

PROCEDIMIENTOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BETA AMILOIDES
EN PLASMA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere al sector de la medicina y la ciencia veterinaria en el diagnóstico de enfermedades amiloides y, en particular, a procedimientos analíticos para la preparación de muestras de plasma para la detección y cuantificación de péptidos amiloides A β 40 y A β 42 mediante espectrometría de masas.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa principal de demencia, caracterizada por una enfermedad degenerativa progresiva del sistema nervioso central, que afecta al 17 % de las personas con edad entre 75 y 84 años y al 32 % de los que están por encima de los 85 años (*Bateman y Budelier, Biomarkers of Alzheimer Disease, Journal of Applied Laboratory Medicine, Enero 2020, 194-208*). La AD se caracteriza por una aparición progresiva en el cerebro de los pacientes de placas amiloides que tienen núcleos centrales de depósitos amiloides formados principalmente de fibrillas de péptidos de 40-42 aminoácidos. Dichos depósitos amiloides se forman después del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP), lo que da lugar a la generación de péptidos A β insoluble, mayoritariamente A β 1-40 (A β 40) y A β 1-42 (A β 42). En pacientes sanos, estos péptidos se depuran el líquido cefalorraquídeo (CSF) o son transportados a la sangre a través de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, la sobreproducción o reducción en la depuración de péptidos amiloides da lugar a la formación de las placas amiloides que son características de la AD. Estas placas contienen principalmente A β 42 y actúan como un “desagüe” para el péptido, reduciendo las concentraciones de A β 42 en el CSF y la sangre.

30

Por tanto, la proporción de la concentración de A β 42/A β 40 se utiliza actualmente como biomarcador de la amiloidosis cerebral en las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer para la inclusión en ensayos clínicos. A β 42 y A β 40 se pueden medir mediante espectrometría de masas (MS) o inmunoensayo, realizándose la mayoría de los procedimientos actualmente disponibles en líquido

35

cefalorraquídeo (CSF), en el que se encuentran concentraciones de A β 42 inferiores cuando están presentes placas amiloides (*Bateman y Budelier, Biomarkers of Alzheimer Disease, Journal of Applied Laboratory Medicine, Jan 2020, 194-208*). Sin embargo, la recogida de CSF es bastante invasiva y requiere habilidades médicas profesionales, que no es lo más conveniente para estudios de cribado amplio. Por lo tanto, los procedimientos para cuantificar A β 42 y A β 40 en plasma son de mucho interés para el diagnóstico de individuos con o sin síntomas (*Fandos et al., Plasma amyloid β 42/40 ratios as biomarkers for amyloid β cerebral deposition in cognitively normal individuals. Alzheimer's Dement, 12 de septiembre de 2017; 8:179-187*).

10

Sin embargo, la medición de la concentración de A β 42 y A β 40 en plasma también implica dificultades. En primer lugar, la sangre es una matriz muy compleja que comprende cantidades elevadas de numerosas proteínas que dan lugar a un contenido total de proteínas 60 veces superior en plasma frente al CSF. En segundo lugar, la concentración de A β 42 y A β 40 es inferior en comparación con CSF debido al transporte desde el sistema nervioso central a la sangre venosa. Además, la diferencia en la concentración de A β 42 en plasma entre individuos amiloide-positivo y amiloide-negativo es más pequeña que en CSF (*Bateman y Budelier, Biomarkers of Alzheimer Disease, Journal of Applied Laboratory Medicine, Enero 2020, 194-208*). Por dichas razones, el análisis de péptidos beta amiloides en plasma es más desafiante que en CSF y, por lo tanto, se necesitan procedimientos más sensibles y precisos.

Los estudios anteriores que utilizan un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para medir la concentración de péptido beta amiloide en plasma han mostrado resultados contradictorios con respecto a la medición de la proporción de concentraciones de A β 42/A β 40 en pacientes con AD y controles sanos (*Fukumoto et al., Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels, Arch Neurol. 2003; 60:958-964; Pérez-Grijalba et al., Plasma A β 42/40 ratio alone or combined with FDG-PET can accurately predict amyloid-PET positivity: a cross-sectional analysis from the AB255 Study, Alzheimer's Res Ther. 2019;11:96*). De hecho, las diferencias medias entre grupos (es decir, controles sanos frente a individuos con deterioro cognitivo leve) son de hasta un mínimo del 10-15 %, la misma magnitud de la variabilidad aceptable para la exactitud y precisión de los procedimientos analíticos. Esto implica que, a efectos de detectar dicha diferencia tan

35

baja entre grupos, la variabilidad de los procedimientos analíticos debe ser muy inferior al 15 %.

Por otro lado, se ha demostrado que los procedimientos de espectrometría de masas (MS) disponibles son más sensibles y precisos que los inmunoensayos. Actualmente, existen dos procedimientos analíticos basados en MS conocidos en la técnica para la determinación de A β 40 y A β 42 en plasma humano. El primero se publicó en 2017 por el grupo de Randall Bateman (*Ovod et al., Amyloid B concentrations and stable isotope labelling kinetics de human plasma specific to central nervous system amyloidosis, Alzheimer's and Dementia, Octubre de 2017; 13(10): 1.185*). Este procedimiento combina la preparación de la muestra mediante inmunoprecipitación y la digestión en Lys-N con nanoLC-MS/MS. El segundo procedimiento se publicó en 2018 por el grupo de Akinori Nakamura (*Nakamura et al., High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease, Nature 2018 Feb 8; 554(7691):249-254*) y combina la preparación de la muestra mediante doble inmunoprecipitación con MALDI-TOF/EM.

Sin embargo, ambos procedimientos consumen tiempo y recursos, ya que requieren la utilización de anticuerpos caros durante la inmunoprecipitación. Además, el procedimiento de Bateman requiere adicionalmente la digestión enzimática del analito de la muestra, lo que da lugar a la detección de una mezcla de especies A β truncadas en N en lugar de los péptidos A β intactos.

Por consiguiente, existe aún la necesidad en la técnica de procedimientos sensibles y reproducibles para la detección y cuantificación de péptidos beta amiloides en muestras de plasma que podrían aplicarse a estudios de cribado amplios.

Los inventores de la presente invención, después de una experimentación amplia y profunda, han descubierto, de manera sorprendente, un nuevo procedimiento para la preparación de muestras de plasma que comprenden péptidos amiloides que permite la cuantificación exacta de los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 intactos mediante espectrometría de masas. Por tanto, este nuevo procedimiento reduce la variabilidad en la medición de las proporciones de A β 42/A β 40 a valores inferiores a la diferencia real entre controles sanos e individuos con deterioro cognitivo leve.

Además, el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo sin utilizar inmunoprecipitación o digestión de la muestra, que son etapas esenciales de los procedimientos conocidos en la técnica y, por lo tanto, proporciona una preparación de la muestra más sencilla y más rápida, reduciendo las necesidades de coste y tiempo en comparación con los procedimientos actuales disponibles.

Finalmente, el procedimiento de la presente invención cumple con las recomendaciones actuales de la FDA para la validación de un procedimiento bioanalítico y, por lo tanto, se puede aplicar para diagnosticar y/o distinguir entre diferentes fases de una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides para análisis mediante espectrometría de masas, caracterizado por que comprende las etapas de:

- a) Poner en contacto dicha muestra de plasma con un agente desnaturalizante,
 - b) Realizar una primera etapa de extracción en fase sólida sobre la solución obtenida en la etapa a) para recuperar un primer eluato,
 - c) Realizar una segunda etapa de extracción en fase sólida de dicho primer eluato obtenido en la etapa b) para recuperar un segundo eluato, y
 - d) Secar dicho segundo eluato obtenido en la etapa c) y procesarlo para análisis por espectrometría de masas,
- en el que la muestra obtenida en la etapa d) comprende los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos.

En una realización de dicho procedimiento la segunda etapa de extracción en fase sólida es una extracción de intercambio de cationes.

En otra realización, la segunda extracción en fase sólida de intercambio de cationes es un intercambio de cationes fuerte, débil o en modo mixto fase inversa-intercambio de cationes.

En otra realización, la segunda etapa de extracción en fase sólida es una extracción en fase sólida de intercambio de aniones.

En otra realización, la extracción en fase sólida de intercambio de aniones es un
5 intercambio de aniones fuerte, débil o en modo mixto fase inversa-intercambio de aniones.

En otra realización, la muestra de plasma se pone en contacto con un agente desnaturalizante ácido en la etapa a) para obtener una solución que tiene un pH
10 menor o igual a 4,5.

En otra realización, el agente desnaturalizante ácido es una solución de ácido fórmico en agua a una concentración entre el 40 % y el 70 % (v/v).

15 En otra realización, la primera etapa de extracción en fase sólida es una extracción en fase sólida de fase inversa.

En otra realización, las primera y segunda etapas de extracción en fase sólida comprenden cada una, como mínimo, dos etapas de lavado caracterizadas por que
20 las primeras etapas de lavado de las primera y segunda etapas de extracción en fase sólida se llevan a cabo con una solución que comprende un ácido y las segundas etapas de lavado de las primera y segunda etapas de extracción en fase sólida se llevan a cabo con una solución que comprende un disolvente orgánico polar miscible en agua.

25

En otra realización, la solución que comprende un ácido de las primeras etapas de lavado es la misma que la solución que comprende un ácido de las segundas etapas de lavado.

30 En otra realización, la solución que comprende un ácido de las primeras etapas de lavado es diferente que la solución que comprende un ácido de las segundas etapas de lavado.

En otra realización, la primera etapa de extracción en fase sólida es una extracción
35 en fase sólida de intercambio de cationes.

En otra realización, la primera extracción en fase sólida de intercambio de cationes es un intercambio de cationes fuerte, débil o en modo mixto fase inversa-intercambio de cationes.

5

En otra realización, las primera y segunda etapas de extracción en fase sólida comprenden cada una de ellas al menos dos etapas de lavado caracterizadas por que la primer etapa de lavado de la primera extracción en fase sólida se lleva a cabo con una solución que comprende un ácido y la primera etapa de lavado de la segunda extracción en fase sólida se lleva a cabo con una solución que comprende una base, y las segundas etapas de extracción de las primera y segunda etapas de extracción en fase sólida se llevan a cabo con una solución que comprende un disolvente orgánico polar miscible en agua.

15 En otra realización, la muestra de plasma se pone en contacto con un agente desnaturalizante básico en la etapa a) para obtener una solución que tiene un pH mayor o igual que aproximadamente 11.

En otra realización, el agente desnaturalizante básico es una solución de hidróxido de amonio en agua a una concentración entre 5 % y 50 % (v/v).

20

En otra realización, la primera etapa de extracción en fase sólida es una extracción en fase sólida de intercambio de aniones.

En otra realización, la primera etapa de extracción en fase sólida de intercambio de aniones es un intercambio de aniones fuerte, débil o en modo mixto fase inversa-intercambio de aniones.

25

En otra realización, las segundas etapas de extracción en fase sólida comprende cada una de ellas al menos dos etapas de lavado caracterizado por que la primera etapa de lavado de la primer extracción en fase sólida se lleva a cabo con una solución que comprende un ácido y la primera etapa de lavado de la segunda extracción en fase sólida se lleva a cabo con una solución que comprende una base, y las segundas etapas de lavado de la primera y la segunda etapas de extracción en fase sólida se llevan a cabo con una solución que comprende un disolvente orgánico polar miscible en agua.

35

En aún otra realización, la solución para procesar el segundo eluato para análisis por espectrometría de masa es una solución acuosa que comprende un surfactante y un agente reductor. En una realización preferente, dicha solución de la etapa d) para procesar el eluato seco es una solución acuosa que comprende Triton X-100 a una concentración entre el 0,01 % y el 0,8 % (v/v) y tris-carboxietilfosfina a una concentración entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v).

En otra realización, dicha solución de la etapa d) para procesar el eluato seco es una solución acuosa que comprende un surfactante, un agente reductor, un disolvente orgánico polar miscible en agua y un ácido. En una realización preferente, dicha solución de la etapa d) para procesar el eluato seco es una solución acuosa que comprende Triton X-100 a una concentración entre el 0,01 % y el 0,8 % (v/v), tris-carboxietilfosfina a una concentración entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v), acetonitrilo a una concentración entre el 3 % y el 7 % (v/v), dimetilformamida a una concentración entre el 0,1 % y el 3 % (v/v) y ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración entre el 0,1 % y el 3 % (v/v).

En algunas realizaciones de la presente invención, la muestra de plasma es una muestra de plasma humano. En otras realizaciones, el volumen de muestra de plasma utilizado en la etapa a) del procedimiento de la presente invención se encuentra entre 100 μ l y 400 μ l.

En algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides para análisis mediante espectrometría de masas no comprende inmunoprecipitación o digestión de la muestra de plasma antes del análisis con espectrometría de masas.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la cuantificación de los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos en una muestra de plasma mediante espectrometría de masas, caracterizado por que comprende las etapas a) a d) del procedimiento para preparar una muestra de plasma, tal como se describe en el presente documento, y comprende, además, las etapas de:

- i) Realizar una etapa de cromatografía líquida sobre la solución obtenida en la etapa d), para separar los analitos de interés,
- ii) Someter los analitos separados en la etapa i) a ionización para generar una o más especies cargadas;
- 5 iii) Separar dichas una o más especies cargadas según su movilidad iónica,
- iv) Detectar dichas una o más especies cargadas separadas en la etapa iii) y medir su abundancia mediante espectrometría de masas; y
- v) Determinar la cantidad o concentración de los péptidos beta amiloides A β 40 y/o A β 42 intactos en la muestra de plasma mediante comparación de las
- 10 abundancias de la una o más especies cargadas medidas en la etapa iv) con una curva estándar.

En algunas realizaciones, dicho procedimiento para la cuantificación de los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos en una muestra de plasma mediante

15 espectrometría de masas se caracteriza por que la cromatografía líquida es micro-cromatografía líquida (micro-HPLC), la ionización es ionización por electrospray (ESI), la separación de la una o más especies cargadas se lleva a cabo mediante espectrometría de movilidad diferencial (DMS) y la técnica de espectrometría de masas para detectar y medir las abundancias de la una o más especies cargadas

20 separadas es la monitorización de múltiples reacciones (MRM) en un instrumento con triple cuadrupolo.

En otras realizaciones de la presente invención, la curva estándar utilizada en dicho procedimiento para la cuantificación de los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42

25 intactos en una muestra de plasma mediante espectrometría de masas se prepara con plasma humano.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una solución acuosa para procesar un eluato seco para analizar mediante espectrometría de masas que

30 comprende Triton X-100 a una concentración entre el 0,01 % y el 0,8 % (v/v), tris-carboxietilfosfina a una concentración entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v), acetonitrilo a una concentración entre el 3 % y el 7 % (v/v), dimetilformamida a una concentración entre el 0,1 % y el 3 % (v/v) y ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración entre el 0,1 % y el 3 % (v/v).

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un gráfico que representa las proporciones de A β 42/A β 40 correspondientes a las muestras de 36 individuos (PET negativa o PET positiva) cuantificados mediante los procedimientos de la presente invención.

La figura 2 muestra un gráfico de la curva ROC calculada para las proporciones de A β 42/A β 40 de la figura 1.

La figura 3 muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de plasma sometida a una única etapa de SPE, un intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto (MCX). El trazo a la izquierda se refiere a A β 40 y el trazo a la derecha a A β 42.

La figura 4 muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de plasma sometida a una 1ª etapa de SPE, una SPE de fase inversa (HLB Prime) seguida de una segunda SPE MCX, según el protocolo A. El trazo de la izquierda se refiere a A β 40 y el trazo de la derecha a A β 42.

La figura 5 muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de plasma sometida a una 1ª etapa de SPE MCX, seguida de una segunda SPE HLB. El trazo de la izquierda se refiere a A β 40 y el trazo de la derecha a A β 42.

La figura 6 muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de plasma sometida a una 1ª etapa de SPE HLB, seguida de una segunda SPE MCX, según el protocolo B. El trazo de la izquierda se refiere a A β 40 y el trazo de la derecha a A β 42.

La figura 7 muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de plasma sometida a una 1ª etapa de SPE, una SPE de intercambio aniónico de fase inversa en modo mixto (MAX), seguida de una segunda SPE MCX, según el protocolo D, en comparación con la combinación de una primera HLB, seguida de una segunda MCX. El trazo de la izquierda se refiere a A β 40 y el trazo de la derecha a A β 42.

La figura 8 muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de plasma sometida a una 1ª etapa de SPE MCX, seguida de una segunda SPE MAX, según el

protocolo C, en comparación con la combinación de una primera HLB, seguida de una segunda MCX. El trazo de la izquierda se refiere a A β 40 y el trazo de la derecha a A β 42.

5 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La siguiente descripción pretende simplemente ilustrar varias realizaciones de la presente invención. Por tanto, las modificaciones específicas descritas no pretenden ser limitativas. Será evidente para un experto en la materia que se pueden utilizar
10 equivalentes, realizar cambios y modificaciones sin alejarse del espíritu o alcance del objeto presentado en el presente documento, y debe entenderse que dichas realizaciones equivalentes se incluyen en el presente documento.

Tal como se utiliza en la presente invención, las formas singulares “un”, “una” y “el” o
15 “la” incluyen las referencias plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra “comprender”, o variaciones, tales como
20 “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un elemento o grupo de elementos mencionados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o grupo de elementos.

Los términos “analito”, “especie”, “muestra”, “componente”, “sustancia química” e
25 “ion” se pueden utilizar todos en el presente documento para referirse a una sustancia para analizar, identificar y cuantificar mediante los procedimientos de la presente invención.

El término “extracción en fase sólida” o “SPE”, tal como se utiliza en el presente
30 documento, se refiere a un proceso mediante el cual una mezcla se separa en componentes. Los componentes se disuelven y/o suspenden en una solución (“solución de muestra”) y se separan entre sí por sus diferentes afinidades a un sólido a través del cual pasa la solución (“fase estacionaria”). En algunos casos, a medida que la solución de muestra pasa a través de la fase estacionaria, los componentes no
35 deseados de la solución de muestra pueden ser retenidos por la fase estacionaria (es

decir, el analito en la solución de muestra se purifica). En otros casos, los componentes deseados pueden ser retenidos por la fase estacionaria (es decir, el analito de interés es retenido en la fase estacionaria) y se utiliza una segunda fase móvil para eluir el analito retenido de la fase estacionaria para el posterior procesamiento o análisis. La "fase estacionaria" está contenida habitualmente en un "cartucho", una "punta" o una "columna", que se pueden agrupar en placas con múltiples pocillos, que son particularmente convenientes para estudios de cribado amplio. Los cartuchos, columnas, puntas y placas con múltiples pocillos están disponibles comercialmente o se pueden preparar según procedimientos conocidos en la técnica.

El término "purificación" se refiere a un procedimiento que enriquece la cantidad de uno o más analitos de interés en relación con otros componentes en la muestra que pueden interferir con la detección del analito de interés. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "purificación" no se refiere a eliminar todo el material de la muestra distinta del analito o analitos de interés.

"Inmunoprecipitación" se refiere a un procedimiento de purificación que utiliza anticuerpos, que incluyen anticuerpos policlonales o monoclonales, para enriquecer a una muestra en dicho uno o más analitos de interés.

El término "digestión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere, en general, a cualquier procedimiento adecuado para degradar o escindir un polipéptido o proteína, que incluye, por ejemplo, la utilización de enzimas celulares (proteasas) y digestión intramolecular.

Las expresiones "espectrometría de masas" o "MS", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una técnica analítica para medir una proporción de masa con respecto a carga de un analito particular. La MS se utiliza ampliamente para incluir todos los componentes y sistemas que se pueden utilizar para detectar e identificar analitos utilizando su proporción de masa con respecto a carga. La tecnología de MS incluye, en general, ionizar los analitos (aunque se pueden ionizar previamente en solución) para formar analitos cargados, transferir estos analitos cargados a la fase gaseosa, determinar la proporción de masa con respecto a carga y calcular las abundancias relativas o absolutas. Los analitos se pueden ionizar y

detectar mediante cualquier medio adecuado.

El término "cromatografía" se refiere a un proceso mediante el cual se separa una mezcla transportada por un líquido o gas en componentes que eluyen a tiempos de retención diferentes como resultado de una distribución diferencial de las entidades químicas a medida que fluyen a través de una fase estacionaria. Por tanto, "cromatografía líquida" (LC) o "cromatografía líquida de alto rendimiento" (HPLC) se refieren a la separación selectiva de uno o más componentes de una solución de fluido a medida que el fluido se mueve a través de una columna. La separación es el resultado de la división de los componentes de la mezcla entre una o más fases estacionarias y la fase móvil. Entre los ejemplos de LC o HPLC se incluyen cromatografía líquida de fase normal (NPLC), cromatografía líquida de fase inversa (RPLC), cromatografía líquida de alta turbulencia (HTLC), cromatografía de interacción hidrófila (HILIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía líquida por repulsión electrostática (ERLIC) y cromatografía líquida multidimensional.

El término "micro-HPLC" o "micro-LC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) que utiliza microcaudales (es decir, 1-25 $\mu\text{l/min}$) y columnas capilares (150-500 μm de diámetro interno).

Los términos "ionización" o "ionizar", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a un proceso mediante el cual se genera un ion de analito que tiene una carga eléctrica neta igual a una o más unidades de carga. Los iones negativos tienen una carga neta negativa y los iones positivos tienen una carga neta positiva. Entre los ejemplos no limitativos de ionización se incluyen la ionización electrónica, la ionización química, la ionización por electrospray (ESI), la fotoionización a presión atmosférica (APPI), la ionización de desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI), la ionización química a presión atmosférica (APCI), entre otras.

"Ionización por electrospray" o "ESI" se refiere a un procedimiento de ionización en el que se transfiere un analito de interés como un ion a la fase gaseosa, en el que una

solución de muestra que contiene el analito de interés se pulveriza en un campo eléctrico para forma gotas cargadas.

La expresión "espectrometría de movilidad iónica (IMS)" se refiere a una técnica analítica utilizada para separar e identificar moléculas ionizadas en la fase gaseosa en base a su movilidad en un gas tampón portador. La expresión "espectrometría de movilidad diferencial (DMS)" se refiere a un tipo particular de IMS que consiste en la separación de moléculas ionizadas en base a la diferencia entre la movilidad iónica en campos eléctricos altos y bajos en gases a presión atmosférica o próxima a la misma.

La expresión "monitorización de múltiples reacciones (MRM)", también denominada "monitorización de reacciones seleccionadas (SRM)" se refiere a un modo de rastreo en MS en tándem en el que dos (o más) dispositivos de análisis (es decir, cuadrupolos) se ajustan para monitorizar una o más parejas de productos originales elegidos de los analitos de interés.

Las expresiones "espectrometría de masas en tándem" o "MS/MS" se refieren a espectrometría de masas en la que se realizan múltiples etapas de análisis de masas, en la que las múltiples etapas están separadas en el tiempo o el espacio. Por ejemplo, al espectrometría de masas en tándem en el tiempo puede implicar un analizador de masas (por ejemplo, una trampa de iones), en la que iones particulares, en primer lugar, son atrapados, aislados y fragmentados y, a continuación, se analizan en el mismo analizador de masas. La espectrometría de masas en tándem en espacio implica más de un analizador. Los analizadores se separan por una o más regiones de reacción (es decir, una celda de colisiones rellena con un gas como argón, xenón, nitrógeno, helio), donde tiene lugar la disociación del analito. Finalmente, los iones del fragmento se filtran en el analizador final y, a continuación, se detectan. En general, se utilizan dos analizadores. Estos pueden ser, o no, del mismo tipo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ROC" significa "característica operativa del receptor". Se puede utilizar un análisis ROC para evaluar el resultado de un diagnóstico o la capacidad predictiva de una prueba o un procedimiento de análisis. Un gráfico ROC es una representación de la sensibilidad y

especificidad de una prueba de varios umbrales o valores de corte. Cada punto en una curva ROC representa la sensibilidad y su respectiva especificidad. Se puede seleccionar un valor umbral en base a una curva ROV para identificar un punto en el que tanto la sensibilidad como la especificidad tienen valores aceptables, y este valor se puede utilizar en la aplicación de la prueba para un objetivo de diagnóstico. Si se solo se optimiza la especificidad, entonces es menos probable que la prueba genere un falso positivo (diagnóstico de la enfermedad en más sujetos que no tienen la enfermedad) a coste de una mayor probabilidad de que no se identifiquen algunos casos (por ejemplo, falsos negativos). Si solo se optimiza la sensibilidad, entonces la prueba probablemente identificará la mayoría o todos los sujetos con la enfermedad, pero también diagnosticará la enfermedad en más sujetos que no tienen la enfermedad (por ejemplo, falsos positivos). Un usuario es capaz de modificar los parámetros y, por lo tanto, seleccionar un valor umbral de ROC adecuado para una situación clínica determinada de maneras fácilmente entendibles por los expertos en la materia.

La expresión “valor del área bajo la curva (AUC)”, cuantifica la capacidad global de la prueba para discriminar entre propiedades de muestras diferentes, en este caso para discriminar entre los sujetos con amiloidosis A β (es decir, amiloide positivo) y aquellos sin amiloidosis A β (es decir, amiloide negativo). Una prueba que no es mejor en la identificación de verdaderos positivos que la posibilidad aleatoria generará una curva ROC con una AUC de 0,5. Una prueba que tiene una especificidad y sensibilidad perfectas (es decir, que no generan falsos positivos ni falsos negativos) tendrá una AUC de 1,00.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. A continuación, se describen procedimientos y materiales de ejemplo, aunque también se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento y serán evidentes para los expertos en la materia.

Cada realización en esta memoria descriptiva debe aplicarse mutatis mutandis a cualquier otra realización, a menos que se indique claramente lo contrario.

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides para análisis mediante espectrometría de masas.

- 5 Los péptidos beta amiloides (también denominados péptidos A β o Abeta) son péptidos resultantes del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "beta amiloide" se refiere a una proteína beta amiloide (A β) total, A β 40, A β 42 u otra isoforma A β . En algunas realizaciones, una muestra puede comprender A β 40. En otras realizaciones,
- 10 una muestra puede comprender A β 42. En realizaciones preferentes, una muestra puede comprender A β 40 y A β 42.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término beta amiloide "intacto" se refiere a péptidos de longitud completa que no se han sometido a escisión

15 química/enzimática o cualquiera otra modificación de péptidos. En el caso exacto de péptidos A β 40 y A β 42, el péptido beta amiloide A β 42 intacto se refiere a un péptido de 42 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 672 a 713 de la isoforma 770 de APP humana (canónica, número de acceso en UniProtKB P05067) y el péptido beta amiloide A β 40 intacto se refiere a un péptido de 40 aminoácidos que

20 corresponde a los aminoácidos 672 a 711 de la isoforma 770 de APP humana (canónica, número de acceso en UniProtKB P05067).

En algunas realizaciones, una muestra es una muestra de plasma derivada de un sujeto. Entre los sujetos adecuados se incluyen seres humanos o cualquier otro

25 mamífero, animales de ganado (tales como cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, llamas y alpacas), animales de compañía (tales como perros, gatos, conejos y pájaros), animales de laboratorio (tales como roedores, por ejemplo, un ratón, una rata, una cobaya) o animales de zoológico. En realizaciones preferentes, el sujeto es un mamífero. En realizaciones más preferentes, el sujeto es un ser humano.

30

La muestra de plasma puede ser "tal cual" o se puede aislar una fracción de proteína de la muestra de plasma utilizando técnicas estándar. Por ejemplo, una muestra de plasma se puede concentrar, diluir o extraer. Entre las técnicas de extracción adecuadas se pueden incluir surfactantes, ácidos, bases, disolventes orgánicos u

35 otros procedimientos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las muestras

sin tratar se pueden tratar previamente a efectos de reducir la complejidad de la matriz. En algunas realizaciones, estos tratamientos previos son técnicas bien conocidas por el experto en la materia, tales como extracción líquido-líquido o precipitación de proteínas, pero no se excluyen otras técnicas conocidas por el
5 experto en la materia. En algunas realizaciones, es preferente una muestra de plasma. En una realización más preferente, la muestra de plasma es una muestra de plasma humano.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para
10 preparar una muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides para análisis mediante espectrometría de masas. Dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) Poner en contacto dicha muestra de plasma con un agente desnaturizante,
- b) Realizar una primera etapa de extracción en fase sólida sobre la solución
15 obtenida en la etapa a) para recuperar un primer eluato,
- c) Realizar una segunda etapa de extracción en fase sólida sobre dicho primer eluato obtenido en la etapa b) para recuperar un segundo eluato, y
- d) Secar dicho segundo eluato obtenido en la etapa c) y procesarlo para su análisis por espectrometría de masas,
- 20 en el que la muestra obtenida en la etapa d) comprende los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos.

El término "procesarlo" se refiere a adecuar la muestra para análisis por espectrometría de masa e incluye, por ejemplo, adecuar la muestra para la
25 cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa.

En algunas realizaciones, la muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides se pone en contacto con un agente desnaturizante ácido. En realizaciones más preferentes, el agente desnaturizante ácido es un ácido orgánico.
30 En realizaciones aún más preferentes, el ácido orgánico es un ácido carboxílico. En realizaciones aún más preferentes, el ácido carboxílico es un ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico. El ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico puede tener un pKa de aproximadamente ≤ 6 , por ejemplo aproximadamente ≤ 5 , tal como aproximadamente ≤ 4 . El ácido monocarboxílico,
35 ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico puede tener un pKa de aproximadamente ≤ 4 .

En una realización preferente, el ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico el haloalquilo C1-C10, alquilo C1-C10 y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el ácido carboxílico se puede seleccionar entre un ácido haloalquil C1-C5 monocarboxílico, un ácido alquil C1-C5 monocarboxílico y combinaciones de los mismos. En realizaciones aún más preferentes, el ácido carboxílico es ácido fórmico.

Todos los valores de pKa dados a conocer en el presente documento se miden en agua a 25 °C y 1 atm de presión.

10

Por tanto, en algunas realizaciones, el agente desnaturizante ácido es ácido fórmico. En una realización aún más preferente, el agente desnaturizante ácido es una solución de ácido fórmico en agua que comprende entre el 40 % y el 70 % (v/v) de ácido fórmico. En una realización preferente, la solución de ácido fórmico comprende entre el 45 % y el 60 % (v/v) de ácido fórmico en agua. En una realización más preferente, la solución de ácido fórmico comprende aproximadamente el 50 % (v/v) de ácido fórmico en agua.

En algunas realizaciones preferentes, la muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides se pone en contacto con el agente desnaturizante ácido para obtener una solución que tiene un pH menor o igual a aproximadamente 4,5. En realizaciones más preferentes, el pH de la solución puede estar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 4,5. Por ejemplo, el pH de la solución puede estar entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 3. El pH de la solución puede estar entre aproximadamente 0,5 y 2, por ejemplo, entre aproximadamente 0,8 y 1,5. En una realización más preferente, la solución obtenida después del contacto de la muestra de plasma con el agente desnaturizante ácido tiene un pH entre 1 y 1,4, de manera más preferente, entre 1,1 y 1,3, de manera más preferente, aproximadamente 1,2.

30

El volumen del agente desnaturizante ácido utilizado en los procedimientos de la presente invención depende del volumen de la muestra de plasma utilizado y del pH de dicho agente desnaturizante ácido. El experto en la materia es capaz de determinar el volumen del agente desnaturizante ácido para obtener una solución que tiene un pH específico con cálculos sencillos. En algunas realizaciones

35

preferentes de la presente invención, el agente desnaturizante ácido es ácido fórmico a una concentración entre el 40 % y el 70 % (v/v) en agua. En realizaciones más preferentes de la presente invención, un volumen de una muestra de plasma entre 100 μ l y 400 μ l se pone en contacto con un volumen entre 200 μ l y 800 μ l de ácido fórmico a una concentración entre el 40 % y el 70 % (v/v) en agua.

La utilización de ácido fórmico como agente desnaturizante para desnaturizar la muestra de plasma de la presente invención proporciona varias ventajas, tales como la alteración de las interacciones de muchas proteínas plasmáticas A β (es decir, IgG), a la vez que se mantienen los péptidos A β en solución (no tiene lugar la precipitación).

En algunas realizaciones, la muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides se pone en contacto con un agente desnaturizante básico. En realizaciones más preferentes, el agente desnaturizante básico se selecciona del grupo que consiste en hidróxidos solubles en agua, carbonatos, óxidos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la base puede ser un hidróxido soluble en agua. Entre los hidróxidos adecuados se incluyen hidróxidos inorgánicos, hidróxidos orgánicos y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, la base es hidróxido de amonio. En una realización aún más preferente el agente desnaturizante básico es una solución de hidróxido de amonio en agua que comprende entre el 15 % y el 40 % (v/v) de hidróxido de amonio. En una realización preferente, la solución de agente básico comprende entre el 20 % y el 50 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua. En una realización más preferente, la solución de agente básico comprende aproximadamente el 25 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua.

En algunas realizaciones preferentes, la muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides se pone en contacto con el agente desnaturizante básico para obtener una solución que tiene un pH mayor o igual a aproximadamente 11. En realizaciones más preferentes, el pH de la solución puede ser entre aproximadamente 11 y aproximadamente 13. Por ejemplo, el pH de la solución puede ser entre aproximadamente 11 y aproximadamente 12. El pH de la solución puede ser entre aproximadamente 11 y 11,5, de manera más preferente, aproximadamente 11,3.

El volumen del agente desnaturalizante básico utilizado en los procedimientos de la presente invención depende del volumen de la muestra de plasma utilizado y del pH de dicho agente desnaturalizante básico. El experto en la materia es capaz de determinar el volumen del agente desnaturalizante básico para obtener una solución

5 que tiene un pH específico con cálculos sencillos. En algunas realizaciones preferentes de la presente invención, el agente desnaturalizante básico es hidróxido de amonio a una concentración entre el 15 % y el 40 % (v/v) en agua. En realizaciones más preferentes de la presente invención, un volumen de muestra de plasma entre 100 μ l y 400 μ l se pone en contacto con un volumen entre 200 μ l

10 y 800 μ l de hidróxido de amonio a una concentración entre el 15 % y el 40 % (v/v) en agua.

La utilización de un hidróxido de amonio como agente desnaturalizante para desnaturalizar la muestra de plasma de la presente invención proporciona varias

15 ventajas, tales como la alteración de las interacciones de muchas proteínas plasmáticas A β (es decir, IgG), a la vez que se mantienen los péptidos A β en solución (no tiene lugar la precipitación).

Después de desnaturalizar la muestra, los péptidos beta amiloides se separan de los

20 otros componentes de la muestra mediante extracción en fase sólida (SPE).

En la técnica se conocen varios tipos de SPE. Se pueden clasificar dependiendo de las propiedades químicas de la fase estacionaria utilizada. Por tanto, en una SPE de fase normal, la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, tal como una

25 combinación de gel de sílice o alúmina como fases estacionarias con fases móviles de eluyentes menos polares (es decir, hexano). En cambio, la SPE de fase inversa utiliza rellenos de baja polaridad, tal como octadecilsilano u octilsilano, unidos a sílice o perlas poliméricas, y las fases móviles son habitualmente mezclas de agua y disolventes miscibles orgánicos y modificadores. Durante la SPE de intercambio

30 iónico, por otro lado, los componentes se separan en base a interacciones electrostáticas entre los componentes y el grupo cargado positivamente o negativamente de la fase estacionaria. Por tanto, la SPE de intercambio iónico incluye la SPE de intercambio aniónico, en la que la fase estacionaria comprende grupos cargados positivamente que interaccionan y retienen aniones cargados

negativamente, tales como ácidos, y la SPE de intercambio catiónico, en la que la fase estacionaria comprende grupos cargados negativamente que interaccionan y retienen cationes cargados positivamente, tales como bases. Los sorbentes de intercambio catiónico fuertes contienen grupos de ácidos sulfónicos alifáticos que
5 siempre están cargados negativamente en solución acuosa, y los sorbentes de intercambio catiónico débiles contienen ácidos carboxílicos alifáticos, que están cargados cuando el pH está por encima de 5. También es posible combinar múltiples mecanismos de retención en el mismo cartucho, lo que se conoce como SPE de modo mixto, que combina, a menudo, cartuchos de fase inversa y de intercambio
10 iónico. Por tanto, la SPE de intercambio aniónico de fase inversa de modo mixto y la SPE de intercambio catiónico de fase inversa de modo mixto son SPE conocidas en la técnica.

El objetivo de la extracción en fase sólida en el procedimiento de la presente
15 invención es separar y descartar los componentes no deseados de la muestra de plasma a efectos de purificar y concentrar la muestra en los péptidos beta amiloides de interés.

En algunas realizaciones, el procedimiento de la presente invención comprende
20 realizar una primera etapa de extracción en fase sólida sobre la solución obtenida después de poner en contacto la muestra con el agente desnaturalizante. En realizaciones preferentes, el procedimiento de la presente invención comprende realizar una segunda etapa de extracción en fase sólida después de dicha primera etapa de extracción en fase sólida. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el
25 procedimiento para preparar una muestra que comprende péptidos beta amiloides para análisis mediante espectrometría de masas de la presente invención comprende dos etapas consecutivas de extracción en fase sólida.

En algunas realizaciones, las primera y segunda etapas de extracción en fase sólida
30 del procedimiento para preparar una muestra que comprende péptidos beta amiloides de la presente invención pueden ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia.

En algunas realizaciones, la primera etapa de extracción en fase sólida es una SPE
35 de fase inversa. En algunas realizaciones, la primera etapa de extracción en fase

sólida es una SPE de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, la primera etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, la SPE de intercambio catiónico es un intercambio catiónico de fase inversa fuerte, débil o modo mixto. En algunas realizaciones, la SPE de intercambio

5 aniónico es un intercambio aniónico de fuerte, débil o modo mixto fase inversa-intercambio aniónico.

En algunas realizaciones, la segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de fase inversa. En algunas realizaciones, la segunda etapa de extracción en fase

10 sólida es una SPE de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, la segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, la SPE de intercambio catiónico es un intercambio catiónico de fase inversa fuerte, débil o modo mixto. En algunas realizaciones, la SPE de intercambio aniónico es un intercambio aniónico fuerte, débil o modo mixto fase inversa-

15 intercambio aniónico.

En algunas realizaciones, la primera etapa de extracción en fase sólida es una SPE de fase inversa y la segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio catiónico, de manera más preferente, dicha SPE de intercambio catiónico

20 es un intercambio catiónico fuerte, débil o modo mixto fase inversa-intercambio catiónico.

En algunas realizaciones, la primera etapa de extracción en fase sólida es una SPE de fase inversa y la segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de

25 intercambio aniónico, de manera más preferente, dicha SPE de intercambio aniónico es un intercambio aniónico fuerte, débil o modo mixto fase inversa-intercambio aniónico.

En algunas realizaciones, la primera etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio catiónico, de manera más preferente, dicha SPE de intercambio catiónico es un intercambio catiónico de fase inversa fuerte, débil o modo mixto, y la

30 segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio aniónico, de manera más preferente, dicha SPE de intercambio aniónico es un intercambio aniónico fuerte, débil o modo mixto fase inversa-intercambio aniónico.

En algunas realizaciones, la primera etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio aniónico, de manera más preferente, dicha SPE de intercambio aniónico es un intercambio aniónico de fase inversa fuerte, débil o modo mixto, y la segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio catiónico, de manera más preferente, dicha SPE de intercambio catiónico es un intercambio catiónico fuerte, débil o modo mixto fase inversa-intercambio catiónico.

En algunas realizaciones preferentes del procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende un péptido beta amiloide para análisis mediante espectrometría de masas de la presente invención, la muestra de plasma se pone en contacto con un agente desnaturalizante ácido, tal como se describe en el presente documento, antes de que se realicen una primera y una segunda SPE, en el que la primera SPE es una SPE de fase inversa y la segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio catiónico.

En algunas realizaciones preferentes del procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende un péptido beta amiloide para análisis mediante espectrometría de masas de la presente invención, la muestra de plasma se pone en contacto con un agente desnaturalizante ácido, tal como se describe en el presente documento, antes de que se realicen una primera y una segunda SPE, en el que la primera SPE es una SPE de fase inversa y la segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio aniónico.

En algunas realizaciones preferentes del procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende un péptido beta amiloide para análisis mediante espectrometría de masas de la presente invención, la muestra de plasma se pone en contacto con un agente desnaturalizante ácido, tal como se describe en el presente documento, antes de que se realicen una primera y una segunda SPE, en el que la primera SPE es una SPE de intercambio catiónico y la segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio aniónico.

En algunas realizaciones preferentes del procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende un péptido beta amiloide para análisis mediante espectrometría de masas de la presente invención, la muestra de plasma se pone en contacto con un agente desnaturalizante básico, tal como se describe en el presente

documento, antes de que se realicen una primera y una segunda SPE, en el que la primera SPE es una SPE de intercambio aniónico y la segunda etapa de extracción en fase sólida es una SPE de intercambio catiónico.

- 5 La combinación específica de las dos etapas de SPE consecutivas, tal como se describen en el presente documento, después de desnaturalizar las proteínas en una muestra de plasma que comprende péptidos amiloides, según el procedimiento de la presente invención, permite la purificación de los péptidos A β 40 y A β 42 intactos, que se pueden analizar adicionalmente mediante espectrometría de masas sin necesitar
10 ninguna etapa de purificación adicional.

El protocolo para llevar a cabo la primera y segunda etapas de SPE de la presente invención comprende el acondicionamiento y el equilibrio de la fase estacionaria, la carga de la muestra en la columna o cartucho, como mínimo, una etapa de lavado y,
15 como mínimo, una etapa de elución. Dichas etapas son conocidas por el experto en la materia y las condiciones específicas para cada etapa también son conocidas en la técnica.

En una realización de la presente invención, el protocolo para llevar a cabo la primera
20 y segunda etapas de SPE de la presente invención son las conocidas en la técnica. En otra realización de la presente invención, las primera y segunda etapas de SPE comprenden, como mínimo, una etapa de lavado para eliminar los componentes no deseados de la muestra. En una realización preferente de la presente invención cada una de las primera y segunda etapas de SPE comprenden, como mínimo, dos etapas
25 de lavado.

Las soluciones de lavado adecuadas con conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la solución de lavado para las etapas de SPE de los procedimientos de la presente invención es una solución de un ácido, tal como un ácido orgánico, de
30 manera preferente, ácido acético, ácido fórmico o ácido trifluoroacético (TFA). En otras realizaciones, la solución de lavado para las etapas de SPE de los procedimientos de la presente invención es una solución de agua y un disolvente orgánico miscible en agua. Por ejemplo, el disolvente orgánico miscible en agua puede ser un disolvente orgánico polar aprótico o prótico. Entre los ejemplos no
35 limitativos de clases de disolventes orgánicos miscibles en agua se incluyen, sin

limitación, ésteres, nitrilos, ácidos carboxílicos, amidas, aldehídos, cetonas y combinaciones de los mismos. Los expertos en la materia entenderán que no todos los compuestos de las clases indicadas anteriormente son miscibles en agua, sin embargo, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los compuestos de una clase particular que son miscibles en agua. En realizaciones aún más preferentes, el disolvente orgánico miscible en agua es acetonitrilo, dimetilformamida o combinaciones de los mismos. En una realización particularmente preferente, el disolvente orgánico miscible en agua de la solución de lavado para las etapas de SPE del procedimiento de la presente invención es acetonitrilo. En otras realizaciones, la solución de lavado para las etapas de SPE de los procedimientos de la presente invención es una solución de una base, tal como hidróxidos solubles en agua, carbonatos, óxidos y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, la solución de lavado para las etapas de SPE de los procedimientos de la presente invención es una solución de hidróxido de amonio.

En algunas realizaciones preferentes, la solución de lavado para un primer lavado es ácido trifluoroacético (TFA). La concentración de TFA que se puede utilizar para un primer lavado durante las etapas de SPE de la presente invención se encuentra el 0,01 % y el 10 % (v/v) de TFA en agua. En otra realización preferente, la solución de lavado es entre el 0,05 % y el 1 % (v/v) de TFA en agua. En una realización aún más preferente, la solución de lavado es de aproximadamente el 0,1 % (v/v) de TFA en agua. En una realización preferente, la solución de lavado para un primer lavado durante la primera etapa de SPE de la presente invención es entre el 0,05 % y el 1 % (v/v) de TFA en agua, de manera más preferente, de aproximadamente el 0,1 % de TFA en agua.

En algunas realizaciones preferentes, la solución de lavado para un primer lavado es ácido fórmico. La concentración de ácido fórmico que se puede utilizar para un primer lavado durante las etapas de SPE de la presente invención se encuentra el 15 % y el 35 % (v/v) de ácido fórmico en agua. En una realización preferente, la solución de lavado es entre el 20 % y el 30 % (v/v) de ácido fórmico en agua. En una realización más preferente, la solución de lavado es de aproximadamente el 25 % (v/v) de ácido fórmico en agua. En otra realización preferente, la solución de lavado para un primer lavado durante la segunda etapa de SPE de la presente invención es entre el 20 % y el 30 % (v/v) de ácido fórmico en agua, de manera más preferente, de

aproximadamente el 25 % (v/v) de ácido fórmico en agua.

En algunas realizaciones preferentes, la solución de lavado para un primer lavado es una solución de hidróxido de amonio. La concentración de hidróxido de amonio que se puede utilizar para un primer lavado durante las etapas de SPE de la presente invención se encuentra entre el 2 % y el 50 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua. En una realización preferente, la solución de lavado es entre el 2 % y el 30 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua. En una realización más preferente, la solución de lavado es de aproximadamente el 10 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua. En otra realización preferente, la solución de lavado para un primer lavado durante la segunda etapa de SPE de la presente invención es entre el 5 % y el 30 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua, de manera más preferente, de aproximadamente el 10 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua.

En algunas realizaciones preferentes, la solución de lavado para un segundo lavado es acetonitrilo. La concentración de acetonitrilo que se puede utilizar para un segundo lavado durante las etapas de SPE de la presente invención se encuentra entre el 5 % y el 80 % (v/v) de acetonitrilo en agua. En una realización preferente, la solución de lavado se encuentra entre el 10 % y el 60 % (v/v) de acetonitrilo en agua.

En una realización preferente, la solución de lavado para un segundo lavado durante la primera etapa de SPE de la presente invención es acetonitrilo entre el 5 y el 15 % (v/v) en agua. En una realización más preferente, la solución de lavado es acetonitrilo aproximadamente al 10 % (v/v) en agua.

En una realización preferente, la solución de lavado para un segundo lavado durante la segunda etapa de SPE de la presente invención es entre el 40 % y el 70 % (v/v) de acetonitrilo en agua. En una realización más preferente, la solución de lavado es aproximadamente el 60 % (v/v) de acetonitrilo en agua.

En otras realizaciones preferentes, se lleva a cabo un tercer lavado durante la primera etapa de SPE de la presente invención. En una realización preferente, la solución de lavado para un tercer lavado comprende acetonitrilo a una concentración entre el 90 % y el 100 % (v/v). En una realización más preferente, la solución de lavado para un tercer lavado durante la primera etapa de SPE es acetonitrilo a una

concentración de aproximadamente el 100 % (v/v).

En una realización preferente, la primera etapa de SPE comprende, como mínimo, dos etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende

5 TFA entre el 0,05 % y el 1 % (v/v) en agua y llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende acetonitrilo entre el 5 y el 15 % (v/v) en agua, y la segunda etapa de SPE comprende, como mínimo, tres etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende ácido fórmico entre el 20 % y el 30 % (v/v) en agua, llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende acetonitrilo

10 entre el 40 % y el 70 % (v/v) en agua, y llevándose a cabo la tercera con una solución que comprende acetonitrilo entre el 90 % y el 100 % (v/v).

En una realización más preferente, la primera etapa de SPE comprende, como mínimo, dos etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que

15 comprende TFA aproximadamente al 0,1 % (v/v) en agua y llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende acetonitrilo aproximadamente al 10 % (v/v) en agua, y la segunda etapa de SPE comprende, como mínimo, tres etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende ácido fórmico aproximadamente al 25 % (v/v) en agua, llevándose a cabo la segunda con una

20 solución que comprende acetonitrilo aproximadamente al 60 % (v/v) en agua, y llevándose a cabo la tercera con una solución que comprende acetonitrilo aproximadamente al 100 % (v/v).

En una realización preferente, la primera etapa de SPE comprende, como mínimo,

25 dos etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende ácido fórmico entre el 0,05 % y el 1 % (v/v) en agua y llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende acetonitrilo entre el 5 y el 15 % (v/v) en agua, y la segunda etapa de SPE comprende, como mínimo, tres etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende ácido fórmico entre el 0,5 % y

30 el 15 % (v/v) en agua, llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende acetonitrilo entre el 30 % y el 70 % (v/v) en agua, y llevándose a cabo la tercera con una solución que comprende acetonitrilo entre el 90 % y el 100 % (v/v).

En una realización preferente, la primera etapa de SPE comprende, como mínimo,

35 tres etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende

- entre el 5 % y el 50 % (v/v) de ácido fórmico en agua, llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende entre el 40 y el 70 % (v/v) de acetonitrilo en agua, y llevándose a cabo la tercera con una solución que comprende entre el 90 % y el 100 % (v/v) de acetonitrilo, y la segunda etapa de SPE comprende, como mínimo,
- 5 dos etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende entre el 0,5 % y el 15 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua, y llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende entre el 30 % y el 70 % (v/v) de acetonitrilo en agua.
- 10 En una realización más preferente, la primera etapa de SPE comprende, como mínimo, tres etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende aproximadamente el 25 % (v/v) de FA en agua, llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende aproximadamente el 60 % (v/v) de acetonitrilo en agua, y llevándose a cabo la tercera con una solución que comprende
- 15 aproximadamente el 100 % (v) de acetonitrilo, y la segunda etapa de SPE comprende, como mínimo, dos etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende aproximadamente el 10 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua, y llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende aproximadamente el 60 % (v/v) de acetonitrilo en agua.
- 20 En una realización más preferente, la primera etapa de SPE comprende, como mínimo, dos etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende entre el 1 % y el 20 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua y llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende entre el 30 y el 70 % (v/v) de
- 25 acetonitrilo en agua, y la segunda etapa de SPE comprende, como mínimo, tres etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende entre el 0,5 % y el 15 % (v/v) de ácido fórmico en agua, llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende entre el 30 % y el 70 % (v/v) de acetonitrilo en agua, y llevándose a cabo la tercera con una solución que comprende entre el 90 % y
- 30 el 100 % (v/v) de acetonitrilo.
- En una realización más preferente, la primera etapa de SPE comprende, como mínimo, dos etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende aproximadamente el 10 % (v/v) de hidróxido de amonio en agua y
- 35 llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende aproximadamente

el 60 % (v/v) de acetonitrilo en agua, y la segunda etapa de SPE comprende, como mínimo, tres etapas de lavado, llevándose a cabo la primera con una solución que comprende aproximadamente el 5 % (v/v) de ácido fórmico en agua, llevándose a cabo la segunda con una solución que comprende aproximadamente el 40 % (v/v) de acetoneitrilo en agua, y llevándose a cabo la tercera con una solución que comprende aproximadamente el 100 % (v/v) de acetoneitrilo.

Después de, como mínimo, la etapa de lavado llevada a cabo durante cualquiera de las etapas de SPE, es necesaria la elución de los analitos retenidos en la fase estacionaria. Las soluciones de elución adecuadas son conocidas por el experto en la materia.

En algunas realizaciones, los analitos retenidos en la fase estacionaria durante la primera etapa de SPE se eluyen con una solución de elución que comprende un surfactante y un disolvente orgánico polar miscible en agua. En otras realizaciones, los analitos retenidos en la fase estacionaria durante la primera etapa de SPE se eluyen con una solución de elución que comprende una base y un disolvente orgánico polar miscible en agua. En otras realizaciones, los analitos retenidos en la fase estacionaria durante la primera etapa de SPE se eluyen con una solución de elución que comprende un ácido y un disolvente orgánico polar miscible en agua.

Por ejemplo, el disolvente orgánico miscible en agua puede ser un disolvente orgánico polar aprótico o prótico. Entre los ejemplos no limitativos de clases de disolventes orgánicos miscibles en agua se incluyen, sin limitación, éteres, ésteres, nitrilos, ácidos carboxílicos, amidas, aldehídos, cetonas y combinaciones de los mismos. Los expertos en la materia entenderán que no todos los compuestos de las clases indicadas anteriormente son miscibles en agua, sin embargo, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los compuestos de una clase particular que son miscibles en agua. En realizaciones aún más preferentes, el disolvente orgánico miscible en agua es acetoneitrilo, dimetilformamida o combinaciones de los mismos. En una realización particularmente preferente, el disolvente orgánico miscible en agua de la solución de elución después de la primera etapa de SPE del procedimiento de la presente invención es acetoneitrilo. El surfactante de la solución de elución puede ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia, de manera preferente, del tipo no iónico. En algunas realizaciones, el surfactante es del

tipo no iónico. En algunas realizaciones preferentes, el surfactante no iónico es del tipo etoxilato. En realizaciones aún más preferentes, el surfactante no iónico del tipo etoxilato es Triton X-100. La base se puede seleccionar del grupo que consiste en hidróxidos solubles en agua, carbonatos, óxidos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la base puede ser un hidróxido soluble en agua. Entre los hidróxidos adecuados se incluyen hidróxidos inorgánicos, hidróxidos orgánicos y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, la base es hidróxido de amonio. El ácido de la solución de elución puede ser un ácido orgánico, de manera preferente, ácido acético, ácido fórmico o ácido trifluoroacético (TFA).

10

En una realización preferente, la solución de elución utilizada después de la primera etapa de SPE del procedimiento de la presente invención comprende Triton X-100 a una concentración entre el 1 % y el 5 % (v/v) y acetonitrilo a una concentración entre el 20 % y el 40 % (v/v). En una realización más preferente, la solución de elución consiste en aproximadamente el 2 % (v/v) de Triton X-100 y aproximadamente el 30 % (v/v) de acetonitrilo en agua.

En otra realización preferente, la solución de elución utilizada después de la primera etapa de SPE del procedimiento de la presente invención comprende hidróxido de amonio a una concentración entre el 5 % y el 15 % (v/v), y acetonitrilo a una concentración entre el 50 % y el 90 % (v/v). En una realización más preferente, la solución de elución consiste en aproximadamente el 10 % (v/v) de hidróxido de amonio y aproximadamente el 75 % (v/v) de acetonitrilo en agua.

En otra realización preferente, la solución de elución utilizada después de la primera etapa de SPE del procedimiento de la presente invención comprende ácido trifluoroacético a una concentración entre el 1 % y el 15 % (v/v), y acetonitrilo a una concentración entre el 50 % y el 90 % (v/v). En una realización más preferente, la solución de elución consiste en aproximadamente el 5 % (v/v) de ácido trifluoroacético y aproximadamente el 70 % (v/v) de acetonitrilo en agua.

En algunas realizaciones, los analitos retenidos en la fase estacionaria durante la segunda etapa de SPE se eluyen con una solución de elución que comprende una base y un disolvente orgánico polar miscible en agua. En otras realizaciones, los analitos retenidos en la fase estacionaria durante la segunda etapa de SPE se eluyen

con una solución de elución que comprende un ácido y un disolvente orgánico polar miscible en agua.

La base se puede seleccionar del grupo que consiste en hidróxidos solubles en agua, carbonatos, óxidos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la base puede ser un hidróxido soluble en agua. Entre los hidróxidos adecuados se incluyen hidróxidos inorgánicos, hidróxidos orgánicos y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, la base es hidróxido de amonio. El disolvente orgánico miscible en agua puede ser un disolvente orgánico polar aprótico o prótico. Entre los ejemplos no limitativos de clases de disolventes orgánicos miscibles en agua se incluyen, sin limitación, ésteres, nitrilos, ácidos carboxílicos, amidas, aldehídos, cetonas y combinaciones de los mismos. Los expertos en la materia entenderán que no todos los compuestos de las clases indicadas anteriormente son miscibles en agua, sin embargo, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los compuestos de una clase particular que son miscibles en agua. En realizaciones aún más preferentes, el disolvente orgánico miscible en agua es acetonitrilo, dimetilformamida, o combinaciones de los mismos. En una realización particularmente preferente, el disolvente orgánico miscible en agua de la solución de elución después de la segunda etapa de SPE del procedimiento de la presente invención es acetonitrilo. El ácido de la solución de elución puede ser un ácido orgánico, de manera preferente, ácido acético, ácido fórmico o ácido trifluoroacético (TFA).

En una realización preferente, la solución de elución utilizada después de la segunda etapa de SPE del procedimiento de la presente invención comprende hidróxido de amonio a una concentración entre el 5 % y el 15 % (v/v) y acetonitrilo a una concentración entre el 50 % y el 90 % (v/v). En una realización más preferente, la solución de elución consiste en aproximadamente el 10 % (v/v) de hidróxido de amonio y aproximadamente el 75 % (v/v) de acetonitrilo en agua.

En otra realización preferente, la solución de elución utilizada después de la primera etapa de SPE del procedimiento de la presente invención comprende ácido trifluoroacético a una concentración entre el 1 % y el 15 % (v/v), y acetonitrilo a una concentración entre el 50 % y el 90 % (v/v). En una realización más preferente, la solución de elución consiste en aproximadamente el 5 % (v/v) de ácido trifluoroacético y aproximadamente el 70 % (v/v) de acetonitrilo en agua.

Después de la elución de los analitos de interés durante la primera etapa de SPE de la presente invención, el pH de los eluatos obtenidos se puede modificar a efectos de prepararlos para las siguientes etapas. En una realización preferente, los eluatos
5 obtenidos después de la elución durante la primera SPE se ponen en contacto con ácido fórmico, de manera preferente, a una concentración de ácido fórmico entre el 30 % y el 70 % (v/v) en agua, de manera más preferente, a una concentración de ácido fórmico de aproximadamente el 50 % (v/v) en agua, a efectos de reducir el pH de la solución que contiene los analitos de interés.

10

El eluato que comprende los péptidos beta amiloides intactos purificados obtenidos después de la segunda etapa de SPE, a continuación, se pueden secar y resuspender en una solución adecuada para el análisis corriente abajo, tal como espectrometría de masas. Los procedimientos de secado adecuados son conocidos
15 en la técnica y pueden incluir, pero sin limitarse a éstos, evaporación en un concentrador de vacío centrífugo (por ejemplo, Thermo SpeedVac, Genevac) y liofilización. En una realización preferente, los eluatos obtenidos después de la segunda etapa de SPE del procedimiento para preparar una muestra que comprende péptidos beta amiloides de la presente invención se secan en un concentrador de
20 vacío, como mínimo, durante 30 minutos y a una temperatura entre 30 °C y 50 °C. En una realización más preferente, los eluatos se secan en un concentrador de vacío durante aproximadamente 35 minutos y a una temperatura entre 40 °C y 47 °C.

Después de secar los eluatos, es necesario resuspender los analitos en una solución
25 adecuada para el análisis corriente abajo específico. En algunas realizaciones, el análisis corriente abajo puede ser un procedimiento de detección basado en anticuerpos, tal como ELISA, pero, en realizaciones más preferentes, el análisis corriente abajo es la espectrometría de masa, que incluye la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa. En la técnica se conocen soluciones
30 adecuadas para los diferentes análisis corriente abajo.

En algunas realizaciones de la presente invención, los analitos se someten adicionalmente a espectrometría de masas, que incluye la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa y la solución en la que se resuspenden los
35 analitos secos comprende, como mínimo, dos de un surfactante, un agente reductor,

un disolvente orgánico polar miscible en agua y un ácido. En otras realizaciones, dicha solución en la que se resuspenden los analitos secos comprende un surfactante y un agente reductor. En otras realizaciones, dicha solución en la que se resuspenden los analitos secos comprende un surfactante, un agente reductor, un disolvente orgánico polar y un ácido.

Según la presente invención, el surfactante de la solución en la que se resuspenden los analitos secos puede ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia, de manera preferente, del tipo no iónico. En algunas realizaciones, el surfactante es del tipo no iónico. En algunas realizaciones preferentes, el surfactante no iónico es del tipo etoxilato. En realizaciones aún más preferentes, el surfactante no iónico del tipo etoxilato es Triton X-100.

Según la presente invención, el agente reductor de la solución en la que se resuspenden los analitos secos puede ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia, de manera preferente, un agente reductor adecuado para reducir enlaces disulfuro. Entre los ejemplos no limitativos de agentes reductores adecuados para reducir enlaces disulfuro se incluyen agentes reductores de organofosfina u otros agentes reductores, tales como ditiotreitól o β -mercaptoetanol. En realizaciones preferentes, el agente reductor adecuado para reducir enlaces disulfuro es un agente reductor de organofosfina. En realizaciones más preferentes, el agente reductor de organofosfina es tris-carboxietilfosfina.

Según la presente invención, el disolvente orgánico polar miscible en agua de la solución en la que se resuspenden los analitos secos puede ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia, de manera preferente, acetonitrilo o dimetilformamida. En otras realizaciones, el disolvente orgánico polar puede ser una mezcla de acetonitrilo y dimetilformamida. El disolvente orgánico miscible en agua puede ser un disolvente orgánico polar aprótico o prótico. Entre los ejemplos no limitativos de clases de disolventes orgánicos miscibles en agua se incluyen, sin limitación, éteres, ésteres, nitrilos, ácidos carboxílicos, amidas, aldehídos, cetonas y combinaciones de los mismos. Los expertos en la materia entenderán que no todos los compuestos de las clases indicadas anteriormente son miscibles en agua, sin embargo, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los compuestos de una clase particular que son miscibles en agua. En realizaciones aún más

preferentes, el disolvente orgánico miscible en agua es acetonitrilo, dimetilformamida o combinaciones de los mismos.

Según la presente invención, el ácido de la solución en la que se resuspenden los
5 analitos secos puede ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia, de manera preferente, un ácido orgánico. En realizaciones aún más preferentes, el ácido orgánico es un ácido carboxílico. En realizaciones aún más preferentes, el ácido carboxílico es un ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico. El ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico puede tener un pKa
10 de aproximadamente ≤ 4 , por ejemplo, aproximadamente ≤ 3 , tal como, aproximadamente ≤ 2 , de manera adecuada ≤ 1 . El ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico puede tener un pKa de aproximadamente $\leq 0,5$. En una realización preferente, el ácido carboxílico es un ácido haloalquil C1-C10 monocarboxílico, dicarboxílico o tricarboxílico. Por ejemplo, el ácido carboxílico puede
15 ser un ácido haloalquil C1-C10 monocarboxílico. En realizaciones aún más preferentes, el ácido carboxílico es ácido trifluoroacético (TFA). En algunas realizaciones preferentes, el ácido de la solución en la que se resuspenden los analitos secos es TFA.

20 Todos los valores de pKa dados a conocer en el presente documento se miden en agua a 25 °C y 1 atm de presión.

En realizaciones más preferentes, el surfactante es Triton X-100, el agente reductor es tris-carboxietilfosfina, el disolvente orgánico polar es acetonitrilo y
25 dimetilformamida y el ácido es TFA.

En algunas realizaciones preferentes, la concentración de acetonitrilo en la solución en la que se disuelven los analitos secos es entre el 2 % y el 8 % (v/v), de manera más preferente, entre el 3 % y el 7 % (v/v), de manera más preferente, entre el 4 % y
30 el 6 % (v/v) y, de manera incluso más preferente, de aproximadamente el 5 % (v/v).

En algunas realizaciones preferentes, la concentración de dimetilformamida en la solución en la que se disuelven los analitos secos es entre el 0,1 % y el 3 % (v/v), de manera más preferente, entre el 0,5 % y el 2 % (v/v), de manera más preferente,
35 entre el 0,5 % y el 1,5 % (v/v) y, de manera incluso más preferente, de

aproximadamente el 1 % (v/v).

En algunas realizaciones preferentes, la concentración de ácido trifluoroacético (TFA) en la solución en la que se disuelven los analitos secos es entre el 0,1 % y el 5 % (v/v), de manera más preferente, entre el 0,2 % y el 4 % (v/v), de manera más preferente, entre el 0,2 % y el 3 % (v/v), de manera más preferente, entre el 0,2 % y el 2,5 % (v/v) y, de manera incluso más preferente, de aproximadamente el 0,5 % (v/v).

En algunas realizaciones preferentes, la concentración de Triton X-100 en la solución en la que se disuelven los analitos secos es entre el 0,01 % y el 2 % (v/v), de manera más preferente, entre el 0,05 % y el 1 % (v/v), de manera más preferente, entre el 0,05 % y el 0,8 % (v/v), de manera más preferente, entre el 0,05 % y el 0,1 % (v/v) y, de manera incluso más preferente, de aproximadamente el 0,05 % (v/v).

En algunas realizaciones preferentes, la concentración de tris-carboxietilfosfina en la solución en la que se disuelven los analitos secos es entre el 0,05 % y el 0,3 % (p/v), de manera más preferente, entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v), de manera más preferente, entre el 0,12 % y el 0,16 % (p/v) y, de manera incluso más preferente, de aproximadamente el 0,14 % (p/v).

En algunas realizaciones preferentes, la solución en la que se disuelven los analitos es una solución acuosa que comprende un surfactante y un agente reductor. En realizaciones aún más preferentes, la solución en la que se disuelven los analitos secos comprende Triton X-100 a una concentración entre el 0,05 % y el 0,8 % (v/v) y tris-carboxietilfosfina a una concentración entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v).

En otra realización preferente, la solución en la que se disuelven los analitos secos comprende Triton X-100 a una concentración entre el 0,01 % y el 0,1 % (v/v), tris-carboxietilfosfina a una concentración entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v) y acetonitrilo a una concentración entre el 3 % y el 7 % (v/v).

En algunas realizaciones preferentes, la solución en la que se disuelven los analitos secos es una solución acuosa que comprende un surfactante, un agente reductor, un disolvente orgánico polar y un ácido. En realizaciones aún más preferentes, la solución en la que se disuelven los analitos secos comprende Triton X-100 a una

concentración entre el 0,01 % y el 0,1 % (v/v), tris-carboxietilfosfina a una concentración entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v), acetonitrilo a una concentración entre el 3 % y el 7 % (v/v) y ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración entre el 0,1 % y el 3 % (v/v). En realizaciones aún más preferentes, la solución en la que se disuelven los analitos secos comprende Triton X-100 a una concentración entre el 0,01 % y el 0,1 % (v/v), tris-carboxietilfosfina a una concentración entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v), acetonitrilo a una concentración entre el 3 % y el 7 % (v/v), dimetilformamida a una concentración entre el 0,1 % y el 3 % (v/v) y ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración entre el 0,1 % y el 3 % (v/v).

10

En algunas realizaciones, la muestra preparada mediante el procedimiento de la presente invención se analiza adicionalmente mediante cromatografía líquida y/o espectrometría de masas.

15 La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides para análisis mediante espectrometría de masas, caracterizado por que no comprende inmunoprecipitación o digestión de la muestra de plasma antes del análisis con espectrometría de masas.

20 La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides para análisis mediante espectrometría de masas, caracterizado por que consiste esencialmente en las siguientes etapas:

- a) Poner en contacto dicha muestra de plasma con un agente desnaturalizante,
- 25 b) Realizar una primera etapa de extracción en fase sólida sobre la solución obtenida en la etapa a) para recuperar un primer eluato,
- c) Realizar una segunda etapa de extracción en fase sólida sobre dicho primer eluato obtenido en la etapa b) para recuperar un segundo eluato, y
- d) Secar dicho segundo eluato obtenido en la etapa c) y procesarlo para análisis
- 30 mediante espectrometría de masas,

en el que la muestra obtenida en la etapa d) comprende los péptidos beta amiloides intactos A β 40 y A β 42.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la
35 cuantificación de los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos en una muestra

de plasma mediante espectrometría de masas. En algunas realizaciones, el procedimiento para la cuantificación de los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos en una muestra de plasma mediante espectrometría de masas de la presente invención comprende las etapas a) a d) del procedimiento para preparar una muestra, tal como se describe en el presente documento, y comprende, además, las etapas de:

- i) Realizar una etapa de cromatografía líquida sobre la solución obtenida en la etapa d), para separar los analitos de interés,
- 10 ii) Someter los analitos separados en la etapa i) a ionización para generar una o más especies cargadas;
- iii) Separar dichas una o más especies cargadas según su movilidad iónica,
- iv) Detectar dichas una o más especies cargadas separadas en la etapa iii) y medir sus abundancias mediante espectrometría de masas; y
- 15 v) Determinar la cantidad o concentración de los péptidos beta amiloides A β 40 y/o A β 42 intactos en la muestra de plasma mediante comparación de las abundancias of la una o más especies cargadas medidas en la etapa iv) con una curva estándar.

20 En algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento para la cuantificación de los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 intactos en una muestra de plasma mediante espectrometría de masas comprende realizar una etapa cromatográfica i) sobre la solución obtenida a partir de un procedimiento para preparar una muestra que comprende péptidos beta amiloides, tal como se describe en el presente documento. En realizaciones preferentes, dicha etapa cromatográfica es una cromatografía líquida (LC). En realizaciones más preferentes, dicha cromatografía líquida es HPLC. En realizaciones aún más preferentes, dicha etapa cromatográfica es una micro-cromatografía líquida (micro-HPLC).

30 En algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento para la cuantificación de los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos en una muestra de plasma mediante espectrometría de masas comprende a segunda etapa ii), en la que los analitos separados en la etapa i) se someten a ionización para generar una o más especies cargadas.

En algunas realizaciones de la presente invención, la ionización a la que se someten los analitos es ionización por electrospray (ESI) en modo de ion positivo. Las condiciones para llevar a cabo la ionización por electrospray de la presente invención son bien conocidas por el experto en la materia.

5

En algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento para la cuantificación de los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos en una muestra de plasma mediante espectrometría de masas comprende una tercera etapa iii), en la que una o más especies cargadas obtenidas en la etapa ii) se separan según su
10 movilidad iónica. En realizaciones preferentes, dicha una o más especies cargadas se separan mediante espectrometría de movilidad iónica (IMS). En una realización más preferente, la técnica de espectrometría de movilidad iónica utilizada en los procedimientos de la presente invención es espectrometría de movilidad diferencial (DMS).

15

En algunas realizaciones de la presente invención, después de la separación de las especies cargadas según su movilidad iónica, éstas son detectadas y se miden sus abundancias mediante espectrometría de masas (etapa iv)). Tal como se ha explicado anteriormente, la expresión “espectrometría de masas” abarca varias
20 técnicas analíticas para determinar la proporción de masa con respecto a carga del analito o grupo de analitos. Entre los ejemplos no limitativos de técnicas de espectrometría de masas se incluyen Trap (3D o Lineal), cuadrupolo único o triple cuadrupolo, tiempo de vuelo, Orbitrap, espectrometría de masas por resonancia de ciclotrón iónica con transformada de Fourier y sus combinaciones (instrumentos
25 híbridos).

En una realización preferente, la técnica para medir las intensidades y abundancias de las especies cargadas mediante espectrometría de masas es la monitorización de múltiples reacciones (MRM) en un instrumento con triple cuadrupolo.

30

En algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento para la cuantificación de péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos en una muestra de plasma mediante espectrometría de masas comprende una quinta etapa v) en la que se determina la cantidad o concentración de dichos péptidos mediante la

comparación de las abundancias de los analitos medidas en iv) con una curva estándar.

Por lo tanto, una curva de calibración se prepara, de manera preferente, utilizando una concentración creciente, como mínimo, de un patrón a efectos de cuantificar la cantidad o la concentración de un analito en una muestra analizada mediante espectrometría de masas. En el contexto de la presente invención, como A β 40 y A β 42 son los péptidos que, de manera preferente, son cuantificados, se utilizan, de manera preferente, ^{15}N -A β 40 y ^{15}N -A β 42 como patrones para la curva de calibración.

La curva de calibración se puede preparar con soluciones tampón, tales como PBS, que comprende BSA, tal como se ha descrito anteriormente en la técnica. Sin embargo, en realizaciones preferentes de la presente invención, las curvas de calibración se preparan con plasma, que proporciona varias ventajas, tales como proporcionar recuperaciones iguales para patrones y analitos, e igualar los efectos de la matriz que, de otro modo, pueden afectar de manera adversa a la cuantificación. En realizaciones más preferentes, las curvas de calibración se preparan con plasma humano.

Además, se utilizan patrones internos como controles para la calidad de las diferentes etapas de los procedimientos de la presente invención, así como para la normalización de la señal. Por lo tanto, se pueden añadir patrones internos a las soluciones para preparar las curvas de calibración y a las muestras para analizar mediante espectrometría de masas, a efectos de asegurar la calidad de las diferentes etapas.

En algunas realizaciones, las soluciones para las curvas de calibración y las muestras se obtienen con ^2H -A β 40 y ^2H -A β 42 marcados como patrones internos. En otras realizaciones, las soluciones para las curvas de calibración y las muestras se obtienen con ^{13}C -A β 40 y ^{13}C -A β 42 marcados como patrones internos. En otras realizaciones, las soluciones para las curvas de calibración y las muestras se obtienen con ^2H -A β 40 y ^{13}C -A β 42 o ^2H -A β 42 y ^{13}C -A β 40 como patrones internos.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento para la cuantificación de los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 intactos en una muestra

de plasma mediante espectrometría de masas caracterizado por que no comprende una etapa en la que se determina la concentración de dichos péptidos mediante comparación de las abundancias de los analitos medidas en iv) con una curva estándar. En dichas realizaciones, el procedimiento para la cuantificación es un
5 procedimiento semicuantitativo en el que la utilización de patrones internos pretende cuantificar las abundancias de dichos analitos sin comparación con una curva estándar.

Las muestras que comprenden péptidos beta amiloides utilizadas en los
10 procedimientos de la presente invención son, de manera preferente, muestras de plasma. El volumen de la muestra de plasma utilizada en la etapa a) del procedimiento para la preparación de una muestra para análisis mediante espectrometría de masas se puede determinar por el experto en la materia teniendo en cuenta el protocolo específico de la espectrometría de masas a seguir.

15 Sin embargo, una de las ventajas de los procedimientos de la presente invención es que es posible reducir el volumen de la muestra requerido para obtener valores exactos de la concentración de los péptidos beta amiloides A β 40 y A β 42 para identificar etapas tempranas de enfermedades neurodegenerativas, tales como la
20 enfermedad de Alzheimer, en un sujeto. La reducción del volumen de la muestra de plasma requerido en los procedimientos de la presente invención es especialmente conveniente para estudios de cribado amplio.

Por tanto, el volumen de muestra utilizado en la etapa a) de los procedimientos para
25 preparar una muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides para análisis mediante espectrometría de masas se encuentra entre 100 μ l y 400 μ l. En una realización preferente, el volumen de muestra se encuentra entre 150 μ l y 300 μ l. En una realización más preferente, el volumen de muestra se encuentra entre 200 μ l y 250 μ l. En una realización aún más preferente, el volumen de muestra es de
30 aproximadamente 200 μ l.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una solución acuosa para procesar un eluato seco para analizar mediante espectrometría de masas que comprende, como mínimo, dos de un surfactante, un agente reductor, un disolvente

orgánico polar miscible en agua y un ácido. En otras realizaciones, dicha solución acuosa comprende un surfactante y un agente reductor. En otras realizaciones, dicha solución comprende un surfactante, un agente reductor, un disolvente orgánico polar y un ácido.

5

Según la presente invención, el surfactante de la solución en la que se procesan los analitos secos puede ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia, de manera preferente, del tipo no iónico. En algunas realizaciones, el surfactante es del tipo no iónico. En algunas realizaciones preferentes, el surfactante no iónico es del tipo etoxilato. En realizaciones aún más preferentes, el surfactante no iónico del tipo etoxilato es Triton X-100.

Según la presente invención, el agente reductor de la solución en la que se procesan los analitos secos puede ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia, de manera preferente, un agente reductor adecuado para reducir enlaces disulfuro. Entre los ejemplos no limitativos de agentes reductores adecuados para reducir enlaces disulfuro se incluyen agentes reductores de organofosfina u otros agentes reductores, tales como ditiotreitól o β -mercaptoetanol. En realizaciones preferentes, el agente reductor adecuado para reducir enlaces disulfuro es un agente reductor de organofosfina. En realizaciones más preferentes, el agente reductor de organofosfina es tris-carboxietilfosfina.

Según la presente invención, el disolvente orgánico polar miscible en agua de la solución en la que se procesan los analitos secos puede ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia. El disolvente orgánico miscible en agua puede ser un disolvente orgánico polar aprótico o prótico. Entre los ejemplos no limitativos de clases de disolventes orgánicos miscibles en agua se incluyen, sin limitación, éteres, ésteres, nitrilos, ácidos carboxílicos, amidas, aldehídos, cetonas y combinaciones de los mismos. Los expertos en la materia entenderán que no todos los compuestos de las clases indicadas anteriormente son miscibles en agua, sin embargo, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los compuestos de una clase particular que son miscibles en agua. En realizaciones aún más preferentes, el disolvente orgánico miscible en agua es acetonitrilo, dimetilformamida o combinaciones de los mismos.

35

Según la presente invención, el ácido de la solución en la que se procesan los analitos secos puede ser de cualquier tipo conocido por el experto en la materia, de manera preferente, un ácido orgánico. En realizaciones aún más preferentes, el ácido orgánico es un ácido carboxílico. En realizaciones aún más preferentes, el ácido carboxílico es un ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico. El ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico puede tener un pKa de aproximadamente ≤ 4 , por ejemplo, aproximadamente ≤ 3 , tal como, aproximadamente ≤ 2 , de manera adecuada, ≤ 1 . El ácido monocarboxílico, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico puede tener un pKa de aproximadamente $\leq 0,5$. En una realización preferente, el ácido carboxílico es un ácido haloalquil C1-C10 monocarboxílico, dicarboxílico o tricarboxílico. Por ejemplo, el ácido carboxílico puede ser un ácido haloalquil C1-C5 monocarboxílico. En realizaciones aún más preferentes, el ácido carboxílico es ácido trifluoroacético (TFA). Por tanto, en algunas realizaciones preferentes, el ácido de la solución en la que se procesan los analitos secos es TFA.

En realizaciones más preferentes, el surfactante es Triton X-100, el agente reductor es tris-carboxietilfosfina, el disolvente orgánico polar son acetonitrilo y dimetilformamida y el ácido es TFA.

En realizaciones más preferentes, la solución acuosa para resuspender un eluato seco para analizar mediante espectrometría de masas de la presente invención comprende Triton X-100 a una concentración entre el 0,01 % y el 0,1 % (v/v) y tris-carboxietilfosfina a una concentración entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v).

En otras realizaciones preferentes, la solución acuosa para procesar un eluato seco para analizar mediante espectrometría de masas de la presente invención comprende Triton X-100 a una concentración entre el 0,010 % y el 1 % (v/v), tris-carboxietilfosfina a una concentración entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v), acetonitrilo a una concentración entre el 3 % y el 7 % (v/v), dimetilformamida a una concentración entre el 0,1 % y el 3 % (v/v) y ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración entre el 0,1 % y el 3 % (v/v).

La presente invención se entenderá de manera más completa mediante referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Preparación de muestras de plasma para análisis mediante 5 espectrometría de masas

Curvas de calibración y control de calidad

Las curvas de calibración y las muestras del control de calidad se prepararon utilizando plasma humano y los patrones marcados ^{15}N -A β 40 y ^{15}N -A β 42 (rPeptide, 10 Watkinsville, GA, USA). Se utilizaron intervalos de calibración de 50 a 3.000 pg/ml y de 10 a 100 pg/ml para preparar series de patrones de ^{15}N -A β 40 y ^{15}N -A β 42, respectivamente.

La serie de patrones para la curva de calibración, las muestras de control de calidad y 15 las muestras de plasma de sujetos humanos para analizar posteriormente se obtuvieron con ^2H -A β 40 y ^2H -A β 42 marcados según conveniencia como patrones internos para el control de calidad y la normalización de la señal (Bachem, Bubendorf, Suiza).

20 Preparación de muestras de plasma para análisis mediante espectrometría de masas

Se prepararon muestras de plasma obtenidas de sujetos humanos siguiendo diferentes protocolos (A, B, C o D) dependiendo de la combinación de los cartuchos de SPE para utilizar posteriormente.

25 Protocolo A: Las muestras se obtuvieron primero con los patrones internos de elección. A continuación, las muestras se desnaturalizaron mediante el contacto de 400 μl de ácido fórmico (FA) al 50 % en agua con 200 μl de plasma humano. Después de la desnaturalización, los péptidos amiloides se purificaron utilizando dos etapas de SPE consecutivas.

30

La primera SPE consistió en una SPE de fase inversa para la que se utilizaron placas de extracción HLB Prime (placas de 96 pocillos OASIS, 30 μm , 30 mg, Waters, Milford, MA, Estados Unidos, número de la pieza WAT058951). Las condiciones

adecuadas para la primera SPE se resumen a continuación:

- Disolución: 1 ml de acetonitrilo
 - Acondicionamiento: 1 ml de FA (ácido fórmico) al 0,1 % en agua
 - Carga de muestra
- 5 • Lavado 1: 1 ml de FA al 0,1 %
- Lavado 2: 0,4 ml de acetonitrilo al 10 % en agua
 - Elución: 0,7 ml de Triton X-100 al 2 % en acetonitrilo/agua 30/70
 - Acidificación de los eluatos mediante la adición de 10 µl de FA al 50 % en agua
- 10 Después de la primera SPE, los eluatos se sometieron a una segunda SPE, en este caso, una SPE de intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto que utilizaba la placa de extracción MCX (placas de µelución de 96 pocillos OASIS, 30 µm, 2 mg, Waters, Milford, MA, Estados Unidos, número de la pieza 186001830BA). Las condiciones adecuadas para la segunda SPE se resumen a continuación:
- 15 • Disolución: 0,2 ml de metanol
- Acondicionamiento: 0,2 ml de FA al 5 % en agua
 - Carga de muestra: eluatos acidificados de SPE 1
 - Lavado 1: 0,4 ml de FA al 5 % en agua
 - Lavado 2: 0,4 ml de acetonitrilo al 40 % en agua
- 20 • Lavado 3: 0,4 ml de acetonitrilo al 100%
- Elución: 100 µl de acetonitrilo/agua/hidróxido de amonio 75/15/10

Después de la segunda SPE, los eluatos se evaporaron a sequedad durante 35 minutos a 45 °C en un concentrador de vacío. A continuación, las muestras secas se resuspendieron con 25 µl de disolvente AB, una solución optimizada de forma interna que estaba compuesta por:

- Acetonitrilo al 100 %: 2,5 ml
 - Dimetilformamida (DMF) al 100 %: 0,5 ml
 - TFA al 25 % en agua: 1 ml
- 30 • Triton X-100 al 10 % en agua: 0,25 ml
- Tris-carboxietilfosfina: 70 mg
 - Agua: se enrasa a un volumen de 50 ml en un matraz volumétrico

Protocolo B: Las muestras se obtuvieron primero con los patrones internos de

elección. A continuación, las muestras se desnaturalizaron mediante el contacto de 400 µl de ácido fórmico (FA) al 50 % en agua con 200 µl de plasma humano. Después de la desnaturalización, los péptidos amiloides se purificaron utilizando dos etapas de SPE consecutivas.

5

La primera SPE consistió en una SPE de fase inversa para la se utilizaron placas de extracción HLB (placas de 96 pocillos OASIS, 30 µm, 30 mg, Waters, Milford, MA, Estados Unidos, número de pieza WAT058951). Las condiciones adecuadas para la primera SPE se resumen a continuación:

- 10
- Disolución: 1 ml de acetonitrilo
 - Acondicionamiento: 1 ml de TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1 % en agua
 - Carga de muestra
 - Lavado 1: 1 ml de TFA al 0,1 %
 - Lavado 2: 0,5 ml de acetonitrilo al 10 % en agua
- 15
- Elución: 0,7 ml de Triton X-100 al 2 % en acetonitrilo/agua 30/70
 - Acidificación de los eluatos mediante la adición de 10 µl de FA al 50 % en agua

Después de la primera SPE, los eluatos se sometieron a una segunda SPE, en este caso, una SPE de intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto que utilizaba la

20

placa de extracción MCX (placas de elución de 96 pocillos OASIS MCX, 30 µm, 2 mg, Waters, Milford, MA, Estados Unidos, número de pieza 186001830BA). Las condiciones adecuadas para la segunda SPE se resumen a continuación:

- Disolución: 0,2 ml de metanol
 - Acondicionamiento: 0,2 ml de FA al 25 % en agua
- 25
- Carga de muestra: eluatos acidificados de SPE 1
 - Lavado 1: 0,4 ml de FA al 25 % en agua
 - Lavado 2: 0,4 ml de acetonitrilo al 60 % en agua
 - Lavado 3: 0,4 ml de acetonitrilo al 100 %
 - Elución: 100 µl de acetonitrilo/agua/hidróxido de amonio 75/15/10

30

Después de la segunda SPE, los eluatos se evaporaron a sequedad durante 35 minutos a 45 °C en un concentrador de vacío. A continuación, las muestras secas se resuspendieron con 25 µl de disolvente AB, una solución optimizada de forma interna

que estaba compuesta por AcN al 5 % v/v, dimetilformamida al 1 % v/v, TFA al 0,5 % v/v, Triton X-100 al 0,05 % v/v y tris-carboxietilfosfina al 0,14 % p/v en agua.

Protocolo C: Las muestras se obtuvieron primero con los patrones internos de
5 elección. A continuación, las muestras se desnaturalizaron mediante el contacto de 400 µl de ácido fórmico (FA) al 50 % en agua con 200 µl de plasma humano. Después de la desnaturalización, los péptidos amiloides se purificaron utilizando dos etapas de SPE consecutivas.

10 La primera SPE consistía en una SPE de intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto que utilizaba la placa de extracción MCX (placas de µelución de 96 pocillos OASIS MCX, 30 µm, 2 mg, Waters, Milford, MA, Estados Unidos, número de pieza 186001830BA). Las condiciones adecuadas para la primera SPE se resumen a continuación:

- 15
- Disolución: 1 ml de metanol
 - Acondicionamiento: 1 ml de FA al 25 % en agua
 - Carga de muestra
 - Lavado 1: 1 ml de FA al 25 % en agua
 - Lavado 2: 1 ml de acetonitrilo al 60 % en agua (60/40)
- 20
- Lavado 3: 1 ml de acetonitrilo al 100%
 - Elución: 2 x 400 µl de acetonitrilo/agua/hidróxido de amonio (75/15/10)

Después de la primera SPE, los eluatos se sometieron a una segunda SPE, en este caso, una SPE de intercambio aniónico de fase inversa en modo mixto utilizando las
25 placas MAX µElution (OASIS MAX µElution Plates, Waters, Milford, MA, Estados Unidos, número de parte 186001829). Las condiciones adecuadas para la segunda SPE se resumen a continuación:

- 30
- Disolución: 0,3 ml de metanol
 - Acondicionamiento: 0,4 ml de NH₄OH al 10 %
 - Carga de muestra
 - Lavado 1: 0,4 ml de NH₄OH al 10 %
 - Lavado 2: 2 x 0,4 ml de acetonitrilo/agua (60/40)
 - Elución: 2 x 50 µl de acetonitrilo/agua 70/30, TFA al 5 %

Después de la segunda SPE, los eluatos se evaporaron a sequedad durante 35 minutos a 45 °C en un concentrador de vacío. A continuación, las muestras secas se resuspendieron con 25 µl de disolvente AB, una solución optimizada de forma interna que estaba compuesta por AcN al 5 % v/v, dimetilformamida al 1 % v/v, TFA al 0,5 % v/v, Triton X-100 al 0,05 % v/v y tris-carboxietilfosfina al 0,14 % p/v en agua.

Protocolo D: Las muestras se obtuvieron primero con los patrones internos de elección. A continuación, las muestras se desnaturalizaron mediante el contacto de 400 µl de NH₄OH al 25 % en agua con 200 µl de plasma humano. Después de la desnaturalización, los péptidos amiloides se purificaron utilizando dos etapas de SPE consecutivas.

La primera SPE consistió en una SPE de intercambio aniónico de fase inversa en modo mixto para la que se utilizaron placas de 96 pocillos (30 µg, 30 mg, Waters, Milford, MA, Estados Unidos, número de parte 186000373). Las condiciones adecuadas para la primera SPE se resumen a continuación:

- Disolución: 1 ml de metanol
- Acondicionamiento: 1 ml de NH₄OH al 10 %
- Carga de muestra
- Lavado 1: 1 ml de NH₄OH al 10 %
- Lavado 2: 1 ml de acetonitrilo/agua 60/40
- Elución: 2 x 400 µl of acetonitrilo/agua 70/30, ácido trifluoroacético al 5 %

Después de la primera SPE, los eluatos se sometieron a una segunda SPE, en este caso, una SPE de modo mixto fase inversa-intercambio catiónico utilizando la placa de extracción MCX (placas de elución de 96 pocillos OASIS MCX, 30 µm, 2 mg, Waters, Milford, MA, Estados Unidos, número de parte 186001830BA). Las condiciones adecuadas para la segunda SPE se resumen a continuación:

- Disolución: 0,2 ml de metanol
- Acondicionamiento: 0,2 ml de FA al 5 % en agua
- Carga de muestras
- Lavado 1: 0,4 ml de FA al 5 % en agua
- Lavado 2: 0,4 ml de acetonitrilo al 40 % en agua
- Lavado 3: 0,4 ml de acetonitrilo al 100 %

- Elución: 100 µl de acetonitrilo/agua/hidróxido de amonio 75/15/10

Después de la segunda SPE, los eluatos se evaporaron a sequedad durante 35 minutos a 45 °C en un concentrador de vacío. A continuación, las muestras secas se resuspendieron con 25 µl de disolvente AB, una solución optimizada de forma interna que estaba compuesta por:

- Acetonitrilo al 100 %: 2,5 ml
- Dimetilformamida (DMF) al 100 %: 0,5 ml
- TFA al 25 % en agua: 1 ml
- 10 • Triton X-100 al 10 % en agua: 0,25 ml
- Tris-carboxietilfosfina: 70 mg
- Agua: se enrasa a un volumen de 50 ml en un matraz volumétrico

Las curvas de calibración y las muestras de control de calidad se sometieron también al mismo protocolo de preparación en cada caso.

EJEMPLO 2: Análisis de muestras de plasma mediante espectrometría de masas

20 Las muestras de plasma preparadas en el ejemplo 1 se analizaron posteriormente mediante espectrometría de masas siguiendo los procedimientos para la cuantificación de péptidos amiloides de la presente invención.

El sistema analítico utilizado para la cuantificación de péptidos amiloides estaba compuesto por los siguientes módulos:

- Cromatógrafo de bomba dual M3 Micro-HPLC (trap-elute) dispuesto con un automuestreador CTC y un horno en columna (Sciex, Framingham, MA, Estados Unidos).
- Espectrómetro de masas de trampa de iones lineal de triple cuadrupolo híbrido 6500+ QTRAP acoplado a una interfaz de espectrometría de movilidad diferencial (DMS) SelexION (Sciex, Framingham, MA, Estados Unidos).

Después de la inyección, las muestras se cargaron en la columna de trampa (YMC Triart C18, 12 nm, 3 µm, 5 x 0,3 mm. YMC, Dinslaken, Alemania). Se utilizó un caudal

de trampa de 50 µl/min con TFA al 0,5 % y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 % en agua durante dos minutos. Después de esto, se accionó la válvula de trampa y los analitos se eluyeron de la columna de trampa a la columna analítica y el sistema de MS. Se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas:

- 5 ○ Fase A: FA al 0,1 % en agua
- Fase B: FA al 0,1 % en acetonitrilo
- Caudal: 15 µl/min
- Columna: HALO Protein C18, 400 Å, 3,4 µm, 0,3 x 50 mm (Advanced Materials Technology, Wilmington, DE, Estados Unidos)
- 10 ○ Temperatura de la columna: 55 °C
- Gradiente: 15 % de B durante 0,3 min, rampa lineal hasta 40 % de B en el minuto 3,5, aumento hasta 90 % de B en 0,1 minutos y durante 0,3 minutos, retorno a las condiciones iniciales (15 % de B) en 0,1 minutos y durante 3 minutos para el reequilibrio de la columna.
- 15 ○ En el minuto 5,5, se accionó la válvula analítica y el sistema se lavó con Triton X-100 al 0,1 % en TFE/agua 80/20. Después de esto, la columna de trampa se equilibró con el disolvente de carga (DMSO al 5 % TFA al 0,5 % en agua).

- La adquisición de muestra empezó cuando se accionó la válvula de trampa y se
- 20 eluyeron los analitos a la columna analítica. Después de que tuviera lugar la separación cromatográfica, los analitos entraron en la fuente de iones del espectrómetro de masas y se sometieron a ionización por electrospray (ESI) en modo de ion positivo. Una vez en fase gaseosa, los analitos se sometieron a espectrometría de movilidad diferencial (DMS) para separarse, lo máximo posible, de los iones de la
- 25 matriz que pudiera interferir.

La combinación específica de DMS con microLC dio lugar a una reducción del ruido de fondo y a un aumento de la sensibilidad.

- 30 Después de la separación mediante DMS, se analizaron los iones (especies cargadas de los analitos de interés) mediante monitorización de múltiples reacciones en un instrumento con triple cuadrupolo. De forma resumida, se filtraron los iones precursores (pseudomoleculares) en el primer cuadrupolo (Q1), se fragmentaron en el segundo cuadrupolo (Q2 o celda de colisión) mediante colisiones con un gas

objetivo (un proceso conocido como disociación inducido por colisión, CID, o disociación activada mediante colisiones, CAD), y los fragmentos de interés se filtraron en el tercer cuadrupolo (Q3) y alcanzaron el detector.

- 5 En Q1 se seleccionaron iones precursores con estado de carga de cinco ($z = 5$), se fragmentaron en Q2 mediante colisiones con nitrógeno gaseoso y se analizaron los fragmentos en Q3 (también con $z = 5$). Los parámetros de adquisición de MRM se resumen a continuación:

Especie	Masa Q1	Masa Q3	Tiempo (ms)	Energía de colisión	Potencial de salida de la celda de
A β 40	867,0	843,6	45	25	18
A β 42	903,8	886,0	45	24	20
¹⁵ N-A β 40	877,5	853,9	45	25	18
¹⁵ N-A β 42	914,8	896,7	45	24	20
² H-A β 40	872,1	848,6	45	25	18
² H-A β 42	909,4	891,5	45	25	20

10

Para A β 40, ¹⁵N-A β 40 and ²H-A β 40, los iones de producto b_{39}^{5+} se analizaron en Q3. Para A β 42, ¹⁵N-A β 42 y ²H-A β 42, los iones de producto b_{41}^{5+} se analizaron en Q3. Todas las masas moleculares en la tabla anterior son masas en promedio.

15

Los siguientes parámetros de adquisición fueron los mismos para todas las especies: temperatura de la fuente 250 °C, Cortina de gas 30 libras por pulgada cuadrada (psi), voltaje de pulverización de iones 4.800 voltios (v), gas 1 de la fuente de iones (nebulizador) 30 psi, gas 2 de la fuente de iones (desolvatación) 50 psi, potencial de desagrupamiento 85 V y potencial de entrada 10 V. Ambos cuadrupolos de filtración, Q1 y Q3, trabajan en Unit Resolution.

20

Se ajustó una ecuación lineal a las proporciones de área máximas (¹⁵N-A β 40/²H-A β 40 y ¹⁵N-A β 42/²H-A β 42) frente a los datos de concentración mediante una regresión lineal para las muestra de la curva de calibración. En el caso de las muestras de control de calidad, se interpolaron las proporciones de respuesta (¹⁵N-A β 40/²H-A β 40 y ¹⁵N-A β 42/²H-A β 42) en su correspondiente curva de calibración y las concentraciones retrocalculadas se obtuvieron y se evaluaron. Para las muestras de

25

interés, se interpolaron las proporciones de las respuestas de las muestras ($A\beta_{40}/^2H$ - $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}/^2H$ - $A\beta_{42}$) en su correspondiente curva de calibración se obtuvieron las concentraciones calculadas. El análisis de regresión se realizó con software MultiQuant 3.0.3 (Sciex, Framingham, MA, Estados Unidos).

5

EJEMPLO 3: Cuantificación de los péptidos beta amiloides $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ intactos en muestras de plasma preparadas y analizadas según la presente invención

- 10 Se prepararon 20 réplicas de dos muestras de plasma diferentes (muestra A y muestra B) siguiendo el procedimiento, tal como se describe en el ejemplo 1 (protocolo A) y el ejemplo 2, y se analizaron posteriormente mediante espectrometría de masas siguiendo el procedimiento, tal como se explica en el ejemplo 2.
- 15 Los valores obtenidos mediante la interpolación en las curvas de calibración de la cuantificación de péptidos beta amiloides realizada sobre 20 réplicas de cada muestra de plasma se muestran en la tabla 1 a continuación.

Tal como se puede observar en la tabla 1, el coeficiente de variación para la cuantificación (% CV) de $A\beta_{40}$ está por debajo del 4 %, mientras que el coeficiente de variación para la cuantificación de $A\beta_{42}$ es de aproximadamente el 6 %. Estos coeficientes de variación representan pequeñas variabilidades que hacen que los procedimientos de la presente invención sean adecuados para detectar pequeñas diferencias en los péptidos $A\beta$ entre grupos.

25

Tabla 1. Cuantificación de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en muestras de plasma

Muestra A		Muestra B	
$A\beta_{40}$	$A\beta_{42}$	$A\beta_{40}$	$A\beta_{42}$
248,8	47,0	189,2	49,8
249,6	44,3	175,4	47,5
236,3	42,2	180,0	50,4
251,8	46,0	184,5	55,9
251,9	42,0	182,7	56,8
254,6	44,5	168,9	53,9
243,1	45,6	172,3	51,4
238,4	46,7	175,3	57,0
235,3	39,6	169,1	49,6

	Muestra A		Muestra B	
	Aβ40	Aβ42	Aβ40	Aβ42
	237,5	44,3	169,0	47,4
	235,3	46,0	169,0	51,1
	238,4	43,3	166,0	52,1
	248,5	42,3	174,7	48,0
	235,4	45,5	166,1	51,4
	260,6	45,5	173,0	53,2
	240,1	48,8	173,9	52,4
	251,8	44,3	176,0	50,8
	242,7	39,0	179,0	48,1
	247,0	46,3	184,5	54,8
	245,6	40,7	173,5	57,5
	Media	244,63	44,19	175,10
SD	7,46	2,57	6,51	3,21
% CV	3,05	5,81	3,72	6,17

Los valores absolutos de cuantificación de A β 40 en plasma humano fueron similares a los obtenidos mediante los procedimientos de MS y ensayo inmunológico de unión a ligando (LBA) (principalmente ELISA) conocidos en la técnica. Sin embargo, para la cuantificación de A β 42, los niveles observados con los procedimientos de la presente invención fueron significativamente más elevados.

Además, el procedimiento de la presente invención permitió la cuantificación de los péptidos A β 40 y A β 42 intactos, mientras que otros procedimientos conocidos en la técnica, tales como el del grupo de Bateman, detectan péptidos truncados (Ovod et al., Amyloid B concentrations and stable isotope labelling kinetics de plasma humano specific to central nervous system amyloidosis, Alzheimer's and Dementia, octubre de 2017; 13(10): 1185).

EJEMPLO 4: Detección de pequeños cambios de la especie A β en una muestra

En estudios adicionales se investigó la capacidad para detectar diferencias pequeñas en la concentración de amiloides en plasma humano. Por tanto, se prepararon 200 μ l y 220 μ l de una muestra de plasma siguiendo el procedimiento del ejemplo 1, protocolo A, y se analizó posteriormente mediante espectrometría de masas siguiendo el procedimiento, tal como se explica en el ejemplo 2. En este caso, se

compararon las proporciones de analito (área de ^{14}N -A β 40/ ^{15}N -A β 40 y ^{14}N -A β 42/ ^{15}N -A β 42).

En este ejemplo, la concentración de amiloides en muestras de plasma fue exactamente la misma. Sin embargo, esto no es cierto en cantidades absolutas, ya que existe un 10 % de diferencia en los volúmenes utilizados. Esta situación mimetiza una diferencia del 10 % en la concentración en muestras reales.

La tabla 2 muestra los resultados de la cuantificación de A β 42 y A β 40 realizada en varias réplicas de la misma muestra de plasma, donde el volumen de partida fue de 200 μl y de 220 μl siguiendo los procedimientos de la presente invención, tal como se describen en los ejemplos 1 y 2.

Los resultados demuestran que el aumento del 10 % en el volumen de una muestra de plasma da lugar a un aumento del 10 % y del 9 % de la cantidad de A β 42 y A β 40, respectivamente, tal como se cuantifica mediante los procedimientos de la presente invención.

Tabla 2. Determinación del aumento de un 10 % de los péptidos A β 40 y A β 42 en muestras de plasma

A β 42			A β 40		
	200 μl	220 μl		200 μl	220 μl
	3,99E-	4,41E-		1,62E-	1,80E-
	3,95E-	4,40E-		1,70E-	1,81E-
	3,58E-	4,17E-		1,73E-	1,85E-
	3,97E-	4,36E-		1,70E-	1,90E-
	4,08E-	4,26E-		1,69E-	1,80E-
	3,98E-	4,51E-		1,65E-	1,85E-
	4,08E-	3,89E-		1,70E-	1,87E-
	4,26E-	4,32E-		1,69E-	1,83E-
	4,01E-	4,14E-		1,70E-	1,84E-
	3,88E-	4,57E-		1,63E-	1,82E-
	3,48E-	4,30E-		1,75E-	1,81E-
	3,77E-	4,17E-			
Media	0,3919	0,4292	Media	0,1687	0,1835
SD	0,0217	0,0184	SD	0,0040	0,0031
% CV	5,55	4,28	% CV	2,34	1,71
%	10		%	9	
Valor p	0,0001642		Valor p	5,5035E-09	

EJEMPLO 5: Resultado en el diagnóstico de los procedimientos de la presente invención

5 Se prepararon muestras de 36 individuos caracterizadas previamente mediante tomografía de emisión de positrones (PET) (26 individuos de PET negativa y 14 individuos de PET positiva) siguiendo el procedimiento, tal como se explica en el ejemplo 1, y se analizaron posteriormente mediante espectrometría de masas siguiendo el procedimiento, tal como se explica en el ejemplo 2. Se calcularon las
10 proporciones de $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ y se muestran en la figura 1. Para los individuos con PET negativa, la media de los valores de las proporciones de $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ fue de 0,184 con una desviación estándar de 0,02, mientras que para los individuos con PET positiva, la media de los valores de las proporciones de $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ fue de 0,152 con una desviación estándar de 0,03 (valor $p < 0,001$). La curva ROC mostró
15 un AUC = 0,8365 (figura 2).

Tal como se explica en la sección del estado de la técnica anterior, se utiliza la proporción de concentraciones de $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ como biomarcador de la amiloidosis cerebral en las etapas tempranas de la enfermedad de la enfermedad de Alzheimer,
20 en la que se encuentran concentraciones inferiores de $A\beta_{42}$ cuando están presentes placas amiloides. Por lo tanto, estos resultados demostraron que los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar no sólo para monitorizar cambios de $A\beta$ como respuesta a una terapia, sino con objetivos de diagnóstico, ya que permiten diferenciar entre controles sanos frente a individuos con deterioro cognitivo leve.

25

EJEMPLO 6: Comparación de diferentes combinaciones de cartuchos de SPE

Se llevaron a cabo diferentes pruebas para la combinación de cartuchos de SPE en base a la preparación de las muestras para la espectrometría de masas, tal como se
30 explica en el ejemplo 1, y, a continuación, se analizaron, tal como se describe en el ejemplo 2. Los trazos cromatográficos respectivos extraídos para $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ se muestran en las figuras 4 a 8. Para la comparación, también se evaluó la utilización de una única etapa de SPE (un intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto)
35 (figura 3). La utilización de una única SPE en modo inverso no se evaluó, ya que el

eluato resultante no es susceptible de ser analizado de forma satisfactoria mediante Micro-LC debido a la duración de la columna cromatográfica.

Por tanto, se evaluaron las siguientes combinaciones de SPE:

- 5 - La figura 4 muestra los trazos cromatográficos extraídos para A β 40 (izquierda) y A β 42 (derecha) cuando la muestra de plasma se puso en contacto con un agente desnaturalizante ácido y se separó en primer lugar con una SPE en modo inverso (HLB), seguida de una segunda SPE de intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto (MCX) siguiendo el
10 protocolo A.
- La figura 6 muestra los trazos cromatográficos extraídos para A β 40 (izquierda) y A β 42 (derecha) cuando la muestra de plasma se puso en contacto con un agente desnaturalizante ácido y se separó en primer lugar con una SPE en modo inverso (HLB), seguida de una segunda SPE de
15 intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto (MCX) siguiendo el protocolo B.
- La figura 5 muestra los trazos cromatográficos extraídos para A β 40 (izquierda) y A β 42 (derecha) cuando la muestra de plasma se puso en contacto con un agente desnaturalizante ácido y se separó en primer lugar con una SPE de intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto (MCX),
20 seguida por una segunda SPE en modo inverso (HLB).

En las figuras se observa claramente que los trazos extraídos para A β 40 (izquierda) y A β 42 (derecha) cuando la primera SPE es una MCX, seguida de una HLB son
25 peores que los obtenidos utilizando una primera HLB seguida de una MCX. Además, cuando se comparan con una única etapa de SPE, tal como se conoce en la técnica anterior (figura 3), los trazos son mucho más intensos, lo que demuestra que la combinación de dos etapas consecutivas de SPE proporciona una mejor relación señal / ruido y, por tanto, una mejor sensibilidad.

- 30 - La figura 8 muestra los trazos cromatográficos extraídos para A β 40 (izquierda) y A β 42 (derecha) cuando la muestra de plasma se puso en contacto con un agente desnaturalizante ácido y se separó en primer lugar con una SPE de intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto (MCX),
35 seguida de una segunda SPE de intercambio aniónico de fase inversa en

modo mixto (MAX) (protocolo C). Dichos trazos se comparan con los trazos obtenidos cuando la muestra de plasma, desnaturalizada con un agente ácido, se separó en primer lugar con una SPE en modo inverso (HLB), seguida de una segunda SPE de intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto (MCX).

Los trazos cromatográficos mostrados en la figura 8 demuestran que la utilización de una primera SPE MCX, seguida de una segunda SPE MAX permite obtener picos discriminativos para A β 40 y A β 42, de una manera similar, aunque no muy intenso en ese momento, a cuando se utiliza una primera SPE HLB, seguida de una SPE MCX. Sin embargo, cuando la primera SPE se sustituye por una HLB (figura 9), entonces la recuperación de ambos analitos es muy baja.

- La figura 7 muestra los trazos cromatográficos extraídos para A β 40 (izquierda) y A β 42 (derecha) cuando la muestra de plasma se puso en contacto con un agente desnaturalizante básico y se separó en primer lugar con una SPE de intercambio aniónico de fase inversa en modo mixto (MAX), seguida de una segunda SPE de intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto (MCX), según el protocolo D. Para la comparación, el trazo obtenido cuando una muestra de plasma se desnaturalizó con un agente básico y se separó en primer lugar con una SPE en modo inverso (HLB), seguida de una segunda SPE de intercambio catiónico de fase inversa en modo mixto (MCX) también se muestra en la figura 7.

Estos resultados demuestran que cuando la muestra de plasma se desnaturaliza con un agente básico y, a continuación, se somete a una primera MAX, seguida de una MCX, los picos obtenidos para A β 40 y A β 42 son tan buenos como para la combinación de HLB, seguida de MCX cuando la muestra se desnaturaliza con un agente ácido.