

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 944**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/031932**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13176765**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13793446 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2852688**

54 Título: **Composiciones y métodos relacionados con la variante 2 de 89BB8 15 y síndrome de ovario poliquístico**

30 Prioridad:

**21.05.2012 US 201261649568 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**24.10.2017**

73 Titular/es:

**THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION  
(50.0%)**

**304 Old Main**

**University Park, PA 16802-7000, US y**

**VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MCALLISTER, JANETTE, M. y**

**STRAUSS, JEROME, F.**

74 Agente/Representante:

**LOZANO GANDIA, José**

**ES 2 638 944 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS CON LA VARIANTE 2 DE DENND1A Y SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO**

**DESCRIPCIÓN**

- 5 **Campo de la invención**
- La presente invención se refiere en general al síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) y más específicamente a composiciones y métodos para la detección y el diagnóstico de SOPQ.
- 10 **Antecedentes de la invención**
- SOPQ es trastorno endocrino más común de las mujeres en edad de procrear, que afecta a aproximadamente el 6-10% de las mujeres en esta población, y es una causa común de esterilidad. SOPQ tiene una incidencia similar entre los distintos grupos étnicos y raciales.
- SOPQ se caracteriza por rasgos que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, acumulación anómala de pequeños folículos dentro del ovario, oligomenorrea o amenorrea, acné, acantosis nigricans, alopecia androgénica, producción aumentada de andrógenos ováricos, esterilidad/aborto espontáneo en el primer trimestre, hirsutismo, hiperinsulinemia/resistencia a la insulina y obesidad. Los criterios clínicos para SOPQ incluyen hiperandrogenemia, niveles aumentados de testosterona total y/o testosterona disponible, oligoovulación, ovarios poliquísticos y menos de seis reglas/año. Cuando se intenta diagnosticar SOPQ de manera definitiva, es necesario excluir otras causas de estos síntomas (por ejemplo, tumores que secretan andrógenos, hiperplasia suprarrenal congénita, síndrome de Cushing).
- 25 Actualmente, el diagnóstico de SOPQ es complejo e implica frecuentemente someter a prueba los niveles hormonales para descartar hiperplasia suprarrenal congénita de aparición tardía (HSCAT) o hiperplasia suprarrenal no clásica (HSNC), y síndrome de Cushing. Frecuentemente, las pruebas realizadas incluyen mediciones de testosterona, sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS), 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, globulina de unión a hormonas sexuales (GUHS), niveles de prolactina, pruebas de función tiroidea y ecografía transvaginal para evaluar la morfología de los ovarios. Por tanto, sigue habiendo desde hace mucho tiempo la necesidad de composiciones y métodos mejorados que puedan usarse con relación al diagnóstico de SOPQ, para monitorizar intervenciones terapéuticas/quirúrgicas, y para seleccionar pacientes para enfoques terapéuticos personalizados. La presente invención satisface estas y otras necesidades.
- 30 **Sumario de la invención**
- La presente invención proporciona composiciones y métodos para realizar o para ayudar a realizar un diagnóstico de SOPQ según las reivindicaciones. En general, el método comprende detectar y/o cuantificar el ARNm de la variante 2 de DENND1A o la proteína de la variante 2 de DENND1A en una muestra obtenida o derivada de un sujeto.
- 35 La invención es adecuada para someter a prueba muestras de cualquier individuo humano, incluyendo sujetos de sexo femenino y masculino de cualquier edad, independientemente del estado médico. Por tanto, en diversas realizaciones, la invención proporciona un método *in vitro* que puede usarse para la determinación cómoda y rápida de la presencia y/o cantidad de ARNm y/o la proteína de la variante 2 de DENND1A en una amplia variedad de muestras biológicas, del que se describen adicionalmente ejemplos no limitativos a continuación. Se espera que la invención proporcione un diagnóstico más temprano, más fácil y más definitivo de SOPQ que el que estaba disponible hasta ahora. En determinadas realizaciones, la invención permite someter a prueba cualquier muestra biológica, incluyendo pero sin limitarse a cualquier tejido o líquidos biológicos, de la que los ejemplos no limitativos incluyen sangre, orina, plasma, suero o líquido mucoso, incluyendo saliva. La invención incluye someter a prueba muestras que contienen exosomas, tales como una muestra de sangre, orina o saliva que contiene o se esperaría que contuviese exosomas. En determinadas realizaciones, la invención se realiza con una muestra que se obtiene de manera no invasiva del sujeto.
- 45 La detección del ARNm y/o la proteína de la variante 2 de DENND1A puede realizarse usando cualquier método. En diversas realizaciones, se detecta el ARNm usando un enfoque basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR en tiempo real (RT-PCR). En enfoques alternativos, se detecta ARNm de la variante 2 de DENND1A mediante hibridación de una sonda marcada, mediante lo cual se detecta la sonda marcada hibridada. Como tal, el método es susceptible de realizarse como parte de un ensayo multiplexado, tal como en un chip o un microalineamiento. En realizaciones alternativas, se detecta la proteína de la variante 2 de DENND1A. La detección/cuantificación de la proteína de la variante 2 de DENND1A puede realizarse usando, por ejemplo, cualquier mecanismo de detección de base inmunológica. En diversos enfoques, la detección de la proteína de la variante 2 de DENND1A se realiza usando anticuerpos o bien policlonales o bien monoclonales de modo que se detecta un complejo que comprende proteína de la variante 2 de DENND1A y los anticuerpos.
- 50 En otro aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para seleccionar un individuo como candidato para

terapia para el SOPQ. Esto implica someter a prueba una muestra de un individuo para determinar el ARNm de la variante 2 de DENND1A y/o la proteína de la variante 2 de DENND1A, y de manera posterior a la detección/cuantificación del ARNm o la proteína de la variante 2 de DENND1A en la muestra, designar al individuo como candidato para la terapia de SOPQ (o no designarlo así, si la muestra no contiene ARNm o proteína de la variante 2 de DENND1A, o contiene menos de cualquiera en comparación con una referencia). En determinadas realizaciones, el método descrito en el presente documento puede implicar tratar al individuo para SOPQ de manera posterior a la detección/cuantificación del ARNm o la proteína de la variante 2 de DENND1A en una muestra del individuo.

La invención también proporciona un producto para su uso en la realización o la ayuda del diagnóstico de SOPQ. El producto puede comprender reactivos, tales como sondas y/o cebadores, en el que al menos una de las sondas y/o los cebadores pueden hibridarse específicamente con ARNm de la variante 2 de DENND1A. El producto puede contener adicionalmente un envase, y material impreso que indica que el producto ha de usarse para detectar ARNm de la variante 2 de DENND1A como indicador de SOPQ. El material impreso puede incluir instrucciones en cuanto a cómo han de usarse los reactivos proporcionados como parte del producto para realizar o ayudar en el diagnóstico de SOPQ.

### Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A y 1B proporcionan resúmenes gráficos de datos que demuestran conjuntamente que aumentan tanto la producción de DHEA y la acumulación de ARNm de CYP17 tanto basales como estimuladas por AMPc en células de la teca con SOPQ propagadas en cultivo a largo plazo. La figura 1A muestra que aumentó significativamente la acumulación de ARNm de CYP17 en células de la teca con SOPQ en comparación con células de la teca normales tratadas en condiciones basales y de estimulación por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ). La figura 1B muestra que aumentó significativamente la biosíntesis de DHEA en células de la teca con SOPQ en condiciones tanto basales como de estimulación por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ).

La figura 2 proporciona una representación gráfica de los datos obtenidos del análisis de delección del promotor de *CYP17A1* en células de la teca normales y con SOPQ y demuestra que aumenta la actividad del promotor de *CYP17A1* en células de la teca con SOPQ, en condiciones tanto basales como de estimulación por forskolina (\*,  $P < 0,01$ ), en comparación con células de la teca normales para constructos de promotor individuales.

Las figuras 3A y 3B proporcionan representaciones gráficas de datos que demuestran que la acumulación de ARNm de la variante 2 de DENND1A es mayor en células de la teca con SOPQ en comparación con células de la teca normales. La figura 3A muestra que la variante 1 de DENND1A no se expresa de manera diferencial en células de la teca normales y con SOPQ. En cambio, la acumulación de ARNm de la variante 2 de DENND1A aumentó significativamente en condiciones tanto basales (\*\*\*,  $P < 0,01$ ) como de estimulación por forskolina (\*\*,  $P < 0,05$ ) en células de la teca con SOPQ, en comparación con células normales.

Las figuras 4A y 4B proporcionan representaciones gráficas de datos que demuestran que la acumulación de ARNm de la variante 2 de DENND1A precede a la acumulación de ARNm de CYP17 en células de la teca normales y con SOPQ. Se examinaron los transcurros temporales de la acumulación de ARNm de la variante 2 de DENND1A (figura 4A) y CYP17 (figura 4B) en células de la teca normales y con SOPQ tratadas en medio libre de suero durante 0, 4, 8, 16, 24 ó 48 h en presencia y ausencia de forskolina 20  $\mu$ M. Específicamente, tal como se muestra en la figura 4A, la acumulación de ARNm de DENND1A.V2 aumenta rápidamente entre 4-8 h y forma una meseta alrededor de las 16-20 h en células con SOPQ (figura 4A). En cambio, la acumulación de ARNm de CYP17 aumenta en respuesta al tratamiento con forskolina a lo largo de 8-48 h, con un aumento de ~2-3 veces del ARNm de CYP17 estimulado por forskolina en células normales, y un aumento de ~10-40 veces en células con SOPQ (figura 4B).

Las figuras 5A y 5B proporcionan una representación fotográfica del análisis de inmunotransferencia de tipo Western que demuestra que aumenta la expresión de la proteína de la variante 2 de DENND1A en células de la teca con SOPQ. La figura 5A representa un análisis de inmunotransferencia de tipo Western representativo que muestra un aumento de la variante 2 de DENND1A de 62 kD (DENND1A.V2) en células de la teca con SOPQ. La figura 5B muestra que la variante 2 de DENND1A de 62 kD estaba presente en el componente nuclear de células de la teca con SOPQ, pero no se detectó la variante 1 de DENND1A de 110 kD en extractos nucleares o de células completas normales o con SOPQ. Estos datos demuestran que la proteína de la variante 2 de DENND1A está presente en el núcleo, y puede trasladarse desde la membrana celular en la que se cree que las proteínas DENND1A se asocian con clatrina hasta el núcleo para regular una variedad de funciones celulares en la célula de la teca del ovario.

Las figuras 6A, 6B, 6C y 6D proporcionan representaciones gráficas de datos que demuestran que la expresión de la variante 2 de DENND1A en células de la teca normales da como resultado una producción elevada de andrógenos, una acumulación aumentada de ARNm de CYP17, y una regulación aumentada del promotor de *CYP17A1*. La figura 6A muestra que todas las dosis de adenovirus para DENND1A.V2 aumentaron significativamente la producción de DHEA estimulada por forskolina en comparación con adenovirus Null (vacío) de control (\*,  $P < 0,05$ ). La figura 6B muestra que la infección de células de la teca normales con 3,0 ufp de adenovirus que expresan DENND1A.V2 da como resultado un aumento significativo de la biosíntesis de DHEA estimulada por forskolina en comparación con

células infectadas por virus vacío (\*,  $P < 0,05$ ). La figura 6C muestra que tanto 1,0 como 10 ufp de adenovirus para DENND1A.V2 aumentó significativamente la acumulación de ARNm de CYP17 en células normales, con y sin estimulación por forskolina, en comparación con la infección con adenovirus Null (\*,  $P < 0,05$ ). La figura 6D muestra que el adenovirus para DENND1A.V2 aumenta la actividad del promotor de -770 CYP17A1 tanto basal (\*,  $P < 0,05$ ) como estimulada por forskolina (\*\*,  $P < 0,01$ ) en comparación con el adenovirus Null.

Las figuras 7A, 7B y 7C proporcionan representaciones gráficas de datos que demuestran que el silenciamiento de la variante 2 de DENND1A en células de la teca con SOPQ da como resultado una disminución de la regulación del promotor de CYP17A1, los niveles de ARNm de CYP17 y la biosíntesis de andrógenos. Tal como se muestra en la figura 7A, el plásmido de retrovirus de ARNhp1 y ARNhp2 de DENND1A.V2 inhibió significativamente la acumulación de ARNm de CYP17 tanto basal (\*,  $P < 0,05$ ) como estimulada por forskolina (\*,  $P < 0,01$ ) en células de la teca con SOPQ. Tal como se muestra en la figura 7B, la cotransfección de -235/+44 del promotor de CYP17A1 fusionado al gen de la luciferasa en un plásmido pGL3 con ARNhp1 y ARNhp2 de DENND1A.V2 dio como resultado una inhibición significativa de la actividad de indicador CYP17A1 dependiente de forskolina en células de la teca con SOPQ, en comparación con ARNhp reordenado (\*,  $P < 0,05$ ). Para evaluar el efecto del silenciamiento de DENND1A.V2 sobre la biosíntesis de DHEA, se infectaron células de la teca con SOPQ con un lentivirus para DENND1A.V2 de ARNhp de silenciamiento o un lentivirus sin silenciamiento de control en presencia o ausencia de forskolina durante 72 h. Tal como se muestra en la figura 7C, la infección con lentivirus para DENND1A.V2 de ARNhp de silenciamiento inhibió significativamente la biosíntesis de DHEA estimulada por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ).

Las figuras 8A y 8B proporcionan representaciones gráficas de datos que demuestran que DENND1A.V2 potencia los cambios dependientes de LH/hCG en la regulación del promotor de CYP17A1 y DHEA. Tal como se muestra en la figura 8A, DENND1A.V2 aumentó significativamente la biosíntesis de DHEA tanto basal como estimulada por LH/hCG (\*,  $P < 0,05$ ). Tal como se muestra en la figura 8B, DENND1A.V2 aumentó significativamente la función del promotor de CYP17A1 estimulada por LH/hCG (\*,  $P < 0,05$ ).

La figura 9 proporciona una representación gráfica de datos que demuestran que aumenta el ARNm de la variante 2 de DENND1A en exosomas de orina aislados de mujeres con SOPQ en comparación con exosomas de orina de mujeres normales. En particular, aumenta significativamente el ARNm de la variante 2 de DENND1A en exosomas de orina aislados de mujeres con SOPQ (\*,  $P < 0,01$ ), en comparación con mujeres con ciclos normales.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos que son útiles para, entre otros fines, el diagnóstico de SOPQ o cualquier otro estado que se correlacione positivamente con la expresión del ARNm y/o la proteína de la variante 2 de DENND1A, tal como se describe adicionalmente en el presente documento según las reivindicaciones. La invención también es adecuada para determinar si un individuo es un candidato o no para la terapia de SOPQ, para el desarrollo de un régimen de tratamiento para un individuo al que se le ha diagnosticado SOPQ, y para monitorizar la terapia de SOPQ.

El método *in vitro* comprende generalmente someter a prueba una muestra para determinar la presencia o ausencia de ARNm o proteína de la variante 2 de DENND1A, o para comparar una cantidad de ARNm o proteína de la variante 2 de DENND1A con una referencia. En realizaciones de la invención, la determinación de la presencia de ARNm o proteína de la variante 2 de DENND1A ayuda en los diagnósticos de un estado que se correlaciona positivamente con la expresión de la variante 2 de DENND1A. En una realización, la determinación de la presencia de ARNm o proteína de la variante 2 de DENND1A se considera un diagnóstico de SOPQ.

La variante 1 de DENND1A y la variante 2 de DENND1A también se denominan "isoforma 1 de DENND1A" e "isoforma 2 de DENND1A" respectivamente, y "DENND1A.V1" y "DENND1A.V2", respectivamente.

La secuencia de ADNc de la variante 2 de DENND1A es: (SEQ ID NO:1):

# ES 2 638 944 T3

0001 cgcgcgccgg gcaocgcgcgc cggcgacccat ggcgttcgcc gggctggagc gactacatta  
0061 acccctggag ggcgcggcgg cggcgagggga ggcagcctcg agcggggcggg cccagcctg  
0121 aggggaagggga ggaaggggcg gggagagcgc cagagggagg ccggctggcc gcgggcgggc  
0181 gggcagcgca gcgccgagcg gggcccgcg gcccagagg aggcctggg accatgggct  
0241 ccaggatcaa gcagaatcca gagaccacat ttgaagtata tgttgaagtg gcctatccca  
0301 ggacaggtgg cactctttca gatcctgagg tgcagaggca attcccggag gactacagtg  
0361 accaggaagt tctacagact ttgaccaagt tttgtttccc cttctatgtg gacagcctca  
0421 cagttagcca agttggccag aacttcacat tcgtgctcac tgacattgac agcaaacaga  
0481 gattcggggt ctgccgctta tcttcaggag cgaagagctg cttctgtatc ttaagctatc  
0541 tcccctgggt cgaggtatatt tataagctgc ttaacatcct ggcagattac acgacaaaaa  
0601 gacaggaaaa tcagtggaat gagcttcttg aaactctgca caaacttccc atccctgacc  
0661 caggagtgtc tgtccatctc agcgtgcatt cttattttac tgtgcctgat accagagaac  
0721 ttcccagcat acctgagaat agaaatctga cagaatattt tgtggctgtg gatgtaaca  
0781 acatgttgca tctgtacgcc agtatgctgt acgaacgccc gatactcatc atttgcagca  
0841 aactcagcac tctgactgcc tgcaccacg ggtctgcggc gatgctctac cccatgtact  
0901 ggcagcagct gtacatcccc gtgctgccg cgcactctgct ggactactgc tgtgctcca  
0961 tgcctacct cataggaatc catttaagtt taatggagaa agtcagaaac atggccctgg  
1021 atgatgtcgt gatcctgaat gtggacacca acaccctgga aacccttcc gatgacctcc  
1081 agagcctccc aaacgacgtg atctcttccc tgaagaacag gctgaaaaag gtctccacaa  
1141 ccaactgggga tgggtgtggc agagcgttcc tcaaggccca ggctgcttcc ttcggtagct  
1201 accgaaacgc tctgaaaatc gagccggagg agccgatcac tttctgtgag gaagccttcg  
1261 tgtcccacta ccgctccgga gccatgaggc agttcctgca gaacgccaca cagctgcagc  
1321 tcttcaagca gtttattgat ggtcgattag atcttctcaa ttccggcgaa ggtttcagtg  
1381 atgtttttga agaggaaatc aacatgggcg agtacgctgg cagtgacaaa ctgtaccatc  
1441 agtggctctc cactgtccgg aaaggaagtg gagcaattct gaactctgta aagaccaaag

1681 tccgagaaga cggcggccca atcacagtcc actttggaca ggtgcgccc cctcgtccac  
1741 atgttgtaa gagaccaaag agcaacatcg cagtggagg ccggaggacg tctgtgccga  
1801 gccctgagca aacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta  
1861 cccatthtgc ggccaagtcc ccgacgagag getggacctc ttcacacat tgacttacgc  
1921 cgttgctttt ccagactggg cagaggggct gacttcgag tgtgtgcca agagccgggtg  
1981 tctgataatc ccatthtctc gcttatcacc tgaactgtgt cagtactact tttagttttg  
2041 ttggttggtt ggtttgttgt ttgttaata tgccctgtht tctactctg ttggaaaata  
2101 tttggggttg aaataacca gtgggagcat ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa  
2161 aaaaaa (SEQ ID NO:1)

## 5 La secuencia de aminoácidos de la variante 2 de DENND1A es (SEQ ID NO:2):

MGSRIKQNPETTFEYVVEVAYPRTGGTLDPEVQRQFPEDYSDQEVLQTLTKFCFPFYVDSLTVSQVGNFTFVL  
TDIDSKQRFQFCRLSSGAKSCFCILSYLPWFVEVYKLLNILADYTTKRQENQWNELETLHKLPIDPGVSVHLS  
VHSYFTVPDTRELPSIPENRNLTEYFVAVDVNNMLHLYASMLYERRILII CSKLSLTACIHGSAAMLYPMYQW  
VYIPVLPPLLDYCCAPMPYLIGIHL SLMEKVRNMLDDVVI LNVDNTLET PFDLQSLPNDVISSLKNRLKKV  
STTTGDGVARAF LKAQAFFG SYRNALKIEPEEPI TFCEEFVSHYRSGAMRQFLQ NATQLQLFKQFIDGRLDLL  
NSGEGFSDVFEEI NMGEYAGSDKLYHQWLSTVVRKSGAILNTVKT KANPAMKT VYKFAKD HAKMGIKEVKNRLK  
QKDIAENG CAPTPEEQLPKTAPSPLVEAKDPKLRDRRPI TVHFGQVRPPRPHVVKRPKSNI AVEGRRTSVP SPE  
QNTIATPATLHILQKSITHFAAKFPTRGWTSSSH (SEQ ID NO:2)

## La secuencia de ADNc de la variante 1 de DENND1A es (SEQ ID NO:3):

10

# ES 2 638 944 T3

```

0001  cgcgcgccgg  gcacgcgcgc  cggcgaccat  ggcgttcgcc  gggctggagc  gagtacatta
0061  acccctggag  gcggcggcgg  cggcgaggga  gcgagcctcg  agcgggcggg  ccccagcctg
0121  agggaaggga  ggaagggggc  gggagagcgc  cagagggagg  ccggtcggcc  gcgggcgggc
0181  gggcagcgca  gcgcgcgagc  gggcccgcgg  gcccatgagg  aggcctgggg  accatgggct
0241  ccaggatcaa  gcagaatcca  gagaccacat  ttgaagtata  tgttgaagtg  gcctatcca
0301  ggacaggtgg  cactctttca  gatcctgagg  tgcagaggca  attcccggag  gactacagtg
0361  accaggaagt  tctacagact  ttgaccaagt  tttgtttccc  cttctatgtg  gacagcctca
0421  cagttagcca  agttggccag  aacttcacat  tcgtgctcac  tgacattgac  agcaaacaga
0481  gattcgggtt  ctgcccgtta  tcttcaggag  cgaagagctg  cttctgtatc  ttaagctatc
0541  tcccctgggt  cgaggatatt  tataagctgc  ttaacatcct  ggcagattac  acgacaaaaa
0601  gacaggaaaa  tcagtggaat  gagcttcttg  aaactctgca  caaacttccc  atccctgacc
0661  caggagtgtc  tgtccatctc  agcgtgcatt  cttattttac  tgtgctgat  accagagaac
0721  ttcccagcat  acctgagaat  agaaatctga  cagaatattt  tgtggtgtg  gatgttaaca
0781  acatgttgca  tctgtacgcc  agtatgctgt  acgaacgccg  gatactcatc  atttgcagca
0841  aactcagcac  tctgactgcc  tgcattccag  ggtctgcggc  gatgctctac  cccatgtact
0901  ggcagcacgt  gtacatcccc  gtgctgccgc  cgcactctgt  ggactactgc  tgtgctccca
0961  tgccctacct  cataggaatc  catttaagtt  taatggagaa  agtcagaaac  atggccctgg
1021  atgatgtcgt  gatcctgaat  gtggacacca  acaccctgga  aacccttcc  gatgacctcc
1081  agagcctccc  aaacgacgtg  atctcttccc  tgaagaacag  gctgaaaaag  gtctccaca
1141  ccaactggga  tgggtgtggc  agagcgttcc  tcaaggccca  ggctgctttc  ttccgtagct
1201  accgaaacgc  tctgaaaatc  gagccggagg  agccgatcac  tttctgtgag  gaagccttcg
1261  tgtcccacta  ccgctccgga  gccatgaggc  agttcctgca  gaacgccaca  cagctgcagc
1321  tcttcaagca  gtttattgat  ggtcgattag  atcttctcaa  ttccggcgaa  ggtttcagtg
1381  atgtttttga  agaggaaatc  aacatgggcg  agtacgctgg  cagtacaaa  ctgtaccatc
1441  agtggctctc  cactgtccgg  aaaggaagtg  gagcaattct  gaatactgta  aagaccaaag
1501  caaatccggc  catgaagact  gtctacaagt  tcgcaaaaaga  tcatgcaaaa  atgggaataa
1561  aagaggtgaa  aaaccgcttg  aagcaaaagg  acattgcccga  gaatggctgc  gccccaccc
1621  cagaagagca  gctgcctcag  actgcaccgt  cccactgggt  ggaggccaag  gacccaagc
1681  tccgagaaga  ccggcggcca  atcacagtcc  actttggaca  ggtgcgcca  cctcgtccac
1741  atgttgttaa  gagaccaaag  agcaacatcg  cagtggaagg  ccggaggacg  tctgtgccga
1801  gccctgagca  gccgcagccg  tatcggacac  tcagggagtc  agacagcgcg  gaaggcgacg
1861  aggcagagag  tccagagcag  caagtgcgga  agtccacagg  ccctgtcca  gctccccctg
1921  accggctgct  cagcatcgac  cttctggaag  acgtcttcag  caacctggac  atggaggccg
1981  cactgcagcc  actgggcccag  gccaaagact  tagaggacct  tcgtgcccc  aaagacctga
2041  gggagcagcc  agggaccttt  gactatcaga  ggctggatct  gggcgggagt  gagaggagcc
2101  gcggggtgac  agtggccttg  aagcttacc  acccgtacaa  caagctctgg  agcctgggcc
2161  aggacgacat  ggccatcccc  agcaagcccc  cagctgcctc  ccctgagaag  ccctggccc
2221  tgctcgggaa  ctcccggcc  ctgcctcgaa  ggccccagaa  ccgggacagc  atcctgaacc
2281  ccagtgacaa  ggaggaggtg  cccaccctca  ctctgggcag  catcaccatc  ccccggcccc
2341  aaggcaggaa  gaccccagag  ctgggcatcg  tgcctccacc  gccattccc  cgcccggcca

```

2401 agctccaggc tgcggggccc gcaacttggtg acgtctcaga gcggtctcag acggatcggg  
 2461 acaggcgagc tgccttgagt ccagggtccc tgctcccca ggccccactg  
 2521 aactgctcca gcegetcage cctggccccg gggtctcagg caccgagcagt gacgccccgc  
 2581 tcgccccctt ggacccgctc agcacagcct ggctcagcag caccctcccg tcacgccccg  
 2641 ccaccccgaa tgtagccacc ccattcacc cccaattcag cttccccctt gcagggacac  
 2701 ccacccattt cccacagcca ccaactcaacc cctttgtccc atccatgcca gcagccccac  
 2761 ccacctgccc cctgggtctcc acaccagccg ggcttttcgg ggcccccca gcttccccgg  
 2821 ggccggcttt tgggtccggc ctctctgctg ccagtgctgg cttctgtgcc cctcacaggt  
 2881 ctcagcccaa cctctccggc ctctccatgc ccaacctctt tggccagatg cccatgggca  
 2941 cccacacgag cccctacag ccgctgggtc ccccagcagt tgccccgtcg aggatccgaa  
 3001 cgttgccccct ggcccgtcca agtgccaggg ctgctgagac caagcagggg ctggccccga  
 3061 ggccctggaga cccccgctt ctgctccca ggccccctca aggcctggag ccaacactgc  
 3121 agccctctgc tctcaacag gccagagacc cctttgagga tttgttacag aaaaccaagc  
 3181 aagacgtgag cccgagtcag gccctggccc cggccccaga ctcggtggag cagctcagga  
 3241 agcagtggga gaccttcgag cctgagggg cctgaggggt ggggatgcac cgaggccccg  
 3301 gggctccgtcc actgctgctgg ttcgagggc cccccgccac tctctctctg cccaggttct  
 3361 gctggtggga agggatggga cccctctctg ctgccccctc ctcccccca cactgcccc  
 3421 ctctgatgtc tggccccggg gaatggcacc agttccagcc tgggaatcaa cccagttcct  
 3481 gagtgcccat cccacccccg ggttgctct cctcgccacc cttgattggg ttttgacta  
 3541 aagaggtcag ctggggccat gatattgctc cagaccgagt cctaccacc tttccccgga  
 3601 agtgtcccaa gaggtccga aggcctccc tccgagccca gctctcctgt ctctccaca  
 3661 gccaggccct gcaagccccac ctctcggac acaggtgaca gggttaccct ccagtttgag  
 3721 ctactctgca cgagacacag gtactctggg gttgaagtta ggactcctc tgggctggag  
 3781 gatttacctg gtggggcact tccagactgt tctagcaat atacacacac gttcttctc  
 3841 gtgtcttcac cccaaaactt cagttgattc tgacctggga ggatctggg accagggggg  
 3901 cttgggctgc cttgtgatac acagcccag ccacctgca cgggggctgc gagcaccagc  
 3961 aactttgatt tatagaagga aaatggaac cccatctga gtattttggg agggaccccc  
 4021 agccctcatc cccacccccg acgctgatac cctcaggtac tccccactg gcaaaagctg  
 4081 gggctcagcc tcttctcatc tggagctttg tgggcaaagc tgagaagctg caaccagat  
 4141 ttcaacccaa aaaggtcaag ctgaatgctc cagactgatg tggaggcag ctggccttcc  
 4201 tgggttgaa cgaggcagtg gccctgagcc ccttctccag ggccaggtag aaaggacaaa  
 4261 cttggctctc gctcgggga agcaggagga gggctagaag ccagtcctc cccactgccc  
 4321 cacagctcca gcccagcaca gaaattcctg gaaatcctg aggccaaagt caccaaagt  
 4381 tttattatct tttttttcc tttttacctt attgatttga tgaatctga aatggattca  
 4441 tttccataaa ccaagttaaa gtatggcccg accatttaag aaaacaacca tctgagacac  
 4501 gcaggaaatt gtgagcattt cgaccggagc tctcatttcc tatttgtgaa gggctcagaca  
 4561 cagctcacc aggggtgctc gggggacaag ggggtctctg gagatgtcac ccagggagcc  
 4621 ccctctatgt ctgagaggtc gccactgtct cacatgtctc gtgaggcttg cggccatcc  
 4681 tggcacatgg ctcttctctg gtcaccctg acctgtctgg ctcaggaatg ggctctggct  
 4741 gctgggggag ccgtgtcact cctggccat gggggcacct cctgggact taggtgttc  
 4801 agcatagat ccagtttctc accctgggca gacccccagg ccccatccgg gatagggcag  
 4861 aggaggtgct ggccggcccc ggaaggaag gtgtgtacct caaggcccc tggctgtgct  
 4921 gaggggctgg ggtgagcgt ccatgttcac atgagcactg ctgcctctc acttgtggga  
 4981 ctttttgcaa acccaaggat gaactttgtg tgcattcaat aaaatcatct tggggaagag  
 5041 g (SEQ ID NO:3)

La secuencia de aminoácidos de la variante 1 de DENND1A es (SEQ ID NO:4):

MGSRIKQNPETTFEVYVEVAYPRTGGTLDPEVQRQFPEDYSQEVLQTLTKFCFPFYVDSLTVSQVQGNFTFVL  
 TDIDSKQRFGRFLSSGAKSCFCILSYLPWFVEVYKLLNLIADYTTKRQENQWNELETLHKLPIPDPGVSVHLS  
 VHSYFTVPDRELPSIPENRNLTEYFVAVDVNNMLHLYASMLYERRILIIICSKLSTLTACIHGSAAMLYPMYQWQ  
 VYIPVLPPLHLDYCCAPMFFYLIGIHLSLMEKVRNMLDDEVILNVDNTLETPEFDDLQSLPNDVYISSLKNRLKVK  
 STTTGDVARAFLKAQAFFYGSYRNALKIEPEEITFCCEAFVSHYRSGAMRQFLQNAATQLQLFKQFIDGRLLDL  
 NSGEGFSDVFEIEINMGEYAGSDKLYHQWLSTVRKSGAILNTVKTKANPAMKTVYKFAKDhakmGIKEVKNRLK  
 QKDIAENGCAPTPEEQLPKTAPSPLVEAKDKPLREDRPI TVHFGQVRPPRHVVKRPKSNIAVEGRRTSVPSP  
 QPQPYRTLRESDSAEGDEAESPEQQRKSTGVPAPPDRAAS IDLLEDVFNLDMEAAALQPLGQAKSLEDLRAPK  
 DLREQPGTFDYQRLDLGGSERSRGVTVALKLTHPYNKLWLSLQDDMAIPSKPPAASPEKPSALLGNSLALPRRQ  
 NRDSILNPSDKKEEVPPTLGSITIPRPQGRKTPELGIVPPPP IPRPAKLQAAGAALGDVSERLQTDNRRAALSP  
 GLLPGVVPQGPTELLQPLSPGPGAAGTSSDALALLDPLSTAWSGSTLPSRPATPNVATPFTPQFSFPPAGTPTP  
 FPQPPLNPFVPSMPAAPTLPVSTPAGPFGAPPASLGFASGLLLSSAGFCAPHRSPNLSALSMPNLFQMP  
 MGTHTSPLQLGPPAVAPSRIRTLPLARSSARAAETKQGLALRPGDPPLLPRPPQGLEPTLQPSAPQQARDPFE  
 5 DLLQKTKQDVSPSPALAPADSVEQLRKQWETFE (SEQ ID NO:4)

Para cada secuencia de ADNc presentada en el presente documento, la invención incluye el equivalente de ARNm del ADNc, lo que significa que la invención incluye cada secuencia de ADNc en la que cada T se reemplaza por U. En realizaciones, la determinación de los polinucleótidos que comprenden o que consisten en la secuencia de ADNc o segmentos de la misma se considera que es lo mismo que la determinación del ARNm correspondiente.

Los presentes experimentos indican que DENND1A.V2 es fundamental para la patogenia de SOPQ debido a su papel en el control de la señalización celular, haciendo que sea un potente biomarcador de la enfermedad. La presente invención incluye pero no se limita al hallazgo novedoso de que el ARNm y la proteína de la variante 2 de

DENND1A están aumentados en células de la teca de ovarios con SOPQ, así como en otros tejidos, incluyendo pero sin limitarse necesariamente a exosomas de orina. Por consiguiente, se demuestra en el presente documento que la variante 2 de DENND1A aumentada es una característica de SOPQ y puede usarse como marcador de diagnóstico para SOPQ. Para fomentar la determinación de la relación entre la variante 2 de DENND1A y SOPQ, se presentan datos que muestran que la presencia de la variante 2 de DENND1A da como resultado un aumento de la producción de andrógenos ováricos, así como una expresión aumentada del gen *CYP17A1*, esta última debido a una transcripción aumentada dirigida por el promotor de *CYP17A1*. También se demuestra en el presente documento que la transfección de células de la teca de los ovarios con la variante 2 de DENND1A da como resultado una fosforilación disminuida de LKB1 y ERK, que se asocian con la conversión de células normales a un fenotipo de SOPQ. Por tanto, es probable que la variante 2 de DENND1A actúe como componente de señalización anterior que puede afectar a acontecimientos de señalización posteriores, incluyendo pero sin limitarse necesariamente a actuar sobre las rutas de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y de proteínas cinasas activadas por LKB1/5' adenosina monofosfato (AMPK). Se cree que esto da como resultado una producción aumentada de andrógenos que concuerda con lo observado en SOPQ. Los datos presentados en el presente documento también demuestran que el bloqueo dirigido de la variante 2 de DENND1A mediante la degradación de ARNm mediada por iARN puede inhibir los efectos perjudiciales de la variante 2 de DENND1A, al menos con respecto a su efecto sobre la expresión de *CYP17A1*, confirmando de ese modo adicionalmente su papel como marcador de diagnóstico, y que es probable que desempeñe un papel sustancial en la etiología de SOPQ. Estos resultados también implican a la variante 2 de DENND1A como diana para intervención terapéutica.

Aunque la presente invención es susceptible de someter a prueba una amplia variedad de muestras biológicas, los inventores han demostrado de forma notable que puede detectarse ARNm de la variante 2 de DENND1A en ARN exosómico de orina, y por tanto puede esperarse que pueda detectarse en cualquier otra muestra biológica, incluyendo pero sin limitarse a líquidos biológicos. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la invención proporciona un enfoque no invasivo para detectar la variante 2 de DENND1A en muestras obtenidas de cualquier sujeto humano. Por tanto, la invención permite someter a prueba cualquier individuo, independientemente de la edad, el sexo, la salud general o el estado patológico. Esto es una preocupación particular cuando se considera el diagnóstico en adolescentes o niños en la pubertad en los que las pruebas no invasivas aportarían un gran valor. Por tanto, la invención incluye en diversos aspectos herramientas para su uso en un enfoque cómodo y rápido para determinar la presencia y/o cantidad de la variante 2 de DENND1A en una amplia variedad de muestras biológicas, de las que se describen realizaciones ilustrativas más adelante. Se espera que estas herramientas faciliten un diagnóstico más temprano, más fácil y más definitivo de SOPQ que los enfoques disponibles previamente.

La muestra biológica sometida a prueba según la invención puede ser cualquier muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene ácidos nucleicos y/o proteína. La muestra puede ser una muestra de tejido, o una muestra de un líquido biológico. Los ejemplos no limitativos de tejidos incluyen muestras obtenidas por medio de biopsia, tal como una biopsia de tejido ovárico, o una muestra de mucosa. La muestra puede ser una muestra que comprende células de la teca. En otros ejemplos no limitativos, la muestra puede ser una muestra líquida tal como sangre, orina, plasma, suero o líquido mucoso, incluyendo saliva. En determinadas realizaciones, la muestra comprende exosomas, tales como una muestra de sangre u orina que contiene o se esperaría que contuviese exosomas. En otras realizaciones, la muestra puede ser una muestra de tejido reproductor, o exudado tal como exudado ovárico o tejido o exudado endometrial. En una realización preferida, la muestra es una que se obtiene de manera no invasiva del sujeto, tal como una muestra que comprende orina, una muestra de mucosa o una muestra de líquido bucal, tal como saliva o esputo.

En determinados enfoques, la muestra se obtiene del sujeto y se usa directamente en la determinación de la presencia o ausencia o cantidad de la variante 2 de DENND1A. En otras realizaciones, la muestra biológica se obtiene y se somete a una etapa de procesamiento antes de usarse la muestra biológica en pruebas para detectar la variante 2 de DENND1A. En algunos ejemplos, la etapa de procesamiento puede llevarse a cabo para aislar, y/o purificar y/o amplificar el ARNm de la variante 2 de DENND1A, o para aislar y/o purificar la proteína de la variante 2 de DENND1A.

En determinadas realizaciones, la invención es útil para someter a prueba una muestra de un sujeto humano de sexo femenino prepuberal o adolescente. En determinados ejemplos, el sujeto de sexo femenino puede tener tan sólo ocho años de edad. En determinadas realizaciones la muestra es de un sujeto humano de sexo femenino que tiene menos de ocho años de edad, tal como un lactante. En otras realizaciones, la invención es útil para someter a prueba una muestra obtenida de un sujeto humano de sexo masculino. A este respecto, se espera que la determinación de ARNm o proteína de la variante 2 de DENND1A en una muestra obtenida de un sujeto humano de sexo masculino será útil porque se sospecha que existe una implicación de la variante 2 de DENND1A en determinados estados en sujetos humanos de sexo masculino, tales como trastornos metabólicos que comprenden estados que afectan al metabolismo de lípidos, incluyendo pero sin limitarse a hiperlipidemias y estados cardiovasculares relacionados con el metabolismo de lípidos. En una realización, el sujeto sometido a prueba según la invención es un sujeto humano de sexo masculino que tiene una hermana a la que se le ha diagnosticado SOPQ.

Las técnicas adecuadas para determinar la presencia o ausencia o cuantificar ARNm de la variante 2 de DENND1A incluyen, pero no se limitan a, hibridación de sondas o cebadores dirigidos con ARNm de la variante 2 de



DENND1A, o usando diversas tecnologías en chip, alineamientos de polinucleótidos u oligonucleótidos, y combinaciones de los mismos. Por tanto, en diversas realizaciones, pueden disponerse y/o fijarse sondas al ARNm de la variante 2 de DENND1A o un equivalente de ADN del mismo, sobre un soporte sólido.

5 Puede someterse a prueba directamente el ARNm de la variante 2 de DENND1A o puede amplificarse enzimáticamente *in vitro* mediante el uso, por ejemplo, de análisis por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (RT-PCR), incluyendo PCR cuantitativa en tiempo real (QT-RT), o cualquier otro método de amplificación *in vitro*. Para reacciones de amplificación, pueden diseñarse cebadores que se hibridan con ARNm de la variante 2 de DENND1A, y usarse para obtener productos de amplificación de ácido nucleico (es decir, amplicones). Los expertos en la técnica reconocerán cómo diseñar cebadores adecuados y realizar las reacciones de amplificación y/o hibridación con el fin de llevar a cabo diversas realizaciones del método de la invención. En general, los cebadores deben ser lo suficientemente largos como para ser útiles en reacciones de amplificación, y generalmente los cebadores que tienen al menos 12 bases de longitud se consideran adecuados para tales fines, pero pueden usarse cebadores que tienen sólo 8 bases dependiendo de las condiciones de reacción. Los cebadores/sondas usados para detectar ARN de la variante 2 de DENND1A pueden comprender modificaciones, tales como conjugarse con uno o más marcadores detectables, tales como fluoróforos en forma de un colorante indicador y/o un resto de extinción para su uso en reacciones tales como PCR en tiempo real (RT-PCR), que permiten la cuantificación de ADN amplificado a partir de ARN, en el que la cuantificación puede realizarse a lo largo del tiempo de manera simultánea a la amplificación. En una realización, la reacción de amplificación comprende al menos una sonda de polinucleótido específica para ARNm de la variante 2 de DENND1A, en la que la sonda incluye un nucleótido terminal modificado para que incluya una etiqueta fluorescente, y el otro nucleótido terminal modificado para que comprenda un resto que extingue la fluorescencia de la etiqueta fluorescente. Por ejemplo, para su uso en RT-PCR, puede diseñarse una sonda de este tipo de modo que se una con especificidad a una parte de la variante 2 de DENND1A o su complemento que está entre y no se solapa con secuencias con las que se hibridan dos cebadores para RT-PCR. Usando este diseño, se extinguirá la señal de la etiqueta fluorescente hasta que se degrade la sonda mediante la actividad exonucleasa de la polimerasa durante la amplificación, punto en el que se separará el nucleótido fluorescente del resto de extinción y será detectable su señal.

Los expertos en la técnica reconocerán que aunque se proporcionan secuencias de cebadores particulares en el presente documento, pueden diseñarse otras secuencias de cebador para detectar el ARNm de la variante 2 de DENND1A. En determinadas realizaciones, se usan al menos dos cebadores oligonucleotídicos sintéticos en una reacción de amplificación. Los cebadores en diferentes realizaciones pueden tener desde 8 hasta 100 nucleótidos de longitud, inclusive, e incluyendo todos los números enteros entremedias. Los cebadores son de longitud suficiente y composición de nucleótidos para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con ARNm de la variante 2 de DENND1A, y con equivalentes de ADN del mismo. En ejemplos no limitativos, un primer cebador sintético para su uso en una reacción de amplificación comprende o consiste en una secuencia de polinucleótido que es idéntica a al menos 8 nucleótidos contiguos en la secuencia de ARNm de la variante 2, y un segundo cebador comprende o consiste en una secuencia de polinucleótido que es complementaria a al menos 8 nucleótidos contiguos en la secuencia de ARNm de la variante 2. Cebadores de mayor longitud pueden tolerar un número determinado de nucleótidos con apareamiento erróneo, lo que resultará evidente para el experto en la técnica, y vienen dictados por parámetros tan bien conocidos como la temperatura de fusión y la rigurosidad. Los cebadores pueden diseñarse de tal manera que no tengan complementariedad entre sí. En una realización, los cebadores se diseñan para amplificar el siguiente segmento de la secuencia de ARNm de la variante 2, que comprende una secuencia de 3'-ARNm de la variante 2 de DENND1A que es diferente de la secuencia de la variante 1 de ARNm de DENND1A. Este segmento en 3' distinto incluye un codón de terminación y un desplazamiento del marco de lectura que da como resultado un ARNm más corto y una secuencia de 33 aminoácidos carboxi-terminal distinta en la variante 2 de DENND1A. El mensaje comprende un codón de terminación que acaba en el nt1913 y una secuencia no traducida que comienza en el nt1914. El ARNm de la variante 2 de DENND1A tiene una secuencia codificante de ARNm que es distinta de la variante 1 de DENND1A desde 1811-1913. La secuencia de la región en 3' mostrada en el equivalente de ADN del segmento de ARNm de la variante 2 de DENND1A, tal como se indica mediante las posiciones de nucleótido:

```

1811          aaacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta
1861 cccatthttgc ggccaagtgc cgcacgagag gctggacctc ttcacacat tgacttacgc
1921 cgttgctttt ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgccaa agagccgggtg
1981 tctgataatc ccattttcct gttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg
2041 ttggttggtt ggtttggtt ttgtttaata tgcctgttt tctactctg ttggaaaata
2101 tttggggttg aaataaacca gtgggagcat ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2161 aaaaaa
(SEQ ID NO:5)

```

En ejemplos no limitativos, el método implica detectar y/o cuantificar ARNm de la variante 2 de DENND1A amplificando un segmento del ARNm, en el que los productos de amplificación comprenden SEQ ID NO:5, o un segmento contiguo más corto de la misma, en el que el segmento contiguo puede excluir, por ejemplo, la cola de poli-A. Por tanto, en una realización, el producto de amplificación puede comprender el marco de lectura abierto en 3' de la variante 2 de DENND1A distinta (ARNm o ADNc) entre e incluyendo los nucleótidos 1811-1913 y la secuencia 3' UTR desde 1914-2132:

```

1811      aaacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta
1861 cccattttgc ggccaagtcc cgcacgagag gctggacctc ttcacacat tgacttacgc
1921 cgttgctttt ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgcaa agagccggtg
1981 tctgataatc ccattttcct gttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg
2041 ttggttgggt ggtttgggtt ttgtttaata tgccctgttt tctacttctg ttggaaaata
2101 tttggggttg aaataaacca gtgggagcat gg (SEQ ID NO:6)

```

5 o un segmento de SEQ ID NO:6 que tiene, por ejemplo, al menos 10 nucleótidos de longitud. Se mantiene la numeración de nucleótidos en esta secuencia a partir de la secuencia de ADNc de longitud completa presentada anteriormente. En una realización, los productos de amplificación comprenden un producto que comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:6. En una realización, al menos 18 polinucleótidos contiguos están presentes en un producto de amplificación que tiene desde 24 hasta 200 pares de bases (pb), inclusive e incluyendo todos los números enteros entremedias. En una realización, un producto de amplificación de este tipo tiene desde 80-100 pb. Dado el beneficio de la presente divulgación, los expertos en la técnica reconocerán que una sonda y/o cebador para su uso en la invención puede ser complementario o idéntico a un segmento contiguo de SEQ ID NO:6. En una realización, tal sonda o cebador tiene al menos 18 nucleótidos de longitud. En una realización, tal sonda o cebador tiene desde 18 hasta 24 nucleótidos de longitud, inclusive, e incluyendo todos los dígitos entremedias. En determinadas realizaciones, tal sonda o cebador es idéntico o complementario sólo a la parte de ARNm de la variante 2 de DENND1A que consiste en SEQ ID NO:6.

15 Por consiguiente, la invención proporciona cebadores que pueden amplificar un polinucleótido que comprende o que consiste en SEQ ID Neo: o SEQ ID NO:6.

20 En realizaciones no limitativas, los cebadores que se usan para detectar y/o cuantificar ARNm de la variante 2 de DENND1A son los siguientes: cebador directo (5'-GGGCTGACTTCGCAGTGTGT-3' SEQ ID NO:7), cebador inverso (5'-ACAGTTCAGGTGATAAGCAGGAAA-3' SEQ ID NO:8).

25 En una realización, puede medirse el ARNm de la variante 2 de DENND1A mediante la hibridación de una sonda marcada de manera detectable, y la detección de la señal del marcador detectable si la sonda se hibrida con el ARNm, o su equivalente de ADNc. La sonda marcada de manera detectable puede tener la misma longitud y composición de nucleótidos tal como se describió anteriormente para cebadores, o puede tener mayor longitud. Un ejemplo no limitativo de una sonda que puede usarse en la detección/cuantificación de ARNm de la variante 2 de DENND1A tiene la secuencia: CCAAAGAGC/ZEN/CGG TGT CTGATAATCCCA, (SEQ ID NO:9) en la que "ZEN" significa la ubicación de un resto de extinción secundario que aumenta la sensibilidad de RT-PCR. El resto "ZEN" se muestra como en la sonda en una ubicación ilustrativa pero puede estar situado en otro lugar en la sonda, según se desee. Esta sonda puede usarse como agente para detectar ARNm de la variante 2 de DENND1A o ADNc mediante hibridación con los mismos, o puede usarse, por ejemplo, como sonda marcada que emite una señal detectable que se extingue durante un ensayo tal como RT-PCR.

35 En determinadas realizaciones, el método de la invención incluye separar ARNm de la variante 2 de DENND1A de la muestra biológica, y mezclar el ARNm separado de la variante 2 de DENND1A en un recipiente de reacción con reactivos que no se producen de manera natural, incluyendo pero sin limitarse necesariamente a sondas y/o cebadores oligonucleotídicos sintéticos. Los reactivos adicionales que pueden añadirse a la mezcla de reacción incluyen, pero no se limitan a, sales, tampones y similares, una ADN polimerasa recombinante procariota o de bacteriófago, nucleótidos trifosfato libres, etc.

45 En determinadas realizaciones, someter a prueba una muestra biológica que comprende o que podría comprender ARNm de la variante 2 de DENND1A incluye la amplificación del ARNm de la variante 2 de DENND1A usando una máquina, tal como a termociclador, que somete los ácidos nucleicos en la muestra a tandas sucesivas de calentamiento (fusión) y enfriamiento para facilitar una amplificación basada en PCR del ARNm para dar su ADNc relacionado, o un segmento del mismo. Por tanto, en determinadas realizaciones, la invención implica crear y/o someter a prueba un ADNc o un segmento de un ADNc a partir de ARNm de la variante 2 de DENND1A.

50 En determinadas realizaciones, someter a ensayo la variante 2 de DENND1A se realiza directamente en células o tejidos, tal como mediante métodos inmunohistoquímicos o hibridaciones *in situ*.

55 En otras realizaciones, la proteína de la variante 2 de DENND1A puede detectarse usando cualquier técnica o reactivo adecuado, y conllevará generalmente separar la proteína de la variante 2 de DENND1A de la muestra biológica y hacer reaccionar la proteína separada con al menos una pareja de unión de la variante 2 de DENND1A específica. Tales parejas de unión puede incluir, pero no se limitan necesariamente a, anticuerpos, ya sean policlonales o monoclonales, y fragmentos de anticuerpo que pueden unirse específicamente a la proteína de la variante 2 de DENND1A, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fd, fragmentos Fv y fragmentos scFv. Otras parejas de unión de la variante 2 de DENND1A específicas pueden incluir aptámeros, diacuerpos, o cualquier otro reactivo que pueda reconocer específicamente la proteína de la variante 2 de DENND1A. La detección de un complejo de una pareja de unión específica y la proteína de la variante 2 de

DENND1A puede realizarse usando cualquier técnica adecuada, incluyendo inmunotransferencia de tipo Western, y otros métodos de inmunodetección, tales como ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), una prueba de flujo lateral, tal como una tira reactiva de orina o sangre, y similares.

5 En determinadas realizaciones, la invención incluye el uso de parejas de unión que pueden distinguir la proteína de la variante 2 de DENND1A de la proteína de la variante 1 de DENND1A mediante la detección, por ejemplo, de estas proteínas después de haberse separado unas de otras basándose en su tamaño y/o movilidad. En una realización ilustrativa, se usó un anticuerpo monoclonal (AcM) adquirido de Aviva Systems Biology. El AcM es específico para los extremos N-terminales de las variantes 1 y variante 2 de DENND1A, y por consiguiente puede reconocer cada una de estas proteínas, pero puede diferenciar entre ellas cuando se separan basándose en su contenido de aminoácidos respectivo. En particular, la proteína de la variante 1 de DENND1A tiene un tamaño aproximado de 110 kD mientras que la proteína de la variante 2 de DENND1A tiene un tamaño aproximado de 62 kD. Por tanto, pueden distinguirse unas de otras usando un AcM en una variedad de métodos de inmunodetección, incluyendo pero sin limitarse necesariamente a inmunotransferencia de tipo Western.

15 En otras realizaciones, la invención puede detectar/cuantificar la proteína de la variante 2 de DENND1A usando una pareja de unión que se dirige a uno o más epítomos en su extremo C-terminal de 33 aminoácidos único. La secuencia de 33 aminoácidos que es única entre las variantes 1 y 2 de DENND1A es: NTIATPDLHILQKSITHFAAKFPTRGW TSSSH (SEQ ID NO: 10). Se han empleado anticuerpos policlonales que se dirigen a un segmento de esta secuencia de aminoácidos C-terminal única de la variante 2 de DENND1A. Específicamente, se usó el anticuerpo policlonal (de conejo) contra la variante 2 de DENND1A dirigido al siguiente segmento de secuencia de 15 aminoácidos único: QKSITHFAAKFP TRGWTSSSH (SEQ ID NO:11). Se han utilizado estos anticuerpos policlonales para detectar la proteína de la variante 2 de DENND1A y se ha detectado la misma proteína obtenida con el anticuerpo N-terminal descrito anteriormente. Se eligió el segmento de secuencia de 15 aminoácidos basándose en un análisis de los solicitantes que predijo que era antigénico de forma óptima, y que no era probable que diera como resultado una producción de anticuerpos que tuvieran reactividad cruzada no específica con otras proteínas.

30 Si se desea, la determinación de ARNm y/o proteína de la variante 2 de DENND1A puede compararse con una referencia. La referencia con la que pueden compararse los niveles de ARNm y/o proteína de la variante 2 del individuo puede ser cualquier referencia adecuada, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, muestras obtenidas de individuos que no tienen el estado particular para el que se busca un diagnóstico, tal como SOPQ. Tales referencias pueden incluir controles correspondientes (es decir, correspondientes para la edad, el sexo, u otros datos demográficos), una(s) curva(s) normalizada(s), y/o controles diseñados experimentalmente tales como ARN o proteína de entrada conocidos usados para normalizar datos experimentales para la determinación cualitativa o cuantitativa de la variante 2 de DENND1A de la muestra para determinar la masa, molaridad, concentración y similares. El nivel de la referencia también puede representarse gráficamente como un área en una gráfica. En determinadas realizaciones, la determinación de ARNm y/o proteína de la variante 2 en una muestra en una cantidad por encima de una referencia es un diagnóstico de SOPQ, o ayuda al médico en el diagnóstico de SOPQ.

40 En determinadas realizaciones, la referencia son células de la teca normales, que se comparan con células de la teca con SOPQ. En otra realización, la referencia es una muestra que contiene exosomas de un individuo que no tiene SOPQ.

45 En determinadas realizaciones, la determinación de un aumento del ARNm de la variante 2 de DENND1A de al menos 1,5 veces en una muestra en comparación con una referencia es un diagnóstico de SOPQ o ayuda en el diagnóstico de SOPQ. En determinadas realizaciones, el aumento con relación a una referencia es de al menos 2,0, 3,0 o 4,0 veces, inclusive, e incluyendo todos los dígitos entremedias, y hasta el primer decimal.

50 En un aspecto, la invención incluye determinar si un sujeto es un candidato o no para recibir un tratamiento profiláctico o terapéutico para un estado que se correlaciona positivamente con la expresión de la variante 2 de DENND1A. En una realización, el estado es SOPQ. El método comprende generalmente someter a prueba una muestra del sujeto para determinar la presencia o ausencia o cantidad de la variante 2 de DENND1A. La presencia de la variante 2 de DENND1A o de una cantidad de la variante 2 de DENND1A por encima de una referencia es indicativa de que el individuo es un candidato para una intervención profiláctica o terapéutica para SOPQ. El método puede comprender además tratar al individuo para SOPQ. El individuo puede tratarse con cualquier intervención para SOPQ, incluyendo pero sin limitarse a intervenciones quirúrgicas. Ejemplos no limitativos adicionales de terapias incluyen inducción de ovulación con citrato de clomifeno o gonadotropinas para las mujeres que tratan de quedarse embarazadas o píldoras anticonceptivas orales para las mujeres que buscan un alivio sintomático para manifestaciones de hiperandrogenemia. Puede usarse una pérdida de peso o fármacos como la metformina para tratar características metabólicas de SOPQ.

65 En otro aspecto, la invención incluye monitorizar el tratamiento del paciente para un estado que se correlaciona positivamente con la expresión de la variante 2 de DENND1A. En una realización, el estado es SOPQ. El método comprende opcionalmente someter a prueba una muestra del individuo para establecer la presencia y/o cantidad u otro valor para la expresión de la variante 2 de DENND1A a nivel de ARNm y/o proteína, y por consiguiente proporciona un valor inicial de expresión de la variante 2 de DENND1A. Durante o de manera posterior al

tratamiento, el método comprende obtener y someter a prueba una muestra del individuo para establecer la presencia y/o cantidad u otro valor para la expresión de la variante 2 de DENND1A a nivel de ARNm y/o proteína, y por consiguiente proporciona un valor de tratamiento. El valor de tratamiento puede determinarse a lo largo de múltiples puntos de tiempo. Se considera que una reducción del valor de tratamiento (es decir, una reducción del ARNm o la proteína de la variante 2 de DENND1A) con relación al valor inicial, y/o una reducción a lo largo del transcurso del tratamiento, es indicativa de que el tratamiento es eficaz. Si no hay un cambio para el valor de tratamiento con relación a un valor inicial o a valores de tratamiento a lo largo del tiempo, esto es indicativo de que el tratamiento no es eficaz, y/o que debe considerarse un tratamiento alternativo.

En una realización, la invención proporciona un paquete o recipiente cerrado o sellado que contiene composiciones útiles para someter a prueba muestras biológicas para determinar el ARNm o la proteína de la variante 2 de DENND1A. Las composiciones pueden incluir cebadores o sondas tal como se han descrito adicionalmente en el presente documento, y pueden incluir reactivos usados para la hibridación de las sondas o los cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos o para la detección directa de ácidos nucleicos, para la extracción y prueba de proteínas, y pueden incluir reactivos para el procesamiento de una muestra biológica, tal como para el procesamiento de muestras biológicas líquidas que podrían contener ARNm o proteína de la variante 2 de DENND1A. En determinadas realizaciones, el paquete puede comprender uno o más viales, frascos cerrados o sellados, o cualquier otro recipiente o envase adecuado que comprende reactivos, y que se diseñan para la venta o distribución, contención o uso de los reactivos. Además de los reactivos para detectar ARNm o proteína de la variante 2 de DENND1A, el paquete puede contener información impresa. La información impresa puede proporcionarse en una etiqueta, o en un prospecto, o imprimirse en el propio material de acondicionamiento. La información impresa puede incluir información que identifica el contenido del paquete, una indicación de qué marcador pretenden detectar los reactivos y/o con qué estado está relacionado el marcador, tal como SOPQ, e instrucciones para el uso del contenido del paquete para las pruebas. En determinadas realizaciones, se considera que los paquetes son kits.

En diversas realizaciones, la invención comprende fijar en un medio tangible el resultado obtenido mediante las pruebas para determinar el ARNm o la proteína de la variante 2 de DENND1A. El medio tangible puede ser cualquier tipo de medio tangible, tal como cualquier tipo de medio digital, incluyendo pero sin limitarse a un DVD, un CD-ROM, un dispositivo portátil de memoria flash, o un informe impreso o digitalizado, etc., tal como una hoja de cálculo o un documento de procesamiento de texto. La invención incluye proporcionar el medio tangible a un profesional sanitario para ayudar con el desarrollo de un diagnóstico y/o recomendación para el tratamiento del individuo y/o para desarrollar un pronóstico para el individuo, tal como para tratar SOPQ.

La siguiente descripción y ejemplos específicos se proporcionan para ilustrar la invención, pero no pretenden ser limitativos en modo alguno. El ejemplo 10 proporciona una descripción ampliada de materiales y métodos usados para obtener los datos tal como se describe adicionalmente a continuación por medio de los ejemplos 1 a 9.

#### Ejemplo 1

Este ejemplo proporciona los datos obtenidos del análisis de la acumulación de ARNm de CYP17 y la biosíntesis de DHEA. Las figuras 1A y 1B proporcionan resúmenes gráficos de datos que demuestran que aumentan la acumulación de ARNm de CYP17 y la producción de DHEA tanto basales como estimuladas por AMPc en células de la teca con SOPQ propagadas en cultivo a largo plazo. La figura 1A muestra que se evaluó la abundancia de ARNm de CYP17 en células de la teca del cuarto pase que se aislaron de 5 mujeres independientes con ciclos normales y 5 mujeres independientes con SOPQ, que se hicieron crecer hasta subconfluencia y se transfirieron a medio libre de suero con vehículo, (condiciones de control) o forskolina 20  $\mu$ M (F). 16 h tras el tratamiento, se recogió el ARNm, y se midió la acumulación de ARNm de CYP17 usando análisis por PCR cuantitativa en tiempo real. Se normalizan los valores de ARNm de CYP17 mediante ARNm de TBP y se presentan como abundancia relativa. Tal como se demuestra mediante los datos representados en la figura 1A, aumentó significativamente la acumulación de ARNm de CYP17 en células de la teca con SOPQ en comparación con células de la teca normales tratadas en condiciones basales y de estimulación por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ). Para evaluar si aumenta la biosíntesis de andrógenos en células de la teca aisladas de mujeres con SOPQ en comparación con mujeres con ciclos normales, se trataron células de la teca del cuarto pase aisladas de múltiples mujeres normales y con SOPQ en presencia o ausencia (control) de forskolina 20  $\mu$ M (F). Tras 72 h de tratamiento, se recogieron los medios, se evaluó la producción de DHEA mediante ELISA, y se normalizaron los datos con respecto al número de células. Se presentan los resultados como la media  $\pm$  E.E.M. de los niveles de esteroides en cultivos de células de la teca por triplicado de 4 mujeres independientes normales y con SOPQ. Tal como se muestra en la figura 1B, la biosíntesis de DHEA en células de la teca con SOPQ aumentó significativamente en condiciones tanto basales como de estimulación por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ).

#### Ejemplo 2

Este ejemplo proporciona una descripción de los datos obtenidos del análisis de la actividad del promotor de CYP17A1. Para comparar la regulación transcripcional del gen CYP17A1 en células de la teca normales y con SOPQ, se transfectaron de manera transitoria células con constructos de pGL3 luciferasa que contenían -770, -235,

-188, -147 o de -61 a +44 pb de la secuencia flanqueante en 5' del gen *CYP17A1*. Todos los constructos contienen la caja TATA endógena y el sitio de iniciación de la transcripción. Se transfectaron de manera transitoria células de la teca del cuarto pase de mujeres con ciclos normales y con SOPQ con los constructos anteriores. Tras la transfección, se cultivaron las células en medio de transfección solo o con forskolina (20  $\mu$ M) durante 24 h. Se presentan los datos como la actividad luciferasa (LUC) relativa que se normalizó con la actividad  $\beta$ -galactosidasa, y representan la media  $\pm$  E.E.M. de experimentos independiente en 5 cultivos de células de la teca normales y 5 con SOPQ. Tal como se muestra en la figura 2, la actividad del promotor de *CYP17A1* aumentó significativamente en células de la teca con SOPQ, tanto en condiciones basales como de estimulación por forskolina (\*,  $P<0,01$ ), en comparación con células de la teca normales para constructos de promotor individuales.

### Ejemplo 3

Este ejemplo proporciona datos y una descripción del análisis de la acumulación de ARNm de DENND1A en células normales y con SOPQ y su transcurso temporal. Los datos de este análisis se resumen en las figuras 3 y 4.

La figura 3A muestra que no se expresa ARNm de la variante 1 de DENND1A de manera diferencial en células de la teca normales y con SOPQ. Se cuantificó la acumulación de ARNm de la variante 1 y la variante 2 de DENND1A en células de la teca del cuarto pase aisladas de 5 mujeres individuales normales y 5 mujeres individuales con SOPQ que se hicieron crecer en cultivo hasta subconfluencia, luego se trataron con y sin forskolina 20  $\mu$ M, un activador de la adenilato ciclasa durante 16 h en medio libre de suero. Tras el tratamiento, se recogió el ARN y se cuantificó la abundancia de ARNm de la variante 1 (figura 3A) y la variante 2 (figura 3B) de DENND1A mediante análisis por PCR en tiempo real, y se normalizó usando la abundancia de ARNm de TBP. La comparación de la acumulación de ARNm de la variante 1 de DENND1A en células de la teca normales y con SOPQ no demostró diferencias estadísticas en la acumulación de ARNm de la variante 1 de DENND1A basal y estimulada por forskolina en células de la teca normales y con SOPQ (figura 3A). En cambio, la acumulación de ARNm de la variante 2 de DENND1A aumentó significativamente en condiciones tanto basales (\*\*\*,  $P<0,01$ ) como de estimulación por forskolina (\*\*,  $P<0,05$ ) en células de la teca con SOPQ, en comparación con células normales (figura 3B).

Las figuras 4A y 4B muestran que la acumulación de ARNm de la variante 2 de DENND1A precede a la acumulación de ARNm de CYP17 en células de la teca normales y con SOPQ. Se examinaron los transcurros temporales de la acumulación de ARNm de la variante 2 de DENND1A (figura 4A) y CYP17 (figura 4B) en células de la teca normales o con SOPQ tratadas en medio libre de suero durante 0, 4, 8, 16, 24 ó 48 h en presencia y ausencia de forskolina 20  $\mu$ M. Se midió la abundancia de ARNm de la variante 2 de DENND1A y CYP17 usando PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizó mediante la abundancia de TBP. La acumulación de ARNm de DENND1A.V2 aumenta rápidamente entre las 4-8 h y forma una meseta alrededor de las 16-20 h en células con SOPQ (figura 4A). En células normales, se observa la misma tendencia, aunque es menos rápida y de magnitud inferior. De acuerdo con los datos en la figura 3B, la acumulación de ARNm de DENND1A.V2 se eleva ~2-3 veces en células con SOPQ en comparación con células normales. En cambio, la acumulación de ARNm de CYP17 aumenta en respuesta al tratamiento con forskolina a lo largo de las 8-48 h, con un aumento de ~2-3 veces del ARNm de CYP17 estimulado por forskolina en células normales, y un aumento de ~10-40 veces en células con SOPQ (figura 4B). Los datos presentados en cada una de las figuras 4A y 4B se obtuvieron de 2 sujetos normales y 2 pacientes con SOPQ, que son representativos de los datos recopilados de las células de la teca de 5 sujetos normales y 5 pacientes con SOPQ.

### Ejemplo 4

Este ejemplo presenta una caracterización de las proteínas codificadas por las variantes 1 y 2 de DENND1A mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Para evaluar la proteína DENND1A en células de la teca humanas, se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western en extractos nucleares y de células completas. Para comparar la expresión de proteína DENND1A en células de la teca normales y con SOPQ, se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western con 35  $\mu$ g de extractos de células completas de células de la teca aisladas de múltiple sujetos normales y pacientes con SOPQ tratados con y sin forskolina 20  $\mu$ M durante 24 h. A partir de los resultados de estos experimentos, se esperaban bandas a aproximadamente 110 kD, correspondientes a la variante 1 de DENND1A, y a aproximadamente 62 kD correspondientes a la variante 2 de DENND1A. Tal como se muestra en la figura 5A, un análisis de inmunotransferencia de tipo Western representativo demuestra un aumento de la variante 2 de DENND1A (DENND1A.V2) de 62 kD en células de la teca con SOPQ. En la figura 5B, la comparación de 25  $\mu$ g de extractos de células completas y extractos nucleares de células de la teca con SOPQ tratadas con y sin forskolina 20  $\mu$ M durante 24 h, mostró que la variante 2 de DENND1A de 62 kD estaba presente en el componente nuclear de células de la teca con SOPQ. No se detectó la variante 1 de DENND1A de 110 kD en extractos nucleares o de células completas de sujetos normales o con SOPQ.

### Ejemplo 5

Este ejemplo describe los efectos de la expresión de la variante 2 de DENND1A sobre la acumulación de ARNm de CYP17 y DHEA.

Para examinar los efectos de la variante 2 de DENND1A sobre la biosíntesis de DHEA y la acumulación de ARNm de CYP17 se obtuvo un adenovirus que expresa DENND1A.V2 de Applied Biological Materials, Richmond, BC.

5 Se construyó el adenovirus para DENND1A.V2 (es decir, hDENND1A.V2-pADenoG) clonando DENND1A.V2 a partir del plásmido pCMV6-XL4 que codifica para la variante 2 de DENND1A en pADenoG, de Origene, Rockville, MD. También se obtuvo un adenovirus de control o Null (adenovirus Null-pAdenoG, de Applied Biological Materials, Richmond, BC.

10 En estos experimentos, se infectaron placas de 6 pocillos de células de la teca normales del cuarto pase con 0,3, 1,0, 3,0 y 10 ufp/célula de cualquier adenovirus vacío (Null) o que exprese DENND1A.V2, se trataron con o sin forskolina 20  $\mu$ M en medio libre de suero. Tras 72 h de tratamiento, se cuantificó DHEA en los medios. Tal como se muestra en la figura 6A, la infección con todas las dosis de adenovirus para DENND1A.V2 aumentó significativamente la producción de DHEA estimulada por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ) en comparación con el adenovirus  
15 Null de control (figura 6A). La infección posterior de células de la teca normales con 3,0 ufp de adenovirus que expresa DENND1A.V2 mostró un aumento significativo en la biosíntesis de DHEA estimulada por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ) en comparación con células infectadas con adenovirus Null (figura 6B). Para examinar los efectos de la expresión de DENND1A.V2 sobre la acumulación de ARNm de CYP17, se infectaron cultivos de 100 mm de células de la teca normales del cuarto pase con 1,0 ufp/célula de adenovirus para DENND1A.V2, o adenovirus Null, y se trataron con o sin forskolina 20  $\mu$ M durante 16 h. Tras el tratamiento, se recogió el ARN, y se cuantificó la abundancia de ARNm de CYP17 usando un protocolo de QRT-PCR Brilliant III Ultra Fast de una sola etapa y se normalizó mediante la abundancia de TBP. Tal como se muestra en la figura 6C, 10 ufp de adenovirus para DENND1A.V2 aumenta significativamente la acumulación de ARNm de CYP17 en células normales, con y sin estimulación por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ), en comparación con la infección con adenovirus Null.

#### 25 Ejemplo 6

Este ejemplo proporciona una descripción de los efectos de la expresión de la variante 2 de DENND1A sobre la regulación del promotor de *CYP17A1*.

30 Para examinar los efectos de la variante 2 de DENND1A sobre la transcripción génica de *CYP17A1*, se transfectaron células de la teca con constructos del gen indicador *CYP17A1* que contenían -770/+44 de las regiones flanqueantes en 5' del gen *CYP17A1* humano fusionado a la luciferasa. Se construyó este constructo subclonando el fragmento 770/+44 (Kpnl/Nacl) de la secuencia flanqueante en 5' de *CYP17A1* en el vector básico pGL3 de luciferasa (Promega Corp, Madison, WI).

En estos experimentos, se transfectaron células de la teca normales del cuarto pase en placas de 6 pocillos usando fosfato de calcio en un incubador con el 3% de CO<sub>2</sub>, el 95% de aire ambiental a 37°C. La reacción de transfección contenía 2  $\mu$ g/pocillo de plásmido de luciferasa promotor, y 100 ng/pocillo de plásmido, que expresa  $\beta$ -galactosidasa (usado para la normalización de la eficacia de transfección entre réplicas y experimentos de transfección). Una hora tras la transfección, se sometieron las células a choque con glicerol en glicerol al 15% y se infectaron con el adenovirus para DENND1A.V2 (hDENND1A.V2-pADenoG) o Null-pAdenoG. hDENND1A.V2-pADenoG se pidió de manera personalizada a Applied Biological Materials, BC. Una hora después de eso, se trataron las células con medio libre de suero con y sin forskolina 20  $\mu$ M, un activador de la adenilato ciclasa. 24 h después de eso, se retiraron los medios y se congelaron las células, se resuspendieron en tampón de lisis de indicador (Promega, Madison, WI.), y se determinó la actividad luciferasa utilizando el sistema de ensayo de luciferasa (Promega, Madison, WI.) en un luminómetro Sirius (Zylux Corp., TN). Se determinó la actividad  $\beta$ -Gal usando un sistema Galacto-Light Plus (Applied Biosystems, Grand Island, NY). Se realizaron transfecciones por triplicado, se normalizaron usando  $\beta$ -galactosidasa, y se calculó  $\pm$  E.E.M. Los resultados de los experimentos mostrados en la  
40 figura 6D demuestran que la expresión de la variante 2 de DENND1A estimuló significativamente la función del promotor de *CYP17A1* tanto de manera basal (\*,  $P < 0,05$ ) y como con estimulación por forskolina (\*,  $P < 0,01$ ) en células de la teca, en comparación con el plásmido de control. Se cree que estos son los primeros datos que sugieren que la variante 2 de DENND1A tiene la capacidad de aumentar la expresión génica de *CYP17A1* en células de la teca humanas.

#### 55 Ejemplo 7

Este ejemplo proporciona una descripción de los efectos de plásmidos de retrovirus de ARNhp1 y ARNhp2 de la variante 2 de DENND1A sobre la regulación del promotor de *CYP17A1* y el ARNm de CYP17, así como los efectos de partículas de lentivirus de ARNhp de la variante 2 de DENND1A sobre la biosíntesis de DHEA. Para investigar si una reducción de la expresión de DENND1A.V2 reduce el ARNm de CYP17 elevado en células de la teca con SOPQ, se transfectaron plásmidos de retrovirus de ARNhp de DENND1A.V2 de silenciamiento en células de la teca con SOPQ y se evaluó el mensaje de CYP17. Se transfectaron células de la teca con SOPQ con plásmidos retrovirales de ARNhp de DENND1A.V2 y plásmidos de control de Origene, en plásmidos de retrovirus pRSV (HUSH). Se dirigió el plásmido de ARNhp1 retroviral de DENND1A a la secuencia de DENND1A.V2 5'-

CGACGAGAGGCTGGACCTCTTAC-3' (SEQ ID NO:12). Se dirigió el plásmido de retrovirus de ARNhp2 de DENND1A.V2 a 5'-CCTCTTCATCACATTGACTTACG-3' (SEQ ID NO:13). En resumen, en estos experimentos se transfectoron células de la teca del cuarto pase en placas de 100 mm con reactivo de transfección Genejuice (Novagen, Madison, WI) y 4 µg/placa de vector de expresión vacío o 4 µg/placa de plásmidos reorganizados de pRSV o específicos para la variante 2 de DENND1A, es decir, pSV-shRNA1 o pRSV-shRNA2 en medio Optimem en un incubador con el 3% de CO<sub>2</sub>, el 95% de aire ambiental a 37°C. Tras 6 h de transfección, se enjuagaron las células con PBS, y se trataron en medio libre de suero con y sin forskolina 20 µM, un activador de la adenilato ciclasa. 24 h después de eso, se retiraron los medios y se congelaron las células, se recogió el ARN total, y se cuantificó la abundancia de ARNm de TBP y CYP17 usando un protocolo de QRT-PCR Brilliant III Ultra Fast de una sola etapa. Tal como se muestra en la figura 7A, ARNhp1 y ARNhp2 de DENND1A.V2 inhibieron significativamente la acumulación de ARNm de CYP17 tanto basal (\*,  $P < 0,05$ ) como estimulada por forskolina (\*,  $P < 0,01$ ) en células de la teca con SOPQ.

Se realizaron estudios para evaluar si los ARNhp de silenciamiento específicos para DENND1A.V2 podrían reducir la actividad del promotor de *CYP17A1*. Para examinar los efectos del silenciamiento de ARNm de la variante 2 de DENND1A sobre la transcripción de *CYP17A1*, se transfectoron células de la teca con SOPQ con constructos del gen indicador *CYP17A1* que contenían -235/+44 de las regiones flanqueantes en 5' del gen *CYP17A1* humano fusionado a la luciferasa. Se produjo este constructo subclonando el fragmento de -235/+44 (Sacl/NaeI) de la secuencia flanqueante en 5' del promotor de *CYP17A1* en el vector básico pGL3 de luciferasa usando pGL3 (Promega Corp., Madison, WI). En estos experimentos, se transfectoron células de la teca del cuarto pase con reactivo de transfección Genejuice (Novagen, Madison, WI) en medio Optimem en placas de 12 pocillos en un incubador con el 3% de CO<sub>2</sub>, el 95% de aire ambiental a 37°C. La reacción de transfección contenía 250 ng/pocillo de plásmido de luciferasa promotor, y 2,5 ng/pocillo de plásmido pRL, que expresa renilla (usada para la normalización de la eficacia de transfección entre réplicas y experimentos de transfección). También se añadió el vector de expresión pRV reorganizado o plásmido que codifica para pRV-shRNA1 o pRV-shRNA2 de la variante 2 de DENND1A, de Origene, Rockville, MD a la reacción de transfección a 1 µg/pocillo. Tras 6 h de transfección, se enjuagaron las células con PBS, y se trataron en medio libre de suero con y sin forskolina 20 µM como activador de la adenilato ciclasa. 24 h después de eso, se retiraron los medios y se congelaron las células, se resuspendieron en tampón de lisis de indicador (Promega, Madison, WI), y se determinó la actividad luciferasa utilizando el sistema dual de ensayo de luciferasa (Promega, Madison, WI) en un luminómetro Sirius (Zylux Corp., TN). Se realizaron transfecciones por triplicado, se normalizaron usando renilla, y se calculó  $\pm$  E.E.M.

Estos experimentos mostraron que la cotransfección de células de la teca con SOPQ con plásmido de retrovirus de ARNhp1 o ARNhp2 de DENND1A.V2 dio como resultado una inhibición significativa de la actividad indicadora de *CYP17A1* estimulada por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ), en comparación con ARNhp reordenado (figura 7B). Los resultados de estos experimentos muestran que la transfección de ARNhp1 y ARNhp2 de la variante 2 de DENND1A inhiben la actividad indicadora de *CYP17A1* tanto basal como dependiente de AMPc en células de la teca con SOPQ, en comparación con ARNhp reorganizado. Estos datos demuestran que la variante 2 de DENND1A confiere activación transcripcional aumentada de la expresión génica de *CYP17A1* en células de la teca con SOPQ.

Para evaluar el efecto del silenciamiento de DENND1A.V2 sobre la biosíntesis de DHEA, se infectaron células de la teca con SOPQ con un lentivirus para DENND1A.V2 de ARNhp de silenciamiento o un lentivirus sin silenciamiento de control en presencia o ausencia de forskolina durante 72 h tal como se detalló anteriormente y con las siguientes modificaciones. Se utilizaron partículas de ARNhp de DENND1A.V2 GIPZ de Thermo/Dharmacon personalizadas. Este lentivirus de ARNhp se dirige al equivalente de ARNm de la secuencia de DENND1A.V2 5'-CTCTTCATCACATTGACTT-3' (SEQ ID NO:14). Se infectaron placas de cultivo tisular de 100 mm de células de la teca con SOPQ confluentes al 50% con 300.000 partículas de lentivirus para DENND1A.V2 de ARNhp de silenciamiento o un lentivirus sin silenciamiento de control en medio libre de suero con Polybrene 5 µg/ml en medio libre de suero. Seis horas después de eso, se retiró la mezcla de lentivirus, se transfirieron las células a medio libre de suero en presencia o ausencia de forskolina durante 72 h. Tal como se muestra en la figura 7C, la infección con lentivirus para DENND1A.V2 de ARNhp de silenciamiento inhibió significativamente la biosíntesis de DHEA estimulada por forskolina (\*,  $P < 0,05$ ). Estos datos combinados respaldan que el silenciamiento de ARNm de la expresión de la variante 2 de DENND1A usando la metodología de ARNhp/ARNip da como resultado el aumento de la inhibición de la expresión génica de *CYP17A1*, la biosíntesis de andrógenos y ARNm de CYP17 en células de la teca con SOPQ.

#### Ejemplo 8

El ejemplo demuestra los efectos de la variante 2 de DENND1A sobre cambios dependientes de LH/hCG en la actividad del promotor de *CYP17A1* y DHEA. Se resumen los datos en las figuras 8A y 8B. En resumen, para examinar si DENND1A.V2 afecta a la biosíntesis de DHEA dependiente de LH/hCG, se infectaron células de la teca normales con 3 ufp/célula de adenovirus Null o para DENND1A.V2, y se trataron con y sin hCG 1,0 UI/ml durante 72 h. Tal como se muestra en la figura 8A, hCG no tuvo ningún efecto significativo sobre la biosíntesis de DHEA en células tratadas con adenovirus Null. En cambio, DENND1A.V2 aumentó significativamente la biosíntesis de DHEA (\*,  $P < 0,05$ ) con respecto a las células de control infectadas con adenovirus Null. La infección con DENND1A.V2

también potenció significativamente la biosíntesis de DHEA estimulada por hCG (\*,  $P < 0,05$ ) (figura 8A). Para examinar si DENND1A.V2 afecta a la expresión de *CYP17A1* dependiente de LH/hCG, se transfectaron células de la teca normales con el constructo de -770 *CYP17A1-luciferasa*, luego se infectaron con 3 ufp/célula de adenovirus Null o para DENND1A.V2. Se incluyó el adenovirus que expresa LHCGR (1,0 ufp/célula) en la infección para garantizar que no era un factor limitante el receptor de LH. Tras la transfección/infección, se trataron las células con y sin hCG 1,0 UI/ml durante 48 h. Tal como se muestra en la figura 8B, la función del promotor de *CYP17A1* estimulada por hCG aumenta en células infectadas con DENND1A.V2.

#### Ejemplo 9

El ejemplo demuestra que la invención es adecuada para detectar la variante 2 de DENND1A en orina. Con el fin de establecer esto, se comparó la abundancia de ARNm de la variante 2 de DENND1A en ARN exosómico aislado de orina de mujeres con ciclos normales y con SOPQ. Se obtuvieron muestras de orina al mediodía de ambas poblaciones de mujeres, y se centrifugaron en serie a 300 g a 4°C durante 10 minutos, 2000 g a 4°C durante 10 minutos y 12.000 g a 4°C durante 30 minutos. Entonces se extrajo el ARN exosómico del sobrenadante usando un protocolo modificado para el aislamiento de ARN de exosomas de orina, de Norgen, (Thorold, CAN). Entonces se cuantificó la abundancia de ARNm de la variante 2 de DENND1A usando PCR en tiempo real y se normalizó usando la abundancia de ARNm de 5S. Tal como se muestra en la figura 9, el ARNm de la variante 2 de DENND1A aumenta significativamente en exosomas de orina aislados de mujeres con SOPQ (\*,  $P < 0,01$ ), en comparación con mujeres con ciclos normales. Por tanto, se ha determinado que puede detectarse la variante 2 de DENND1A en orina, y si se desea, puede compararse con una referencia para establecer una correlación positiva de la variante 2 de DENND1A en orina con SOPQ.

#### Ejemplo 10

Este ejemplo proporciona una descripción de materiales y métodos usados para llevar a cabo los experimentos descritos en los ejemplos anteriores.

Aislamiento y propagación de células de la teca. Con respecto al aislamiento y propagación de células de la teca para su uso en los ejemplos descritos a continuación, para todos los experimentos en los que se obtuvieron datos de células de la teca normales y con SOPQ altamente caracterizadas, se usó tejido ovárico humano aislado de folículos individuales de mujeres con ciclos normales y con SOPQ que se han aislado, depositado en bancos, hecho crecer y sometido a pases en cultivo a largo plazo. Se obtuvo tejido de la capa interna de la teca humano de folículos de mujeres que se sometieron a histerectomía, tras obtener el consentimiento informado según un protocolo de IRB aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad Estatal de Pensilvania. Se disecaron los folículos individuales del estroma ovárico, y se dispersaron con colagenasa I al 0,05%, colagenasa IA al 0,05% y desoxirribonucleasa al 0,01%, en medio que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%, con antibióticos. Se seleccionaron por tamaño los folículos aislados para diámetros que oscilaban entre 3-5 mm de modo que pudieran compararse células de la teca derivadas de folículos de tamaño similar de sujetos normales y con SOPQ. Se cultivaron las células de la teca en placas recubiertas con fibronectina utilizando el medio de crecimiento descrito previamente (mezcla 1:1 de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DME) y F-12 de Ham que contenía FBS al 5%, suero equino (HS, *horse serum*) al 5%, UltroSer G al 2%, insulina 20 nM, selenio 20 nM, vitamina E 1  $\mu$ M y antibióticos). Se obtuvieron los sueros y factores de crecimiento de las siguientes fuentes: FBS y DME/F12 (Irvine Scientific, Irvine, CA); suero equino (Life Technologies, Grand Island, NY); UltroSer G (Reactifs IBF, Villeneuve-la-Garenne, Francia); se adquirieron los demás compuestos de Sigma (St. Louis, MO). Se hicieron crecer las células en tensión de oxígeno reducida (el 5% de O<sub>2</sub>, el 90% de N<sub>2</sub> y el 5% de CO<sub>2</sub>) y se les facilitaron antioxidantes complementarios (vitamina E y selenio) para impedir el daño oxidativo.

Se realizaron experimentos que compararon teca con SOPQ y normal utilizando células de la teca de cuarto pase (31-38 duplicaciones de población) aisladas de folículos de tamaño correspondiente obtenidos de sujetos de edad correspondiente. El uso de las células de cuarto pase permitió realizar múltiples experimentos de la misma población de pacientes, y se propagaron a partir de reservas congeladas de células del segundo pase en los medios descritos anteriormente. Para todos los estudios, se examinaron los cultivos de células de la teca obtenidos de numerosos pacientes independientes, para confirmación. Las condiciones de los pases y las razones de fraccionamiento para todas las células normales y con SOPQ fueron idénticas.

El tejido ovárico con SOPQ y normal provenía de mujeres de edad correspondiente, con 38-40 años de edad. Se realizó el diagnóstico de SOPQ según directrices de consenso de NIH, que incluyen hiperandrogenemia, oligoovulación, ovarios poliquísticos, y la exclusión de la deficiencia en 21 $\alpha$ -hidroxilasa, el síndrome de Cushing y la hiperprolactinemia. Todas las preparaciones de células de la teca con SOPQ estudiadas provenían de ovarios de mujeres con menos de seis menstruaciones al año y niveles elevados en suero de testosterona total o testosterona biodisponible. Cada uno de los ovarios con SOPQ contenía múltiples folículos subcorticales de menos de 10 mm de diámetro. Las preparaciones de células de la teca de control (normales) provenían de ovarios de mujeres fértiles con historias de menstruaciones normales, ciclos menstruales de 21-35 días, y sin signos clínicos de hiperandrogenismo. Ni los sujetos con SOPQ ni los normales estaban recibiendo medicaciones hormonales en el momento de la cirugía. Las indicaciones para la cirugía fueron metrorragia funcional, cáncer de endometrio y/o dolor pélvico.



Cuantificación de ARNm de la variante 1 de DENND1A, la variante 2 de DENND1A y CYP17. Para aquellos datos presentados a continuación en los que se cuantifica ARNm, se usaron los siguientes materiales y métodos.

5 Se determinó la abundancia de ARN de la variante 1 de DENND1A, la variante 2 de DENND1A, CYP17, proteína de unión a caja TATA (TBP) y ARN ribosómico de 5S mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando la mezcla maestra de QRT-PCR Brilliant III Ultra Fast de una sola etapa (Agilent) usando 100 µg de ARN total/tubo, se determinó la concentración final de cada cebador directo e inverso usando las especificaciones del fabricante. Se proporcionan a continuación en detalle las secuencias de cebador y sonda específicas usadas.

10 El conjunto de cebador y sonda para ARNm específico de la variante 2 de DENND1A usado era específico para la secuencia de 3'UTR de DENND1A, de la que se presenta la secuencia completa en el presente documento comenzando en el nt 1914 (excepto por la cola de poliA):

```
1914                                     cttacgc
1921 cgttgctttt ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgcca agagccgggtg
1981 tctgataatc ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg
2041 ttggtttggtt ggtttgttgt ttgtttaata tgccctgttt tctacttctg ttggaaaata
15 2101 tttgggggttg aaataaacca gtgggagcat gg (SEQ ID NO:15)
```

Para amplificar la 3'UTR de DENND1A única descrita anteriormente, se usaron los siguientes cebadores: cebador directo (5'-GGGCTGACTTCGCAGTGTGT-3' - (SEQ ID NO:7); cebador inverso (5'-ACAGTTCCAGGTGATAAGCAGGAAA-3' - SEQ ID NO:8); sonda (5'/56-FAM/CCAAAGAGC/ZEN/CGG TGT CTGATAATCCCA/3IABKFQ/-3' - (SEQ ID NO:9)). (Posición NM\_024820,2, directo 1951, sonda 1967, inverso inicio 5'-2018). Se usaron cebadores 200 nM y sonda 200 nM para la reacción. Se seleccionaron estas secuencias de cebadores y sondas particulares para mitigar la posibilidad de que pudieran hibridarse con otros ARNm que pudieran estar presentes en las muestras.

25 El conjunto de cebador y sonda para ARNm específico de la variante 1 de DENND1A: cebador directo (5'-GGATTCATTTCCATAAACCAAGTTAAA-3' SEQ ID NO:16), cebador inverso (5'-CACAAATTCCTGCGTGTCTCA3' SEQ ID NO:17), sonda (5'/56-FAM/ATGGCCCGA/ZEN/CCATTT AAGAAAACAACCA/#IA3BkFQ/-3 SEQ ID NO:18) (Posición NM\_024820,1, directo 4434, sonda 4463, inverso inicio 5'-4513). Se usaron cebadores 200 nM y sonda 200 nM para la reacción.

30 El conjunto de cebador y sonda para ARNm de CYP17. Cebador directo (5'-GGCCTCAAAA TGGCAAC TCTAGA-3' SEQ ID NO:19); Cebador inverso (5'-CTTCTGATCGCCATCCTTGAA-3' SEQ ID NO:20) sonda (5' 6-FAM-TCGCGTCCAACAACCGTAAGGGTATC-3' BHQ-1,3' SEQ ID NO:21). (Posición NM\_00012, directo 328, sonda 391, inverso inicio 5'-464). Cebador y sonda 200 nM.

35 El conjunto de cebador y sonda para ARNm de proteína de unión a caja TATA (TBP). Se determinó TBP para cada muestra de ADNc en células de la teca para la normalización. Cebador directo (5'-CACGGC ACTGATTTTCAGTTC-3' SEQ ID NO:22). Cebador inverso (5'-TCTTGCTGCCAGTCTGGACT-3' SEQ ID NO:23), sonda (5'-JOE-TGTGCACAGGAGCCAAGAGTGAAGA-3' BHQ-1,3 SEQ ID NO:24').

40 El conjunto de cebador y sonda para ARN ribosómico de 5S. Se determinó 5S para cada muestra de ADNc en ARN exosómico de orina para la normalización. Cebador directo (5'-GCCTCCTCAGCGTCTAC), cebador inverso (5'GTCTCCCATCCAAGTACTAACC - 3' SEQ ID NO:25, sonda (5' 'HEX-TCTCGTCTG/ZEN/ATCTCGGAAGCTAAGCA-3'IABKFQ-1' SEQ ID NO:26). (Posición X51545, directo 262, sonda 306, inverso inicio 5' 343). Se usaron cebadores 50 nM y sonda 50 nM para la reacción.

Se llevó a cabo PCR de una etapa específica de gen por duplicado para cada muestra de ARNm y para una serie de diluciones en serie en un sistema de termociclador Mx3000 (Stratagene, Santa Clara, CA) según las instrucciones del fabricante para este instrumento. Se asignó un valor arbitrario de molde de ARN a cada dilución en serie (es decir, 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 ng) y se representó gráficamente frente al valor de Ct (eje y = Ct; eje x = valor, escala logarítmica) para generar una curva patrón. Se le asignó a cada incógnita un valor arbitrario basándose en la pendiente y la ordenada en el origen de la curva patrón. Se llevó a cabo el mismo proceso para TBP con el fin de usar valores de TBP como molde normalizado cargado en cada reacción. Se dividió el valor objetivo medio para cada incógnita entre el valor de TBP medio para cada incógnita para generar un valor normalizado para la diana para cada muestra.

Método de aislamiento de ARN de células de la teca. Tras el tratamiento tal como se indicó en medio libre de suero, se ultracongelaron células de la teca y se almacenaron a -80°C. Se recogió cada placa de cultivo de 100 mm en hielo en 500 µl de reactivo Trizol (Sigma, St. Louis, MO). Se añadieron 100 µl de cloroformo ultrapuro a la mezcla de

Trizol/células, se agitó en vórtex durante diez segundos, luego se centrifugó durante 30 min a 14.000 rpm en una centrífuga Eppendorf refrigerada a 4°C (Hauppauge, NY). Se pusieron las muestras centrifugadas en hielo y se puso la fase superior en un tubo Eppendorf libre de ARNasa sin congelar con una cantidad equivalente de isopropanol ultrapuro enfriado con hielo a -20°C durante la noche. Entonces se centrifugaron las muestras durante 30 min a 14.000 rpm en una centrífuga Eppendorf refrigerada a 4°C. Se resuspendió el sedimento en 100 µl de agua tratada con DEPC, con 42 µl de NaAc 2 M y 600 µl de ETOH, luego se congelaron a -80°C durante 4-24 h. Entonces se centrifugaron las muestras durante 30 min a 14.000 rpm en una centrífuga Eppendorf refrigerada a 4°C (Hauppauge, NY), se enjuagaron con EtOH al 70%, se secaron al aire y se resuspendieron en 50 µl de DEPC en hielo. Se cuantificó el ARN usando un espectrofotómetro a 260/280 o en un dispositivo NanoDrop. Las muestras tienen habitualmente una razón 260/280 superior a 1,60. Se cuantificó la abundancia de ARNm de CYP17, DENND1A.V2 y DENND1.V1 tal como se describió mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el kit One Step Brilliant III de Agilent, y se normalizó mediante la abundancia de TBP o 5S.

Método de medición de la biosíntesis de andrógenos/DHEA. Tras el tratamiento de células de la teca en placa de cultivo de 6 pocillos tal como se describió en medio libre de suero, se recogió el medio y se congeló y almacenó a -20°C. Cada uno de los 6 pocillos tratados se enjuagó con PBS, se tripsinizó y se contó dos veces con un contador Beckman Z2 Coulter, Brea CA. Se cuantificó la acumulación de DHEA en el medio usando una plataforma de ELISA (DRG International Incorporated, Springfield, NJ).

Metodología para análisis de inmunotransferencia de tipo Western de proteína DENND1A en células de la teca normales y con SOPQ. Para examinar y comparar, se examinó la proteína DENND1A en células de la teca normales y con SOPQ, se hicieron crecer células de la teca del cuarto pase hasta que fueron subconfluentes y se transfirieron a medio libre de suero con y sin forskolina durante 24 horas. Tras el tratamiento, para lisados de células completas, se recogieron células de la teca en tampón RIPA modificado (Tris 30 mM, NaCl 150 mM, NaF 50 mM, EDTA 0,5 mM, ácido desoxicólico al 0,5%, Nonident P-40 al 1,0%, SDS al 0,1%) enfriado con hielo que contenía ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM, ditiotreitól 1 mM, benzamidina 1,0 mM, microcistina 1 µM, leupeptina 2 µg/ml y pepstatina A 2 µg/ml. Para el aislamiento de extractos nucleares, se recogieron células con tripsina/EDTA y se prepararon extractos citoplasmáticos en tampón que contenía NP-40 al 0,1%, HEPES 20 mM (pH 7,9), cloruro de sodio 20 mM. Se centrifugó el sedimento nuclear a 10.000 g durante 5 min, y se prepararon extractos nucleares en tampón que contenía HEPES 20 mM, glicerol al 25%, cloruro de sodio 500 mM, cloruro de magnesio 1,5 mM. Ambos tampones también contenían ditiotreitól 1 mM, PMSF 0,5 mM, EDTA 0,2 mM, leupeptina 2 µg/ml, benzamidina 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y fluoruro de sodio 20 mM para inhibir las proteína fosfatasas y proteasas. Se determinaron las concentraciones de proteína de los extractos de células completas (WCE) usando un ensayo de proteína DC de Bio-Rad (Hercules, CA). Se separaron muestras de proteína de los extractos nucleares (NE) en una SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF, y se realizó análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo de Abcam específico para la secuencia N-terminal de DENND1A, y se visualizó usando ECL (Pierce). A partir de los resultados de estos experimentos, se esperaban bandas a aproximadamente 110 kD, correspondientes a la variante 1 de DENND1A, y una a aproximadamente 62 kD correspondiente a la variante 2 de DENND1A, dado que el anticuerpo N-terminal adquirido es contra la secuencia del péptido N-terminal común, PGVSVHLSVHSYFTVPDTRELPSIPENRNLTEYFVAVDVNMLHLYASML (SEQ ID NO:27) que comienza en el aminoácido n.º 13 de ambos péptidos de las variantes 1 y 2 de DENND1A.

Método para el aislamiento de ARNm exosómico de orina. Los exosomas son pequeñas vesículas de aproximadamente 40 -100 nm que se originan desde el interior de cuerpos multivesiculares, que se secretan por las células al líquido extracelular, y se encuentran en diferentes líquidos corporales tales como la sangre, hemoderivados, orina y líquido amniótico. Los exosomas los producen todos los tipos de células, y tienen un fenotipo molecular que refleja en gran medida el de la célula original. Su contenido refleja el origen y el estado fisiológico de las células fuente, y por tanto los ARN exosómicos pueden servir como biomarcadores para diversas enfermedades.

Se obtuvieron muestras de orina de mujeres normales y mujeres con SOPQ, usando los mismos criterios clínicos descritos anteriormente, tras obtener el consentimiento informado según un protocolo de IRB aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad Estatal de Pensilvania. Se recogieron las muestras de orina y se pusieron a 4°C hasta que se procesaron. Entonces se tomaron alícuotas de las muestras de orina en tubos de 15 ml y se centrifugaron en un cestillo oscilante en una centrífuga de sobremesa Super T21 de Sorvall a 300 g a 4°C durante 10 minutos para retirar la materia particulada. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se centrifugó a 2000 g a 4°C durante 10 minutos en la misma centrífuga para eliminar los residuos celulares. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de cultivo de 17x100 mm y se centrifugó a 12.000 g a 4°C durante 30 minutos usando una centrífuga de suelo Avanti J-E de Beckman Coulter. Entonces se transfirió el sobrenadante a un tubo de 15 ml, y la muestra o bien se congeló a -80°C hasta su uso, o bien se extrajo el ARN exosómico usando un protocolo modificado del "kit de aislamiento de ARN de exosomas de orina" de Norgen (Thorold, CAN).

Usando el kit de Norgen, se añadieron 10 ml de la orina centrifugada a un tubo cónico de 15 cc sin congelar en hielo. Se añadieron 300 µl de disolución A1 y 250 µl de disolución A2 a cada tubo. Se agitaron bien en vórtex los tubos durante 10 segundos. Usando la centrífuga de sobremesa de Sorvall, se centrifugaron los tubos/muestras a 3200 rpm a 4°C durante 2 minutos. Se retiró por aspiración el sobrenadante, y se pusieron los tubos/sedimentos en

hielo. Se resuspendió el sedimento en 300 µl de disolución B, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y en hielo durante 10 minutos. Se añadieron a la mezcla 300 µl de isopropanol al 67% enfriado en hielo, y se agitó bien en vórtex durante 10 segundos. Se transfirió el lisado a una columna de centrifugación de minifiltro, proporcionada con el kit con un tubo de recogida. Se centrifugó el lisado/columna en una microcentrífuga de sobremesa a 14.000 rpm a 4°C durante 1 minuto, y se desechó la fracción no retenida. Se añadieron 400 µl de disolución de lavado enfriada en hielo a la columna de centrifugación reensamblada, y se centrifugó de nuevo a 14.000 rpm a 4°C durante 1 minuto. Se desechó la fracción no retenida, se aplicaron otros 400 µl de disolución de lavado y se centrifugó de nuevo a 14.000 rpm a 4°C durante 1 minuto. Se desechó la fracción no retenida, se aplicaron 400 µl de disolución de lavado (3 lavados en total) y se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C durante 4 minutos. Se desechó el tubo de recogida con la fracción no retenida, y se puso la columna de centrifugación en un tubo de elución. Se añadieron 50 µl de dH<sub>2</sub>O estéril a la columna de centrifugación y se centrifugó a 2.000 rpm a 4°C durante 2 minutos, seguido por una centrifugación a 14.000 rpm a 4°C durante 2 minutos. Se añadieron otros 50 µl de dH<sub>2</sub>O estéril a la columna de centrifugación, y se centrifugó de nuevo a 2.000 rpm a 4°C durante 2 minutos, seguido por una centrifugación a 14.000 rpm a 4°C durante 2 minutos. Se desecharon las columnas de centrifugación; se taparon los tubos de elución y se centrifugaron una última vez a 14.000 rpm a 4°C durante 10 minutos para sedimentar cualquier cantidad de resina restante de la columna. Entonces se transfirió el sobrenadante/ARN a nuevos tubos de 1,5 ml. Se cuantificó el contenido de ácido nucleico usando un espectrofotómetro NanoDrop, entonces se tomaron alícuotas de las muestras en los ng/µl deseados y se congelaron a -80°C.

20 **Lista de secuencias**

<110> Fundación de Investigación del Estado de Pensilvania; Universidad de la Mancomunidad de Virginia

25 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS CON LA VARIANTE 2 DE DENND1A Y SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

<130> 074339.00003

30 <150> Documento 61/649.568  
<151> 21-05-2012

<160> 26

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 2166  
<212> ADN  
<213> Ser humano

40 <400> 1

ES 2 638 944 T3

cgcgcgccgg gcacgcgcgc cggcgacccat ggcgttcgcc gggctggagc gagtacatta 60  
 acccctggag gcggcggcgc cggcgagggg gcgagcctcg agcggggcggg cccagcctg 120  
 agggaaggga ggaaggggcg gggagagcgc cagagggagg ccggtcggcc gcgggcgggc 180  
 gggcagcgcg gcgccgagcg gggcccgcgg gcccatgagg aggcctgggg accatgggct 240  
 ccaggatcaa gcagaatcca gagaccacat ttgaagtata tgttgaagtg gcctatccca 300  
 ggacaggtgg cactctttca gatcctgagg tgcagaggca attcccggag gactacagtg 360  
 accaggaagt tctacagact ttgaccaagt tttgtttccc cttctatgtg gacagcctca 420  
 cagttagcca agttggccag aacttcacat tcgtgctcac tgacattgac agcaaacaga 480  
 gattcggggt ctgccgctta tcttcaggag cgaagagctg cttctgtatc ttaagctatc 540  
 tcccctgggt cgaggtatth tataagctgc ttaacatcct ggcagattac acgacaaaaa 600  
 gacaggaaaa tcagtggaat gagcttcttg aaactctgca caaacttccc atccctgacc 660  
 caggagtgtc tgtccatctc agcgtgcatt cttatthttac tgtgcctgat accagagaac 720  
 ttcccagcat acctgagaat agaaatctga cagaatatth tgtggctgtg gatgthaaca 780  
 acatgttgca tctgtacgcc agtatgctgt acgaacgccg gatactcatc atthgcagca 840  
 aactcagcac tctgactgcc tgcattccag ggtctgcggc gatgctctac cccatgtact 900  
 ggcagcacgt gtacatcccc gtgctgccgc cgcattctgct ggactactgc tgtgctccca 960  
 tggcctacct cataggaatc catttaagtt taatggagaa agtcagaaac atggccctgg 1020  
 atgatgtcgt gatcctgaat gtggacacca acaccctgga aacccttcc gatgacctcc 1080  
 agagcctccc aaacgacgtg atctcttccc tgaagaacag gctgaaaaag gtctccacaa 1140  
 ccactgggga tgggtgtggc agagcgttcc tcaaggccca ggctgcttcc ttcggtagct 1200

ES 2 638 944 T3

accgaaacgc tctgaaaatc gagccggagg agccgatcac tttctgtgag gaagccttcg 1260  
 tgtcccacta ccgctccgga gccatgaggc agttcctgca gaacgccaca cagctgcagc 1320  
 tcttcaagca gtttattgat ggtcgttag atcttctcaa ttccggcgaa ggtttcagtg 1380  
 atgtttttga agaggaaatc aacatgggcg agtacgctgg cagtgacaaa ctgtaccatc 1440  
 agtggctctc cactgtccgg aaaggaagtg gagcaattct gaatactgta aagaccaaag 1500  
 caaatccggc catgaagact gtctacaagt tcgcaaaaga tcatgcaaaa atgggaataa 1560  
 aagaggtgaa aaaccgcttg aagcaaaagg acattgccga gaatggctgc gccccacccc 1620  
 cagaagagca gctgccaaag actgcaccgt cccactgggt ggaggccaag gacccaagc 1680  
 tccgagaaga ccggcggcca atcacagtcc actttggaca ggtgcgcca cctcgtccac 1740  
 atgttgtaa gagaccaaag agcaacatcg cagtggaagg ccggaggacg tctgtgccga 1800  
 gccctgagca aacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta 1860  
 cccattttgc ggccaagttc ccgacgagag gctggacctc ttcacacat tgacttacgc 1920  
 cgttgctttt ccagactggg cagaggggct gacttcgag tgtgtgcaa agagccggtg 1980  
 tctgataatc ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg 2040  
 ttggttggtt ggtttgttgt ttgtttaata tgcctgttt tctacttctg ttggaaaata 2100  
 tttgggggtg aaataaacca gtgggagcat ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2160  
 aaaaaa 2166

<210> 2  
 <211> 559  
 <212> PRT  
 <213> Ser humano

5

<400> 2  
 Met Gly Ser Arg Ile Lys Gln Asn Pro Glu Thr Thr Phe Glu Val Tyr  
 1 5 10 15  
 Val Glu Val Ala Tyr Pro Arg Thr Gly Gly Thr Leu Ser Asp Pro Glu  
 20 25 30  
 Val Gln Arg Gln Phe Pro Glu Asp Tyr Ser Asp Gln Glu Val Leu Gln  
 35 40 45  
 Thr Leu Thr Lys Phe Cys Phe Pro Phe Tyr Val Asp Ser Leu Thr Val  
 50 55 60  
 Ser Gln Val Gly Gln Asn Phe Thr Phe Val Leu Thr Asp Ile Asp Ser  
 65 70 75 80

ES 2 638 944 T3

Lys Gln Arg Phe Gly Phe Cys Arg Leu Ser Ser Gly Ala Lys Ser Cys  
85 90 95

Phe Cys Ile Leu Ser Tyr Leu Pro Trp Phe Glu Val Phe Tyr Lys Leu  
100 105 110

Leu Asn Ile Leu Ala Asp Tyr Thr Thr Lys Arg Gln Glu Asn Gln Trp  
115 120 125

Asn Glu Leu Leu Glu Thr Leu His Lys Leu Pro Ile Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

Val Ser Val His Leu Ser Val His Ser Tyr Phe Thr Val Pro Asp Thr  
145 150 155 160

Arg Glu Leu Pro Ser Ile Pro Glu Asn Arg Asn Leu Thr Glu Tyr Phe  
165 170 175

Val Ala Val Asp Val Asn Asn Met Leu His Leu Tyr Ala Ser Met Leu  
180 185 190

Tyr Glu Arg Arg Ile Leu Ile Ile Cys Ser Lys Leu Ser Thr Leu Thr  
195 200 205

Ala Cys Ile His Gly Ser Ala Ala Met Leu Tyr Pro Met Tyr Trp Gln  
210 215 220

His Val Tyr Ile Pro Val Leu Pro Pro His Leu Leu Asp Tyr Cys Cys  
225 230 235 240

Ala Pro Met Pro Tyr Leu Ile Gly Ile His Leu Ser Leu Met Glu Lys  
245 250 255

Val Arg Asn Met Ala Leu Asp Asp Val Val Ile Leu Asn Val Asp Thr  
260 265 270

Asn Thr Leu Glu Thr Pro Phe Asp Asp Leu Gln Ser Leu Pro Asn Asp  
275 280 285

Val Ile Ser Ser Leu Lys Asn Arg Leu Lys Lys Val Ser Thr Thr Thr  
290 295 300

Gly Asp Gly Val Ala Arg Ala Phe Leu Lys Ala Gln Ala Ala Phe Phe  
305 310 315 320

Gly Ser Tyr Arg Asn Ala Leu Lys Ile Glu Pro Glu Glu Pro Ile Thr  
325 330 335

ES 2 638 944 T3

Phe Cys Glu Glu Ala Phe Val Ser His Tyr Arg Ser Gly Ala Met Arg  
 340 345 350

Gln Phe Leu Gln Asn Ala Thr Gln Leu Gln Leu Phe Lys Gln Phe Ile  
 355 360 365

Asp Gly Arg Leu Asp Leu Leu Asn Ser Gly Glu Gly Phe Ser Asp Val  
 370 375 380

Phe Glu Glu Glu Ile Asn Met Gly Glu Tyr Ala Gly Ser Asp Lys Leu  
 385 390 395 400

Tyr His Gln Trp Leu Ser Thr Val Arg Lys Gly Ser Gly Ala Ile Leu  
 405 410 415

Asn Thr Val Lys Thr Lys Ala Asn Pro Ala Met Lys Thr Val Tyr Lys  
 420 425 430

Phe Ala Lys Asp His Ala Lys Met Gly Ile Lys Glu Val Lys Asn Arg  
 435 440 445

Leu Lys Gln Lys Asp Ile Ala Glu Asn Gly Cys Ala Pro Thr Pro Glu  
 450 455 460

Glu Gln Leu Pro Lys Thr Ala Pro Ser Pro Leu Val Glu Ala Lys Asp  
 465 470 475 480

Pro Lys Leu Arg Glu Asp Arg Arg Pro Ile Thr Val His Phe Gly Gln  
 485 490 495

Val Arg Pro Pro Arg Pro His Val Val Lys Arg Pro Lys Ser Asn Ile  
 500 505 510

Ala Val Glu Gly Arg Arg Thr Ser Val Pro Ser Pro Glu Gln Asn Thr  
 515 520 525

Ile Ala Thr Pro Ala Thr Leu His Ile Leu Gln Lys Ser Ile Thr His  
 530 535 540

Phe Ala Ala Lys Phe Pro Thr Arg Gly Trp Thr Ser Ser Ser His  
 545 550 555

<210> 3  
 <211> 5041  
 <212> ADN  
 <213> Ser humano

5

<400> 3

ES 2 638 944 T3

cgcgcgccgg gcacgcgcgc cggcgacat ggcgttcgcc gggctggagc gagtacatta 60  
 acccctggag gcggcgccgg cggcgagggga gcgagcctcg agcgggcggg ccccagcctg 120  
 agggaaggga ggaaggggcg gggagagcgc cagagggagg ccggtcggcc gcgggcgggc 180  
 gggcagcgca gcgccgagcg gggcccgcgg gcccatgagg aggcctgggg accatgggct 240  
 ccaggatcaa gcagaatcca gagaccacat ttgaagtata tgttgaagtg gcctatccca 300  
 ggacaggtgg cactctttca gatcctgagg tgcagaggca attcccggag gactacagtg 360  
 accaggaagt tctacagact ttgaccaagt tttgtttccc cttctatgtg gacagcctca 420  
 cagttagcca agttggccag aacttcacat tcgtgctcac tgacattgac agcaaacaga 480  
 gattcggggt ctgccgctta tcttcaggag cgaagagctg cttctgtatc ttaagctatc 540  
 tcccctgggt cgaggtattt tataagctgc ttaacatcct ggagattac acgacaaaaa 600  
 gacaggaaaa tcagtggaat gagcttcttg aaactctgca caaacttccc atccctgacc 660  
 caggagtgtc tgtccatctc agcgtgcatt cttatcttac tgtgcctgat accagagaac 720  
 ttcccagcat acctgagaat agaaatctga cagaatattt tgtggctgtg gatgtaaca 780  
 acatggtgca tctgtacgcc agtatgctgt acgaacgccg gatactcatc atttgcagca 840  
 aactcagcac tctgactgcc tgcattccag ggtctgcggc gatgctctac cccatgtact 900  
 ggcagcacgt gtacatcccc gtgctgccgc cgcattctgct ggactactgc tgtgctccca 960  
 tgcctacct cataggaat catttaagtt taatggagaa agtcagaaac atggccctgg 1020  
 atgatgtcgt gatcctgaat gtggacacca acaccctgga aacccttc gatgacctcc 1080  
 agagcctccc aaacgacgtg atctcttccc tgaagaacag gctgaaaaag gtctccacaa 1140  
 ccactgggga tgggtggtg ccagcgttcc tcaaggccca ggctgcttcc ttcggtagct 1200  
 accgaaacgc tctgaaaatc gagccggagg agccgatcac tttctgtgag gaagccttcg 1260  
 tgtcccacta ccgctccgga gccatgaggc agttcctgca gaacgccaca cagctgcagc 1320  
 tcttcaagca gtttattgat ggtcgattag atcttctcaa ttccggcgaa ggtttcagtg 1380  
 atgtttttga agaggaaatc aacatgggcg agtacgctgg cagtgacaaa ctgtaccatc 1440  
 agtggctctc cactgtccgg aaaggaagtg gagcaattct gaatactgta aagaccaaag 1500  
 caaatccggc catgaagact gtctacaagt tcgcaaaaga tcatgcaaaa atgggaataa 1560  
 aagaggtgaa aaaccgcttg aagcaaaagg acattgccga gaatggctgc gccccaccc 1620  
 cagaagagca gctgcaaag actgcaccgt cccactggg ggaggccaag gacccaagc 1680  
 tccgagaaga ccggcgccca atcacagtcc actttggaca ggtgcgcca cctcgtccac 1740  
 atgttgtaa gagaccaaag agcaacatcg cagtggaagg ccggaggacg tctgtgccga 1800  
 gccctgagca gccgcagccg tatcggacac tcagggagtc agacagcgcg gaaggcgacg 1860  
 aggcagagag tccagagcag caagtgcgga agtccacagg ccctgtccca gctccccctg 1920



ES 2 638 944 T3

accgggctgc cagcatcgac cttctggaag acgtcttcag caacctggac atggaggccg 1980  
 cactgcagcc actgggccag gccaaagagct tagaggacct tcgtgcccc aaagacctga 2040  
 gggagcagcc agggaccttt gactatcaga ggctggatct gggcgggagt gagaggagcc 2100  
 gcggggtgac agtggccttg aagcttacct acccgtacaa caagctctgg agcctgggcc 2160  
 aggacgacat ggccatcccc agcaagcccc cagctgcctc ccctgagaag ccctcggccc 2220  
 tgctcgggaa ctccctggcc ctgcctcgaa ggccccagaa ccgggacagc atcctgaacc 2280  
 ccagtgacaa ggaggaggtg cccacccccta ctctgggcag catcaccatc ccccggcccc 2340  
 aaggcaggaa gaccccagag ctgggcatcg tgcctccacc gccattccc cggcccggcca 2400  
 agctccaggc tgccggcgcc gcacttggtg acgtctcaga gcggctgcag acggatcggg 2460  
 acaggcgagc tgccctgagt ccagggtctc tgcctggtgt tgtccccaa ggccccactg 2520  
 aactgctcca gccgctcagc cctggccccg gggctgcagg cacgagcagt gacgccctgc 2580  
 tcgccctcct ggaccgcctc agcacagcct ggtcaggcag caccctcccg tcacgccccg 2640  
 ccaccccga tgtagccacc ccattcacc cccaattcag cttccccct gcagggacac 2700  
 ccaccccatt cccacagcca ccaactcaacc cctttgtccc atccatgcca gcagccccac 2760  
 ccacccctgcc cctggtctcc acaccagccg ggcctttcgg ggccccctca gcttccctgg 2820  
 ggccggcttt tgcgctccggc ctccctgctgt ccagtgcctgg cttctgtgcc cctcacaggt 2880  
 ctcagcccaa cctctccgcc ctctccatgc ccaacctct tggccagatg cccatgggca 2940  
 cccacacgag ccccctacag ccgctgggtc ccccagcagt tgccccgtcg aggatccgaa 3000  
 cgttgccccct ggcccgcctca agtgccaggg ctgctgagac caagcagggg ctggccctga 3060  
 ggctggaga cccccgctt ctgcctcca ggccccctca aggcctggag ccaactctgc 3120  
 agccctctgc tcctcaacag gccagagacc cctttgagga tttgttacag aaaaccaagc 3180  
 aagacgtgag ccgagctccg gccctggccc cggccccaga ctcggtggag cagctcagga 3240  
 agcagtgagg gaccttcgag tgagccgggc cctgaggggtg ggggatgcac cgaggcccga 3300  
 gggctccgtcc actgctgagg ttccgaggct cccccgccac tctctctctg cccaggttct 3360  
 gctggtggga agggatggga cccctctctg ctgccccctc ctccccctca cactgcccat 3420  
 ctctgatgtc tggccctggg gaatggcacc agttccagcc tgggaatcaa cccagttcct 3480  
 gagtgcccat cccaccccgc ggttgccctc cctcggcacc cttgattggg ttttgacta 3540  
 aagaggtcag ctgggccaat gatattgctc cagaccgagt cctaccacc tcccccgga 3600  
 agtgtcccaa gaggtccga aggcctcccc tccgagccca gctctcctgt ctctccaca 3660  
 gccaggccct gcaagccac ctccctcggac acaggtgaca gggttaccct ccagtttgag 3720  
 ctcatctgca cgagacacag gtagcttggg gttgaagtta ggactcctcc tgggctggag 3780

ES 2 638 944 T3

gatttacctg gtggggcact tccagactgt ttctagcaat atacacacac gttctttcct 3840  
 gtgtcttcac cccaaaactt cagttgattc tgacctggga ggatctgggg accagggggg 3900  
 cttgggctgc cttgtgatac acagccccag ccaccctgca cgggggctgc gagcaccagc 3960  
 aactttgatt tatagaagga aaatggaaac ccccatctga gtattttggg aggagcccc 4020  
 agccctcatc cagctctggc acgctgatac ctccaggtac tcccctcact gtcaaagctg 4080  
 gggctcagcc tcttgtcatc tggagctttg tgggcaaagc tgagaagctg caaccagat 4140  
 ttcaacccaa aaaggtcaag ctgaatgcct cagactgatg tgggaaggcag ctggccttcc 4200  
 tgggttgaa cgaggcagtg gccctgagcc ccttctccag gggcaggtag aaaggacaaa 4260  
 cttggtctct gcctcgggga agcaggagga gggctagaag ccagtccctc cccacctgcc 4320  
 cagagctcca ggccagcaca gaaattcctg aggccaacgt caccaaagtt agattgaatg 4380  
 tttattatct ttctttttcc tttttacctt attgatttga tgaatcttga aatggattca 4440  
 tttccataaa ccaagttaa gtatggcccg accatttaag aaaacaacca tctgagacac 4500  
 gcaggaaatt gtgagcattt cgacccgagc tctcatttcc tatttgtgaa gggctcagaca 4560  
 cagtctaccc aggggtgtct gggggacaag ggggtctctg gagatgtcac ccaggagacc 4620  
 ccctctatgt ctgagaggct gccactgctg cacatgctca gtgaggcttg gcggccatcc 4680  
 tggcacatgg ctcttcctgg gtcaaccgtg acctgtctgg ctcaggaatg ggctctggct 4740  
 gctgggggag ccgtgtcact cctgggccat gggggcacct cctgggcact taggtgtttc 4800  
 agcatagatt ccagtttcgc accctgggca gacccccagg ccccatccgg gatagggcag 4860  
 aggaggtgct ggcggcccca gggaaggagg gtgtgtacct caaggccccc tggctgtgct 4920  
 gaggggctgg ggtgagcgtc ccatgttcac atgagcactg ctgcctcttc acttgtggga 4980  
 ctttttgcaa acccaaggat gaactttgtg tgcattcaat aaaatcatct tggggaagag 5040  
 g 5041

<210> 4  
 <211> 1009  
 <212> PRT  
 <213> Ser humano

5

<400> 4  
 Met Gly Ser Arg Ile Lys Gln Asn Pro Glu Thr Thr Phe Glu Val Tyr  
 1 5 10 15  
 Val Glu Val Ala Tyr Pro Arg Thr Gly Gly Thr Leu Ser Asp Pro Glu  
 20 25 30  
 Val Gln Arg Gln Phe Pro Glu Asp Tyr Ser Asp Gln Glu Val Leu Gln  
 35 40 45

ES 2 638 944 T3

Thr Leu Thr Lys Phe Cys Phe Pro Phe Tyr Val Asp Ser Leu Thr Val  
 50 55 60

Ser Gln Val Gly Gln Asn Phe Thr Phe Val Leu Thr Asp Ile Asp Ser  
 65 70 75 80

Lys Gln Arg Phe Gly Phe Cys Arg Leu Ser Ser Gly Ala Lys Ser Cys  
 85 90 95

Phe Cys Ile Leu Ser Tyr Leu Pro Trp Phe Glu Val Phe Tyr Lys Leu  
 100 105 110

Leu Asn Ile Leu Ala Asp Tyr Thr Thr Lys Arg Gln Glu Asn Gln Trp  
 115 120 125

Asn Glu Leu Leu Glu Thr Leu His Lys Leu Pro Ile Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140

Val Ser Val His Leu Ser Val His Ser Tyr Phe Thr Val Pro Asp Thr  
 145 150 155 160

Arg Glu Leu Pro Ser Ile Pro Glu Asn Arg Asn Leu Thr Glu Tyr Phe  
 165 170 175

Val Ala Val Asp Val Asn Asn Met Leu His Leu Tyr Ala Ser Met Leu  
 180 185 190

Tyr Glu Arg Arg Ile Leu Ile Ile Cys Ser Lys Leu Ser Thr Leu Thr  
 195 200 205

Ala Cys Ile His Gly Ser Ala Ala Met Leu Tyr Pro Met Tyr Trp Gln  
 210 215 220

His Val Tyr Ile Pro Val Leu Pro Pro His Leu Leu Asp Tyr Cys Cys  
 225 230 235 240

Ala Pro Met Pro Tyr Leu Ile Gly Ile His Leu Ser Leu Met Glu Lys  
 245 250 255

Val Arg Asn Met Ala Leu Asp Asp Val Val Ile Leu Asn Val Asp Thr  
 260 265 270

Asn Thr Leu Glu Thr Pro Phe Asp Asp Leu Gln Ser Leu Pro Asn Asp  
 275 280 285

Val Ile Ser Ser Leu Lys Asn Arg Leu Lys Lys Val Ser Thr Thr Thr  
 290 295 300

ES 2 638 944 T3

Gly Asp Gly Val Ala Arg Ala Phe Leu Lys Ala Gln Ala Ala Phe Phe  
 305 310 315 320

Gly Ser Tyr Arg Asn Ala Leu Lys Ile Glu Pro Glu Glu Pro Ile Thr  
 325 330 335

Phe Cys Glu Glu Ala Phe Val Ser His Tyr Arg Ser Gly Ala Met Arg  
 340 345 350

Gln Phe Leu Gln Asn Ala Thr Gln Leu Gln Leu Phe Lys Gln Phe Ile  
 355 360 365

Asp Gly Arg Leu Asp Leu Leu Asn Ser Gly Glu Gly Phe Ser Asp Val  
 370 375 380

Phe Glu Glu Glu Ile Asn Met Gly Glu Tyr Ala Gly Ser Asp Lys Leu  
 385 390 395 400

Tyr His Gln Trp Leu Ser Thr Val Arg Lys Gly Ser Gly Ala Ile Leu  
 405 410 415

Asn Thr Val Lys Thr Lys Ala Asn Pro Ala Met Lys Thr Val Tyr Lys  
 420 425 430

Phe Ala Lys Asp His Ala Lys Met Gly Ile Lys Glu Val Lys Asn Arg  
 435 440 445

Leu Lys Gln Lys Asp Ile Ala Glu Asn Gly Cys Ala Pro Thr Pro Glu  
 450 455 460

Glu Gln Leu Pro Lys Thr Ala Pro Ser Pro Leu Val Glu Ala Lys Asp  
 465 470 475 480

Pro Lys Leu Arg Glu Asp Arg Arg Pro Ile Thr Val His Phe Gly Gln  
 485 490 495

Val Arg Pro Pro Arg Pro His Val Val Lys Arg Pro Lys Ser Asn Ile  
 500 505 510

Ala Val Glu Gly Arg Arg Thr Ser Val Pro Ser Pro Glu Gln Pro Gln  
 515 520 525

Pro Tyr Arg Thr Leu Arg Glu Ser Asp Ser Ala Glu Gly Asp Glu Ala  
 530 535 540

Glu Ser Pro Glu Gln Gln Val Arg Lys Ser Thr Gly Pro Val Pro Ala



ES 2 638 944 T3

Arg Pro Ala Thr Pro Asn Val Ala Thr Pro Phe Thr Pro Gln Phe Ser  
 805 810 815

Phe Pro Pro Ala Gly Thr Pro Thr Pro Phe Pro Gln Pro Pro Leu Asn  
 820 825 830

Pro Phe Val Pro Ser Met Pro Ala Ala Pro Pro Thr Leu Pro Leu Val  
 835 840 845

Ser Thr Pro Ala Gly Pro Phe Gly Ala Pro Pro Ala Ser Leu Gly Pro  
 850 855 860

Ala Phe Ala Ser Gly Leu Leu Leu Ser Ser Ala Gly Phe Cys Ala Pro  
 865 870 875 880

His Arg Ser Gln Pro Asn Leu Ser Ala Leu Ser Met Pro Asn Leu Phe  
 885 890 895

Gly Gln Met Pro Met Gly Thr His Thr Ser Pro Leu Gln Pro Leu Gly  
 900 905 910

Pro Pro Ala Val Ala Pro Ser Arg Ile Arg Thr Leu Pro Leu Ala Arg  
 915 920 925

Ser Ser Ala Arg Ala Ala Glu Thr Lys Gln Gly Leu Ala Leu Arg Pro  
 930 935 940

Gly Asp Pro Pro Leu Leu Pro Pro Arg Pro Pro Gln Gly Leu Glu Pro  
 945 950 955 960

Thr Leu Gln Pro Ser Ala Pro Gln Gln Ala Arg Asp Pro Phe Glu Asp  
 965 970 975

Leu Leu Gln Lys Thr Lys Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Leu Ala  
 980 985 990

Pro Ala Pro Asp Ser Val Glu Gln Leu Arg Lys Gln Trp Glu Thr Phe  
 995 1000 1005

Glu

<210> 5

<211> 356

<212> ADN

<213> Ser humano

<400> 5

aaacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta cccattttgc

60

ES 2 638 944 T3

	ggccaagttc ccgacgagag gctggacctc ttcacacat tgacttacgc cgttgctttt	120
	ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgcaa agagccggtg tctgataatc	180
	ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg ttggttggtt	240
	ggtttggtgt ttgtttaata tgcctgttt tctacttctg ttggaaaata tttgggggtg	300
	aaataaacca gtgggagcat ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	356
	<210> 6	
	<211> 322	
5	<212> ADN	
	<213> Ser humano	
	<400> 6	
	aaacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta cccattttgc	60
	ggccaagttc ccgacgagag gctggacctc ttcacacat tgacttacgc cgttgctttt	120
	ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgcaa agagccggtg tctgataatc	180
	ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg ttggttggtt	240
	ggtttggtgt ttgtttaata tgcctgttt tctacttctg ttggaaaata tttgggggtg	300
	aaataaacca gtgggagcat gg	322
10	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
20	<400> 7	
	gggctgactt cgcagtgt 20	
	<210> 8	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador de PCR	
	<400> 8	
	acagtcagg tgataagcag gaaa 24	
35	<210> 9	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> sonda	
	<400> 9	
45	caaagagcc ggtgtctgat aatcca 27	

ES 2 638 944 T3

<210> 10  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Ser humano

5

<400> 10  
 Asn Thr Ile Ala Thr Pro Ala Thr Leu His Ile Leu Gln Lys Ser Ile  
 1 5 10 15

Thr His Phe Ala Ala Lys Phe Pro Thr Arg Gly Trp Thr Ser Ser Ser  
 20 25 30

**His**

10

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Ser humano

<400> 11  
 Gln Lys Ser Ile Thr His Phe Ala Ala Lys Phe Pro Thr Arg Gly Trp  
 1 5 10 15

Thr Ser Ser Ser His  
 20

15

<210> 12  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Ser humano

20

<400> 12  
 cgacgagagg ctggacctct tac 23

25

<210> 13  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Ser humano

30

<400> 13  
 ctctcatca cattgactt 19

35

<210> 14  
 <211> 212  
 <212> ADN  
 <213> Ser humano

<400> 14  
 cgttgcttt ccagactggg cagaggggct gacttcgacg tgtgtgcaa agagccggtg 60  
 tctgataatc ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg 120  
 ttggttggtt ggtttgttgt ttgtttaata tgcctgttt tctacttctg ttggaaaata 180

40

tttgggggttg aaataaacca gtgggagcat gg 212

45

<210> 15  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial



<220>

<223> cebador

5 <400> 15  
ggattcattt ccataaacca agttaaa 27

<210> 16  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 16  
 20 cacaatttcc tgcgtgtctc a 21

<210> 17  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> sonda

30 <400> 17  
atggcccgac catttaagaa aacaacca 28

<210> 18  
 <211> 22  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> cebador

<400> 18  
 ggctcaaat ggcaactcta ga 22

<210> 19  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> cebador

<400> 19  
 55 cttctgatcg ccatccttga a 21

<210> 20  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 60 <213> secuencia artificial

<220>

<223> sonda  
 <400> 20  
 tcgctgca caaccgtaag ggtatc 26  
 5  
 <210> 21  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> cebador  
 15  
 <400> 21  
 cacggcactg attttcagtt c 21  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 25  
 <223> cebador  
 <400> 22  
 tctgctgcc agtctggact 20  
 30  
 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> sonda  
 <400> 23  
 40 tgtgcacagg agccaagagt gaaga 25  
 <210> 24  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 45 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 50  
 <400> 24  
 gcctcctca gctctac 18  
 <210> 25  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 60  
 <223> cebador  
 <400> 25

gtctccatc caagtactaa cc 22

<210> 26

<211> 26

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> sonda

<400> 26

tctcgtctga tctcggaagc taagca 26

15

## REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico que comprende detectar ARNm de la variante 2 de DENND1A o proteína de la variante 2 de DENND1A en una muestra biológica de un sujeto.
2. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que se detecta el ARNm de la variante 2 de DENND1A.
3. Método *in vitro* según la reivindicación 2, en el que la detección del ARNm de la variante 2 de DENND1A comprende usar una reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el ARNm de la variante 2 de DENND1A para dar ADN bicatenario.
4. Método *in vitro* según la reivindicación 2, en el que se detecta el ARNm de la variante 2 de DENND1A hibridando una sonda marcada con el ARNm de la variante 2 de DENND1A o a ADN amplificado a partir del ARNm de la variante 2 de DENND1A, y detectando la sonda marcada hibridada con el ARNm de la variante 2 de DENND1A o detectando la sonda marcada hibridada con ADN amplificado.
5. Método *in vitro* según la reivindicación 2, en el que se detecta el ARNm de la variante 2 de DENND1A detectando una señal de un nucleótido marcado de manera fluorescente liberado de una sonda hibridada con ADN amplificado, en el que el nucleótido marcado de manera fluorescente se libera mediante actividad exonucleasa en la sonda durante la amplificación del ARNm de la variante 2 de DENND1A para dar el ADN bicatenario.
6. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se detecta el ARNm de la variante 2 de DENND1A, y en el que la muestra del sujeto es una muestra que comprende exosomas, en el que los exosomas comprenden el ARNm de la variante 2 de DENND1A.
7. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra es una seleccionada de una muestra que comprende orina, sangre, plasma, suero o saliva.
8. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además cuantificar una cantidad del ARNm de la variante 2 de DENND1A comparando el ARNm de la variante 2 de DENND1A con una referencia.
9. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que se detecta la proteína de la variante 2 de DENND1A.
10. Método *in vitro* según la reivindicación 9, en el que la detección de la proteína de la variante 2 de DENND1A se realiza usando una composición que comprende anticuerpos, en el que los anticuerpos se hibridan con la proteína de la variante 2 de DENND1A, y en el que se detecta la hibridación de los anticuerpos con la proteína de la variante 2 de DENND1A.
11. Método *in vitro* según la reivindicación 10, en el que los anticuerpos reconocen específicamente al menos un epítipo en un segmento de la proteína de la variante 2 de DENND1A que consiste en los 33 aminoácidos en su extremo C-terminal, en el que la proteína de la variante 2 de DENND1A se pone en contacto con los anticuerpos y en el que se detectan los anticuerpos hibridados con el segmento.
12. Método *in vitro* para seleccionar un individuo como candidato para terapia para el síndrome de ovario poliquístico, comprendiendo el método someter a prueba una muestra del individuo para determinar el ARNm de la variante 2 de DENND1A o la proteína de la variante 2 de DENND1A, y de manera posterior a la detección del ARNm de la variante 2 de DENND1A o la proteína de la variante 2 de DENND1A en la muestra, designar al individuo como candidato para la terapia del síndrome de ovario poliquístico.
13. Producto para su uso para ayudar al diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico, comprendiendo el producto un envase y al menos dos sondas y/o cebadores oligonucleotídicos sintéticos, en el que al menos una de las sondas y/o los cebadores pueden hibridarse específicamente con ARNm de la variante 2 de DENND1A, en el que el producto incluye además material impreso que indica que el producto ha de usarse para detectar ARNm de la variante 2 de DENND1A como indicador de síndrome de ovario poliquístico, conteniendo opcionalmente el producto uno o más recipientes sellados que comprenden reactivos para su uso en la hibridación de la una o más sondas o los cebadores con el ARNm de la variante 2 de DENND1A.
14. Producto según la reivindicación 13, en el que uno de los dos cebadores oligonucleotídicos sintéticos puede hibridarse específicamente con ARNm de la variante 2 de DENND1A y usarse para la amplificación del ARNm de la variante 2 de DENND1A para dar ADN bicatenario, en el que el ADN amplificado bicatenario comprende una hebra que tiene al menos 8 nucleótidos contiguos de la secuencia de:

## ES 2 638 944 T3

aaacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta  
cccattttgc ggccaagtgc ccgacgagag gctggacctc ttcacacacat tgacttacgc  
cgttgctttt ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgcaa agagccggtg  
tctgataatc ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact ttagttttg  
ttggttggtt ggtttggtgt ttgtttaata tgccctgttt tctacttctg ttggaaaata  
tttggggttg aaataaacca gtgggagcat gg (SEQ ID NO:6).

15. Producto según la reivindicación 14, que comprende además una sonda oligonucleotídica sintética que se une con especificidad a SEQ ID NO:6 o su complemento, en el que la sonda se une a un segmento de SEQ ID NO:6 que está entre y no se solapa con las secuencias con las que se hibridan los al menos dos cebadores oligonucleotídicos sintéticos, y en el que la sonda oligonucleotídica sintética se modifica de tal manera que comprende un primer nucleótido modificado para incluir una etiqueta fluorescente y un segundo nucleótido modificado para comprender un resto que extingue la fluorescencia de la etiqueta fluorescente cuando están presentes los nucleótidos primero y segundo en la sonda oligonucleotídica sintética.
- 5
- 10

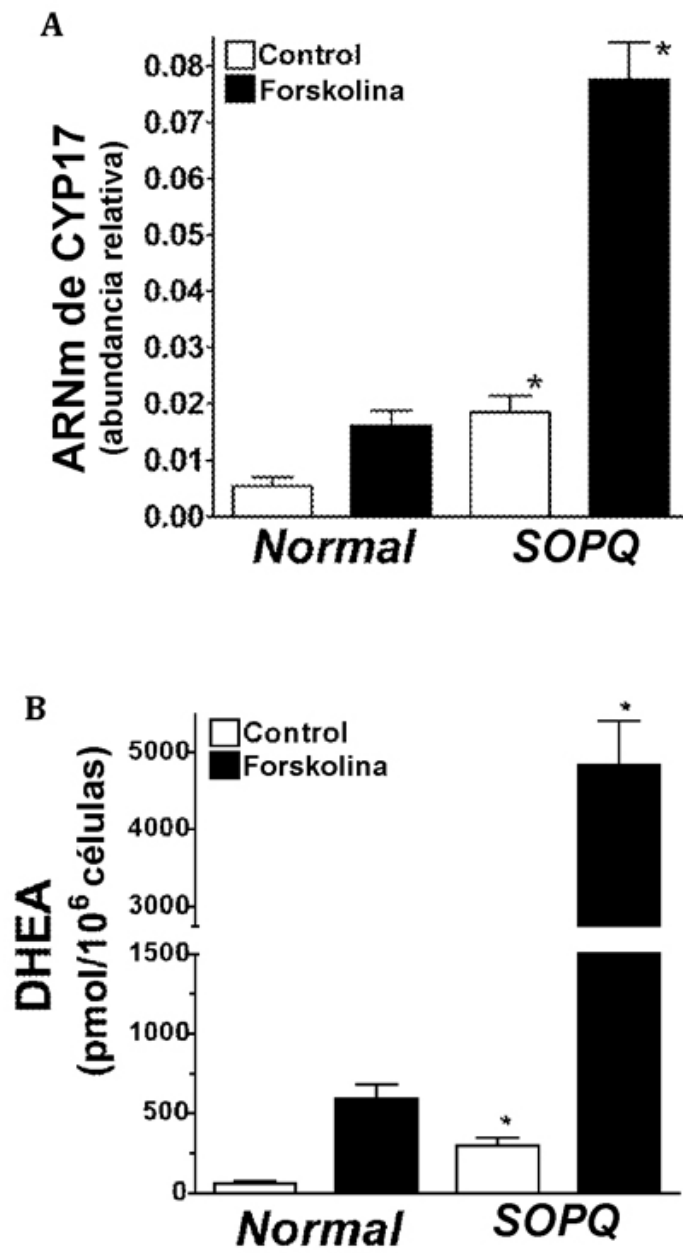


Figura 1

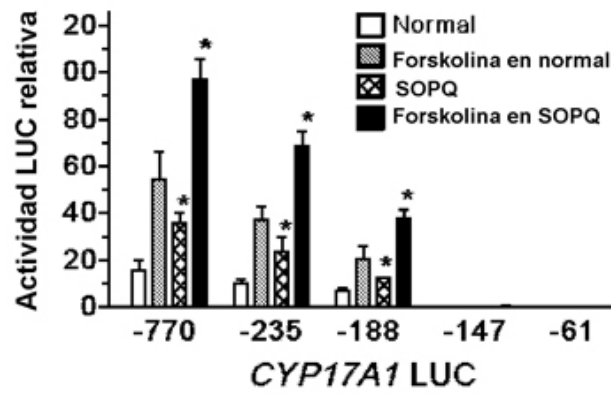


Figura 2

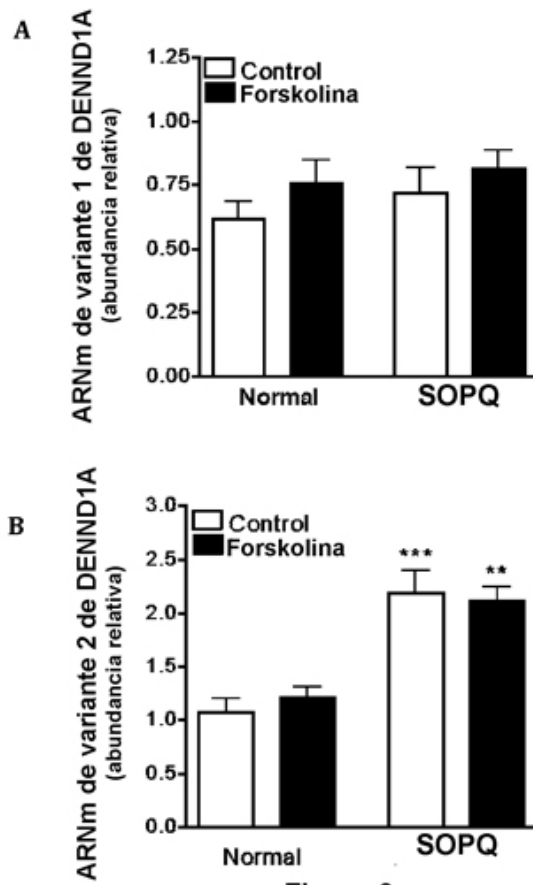
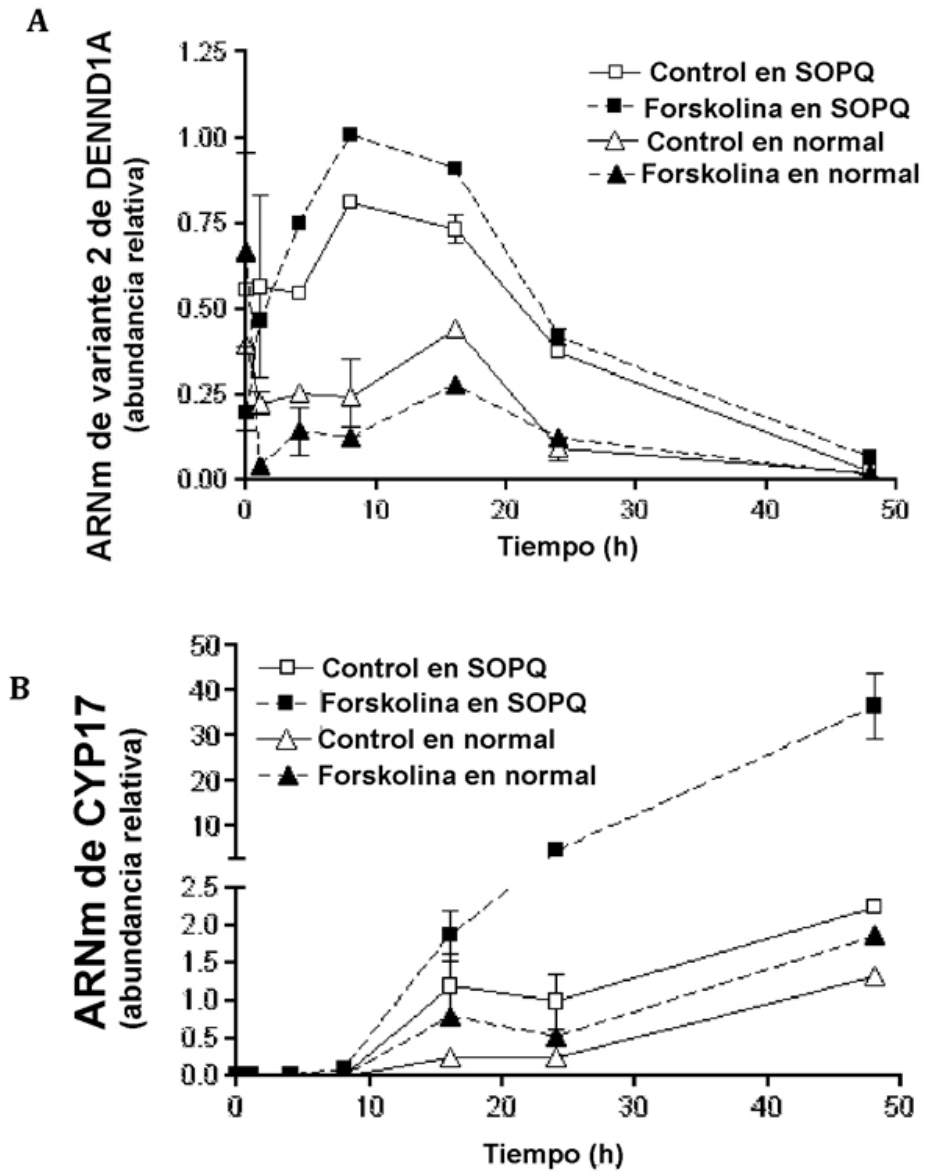


Figura 3



**Figura 4**



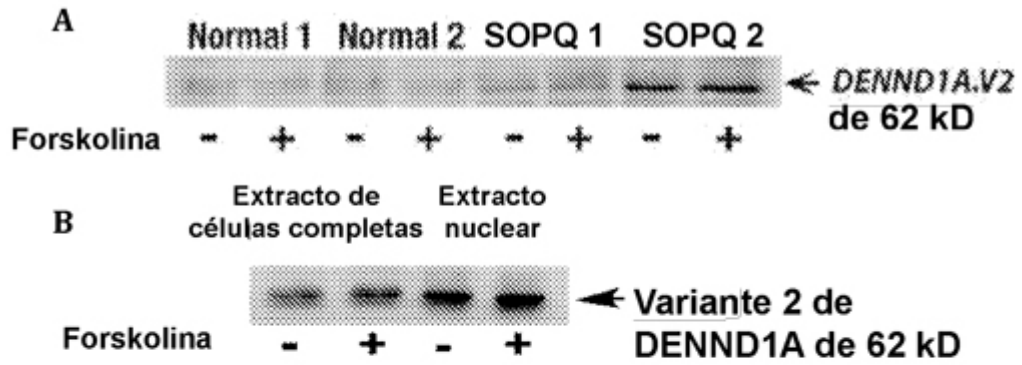


Figura 5

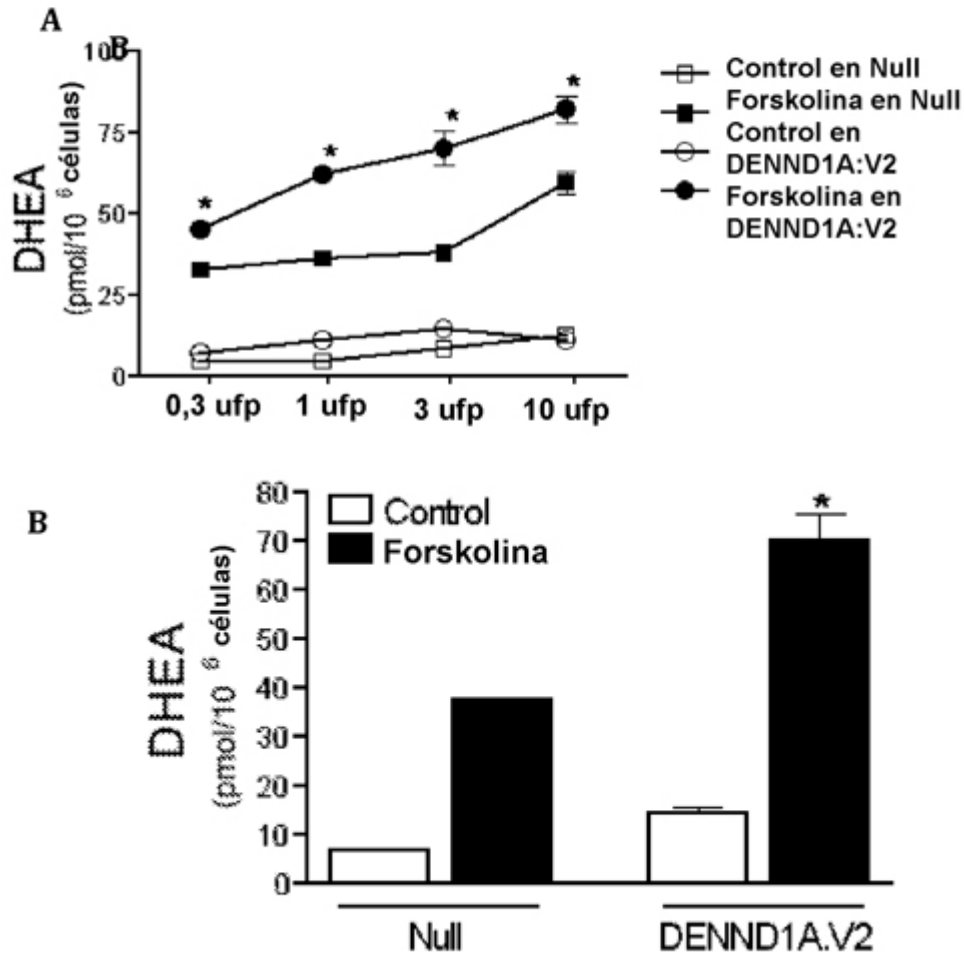


Figura 6

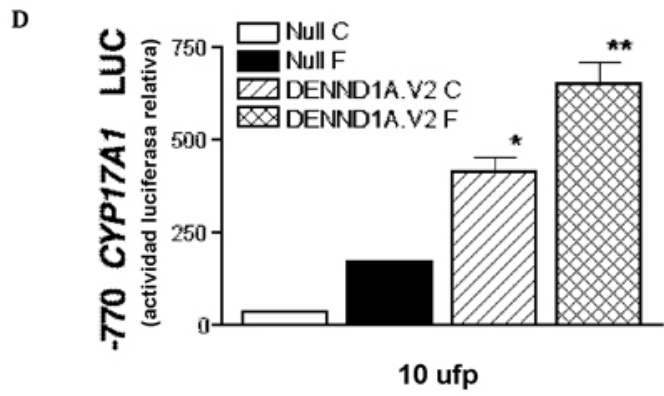
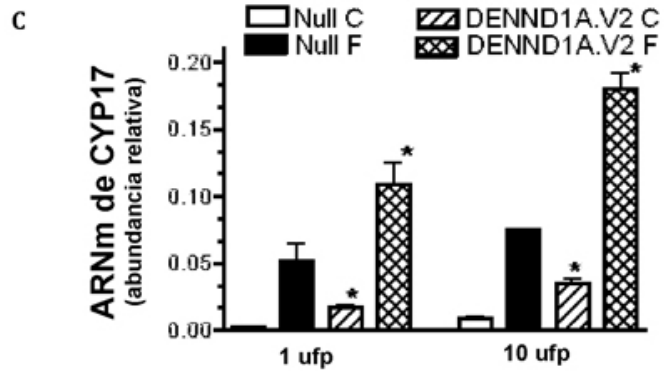


Figura 6 cont.

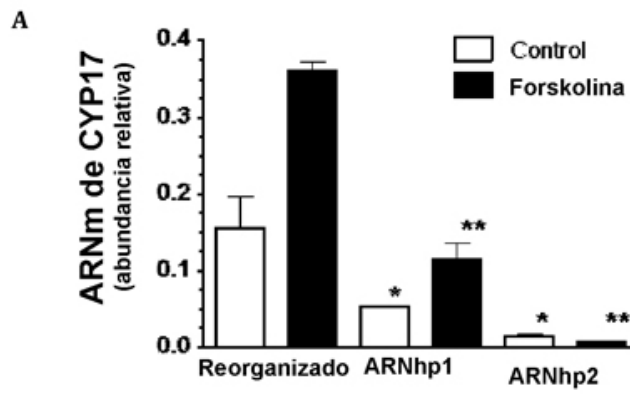
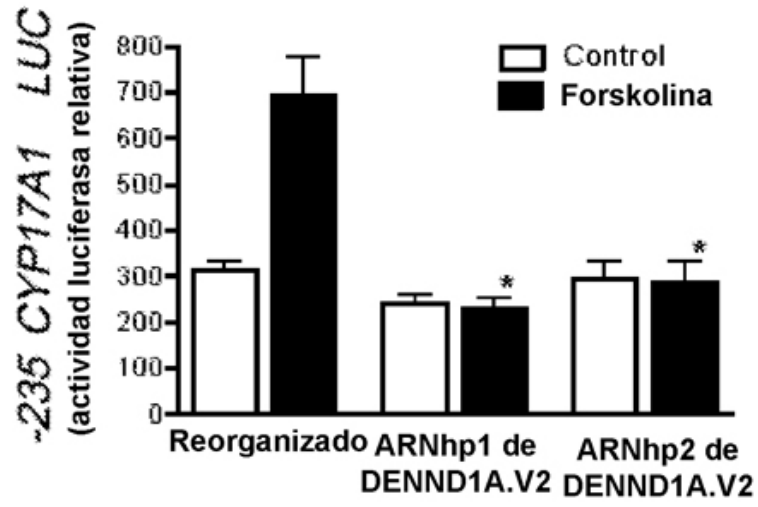


Figura 7

B



C

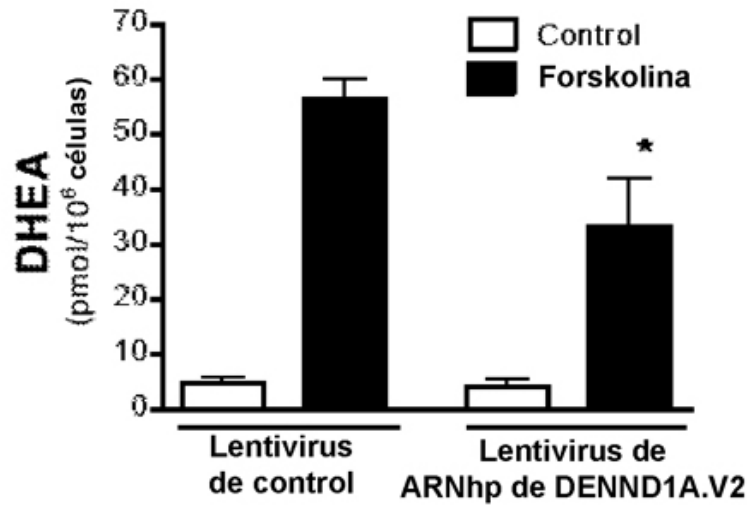


Figura 7 cont.

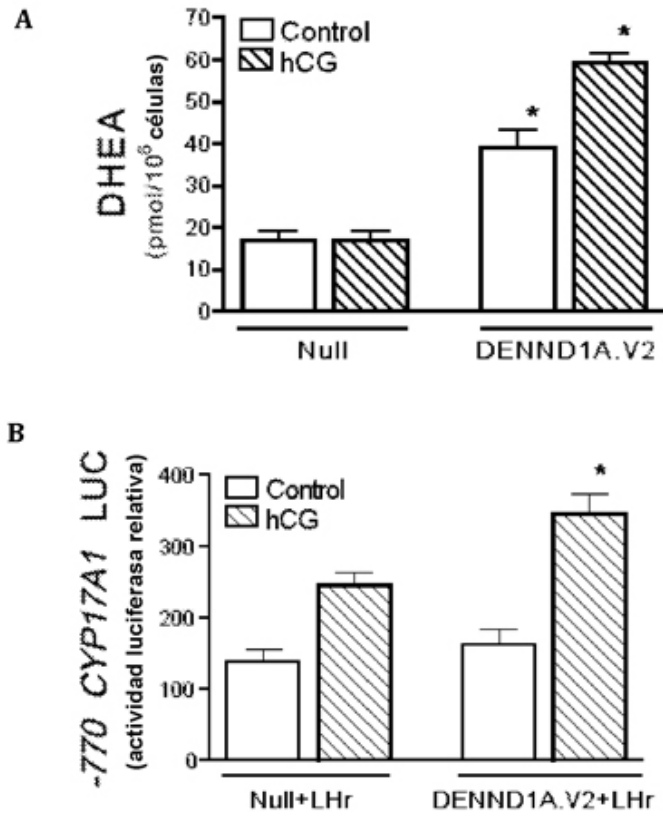


Figura 8

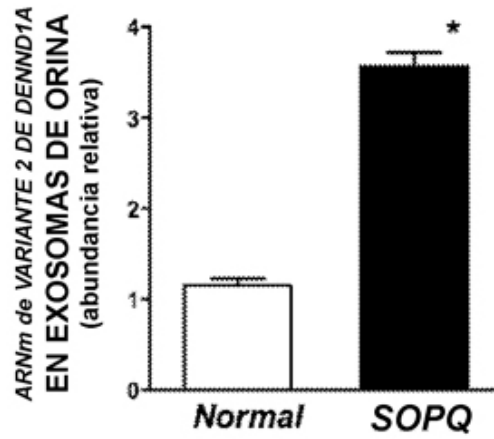


Figura 9