

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una muestra de plasma que comprende péptidos beta amiloides para análisis mediante espectrometría de masas, caracterizado por que
- 5 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 sobre dicho primer
 - 10 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.
- 15
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la segunda etapa de extracción en fase sólida es una extracción en fase sólida de intercambio catiónico.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la extracción en fase sólida de
- 20 intercambio catiónico es un intercambio catiónico fuerte, débil o en modo mixto fase inversa – intercambio catiónico.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la segunda etapa de extracción en fase sólida es una extracción en fase sólida de intercambio aniónico.
- 25
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que la extracción en fase sólida de intercambio aniónico es un intercambio aniónico fuerte, débil o en modo mixto fase inversa – intercambio aniónico.
- 30
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que 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 menor o igual a aproximadamente 4,5.

7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el agente desnaturalizante ácido es una solución de ácido fórmico en agua a una concentración entre el 40 % y el 70 % (v/v).
- 5 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la primera etapa de extracción en fase sólida es una extracción en fase sólida de fase inversa.
9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que las primera y segunda etapas de extracción en fase sólida comprenden cada una, como
- 10 mínimo, dos etapas de lavado caracterizado por que 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.
- 15 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que 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.
- 20 11. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que 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.
12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 7, en el que la
- 25 primera etapa de extracción en fase sólida es una extracción en fase sólida de intercambio catiónico.
13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que la extracción en fase sólida de intercambio catiónico es un intercambio catiónico fuerte, débil o en modo mixto
- 30 fase inversa – intercambio catiónico.
14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que las primera y segunda etapas de extracción en fase sólida comprenden cada una, como mínimo, dos etapas de lavado caracterizadas por que la primera etapa de lavado de la primera extracción
- 35 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 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.

5

15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 to 3, en el que 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 a aproximadamente 11.

10

16. Procedimiento, según la reivindicación 15, en el que el agente desnaturalizante básico es una solución de hidróxido de amonio en agua a una concentración entre el 5 % y el 50 % (v/v).

15

17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en el que la primera etapa de extracción en fase sólida es una extracción en fase sólida de intercambio aniónico.

20

18. Procedimiento, según la reivindicación 17, en el que la extracción en fase sólida de intercambio aniónico es un intercambio aniónico fuerte, débil o en modo mixto fase inversa – intercambio aniónico.

25

19. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que las primera y segunda etapas de extracción en fase sólida comprenden cada una, como mínimo, dos etapas de lavado caracterizadas por que la primera etapa de lavado de la primera extracción en fase sólida se lleva a cabo con una solución que comprende una base y la primera etapa de lavado de la segunda extracción en fase sólida se lleva 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.

30

20. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución de la etapa d) para procesar el eluato seco es una solución acuosa que comprende un surfactante y un agente reductor.

35

21. Procedimiento, según la reivindicación 20, en el que la 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).
- 5 22. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la solución 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.
- 10 23. Procedimiento, según la reivindicación 22, en el que la 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 3 % (v/v).
- 15 24. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de plasma es una muestra de plasma humano.
- 20 25. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el volumen de una muestra de plasma utilizado en la etapa a) es entre 100 μ l y 400 μ l.
26. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que no comprende inmunoprecipitación o digestión de la muestra de plasma antes del análisis con espectrometría de masas.
- 25 27. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque procesar el eluato de la etapa d) de la reivindicación 1 es adecuar el eluato para cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa.
- 30 28. 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, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y que comprende, además, las etapas de:

- 5 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;
- iii) Separar dichas una o más especies cargadas según su movilidad iónica,
- 10 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 abundancias de la una o más especies cargadas medidas en la etapa iv) con una curva estándar.

15

29. Procedimiento, según la reivindicación 28, en el 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 separadas es la monitorización de múltiples reacciones (MRM) en un instrumento con triple cuadrupolo.

30. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 28 o 29, en el que la curva estándar se prepara con plasma humano.

31. Solución acuosa para procesar un eluato seco para analizar mediante espectrometría de masas 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 3 % (v/v).

.