

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 942**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 17170963 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019** **EP 3222633**

54 Título: **Composiciones y métodos relacionados con la variante 2 de dennd1a 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:

**30.04.2020**

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 2 757 942 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).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos relacionados con la variante 2 de dennd1a y síndrome de ovario poliquístico

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.

15 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. El documento WO 01/98353 A2 divulga proteínas secretadas humanas (SECP) entre las que el polipéptido correspondiente a DENND1A. V2 está presente como SEQ ID NO: 33. Además, se describe la producción de anticuerpos dirigidos al extremo C-terminal de dicha SECP y el uso de dichos anticuerpos para la detección específica del polipéptido. También proporciona métodos para diagnosticar, tratar o prevenir trastornos asociados con la expresión anómala de SECP. 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.

40 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona composiciones y métodos para realizar o para ayudar a realizar un diagnóstico de SOPQ como se define en las reivindicaciones. En general, el método comprende detectar y/o cuantificar la proteína de la variante 2 de DENND1A en una muestra obtenida o derivada de un sujeto.

45 La divulgación 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, la invención proporciona un método *in vitro* que puede usarse para la determinación cómoda y rápida de la presencia y/o cantidad de 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.

50 En determinadas realizaciones, la invención se realiza con una muestra que se obtiene de manera no invasiva del sujeto.

La detección de la proteína de la variante 2 de DENND1A puede realizarse usando cualquier método. En una realización, 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.

65 Además, en el presente documento se describe 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 divulgación 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 como se define en las reivindicaciones que son útiles para, entre otros fines, el diagnóstico de SOPQ o cualquier otro estado que se correlacione positivamente con la expresión de la proteína de la variante 2 de DENND1A, tal como se describe adicionalmente en el presente documento según las reivindicaciones. La materia objeto de 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. 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 2 757 942 T3

0001 cgcgcgccgg gcacgcgcgc cggcgacat ggggttcgcc gggctggagc gagtacatta  
 0061 acccctggag gggcgccggc cggcgagga ggcagcctcg agcggggcgg cccagcctg  
 0121 agggaagggg ggaaggggcg gggagagcgc cagagggagg ccggctggcc gcggggcggc  
 0181 gggcagcgca gcgccgagcg gggcccgcgg gcccatgagg aggcctgggg 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 acgaacgccg gatactcatc atttgcagca  
 0841 aactcagcac tctgactgcc tgcaccacg ggtctgcggc gatgctctac cccatgtact  
 0901 ggcagcagct gtacatcccc gtgctgcgcg 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 tgggtgtggcc 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 gaatactgta aagaccaaag

1681 tccgagaaga cggggggcca atcacagtcc actttggaca ggtgcgcca cctcgtccac  
 1741 atgttgtaa gagaccaaag agcaacatcg cagtggagg ccggaggacg tctgtgccga  
 1801 gccctgagca aaacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta  
 1861 cccattttgc ggccaagtcc ccgacgagag getggacctc ttcacacat tgacttacgc  
 1921 cgttgetttt ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgcaa agagccgggtg  
 1981 tctgataatc ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact ttagttttg  
 2041 ttggttggtt ggtttggtt ttgttataa tgccctggtt tctacttctg ttggaaaata  
 2101 tttggggttg aaataaacca 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):

MGSRIKQNPETTFEYVVEVAYPRTGGTLDPEVQRQFPEDYSDQEVLQTLTKFCFPFYVDSLTVSQVQGNFTFVL  
 TDIDSKQRFQFCRLSSGAKSCFCILSYLPWFVEVYKLLNILADYTTKRQENQWNELETLHKLPIDPGVSVHLS  
 VHSYFTVPDTRELPSIPENRNLTEYFVAVDVNNMLHLYASMLYERRILII CSKLSLTACIHGSAAMLYPMYQW  
 VYIPVLPPLLDYCCAPMPYLIIGIHLKSLMEKVRNMLDDVVI LNVDNTLETPEFDDLQSLPNDVISSLKNRLKKV  
 STTTGDGVARAFLKAQAFFGSYRNALKIEPEEPI TFCEEAFVSHYRSGAMRQLQATQLQLFKQFIDGRLDLL  
 NSGEGFSDVFEEEINMGEYAGSDKLYHQWLSTVRKSGSAILNTVKTKANPAMKTIVYKFAKDhakmGIKEVKNRLK  
 QKDIAENGCAPTPEEQLPKTAPSPLVEAKDPKLRDRRPI TVHFGQVRPPRPHVVKRPKSNIAVEGRRTSVPSPE  
 QNTIATPATLHILQKSI THFAAKFPTRGWTSSSH (SEQ ID NO:2)

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

10

# ES 2 757 942 T3

```

0001 cgcgcgccgg gcacgcgcgc cggcgacat ggcgttcgcc gggctggagc gagtacatta
0061 acccctggag gcggcggcgg cggcgagggg gcgagcctcg agcggggcgg ccccagcctg
0121 aggggaagga ggaagggggc gggagagcgc cagagggagg ccggtcggcc gcgggcgggc
0181 gggcagcgca gcgcgcgagc gggcccgcgg gcccatgagg aggcctgggg 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 gattcgggtt ctgcgcctta tcttcaggag cgaagagctg cttctgtatc ttaagctatc
0541 tcccctggtt cgaggatatt tataagctgc ttaacatcct ggcagattac acgacaaaaa
0601 gacaggaaaa tcagtggaaat gagcttcttg aaactctgca caaacttccc atccctgacc
0661 caggagtgtc tgtccatctc agcgtgcatt cttattttac tgtgcctgat accagagaac
0721 ttcccagcat acctgagaat agaaatctga cagaatattt tgtggctgtg gatgtaaca
0781 acatgttgca tctgtacgcc agtatgctgt acgaacgccg gatactcatc atttgcagca
0841 aactcagcac tctgactgcc tgcacccacg 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 gtctccacaa
1141 ccaactggga tgggtgtggcc agagcgttcc tcaaggccca ggetgctttc ttcggtagct
1201 accgaaacgc tctgaaaatc gagccggagg agccgatcac tttctgtgag gaagccttcg
1261 tgtcccacta ccgctccgga gccatgaggc agttcctgca gaacgccaca cagctgcagc
1321 tcttcaagca gtttattgat ggtcgattag atcttctcaa tccggcgaa ggtttcagtg
1381 atgtttttga agaggaaatc aacatggcgc agtacgctgg cagtgacaaa ctgtaccatc
1441 agtggctctc cactgtccgg aaaggaagtg gagcaattct gaatactgta aagaccaaag
1501 caaatccggc catgaagact gtctacaagt tcgcaaaaaga tcatgcaaaa atgggataaa
1561 aagaggtgaa aaaccgcttg aagcaaaagg acattgccga gaatggctgc gccccaccc
1621 cagaagagca gctgccaag actgcaccgt cccactggg ggaggccaag gacccaagc
1681 tccgagaaga ccggcggcca atcacagtcc actttggaca ggtgcgcca cctcgtccac
1741 atgttgtaa gagaccaaag agcaacatcg cagtggaagg ccggaggacg tctgtgccga
1801 gccctgagca gccgcagccg tatcggacac tcagggagtc agacagcgcg gaaggcgacg
1861 aggcagagag tccagagcag caagtgcgga agtccacagg ccctgtccca gctccccctg
1921 accgggctgc 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 agcaagccc cagctgcctc ccctgagaag cctcggccc
2221 tgctcgggaa ctcccggcc ctgcctcgaa ggcccagaa ccgggacagc atcctgaacc
2281 ccagtgacaa ggaggaggtg cccaccctc ctctgggcag catcaccatc ccccggcccc
2341 aaggcagga gaccccagag ctgggcatcg tgcctccacc gcccttccc cgcggcca

```

2401 agctccaggc tgcggggccc gcaacttggtg acgtctcaga gcggtctcag acggatcggg  
 2461 acaggcgagc tgccttgagt ccagggtccc tgcttcccaa ggccccactg  
 2521 aactgctcca gcegetcagc cctggccccg gggtctcagc cagcagcagt gacgccctgc  
 2581 tcgcccctct ggacccgctc agcacagcct ggctcaggcag caccctcccg tcacgccccg  
 2641 ccaccccgaa tgtagccacc ccattcacc cccaattcag cttccccct gcagggacac  
 2701 ccacccatt cccacagcca ccaactcaacc cctttgtccc atccatgcca gcagccccac  
 2761 ccaccctgcc cctggtctcc acaccagccg ggcctttcgg ggccctcca gcttccctgg  
 2821 ggccggcttt tgcgtccggc ctctctgctg ccagtgtctg cttctgtgcc cctcacaggt  
 2881 ctcagcccaa cctctccgcc ctctccatgc ccaacctctt tggccagatg ccatgggca  
 2941 cccacacgag cccctacag ccgctgggtc ccccagcagt tgccccgtcg aggatccgaa  
 3001 cgttgcccct ggcccgtca agtgccaggg ctgctgagac caagcagggg ctggccctga  
 3061 ggccctggaga cccccgctt ctgctccca ggccccctca aggcctggag ccaacactgc  
 3121 agccctctgc tcctcaacag gccagagacc cctttgagga ttgttacag aaaaccaagc  
 3181 aagacgtgag cccgagtcg cccctggccc cgccctcaga ctcggtggag cagctcagga  
 3241 agcagtggga gaccttcag tgagccgggc cctgaggggtg ggggatgcac cgaggccga  
 3301 gggctccgtc actgctcggg ttccgaggct ccccgccac tctctctctg ccagggttct  
 3361 gctggtggga agggatggga cccctctctg ctgccccctc ctcccccca cactgcccc  
 3421 ctctgatgtc tggccctggg gaatggcacc agttccagcc tgggaatcaa cccagttcct  
 3481 gagtgcccat cccaccccg gttgctct cctcgccacc cttgatggg ttttgcacta  
 3541 aagaggtcag ctgggccaat gatattgctc cagaccgagt cctaccacc tcccccgga  
 3601 agtgtcccaa gaggtccga aggcctccc tcogagcca gctctcctgt ctctccaca  
 3661 gccaggccct gcacgcccac ctctcggac acaggtgaca gggttaccct ccagtttgag  
 3721 ctcattgca cgagacacag gttagctggg gttgaagtta ggactcctcc tgggctggag  
 3781 gatttactcg gtggggcact tccagactgt ttctagcaat atacacacac gttcttctct  
 3841 gtgtcttcac cccaaaactt cagttgattc tgacctggga ggatctggg accagggggg  
 3901 cttgggctgc cttgtgatac acagcccag ccacctgca cggggctgc gaggaccagc  
 3961 aactttgatt tatagaagga aatggaaac cccatctga gtattttggg aggagcccc  
 4021 agccctcatc cagctctggc acgctgatac ctccaggtac tccccact gtcaaagctg  
 4081 gggctcagcc tcttctcatc tggagcttg tgggcaaagc tgagaagctg caaccagat  
 4141 ttcaacccea aaaggtcaag ctgaatgctt cagactgatg tggaggcag ctggccttcc  
 4201 tgggttgaa cgaggcagtg gccctgagcc ccttctccag ggccaggtag aaaggacaaa  
 4261 cttggtctct gctcgggga agcaggagga gggctagaag ccagtcctc cccactgccc  
 4321 cagagctcca gcccagcaca gaaattcctg gaaaccaagt caccaaagt agattgaatg  
 4381 tttattatct ttctttttcc tttttacctt attgatttga tgaatctga aatggattca  
 4441 tttcataaaa ccaagttaaa gtatggcccg accatttaag aaaacaacca tctgagacac  
 4501 gcaggaaatt gtgagcattt cgaccgagc tctcatttcc tatttgtgaa gggctcagaca  
 4561 cagctcacc aggggtgctt gggggacaag ggggtctctg gagatgtcac ccagggagcc  
 4621 cctctatgt ctgagaggct gccactgctg cacatgctca gtgaggctg gcggccatcc  
 4681 tggcacatgg ctcttctctg gtcaccctg acctgtctgg ctcaggaatg ggctctggct  
 4741 gctgggggag ccgtgtcact cctgggcaat gggggcacct cctgggcaact taggtgttcc  
 4801 agcatagatt ccagtttctc accctgggca gacccccagg ccccatccgg gatagggcag  
 4861 aggaggtgct ggccgcccc ggaaggagg gtgtgtacct caaggcccc ttggtgtgct  
 4921 gaggggctgg ggtgagcgt ccatgttca atgagcactg ctgctcttc acttgtggga  
 4981 ctttttcaa acccaaggat gaactttgtg tgcattcaat aaatcatct tggggaagag  
 5041 g (SEQ ID NO:3)

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

MGSRIKQNPETTFEYVEVAYPRTGGTLDSPVQRQFPEDYSQEVLQTLTKFCFPFYVDSLTVSQVQGNFTFVL  
 TDIDSKQRFQFCRLSSGAKSCFCILSYLPWFVEVYKLLNLIADYTTKRQENQWNELETLHKLPIPDPGVSVHLS  
 VHSYFTVPDRELPSIPENRNLTIFYVAVDVNNMLHLYASMLYERRILIIICSKLSTLTACIHGSAAMLYPMYQWQ  
 VYIPVLPPLHLDYCCAPMFLYLIHLSLMEKVRNMLDDVVILNVDNTLETTFDDLQSLPNDVYISSLKNRLKVK  
 STTTGDGVARAFLKAQAAFFYGSYRNALKIEPEEITFCEAFVSHYRSGAMRQLQATQQLQFLKQFI DGRLLDL  
 NSGEGFSDVFEEEINMGEYAGSDKLYHQWLSTVRKSGSAILNTVKTKANPAMKTIVYKFAKDhakmGIKEVKNRLK  
 QKDIAENGCAPTPEEQPKTAPSPLEAKDKLREDRRPI TVHFGQVRPPRHVVKRPKSNIAVEGRRTSVPSP  
 QPQPYRTLRESDSAEGDEAESPEQQRKSTGVPAPPDRAAS IDLLEDVFNLDMEAAALQLGQAKSLEDLRAPK  
 DLREQPGTFDYQRLLDGGSESRGVTVALKLTHPYNKLWSLGQDDMAIPSKPPAASPEKPSALLGNSLALPRRQ  
 NRDSILNPSDKKEEVPPTLGSITIPRPQGRKTPELGIVPPPP IPRPAKLQAAGAALGDVSERLQTD RDRRAALSP  
 GLLPGVVPQGPTELLQPLSPGPGAAGTSSDALLALLDPLSTAWSGSTLPSRPATPNVATPFTPQFSFPPAGTPTP  
 FPQPPLNPFVPSMPAAPPTLPLVSTPAGPFGAPPASLGPAFASGLLLSSAGFCAPHRSPNLSALSMPNLFQMP  
 MGTHTSPLQLGPPAVAPSRI RTLPLARSSARAAETKQGLALRPGDPPLLPRPPQGLEPTLQPSAPQQARDPFE  
 5 DLLQKTKQDVSPSPALAPADSVEQLRKQWETFE (SEQ ID NO:4)

Para cada secuencia de ADNc presentada en el presente documento, la divulgación 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. 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 divulgación 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 divulgación 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, se ha mostrado que 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. Se ha mostrado que la muestra comprende exosomas, tales como una muestra de sangre u orina que contiene o se esperaría que contuviese exosomas. Además, la muestra puede ser una muestra de tejido reproductor, o exudado tal como exudado ovárico o tejido o exudado endometrial. Se ha mostrado que 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 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 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 en un método como se describe en el presente documento 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,  
10 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 descrito en el presente  
documento. 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  
15 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  
20 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  
25 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.

30 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. Además, 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  
35 composición de nucleótidos para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con ARNm de la variante 2 de  
DENND1A, y con equivalentes de ADNc 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  
40 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  
45 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  
50 variante 1 de DENND1A desde 1811-1913. La secuencia de la región en 3' mostrada en el equivalente de ADNc 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 gacttcgacg tgtgtggcaa agagccgggtg
1981 tctgataatc ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg
2041 ttggttggtt ggtttggtt ttgtttaata tgccctgttt tctacttctg ttggaaaata
2101 tttgggggtt aaataaacca gtgggagcat ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2161 aaaaaa
(SEQ ID NO:5)

```

55 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:

## ES 2 757 942 T3

```
1811          aaacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta
1861 cccattttgc ggccaagttc ccgacgagag gctggacctc ttcacacat tgacttacgc
1921 cgttgctttt ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgcaa agagccggtg
1981 tctgataatc ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg
2041 ttggttggtt ggtttggtt ttgtttaata tgccctgttt tctactctg 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. Además, un producto de amplificación de este tipo tiene desde 80-100 pb.

10 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.

Además, los cebadores 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 descrito en el presente documento 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 procarriota 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 divulgación 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 son 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,

60

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 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 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: NTIATPATLHILQKSITHFAAKFPTRGW 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.

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. 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.

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.

Se ha mostrado que determinar si un sujeto es un candidato o no para recibir un tratamiento profiláctico o terapéutico para un estado se correlaciona positivamente con la expresión de la variante 2 de DENND1A. Se ha mostrado además que 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. También, 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.

Se ha mostrado que monitorizar el tratamiento del paciente para un estado se correlaciona positivamente con la expresión de la variante 2 de DENND1A. Además, 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.

Además, la divulgación 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. También, 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. Adicionalmente, se considera que los paquetes son kits.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender 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. También, el medio tangible a un profesional sanitario ayuda 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.

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.

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 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.

#### 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*.

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 (KpnI/NaeI) 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 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.

#### 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

transfectaron 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 ciclase. 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 transfectaron 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/Nael) 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 transfectaron 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 ciclase. 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 ± 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.

#### 55 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 divulgación 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 tgtgtgccaa agagccggtg
1981 tctgataatc ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg
2041 ttggttggtt ggtttgttgt ttgtttaata tgccctgttt tctacttctg ttggaaaata
2101 tttgggggtg aaataaacca gtgggagcat gg (SEQ ID NO:15)
    
```

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-ACAGTTCAGGTGATAAGCAGGAAA-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 estas presentes en las muestras.

20 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'-GGCCTCAAA 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.

45 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.

55 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 centrifuga 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 centrifuga 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 centrifuga 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 fenilmetilsufonilo 0,5 mM, ditiotreititol 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 ditiotreititol 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, PGVSVHLSVHSYFTVPDTRELPSIPENRNLTEYFVAVDVNNMLHLYASML (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 centrifuga 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 centrifuga 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 centrifuga 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 centrifuga 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.

**Lista de secuencias**

20 <110> MCALLISTER, Janette STRAUSS, Jerome

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

25 <130> 02941024US

<150> Documento 61/649.568

<151> 21-05-2012

30 <160> 27

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

35 <211> 2166

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 757 942 T3

cgcgcgccgg gcacgcgcgc cggcgacat ggcgttcgcc gggctggagc gaggacatta	60
accctggag gcggcgccgg cggcgagga gcgagcctcg agcggggggg cccagcctg	120
aggaagga ggaagggcg gggagagcgc cagagggagg ccggtcggcc gcggcgggc	180
ggcagcgca gcgccgagcg gggcccgcgg gccatgagg aggcctgggg accatgggct	240
ccaggatcaa gcagaatcca gagaccacat ttgaagtata tgttgaagtg gcctatcca	300
ggacaggtgg cactctttca gatcctgagg tgcagaggca attcccggag gactacagtg	360
accaggaagt tctacagact ttgaccaagt tttgtttccc cttctatgtg gacagcctca	420
cagttagcca agttggccag aacttcacat tcgtgctcac tgacattgac agcaaacaga	480
gattcgggtt ctgccgctta tcttcaggag cgaagagctg cttctgtatc ttaagctatc	540
tcccctgggt cgaggtattt tataagctgc ttaacatcct ggcagattac acgacaaaa	600
gacaggaaaa tcagtggaat gagcttcttg aaactctgca caaacttccc atccctgacc	660
caggagtgtc tgtccatctc agcgtgcatt cttatcttac tgtgcctgat accagagaac	720
ttcccagcat acctgagaat agaaatctga cagaatattt tgtggctgtg gatgtaaca	780
acatgttgca tctgtacgcc agtatgctgt acgaacgccg gatactcatc atttgcagca	840
aactcagcac tctgactgcc tgcacccagc ggtctgcggc gatgctctac cccatgtact	900
ggcagcacgt gtacatcccc gtgctgccgc cgcacctgct ggactactgc tgtgctccca	960
tgccctacct cataggaatc catttaagtt taatggagaa agtcagaaac atggccctgg	1020
atgatgtcgt gatcctgaat gtggacacca acaccctgga aacccttc gatgacctcc	1080
agagcctccc aaacgacgtg atctcttccc tgaagaacag gctgaaaaag gtctccacaa	1140
ccactgggga tgggtgtggc agagcgttcc tcaaggccca ggctgcttcc ttcggtagct	1200

ES 2 757 942 T3

```

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 gccccacccc      1620
cagaagagca gctgccaaag actgcaccgt cccactgggt ggaggccaag gacccaagc      1680
tccgagaaga ccggcggcca atcacagtcc actttggaca ggtgcgccca cctcgtccac      1740
atgttggtta gagaccaaag agcaacatcg cagtggaagg ccggaggacg tctgtgccga      1800
gccctgagca aacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta      1860
cccattttgc ggccaagttc ccgacgagag gctggacctc ttcacacat tgacttacgc      1920
cgttgctttt ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgccaa 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> Homo sapiens

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 2 757 942 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 2 757 942 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> Homo sapiens

5

<400> 3

ES 2 757 942 T3

cgcgcgccgg gcacgcgcgc cggcgacat ggcgttcgcc gggctggagc gagtacatta 60  
 acccctggag gcggcggcgc cggcgagggga gcgagcctcg agcgggaggc cccagcctg 120  
 agggaaggga ggaaggggcg gggagagcgc cagagggagg ccggtcggcc gcgggaggc 180  
 gggcagcgc 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 gtgctgcgc cgcattctgt 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 tgggtgaggc agagcgttcc tcaaggccca ggctgcttc ttoggtagct 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 tcatgacaaa atgggaataa 1560  
 aagaggtgaa aaaccgcttg aagcaaaagg acattgccga gaatggctgc gccccaccc 1620  
 cagaagagca gctgcaaag actgcaccgt cccactggg ggaggccaag gacccaagc 1680  
 tccgagaaga ccggcggcca 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 2 757 942 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 cccaccccta ctctgggcag catcaccatc ccccggcccc 2340  
 aaggcaggaa gaccccagag ctgggcatcg tgctccacc gccattccc cggcccggcca 2400  
 agctccaggc tgccggcgcc gcacttgggt acgtctcaga gcggctgcag acggatcggg 2460  
 acaggcgagc tgccctgagt ccagggtcc tgctggtgt tgtccccaa ggccccactg 2520  
 aactgctcca gccgctcagc cctggccccg gggctgcagg cacgagcagt gacgccctgc 2580  
 tcgccctcct ggacccgctc agcacagcct ggtcaggcag caccctcccg tcacgccccg 2640  
 ccaccccgaa tgtagccacc ccattcacc cccaattcag cttccccct gcagggacac 2700  
 ccacccatt cccacagcca ccaactcaacc cctttgtccc atccatgcca gcagccccac 2760  
 ccaccctgcc cctggtctcc acaccagccg ggcccttcgg ggcccccca gcttcctgg 2820  
 ggccggcttt tgcgctccggc ctctgctgt ccagtgtgg cttctgtgcc cctcacaggt 2880  
 ctcagcccaa cctctccgcc ctctccatgc ccaacctct tggccagatg cccatgggca 2940  
 cccacacgag ccccctacag ccgctgggtc ccccagcagt tgccccgtcg aggatccgaa 3000  
 cgttgccctt ggcccgtca agtgccaggg ctgctgagac caagcagggg ctggccctga 3060  
 ggctggaga cccccgctt ctgcctcca ggccccctca aggcctggag ccaactctgc 3120  
 agccctctgc tcctcaacag gccagagacc cctttgagga tttgttacag aaaaccaagc 3180  
 aagacgtgag ccgagctcc gccctggccc cggccccaga ctcgggtggag cagctcagga 3240  
 agcagtggga gaccttcgag tgagccgggc cctgaggggtg ggggatgcac cgaggcccga 3300  
 gggctccgtcc actgctgcgg ttccgaggct cccccgccac tctctctctg ccaggttct 3360  
 gctggtggga agggatggga cccctctctg ctgccccctc ctcccccca cactgcccat 3420  
 ctctgatgtc tggccctggg gaatggcacc agttccagcc tgggaatcaa ccagttcct 3480  
 gagtgcccat cccacccgc ggttgccctc cctcggcacc cttgattggg ttttgacta 3540  
 aagaggtcag ctgggccaat gatattgtc cagaccgagt cctaccacc tcccccgga 3600  
 agtgtcccaa gaggtccga aggcctcccc tccgagccca gctctcctgt ctctccaca 3660  
 gccaggccct gcacgccac ctctcggac acaggtgaca gggttaccct ccagtttgag 3720  
 ctcatctgca cgagacacag gtagcttggg gttgaagtta ggactcctcc tgggctggag 3780

ES 2 757 942 T3

gatttacctg gtggggcact tccagactgt ttctagcaat atacacacac gttctttcct 3840  
 gtgtcttcac cccaaaactt cagttgattc tgacctggga ggatctgggg accagggggt 3900  
 cttgggctgc cttgtgatac acagccccag ccaccctgca cgggggctgc gagcaccagc 3960  
 aactttgatt tatagaagga aatggaaac 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 ggcaggtag aaaggacaaa 4260  
 cttggtctct gcctcgggga agcaggagga gggctagaag ccagtccctc cccacctgcc 4320  
 cagagctcca ggccagcaca gaaattcctg agccaacgt caccaaagtt agattgaatg 4380  
 tttattatct ttctttttcc tttttacctt attgatttga tgaatcttga aatggattca 4440  
 tttccataaa ccaagttaa gtagggccc accatttaag aaaacaacca tctgagacac 4500  
 gcaggaaatt gtgagcattt cgaccgagc tctcatttcc tatttgtgaa gggctcagaca 4560  
 cagtctacc aggggtgtct gggggacaag ggggtctctg gagatgtcac ccaggagacc 4620  
 ccctctatgt ctgagaggct gccactgctg cacatgctca gtgaggcttg gcggccatcc 4680  
 tggcacatgg ctcttcctgg gtcaaccgtg acctgtctgg ctcaggaatg ggctctggct 4740  
 gctgggggag ccgtgtcact cctgggcat gggggcacct cctgggact taggtgtttc 4800  
 agcatagatt ccagtttcgc accctgggca gacccccagg ccccatccgg gatagggcag 4860  
 aggaggtgct ggcggcccca ggaaggagg gtgtgtacc caaggcccc tggtgtgct 4920  
 gaggggctgg ggtgagcgt ccatgttcac atgagcactg ctgcctcttc acttgtggga 4980  
 ctttttgcaa acccaaggat gaactttgtg tgcattcaat aaaatcatct tggggaagag 5040  
 g 5041

<210> 4  
 <211> 1009  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

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 2 757 942 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 2 757 942 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 2 757 942 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  
5 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
aaacaccatt gcaacaccag ctacactcca catcctacag aaaagcatta cccattttgc

60

ES 2 757 942 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> Homo sapiens	
	<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 sintético	
	<400> 7	
20	gggctgactt cgcagtgtgt 20	
	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
30	<400> 8	
	acagttcagg tgataagcag gaaa 24	
	<210> 9	
	<211> 28	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> n es un resto de extinción secundario	
45	<220>	
	<221> misc_feature	



<223> Secuencia artificial

<400> 14  
ctcttcatca cattgactt 19

5

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

10

<220>  
<223> Secuencia artificial

15

<400> 15

cgttgctttt ccagactggg cagaggggct gacttcgcag tgtgtgcaa agagccggtg 60

tctgataatc ccattttcct gcttatcacc tgaactgtgt cagtatcact tttagttttg 120

ttggttggtt ggtttgttgt ttgtttaata tgcctgttt tctacttctg ttggaaaata 180

tttggggttg aaataaacca gtgggagcat gg 212

<210> 16  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Cebador sintético

25

<400> 16  
ggattcatt ccataaacca agttaa 27

30

<210> 17  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Cebador sintético

<400> 17  
cacaatttc tgcgtgtctc a 21

40

<210> 18  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Sonda sintética

<220>

50

<221> misc\_feature  
<223> n es un fluoróforo o resto de extinción secundario

<220>

55

<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> n es a, c, g o t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> n e s a , c , g o t  
 5  
 <400> 18  
 natggcccga nccatttaag aaaacaacca 30  
 <210> 19  
 10 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador sintético  
 <400> 19  
 ggccctcaaat ggcaactcta ga 22  
 20 <210> 20  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 20  
 cttctgatcg ccatccttga a 21  
 30 <210> 21  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda sintética  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <223> n e s u n f l u o r ó f o r o  
 <220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n e s a , c , g o t  
 <400> 21  
 ntcggtcca acaaccgtaa gggatc 27  
 50 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 22  
 60 cacggcactg atttcagtt c 21  
 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

5 <400> 23  
 tcttgctgcc agtctggact 20

<210> 24  
 <211> 26  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sonda sintética

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> n es un fluoróforo

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n es a, c, g o t

25 <400> 24  
 ntgtgcacag gagccaagag tgaaga 26

<210> 25  
 <211> 22  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador sintético

35 <400> 25  
 gtctcccatc caagtactaa cc 22

<210> 26  
 <211> 28  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> Sonda sintética

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> n es un fluoróforo o resto de extinción secundario

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n es a, c, g o t

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> n es a, c, g o t

60 <400> 26  
 ntctcgtctg natctcggaa gctaagca 28

<210> 27

ES 2 757 942 T3

<211> 50  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Secuencia sintética

<400> 27

Pro Gly Val Ser Val His Leu Ser Val His Ser Tyr Phe Thr Val Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Arg Glu Leu Pro Ser Ile Pro Glu Asn Arg Asn Leu Thr Glu  
20 25 30

Tyr Phe Val Ala Val Asp Val Asn Asn Met Leu His Leu Tyr Ala Ser  
35 40 45

Met Leu  
50

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una pareja de unión o un fragmento de la misma que se une específicamente a la proteína de DENND1A.V2 y no reconoce específicamente DENND1A.V1, en la que dicha pareja de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce específicamente la proteína de DENND1A.V2 y que no reconoce específicamente la proteína de DENND1A.V1, en la que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reconoce específicamente al menos un epítipo presente en la secuencia de aminoácidos de NTIATPATLHILQKSITHFAAKFPTRGW TSSSH (SEQ ID NO. 10).
- 10 2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 en el que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o monoclonal.
- 15 3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 o 2 en el que dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fd, fragmento Fv y fragmentos scFv.
- 20 4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno reconoce específicamente al menos un epítipo presente en la secuencia de aminoácidos de QKSITHFAAKFPTRGWTSSSH (SEQ ID NO. 11).
- 25 5. La pareja de unión o fragmento de la misma según la reivindicación 1 que es específica para la proteína de DENND1A.V2 son díacuerpos.
- 30 6. Método para la detección in vitro de la proteína de DENND1A.V2 que comprende usar la pareja de unión o un fragmento de la misma, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la detección específica de la proteína de DENND1A.V2.
7. El método según la reivindicación 6 en el que un complejo de la pareja de unión específica y la proteína de la variante 2 de DENND1A se detecta por inmunotransferencia de tipo Western o métodos de inmunodetección que incluyen ELISA, una prueba de flujo lateral que incluye una tira reactiva de orina o sangre.

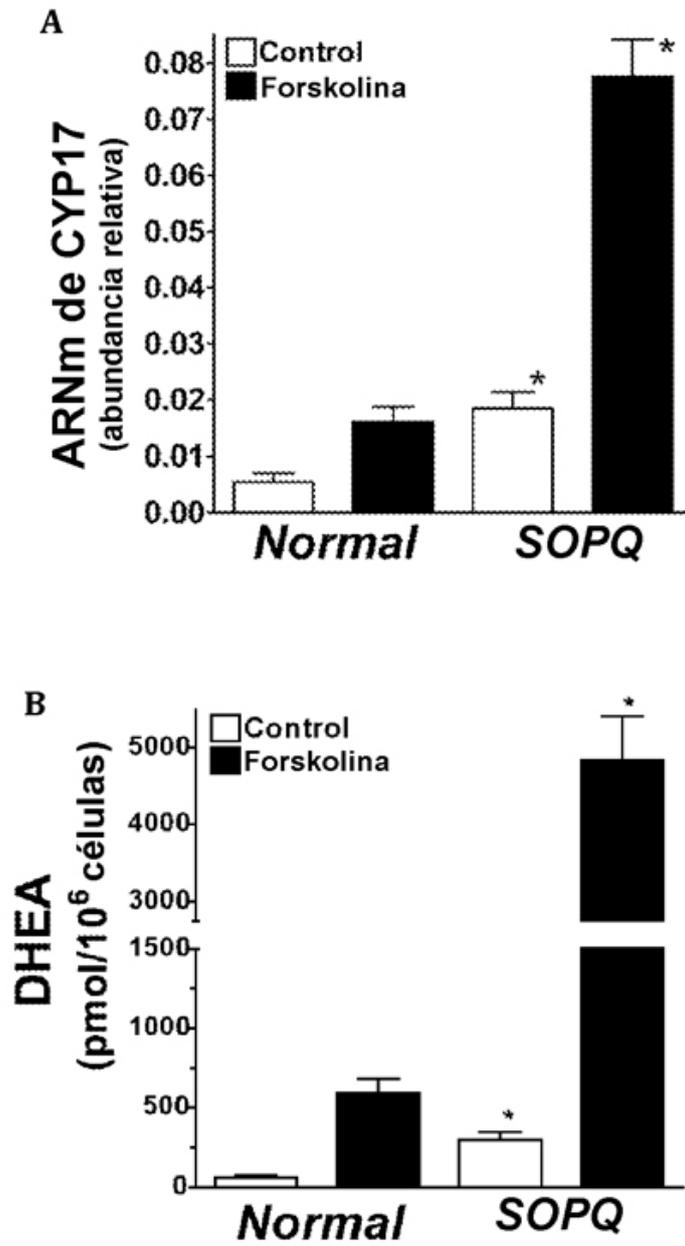


Figura 1

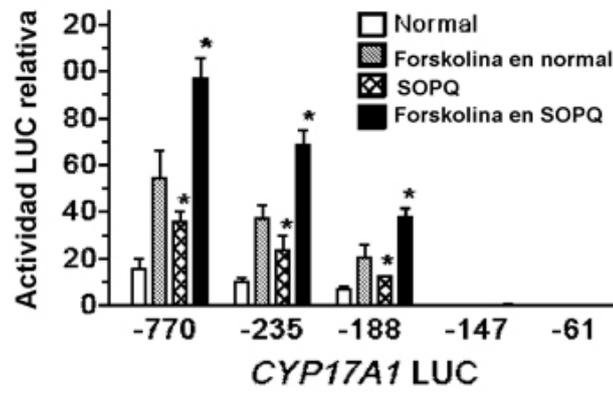


Figura 2

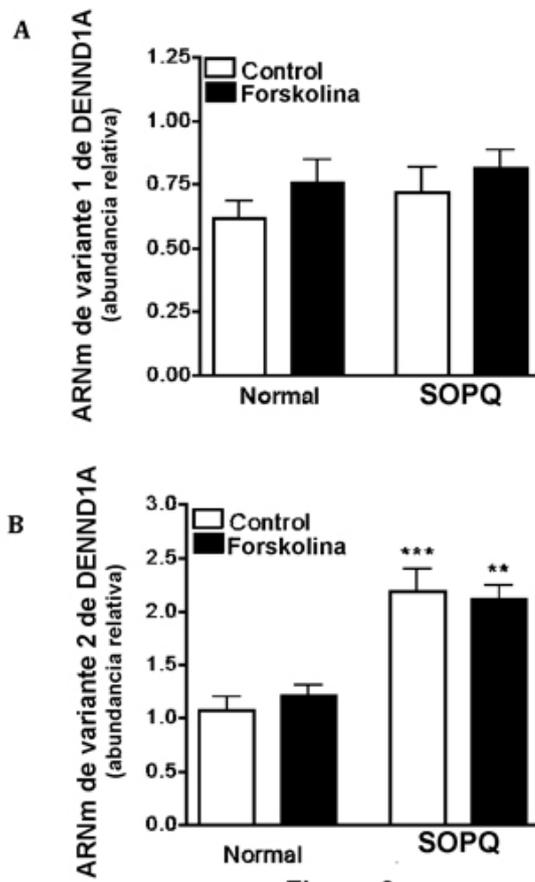


Figura 3

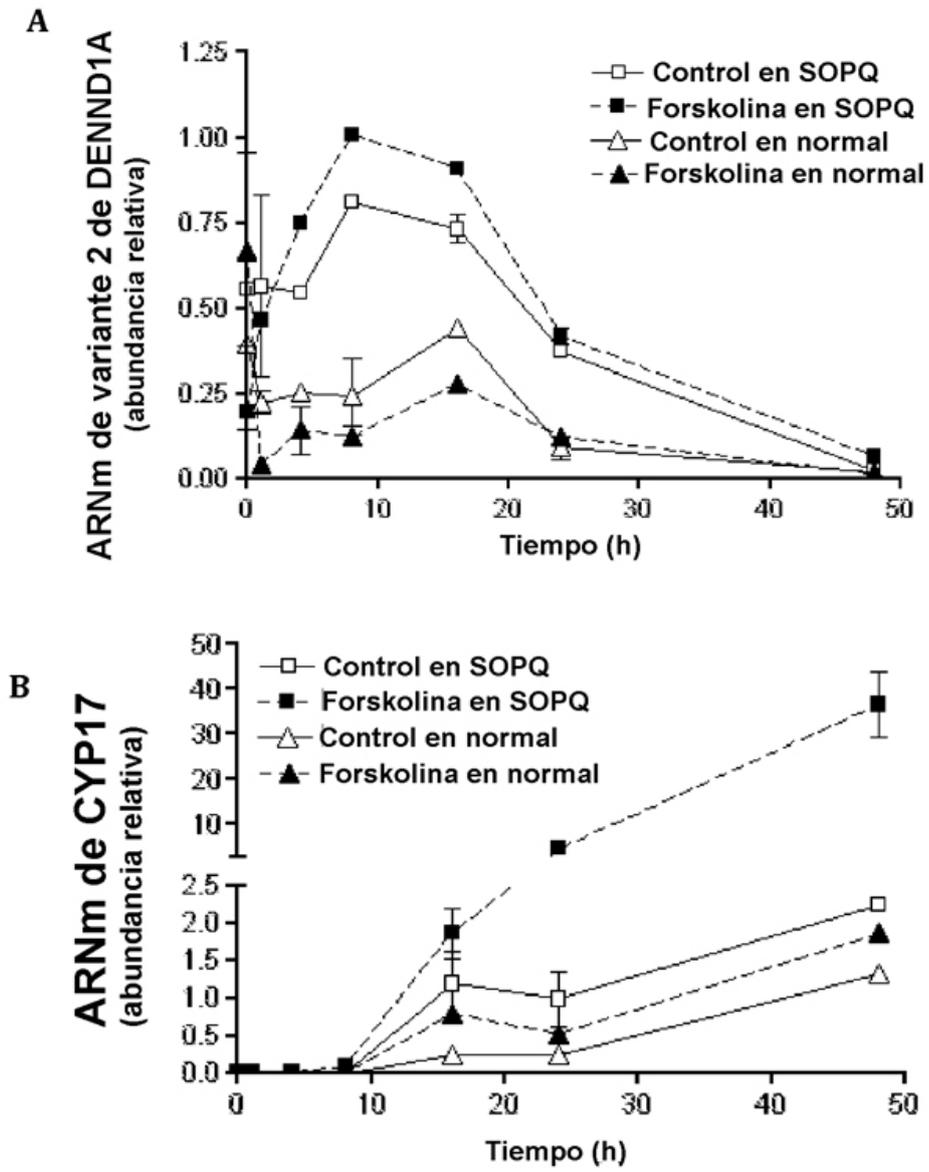


Figura 4

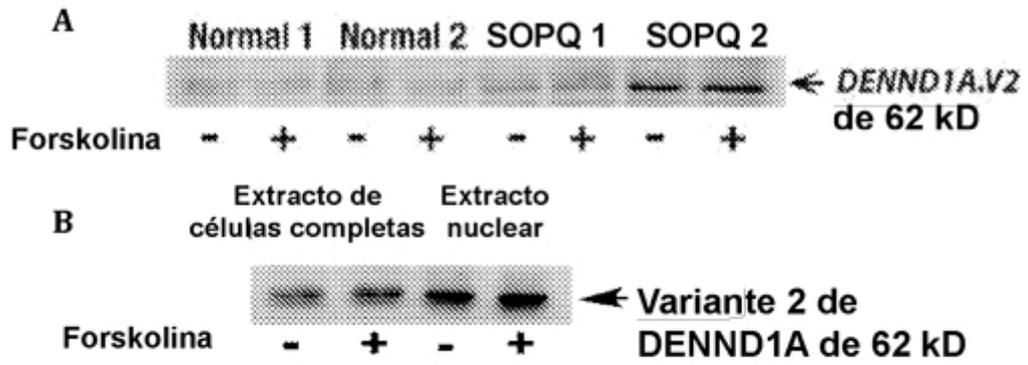


Figura 5

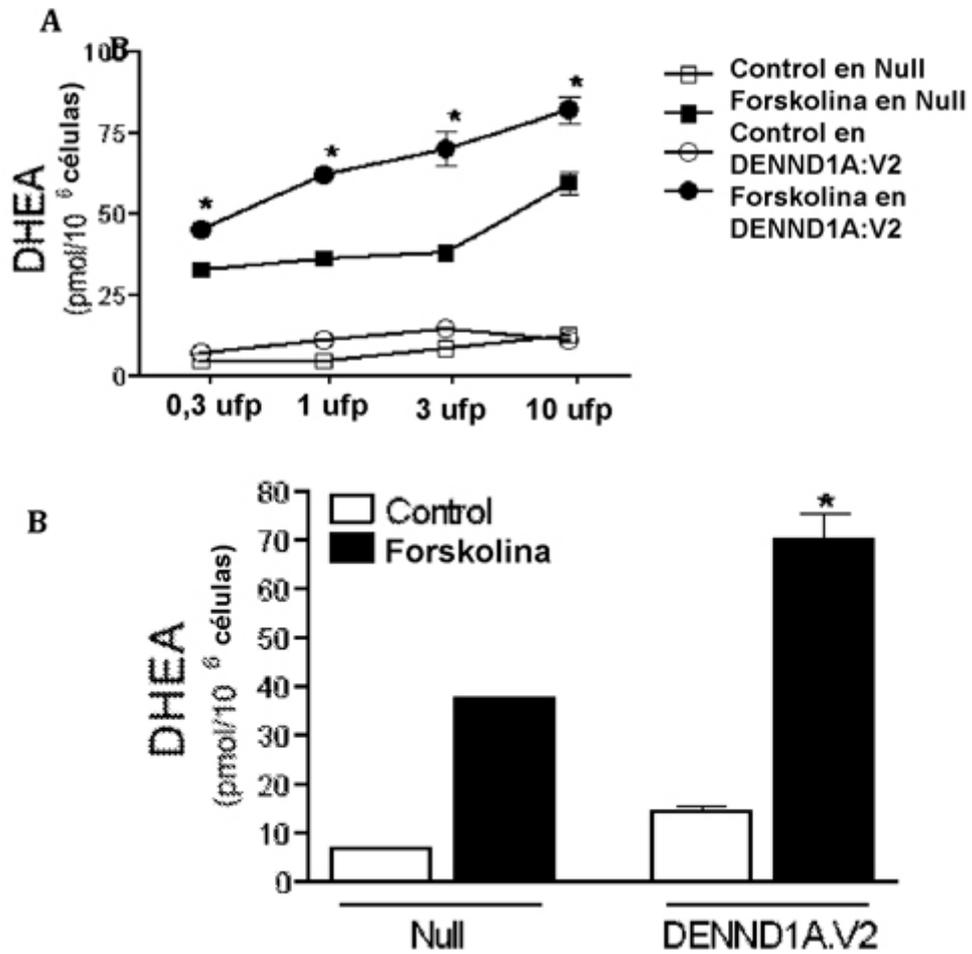


Figura 6

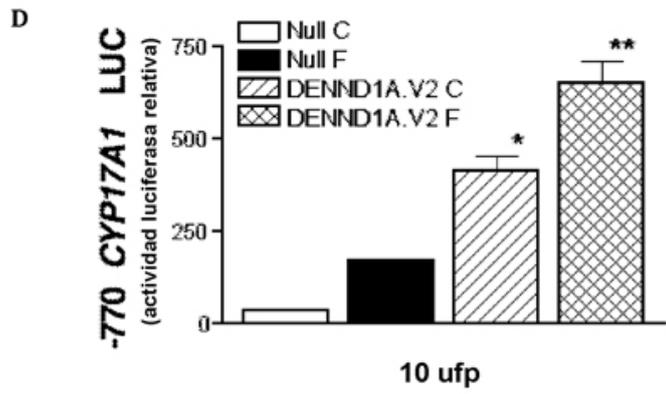
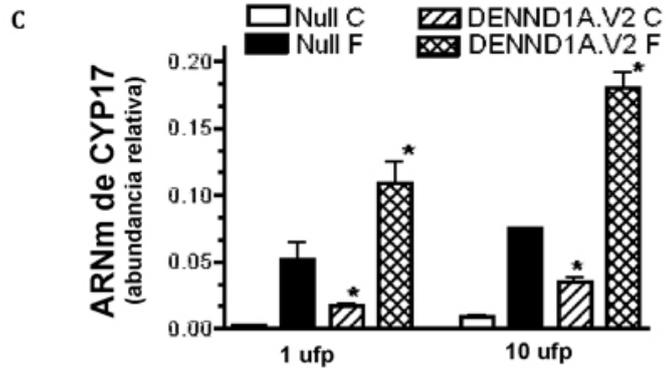


Figura 6 cont.

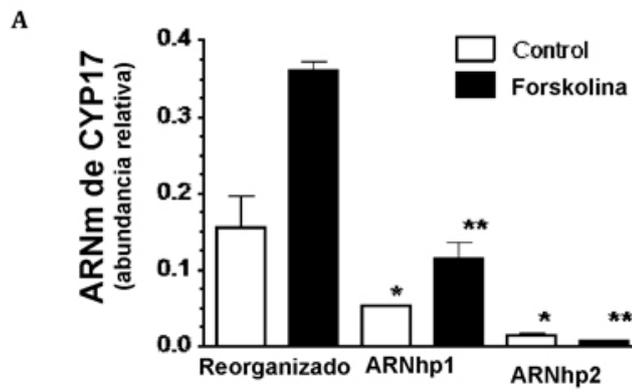
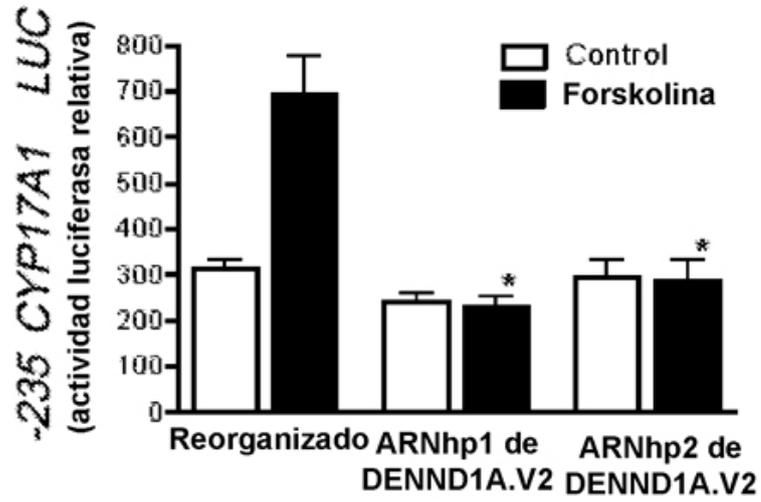


Figura 7

B



C

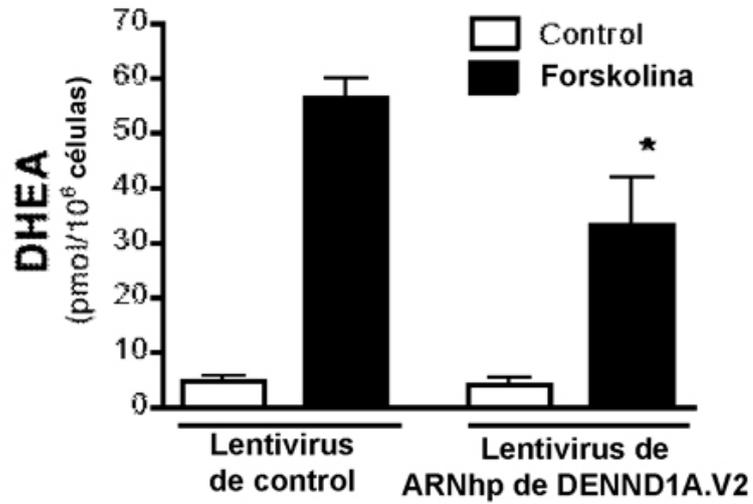


Figura 7 cont.

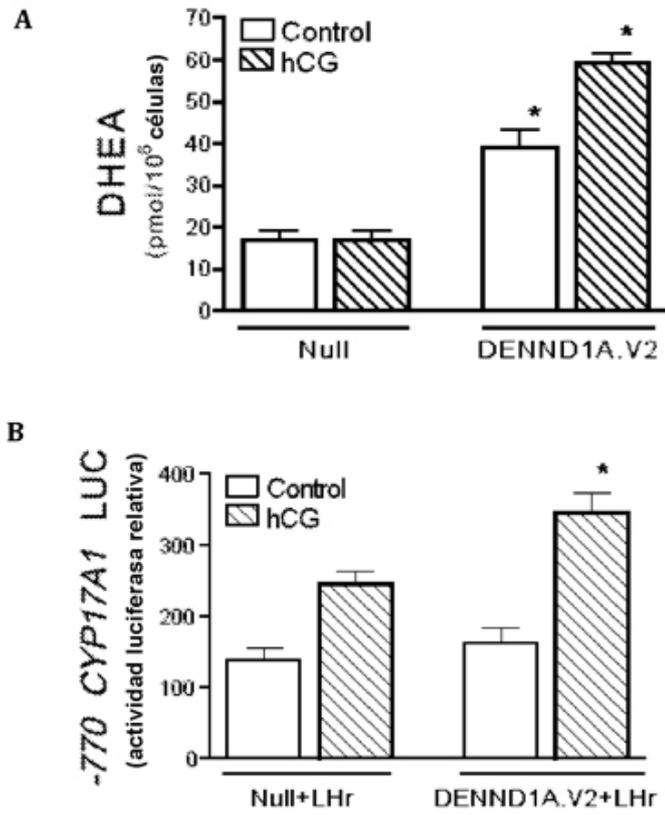


Figura 8

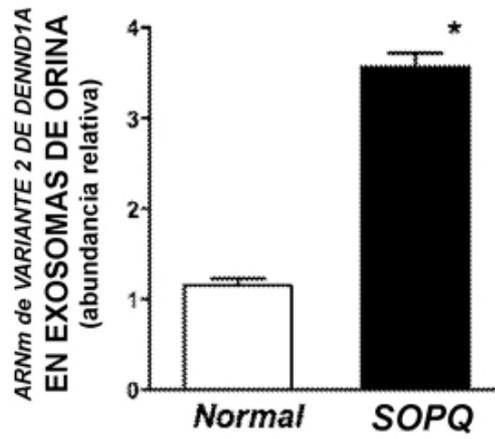


Figura 9