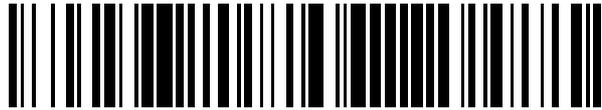


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 504 967**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2010 E 10745685 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2464977**

54 Título: **Procedimiento de detección de compuestos de Pneumocandina**

30 Prioridad:

**14.08.2009 US 233846 P**

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

**09.10.2014**

73 Titular/es:

**XELLIA PHARMACEUTICALS APS (100.0%)  
P.O. Box 1736  
2300 København, DK**

72 Inventor/es:

**BRUNSVIK, ANDERS y  
MÅNSSON, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 504 967 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de compuestos de Pneumocandina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos de detección de compuestos de Pneumocandina.

10 **Antecedentes**

10 Las Pneumocandinas son hexapéptidos cíclicos antifúngicos con una cadena lateral lipídica (véase Schwarts *et al*, 1992, Journal of antibiotics, vol. 45, n.º 12, páginas 1853-1866, Masurekar *et al*, 1992, Journal of Antibiotics, vol. 45, n.º 12, páginas 1867-1874, Hensens *et al*, 1992, Journal of Antibiotics, vol. 45, n.º 12, páginas 1875-1885, Schmatz *et al*, 1992, Journal of Antibiotics, vol. 45, n.º 12, páginas 1886 - 1891 y Adefarati *et al*, 1992, Journal of Antibiotics, vol. 45, n.º 12, páginas 1953-1957 y documento US 5.021.341).

15 La actividad antifúngica de las Pneumocandinas está relacionada con la inhibición de la biosíntesis de 1,3 $\beta$ -glucanos. La 1,3 $\beta$ -glucano sintasa, una enzima de múltiples subunidades, es responsable de la construcción de la pared celular fúngica, la deposición del tabique de división y el ensamblaje de la pared de la ascospora. La subunidad catalítica de este complejo enzimático, una proteína integral de la membrana, se ha identificado tanto en las levaduras modelo *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, como en hongos patógenos tales como especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis*. (Curr Drug Targets Infect Disord. Agosto de 2001; 1(2): 159-69 por Liu y Balasubramanian).

20 Las Pneumocandinas y los derivados de Pneumocandina son útiles como principios farmacéuticos activos (API) y/o productos intermedios para producir API. Los fármacos que comprenden los API están previstos para su utilización en el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades o estados que implican infecciones fúngicas.

25 Por ejemplo, el API caspofungina es un derivado semisintético de Pneumocandina B<sub>0</sub>. La caspofungina, comercializada como Cancidas<sup>®</sup>, está indicada en adultos y pacientes pediátricos (3 meses y mayores) para:

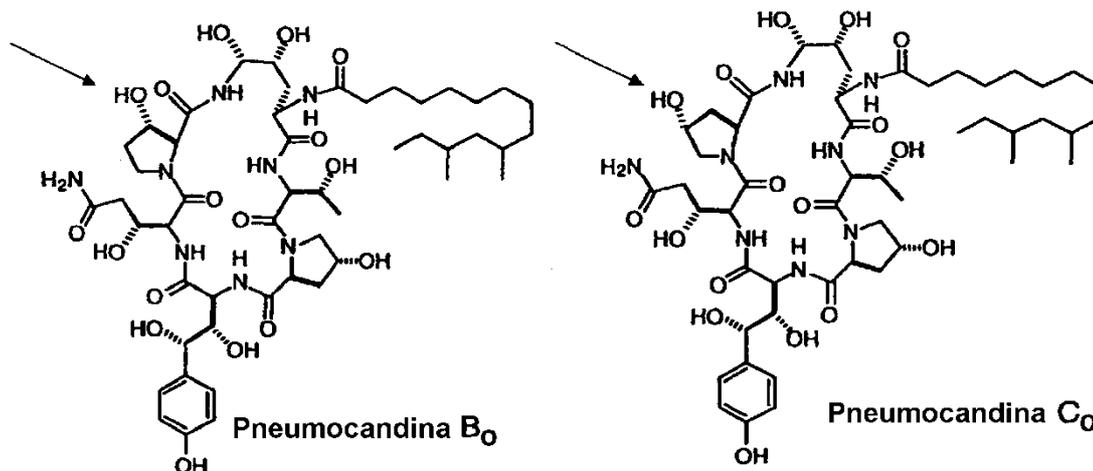
- 30 - Terapia empírica para supuestas infecciones fúngicas en pacientes febriles, neutropénicos.
- 35 - Tratamiento de candidemia y las siguientes infecciones por *Candida*: abscesos intraabdominales, peritonitis e infecciones del espacio pleural.
- Tratamiento de candidiasis esofágica.
- 40 - Tratamiento de aspergilosis invasiva en pacientes que son resistentes o intolerantes a otras terapias.

40 Por tanto, se requiere una alta pureza del API para la seguridad y eficacia de los fármacos.

45 Puede utilizarse Pneumocandina B<sub>0</sub> como material de partida para producir caspofungina. Durante tal producción, se considerará Pneumocandina C<sub>0</sub> como una impureza. Por tanto, es deseable monitorizar y controlar tanto el contenido de Pneumocandina B<sub>0</sub> así como el contenido de Pneumocandina C<sub>0</sub>.

50 A menudo se produce Pneumocandina B<sub>0</sub> mediante fermentación del hongo *Glarea lozoyensis* (anteriormente clasificado como *Zalerion arboricola*), pero se producen conjuntamente muchos isómeros y derivados con propiedades fisicoquímicas similares en los procedimientos de fermentación.

La Pneumocandina B<sub>0</sub> y la Pneumocandina C<sub>0</sub> son isómeros que difieren por la posición de un grupo hidroxilo en un residuo de prolina únicamente:



Número de registro de Chemical abstracts: 135575-42-7

Número de registro de Chemical abstracts: 144074-96-4

Se conocen varios procedimientos para la detección de Pneumocandinas. Sin embargo, generalmente son engorrosos e ineficaces para la detección selectiva de Pneumocandina B<sub>0</sub> o la detección selectiva de Pneumocandina C<sub>0</sub>. Por ejemplo, la cristalización y la cromatografía de fase inversa no pueden separar Pneumocandina B<sub>0</sub> de Pneumocandina C<sub>0</sub>. La cromatografía de fase normal que utiliza fases móviles de acetato de etilo/metanol/agua puede separar Pneumocandina B<sub>0</sub> de Pneumocandina C<sub>0</sub>. Sin embargo, este procedimiento adolece de una baja solubilidad de la Pneumocandina en la disolución de carga y también de algo de mala robustez. Además, esta fase móvil no es muy compatible con procedimientos espectrométricos de masas, lo que limita la utilidad del procedimiento para fines analíticos.

#### Técnica anterior relevante

##### Documento US 5194377

J Mass Spectrom. Abril de 2007; 42(4):440-9 por Rochat *et al.* Detection of Caspofungin by LC-EM/EM in plasma.

Rapid Commun Mass Spectrom. 2004; 18(23):2871-7 por Egle *et al.* Double column-switching technique (LC-LC) for liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry for fully automated analysis of Caspofungin.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 1 de septiembre de 2008; 872(1-2):1-22. Publicación electrónica 26 de julio de 2008. Quantitative bio analysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry.

Journal of mass spectrometry: JEM, (julio de 1999) vol. 34, n.º 7, págs. 733-40 por Oin *et al.* Collision-induced dissociation of protonated MK-0991: novel ring opening of a cyclic hexapeptide in the gas phase.

J Chromatogr A 1999; 831:217-225 por Osawa *et al.* Purification of pneumocandins by preparative silica gel high-performance liquid chromatography.

Las siguientes abreviaturas se utilizan con el significado especificado a lo largo de toda esta memoria descriptiva:

##### Abreviaturas

- API - Principio(s) farmacéutico(s) activo(s)
- EM- Espectrometría de masas
- EM/EM - Espectrometría de masas en tándem
- CL - Cromatografía de líquidos
- ACN - Acetonitrilo
- AmAc - Acetato de amonio
- HILIC - Cromatografía de líquidos de interacción hidrófila
- HPLC - Cromatografía de líquidos de alta resolución
- Q - Cuadrupolo
- TOF - Tiempo de vuelo
- EC - Energía de colisión

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la detección específica de Pneumocandina B<sub>0</sub> y/o la detección específica de Pneumocandina C<sub>0</sub> mediante espectrometría de masas (EM). La invención se basa en el descubrimiento sorprendente de un comportamiento de fragmentación diferente de B<sub>0</sub> en comparación con C<sub>0</sub>.

La invención puede utilizarse para detectar estas moléculas específicamente. También puede utilizarse para monitorizar la presencia de estas moléculas en una muestra, o en un procedimiento industrial. Por tanto, incluso cuando no se separan cromatográficamente Pneumocandina B<sub>0</sub> y C<sub>0</sub>, un experto en la materia puede analizar el contenido del compuesto B<sub>0</sub> a menudo deseado durante un procedimiento de fabricación. De manera simultánea o alternativa, puede analizarse el contenido del compuesto C<sub>0</sub> pocas veces deseado durante un procedimiento de fabricación. El conocimiento y la documentación del contenido de estos compuestos son importantes para cualquier producción comercial o científica de Pneumocandina B<sub>0</sub> o Pneumocandina C<sub>0</sub>.

## Descripción detallada de la invención

La detección de Pneumocandinas puede realizarse con detección UV. Para fines analíticos, se utiliza más preferiblemente un detector de EM que puede realizar EM/EM. En el contexto de la presente invención se descubrió sorprendentemente, realizando EM/EM en modo de ión tanto positivo como negativo, que Pneumocandina B<sub>0</sub> y Pneumocandina C<sub>0</sub> se fragmentan de manera diferente cuando se elige el ión molecular desprotonado ([M-H]<sup>-</sup>) para EM/EM. De manera notable, pueden encontrarse iones de fragmentos que son específicos para (es decir, que el ión del fragmento se produce exclusivamente sólo para uno de los isómeros) o casi específicos para (es decir, que el ión del fragmento se produce en una abundancia mucho más alta para uno de los isómeros) Pneumocandina B<sub>0</sub> y Pneumocandina C<sub>0</sub>, respectivamente. Para Pneumocandina B<sub>0</sub>, estos iones presentan valores de *m/z* de por ejemplo 300, 416 y 452. Para Pneumocandina C<sub>0</sub>, estos iones presentan valores de *m/z* de por ejemplo 338, 356 y 360.

Combinando la separación cromatográfica con la monitorización de esos fragmentos específicos (preferiblemente utilizando tecnología de CL-EM/EM) para Pneumocandina B<sub>0</sub> y Pneumocandina C<sub>0</sub>, es posible detectar y cuantificar Pneumocandina B<sub>0</sub> y Pneumocandina C<sub>0</sub> en muestras fermentadas complejas.

Deben incluirse patrones de referencia auténticos para Pneumocandina B<sub>0</sub> y Pneumocandina C<sub>0</sub> en relación con el análisis. La identidad del isómero respectivo en la muestra se determina a partir de la comparación de los tiempos de retención y los fragmentos específicos con los patrones de referencia auténticos. Las cuantificaciones de Pneumocandina B<sub>0</sub> y Pneumocandina C<sub>0</sub> se realizan a partir de la comparación del área con los patrones de referencia auténticos (utilizando curvas de calibración), ya que el área del pico de isómero respectivo es proporcional a la cantidad del isómero respectivo.

Para poder crear un procedimiento analítico para analizar el contenido de B<sub>0</sub> y C<sub>0</sub> en una muestra, era necesario o bien separar los dos compuestos cromatográficamente o bien encontrar iones, calificadores o transiciones de EM/EM específicos de los compuestos. Puesto que ninguno de los patrones de B<sub>0</sub> o C<sub>0</sub> suministrados eran lo suficientemente puros, tuvo que desarrollarse una separación rápida de B<sub>0</sub> o C<sub>0</sub> antes de pudiesen realizarse experimentos de EM adicionales. Puesto que la cromatografía de fase inversa no mostró ningún resultado prometedor, se decidió intentar y establecer un procedimiento basado en cromatografía de fase normal. Se realizaron pruebas iniciales en una columna Agilent-NH<sub>2</sub>, con diferentes combinaciones de acetonitrilo (ACN) y disolución de acetato de amonio al 0,1% en agua (AmAc) que mostró signos de separación pero la resolución estaba lejos de ser lo suficientemente buena como para proporcionar una separación de nivel inicial de los dos compuestos. Entonces se sometió a prueba una columna de HILIC Ascentis Express, de Sigma-Aldrich basándose en que es un tipo de columna de "fase normal" y que es conocido que la tecnología de partículas Fused-Core proporciona una buena resolución. Tras someter a prueba diferentes combinaciones de ACN y AmAc, se eligió una mezcla de 85/15 (ACN/AmAc). El resultado fue una separación de nivel inicial de B<sub>0</sub> y C<sub>0</sub>. El aumento del contenido en ACN proporcionó unos tiempos de retención más largos pero picos más anchos, y el aumento del contenido en AmAc proporcionó unos tiempos de retención más cortos pero menos separación. Se monitorizaron B<sub>0</sub> y C<sub>0</sub> con ESI/EM en modo positivo.

La fragmentación Q-TOF con energías de colisión que oscilaban entre 10 y 60 V no dio como resultado fragmentos específicos en el ión pseudo-molecular [M+H]<sup>+</sup> o en el aducto de sodio [M+Na]<sup>+</sup>. Sin embargo, la ionización negativa con energías de colisión que oscilaban entre 10 y 60 V reveló sorprendentemente fragmentos de B<sub>0</sub> específicos o casi específicos a pesar de su diferencia menor con respecto a C<sub>0</sub>.

La invención se define mediante las reivindicaciones y no mediante los siguientes ejemplos ilustrativos:

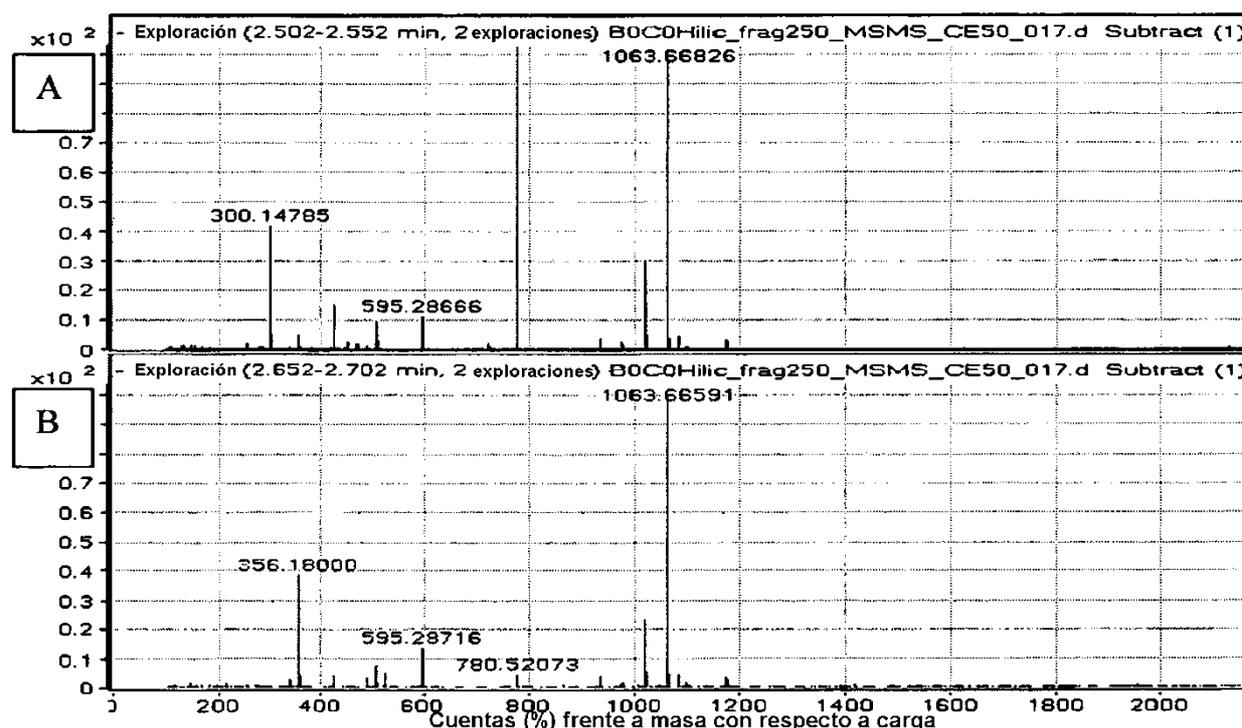
## Ejemplos

## Ejemplo I

5 En este experimento, se utilizó un sistema de HPLC Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) Agilent 6520. El sistema de HPLC Agilent 1200 consistía en una bomba binaria, un desgasificador, un inyector automático termostatzado y un compartimento de columna termostatzado (ajustado a 25°C). Se utilizó una columna de HILIC Supelco Ascentis Express de 15 cm x 4,6 mm, 2,7 µm. La fase móvil consistía en acetato de amonio al 15% v/v, 0,1% p/p, pH 4,5 y ACN al 85% v/v. La velocidad de flujo era de 1 ml/min. Los parámetros de la fuente de iones de EM eran los siguientes: Presión de nebulizador de 50 psig, flujo de gas de secado de 10 l/min, temp. del gas de secado de 350°C, voltaje de salida del capilar 250 V. Se realizó CL-EM/EM en el modo de ión negativo en el que se aislaron Pneumocandina B<sub>0</sub> o Pneumocandina C<sub>0</sub> desprotonada a *m/z* 1063 en el cuadrupolo (Q). Entonces se fragmentó el ión pseudo-molecular aislado en la célula de colisión a una energía de colisión de 50 V. Entonces se ajustó el analizador de TOF para explorar entre *m/z* 100-2200 (figuras 1A-15 B) o para monitorizar los iones seleccionados (figuras 2A-C).

La figura 1A muestra el espectro de masas de Pneumocandina B<sub>0</sub> (a partir de una muestra que contiene tanto Pneumocandina B<sub>0</sub> como Pneumocandina C<sub>0</sub>) en el que se encontró un fragmento específico a *m/z* 300. La figura 1B muestra el espectro de masas de Pneumocandina C<sub>0</sub> (a partir de una muestra que contiene tanto Pneumocandina B<sub>0</sub> como Pneumocandina C<sub>0</sub>) en el que se encontró un fragmento casi específico a *m/z* 356.

La figura 2A muestra que este sistema cromatográfico puede separar Pneumocandina B<sub>0</sub> de Pneumocandina C<sub>0</sub> en una muestra que contiene ambos isómeros. La figura 2B muestra el poder combinado de la separación cromatográfica y la detección por EM/EM del fragmento a *m/z* 300 que es específico para Pneumocandina B<sub>0</sub>. La figura 2C muestra el poder combinado de la separación cromatográfica y la detección por EM/EM del fragmento a *m/z* 356 que es casi específico para Pneumocandina C<sub>0</sub>.



30 Figura 1. Espectros de masas de un experimento de CL-EM/EM en una muestra que contiene tanto Pneumocandina B<sub>0</sub> como Pneumocandina C<sub>0</sub>. Se aisló Pneumocandina B<sub>0</sub> (A) o Pneumocandina C<sub>0</sub> (B) desprotonada a *m/z* 1063 en el cuadrupolo (Q). Entonces se fragmentó el ión pseudo-molecular aislado en la célula de colisión a una energía de colisión de 50 V. Se ajustó el analizador de TOF para explorar entre *m/z* 100-2200. (A) Espectro de masas de Pneumocandina B<sub>0</sub> en el que se encontró un fragmento específico a *m/z* 300. (B) Espectro de masas de  
35 Pneumocandina C<sub>0</sub> en el que se encontró un fragmento casi específico a *m/z* 356.

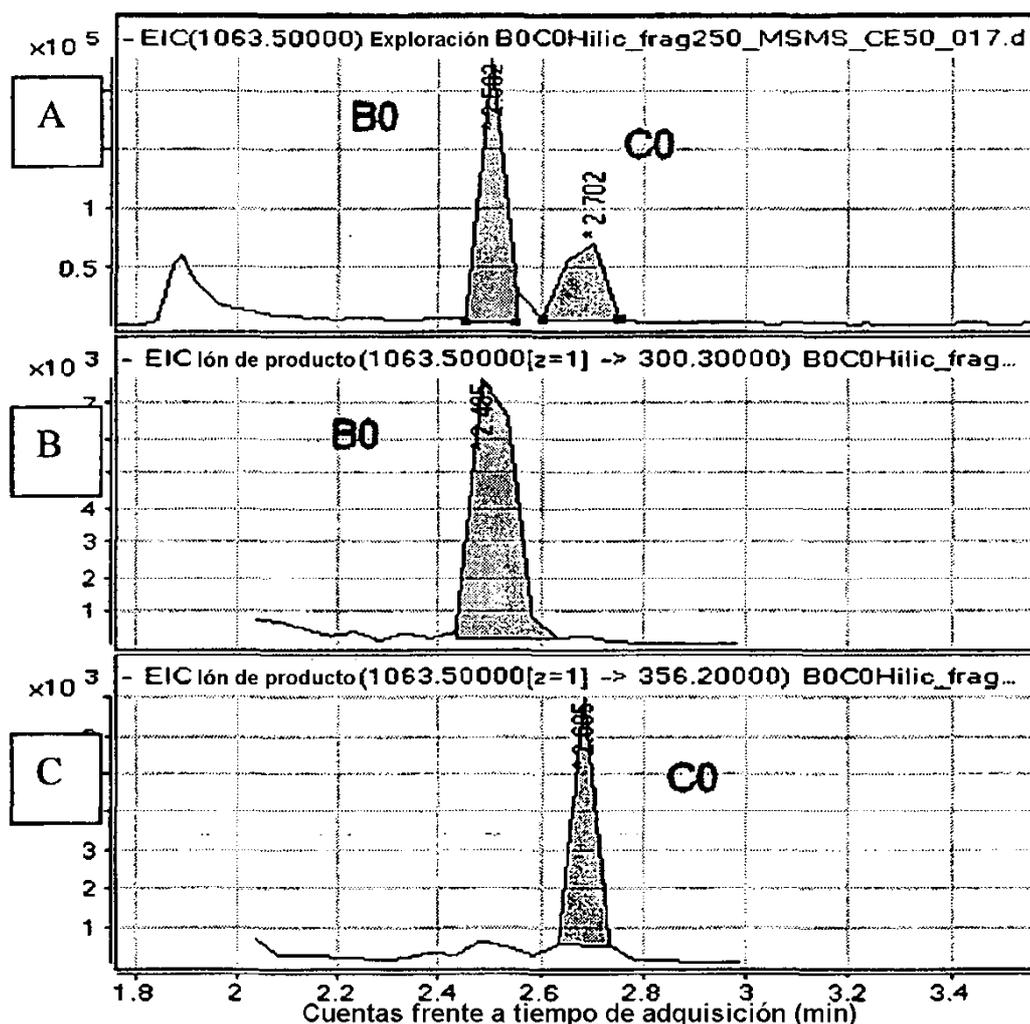


Figura 2. Cromatogramas de masas de un experimento de CL-EM/EM en una muestra que contiene tanto Pneumocandina B<sub>0</sub> como Pneumocandina C<sub>0</sub>. Se aisló Pneumocandina B<sub>0</sub> o Pneumocandina C<sub>0</sub> desprotonada a  $m/z$  1063 en el cuadrupolo (Q). Entonces se fragmentó el ión pseudo-molecular aislado en la célula de colisión a una energía de colisión de 50 V. Se ajustó el analizador de TOF para monitorizar iones seleccionados. (A) Separación cromatográfica de Pneumocandina B<sub>0</sub> de Pneumocandina C<sub>0</sub> en una muestra que contiene ambos isómeros. (B) El poder combinado de la separación cromatográfica y detección por EM/EM del fragmento a  $m/z$  300 que es específico para Pneumocandina B<sub>0</sub>. (C) El poder combinado de la separación cromatográfica y la detección por EM/EM del fragmento a  $m/z$  356 que es casi específico para Pneumocandina C<sub>0</sub>.

### Ejemplo II

En este experimento, se utilizó un sistema de HPLC Surveyor de Thermo Fisher acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica lineal LXQ de Thermo Fisher. El sistema de HPLC Surveyor consistía en una bomba cuaternaria, un desgasificador, un inyector automático termostatzado y un compartimento de columna termostatzado (ajustado a 40°C). Se utilizó una columna de HILIC Ascentis Si de Supelco de 15 cm x 2,1 mm, 5  $\mu$ m. La fase móvil consistía en acetato de amonio al 13% v/v, 0,1%, p/p pH 4,5 y ACN al 87% v/v. La velocidad de flujo era de 0,2 ml/min. Los parámetros de la fuente de iones de EM eran los siguientes: gas de impulsión 35 (unidades arbitrarias), gas auxiliar 15 (unidades arbitrarias), temperatura del capilar de 350°C, voltaje de pulverización de 5 kV. Se realizó CL-EM/EM en el modo de ión negativo en el que se aislaron Pneumocandina B<sub>0</sub> o Pneumocandina C<sub>0</sub> desprotonada (a  $m/z$  1063) y fragmentada (a una energía de colisión de 13) en la trampa iónica. Se ajustó la trampa iónica para explorar entre  $m/z$  290-1100 (figuras 3A-E) o para monitorizar iones seleccionados (figuras 4A-C).

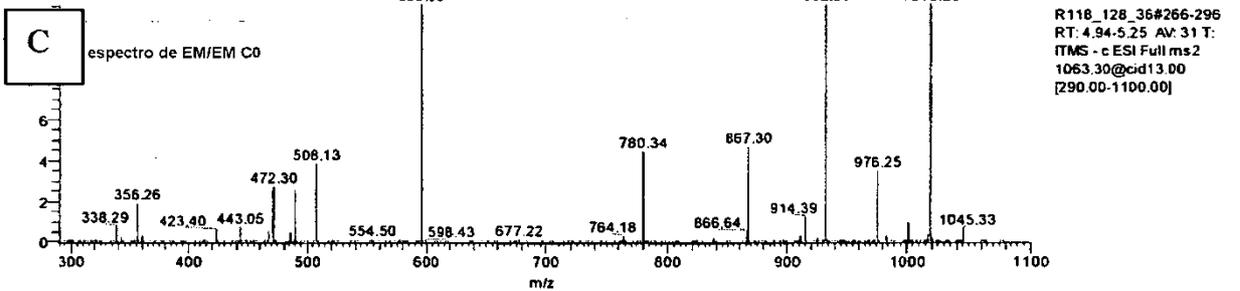
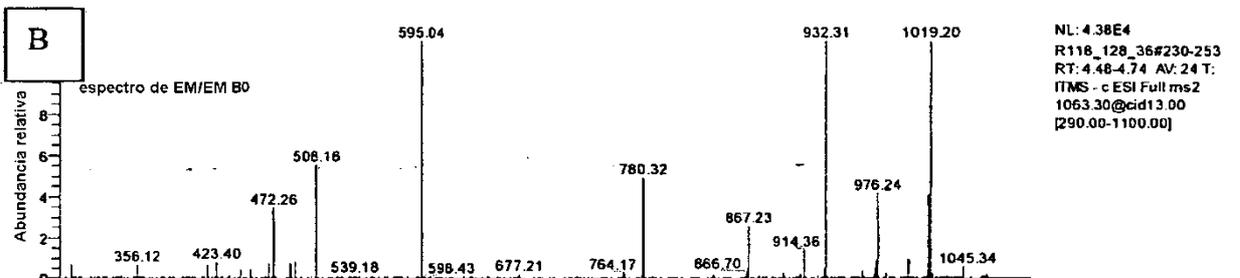
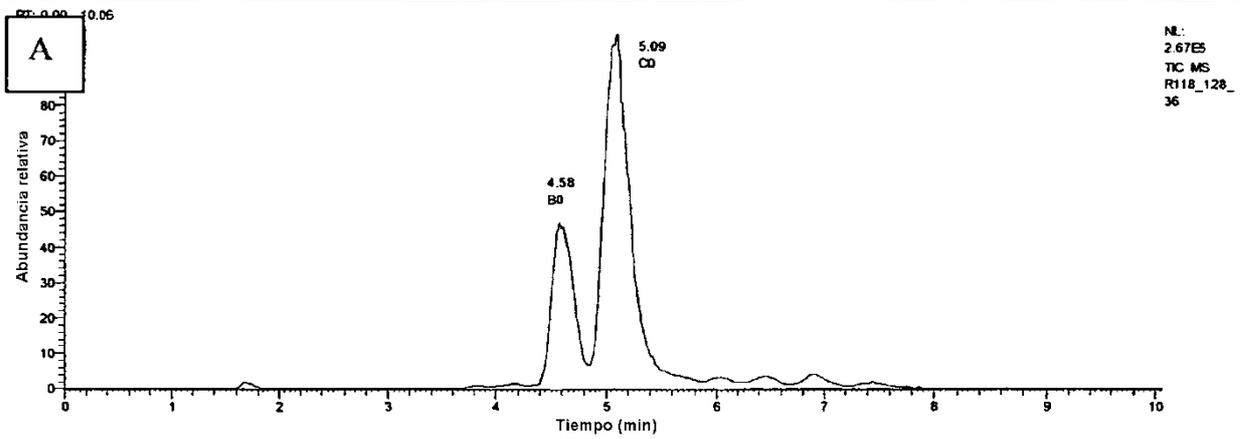
La figura 3A muestra que este sistema cromatográfico puede separar Pneumocandina B<sub>0</sub> de Pneumocandina C<sub>0</sub> en una muestra que contiene ambos isómeros. Las figuras 3B y 3D (ampliación de 3B) muestran el espectro de masas de Pneumocandina B<sub>0</sub> (extraído del experimento mostrado en la figura 3A) en el que se encontraron fragmentos específicos a  $m/z$  300, 416 y 452. Las figuras 3C y 3E (ampliación de 3C) muestran el espectro de masas de Pneumocandina C<sub>0</sub> (extraído del experimento mostrado en la figura 3A) en el que se encontraron fragmentos específicos a  $m/z$  338 y 360. La figura 4A muestra que este sistema cromatográfico puede separar Pneumocandina

B<sub>0</sub> de Pneumocandina C<sub>0</sub> en una muestra que contiene ambos isómeros. La figura 4B muestra el poder combinado de la separación cromatográfica y la detección por EM/EM del fragmento a *m/z* 300 que es específico para Pneumocandina B<sub>0</sub>. La figura 4C muestra el poder combinado de la separación cromatográfica y la detección por EM/EM del fragmento a *m/z* 338 que es específico para Pneumocandina C<sub>0</sub>.

5

C:\Xcalibur\...R118\_128\R118\_128\_36

1/13/2009 9:17:42 PM



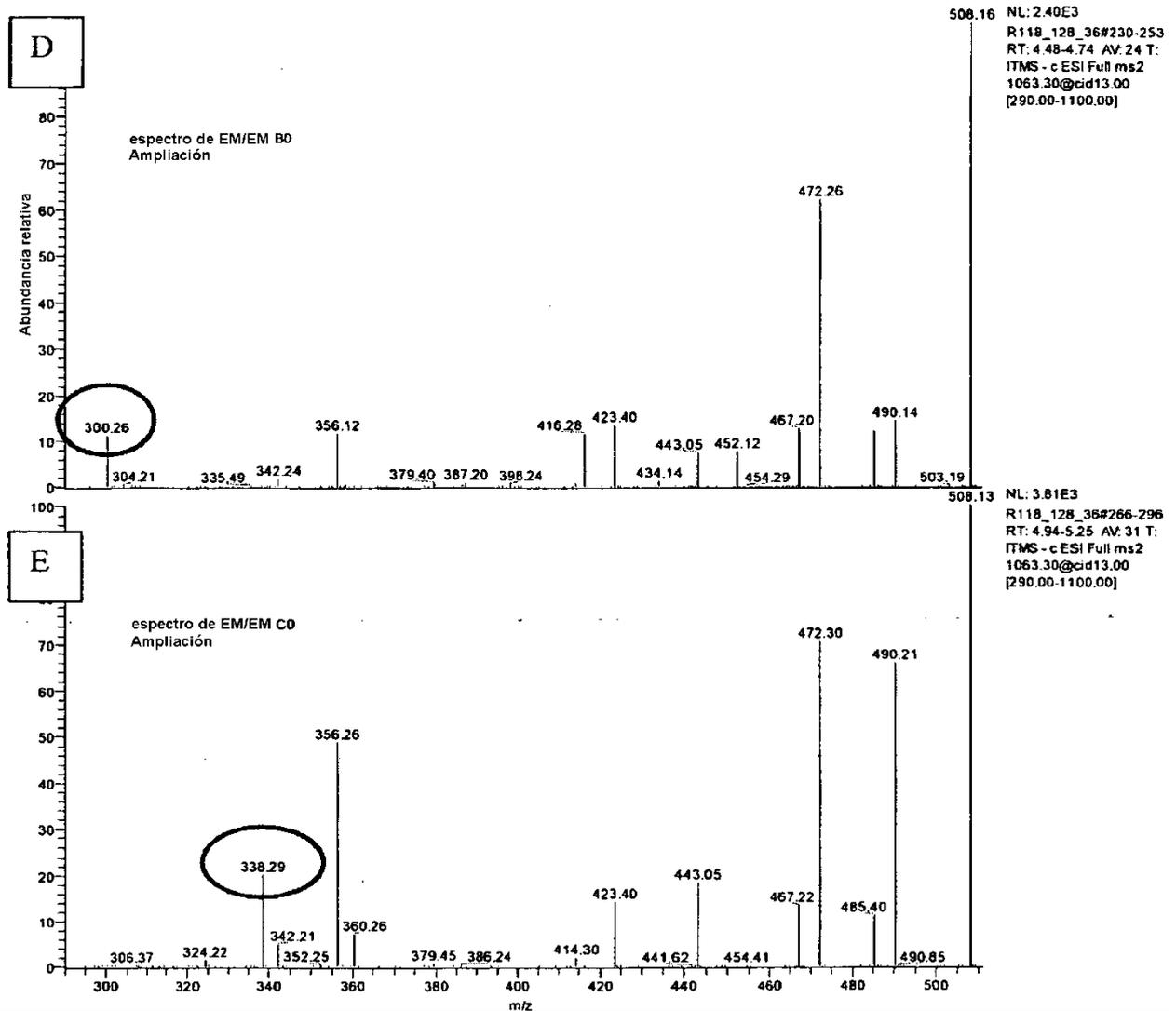
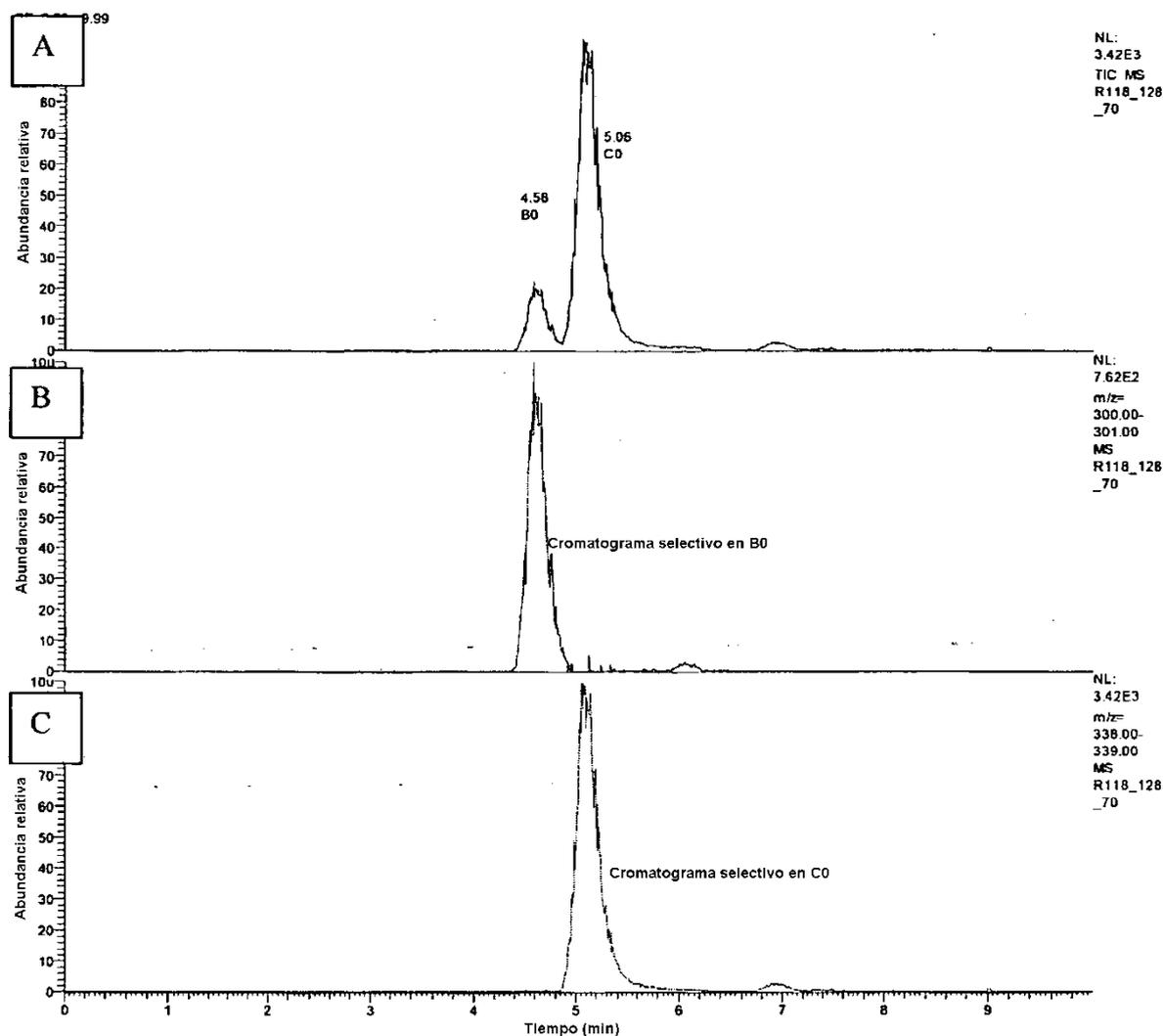


Figura 3. Cromatograma de TIC y espectros de masas de un experimento de CL-EM/EM en una muestra que contiene tanto Pneumocandina B<sub>0</sub> como Pneumocandina C<sub>0</sub>. Se aislaron Pneumocandina B<sub>0</sub> o Pneumocandina C<sub>0</sub> desprotonada (a  $m/z$  1063) y fragmentada (a una energía de colisión de 13) en la trampa iónica. Se ajustó la trampa iónica para explorar entre  $m/z$  290-1100. (A) Separación cromatográfica de Pneumocandina B<sub>0</sub> de Pneumocandina C<sub>0</sub> en una muestra que contiene ambos isómeros. (B) Espectro de masas de Pneumocandina B<sub>0</sub> en el que se encontraron fragmentos específicos a  $m/z$  300, 416 y 452. (C) Espectro de masas de Pneumocandina C<sub>0</sub> en el que se encontraron fragmentos específicos a  $m/z$  338 y 360. (D) Ampliación de 3B. (E) Ampliación de 3C.

5

10



5  
10  
15  
20  
25

Figura 4. Cromatogramas de masas de un experimento de CL-EM/EM en una muestra que contiene tanto Pneumocandina B<sub>0</sub> como Pneumocandina C<sub>0</sub>. Se aislaron Pneumocandina B<sub>0</sub> o Pneumocandina C<sub>0</sub> desprotonada (a  $m/z$  1063) y fragmentada (a una energía de colisión de 13) en la trampa iónica. Se ajustó la trampa iónica para monitorizar iones seleccionados. (A) Separación cromatográfica de Pneumocandina B<sub>0</sub> de Pneumocandina C<sub>0</sub> en una muestra que contiene ambos isómeros. (B) El poder combinado de la separación cromatográfica y la detección por EM/EM del fragmento a  $m/z$  300 que es específico para Pneumocandina B<sub>0</sub>. (C) El poder combinado de la separación cromatográfica y la detección por EM/EM del fragmento a  $m/z$  338 que es específico para Pneumocandina C<sub>0</sub>.

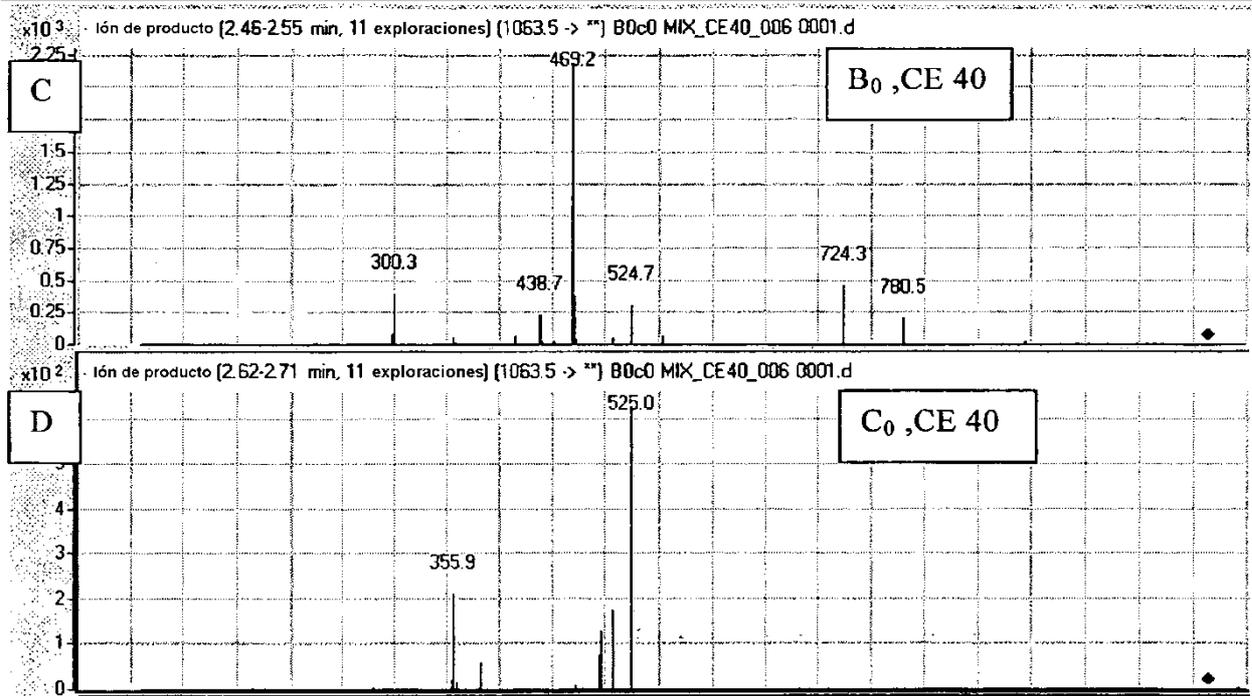
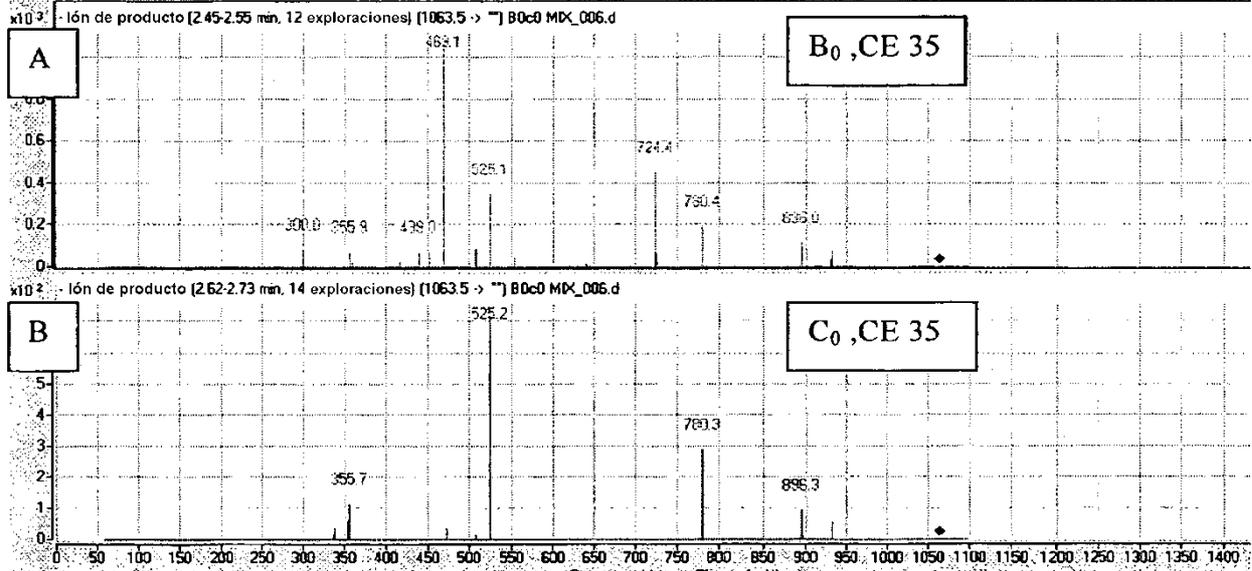
### Ejemplo III

15  
20  
25

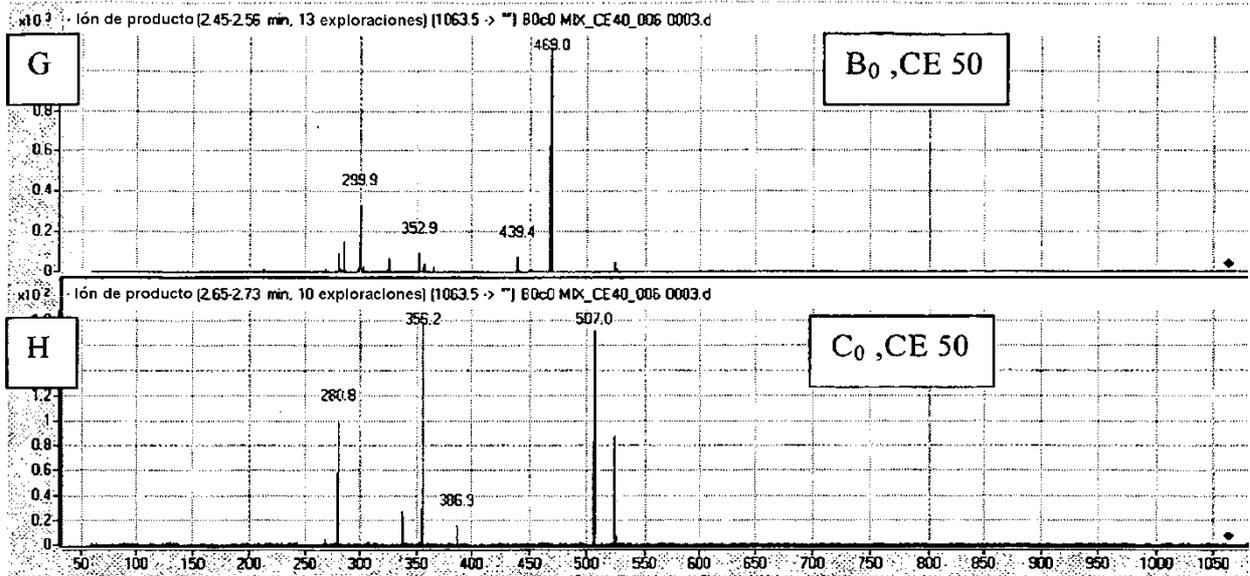
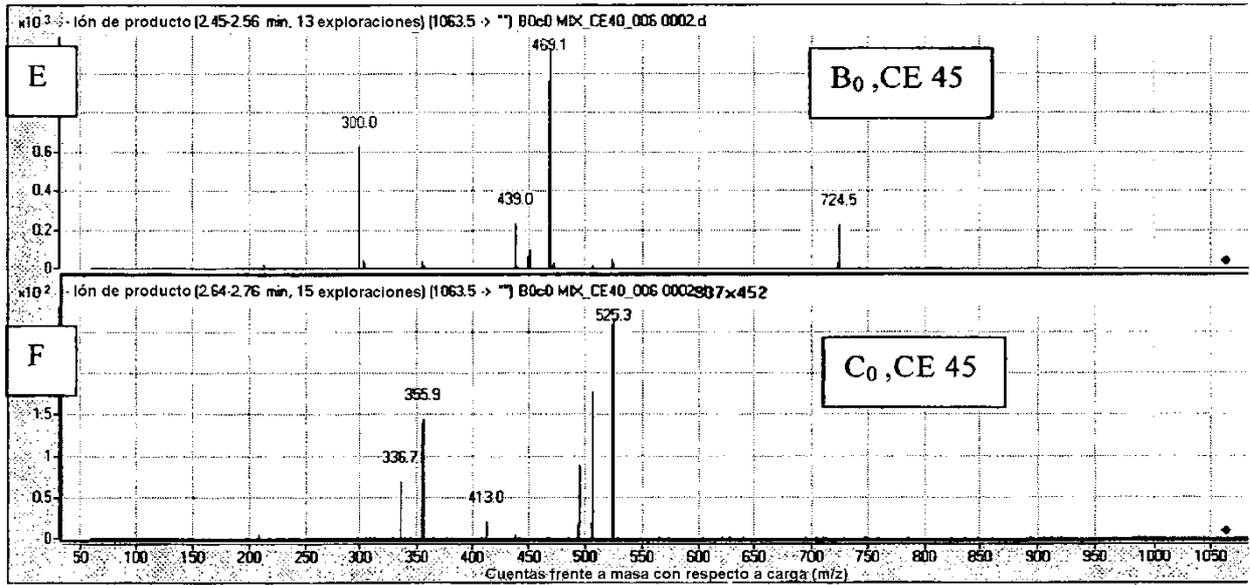
En este experimento, se utilizó un sistema de HPLC Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QQQ) Agilent 6410. El sistema de HPLC Agilent 1200 consistía en una bomba binaria, un desgasificador, un inyector automático termostatzado y un compartimento de columna termostatzado (ajustado a 25°C). Se utilizó una columna de HILIC Ascentis Express de Supelco de 15 cm x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m. La fase móvil consistía en acetato de amonio al 15% v/v, 0,1% p/p, pH 4,5 y ACN al 85% v/v. La velocidad de flujo era de 1 ml/min. Los parámetros de la fuente de iones de EM eran los siguientes: presión de nebulizador de 50 psig, flujo de gas de secado de 10 l/min, temp. del gas de secado de 325°C, voltaje de salida del capilar de 4000 V. Se realizó CL-EM/EM en el modo de ión negativo en el que se aislaron Pneumocandina B<sub>0</sub> o Pneumocandina C<sub>0</sub> desprotonada a  $m/z$  1063 en el primer cuadrupolo (Q). Entonces se fragmentó el ión pseudo-molecular aislado en el segundo cuadrupolo/célula de colisión (Q) a una energía de colisión de 35-60 V. Entonces se ajustó el tercer cuadrupolo (Q) para explorar entre  $m/z$  60-1100.

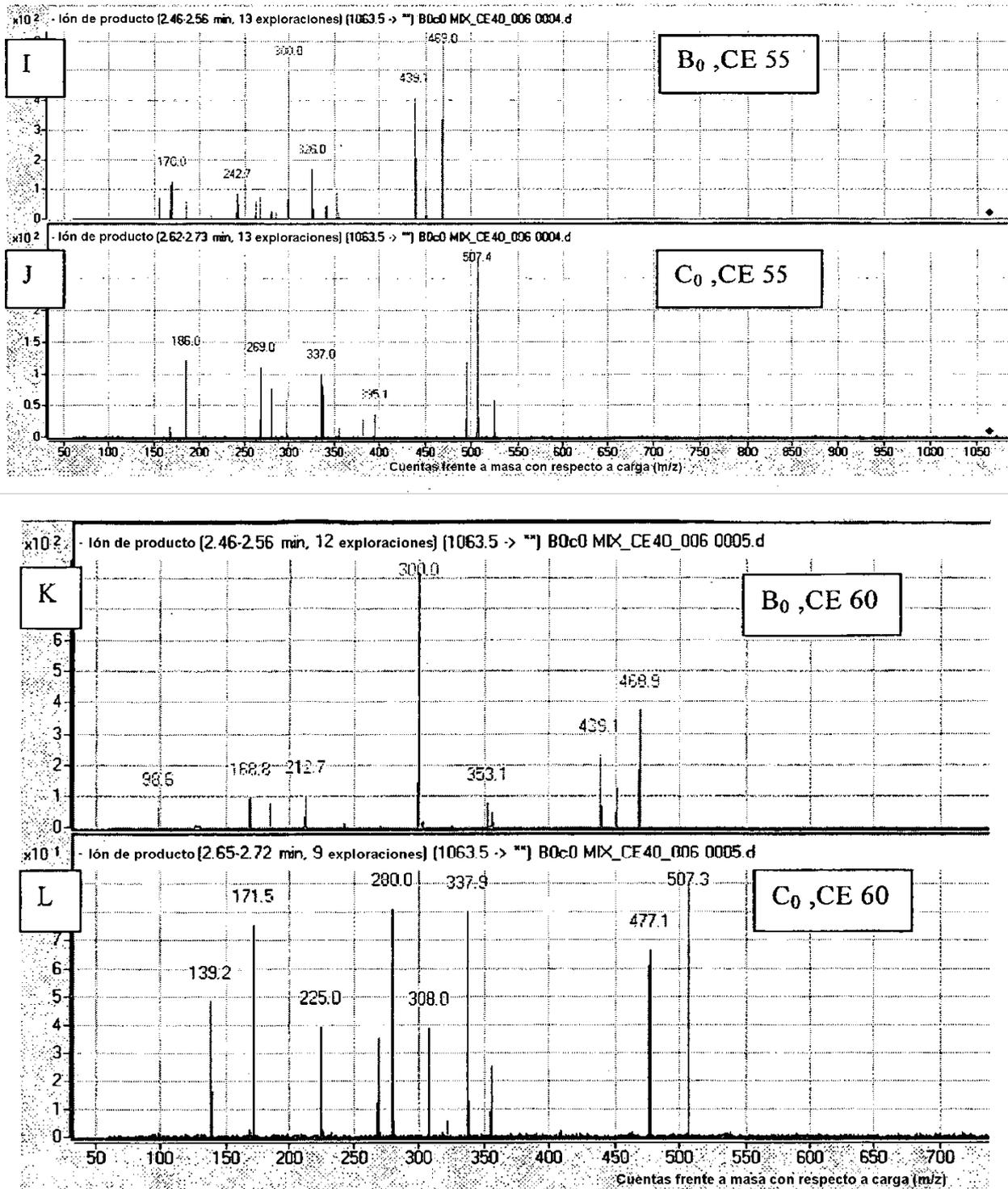
Las figuras 5A-L muestran los espectros de masas correspondientes de Pneumocandina B<sub>0</sub> y Pneumocandina C<sub>0</sub> (a partir de una muestra que contiene tanto Pneumocandina B<sub>0</sub> como Pneumocandina C<sub>0</sub>) a energías de colisión de 35-60 V. Estas figuras muestran que en cada energía de colisión, pueden encontrarse fragmentos específicos para

5 Pneumocandina B<sub>0</sub> y Pneumocandina C<sub>0</sub>. Algunos de estos fragmentos específicos aparecen a lo largo de un amplio intervalo de energías de colisión, mientras que otros están restringidos a un intervalo más pequeño. Algunos ejemplos de fragmentos específicos para Pneumocandina B<sub>0</sub> son *m/z* 300, 439 y 469 a energías de colisión de 35-60 V, *m/z* 724 a energías de colisión de 35-45 V y *m/z* 326 a una energía de colisión de 55 V. Algunos ejemplos de fragmentos específicos para Pneumocandina C<sub>0</sub> son *m/z* 507 a energías de colisión de 45-60 V y *m/z* 139, 280 y 338 a una energía de colisión de 60 V.



10





5 Figura 5. Espectros de masas de un experimento de CL-EM/EM en una muestra que contiene tanto Pneumocandina  $B_0$  como Pneumocandina  $C_0$ . Se aislaron Pneumocandina  $B_0$  (A, C, E, G, I y K) o Pneumocandina  $C_0$  (B, D, F, H, J y L) desprotonada a  $m/z$  1063 en el primer cuadrupolo (Q). Entonces se fragmentó el ión pseudo-molecular aislado en el segundo cuadrupolo (Q) a una energía de colisión de 35 V (A y B), 40 V (C y D), 45 V (E y F), 50 V (G y H), 55 (I y J) y 60 V (K y L). Entonces se ajustó el tercer cuadrupolo (Q) para explorar entre  $m/z$  60-1100. En cada energía de colisión, pueden encontrarse fragmentos específicos para Pneumocandina  $B_0$  y Pneumocandina  $C_0$ . Algunos de estos fragmentos específicos aparecen a lo largo de un amplio intervalo de energías de colisión, mientras que otros están restringidos a un intervalo más pequeño. Véase el texto para más detalles.

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de detección de Pneumocandina B<sub>0</sub> y/o Pneumocandina C<sub>0</sub> en una muestra, en el que se detecta(n) un fragmento específico de Pneumocandina B<sub>0</sub> y/o un fragmento específico de Pneumocandina C<sub>0</sub> utilizando espectrometría de masas en tándem en modo negativo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fragmento específico para Pneumocandina B<sub>0</sub> está a aproximadamente *m/z* 300, 439 o 469.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la energía de colisión es de aproximadamente 35-60 V.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fragmento específico para Pneumocandina B<sub>0</sub> está a aproximadamente *m/z* 724.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la energía de colisión es de aproximadamente 35-45 V.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fragmento específico para Pneumocandina B<sub>0</sub> está a aproximadamente *m/z* 326.
- 20 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la energía de colisión es de aproximadamente 55 V.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fragmento específico para Pneumocandina C<sub>0</sub> está a aproximadamente *m/z* 507 a una energía de colisión de aproximadamente 45-60 V.
- 25 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fragmento específico para Pneumocandina C<sub>0</sub> está a aproximadamente *m/z* 139, 280 o 338.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la energía de colisión es de aproximadamente 60 V.
- 30 11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fragmento específico para Pneumocandina B<sub>0</sub> está a aproximadamente *m/z* 300, 416 o 452.
- 35 12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fragmento específico para Pneumocandina C<sub>0</sub> está a aproximadamente *m/z* 338 o 360.