, incluindo cardiomiócitos) e/ou tecido (incluindo tecido cardíaco). Aspectos específicos para tais modalidades resultam em reversão de uma ou mais condições médicas relacionadas cardíacas. Certos aspectos para tais modalidades resultam em aperfeiçoamento de pelo menos um sintoma de uma condição médica, como uma condição médica relacionada cardíaca, uma condição médica ocular ou uma condição médica otológica.

[0055] Em modalidades específicas, um polinucleotídeo mutante Yap, proteína, peptídeo ou misturas dos mesmos é direcionada a um tecido de interesse específico, incluindo um tecido muscular, como tecido cardíaco, por exemplo.

[0056] Em alguns casos, métodos e composições da presente descrição são empregados para prevenção de uma ou mais condições médicas relacionadas cardíacas ou retardo de início de uma ou mais condições médicas relacionadas cardíacas ou redução de extensão de um ou mais sintomas de uma ou mais condições médicas relacionadas cardíacas. Em casos específicos, tal prevenção, retardo ou início, ou

redução de extensão de um ou mais sintomas, ocorre em um indivíduo que está em risco para uma condição médica relacionada cardíaca. Fatores de risco exemplificadores incluem um ou mais dos seguintes: idade, sexo (masculino, embora ocorra em mulheres), pressão sanguínea alta, níveis de colesterol de soro altos, fumar tabaco, consumo excessivo de álcool, consumo de açúcar, histórico familiar, obesidade, ausência de atividade física, fatores psicossociais, diabetes mellitus, sobrepeso, predisposição genética, e/ou exposição à poluição de ar.

[0057] Qualquer indivíduo sendo tratado pode ser um adulto, adolescente, criança, bebê ou o tratamento pode ser *in utero*.

[0058] O fornecimento ao indivíduo da(s) proteína(s) Yap mutante(s) e/ou ácido(s) nucleico(s) codificando as mesmas pode ser sistêmica ou pode ser local. Em exemplos específicos, após uso da proteína mutante Yap ou polinucleotídeo, cardiomiócitos derivados *in vitro* são fornecidos a um indivíduo. Em outros casos, a proteína mutante Yap ou polinucleotídeo é fornecido *in vivo* no coração. Isso poderia funcionar, por exemplo, usando Yap para expandir cardiomiócitos derivados de célula tronco pluripotentes induzidas (não derivadas de paciente) derivadas de patente (ou cardiomiócitos derivados de célula tronco) em cultura antes de transplantar para um paciente, ou usando Yap para expandir cardiomiócitos derivados de célula tronco após transplantar no paciente usando promotores acionados por molécula pequena, ou outros esquemas de indução Yap construídos nos cardiomiócitos derivados de célula tronco.

[0059] Um indivíduo que recebe a terapia abrangida aqui pode ou não ter sido diagnosticado com uma condição médica, incluindo uma condição médica cardíaca, por exemplo. O indivíduo pode ou não estar apresentando um ou mais sintomas de ter uma condição médica cardíaca sem ter um diagnóstico prévio, por exemplo.

III. Preparações Farmacêuticas

[0060] Composições farmacêuticas da presente invenção compreendem uma quantidade eficaz de uma ou mais proteínas mutantes Yap, e/ou polinucleotídeos codificando agente igual ou adicional dissolvido ou disperso em um veículo farmaceuticamente aceitável. As frases "farmacêutico ou farmacologicamente aceitável" se refere a entidades moleculares e composições que não produzem uma reação adversa, alérgica ou outra desfavorável quando administrada a um animal como, por exemplo, um ser humano, como apropriado. A preparação de uma composição farmacêutica que contém pelo menos uma proteína mutante Yap e/ou polinucleotídeo codificando ingrediente ativo igual ou adicional será conhecida por aqueles versados na técnica à luz da presente descrição, como exemplificado por Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a Ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2005, incorporado aqui por referência. Além disso, para administração em animais (por exemplo, seres humanos) será entendido que preparados devem atender padrões de esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e pureza como exigido por FDA Office of Biological Standards.

[0061] Como usado aqui, "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, tensoativos, antioxidantes, conservantes (Por exemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotônicos, agentes de retardar absorção, sais, conservantes, drogas, estabilizadores de droga, géis, aglutinantes, excipientes, agentes desintegrantes, lubrificantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, corantes, tais materiais similares e combinações dos mesmos, como seria conhecido por uma pessoa versada na técnica (vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, incorporado aqui por referência).

Exceto até onde qualquer veículo convencional é incompatível com o ingrediente ativo, seu uso nas composições farmacêuticas é considerado.

[0062] As proteínas mutantes Yap e/ou polinucleotídeos codificando as mesmas podem compreender tipos diferentes de veículos dependendo de se deve ser administrado em forma sólida, líquida ou aerossol, e se necessita ser estéril para tais vias de administração como injeção. A presente invenção pode ser administrada por via intravenosa, intravaginal, intrarretal, tópica, intramuscular, subcutânea, mucosa, oral, tópica, local, inalação (por exemplo, inalação por aerossol), injeção, infusão, infusão contínua, perfusão localizada banhando células-alvo diretamente, através de um cateter via lavagem, em cremes, em composições de lipídeo (por exemplo, lipossomas) ou por outro método ou qualquer combinação do acima como seria sabido por uma pessoa versada na técnica (vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed Mack Printing Company, 1990, incorporada aqui por referência).

[0063] As proteínas mutantes Yap e/ou polinucleotídeos codificando as mesmas podem ser formuladas em uma composição em uma forma de base livre, neutra ou sal. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido, por exemplo, aqueles formados com os grupos de amino livre de uma composição proteinácea, ou que são formadas com ácidos inorgânicos como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou tais ácidos orgânicos como ácido acético, oxálico, tartárico ou mandélico. Sais formados com os grupos de carboxila livre também podem ser derivados de bases inorgânicas como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amônio, cálcio ou férrico; ou tais bases orgânicas como isopropil amina, trimetil amina histidina ou procaína. Após formulação, soluções serão administradas em um modo compatível com a formulação de dosagem

e em tal quantidade como é terapeuticamente eficaz. As formulações são facilmente administradas em uma variedade de formas de dosagem como formuladas para administrações parenterais como soluções injetáveis, ou aerossóis para fornecimento aos pulmões, ou formuladas para administrações alimentares como cápsulas de liberação de droga e similares.

[0064] Além disso, de acordo com a presente invenção, a composição da presente invenção adequada para administração é fornecida em um veículo farmaceuticamente aceitável com ou sem um diluente inerte. O veículo deve ser assimilável e inclui veículos líquidos, semissólidos, isto é, pastas, ou sólidos. Exceto até onde qualquer meio convencional, agente, diluente ou veículo seja prejudicial para o receptor ou para a eficácia terapêutica de uma composição contida no mesmo, seu uso em composição administrável para uso na prática dos métodos da presente invenção é apropriado. Os exemplos de veículos ou diluentes incluem gorduras, óleos, água, soluções salinas, lipídeos, lipossomas, resinas, aglutinantes, cargas e similares ou combinações dos mesmos. A composição pode compreender também vários antioxidantes para retardar oxidação de um ou mais componentes. Adicionalmente, a prevenção da ação de micro-organismos pode ser ocasionada por conservantes como vários agentes antibacterianos e antifúngicos, incluindo, porém não limitado a parabenos (por exemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal ou combinações dos mesmos.

[0065] De acordo com a presente descrição, a composição é combinada com o veículo em qualquer modo conveniente e prático, isto é, por solução, suspensão, emulsificação, mistura, encapsulação, absorção e similares. Tais procedimentos são rotinas para aqueles versados na técnica.

[0066] Em uma modalidade específica da presente descrição, a composição é combinada ou mistura completamente com um veículo semissólido ou sólido. A mistura pode ser realizada em qualquer modo conveniente como trituração. Agentes estabilizadores também podem ser adicionados no processo de mistura para proteger a composição contra perda de atividade terapêutica, isto é, desnaturação no estomago. Os exemplos de estabilizadores para uso na composição incluem tampões, aminoácidos como glicina e lisina, carboidratos como dextrose, manose, galactose, frutose, lactose, sacarose, maltose, sorbitol, manitol etc.

[0067] Em modalidades adicionais, a presente invenção pode se referir ao uso de uma composição de veículo de lipídeo farmacêutico que inclui proteínas mutantes Yap e/ou polinucleotídeos codificando as mesmas um ou mais lipídeos e um solvente aquoso. Como usado aqui, o termo "lipídeo" será definido para incluir qualquer de uma ampla gama de substâncias que é characteristicamente insolúvel em água e extraível com um solvente orgânico. Essa classe ampla de compostos é em conhecida por aqueles versados na técnica e como o termo "lipídeo" é usado aqui, não é limitado a nenhuma estrutura específica. Os exemplos incluem compostos que contêm hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa e seus derivados. Um lipídeo pode ser de ocorrência natural ou sintético (isto é, projetado ou produzido por homem). Entretanto, um lipídeo é normalmente uma substância biológica. Lipídeos biológicos são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, gorduras neutras, fosfolipídeos, fosfoglicerídeos, esteroides, terpenos, lisolipídeos, glicosfingolipídeos, gliolipídeos, sulfatídeos, lipídeos com éter e ácidos graxos ligados por éster e lipídeos polimerizáveis, e combinações dos mesmos. Evidentemente, compostos diferentes daqueles especificamente descritos aqui que são entendidos por uma pessoa versada na técnica

como lipídeos são também abrangidos pelas composições e métodos da presente invenção.

[0068] Uma pessoa com conhecimentos comuns na técnica estaria familiarizado com a gama de técnicas que podem ser empregadas para dispersar uma composição em um veículo de lipídeo. Por exemplo, as proteínas mutantes Yap e/ou polinucleotídeos codificando as mesmas podem ser dispersas em uma solução contendo um lipídeo, dissolvido com um lipídeo, emulsificado com um lipídeo, misturado com um lipídeo, combinado com um lipídeo, ligado de modo covalente com um líquido, contido como uma suspensão em um lipídeo, contido ou complexado com uma micela ou lisossoma, ou de outro modo associado a um lipídeo ou estrutura de lipídeo por qualquer meio conhecido por aqueles versados na técnica. A dispersão pode ou não resultar na formação de lipossomas.

[0069] A quantidade de dosagem efetiva de uma composição da presente invenção administrada a um paciente animal pode ser determinada por fatores físicos e fisiológicos como peso do corpo, gravidade de condição, tipo de doença sendo tratada, intervenções terapêuticas anteriores ou simultâneas, idiopatia do paciente e a via de administração. Dependendo da dosagem e via de administração, o número de administrações de uma dosagem preferida e/ou uma quantidade efetiva podem variar de acordo com a resposta do sujeito. O médico responsável pela administração, em qualquer evento, determinará a concentração de ingrediente(s) ativo(s) em uma composição com dose(s) apropriada(s) para o sujeito individual.

[0070] Em certas modalidades, composições farmacêuticas podem compreender, por exemplo, pelo menos aproximadamente 0,1% de um composto ativo. Em outras modalidades, um composto ativo pode compreender entre aproximadamente 2% e aproximadamente 75% do peso da unidade, ou entre aproximadamente 25% e aproximadamente

60%, por exemplo, e qualquer faixa derivável na mesma. Naturalmente, a quantidade de composto(s) ativo(s) em cada composição terapeuticamente útil pode ser preparada de tal modo que uma dosagem adequada será obtida em qualquer dose unitária dada do composto. Fatores como solubilidade, biodisponibilidade, meia-vida biológica, via de administração, vida de armazenagem de produto, bem como outras considerações farmacológicas serão consideradas por uma pessoa versada na técnica de preparar tais formulações farmacêuticas, e como tal, uma variedade de dosagens e regimes de tratamento podem ser desejáveis.

[0071] Em outros exemplos não limitadores, uma dose pode compreender de cerca de 1 micrograma/kg/peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 10 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 50 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 100 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 200 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 350 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 500 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 1 miligrama/kg/peso corporal, cerca de 5 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 10 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 50 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 100 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 200 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 350 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 500 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 1.000 mg/kg/peso corporal ou mais por administração, e qualquer faixa derivável na mesma. Em exemplos não limitadores de uma faixa derivável a partir dos números listados aqui, uma faixa de cerca de 5 mg/kg/peso corporal a cerca de 100 mg/kg/peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg/peso corporal a cerca de 500 miligramas/kg/peso corporal, etc., pode ser administrada, com base nos números descritos acima.

A. Composições e Formulações Alimentares

[0072] Em modalidades da presente invenção, as proteínas mutantes Yap e/ou polinucleotídeos codificando as mesmas são formuladas para serem administradas através de uma via alimentar. Vias alimentações incluem todas as vias de administração possíveis nas quais a composição está em contato direto com o trato alimentar. Especificamente, as composições farmacêuticas reveladas aqui podem ser administradas por via oral, bucal, retal ou sublingual. Como tal, essas composições podem ser formuladas com um diluente inerte ou com um veículo comestível assimilável, podem ser encerradas em cápsula de gelatina de invólucro duro ou macio, ou podem ser comprimidas em tabletes, ou podem ser incorporadas diretamente com o alimento da dieta.

[0073] Em certas modalidades, os compostos ativos podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de tabletes ingeríveis, tabletes bucais, trociscos, capsulas, elixires, suspensões, xaropes, pastilhas e similares.^{12,13} (Patentes US 5.641.515; 5.580.579 e 5.792.451, cada especificamente incorporada aqui por referência na íntegra). Os tabletes, trociscos, pílulas, cápsulas e similares também podem conter o seguinte: um aglutinante, como, por exemplo, goma tragacanto, acácia, amido de milho, gelatina ou combinações dos mesmos; um excipiente, como, por exemplo, fosfato de dicálcio, manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio ou combinações dos mesmos; um agente desintegrante, como, por exemplo, amido de milho, amido de batata, ácido algínico ou combinações dos mesmos; um lubrificante, como, por exemplo, estearato de magnésio; um agente edulcorante; como, por exemplo, sacarose, lactose, sacarina ou combinações dos mesmos; um agente aromatizante, como, por exemplo, hortelã pimenta, óleo de wintergreen, aromatizante de cereja, aromatizante de laranja, etc. Quando a forma de unidade de dosagem é uma cápsula,

pode conter, além dos materiais do tipo acima, um veículo líquido. Vários outros materiais podem estar presentes como revestimentos ou de outro modo modificar a forma física da unidade de dosagem. Por exemplo, tabletes, pílulas ou cápsulas podem ser revestidas com goma laca, açúcar ou ambos. Quando a forma de dosagem é uma cápsula, pode conter, além de materiais do tipo acima, veículos como um veículo líquido. Cápsulas de gelatina, tabletes ou pílulas podem ser revestidas de modo entérico. Revestimentos entéricos evitam desnaturação da composição no estomago ou parte superior do intestino onde o pH é ácido. Vide, por exemplo, a Patente US 5.629.001. Após atingir o intestino delgado, o pH básico no mesmo dissolve o revestimento e permite que a composição seja liberada e absorvida pelas células especializadas, por exemplo, enterócitos epiteliais e células M de patch de Peyer. Um xarope ou elixir pode conter o composto ativo de sacarose como agente edulcorante metila e propilparabenos como conservantes, um corante e aromatizante, como aromatizante de cereja ou laranja. Evidentemente, qualquer material usado na preparação de qualquer forma de unidade de dosagem deve ser farmaceuticamente puro e substancialmente não tóxico nas quantidades empregadas. Além disso, os compostos ativos podem ser incorporados em formulações e preparados de liberação controlada.

[0074] Para administração oral as composições da presente invenção podem ser alternativamente incorporadas com um ou mais excipientes na forma de um colutório, dentífricio, tablete bucal, pulverização oral, ou formulação administrada por via oral sublingual. Por exemplo, um colutório pode ser preparado incorporando o ingrediente ativo na quantidade exigida em um solvente apropriado, como uma solução de borato de sódio (solução de Dobell). Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser incorporado em uma

solução oral como uma contendo borato de sódio, glicerina e bicarbonato de potássio, ou disperso em um dentífrico, ou adicionado em uma quantidade terapeuticamente eficaz a uma composição que pode incluir água, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes, e umectantes. Alternativamente, as composições podem ser moldadas em uma forma de tablete ou solução que podem ser colocadas embaixo da língua ou de outro modo dissolvidas na boca.

[0075] Formulações adicionais que são adequadas para outros modos de administração alimentar incluem supositórios. Supositórios são formas de dosagem sólida de vários pesos e formatos, normalmente medicados, para inserção no reto. Após inserção, supositórios amolecem, derretem ou dissolvem nos fluidos de cavidade. Em geral, para supositórios, veículos tradicionais podem incluir, por exemplo, polialquíleno glicóis, triglicerídeos ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, supositórios podem ser formados de misturas contendo, por exemplo, o ingrediente ativo na faixa de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10% e preferivelmente aproximadamente 1% a aproximadamente 2%.

B. Formulações e Composições Parenterais

[0076] Em modalidades adicionais, proteínas mutantes Yap e/ou polinucleotídeos codificando as mesmas podem ser administradas através de uma via parenteral. Como usado aqui, o termo "parenteral" inclui vias que desviam do trato alimentar. Especificamente, as composições farmacêuticas reveladas aqui podem ser administradas, por exemplo, porém não limitadas a via intravenosa, intradérmica, intramuscular, intra-arterial, intratecal, subcutânea ou intraperitoneal nas Patentes US 6.7537.514, 6.613.308, 5.466.468, 5.543.158, 5.641.515 e 5.399.363 (cada uma especificamente incorporada aqui por referência em sua totalidade).

[0077] Soluções dos compostos ativos como base livre ou sais farmacologicamente aceitáveis podem ser preparados em água adequadamente misturada com um tensoativo, como hidroxipropil celulose. Dispersões também podem ser preparadas em glicerol, polietileno glicóis líquidos, e misturas dos mesmos e em óleos. Em condições comuns de armazenagem e uso, esses preparados contêm um conservante para evitar o crescimento de micro-organismos. As formas farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para o prepraro extemporâneo de soluções injetáveis estéreis ou dispersões (Patente US 5.466.468, especificamente incorporado aqui por referência na íntegra). Em todos os casos a forma deve ser estéril e deve ser fluida até o ponto em que capacidade de injeção fácil existe. Deve ser estável nas condições de fabricação e armazenagem e deve ser conservada contra a ação contaminante de micro-organismos, como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (isto é, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e similares), misturas adequadas dos mesmos, e/ou óleos vegetais. Fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, como lecitina, pela manutenção do tamanho exigido de partícula no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser ocasionada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e similares. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser ocasionada pelo uso nas composições de agentes que retardam absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[0078] Para administração parenteral em uma solução aquosa, por

exemplo, a solução deve ser adequadamente tamponada se necessário e o diluente líquido primeiramente tornado isotônico com solução salina ou glicose suficiente. Essas soluções aquosas específicas são especialmente adequadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Em relação a, meios aquosos estéreis que podem ser empregados serão conhecidos por aqueles versados na técnica à luz da presente descrição. Por exemplo, uma dosagem pode ser dissolvida em solução de NaCl isotônica e fluido hipodermoclise adicionado ou injetado no sítio de infusão proposto (vide, por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15a edição, páginas 1035-1038 e 1570-1580). Alguma variação na dosagem necessariamente ocorrerá dependendo da condição do indivíduo sendo tratado. A pessoa responsável pela administração, em qualquer evento, determinará a dose apropriada para o sujeito individual. Além disso, para administração humana, as preparações devem atender aos padrões de esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e de pureza, conforme requerido pelo FDA Office of Biologics standards.

[0079] Soluções injetáveis estéreis são preparadas por incorporar os compostos ativos na quantidade exigida no solvente apropriado com vários dos outros ingredientes enumerados acima, como exigido, seguido por esterilização filtrada. Em geral, dispersões são preparadas por incorporar os vários ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes exigidos a partir daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são técnicas de secagem a vácuo e liofilização que fornecem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução filtrada estéril anteriormente do mesmo. Uma composição em pó é combinada com

um veículo líquido como, por exemplo, água ou uma solução salina, com ou sem um agente de estabilização.

C. Formulações e Composições Farmacêuticas Diversas

[0080] Em outras modalidades preferidas da invenção, o composto ativo proteínas mutantes Yap e/ou polinucleotídeos codificando as mesmas pode ser formulado para administração através de várias vias diversas, por exemplo, administração tópica (isto é, transdérmica), administração por mucosa (intranasal, vaginal etc.) e/ou inalação.

[0081] Composições farmacêuticas para administração tópica podem incluir o composto ativo formulado para uma aplicação medicada como um unguento, pasta, creme ou pó. Unguentos incluem todas as composições baseadas em água solúvel e emulsão, adsorção, oleaginosas, para aplicação tópica, enquanto cremes e loções são aquelas composições que incluem uma base de emulsão somente. Medicamentos administrados por via tópica podem conter um intensificador de penetração para facilitar adsorção dos ingredientes ativos através da pele. Intensificadores de penetração adequados incluem glicerina, álcoois, sulfóxidos de alquil metila, pirrolidonas e luarocapramo. Bases possíveis para composições para aplicação tópica incluem polietileno glicol, lanolina, creme frio e petrolato bem como qualquer outra base de unguento de absorção, emulsão ou solúvel em água, adequada. Preparações tópicas podem incluir também emulsionantes, agentes de gelificação e conservantes antimicrobianos como necessário para conservar o ingrediente ativo e fornecer uma mistura homogênea. Administração transdérmica da presente invenção também pode compreender o uso de um "adesivo". Por exemplo, o adesivo pode fornecer uma ou mais substâncias ativas em uma taxa predeterminada e em um modo contínuo durante um período de tempo fixo.

[0082] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas

podem ser fornecidas por colírios, pulverizações intranasais, inalação e/ou outros veículos de fornecimento de aerossol. Métodos para fornecer composições diretamente nos pulmões através de pulverizações de aerossol nasal foram descritos, por exemplo, nas Patentes US 5.756.353 e 5.804.212 (cada uma especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade). Da mesma forma, a distribuição de drogas usando resinas de micropartícula intranasais¹⁴ e compostos de glicerol-lisofosfatidil (Patente US 5.725.871, especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade) são também bem conhecidos nas técnicas farmacêuticas. Do mesmo modo, o fornecimento de droga transmucosal na forma de uma matriz de suporte de poli-tetrafluoroetileno é descrito na Patente US 5.780.045 (especificamente incorporada aqui por referência em sua totalidade).

[0083] O termo aerossol refere-se a um sistema coloidal de sólido finamente dividido de partículas líquidas dispersas em um propelente gasoso liquefeito ou pressurizado. O aerossol típico da presente invenção para inalação consistirá em uma suspensão de ingredientes ativos em propelente líquido ou uma mistura de propelente líquido e um solvente adequado. Propelentes adequados incluem hidrocarbonetos e éteres de hidrocarbonetos. Recipientes adequados variarão de acordo com os requisitos de pressão do propelente. A administração do aerossol variará de acordo com a idade do indivíduo, peso e severidade e resposta dos sintomas.

IV. Kits da Descrição

[0084] Qualquer das composições descritas aqui pode ser compreendida em um kit. Em um exemplo não limitador, um polipeptídio Yap mutante e/ou polinucleotideo (ou oligonucleotideos para geração do mesmo) pode ser compreendido em um kit.

[0085] Os componentes dos kits podem ser embalados em meios

aquosos ou em forma liofilizada. Os meios de recipiente dos kits incluirão em geral pelo menos um frasco, tubo de teste, frasco, garrafa, seringa ou outro meio de recipiente, no qual um componente pode ser colocado; e preferivelmente, formado em alíquotas adequadamente. Onde há mais de um componente no kit, o kit também conterá em geral um segundo, terceiro ou outro recipiente adicional no qual os componentes adicionais podem ser separadamente colocados. Entretanto, várias combinações de componentes podem ser compreendidas em um frasco. Os kits da presente descrição também incluirão tipicamente um meio para conter uma ou mais composições em confinamento estreito para venda comercial. Tais recipientes podem incluir recipientes de plástico moldados a sopro ou injeção nos quais os frascos desejados são retidos.

[0086] A composição pode ser formulada em uma composição que pode ser colocada em seringa. Em cujo caso, o meio de recipiente pode ele próprio ser uma seringa, pipeta e/ou outro aparelho similar, do qual a formulação pode ser aplicada em uma área infectada do corpo, injeta em um animal, e/ou mesmo aplicada a e/ou misturada com os outros componentes do kit. Entretanto, os componentes do kit podem ser fornecidos como pó(s) seco(s) quando reagentes e/ou componentes são fornecidos como pó seco, o pó pode ser reconstituído pela adição de um solvente adequado. É previsto que o solvente também pode ser fornecido em outro meio de recipiente.

[0087] Os kits da presente descrição também incluirão tipicamente um meio para conter os frascos em confinamento estreito para venda comercial, como, por exemplo, recipientes de plástico moldados por injeção e/ou sopro nos quais os frascos desejados são retidos.

[0088] Em modalidades específicas, o kit compreende reagentes e/ou ferramentas para determinar que um indivíduo tem uma condição

mediada relacionada cardíaca. Em algumas modalidades, o kit compreende uma ou mais terapias adicionais para uma condição mediada relacionada cardíaca, como um ou mais de inibidor ACE, inibidor aldosterona, bloqueador de receptor de angiotensina II (ARBs); betabloqueador, potássio, magnésio, vasodilatador, medicação anticoagulante, aspirina e uma combinação dos mesmos.

EXEMPLOS

[0089] Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar modalidades preferidas da invenção. Deve ser reconhecido por aqueles versados na arte que as técnicas reveladas nos exemplos que se seguem representam técnicas descobertas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção e desse modo podem ser consideradas como constituindo modos preferidos para sua prática. Entretanto, aqueles versados na técnica devem, à luz da presente descrição, reconhecer que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas que são reveladas e ainda obter um resultado igual ou similar sem se afastar do espírito e escopo da invenção.

EXEMPLO 1

YAP ATIVO DOMINANTE INDUZ ACESSIBILIDADE DE CROMATINA E RENOVAÇÃO DE CARDIOMIÓCITO

[0090] Para caracterizar que a mutação YapS127A falha em responder por toda a inibição Yap dependente de Lats e modelar um coração que não tem atividade Hippo, uma linhagem de camundongo transgênico foi gerado que condicionalmente superexpresso Yap5SA que tem todos os cinco sítios de fosforilação Lats $\frac{1}{2}$ mudados para A⁸.

[0091] O transgene Yap5SA induzível acionado por CAG continha um eGFP STOP-flanqueado LoxP, seguido pelo Yap5SA etiquetado Flag e IRES LacZ (figura 1A). A expressão de eGFP dirigida para transgene em corações pós-natal e embrionico antes da recombinação

(figuras 1B, 1C). Os inventores cruzaram camundongos Yap5SA para o acionador Cre específico de cardiomiócito induzível por tamoxifeno, α MyHC-Cre-ERT2 (figura 1D)¹⁵ para gerar camundongos superexpressando (OE) Yap5SA. A recombinação foi induzida em CMs adultos por 4 dias de injeções consecutivas de tamoxifeno (40 ug/g). Western blots em extratos de coração adulto mostraram um aumento de 5 vezes em níveis de Yap nos corações OE Yap5SA (figura 1D). Estudos de imunofluorescência revelaram um enriquecimento nuclear Yap de 2,5 vezes em relação a citosol de CMs OE Yap5SA. CMs de controle expressaram Yap tanto em citosol como em núcleo (figura 1E).

[0092] Camundongos OE Yap5SA morreram 72 horas após a injeção de tamoxifeno final (figura 2A). A histologia revelou espessura de parede ventricular esquerda aumentada com as câmaras LV quase ocluídas com músculo (figura 2B). Ecocardiografia de antes e um dia após tamoxifeno mostrou as paredes ventriculares espessadas, tamanho diminuído de câmara, e fração aumentada de ejeção de corações OE Yap5SA *in vivo* (figuras 2C-2J e múltiplos vídeos). Esse fenótipo contrasta com dilatação ventricular cardiotônico em camundongos α -MHC-merCremer de controle após tamoxifeno¹⁶.

[0093] Para monitorar em relação a arritmias, dispositivos de telemetria foram implantados em controle de ninhada e camundongos Yap5SAOE. Não houve detecção de arritmias em camundongos OE Yap5SA porém ao invés proteção de arritmias induzidas por tamoxifeno (inversão de onda T) observadas em todos os camundongos α MyHC-Cre-ERT2 estudados (figura 5A, 5B; n=3). Além disso, Yap5SA expressando cardiomiócitos (β -galactosidase positivo) foram conectados para controlar CMs de controle por junções de folga, como indicado por imunofluorescência Connexin43 (figura 5C) sugerindo que CMs expressando Yap5SA acoplam eletricamente com

CMs do tipo selvagem. Cardiomiócitos foram isolados 24 horas após a injeção final de tamoxifeno e estudaram contratilidade de CM no nível de célula individual. CMs OE Yap5SA eram menores, porém tinham comprimento de sarcômero de descanso similar e contratilidade em resposta à estimulação de campo como comparado com CMs de controle administrados com tamoxifeno (figura 3A, 5D).

[0094] Para determinar número CM por estereologia, corações de diástole fixo foram seccionadas 2 dias após injeção de tamoxifeno a partir do ápice até a aorta em incrementos de 7 µm e os inventores mediram diretamente área ventricular esquerda em profundidades de tecido diferentes. O volume ventricular esquerdo de referência foi calculado por traçar áreas ventriculares esquerdas como uma função de localização no coração e integrar a área sob a curva. Como pode ser difícil identificar de modo inequívoco CMs, os inventores usaram o marcador de material pericentriolar 1 (PCM-1) para identificar núcleos CM no ventrículo esquerdo¹. Corações OE Yap5SA tinham área de parede ventricular esquerda aumentada, volume miocárdio aumentado e volume de câmara diminuído em comparação com corações de controle (figura 3B-3D). Corações OE Yap5SA também aumentaram a razão de peso de ventrículo esquerdo aumentado para peso corporal (figura 3E).

[0095] Para estimar número CM ventricular esquerdo total, os inventores calcularam densidade de núcleo CM positivo PCM-1 calculada em controle (72.100 ± 2.300 CM núcleos/mm³) e corações OE Yap5SA (70600 ± 1.300 CM núcleos/mm³)^{1,17}. Densidades de núcleo CM foram compatíveis com dados de estereologia de camundongo recente a partir de Alkass e outros (vide a figura 1B¹⁷). Para obter número CM, os inventores multiplicaram a densidade de CM por volume total de coração e corrigiram para nucleação CM (vide abaixo)^{1,17}. Ventrículos esquerdos OE Yap5SA

tinham um aumento grande em número CM em comparação com controle (controle: 1.880.000 +/-78.000 vs, Yap5SA: 2.680.000 +/-54.000; ANOVA com análise post-hoc Bonferroni p<0,0001; figura 3F). Os dados de número CM de controle são também compatíveis com dados de camundongos anteriormente publicados¹⁸.

[0096] Teor de DNA foi quantificado de núcleos CM positivo PCM-1 isolados por citometria de fluxo e CMs OE Yap5SA tinham um aumento pequeno em núcleos 4N porém nenhum aumento em núcleos com teor de DNA maior que 4N como visto em modelos em catástrofe mitótico¹⁹ (figura 6) como células diploides em G2/M têm o mesmo teor de DNA 4N como células tetraploides, os dados sugerem que o aumento em núcleos 4N Yap5SA é devido a progressão de ciclo de célula normal ao invés de hiper-ploidização²⁰. O número de núcleos CM foi medido em CMs isolados e houve um aumento em CMs mononucleares em corações OE Yap5SA porém nenhuma alteração em CMs binucleados (figura 3G). Foi também observado que corações de Yap5SA tinham uma proporção reduzida de CMs com 4 núcleos sugerindo menos divisões nucleares não produtivas (figura 3G).

[0097] Os inventores forneceram EdU ad-libitum em água potável por dois dias após indução de Yap5SA e colorido para EdU em CMs isolados para estudar entrada de fase S em CMs adultos não lesionados (figura 3H). Similarmente a observações anteriores, incorporação de EdU em CMs de controle não lesionados não foi detectável (figura 3H)². Em contraste, aproximadamente 16% de CMs OE Yap5SA eram positivos para EdU (figura 3H). Além disso, CMs de Yap5SA expressaram marcadores mitóticos com aproximadamente 11% de Yap5SA CMs positivos para Aurkb e 6% positivos para PHH3 (figuras 3I-3J). Para calcular tempo de duplicação de CM (t_D) recombinação não frequente foi induzida com uma dose baixa única de tamoxifeno e CMs positivos em LacZ foram contados em pontos de

tempo diferentes. Após converter em forma logarítmica, os inventores verificaram um t_{D} de 1.37 dias para CMs OE Yap5SA (figura 3K). De modo importante, Yap5SA não induziu apoptose CM ou fibrose intersticial (figuras 7, 8). Juntos, os dados indicam que Yap5SA induz proliferação de CM adulto com o nascimento de novos CMs.

[0098] Para obter insight nos genes alvos de Yap5SA no contexto de renovação de CM adulto, RNA-seq nuclear específico de CM foi realizado 48 horas após injeção de tamoxifeno^{21, 22}. Um total de 1.352 genes foi significativamente regulado para cima e 748 foram regulados para baixo em CMs Yap5SA (valor-p ajustado < 0,01) (figuras 4A, 9). A análise de ontologia de gene não polarizada revelou que alterações de expressão de gene foram compatíveis com um fenótipo de CM proliferativo (figura 10A). Transcritos regulados para cima incluíram os genes de centrômero, Cenpe e Cenpf, e as ciclinas Ccnd1 e Ccna2. Outros genes incluíram Dock2, um fator de permuta de nucleotídeo de guanina da família Rho, que promove remodelagem citoesqueleto e proliferação de células²³. Genes regulados para baixo incluíram genes codificando miosinas e canais de íon que caracterizam o fenótipo de CM diferenciado (figura 10B). De modo interessante, genes de via Hippo estavam entre os transcritos mais significativamente aumentados em CMs Yap5SA (figura 11). Os genes de via Hippo de núcleo Lats 2 e Kibra (Wwc1) foram regulados para cima como foram genes que codificam inibidores de Yap Crb2, Amot e VgII2-4 (figuras 10B, 11).

[0099] Para investigar a paisagem de cromatina CM OE Yap5SA, um ensaio foi realizado em relação a cromatina acessível por transposase (ATAC)-seq em núcleos CM isolados PCM-1²⁴. No total, 16.189 picos mostraram acessibilidade aumentada em CMs Yap5SA, enquanto 13.353 picos ATAC foram diminuídos em comparação com CMs de controle (figuras 4A, 9). A descoberta de motivo de novo

revelou que os três motivos enriquecidos superiores em picos de ATAC recentemente abertos em CMs OE Yap5SA todos pertenciam ao fator de transcrição TEAD (figura 4B), um meio de interação Yap bem conhecido²⁵. Outros motivos enriquecidos foram elementos AP-1 compatíveis com dados ChIP-seq Yap anteriores e Atf3 que tem um papel na prevenção de remodelagem cardíaca patológica^{26,28}. O algoritmo Núcleo-ATAC foi aplicado para ilustrar o estado aberto de cromatina em relação a motivos de ligação e DNA TEAD e encontrou depleção de nucleossoma em motivos TEAD, compatível com ocupação aumentada de fator de transcrição²⁹ (figura 4B).

[00100] Picos ATAC intergênicos foram traçados em relação aos sítios de início de transcrição mais próximos (TSS) e houve uma distribuição bimodal contendo regiões promotoras (<1 kb de TSS) e locais distais (>10 kb) em ambos controle e CMs OE Yap5SA (figura 12A). Picos ATAC recentemente acessíveis, regulados para cima em CMs OE Yap5SA (valor-p ajustado < 1e-5) foram localizados principalmente distalmente em intensificadores putativos²⁴. De modo semelhante, picos ATAC que mapeiam para genes ativamente transcritos foram também enriquecidos em regiões distais (figura 4C, 12B). O trabalho anterior revelou que sítios de ligação Yap-Tead foram enriquecidos para H3K27Ac, um marcador de cromatina ativa⁵. A comparação de dados ATAC-seq com dados ChIP-seq H3K27Ac existentes a partir de coração adulto e em desenvolvimento revelou que picos ATAC-seq de CMs OE Yap5SA (valor-p ajustado ≤ 0,035) foram enriquecidos para marcas de cromatina H3K27Ac embrionica. Em contraste, picos ATAC-seq de CMs de controle (valor-p ajustado ≤ 0,035) mostraram enriquecimento para marcas de cromatina H3K27Ac de adulto³⁰ (figura 4D). Esses dados sugerem que Yap5SA promoveu acessibilidade de cromatina em intensificadores de desenvolvimento.

[00101] ChIP-seq foi realizado usando um anticorpo contra o

epítopo Flag Yap5SA para destruir cromatina ligada por Yap5SA. Compatível com dados ATAC-seq, Yap5SA ChIP-seq revelou que Yap5SA preferencialmente ligou regiões intensificadoras distais em uma razão de aproximadamente 6.3 para 1 (figura 4C)^{26,31}. Yap também ligou promotores acessíveis para regular positivamente transcrição de genes normalmente silenciosos³¹.

[00102] Genes regulados para cima de modo transcrecional foram comparados com CMs Yap5SA com dados Yap5SA ChIP-seq e havia 173 genes que eram genes alvo Yap5SA direto. Dos locais alvo Yap5SA direto, 76 locais tinham também acessibilidade de cromatina aumentada como determinado por ATAC-seq, enquanto os outros locais alvo Yap5SA já tinham uma assinatura de cromatina aberta (figuras 4E, 13A). Traçar a profundidade média de fragmento para RNA-seq e ATAC-seq em torno de uma janela de 1kb centrada na TSS de cada gene revelou um padrão de alta acessibilidade de promotor e transcrição aumentada naqueles locais (figura 13C).

[00103] Entre os 76 genes diretamente regulados por Yap5SA estavam componentes de via Hippo, indicando que Yap ativa diretamente um loop de feedback negativo para evitar proliferação de CM (figura 4G, 11A-11B). os genes de via Hippo incluíram Lats2, VgII2, VgII3 e Wwcl^{8,32} (figura 4F; 13A). Western blots revelaram que Yap com peso molecular mais baixo, endógeno tinha aumentado fosforilação de serina 112 indicando atividade Hippo regulada para cima (figura 11). Outros genes diretamente regulados por Yap5SA incluíram mitose e genes de citocinese como *Pkcr*³³. Uma categoria principal de alvos Yap5SA acessíveis eram genes codificando componentes de separação endossomal. Essa categoria incluiu Snx2, Snx7 que codificam componentes de retromer. *Dab2*, codificando uma proteína adaptadora endocítica, funciona como um inibidor de Wnt enquanto *Wls* é essencial para tráfego endossomal de ligantes Wnt³⁴.

³⁵ (figuras 13A1-13A3, 13B).

[00104] Genes que promovem montagem de junção de adherens, como *Nectin1*, *Plekha7*, *Miss1* e *Ctnnd1*, foram também alvos Yap5SA acessíveis apoiando adicionalmente a descoberta de que novos CMs integram funcionalmente no coração³⁶. Múltiplos genes que regulam o citoesqueleto de actina foram também encontrados nos alvos Yap5SA acessíveis. Ephexin e Pak3 codificam proteínas que são importantes para aumentar a atividade de Rho. Outros genes como Cobl, codificando um nucleador de actina de codificação, e Cnn3, importante na formação de fibras de tensão durante cicatrização de ferimento. (Figuras 13A1-13A3, Figura 13B).

[00105] A Figura 14C resume genes diferencialmente regulados por Yap5SA que estão diretamente envolvidos no ciclo de célula, bem como resume a literatura anterior que descreveu ou tentou iniciar o ciclo de célula em cardiomiócitos adultos. O principal indica (símbolo) genes que são diferencialmente regulados para cima ou para baixo em cardiomiócitos Yap5SA como determinado por RNA-seq; genes que são alvos diretos de Yap5SA determinados por imunoprecipitação de cromatina |Yap5SA, seguido por sequencialmente (isto é, ChIP-seq (+); e genes que são represados de modo epigenético em cardiomiócitos de controle, porém não represados na presença de Yap5SA, como determinado por ensaio para cromatina acessível por transposase (isto é, ATAC-seq (para cima)).

[00106] As descobertas revelam que capacidade proliferativa de CMs diferenciados é eficazmente obstruída por elementos reguladores distais descomissionados. Por superexpressa Yap5SA, foi determinado que Yap pode ativar um programa genético que promove progresso através de mitose. De modo importante, genes alvo Yap5SA incluem genes de ciclo de célula, mas também genes codificando proteínas de separação endossomal que são importantes para divisão

de célula produtiva.

[00107] Filmes produzidos pelos inventores mostram ecocardiografia de modo-B de eixo curto de um coração OE Yap5SA antes da administração de tamoxifeno e do mesmo coração, porém um dia após administração de tamoxifeno e 4 dias após. Os filmes também demonstram ecocardiografia de modo-B de eixo curto de um coração OE Yap5SA 2 dias após a dose final de tamoxifeno, e 24 horas antes daquele animal morrer. A câmara ventricular foi diminuída. Ecocardiografia de modo-B eixo longo de um coração OE Yap5SA antes de tamoxifeno e do mesmo coração, porém dois dias após tamoxifeno, e então 5 dias após. O espessamento do miocárdio era evidente.

MATERIAIS SUPLEMENTARES

Materiais e métodos

Animais experimentais

[00108] Estudos de camundongo foram realizados de acordo com o comitê de uso e cuidados com animais institucionais do Baylor College of Medicine. Os inventores utilizaram YAP2 5SA pCMV-flag a partir de Kunliang Guan (plasmídeo Addgene no. 27371), que foi clonado na construção de expressão CAG-loxP-eGFP-Stop-loxP-IRES-βGal como exemplo. Essa construção codifica para uma variante Yap humana que tem oito resíduos de serina mudados para alanina nos cinco motivos de fosforilação dependentes de lats canônico (S61A, S109A, S127A, S128A, S131A, S163A, S164A, S381A). Os camundongos Yap5SA OE (Tg(Jojo-Flag: Yap5SA)5JFM) foram gerados por injeção pronuclear de DNA linearizado codificando o transgene (figura 1A) em óócitos fertilizados de camundongos FVB/N, que foram então implantados em camundongos ICR pseudoprenhes. Cruzamentos únicos foram realizados com camundongos αMyHC-Cre-ERT2 homozigotos, que foram mantidos no segundo plano C57B1/6. Todos

os animais de controle eram de ninhada ou irmãos com idade correspondente. Genótipo foi determinado tanto visualmente por expressão de eGFP na pele da cauda como por genotipagem PCR (F:AAGCCTTGACTTGAGGTTAG (SEQ ID NO: 5), R:CGTCATCGTCTTGAGTCC; SEQ ID NO: 6). Todos experimentos com adultos foram realizados em camundongos macho e fêmea, 7-10 semanas de idade. Indução de tamoxifeno de Cre foi realizada similarmente a publicações anteriores de Heallen, e outros, injeções intraperitoneais (40 mg/kg), diariamente para quatro dias⁴.

Ecocardiografia de Ultrassom

[00109] Ecocardiografia de modo-B e M foi realizado de acordo com protocolos estabelecidos no Baylor College of Medicine Mouse Phenotyping Core usando um scanhead de 30 MHx (RMV7007B) em um sistema VisualSonics 770.

Medições morfológicas e fisiológicas de célula única

[00110] O dia após a quarta injeção de tamoxifeno, cardiomiócitos foram isolados por perfusão retrograda de colagenase A (Roche), como descrito em outra parte³⁷. Uma porção das células foi fixada (10% de formalina, 10 minutos) para quantificação de tamanho de célula, que foi realizado por tomar imagens estáticas de células revestidas (microscópio Nikon Eclipse 80i, equipado com uma câmera Nikon DSFi1) e delinear as mesmas em imageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) para quantificar a área de perfil CM 2D. A pessoa que quantifica as imagens foi ocultada em relação a genótipo. Imageamento fisiológico ao vivo foi realizado usando um Sistema de gravação de contratilidade e cálcio de miócito IonOptix (IonOptix, Westwood, MA). Cardiomiócitos foram revestidos em solução de Tyrodes contendo 1,8 mM Ca²⁺ (HEPES tamponado, pH 7,4) selecionado para ausente ou mínimo de GFP (pós-recombinação), e foram estimulados em campo usando um MyoPacer (IonOptix, Westwood, MA) em 20 V/cm;

encurtamento de sarcômero foi quantificado por transformada Fourier da periodicidade de sarcômero usando o software IonWizard Ionoptix durante os 20 segundos finais de um protocolo de ritmo de 1Hz de dois minutos.

Mapeamento Óptico

[00111] Camundongos foram anestesiados com isoflurano no plano cirúrgico de anestesia e heparina foi injetada por via intraperitoneal (100 unidades) antes de deslocamento cervical. O coração foi então removido e lavado em Solução de Tyrode fria oxigenada (95% O₂, 5% CO₂). A aorta foi então canulada com uma cânula de calibre 21. Após canulação, o coração foi perfundido de modo retrogrado com solução de Tyrode, mantendo a pressão aórtica entre 80 e 120 mmHg. Um eletrodo (Harvard Apparatus, MA, EUA) foi colocado na superfície do átrio direito para estimulações de ritmo (10 Hz, 12Hz e 14 Hz), geradas por PowerLab 26T (AD Instruments, Sidnei, Austrália). Para eliminar artefatos contráteis, corações foram carregados com blebistatina (Sigma-Aldrich, B0560-5 mg, 50 ul de 2,5 mg/ml em DMSO). Os inventores então perfundiram os corações com o corante sensível à tensão, di-4-ANEPS (Invitrogen, D-1199, 20ul de 2,5 mg/ml em DMSO). Uma luz de LED foi usada para excitação (comprimento de onda: 530 nm). Emissão de fluorescência, significando Vm, foi filtrado em passagem longa (>590 nm, 590FG05-50, Andover Corporation Optical Filter) e medida com uma câmera CMOS MiCAM0 (SciMedia, CA, EUA). ECG de superfície (ADInstruments) foi monitorado durante experimento usando LabChart. Velocidades de condução e mapas de ativação foram calculados com software Rhythm³⁸.

Histologia, Imunofluorescência, Seções congeladas e imageamento de EdU

[00112] Embriões recentemente dissecados e corações pós-natal foram dissecados e imageados em relação à fluorescência endógena

em uma Zeiss SteREO Discovery, V12, equipada com um Zeiss AxioCam Hrc. Para fixação, corações foram perfundidos de modo retrogrado com 20 mM KC1-PBS cardioplégico, antes de perfusão de formalina tamponada neutra a 10%, seguido por incorporação em parafina. Seções transversais de 7 micrões foram cortadas e montadas sobre lâminas de poli lisina carregadas (Denville UltraClear Plus, branco fosco). Uma porção foi colorida com coloração de tricroma de Masson, e uma porção foi colorida com vermelho Picro-sírius. Imunoistoquímica foi realizada por primeiramente desparafinizar e reidratar as seções, seguido por recuperação de antígeno. As seções foram bloqueadas (10% de soro de burro em PBS, 0,1% Tween-20) e então coloridas (separadamente, em sucessão) durante a noite antes de imageamento (primário: anti-CX43, coelho sigma 1:200; anti-β-gal, galinha Abcam 1:200) (secundário: anticorpos Alexa de Life Technologies conjugados de modo fluorescente padrão). Núcleos foram coloridos com DAPI. A coloração TUNEL foi realizada usando o sistema TUNEL Fluorométrico DeadEnd (Promega) em tecido incorporado em parafina. A pessoa quantificando as imagens foi ocultada em relação a genótipo. Todo imageamento foi realizado em um microscópio confocal Zeiss LSM 780 no núcleo de Optical Imaging and Vital Microscopy em Baylor College of Medicine.

[00113] Para cortar seções congeladas, corações foram extraídos, perfundidos com sacarose a 30%, 20 mM KCl-PBS, e então colocados em composto O.C.T. Tissue-Tek® antes de congelar sobre gelo seco. Seções de 16 micrônmetro foram então cortadas e montadas em lâminas de vidro. Para coloração de imunofluorescência, recuperação de antígeno foi realizada por aquecer as seções a 42º e então colocar em acetona a -20º por 20 minutos antes de bloquear com soro de burro e então incubadas durante a noite com anticorpo primário (PHH3, coelho Cell Signalin 1:400; AuroraB, coelho Abcam 1:200; cTnT camundongo

Thermo 1:200) a 4º, seguido por anticorpo secundário (anti coelho Alexa Life Technologies; anti-camundongo Vector Labs biotinilado 1:200, seguido por Life Technologies Estreptavidina-Alexa) por 30 minutos em temperatura ambiente. Núcleos foram coloridos com DAPI. A pessoa que quantifica as imagens foi ocultada em relação a genótipo. Todo imageamento foi realizado em microscópio confocal Zeiss LSM 780 no núcleo de Optical Imaging and Vital Microscopy em Baylor College of Medicine.

[00114] Imunocitoquímica foi realizada usando protocolos-padrão. Em resumo, CMs isolados Langendorff foram fixos por 10 minutos em temperatura ambiente em formalina a 10%. Após permeabilizar com 0,5% triton-100 por 20 minutos e bloquear com 2% FBS e 2% BSA, anticorpos foram incubados (separadamente, em sucessão) durante a noite antes de imageamento (anti-Yap, coelho Novus 1:200, cTnT, camundongo Thermo 1:200) (secundário: anticorpos Life Technologies Alexa conjugados de modo fluorescente padrão). Coloração de EdU foi realizada usando tecnologia Click-it através de kit de imageamento Click-it Alexa Flúor 647 da Life Technologies (C10340). Presença genuína de EdU em cardiomiócitos individuais foi determinada por pilhas-z confocais. Número de núcleos foi quantificado nesses cardiomiócitos isolados por coloração com DAPI e contagem do número de núcleos por célula por pilhas-Z confocais. A pessoa que quantifica as imagens foi ocultada em relação a genótipo. Todo imageamento foi realizado em um microscópio confocal Zeiss LSM 780.

Western blotting

[00115] Western blotting foi realizado por homogeneização de glóbulo de corações em um tampão triton, EDTA, HEPES. Os lisados foram então carregados com um tampão de amostra SDS baseado-tris de redução (80 µg/cavidade), e transferidos para membranas de

PVDA, e imageados usando o sistema de imageamento Li-Cor Odyssey. Anticorpos primários: coelho Novus anti-Yap: (1:1000); camundongo Sigma anti-M2flag (1:1.000); anti-GAPDH de camundongo Millipore (1:5.000); homólogo anti-P-Yap(S127-camundongo S112) Cell Signaling Technologies. (1:1.000). Anticorpos secundários fluorescentes Li-cor: IgG anticoelho de cabra, IgG anticamundongo de cabra (1:5.000). Quantificação foi executada usando a característica de análise de Gel em Fiji (ImageJ).

Eletrofisiologia in vivo

[00116] Como anteriormente descrito³⁹, eletrocardiogramas foram registrados continuamente por 5 dias cobrindo o protocolo de indução OE Yap5SA. Transmissores de telemetria (Data Sciences International) foram implantados na cavidade abdominal de camundongos de ambulatório. Os eletrodos s.c. foram colocados em uma configuração de fio II, e registrados usando software Dataquest versão 4.1. Mediçãoes de onda-T foram realizadas por computar a área sob a curva.

Quantificação de tamanho LV e número total de miócitos

[00117] Para determinar o número total de cardiomiócitos nos ventrículos esquerdos, os inventores primeiramente excisaram os corações e fixaram os mesmos em diástole por perfusão retrograda com KC1, seguido por formalina a 10%, e então fixação em gotas em formalina a 10%. Os corações foram incorporados em parafina, e cortados do ápice até a aorta em seções de 7 microns. Os inventores então computaram o volume do ventrículo esquerdo em cada coração por traçar a área de miocárdio LV em uma lâmina de microscópio como uma função de profundidade de tecido e então integraram a área sob aquela curva. A partir daquele volume, a razão de peso LV para peso corporal foi computada por converter o volume em massa usando a densidade do músculo de 1,053 g/mL⁴⁰. As seções de 7 micron em

várias profundidades de tecido foram então coloridas com anti-PCM1, DAPI, e WGA para rótulo: núcleos CM, todos os núcleos e as bordas da célula. Microscopia confocal foi usada para imagear através da espessura inteira de cada seção e então os inventores contaram o número de núcleos PCM1(+) no quadro de imageamento. Núcleos parciais nas bordas inferiores e esquerda do quadro não foram contados, enquanto núcleos parciais nas bordas superior e direita foram contados. Pilhas-Z foram tomadas aleatoriamente por todas as seções a partir de profundidades de tecido diferentes (40 pilhas-Z/coração). Núcleos foram contados somente se eram ambos PCM1 e DAPI positivos, com PCM1 circundando o DAPI (figura 3F). Para encontrar o número total de CMs, o número de núcleos contados por volume foi computado para uma densidade de nucleação, que foi então extrapolada para o volume inteiro do miocárdio e então corrigido para a nucleação média dos miócitos a partir de cada genótipo (controle: 2,04 núcleos/CM; Yap5SA: 1,92 núcleos/CM, figura 3G) como descrito em outra parte⁴¹. A pessoa que quantifica as imagens foi ocultada em relação a genótipo.

Análise de teor de DNA por citometria de fluxo

[00118] Cardiomiócitos foram isolados por perfuração de Langendorff e então fixados em formalina a 10%. Núcleos foram isolados como anteriormente descrito⁴². Células foram suspensas e dounce homogeneizadas 30 vezes em tampão HB (pH 7,4 15 mM Tris-HCl, 0,34 M sacarose, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA com inibidores de proteinase). Os núcleos foram então liberados por passagem através de uma agulha de 18-G 15 vezes em tampão PBTB (0,1% Triton X-100, 5% BSA em PBS). Para rotular núcleos específicos de CM, os núcleos foram incubados com anticorpo PCM1 (1:1.000, Sigma; secundário: anti-coelho 546 Alexa Life Technologies) e DNA foi rotulado com DAPI. Os núcleos foram então

passados através de um separador de células (BD Biosciences FACSARIA II SORP) e teor de DNA de núcleos de cardiomiócitos PCM1(+) foi quantificado como intensidade de fluorescência DAPI e analisado usando software FlowJo (Tree Star) para estágio de ciclo de célula.

Análise de tempo de duplicação de repórter LacZ

[00119] Corações foram dissecados, perfundidos com glicerol a 20% em 20 mM KC1, incorporados em composto O.C.T. e congelados sobre gelo seco. Foram então seccionados em seções de 16 μ m, fixos por 15 minutos em 0,02% de glutaraldeído em PBS. A reação com x-gal foi permitida prosseguir a 37º por 48 horas.

[00120] O número de células resultando da divisão de células pode ser descrito por $N(t) = N_0 2^{2t/t_D}$ onde $N(t)$ é o número de células em um dado tempo, N_0 é o número de início de células, t é a quantidade de tempo que leva para ir de N_0 para $N(t)$ e t_D é o tempo de duplicação. Uma injeção de tamoxifeno de dose baixa única (10 μ g/g) foi realizada, seguido por sacrifícios dependentes de tempo dos camundongos OE Yap5SA. Os inventores então seccionaram os corações em e quantificaram o número de células LacZ(+) por seção. Esse total foi então dividido pela área da seção. Os inventores então traçaram o \log_2 desses valores e adaptaram os dados em uma função linear descrita por $\log_2(N(t)) = \log_2(N_0) + 2t / t_D$ ($R^2 = 0,96$). Por inserir dados para N_0 e $N(t)$, reorganizar e resolver em relação a t_d , o tempo de duplicação (t_D) foi determinado. Imageamento foi realizado em um microscópio Nikon Eclipse 80i, equipado com uma câmera DSFi1 Nikon). A pessoa que quantifica as imagens era ocultada em relação ao ponto de tempo.

Isolamentos nucleares PCM1 para ATAC-seq e RNA-seq:

[00121] Isolamento nuclear foi realizado de acordo com Mo e outros, com as seguintes modificações⁴³. Em resumo, tecido cardíaco novo foi colhido em gelo e imediatamente homogeneizado com um

Biogen series PRO200 (PRO Scientific) antes de dounce homogeneização. Núcleos foram isolados através de centrifugação de gradiente de densidade com meio de gradiente de densidade optiprep (Sigma). Todos os núcleos isolados de interface a 30-40% foram pré-limpos com Protein-G Dynabeads (Life Technologies). A seguir, núcleos foram imunoprecipitados com um anticorpo anti-PCM1 (Sigma, HPA023370) e Protein-G Dynabeads para enriquecer em relação a núcleos de cardiomiócitos²¹.

ATAC-seq

[00122] Aproximadamente 50.000 núcleos PCM1+ limitados por glóbulo foram usados como entrada para ATAC-seq. Bibliotecas ATAC-seq foram gerados de acordo com (Buenrostro et al., 2013)²⁴. Sequenciamento de 2x75 bp de extremidade emparelhada foi realizado em um instrumento Illumina Nextseq (DNA link). Leituras foram mapeadas para o genoma de camundongo (mm10) usando Bowtie2 com ajustes de extremidade emparelhada default⁴⁴. A seguir, todas as leituras não nucleares, e leituras inadequadamente emparelhadas foram descartadas. Leituras duplicadas foram removidas a seguir com MarkDuplicates picard. A chamada de pico foi realizada com MACS2 (callpeak – sem modelo – largo). Regiões de lista preta foram levantadas de mm9 para genoma de camundongo mm10 e removidas juntamente com picos de qualidade de sequenciamento baixa (exige >q30). Leituras foram contadas para cada condição do arquivo de pico abrangente (réplicas de controle e Yap5SA se fundiram) usando bedtools (módulo de multicov)⁴⁵. Normalização quantil de conjuntos de dados ATAC-seq foi realizada com CQN⁴⁶ e deslocamentos foram alimentados para DESeq2 para quantificar acessibilidade diferencial⁴⁷. Chamada de nucleossoma foi realizada com NucleoATAC²⁹. A análise de enriquecimento de motivo foi conduzida com Homer (findMotifsGenome.pl).

RNA-seq

[00123] RNA de núcleos PCM1+ limitados por glóbulo foi coletado usando o Micro kit RNEasy Plus (Qiasen). Bibliotecas RNA-seq nucleares foram construídas com o Kit RNA-seq stranded com Ribo erase (Kapa Biosystems) com adaptadores no formato de Y customizados. Sequenciamento de 2x75 bp de extremidade emparelhada foi realizado para bibliotecas RNA-seq em um instrumento Illumina Nextseq (DNA Link). Leituras foram primeiramente mapeadas para o genoma de camundongo (mm10) usando STAR⁴⁸. Análise de expressão diferencial foi então realizado com DESeq2⁴⁷. Ontologia de gene foi realizada usando Metascape. Análise de via de novo foi realizada usando g:perfilador^{49,50}.

H3K27Ac ChIP-seq

[00124] Dados disponíveis ao público: GSM1264370, GSM1264372, GSM1264372, e GSM1264372 foram mapeados para o genoma do camundongo (mm10 de construção) utilizando parâmetros padrão de bowtie2. Após o mapeamento, as réplicas de coração E11.5 H3K27Ac GSM1264370, e GSM1264372 foram fundidas antes da análise. Os rastreamentos de gene foram mostrados usando o navegador de genoma UCSC.

Yap ChIP-seq

[00125] Ventrículos foram dissecados em DPBS frio para remover sangue então picados em PBS suplementado com TritonX-100 a 0,1%. Foram então rapidamente homogeneizados com BioGen Pro200 e um gerador de 5 mm. A reticulação foi obtida em formaldeído a 1% em temperatura ambiente por 10 minutos em um rotador e resfriada bruscamente com 150 mM de glicina em temperatura ambiente por 10 minutos. As células foram peletizadas e enxaguadas duas vezes com 0,1% de Triton-PBS. Foram então lisadas por incubação em gelo por 20 minutos em tampão de lise de célula de 5 mL (5 nM Tris pH 8,0,

140 mM NaCl, 1 mM EDTA, glicerol a 10%, NP-40 a 0,5%, TritonX-100 a 0,25%, 0,5% De Igepal CA-630, 50 mM de HEPES, Inibidores de protease De Roche isentos de EDTA completo) e então homogeneizados dounce. Lisados foram peletizados, suspensos novamente em tampão de lise de célula e sonicados. A seguir, os inventores peletizaram células e núcleos a 2 kG por 10 minutos a 4C, seguido por nova suspensão em 600 uL de tampão de lise nuclear (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,3% SDS, inibidores de protease de Roche isentos de EDTA completo) e sonicados. 15 ug de cromatina cisalhada foram usados para ChIP com anticorpo de Flag (Sigma, F1804) ou IgG (Milipore 12-371) e glóbulos magnéticos de Proteína-G (Peirce) a 4C durante a noite em rotador. Glóbulos foram lavados por 5 min. a 4C em rotador, lavadas, desreticuladas e DNA foi purificado. Bibliotecas de sequenciamento foram preparadas usando o Kit de Preparação de biblioteca Kappa (Ion Torrent, KK8301). Bibliotecas YAP5SA-FLAG ChIP-seq sequenciadas no Próton de Ion Torrent foram mapeadas para a montagem de genoma de camundongo mm10 usando alinhador de Torrent suíte Tampa (0.2.3) (Life Technologies). Três réplicas biológicas foram realizadas e somente as leituras exclusivamente mapeadas foram mantidas. Picos foram chamados e anotados com HOMER (FindPeaks e annotatePeaks.pl) a partir do conjunto de dados YAP5SA ChIP-seq combinado. Rastreamentos de gene foram mostrados usando o navegador de genoma UCSC.

EXEMPLO 2

ESTABILIDADE DE YAPK265R

[00126] Os inventores geraram duas linhagens de células P19 (Nº 11 e Nº 13) com mutação de homozigoto Yap K265R (mutação de lisina para arginina nos 265 aminoácidos de Yap). Para verificar a meia-vida do mutante YapK265R, células P19 WT e células P19 foram

semeadas com mutação Yap K265R (Nº 13) em placa de 6 cavidades. No dia seguinte, quando as células atingem ~60% - 70% de confluência, as células foram tratadas com 20 ug/ml de ciclo-hexamida (CHX) por 2, 4 ou 6 horas (células tratadas com DMSO como 0 hora). Após tratamento, células foram lavadas com PBS gelado duas vezes e então colhidas com 100 ul de tampão de lise NP40 a 0,5% (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 0,5% de NP40 e inibidor de protease e inibidor de fosforilação). Lisados de célula foram analisados por western blotting para testar a expressão de Yap, Yap com fosforilação S127 (p-Yap), e β-catenina. Expressão de GAPDH foi usada como o controle interno (figura 15A). CHX pode inibir síntese de proteína, porque sem suplemento de proteína nascente após tratamento, os níveis de proteína de Yap, p-Yap e β-catenina diminuíram por tempo. Em comparação com WT Yap, YapK265R diminuiu mais rápido isso significa que Yap com a mutação K265R é menos estável (figura 15A). p-Yap e β-catenina são também menos estáveis em células P19 mutantes YapK265R (figura 15A). Sem tratamento de CHX, o nível basal de Yap e p-Yap é levemente mais baixo em células P19 mutantes YapK265R em comparação com células P19 WT (figura 1B). De modo interessante, expressão de β-catenina foi aumentada em células P19 com mutação YapK265R (figuras 1A e 1B).

[00127] Esses estudos foram repetidos duas vezes com resultados compatíveis (figura 16 e figura 17) e o resultado estatístico é mostrado na figura 17B. Para testar a taxa de rendimento de proteína de Yap, as células foram tratadas com 20 um/ml de MG132, que é um inibidor de proteassoma; níveis de proteína aumentaram com o tempo devido à inabilidade de degradar. Mais acúmulo de proteína Yap em células P19 mutantes YapK265R indica YapK265R tem uma taxa de rendimento mais alta em comparação com WT Yap; em outras palavras, YapK265R é menos estável do que WT Yap (figuras 18A e

18B). entretanto, a taxa de rendimento de β -catenina ficou inalterada em células mutantes YapK265R (figuras 18A e 18C).

[00128] Yap é um cofator de transcrição que funciona juntamente com parceiros de ligação de DNA em nuclear para regular a expressão de gene. Para testar a localização nuclear de mutante YapK265R, células P19 foram lisadas, e as frações de citossol e nuclear foram colhidas para análise de western blotting. A quantidade de proteína Yap é menor na fração nuclear, porém inalterada na fração de citossol de células mutantes YapK265R, que sugere menos localização nuclear de YapK265R (figura 19). Esse experimento foi realizado duas vezes e com três réplicas totais (figuras 19A e 19B). o resultado estatístico é mostrado nas figuras 19C e 19D.

[00129] Exemplos de anticorpos: Yap (1:1000, Novas Biologicals, NB 110-58358); β -catenina (1:1.000, Santa Cruz, sc-7963); p-Yap (S127) (1:1.000, Sinalização celular, #4911); p-Yap (S381) (1:1.000, Sinalização Celular, #13619); GAPDH (1:3000, Abcam, ab9485); HDAC2 (1:5000, Thermo Scientific, PA1-861).

REFERÊNCIAS

[00130] Todas as patentes, pedidos de patente e publicações citadas aqui são pelas presentes incorporadas por referência na íntegra.

- 1 Bergmann, O. *et al.* Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* **161**, 1566-1575, doi:10.1016/j.cell.2015.05.026 (2015).
- 2 Soompaa, M. H. & Field, L. J. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *The American journal of physiology* **272**, H220-226 (1997).
- 3 Yu, F. X., Zhao, B. & Guan, K. L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **163**, 811-828, doi:10.1016/j.cell.2015.10.044 (2015).
- 4 Heallen, T. *et al.* Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development* **140**, 4683-4690 (2013).
- 5 Morikawa, Y. *et al.* Actin cytoskeletal remodeling with protrusion formation is essential for heart regeneration in Hippo deficient mice. *submitted* (2015).
- 6 Xin, M. *et al.* Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 13839-13844, doi:10.1073/pnas.1313192110 (2013).
- 7 Lin, Z. *et al.* Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circulation research* **115**, 354-363, doi:10.1161/circresaha.115.303632 (2014).
- 8 Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C. Y. & Guan, K. L. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes & development* **24**, 72-85, doi:10.1101/gad.1843810 (2010).
- 9 Sultana, N. *et al.* Optimizing Cardiac Delivery of Modified mRNA. *Mol Ther* **25**, 1306-1315, doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.016 (2017).
- 10 Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N. & Karliner, J. S. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* **115**, 155-162, doi:10.1159/000265166 (2010).

11. Florido, R., Smith, K. L., Cuomo, K. K. & Russell, S. D. Cardiotoxicity From Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2) Targeted Therapies. *J Am Heart Assoc* **6**, doi:10.1161/JAHA.117.006915 (2017).
12. Mathiowitz E1, J. J., Jong YS, Carino GP, Chickering DE, Chaturvedi P, Santos CA, Vijayaraghavan K, Montgomery S, Bassett M, Morrell C. Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. *Nature* **386**, 410-414, doi:10.1038/386410a0 (1997).
13. Hwang SJ1, P. H., Park K. Gastric retentive drug-delivery systems. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **15**, 243-284 (1998).
14. Mitsuko Takenaga*, Y. S., Yasutaka Azechi, Akira Ochiai, Yasuo Kosaka, & Rie Igarashi, Y. M. Microparticle resins as a potential nasal drug delivery system for insulin. *Journal of controlled release* **52**, 81-87 (1996).
15. Sohal, D. S. *et al.* Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circulation research* **89**, 20-25 (2001).
16. Bersell, K. *et al.* Moderate and high amounts of tamoxifen in alphaMHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death. *Disease models & mechanisms* **6**, 1459-1469, doi:10.1242/dmm.010447 (2013).
17. Alkass, K. *et al.* No Evidence for Cardiomyocyte Number Expansion in Preadolescent Mice. *Cell* **163**, 1026-1036, doi:10.1016/j.cell.2015.10.035 (2015).
18. Bersell, K., Arab, S., Harling, B. & Kuhn, B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* **138**, 257-270, doi:10.1016/j.cell.2009.04.060 (2009).
19. Castedo, M. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825-2837, doi:10.1038/sj.onc.1207528 (2004).
20. Baildam, A. D. *et al.* DNA analysis by flow cytometry, response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma of the breast. *British journal of cancer* **55**, 553-559 (1987).
21. Gilsbach, R. *et al.* Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nature communications* **5**, 5288, doi:10.1038/ncomms6288 (2014).
22. Preissl, S. *et al.* Deciphering the Epigenetic Code of Cardiac Myocyte Transcription. *Circulation research* **117**, 413-423, doi:10.1161/circresaha.115.306337 (2015).
23. Guo, X. & Chen, S. Y. Dediator of Cytokinesis 2 in Cell Signaling Regulation and Disease Development. *Journal of cellular physiology*, doi:10.1002/jcp.25512 (2016).
24. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature methods* **10**, 1213-1218, doi:10.1038/nmeth.2688 (2013).
25. Halder, G. & Johnson, R. L. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* **138**, 9-22, doi:10.1242/dev.045500 (2011).
26. Zanconato, F. *et al.* Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nature cell biology* **17**, 1218-1227, doi:10.1038/ncb3216 (2015).
27. Stein, C. *et al.* YAP1 Exerts Its Transcriptional Control via TEAD-Mediated Activation of Enhancers. *PLoS genetics* **11**, e1005465, doi:10.1371/journal.pgen.1005465 (2015).
28. Kalfon, R. *et al.* ATF3 expression in cardiomyocytes preserves homeostasis in the heart and controls peripheral glucose tolerance. *Cardiovascular research* **113**, 134-146, doi:10.1093/cvr/cvw228 (2017).

- 29 Schep, A. N. *et al.* Structured nucleosome fingerprints enable high-resolution mapping of chromatin architecture within regulatory regions. *Genome research* **25**, 1757-1770, doi:10.1101/gr.192294.115 (2015).
- 30 Nord, A. S. *et al.* Rapid and pervasive changes in genome-wide enhancer usage during mammalian development. *Cell* **155**, 1521-1531, doi:10.1016/j.cell.2013.11.033 (2013).
- 31 Galli, G. G. *et al.* YAP Drives Growth by Controlling Transcriptional Pause Release from Dynamic Enhancers. *Molecular cell* **60**, 328-337, doi:10.1016/j.molcel.2015.09.001 (2015).
- 32 Lin, Z. *et al.* Acetylation of VGLL4 Regulates Hippo-YAP Signaling and Postnatal Cardiac Growth. *Developmental cell* **39**, 466-479, doi:10.1016/j.devcel.2016.09.005 (2016).
- 33 Passer, D., van de Vrugt, A., Atmanli, A. & Domian, I. J. Atypical Protein Kinase C-Dependent Polarized Cell Division Is Required for Myocardial Trabeculation. *Cell reports* **14**, 1662-1672, doi:10.1016/j.celrep.2016.01.030 (2016).
- 34 Hofsteen, P., Robitaille, A. M., Chapman, D. P., Moon, R. T. & Murry, C. E. Quantitative proteomics identify DAB2 as a cardiac developmental regulator that inhibits WNT/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 1002-1007, doi:10.1073/pnas.1523930113 (2016).
- 35 Haussmann, G., Banziger, C. & Basler, K. Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 331-336, doi:10.1038/nrm2141 (2007).
- 36 Saarikangas, J. *et al.* Missing-in-metastasis MIM/MTSS1 promotes actin assembly at intercellular junctions and is required for integrity of kidney epithelia. *Journal of cell science* **124**, 1245-1255, doi:10.1242/jcs.082610 (2011).
- 37 Reynolds, J. O. *et al.* Junctophilin-2 gene therapy rescues heart failure by normalizing RyR2-mediated Ca(2+) release. *Int J Cardiol* **225**, 371-380, doi:10.1016/j.ijcard.2016.10.021 (2016).
- 38 Laughner, J. L., Ng, F. S., Salkin, M. S., Arthur, R. M. & Efimov, I. R. Processing and analysis of cardiac optical mapping data obtained with potentiometric dyes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**, H753-765, doi:10.1152/ajpheart.00404.2012 (2012).
- 39 Wang, J. *et al.* Pitx2-microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 9181-9186, doi:10.1073/pnas.1405411111 (2014).
- 40 Vinnakota, K. C. & Bassingthwaite, J. B. Myocardial density and composition: a basis for calculating intracellular metabolite concentrations. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **286**, doi:10.1152/ajpheart.00478.2003 (2004).
- 41 Brüel, A. & Nyengaard, J. R. Design-based stereological estimation of the total number of cardiac myocytes in histological sections. *Basic research in cardiology* **100**, 311-319, doi:10.1007/s00395-005-0524-9 (2005).
- 42 Boos, S. *et al.* Cell type-specific chromatin immunoprecipitation from multicellular complex samples using BiTS-ChIP. *Nature protocols* **7**, 978-994, doi:10.1038/nprot.2012.049 (2012).
- 43 Mo, A. *et al.* Epigenomic Signatures of Neuronal Diversity in the Mammalian Brain. *Neuron* **86**, 1369-1384, doi:10.1016/j.neuron.2015.05.018 (2015).
- 44 Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* **10**, 1-10, doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25 (2009).
- 45 Quinlan, A. R. BEDTools: the Swiss army tool for genome feature analysis. *Current protocols in bioinformatics*, doi:10.1002/0471250953.bi1112s47 (2014).

- 46 Hansen, K. D., Irizarry, R. A. & Wu, Z. Removing technical variability in RNA-seq data
using conditional quantile normalization. *Biostatistics (Oxford, England)* **13**, 204-216,
doi:10.1093/biostatistics/kxr054 (2012).
- 47 Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion
for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* **15**, 550, doi:10.1186/s13059-014-0350-8 (2014).
- 48 Dobin, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)* **29**, 15-21, doi:10.1093/bioinformatics/bts635 (2013).
- 49 Reimand, J., Kull, M., Peterson, H., Hansen, J. & Vilo, J. gProfiler--a web-based toolset
for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic acids research* **35**, 200, doi:10.1093/nar/gkm226 (2007).
- 50 Reimand, J. et al. gProfiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016
update). *Nucleic acids research* **44**, 9, doi:10.1093/nar/gkw199 (2016).

[00131] Embora a presente invenção e suas vantagens tenham sido descritas em detalhe, deve ser entendido que várias alterações, substituições e alterações podem ser feitas aqui sem se afastar do espírito e escopo da invenção como definido pelas reivindicações apensas. Além disso, o escopo do presente pedido não pretende ser limitado às modalidades específicas do processo, máquina, fabricação, composição de matéria, meio, métodos e etapas descritas no relatório descritivo. Como uma pessoa versada na técnica prontamente reconhecerá a partir da descrição da presente invenção, processos, máquinas, fabricação, composições de matéria, meios, métodos ou etapas, atualmente existentes ou a serem desenvolvidos posteriormente que executam substancialmente a mesma função ou obtém substancialmente o mesmo resultado como as modalidades correspondentes descritas aqui podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção. Por conseguinte, as reivindicações apensas pretendem incluir em seu escopo tais processos, máquinas, fabricação, composições de matéria, meios, métodos ou etapas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para regenerar células em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de fornecer ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma variante mutada de Yap.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células que são regeneradas são cardiomiócitos, células retinianas, ou células ciliadas do ouvido.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a variante mutada compreende uma ou mais substituições de aminoácidos em uma serina.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2, ou 3, caracterizado pelo fato de que existem 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou mais substituições de aminoácidos em uma serina.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2, ou 3, caracterizado pelo fato de que existem 1, 2, 3, 4, ou 5 substituições de aminoácidos em serinas que são fosforiladas por cinases Lats.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que uma ou mais substituições de aminoácidos são para uma alanina.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a variante mutada de Yap compreende uma mutação K265R.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem uma condição cardíaca, uma condição retiniana, ou uma condição otológica.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a condição cardíaca no indivíduo faz o indivíduo estar em necessidade de renovação de cardiomiócito.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que o coração do indivíduo tem apoptose, necrose e/ou autofagia de cardiomiócito.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizado pelo fato de que a condição cardíaca é uma condição cardíaca selecionada do grupo consistindo em doença cardíaca, cardiomiopatia, problemas de válvula cardíaca, pericardite, arritmia, parada cardíaca, defeito cardíaco congênito, insuficiência cardíaca, doença cardíaca, cardiotoxicidade, insuficiência cardíaca congestiva, doença cardíaca isquêmica, enfarto agudo do miocárdio, fibrilação atrial, doença arterial coronária, doença cardíaca isquêmica, doença cardíaca valvular, doença cardíaca hipertensa e arritmias.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem distrofia muscular de Duchenne.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a composição é fornecida ao indivíduo mais de uma vez.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a composição é fornecida para o indivíduo sistemicamente.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a composição é fornecida ao indivíduo localmente.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a variante mutada de Yap é exposta a células *in vitro* para produzir células derivada *in vitro*.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16,

caracterizado pelo fato de que uma quantidade eficaz das células derivadas *in vitro* é fornecida ao indivíduo.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 15, caracterizado pelo fato de que ao indivíduo é fornecida uma terapia adicional para uma condição.

19. Método para tratar uma condição médica em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de fornecer ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma variante mutada de Yap.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a variante mutada de Yap compreende uma ou mais substituições de aminoácidos em uma serina.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que há 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou mais substituições de aminoácidos em uma serina.

22. Método, de acordo com a reivindicação 19, 20, ou 21, caracterizado pelo fato de que existem 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácidos em serinas que são fosforiladas por cinases Lats.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 22, caracterizado pelo fato de que existem 5 substituições de aminoácidos em uma serina.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 23, caracterizado pelo fato de que uma ou mais substituições de aminoácidos são para uma alanina.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, caracterizado pelo fato de que a variante mutada de Yap compreende uma mutação K265R.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 25, caracterizado pelo fato de que a condição médica é uma condição cardíaca.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a condição cardíaca no indivíduo faz o indivíduo estar em necessidade de renovação de cardiomiócitos.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 27, caracterizado pelo fato de que o coração do indivíduo tem apoptose, necrose e/ou autofagia de cardiomiócito.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 28, caracterizado pelo fato de que a condição médica é uma condição cardíaca selecionada do grupo consistindo em doença cardíaca, cardiomiopatia, problemas de válvula cardíaca, pericardite, arritmia, parada cardíaca, defeito cardíaco congênito, insuficiência cardíaca, doença cardíaca, cardiotoxicidade, insuficiência cardíaca congestiva, doença cardíaca isquêmica, infarto agudo do miocárdio, fibrilação atrial, doença arterial coronária, doença cardíaca isquêmica, doença cardíaca valvular, doença cardíaca hipertensiva e arritmias.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 29, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem distrofia muscular de Duchenne.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 30, caracterizado pelo fato de que a composição é fornecida ao indivíduo mais de uma vez.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 31, caracterizado pelo fato de que a composição é fornecida ao indivíduo sistemicamente.

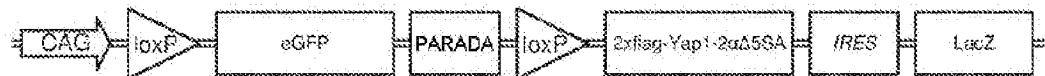
33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 32, caracterizado pelo fato de que a composição é fornecida ao indivíduo localmente.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 33, caracterizado pelo fato de que a variante

mutada de Yap é exposta a células *in vitro* para produzir células derivadas *in vitro*.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que uma quantidade eficaz das células derivadas *in vitro* é fornecida ao indivíduo.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 35, caracterizado pelo fato de que ao indivíduo é fornecida uma terapia adicional para a condição médica.



1 MDPGQQPPPQPAPOGQGQPPSQPPQQGPPSGPGQPAPAATQAAPQAPPAGHOIVHVRGD
 61 SETDLEALFNAVMNPKTANVPQTVPMLRLKLPDSFFKPPPEPKSHSRQASSTDAGTAGALTP
 121 CHVRAHSSPASLQLQAVSPGTLTPTGVVSGPAATPTAQLRQSSFEIPDDVPLPAQWEMA
 181 KTSSGQRYFLNIHDQTTWQDPRKAMLSQMNVTAPTSPPVQQNMMNSASGPLPDGWEQAM
 241 TCDGEIYYINHKKNRTTSWLDPPRLDPRFAMNQRISQASPVKOPPPLAPOSPOQGGVMCGSNS
 301 NQQQQMRLQQQLQMEKERLRKQELLRQELALRSQQLPTLEQDGGTQNPNVSSPGMSQELRT
 361 MTTNNSDPFLNSGTYHSRDESTDSGLSMSSYSVPRTPDDFLNSVDEMDTGTINOSTLPS
 421 QQNRFPDYLEAIPGTNVDLGTLEGDGNNIEGEELMPSLQEALSSDIILNDMESVLAATKLD
 481 KESFLTWL.

Motivo de Fosforilação por Lats: HXRXXS

FIG. 1A

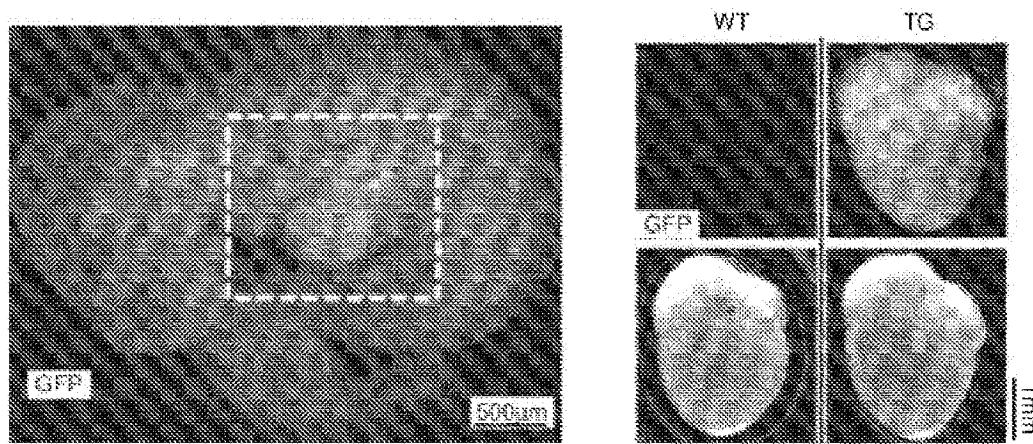


FIG. 1B

FIG. 1C

TG/WT ~PN49 tamoxifeno uma vez ao dia, quatro dias

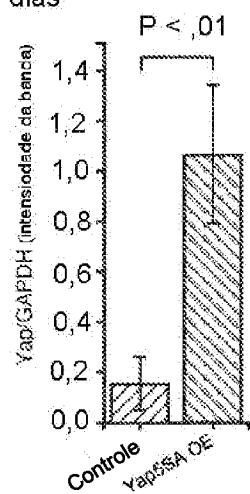
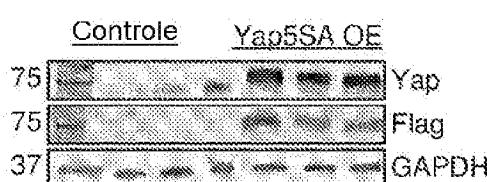
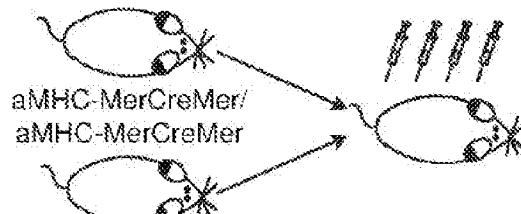


FIG. 1D

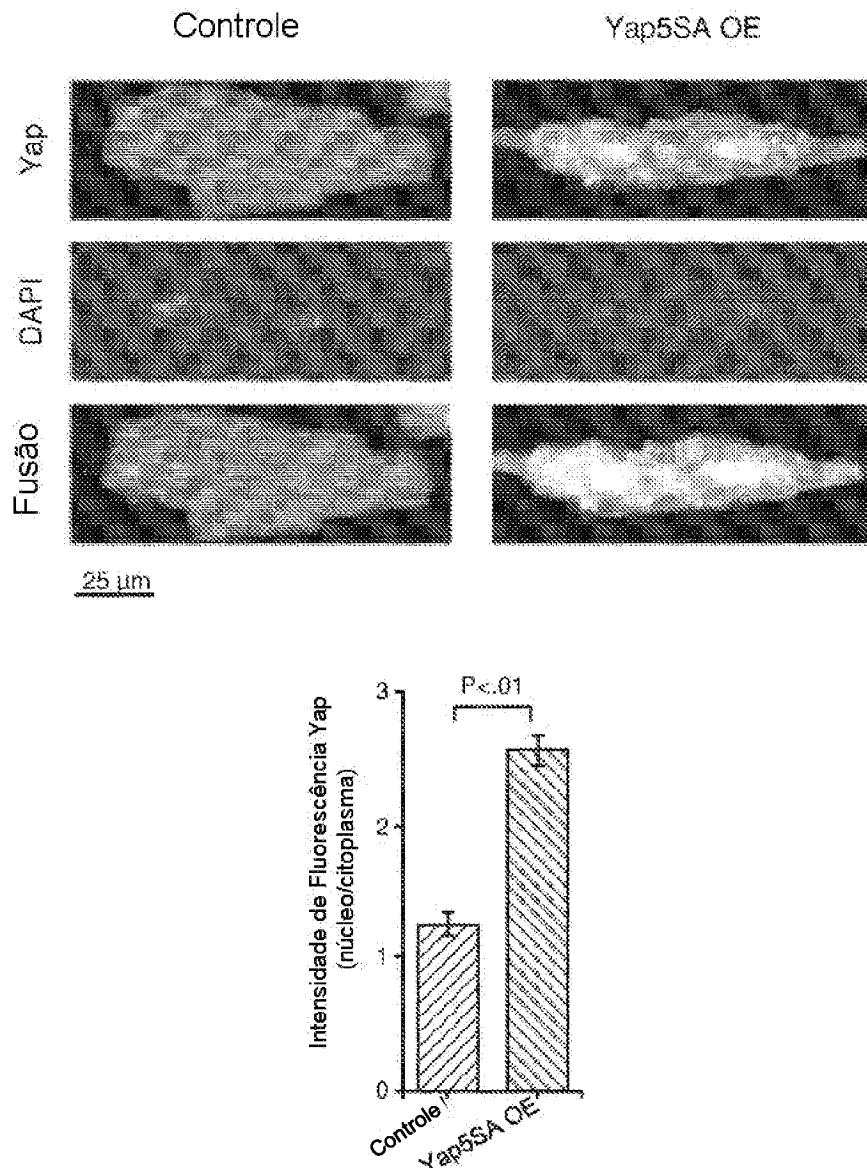


FIG. 1E

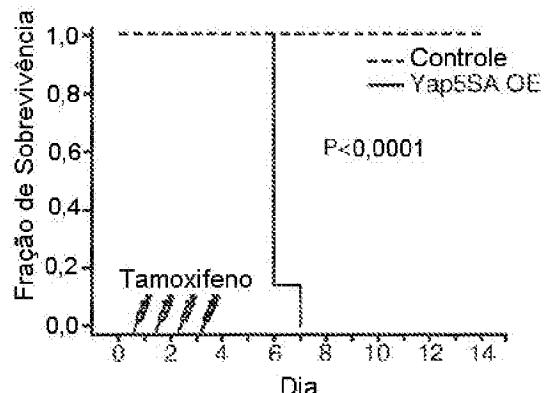


FIG. 2A

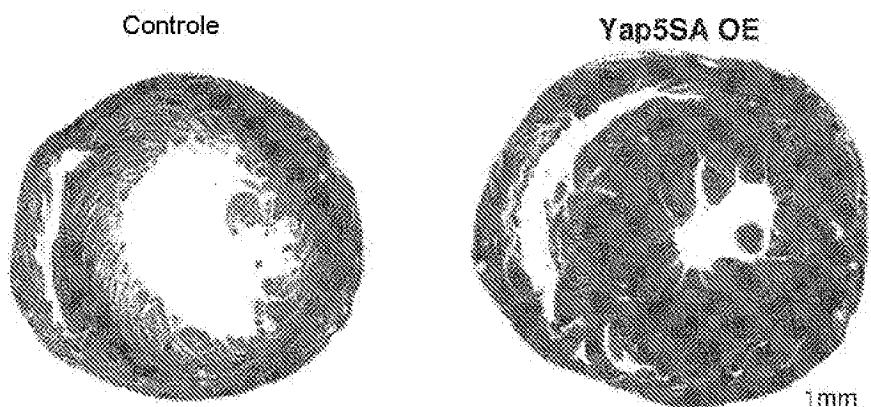


FIG. 2B

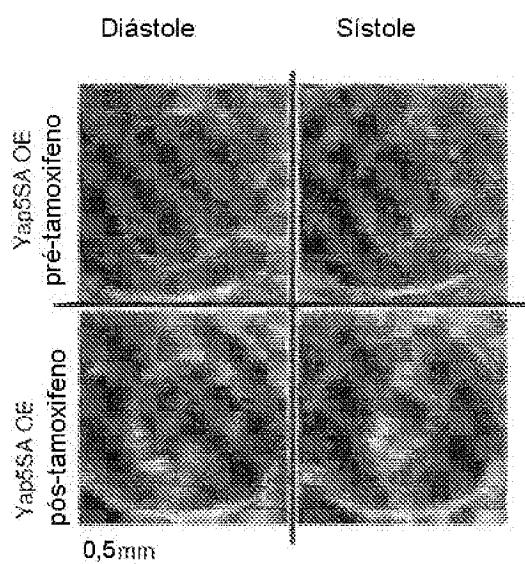


FIG. 2C

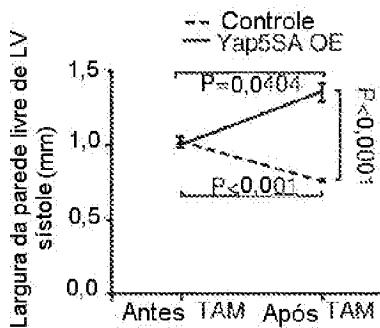


FIG. 2D

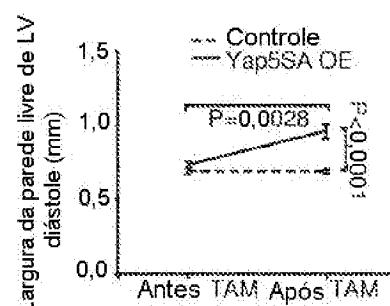


FIG. 2E

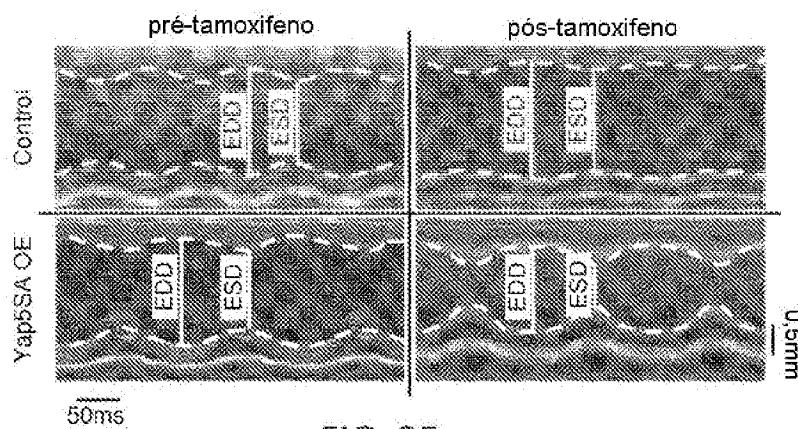


FIG. 2F

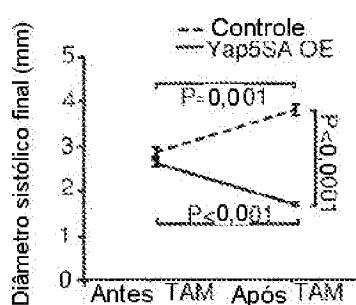


FIG. 2G

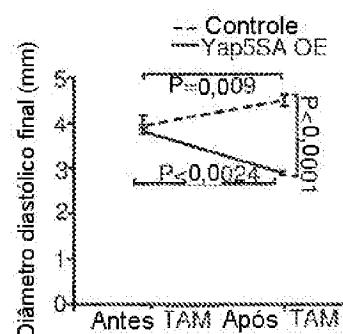


FIG. 2H

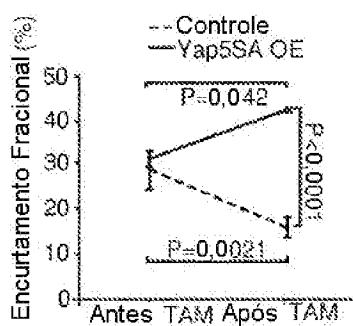


FIG. 2I

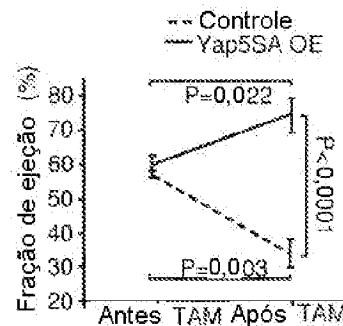
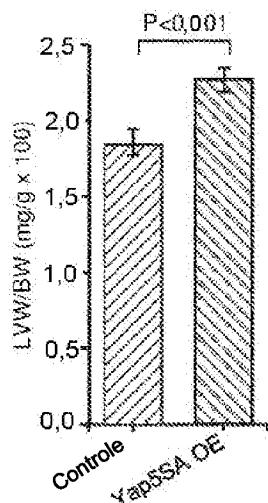
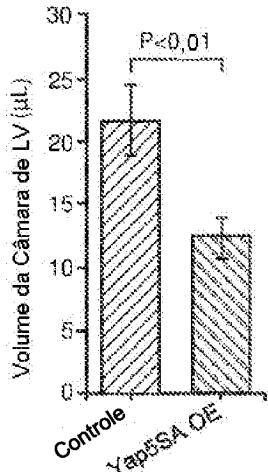
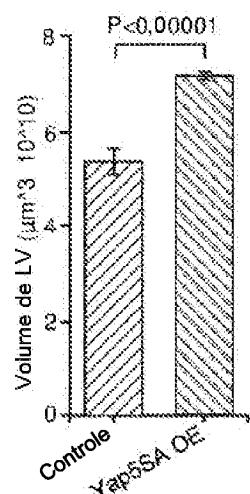
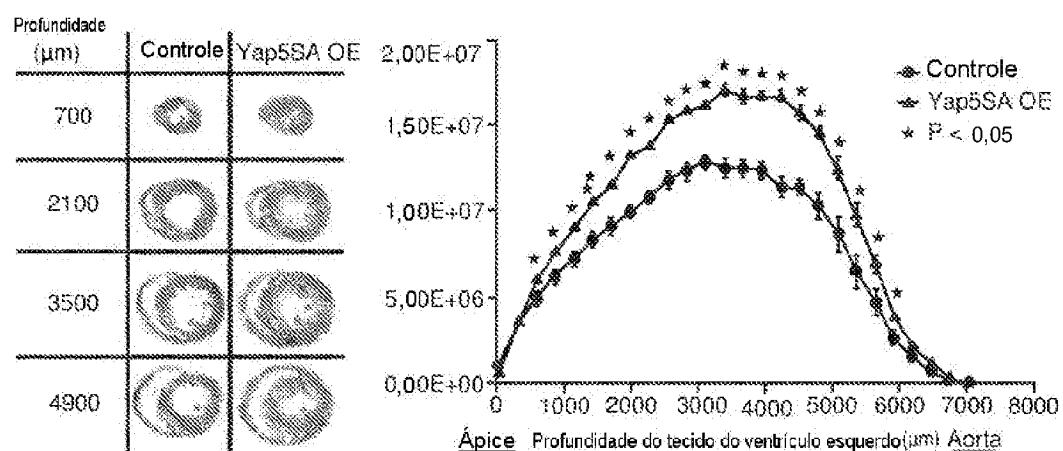
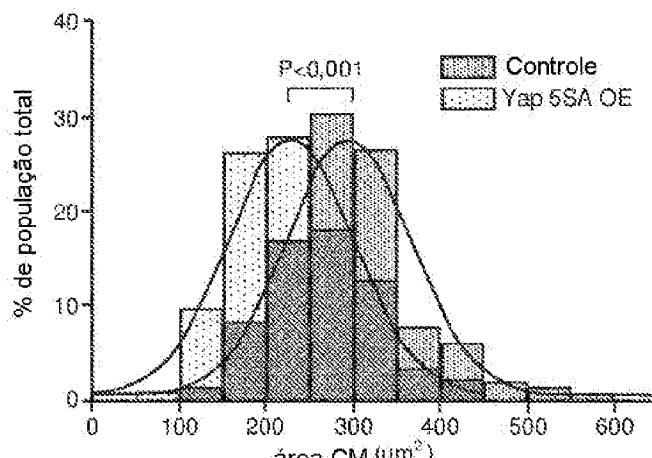


FIG. 2J



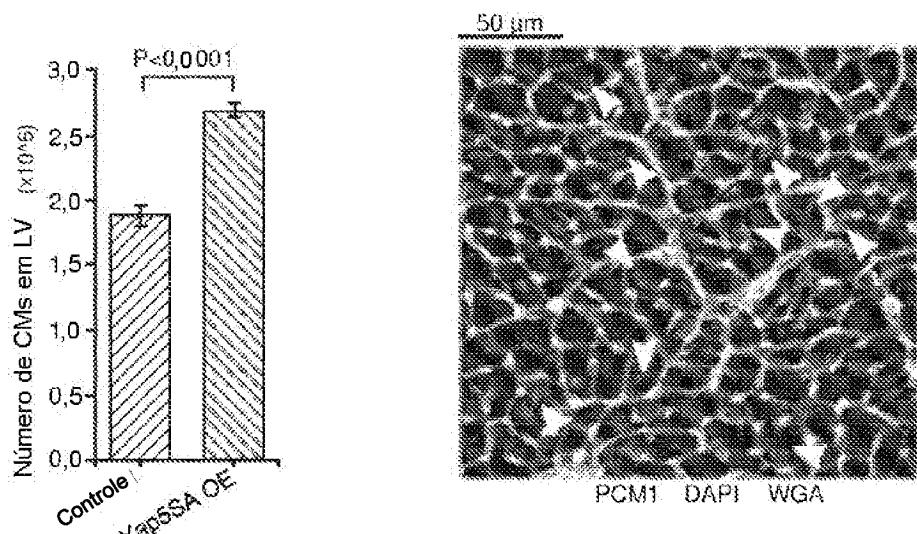


FIG. 3F

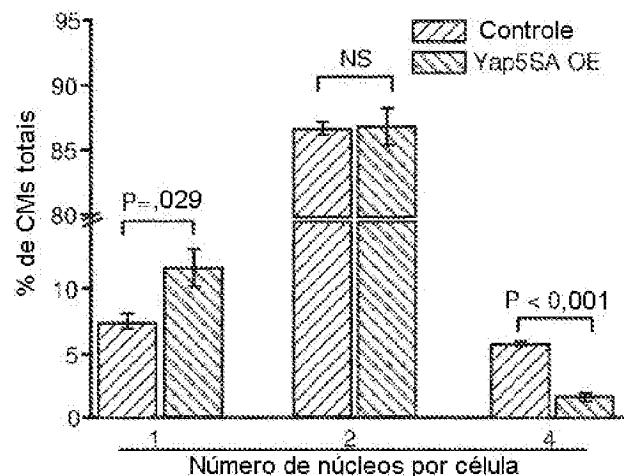
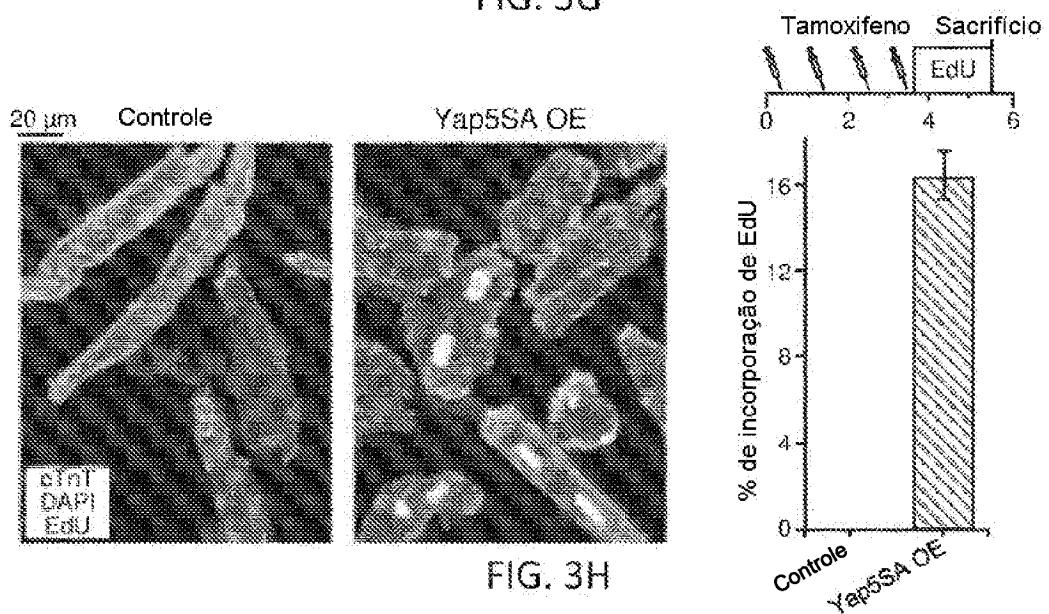


FIG. 3G



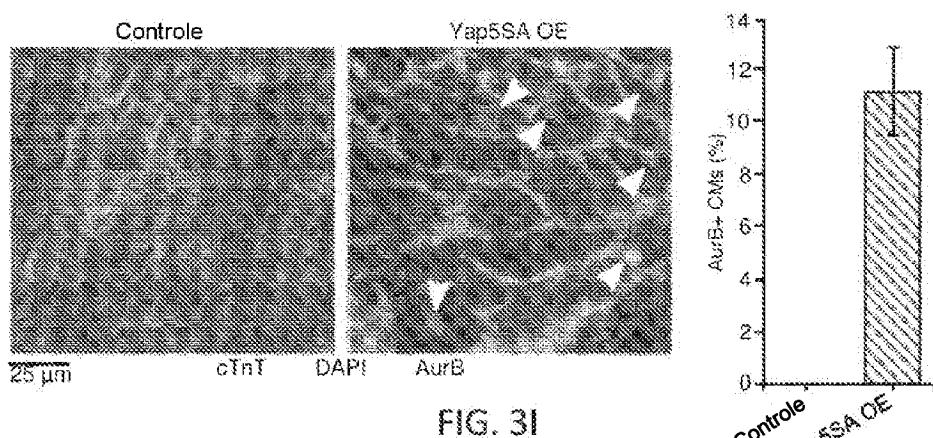


FIG. 3I

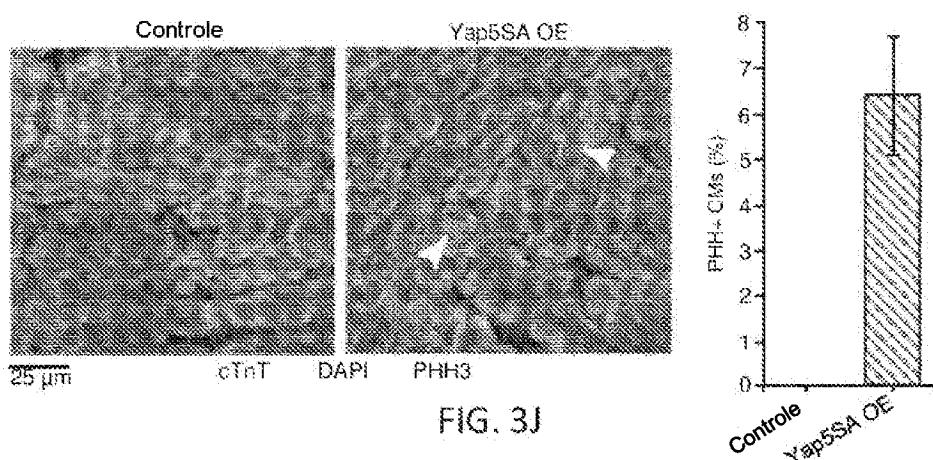


FIG. 3J

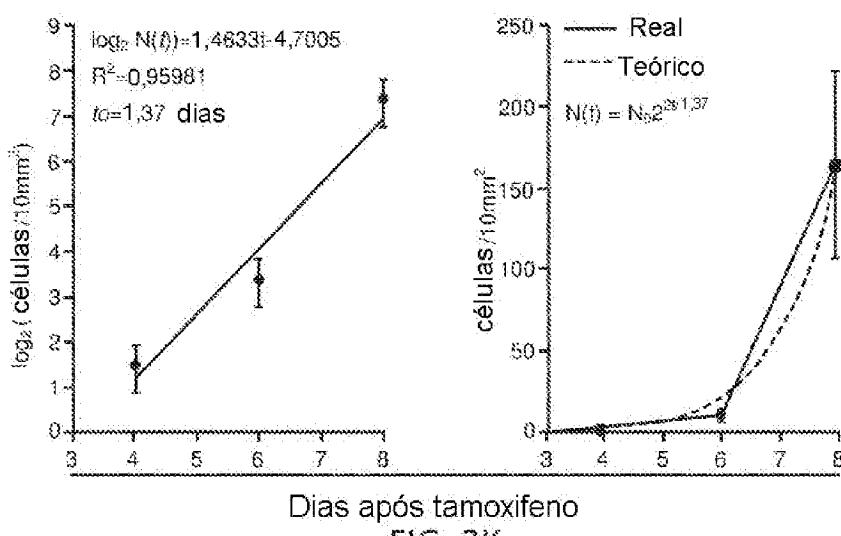


FIG. 3K

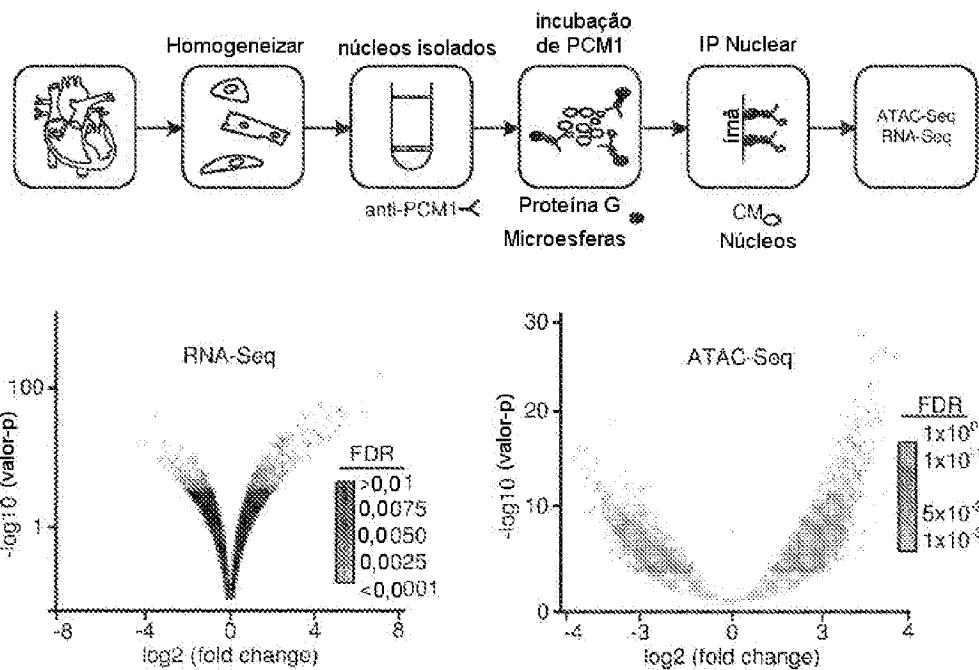


FIG. 4A

Fator	Motivo	valor-P
TEAD4	CTCGGATTC	1e-2763
TEAD	CTCGGATTC	1e-2017
TEAD2	CTCGGATTC	1e-1475
Fra1	CTCTGATCCT	1e-769
At83	CTCTGATCCT	1e-756

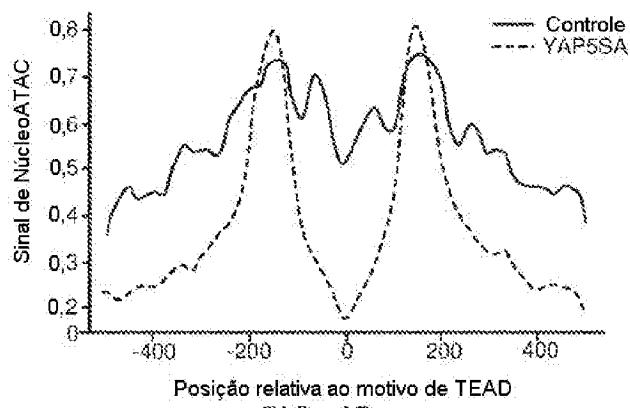


FIG. 4B

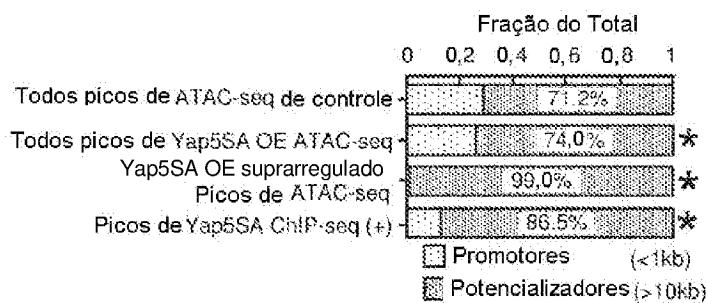


FIG. 4C

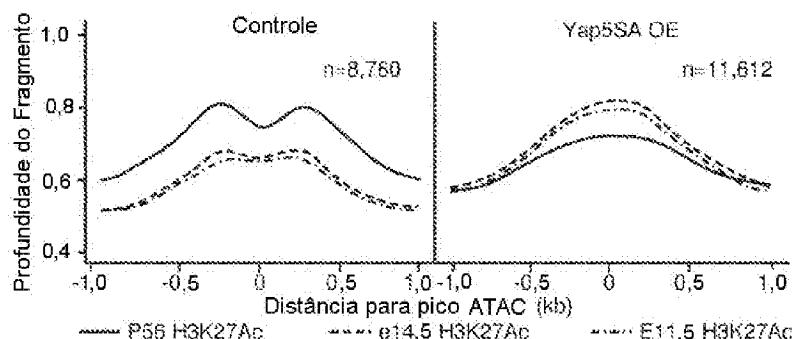
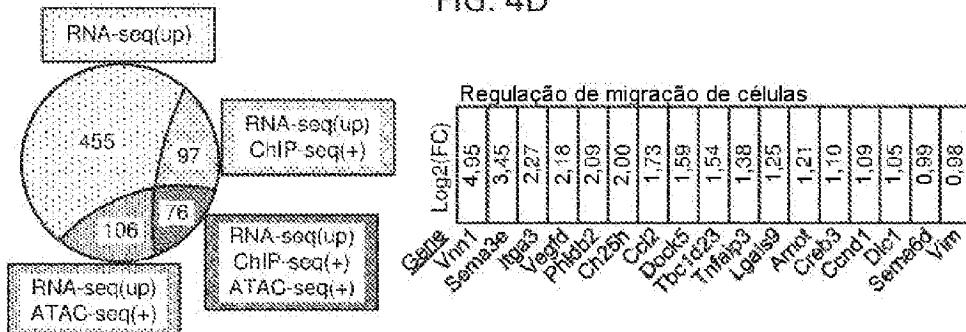


FIG. 4D



Morfogênese celular envolvida na diferenciação

Gene	Log2(FC)	Mitogenese Celular envolvida na diferenciação
Cdk4	4.70	
Cnnm2	4.15	
Ccbp1	3.55	
Carf1	3.10	
Pat3	2.77	
Arhgap16	2.39	
Negb	2.20	
Epib413	2.13	
Kif6	1.94	
Sidt1	1.90	
Mef1	1.88	
Alcam	1.88	
Blim1	1.80	
SIC1aa3	1.78	
Pabpn1	1.62	
Fats3	1.61	
S100a10	1.52	
Fmn1	1.51	
Snaph9n	1.48	
Dabp2	1.44	
Rora	1.34	
Cited2	1.20	
Ptcf1	1.19	
Aseap1	1.17	
Lata2	1.14	
Acodin1	1.10	
Tbx18	1.07	
Zeb2	1.04	
Snn2	1.03	

Ciclo celular mitótico

FIG. 4E

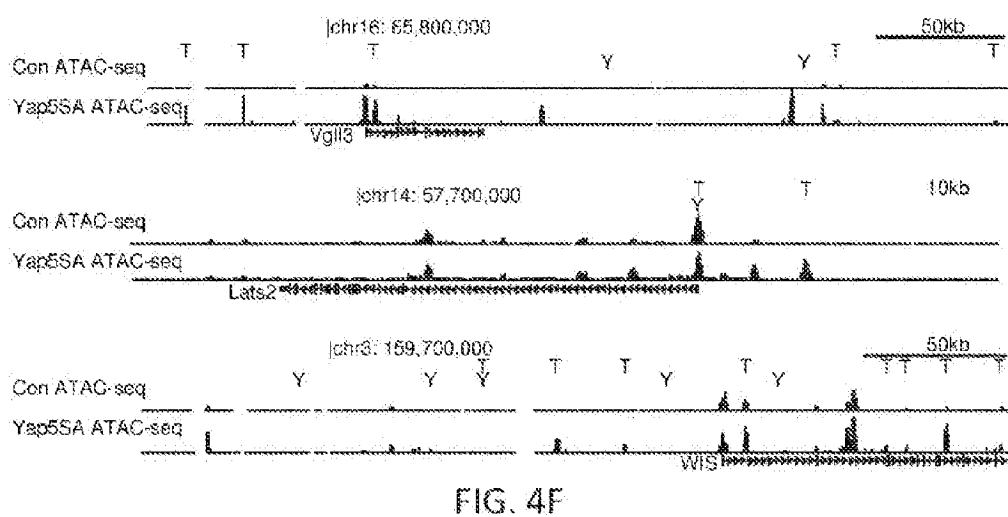


FIG. 4F

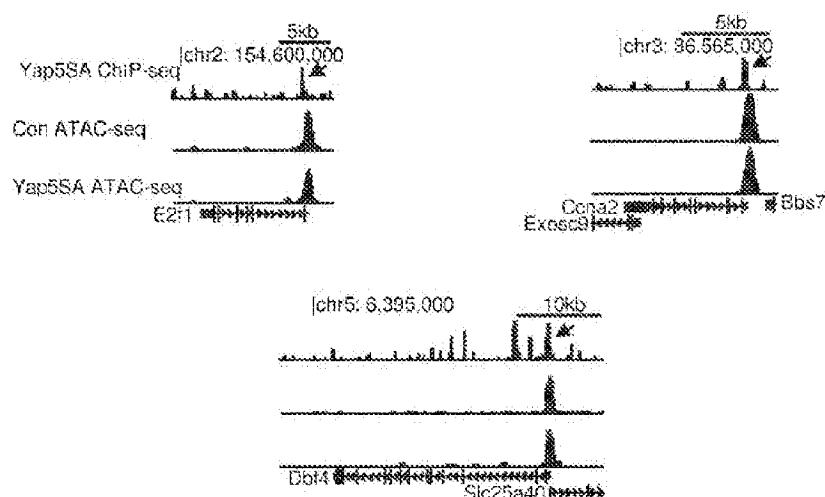


FIG. 4G

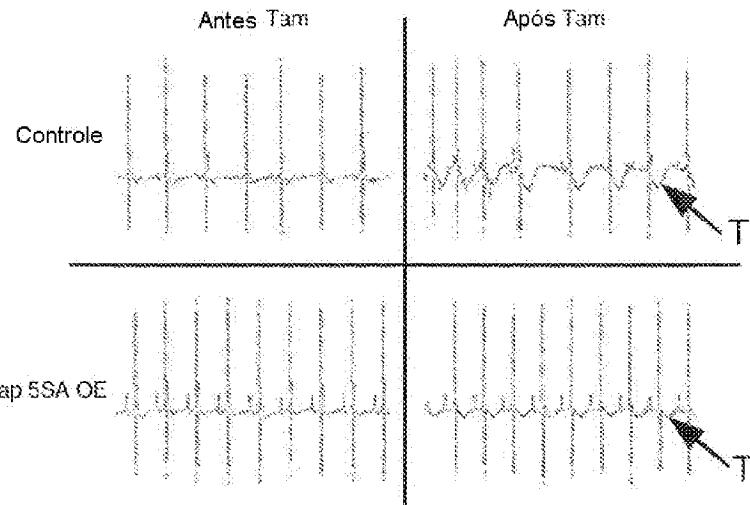


FIG. 5A

	Controle	Yap5SA OE
Pré-tamoxifeno	0/3	0/4
Pós-tamoxifeno	3/3*	0/4

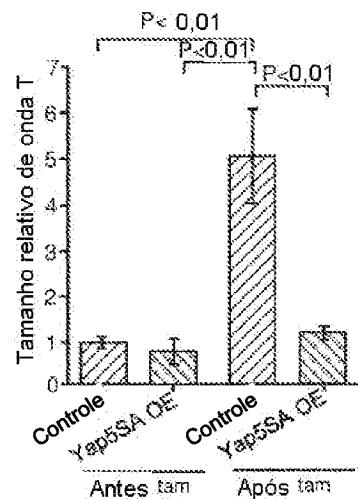


FIG. 5B

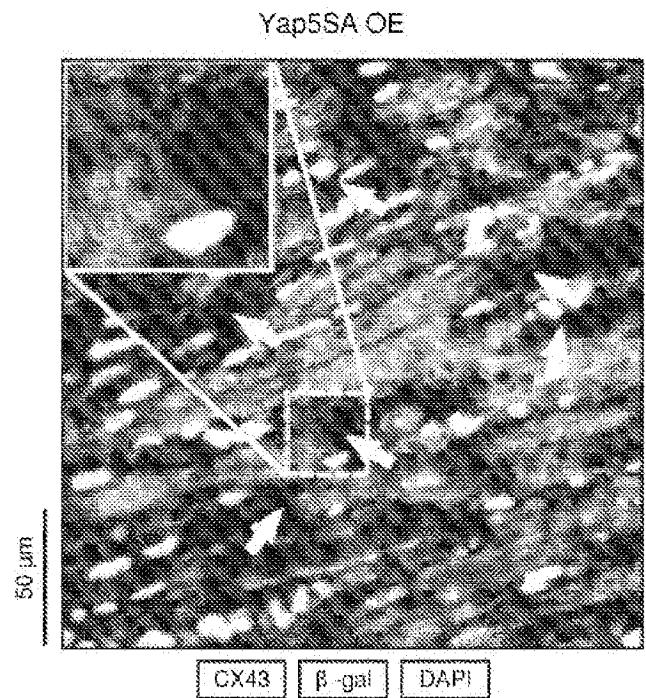


FIG. 5C

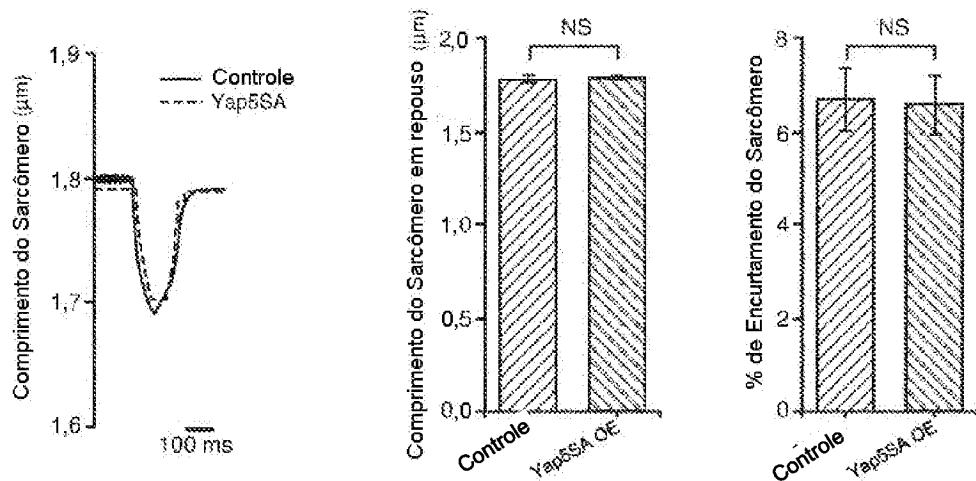


FIG. 5D

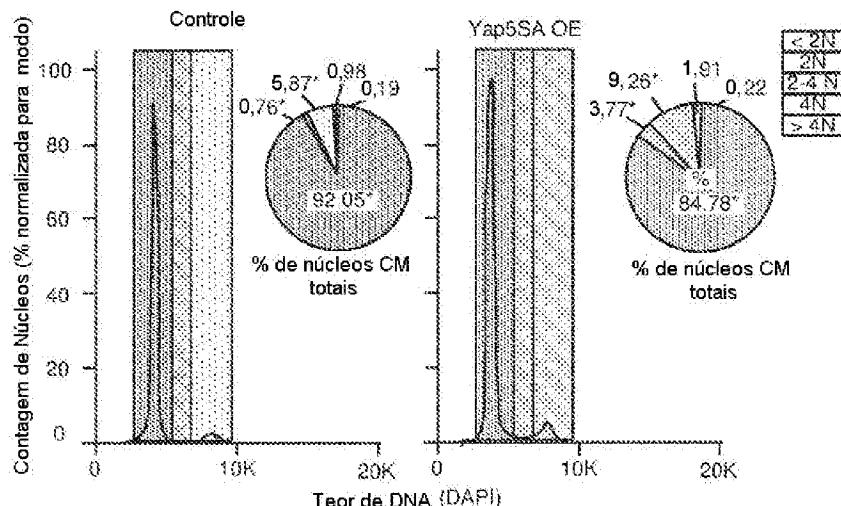


FIG. 6A

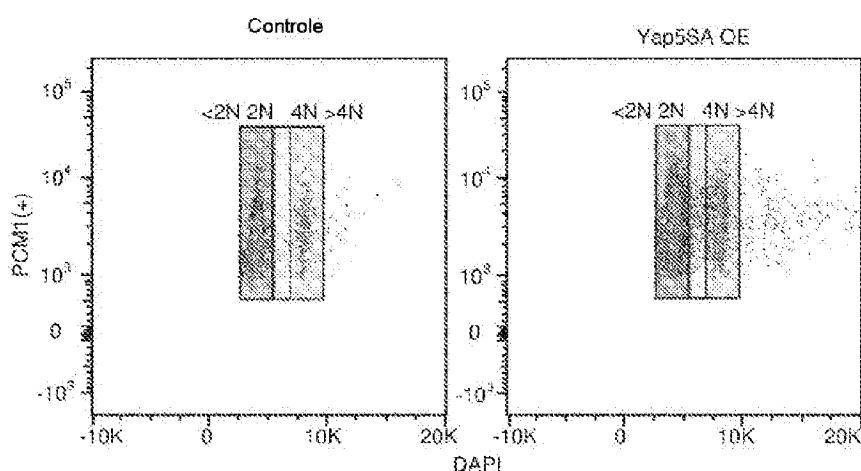


FIG. 6B

	% núcleos <2N	+%	% núcleos 2N	+%	% núcleos 2-4N	+%	% núcleos 4N	+%	% núcleos >4N	+%
Controle	0,18	0,01	92,95	0,24	0,76	0,38	5,87	0,04	0,98	0,66
Yap5SA OE	0,22	0,70	84,78	0,46	3,77	0,31	9,26	0,96	1,81	0,62
P	0,63		0,001		0,008		0,005		0,11	

FIG. 6C

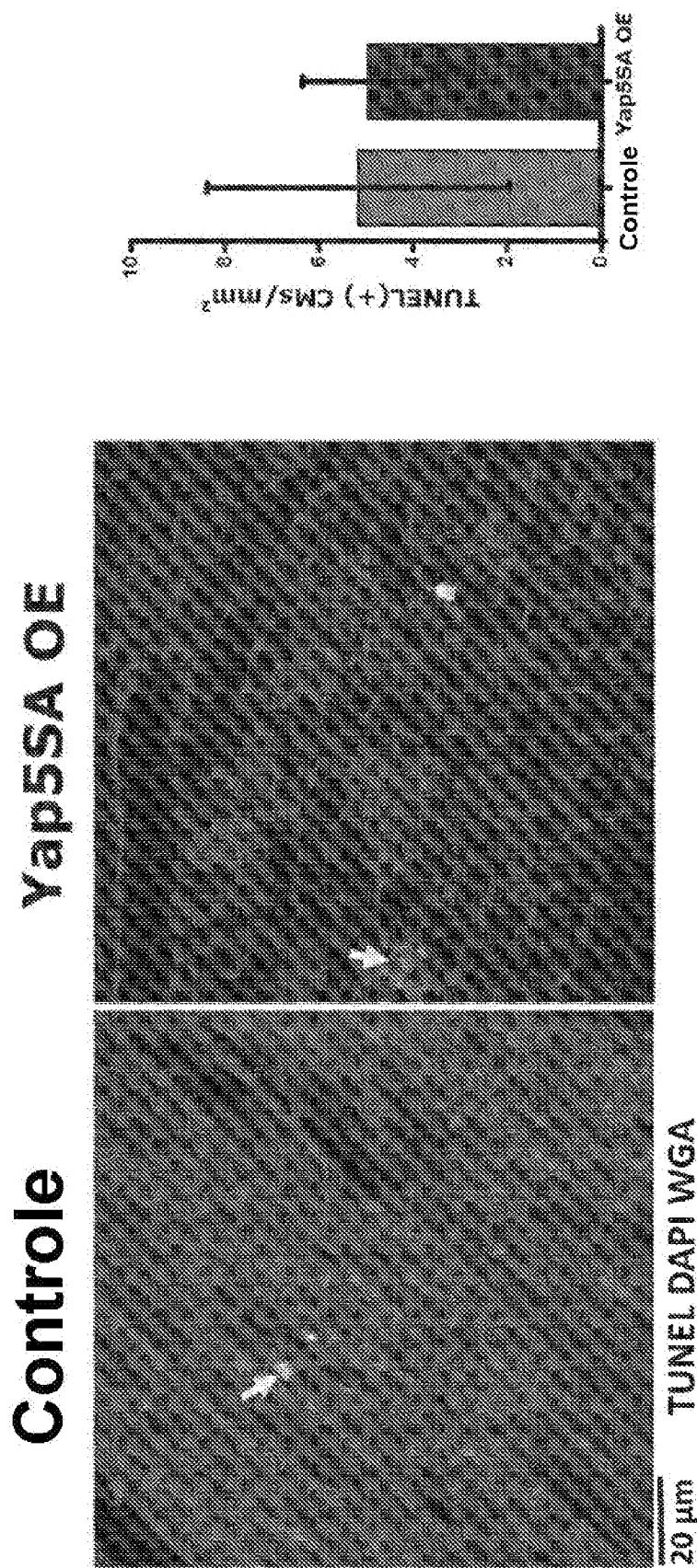


FIG. 7

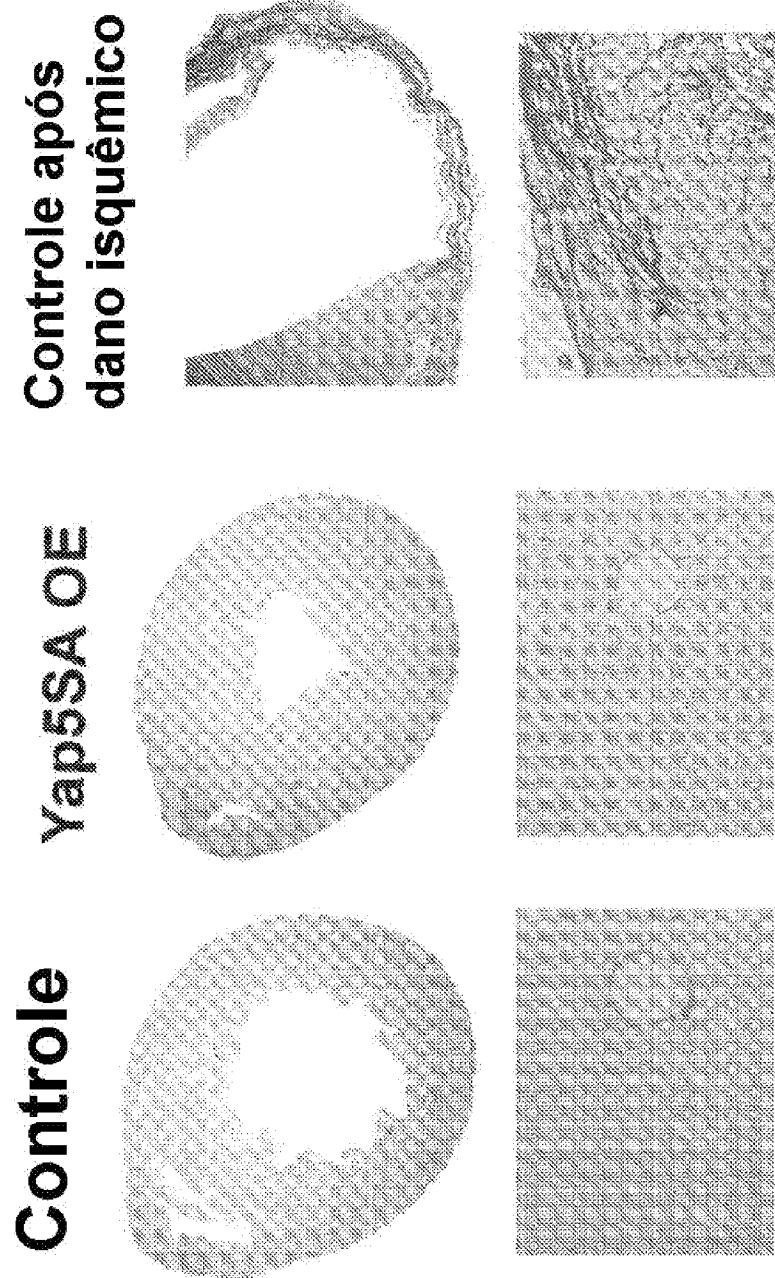


FIG. 8

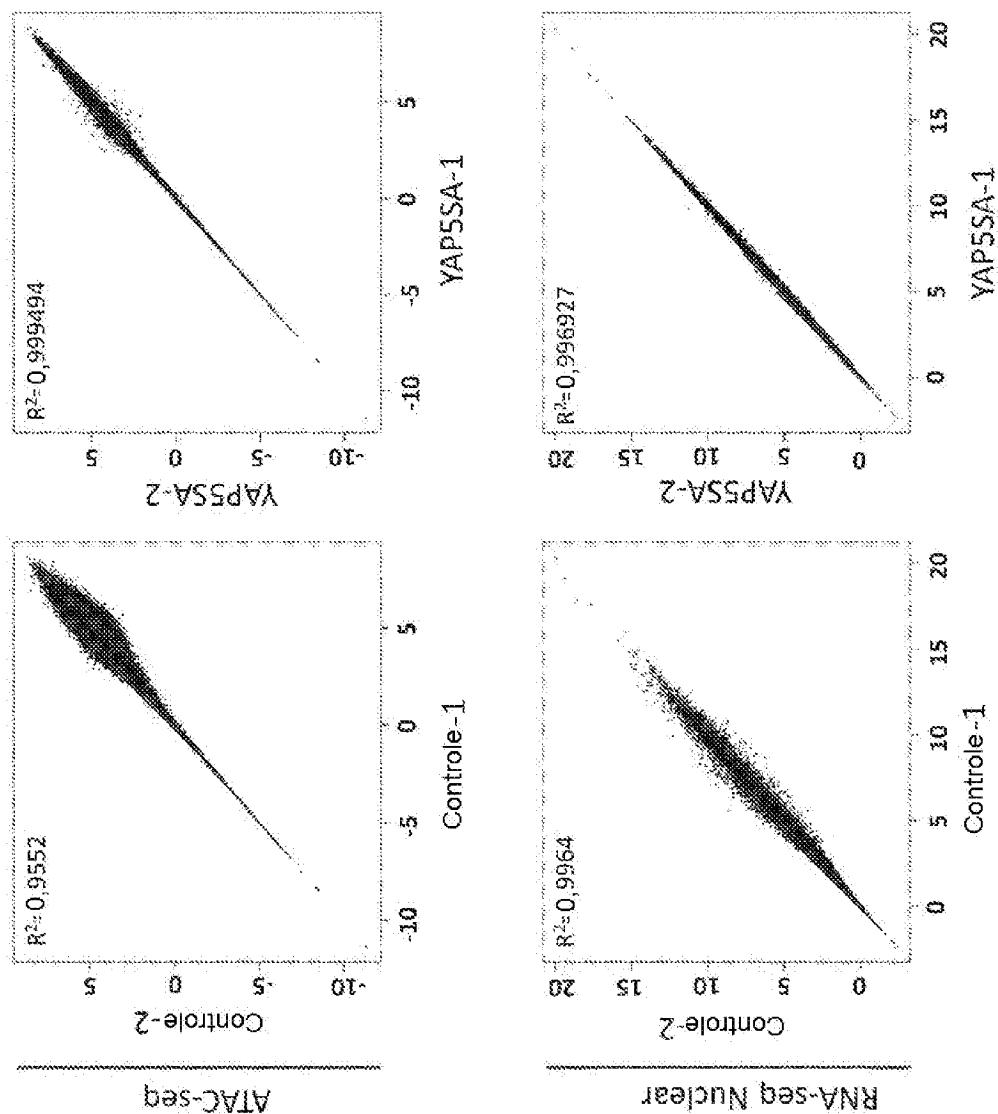


FIG. 9

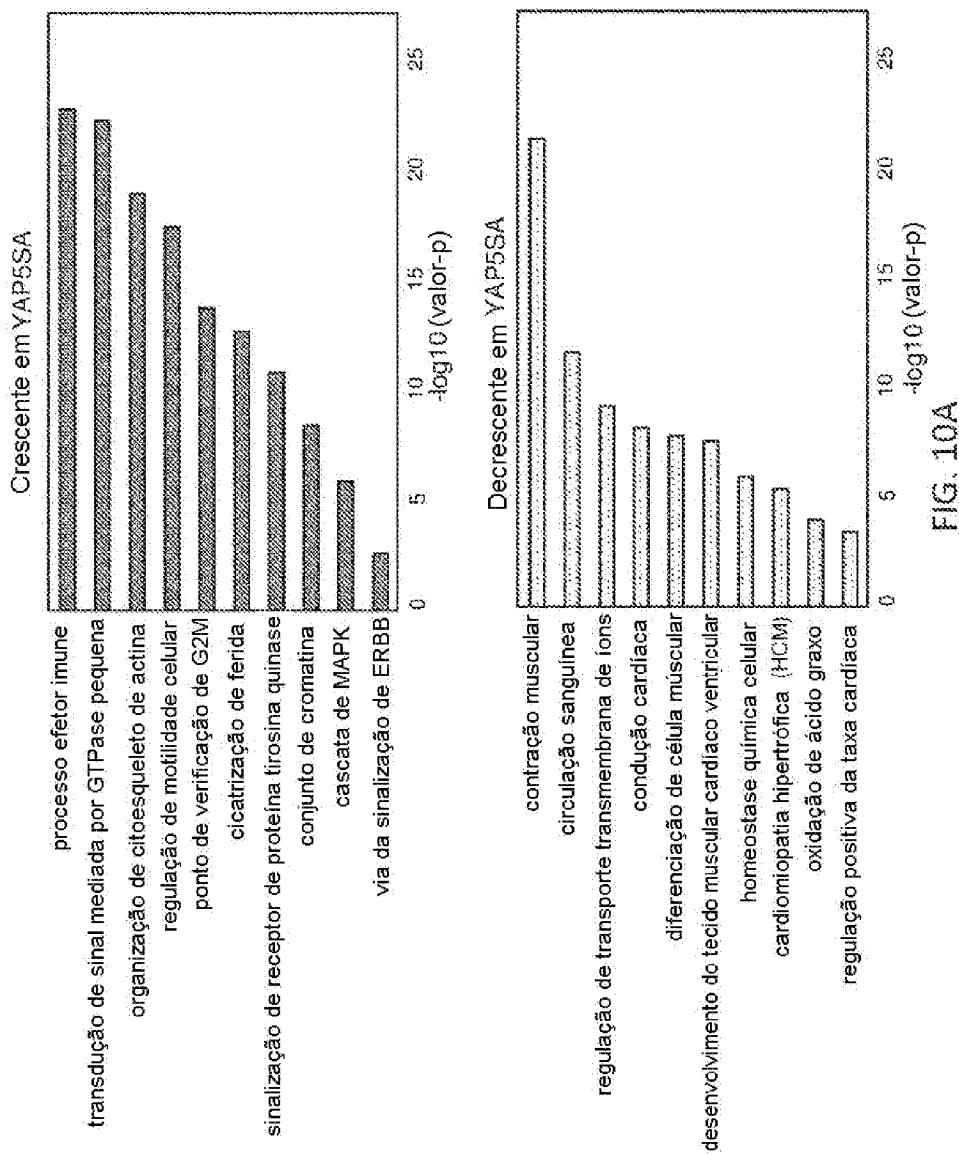


FIG. 10A

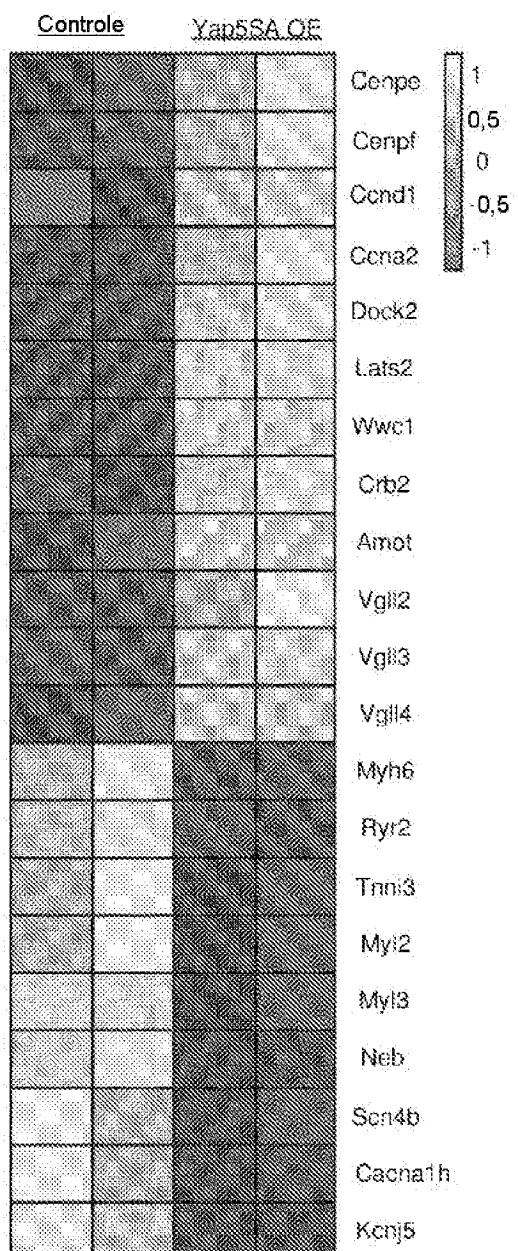


FIG. 10B

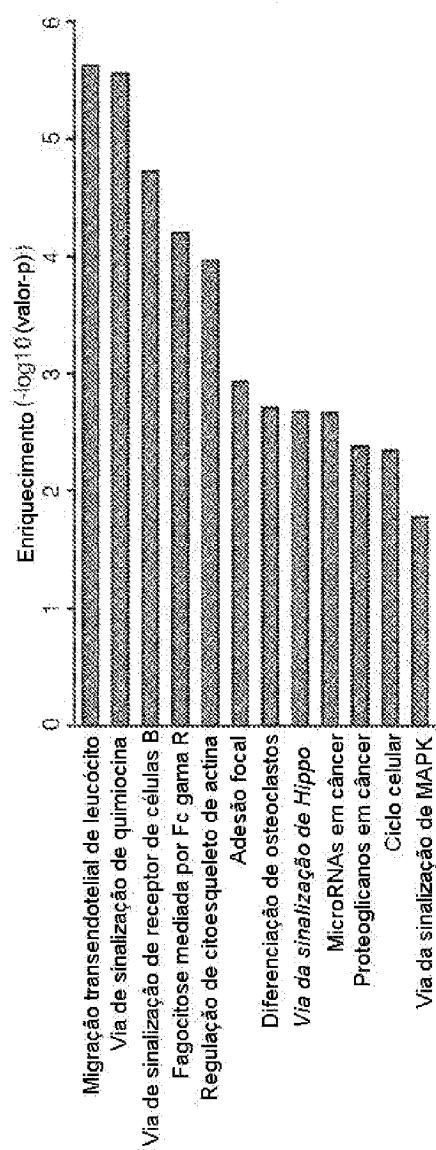


FIG. 11A

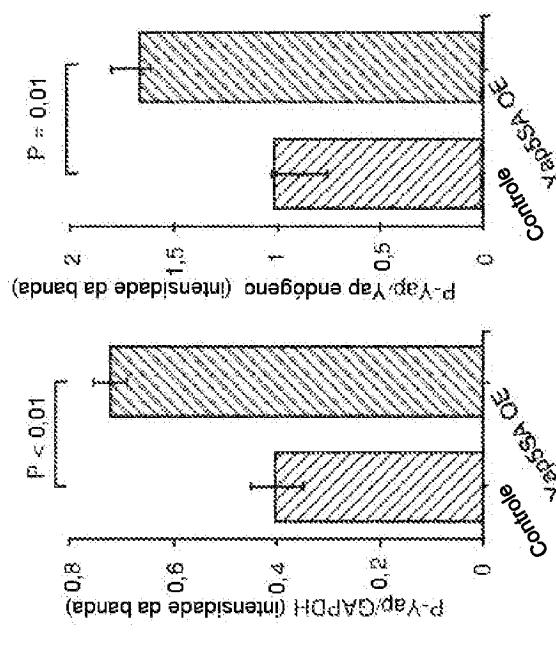
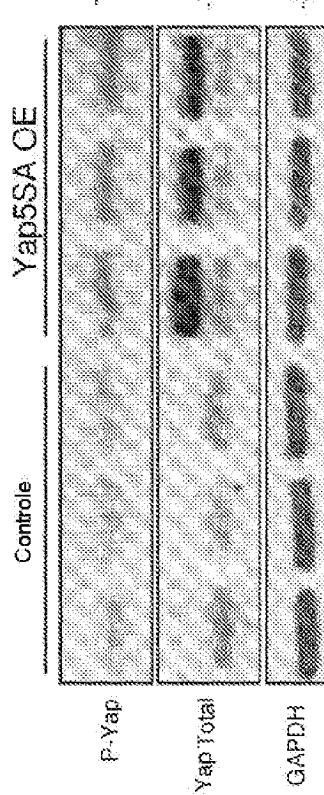


FIG. 11B



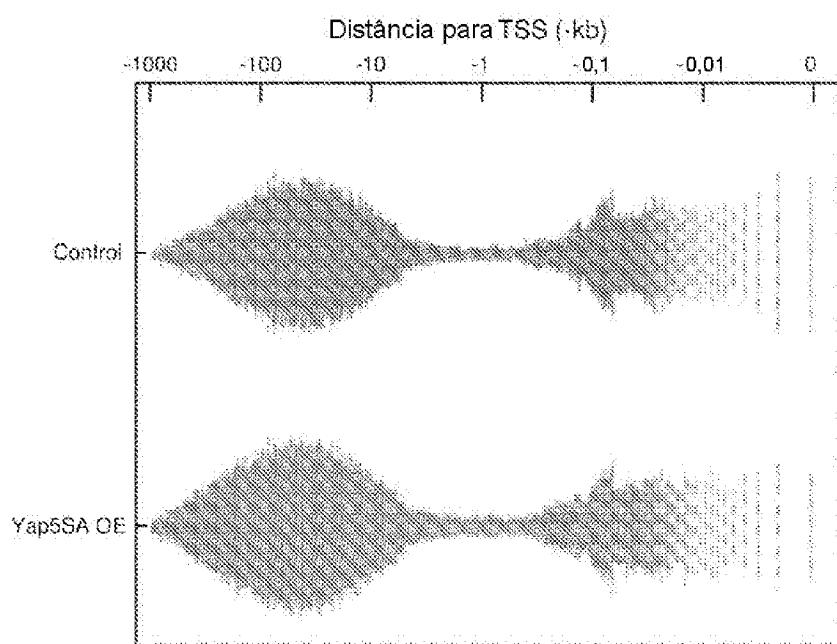


FIG. 12A

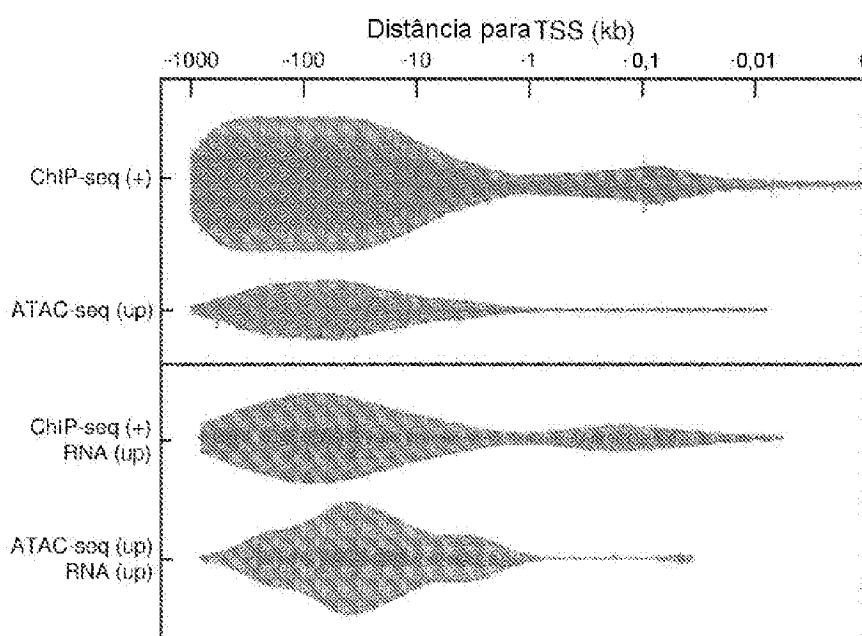


FIG. 12B

RNA-seq (up), ChIP-seq (+), ATAC-seq (sem mudança)

log2(FC)	Gene	log2(FC)	P ajustado	Gene	log2(FC)	P ajustado
9.09	Adamts5	2.43	8.98E-19	Cbf4	1.20	1.29E-03
-10.00	Tmem97	2.68	1.28E-15	Sufl	1.05	1.38E-03
	Actn1	1.75	2.68E-12	Pacsin3	0.97	1.73E-03
	Usp31	1.68	9.68E-09	Il17a	1.33	1.90E-03
	2310022B06	1.75	3.28E-08	Msxco1	0.98	1.97E-03
	Wsb1	1.58	3.80E-06	Mitans	1.90	2.07E-03
	Alba	1.61	3.81E-06	Vvas	1.47	2.11E-03
	Gta3	2.09	3.80E-06	Hes1	1.08	2.71E-03
	Psak1	1.43	4.49E-06	Mhast1	1.00	2.83E-03
	G180a7a	3.05	2.69E-07	Spy2	1.03	2.86E-03
	Ptk2z	2.28	3.88E-07	Spy3	1.08	3.24E-03
	Fog1	1.77	1.26E-06	Zfd3	1.28	3.02E-03
	Kcnth2	1.77	1.64E-06	Namda8	1.40	3.13E-03
	Hist1h4f	1.88	1.95E-06	Parojo	1.03	3.25E-03
	Rst	2.19	3.30E-06	Esr1	1.10	3.34E-03
	Adore1	1.55	3.69E-06	Cape	1.18	3.68E-03
	Efemp1	1.78	7.17E-08	Lacc1	1.33	3.80E-03
	PIK3cb	1.82	1.18E-06	Fam106a	1.33	4.36E-03
	Lvr	1.23	1.20E-06	Sptm3	0.98	4.37E-03
	Plkd2	1.92	1.81E-05	Inoscp	1.11	4.52E-03
	Mt4e7	1.98	1.73E-06	Vnt2a	1.18	4.63E-03
	Cpxk	1.44	2.87E-05	Atic	1.03	4.71E-03
	Dock8	1.33	2.82E-06	Apf1	1.10	4.78E-03
	Rise2	1.48	5.08E-05	Kvns1	1.28	4.78E-03
	Ckap40	1.30	8.15E-07	Hoxb	1.07	4.79E-03
	Chn1	1.35	2.76E-06	Itmnp6	1.38	4.80E-03
	Basp1	1.81	1.34E-04	Ambyz	1.77	5.07E-03
	Rnbp3	1.12	1.45E-04	S107a2	1.13	5.11E-03
	Phd3	2.16	1.48E-04	Itm44	1.07	5.38E-03
	Nhlrc1	1.68	1.76E-04	Prk1	1.22	5.68E-03
	Dab1	1.19	1.76E-04	Map4k3	0.91	5.69E-03
	Ppp1rla	1.15	1.77E-04	E2f1	1.30	5.69E-03
	Nel1	1.09	2.35E-04	Ebp31	1.14	5.70E-03
	Hk3	1.62	2.49E-04	Prsn2	1.38	5.78E-03
	Absc4	1.37	2.52E-04	Eme2k	0.66	5.31E-03
	Rgma	1.17	2.88E-04	1500014G10	1.14	5.97E-03
	Prep	1.15	5.08E-04	Ousq10	1.38	6.98E-03
	Rnp2	1.13	4.30E-04	Closed1	0.91	7.24E-03
	Mk67	1.23	5.28E-04	Pdab1	1.07	7.27E-03
	Atg8b4	1.47	5.58E-04	Pdab2b	1.05	7.79E-03
	E22	1.87	5.59E-04	Rap1b	0.68	8.12E-03
	Cd53	1.27	6.75E-04	Fsp	1.35	8.25E-03
	Ect2	1.27	6.79E-04	Tsc2	1.02	8.62E-03
	Myofg	1.25	6.98E-04	Rup210	1.33	9.70E-03
	Endod1	1.15	7.66E-04			
	Rock2	0.95	9.05E-04			
	Cd28	2.18	9.73E-04			
	Rps2ka5	1.28	9.93E-04			
	Cntf2	1.37	1.05E-03			
	Cnn2	1.28	1.06E-03			
	I33	1.29	1.08E-03			
	Atp12a3	1.09	1.28E-03			
	Rps2ka1	1.23	1.54E-03			

FIG. 13A.1

RNA-seq (up), ChIP-seq (-), ATAC-seq (+)

log2(FC) _{RNA}	Gene	log2(FC) _{ChIP}	padj	Gene	log2(FC) _{ATAC}	padj
0.02	Pde6b2	4.21	3.48E-57	Prsf1	1.76	8.91E-05
10.30	Serphn2bp1	8.16	1.20E-49	Inslrp3	1.38	1.17E-05
	Tofl1	8.14	1.73E-44	Knp118	1.28	1.23E-04
	Ctnnb2	5.24	1.25E-43	Slc41a3	1.43	1.34E-04
	Flimpd1	5.80	4.08E-32	Ces47nsa2	1.15	1.42E-04
	Tofl1a	4.26	4.19E-28	Cacu13	1.16	1.57E-04
	Slc24a3	3.84	3.72E-24	Trpmo	1.14	1.68E-04
	Vnn1	4.98	6.58E-23	Lgals9	1.25	2.38E-04
	KK7	3.85	9.37E-22	Cachals	1.18	2.47E-04
	Cspc4	3.82	4.23E-21	Slc21a3	1.19	3.98E-04
	Spct3	3.27	5.98E-19	Mirna8	1.60	3.48E-04
	Fmn23	2.48	1.88E-18	Adm10519	1.04	8.21E-04
	Abhd9tc	2.37	3.28E-18	Shed1	1.15	8.48E-04
	Ocov164	2.46	6.09E-17	Utmn41	1.08	5.23E-04
	Tshz3	2.38	6.58E-17	Mir289	1.15	5.93E-04
	Mirn64	2.73	4.31E-16	U7000374G	1.37	6.79E-04
	Sema3e	3.89	1.26E-15	Bsse	1.21	8.24E-04
	Amotl2	1.92	3.29E-15	Utmn41	1.08	1.19E-03
	Rim1	2.86	8.03E-14	Mir282	1.20	1.22E-03
	Flnkng2	2.05	3.50E-13	Mir3584	1.10	1.38E-03
	Gchd8	2.87	2.22E-12	Snx39	1.53	1.58E-03
	Nckap1	2.47	7.72E-10	Utmn1	0.89	1.71E-03
	Map6	2.35	3.82E-10	Utmn1	1.10	1.81E-03
	Abm1	2.17	3.81E-09	Cbpn2	1.10	1.98E-03
	Ubc1833	1.84	4.78E-08	Utmn1	1.04	3.08E-03
	Uocns5	1.99	7.30E-08	Mir286	1.49	2.16E-03
	Utmn37	2.76	2.97E-08	Utmpe	1.21	2.21E-03
	Prx	2.18	1.09E-07	Sema6d	0.99	2.42E-03
	Exoc5	1.59	1.93E-07	Snaph	1.03	2.47E-03
	Cdk42293	1.62	3.23E-07	Uts	0.80	2.77E-03
	ERK2	2.49	9.38E-07	Utmn261	1.07	2.90E-03
	Mirn62	1.85	1.11E-06	Mir23	1.10	3.02E-03
	G3p4	1.92	1.18E-06	Utmn301	1.21	3.21E-03
	Utmn31	1.47	1.21E-06	Amotl	1.21	3.26E-03
	Utm2	2.89	1.30E-06	Utmn2	1.11	3.38E-03
	Serphn2bp1	1.91	1.20E-06	Cbpn18	1.00	3.68E-03
	Stom1	1.29	1.58E-06	Mirn1	1.09	3.77E-03
	Tos3	1.30	1.64E-06	Utmn72a	1.76	3.79E-03
	Ct42	1.73	2.38E-06	Actn3	1.94	3.80E-03
	Mcp	1.85	3.66E-06	Utmn2	1.17	3.83E-03
	Ubc783	1.81	6.63E-06	Utmn1	1.26	4.34E-03
	Abma	1.31	6.67E-06	Cbpn18	1.41	4.79E-03
	Can4341	2.81	6.34E-06	Utmn134b	0.67	6.07E-03
	Phnx2	2.09	7.42E-06	A330015K0	1.81	6.36E-03
	Prdx2	1.42	7.69E-06	Vim	0.96	6.49E-03
	Prnd3	1.38	8.10E-06	Utmn14	1.00	6.80E-03
	Ngf11	1.57	8.68E-06	Utmn11	1.47	6.98E-03
	Adamts10	1.61	1.21E-06	Utg1	1.05	7.16E-03
	Vgr4	1.38	2.70E-06	A4467500	1.71	7.20E-03
	Serph20	1.21	3.15E-06	Mir2018	1.04	7.63E-03
	Asp4	2.13	4.64E-06	Mir23	1.08	7.82E-03
	Ch33h	2.00	7.04E-06	Cond1	1.09	8.45E-03
	Gart	1.23	8.60E-06	Utmn1	1.71	8.82E-03

FIG. 13A.2

RNA-seq (up), ChIP-seq (-), ATAC-seq (+)

log2(FC)S	Gene	log2(FC)	padj	Gene	log2(FC)	padj
0.00	Cemip	7.03	3.24E-158	Snap91	1.44	1.71E-03
10.00	Cat4a3	4.70	1.49E-54	Bdnf	1.80	2.13E-03
	Col4a4	3.68	1.47E-54	Negl	2.20	2.43E-03
	Cebn	3.50	1.38E-57	C1gat1	0.98	2.80E-03
	Wif1	4.60	8.50E-36	Cedc7l1	1.06	2.84E-03
	Cebn	3.10	3.88E-27	Seristin2s	0.92	2.79E-03
	Aring18	3.89	1.57E-21	Rbms3	0.85	3.15E-03
	Khsj63a	2.82	1.84E-19	Zfpv3	0.01	3.31E-03
	Ctnnd2	4.18	3.27E-18	Mess1	1.13	3.32E-03
	I23r	4.39	1.98E-17	Fndc1	0.97	3.61E-03
	Itgb2	2.57	1.07E-16	Cmbs3	1.08	4.00E-03
	Plecksh7	2.40	9.18E-16	Prickle1	1.21	4.05E-03
	Ctbp2	4.14	5.85E-15	Smx2	1.00	4.13E-03
	Ging12	2.17	1.07E-13	Vapah1	2.08	4.57E-03
	Arhge126	2.38	1.07E-13	Pkd1	2.06	4.57E-03
	Otx2	1.85	6.71E-11	Sptac1	0.85	7.16E-03
	Adcy8	2.60	1.08E-08	Ttk18	1.07	7.34E-03
	E464113	2.13	1.87E-08	Aprrha	1.16	7.34E-03
	Pak3	2.77	2.24E-08	Ckbld2	0.83	7.48E-03
	Vgl3	1.78	3.08E-08	Ankrd41	0.98	7.56E-03
	Pgrmc2	1.68	6.33E-08	Vgr2	1.89	8.08E-03
	Dmbz	1.44	1.00E-07	Fat3	1.81	9.34E-03
	Sle1a3	1.78	1.80E-07	Pvt1	1.19	9.05E-03
	1180002N15	2.45	3.37E-07			
	Fam178a	1.43	3.38E-07			
	Nav3	1.51	3.68E-07			
	Msr1	1.88	3.89E-07			
	Cxcr3	1.58	5.64E-07			
	Pnks1	1.52	1.06E-06			
	Altarn	1.88	2.26E-06			
	Ptchd4	2.72	3.18E-06			
	Htral	1.75	3.55E-06			
	Fmn1	1.48	3.88E-06			
	Foxsd4s	1.68	6.35E-06			
	Inhbd10	1.40	1.28E-05			
	Pipri	1.62	1.30E-05			
	Cane2	1.70	1.87E-05			
	Asap1	1.17	4.38E-05			
	Lats2	1.14	5.11E-05			
	Cdk1	1.90	5.48E-05			
	Arnt2	2.10	1.08E-04			
	Snx7	1.30	1.68E-04			
	Exocet6	1.13	3.14E-04			
	Peppa	1.28	5.30E-04			
	Abcb6	1.68	5.44E-04			
	S100a10	1.51	5.49E-04			
	Cited2	1.20	5.88E-04			
	Mme	1.68	6.91E-04			
	Igas1	1.34	6.24E-04			
	Wif1	1.10	9.09E-04			
	Kif5	1.94	1.24E-03			
	Zeb2	1.84	1.58E-03			
	Scc24	1.54	1.69E-03			

FIG. 13A.3

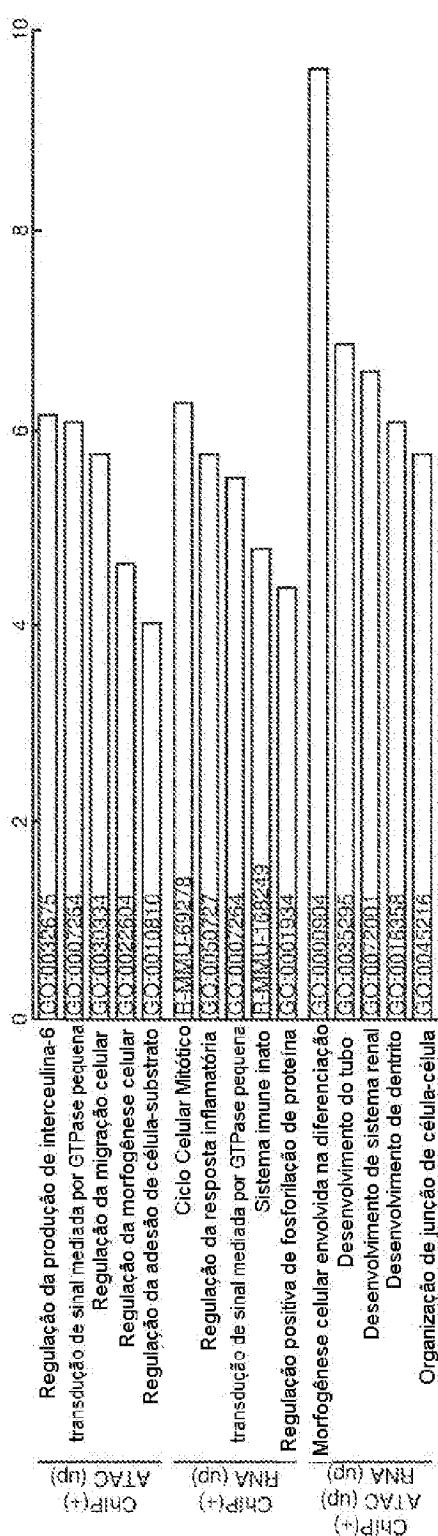


FIG. 13B

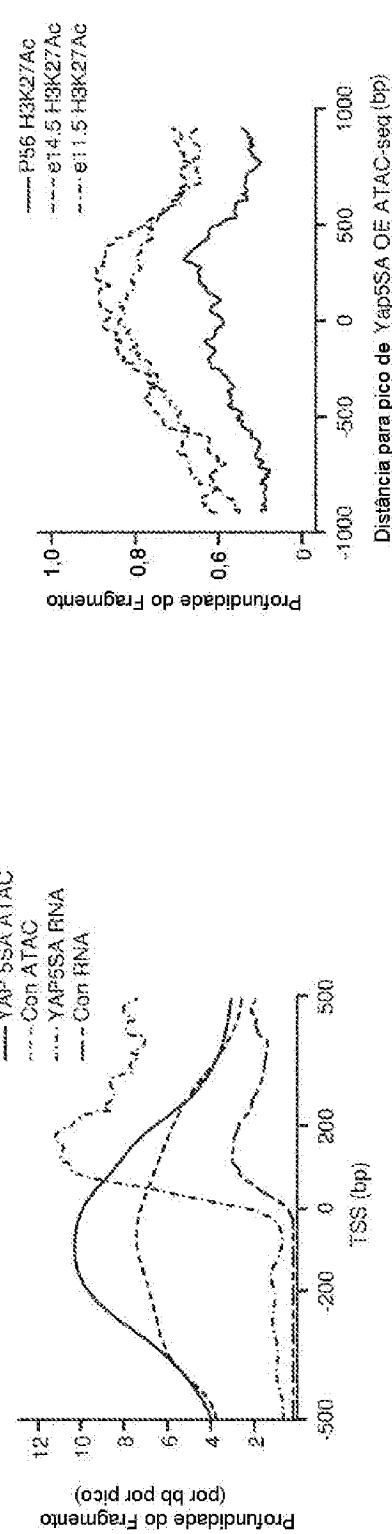
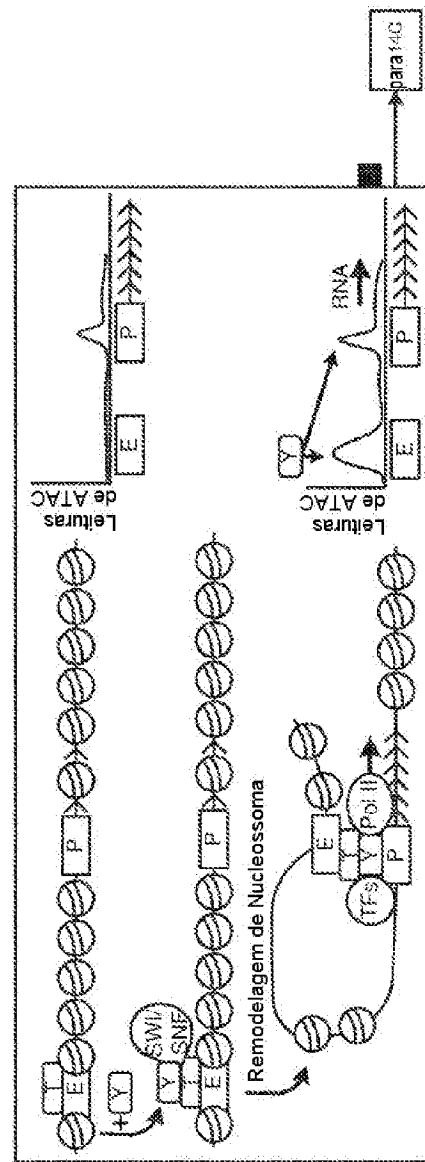
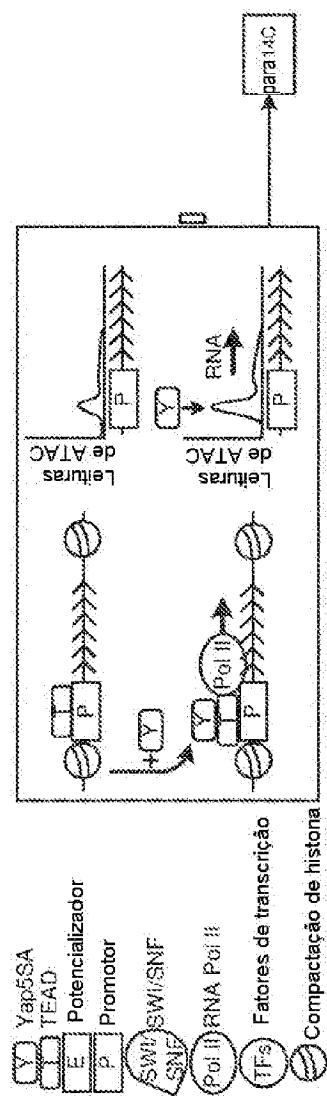
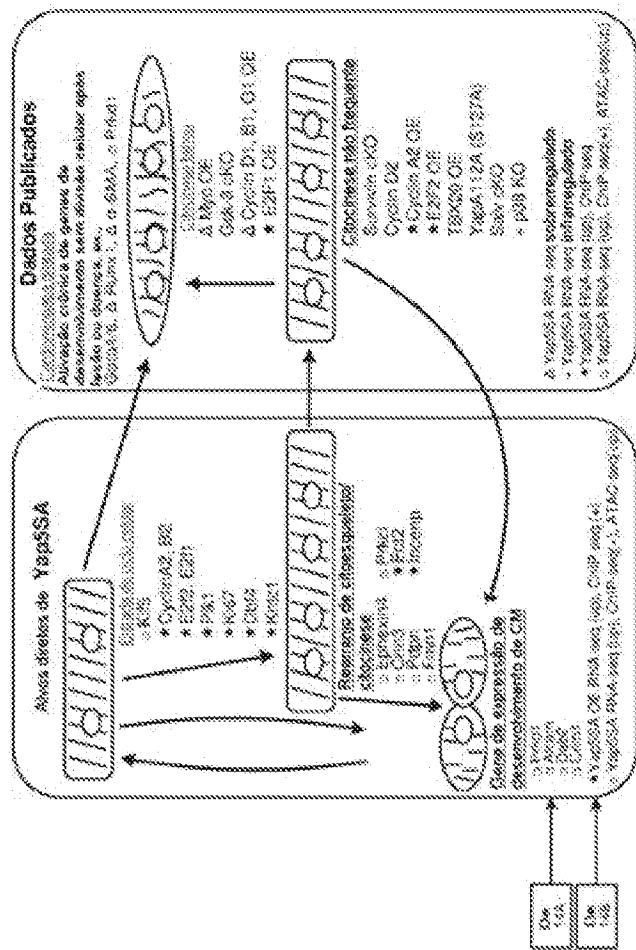


FIG. 13C

FIG. 13D





145

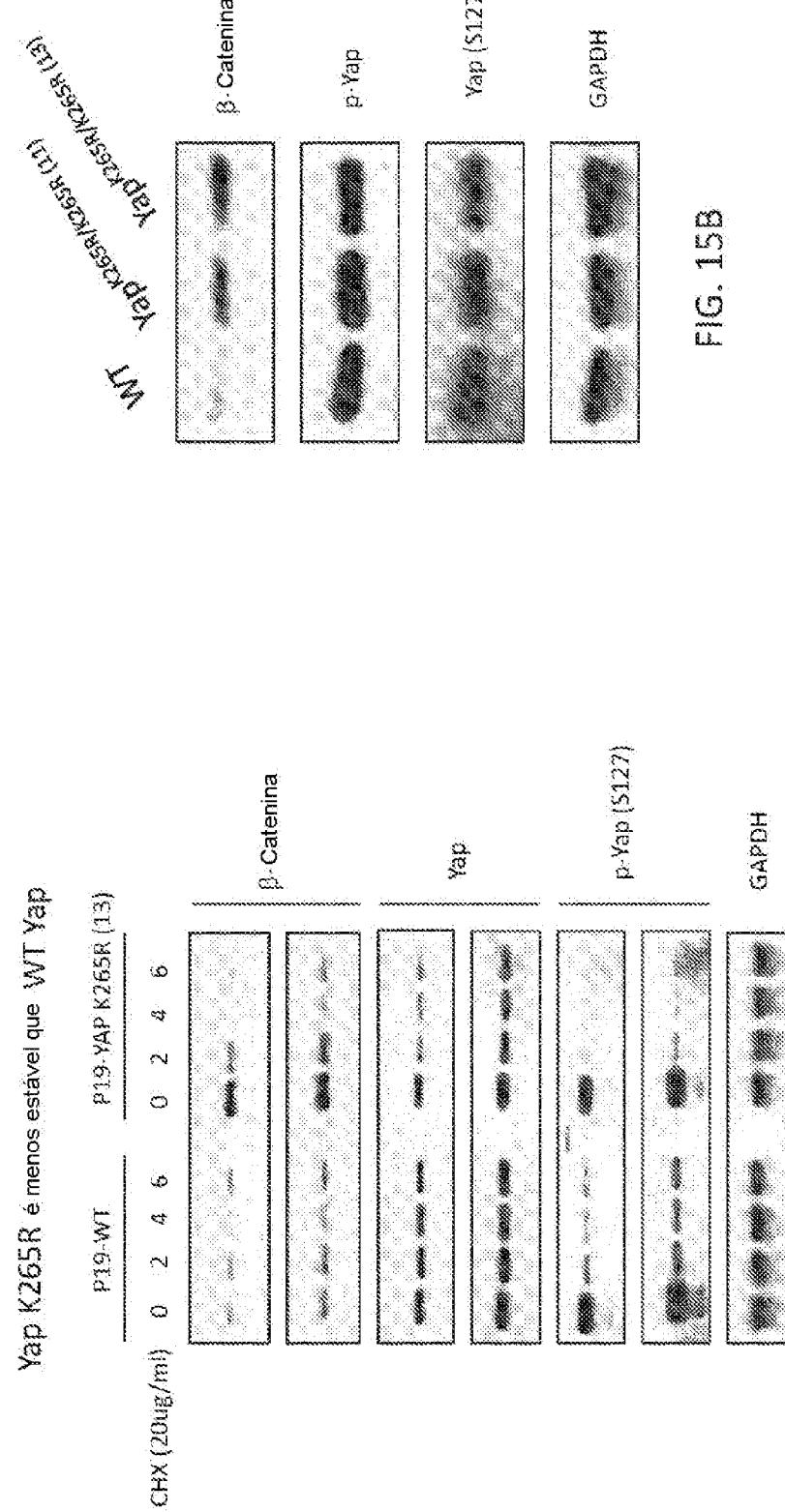


FIG. 15A

FIG. 15B

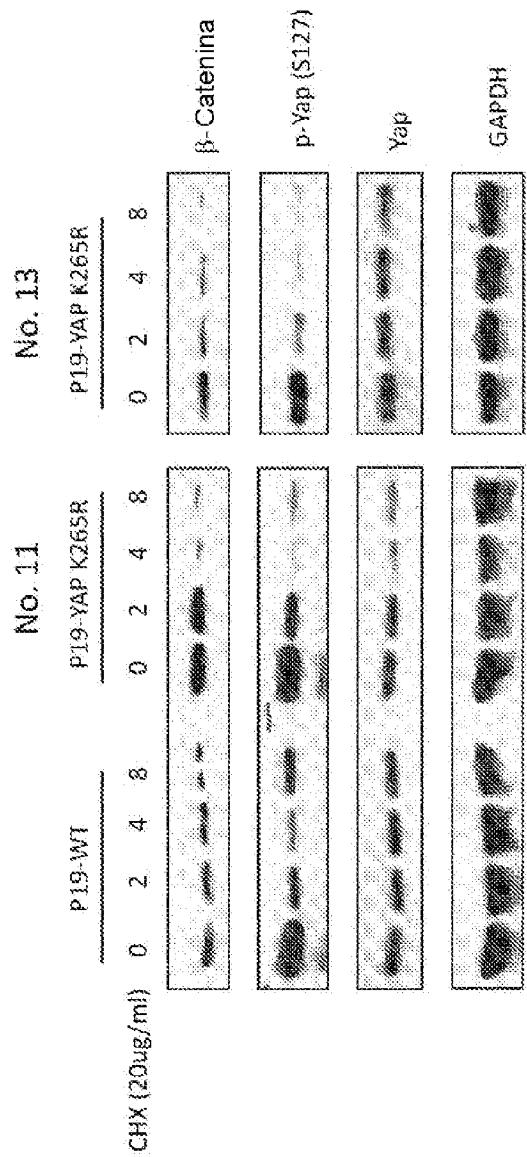


FIG. 16

No. 11
P19-WT P19-YAP K265R

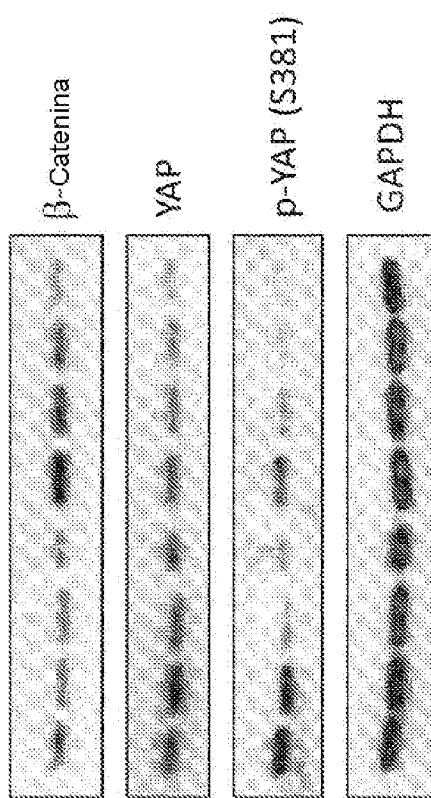


FIG. 17A

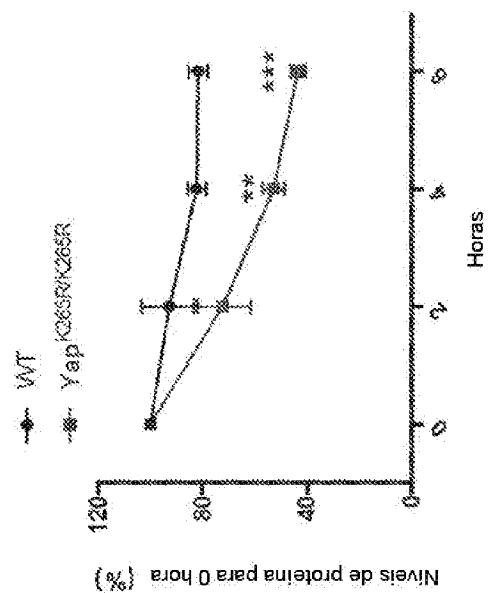


FIG. 17B

baixa densidade
 $3,0 \times 10^5$ células foram semeadas em placas de 6 poços, 18 horas depois,
 as células foram tratadas com Mg132

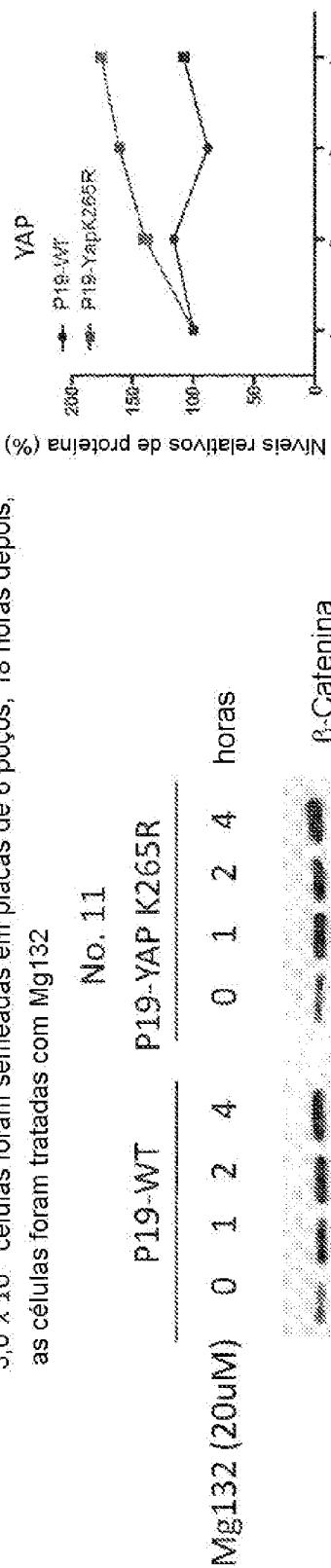


FIG. 18B

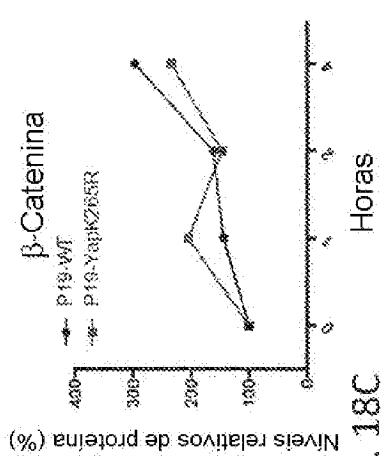


FIG. 18C



FIG. 18A

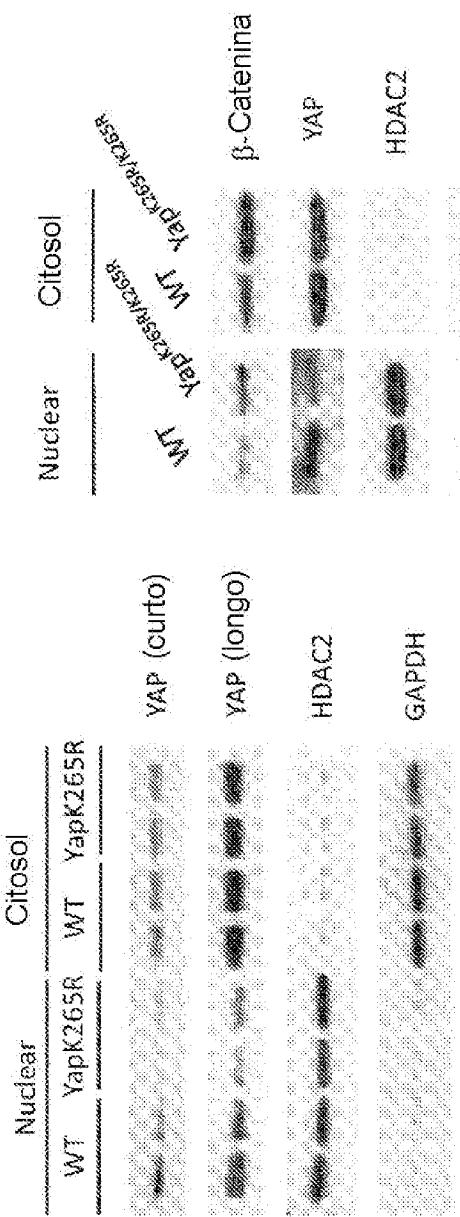


FIG. 19A

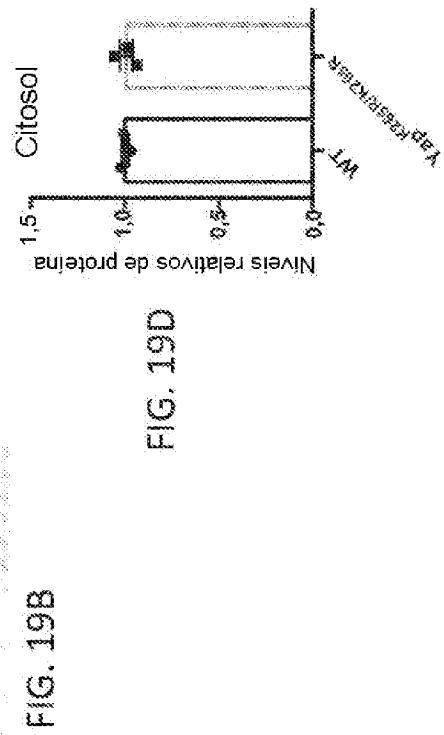


FIG. 19B

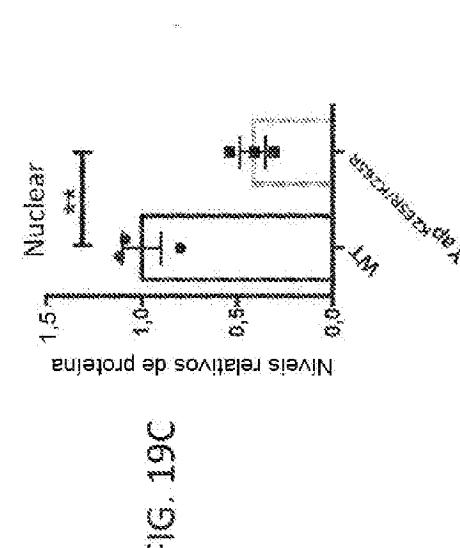


FIG. 19C

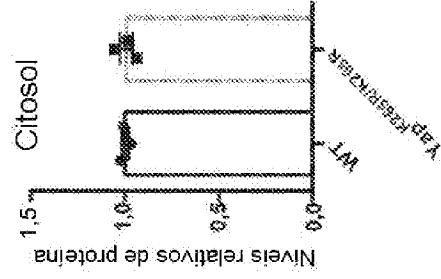


FIG. 19D

RESUMO

Patente de Invenção: "**YAP ATIVO DOMINANTE, HIPOEFETOR, INDUZ ACESSIBILIDADE DE CROMATINA E RENOVAÇÃO DE CARDIOMIÓCITO**".

A presente refere-se a métodos para gerar células ou tecidos de células existentes com uma ou mais variantes mutadas de Yap. Em modalidades específicas, a divulgação se refere ao tratamento de cardiomiócitos existentes com uma ou mais variantes mutadas de Yap que faz com que eles se dividam e gerem novos cardiomiócitos. Em casos específicos, a variante mutada de Yap tem substituições de serina para alanina em 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais serinas de Yap.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA (JUNTADA) P242402.TXT
- Data de Geração do Código: 10/10/2019
- Hora de Geração do Código: 15:11:34
- Código de Controle:
 - Campo 1: CEC7E9B3532F84E0
 - Campo 2: D4720427E39543BF