

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-95-105>  
УДК 615.074



Оригинальная статья / Research article

## Двойной протеолиз для определения N- и O-гликозилирования Fc-гибридного белка этанерцепта методом пептидного картирования

В. Г. Варзиева<sup>1</sup>✉, Н. В. Месонжник<sup>1,2</sup>✉✉, А. О. Белушенко<sup>1</sup>, Н. Л. Бочкарева<sup>1</sup>, С. А. Апполонова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<sup>2</sup> Научный центр мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ Контактное лицо: Варзиева Валерия Георгиевна. E-mail: varzieva.valeria@gmail.com

✉ Контактное лицо: Месонжник Наталья Владимировна. E-mail: natalia.mesonzhnik@labworks.ru

ORCID: В. Г. Варзиева – <https://orcid.org/0000-0002-9067-8717>; Н. В. Месонжник – <https://orcid.org/0000-0001-8860-5853>; А. О. Белушенко – <https://orcid.org/0000-0003-4656-7187>; Н. Л. Бочкарева – <https://orcid.org/0000-0001-8080-1665>; С. А. Апполонова – <https://orcid.org/0000-0002-9032-1558>.

Статья поступила: 11.10.2022

Статья принята в печать: 25.01.2023

Статья опубликована: 24.02.2023

### Резюме

**Введение.** Современные биотехнологические препараты представлены преимущественно высокогликозилированными белками. Подавляющее большинство таких препаратов, выпускаемых отечественными биофармацевтическими компаниями, являются биоаналогами зарубежных препаратов. Основа разработки таких препаратов – аналитические исследования, направленные на подтверждение эквивалентности структур биоаналога и эталона. Наибольшую аналитическую сложность представляют Fc-слитые препараты, сочетающие в себе свойства эффекторных белков и кристаллизующегося фрагмента IgG1. Единственным биоаналогом такого вида, зарегистрированным в России, является этанерцепт, который был выбран в качестве объекта исследования. Существующие классические подходы не позволяют точно и достоверно определять гликановый профиль таких препаратов. Разработка подходов и принципов таких исследований необходима, так как изменение структуры биоаналога в процессе производства может оказать большое влияние на его эффективность и безопасность.

**Цель.** Разработка подходов двойного протеолиза, позволяющих провести гликопептидное картирование Fc-слитого белка этанерцепта с использованием протеазы Arg-C.

**Материалы и методы.** Этанерцепт подвергался энзиматическому гидролизу с применением комбинаций трипсина с одной из двух протеаз (Arg-C или Asp-N). Образующиеся пептиды идентифицировались методом ВЭЖХ-МС/МСВР. Подтверждение структуры гликанов осуществлялось по фрагментным спектрам гликопептидов, полученным в режиме повышенной энергии столкновений (MS<sup>E</sup>).

**Результаты и обсуждение.** Использование комбинации трипсина с Arg-C приводило к надежным результатам. Разработанный подход позволил определить большинство участков O-гликозилирования и установить типы O-гликанов этанерцепта. Показано, что для эффективного O-гликопептидного картирования необходима стадия N-дегликозилирования. N-гликопептидным картированием были идентифицированы основные формы N-гликанов каждого из трех участков N-гликозилирования (N149, N171, N317). Установлено, что применение комбинации трипсина с Arg-C позволяет идентифицировать трехантенные формы, несмотря на наличие в образующемся пептиде участка O-гликозилирования. Общий профиль N-гликозилирования, выраженный как процент от суммарного отклика всех идентифицированных гликоформ, показывает сопоставимость результатов при использовании разработанного подхода.

**Заключение.** В результате проведенного исследования нами были разработаны подходы гликопептидного картирования, включающие использование комбинации протеаз, которые позволяют надежно и воспроизводимо определять локализацию участков и формы N- и O-гликозилирования этанерцепта. Разработанные подходы могут использоваться для проведения исследований сопоставимости биоподобных лекарственных средств, оценки качества при изменении технологии производства лекарственных препаратов (ЛП), при разработке новых биотехнологических ЛП.

**Ключевые слова:** пептидное картирование, биоаналоги, моноклональные антитела, Fc-слитые белки, трипсин, Arg-C, Asp-N

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** В. Г. Варзиева, Н. В. Месонжник, А. О. Белушенко придумали, разработали и выполнили эксперимент. Все авторы провели обработку полученных данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 075-15-2022-304.

**Для цитирования:** Варзиева В. Г., Месонжник Н. В., Белушенко А. О., Бочкарева Н. Л., Апполонова С. А. Двойной протеолиз для определения N- и O-гликозилирования Fc-гибридного белка этанерцепта методом пептидного картирования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):95–105. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-95-105>

## Double Proteolysis for N- and O-glycan Analysis of Fc-fusion Protein Etanercept

Valeria G. Varzieva<sup>1</sup>✉, Natalia V. Mesonzhnik<sup>1,2</sup>✉✉, Anton O. Belushenko<sup>1</sup>,  
Natalia L. Bochkareva<sup>1</sup>, Svetlana A. Appolonova<sup>1</sup>

© Варзиева В. Г., Месонжник Н. В., Белушенко А. О., Бочкарева Н. Л., Апполонова С. А., 2023

© Varzieva V. G., Mesonzhnik N. V., Belushenko A. O., Bochkareva N. L., Appolonova S. A., 2023

<sup>1</sup> I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

<sup>2</sup> World-Class Research Center «Digital Biodesign and Personalized Healthcare», I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Valeria G. Varzieva. **E-mail:** varzieva.valeria@gmail.com

✉ **Corresponding author:** Natalia V. Mesonzhnik. **E-mail:** natalia.mesonzhnik@labworks.ru

**ORCID:** Valeria G. Varzieva – <https://orcid.org/0000-0002-9067-8717>; Natalia V. Mesonzhnik – <https://orcid.org/0000-0001-8860-5853>;

Anton O. Belushenko – <https://orcid.org/0000-0003-4656-7187>; Natalia L. Bochkareva – <https://orcid.org/0000-0001-8080-1665>;

Svetlana A. Appolonova – <https://orcid.org/0000-0002-9032-1558>.

**Received:** 11.10.2022

**Revised:** 25.01.2023

**Published:** 24.02.2023

## Abstract

**Introduction.** Highly glycosylated proteins are the most abundant class of modern biopharmaceuticals. A majority of such therapeutics produced by Russian biopharmaceutical companies is biosimilars. The foundation of biosimilar manufacturing is analytical assessment of structure equivalence to an original molecule. Fc-fusions present a challenge due to their structural properties. The only biosimilar of this kind registered in Russia is etanercept – a fusion of tumor necrosis factor receptor  $\alpha$  and Fc-fragment of IgG1. Existing approaches widely used in protein analysis do not allow accurate and reliable description of glycoylation of these proteins. Development of new approaches and principles of such analysis is necessary, as the changes in biosimilar's molecular structure can seriously affect its efficacy and safety.

**Aim.** Development of double proteolysis approaches for glycopeptide mapping of Fc-fusion protein etanercept using Arg-C protease.

**Materials and methods.** Etanercept was subjected to enzymatic hydrolysis using trypsin in combination with Arg-C or Asp-N. The resulting peptides were analyzed using HPLC-MS system Xevo G2-XS QTOF (Waters Corporation, USA). The conformation of glycan structure was performed via analysis of fragment spectra of glycopeptides, acquired with high collision energy mode (MS<sup>2</sup>). UNIFI (version 1.8) with biopharmaceutical assessment setting (Waters Corporation, USA) was used to analyze the peptide maps.

**Results and discussion.** It was found that using the combination of trypsin with protease Arg-C leads to reliable results. Using the developed approach we successfully determined the majority of O-glycosylation sites and types of O-glycans. It was shown that for an effective O-glycopeptide mapping N-deglycosylation stage is required. Most abundant N-glycan structures were identified for each of three N-glycosylation sites (N149, N171, N317). It was determined, that the combination of trypsin with Arg-C allows identification of three-antenna forms despite the presence of O-glycosylation site on the analyzed peptide. General N-glycosylation profile shows comparability of results for both approaches.

**Conclusion.** As a result of this research we developed glycopeptide mapping approaches in which a combination of proteases is used. Using these methods sites of N- and O-glycosylation and glycoforms of etanercept were accurately and reproducibly determined. Developed procedures can be applied to other types of Fc-fusion proteins, making it of broader appeal and benefit to the overall biopharmaceutical industry. These approaches provide comprehensive information useful for structure-function studies and of potential value for product comparability measurements and possibly even future manufacturing control strategies.

**Keywords:** peptide mapping, mass-spectrometry, glycosylation, fusion proteins, etanercept, Asp-N, Arg-C

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Valeria G. Varzieva, Natalia V. Mesonzhnik and Anton O. Belushenko conceived, designed and performed the experiments. All authors compiled and analyzed data. All authors reviewed the manuscript and contributed in writing.

**Funding.** The work was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of a World-Class Research Centers "Digital Biodesign and Personalized Healthcare" № 075-15-2022-304.

**For citation:** Varzieva V. G., Mesonzhnik N. V., Belushenko A. O., Bochkareva N. L., Appolonova S. A. Double proteolysis for N- and O-glycan analysis of Fc-fusion protein etanercept. *Drug development & registration*. 2023;12(1):95–105. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-95-105>

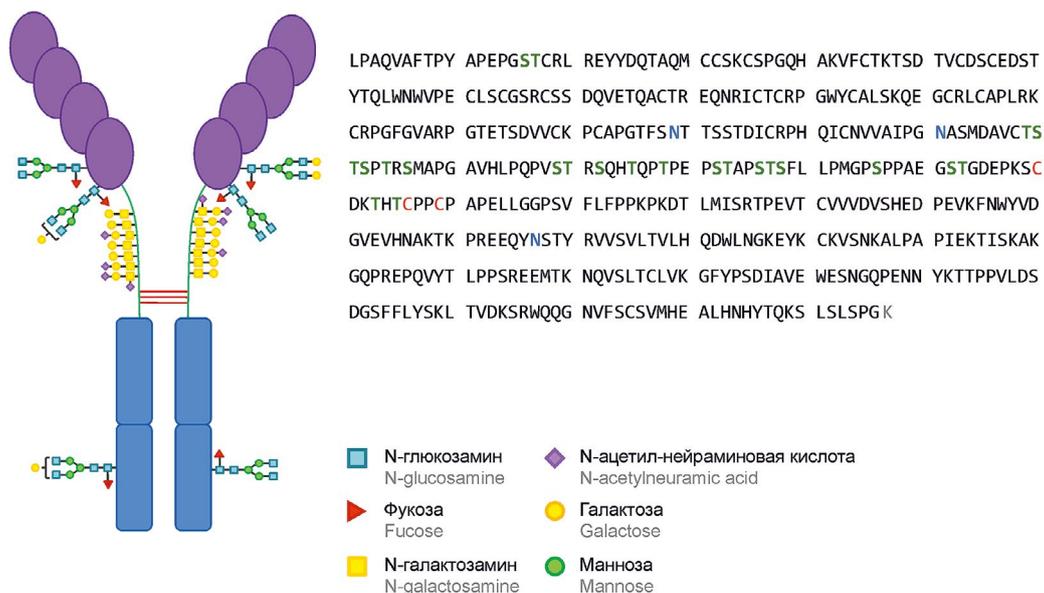
## ВВЕДЕНИЕ

Разработка лекарственных препаратов (ЛП) – терапевтических белков на основе моноклональных антител (МАТ) представляет собой одно из наиболее перспективных направлений фармацевтической промышленности, что обусловлено высокими показателями их клинической эффективности и специфичности при лечении ряда заболеваний. На современном российском фармацевтическом рынке главной является тенденция к регистрации не оригинальных препаратов, а биоаналогов – более дешевых копий популярных зарубежных ЛП [1]. Современные препараты, имеющие в основе своей

структуры IgG1, включают моноклональные антитела, биспецифичные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, токсин иммуно-конъюгаты и Fc-слитые белки<sup>1</sup>.

В связи с особенностями воспроизводства таких белков в клетках-продуцентах, для их структуры характерно множество пост-трансляционных модификаций (ПТМ), которые возникают естественным об-

<sup>1</sup> Cruz E., Kayser V. Major Classes of Biotherapeutics. In: Ramzan I., editor. *Biologics, Biosimilars, and Biobetters: An Introduction for Pharmacists, Physicians, and Other Health Practitioners* [Internet]. New York: Wiley; 2020. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/9781119564690.ch4>. Accessed: 17.11.2022.



**Рисунок 1.** Первичная последовательность и дисульфидные связи этанерцепта.

**Примечание.** В первичной последовательности участки N-гликозилирования обозначены синим цветом; участки O-гликозилирования обозначены зеленым цветом; в наиболее распространенной протеоформе отсутствует C-концевой остаток лизина (выделено серым цветом); цистеины области межмолекулярных дисульфидных связей выделены красным цветом

**Figure 1.** Etanercept primary sequence and disulfide bonds.

**Note.** In the primary sequence, N-glycosylation sites are shown in blue; O-glycosylation sites are shown in green; the most common proteoform lacks a C-terminal lysine residue (highlighted in grey); cysteine regions of intermolecular disulfide bonds are highlighted in red

разом<sup>1</sup>. В то же время, они подвержены химическим изменениям в процессе производства и хранения готового ЛП [2]. К таким модификациям относятся окисление, дезамидирование, терминальные варианты аминокислотной последовательности, гликозилирование и др. [3, 4]. Все они могут оказывать сильное влияние на безопасность и эффективность ЛП [5, 6], и, следовательно, должны быть тщательно изучены и описаны.

Большое количество ПТМ является главной причиной того, что основой регистрации биоаналогов служат аналитические исследования, подразумевающие максимально полную характеристику структуры препарата-кандидата в сравнении с оригинальным ЛП.

В связи с этим, особый интерес представляют Fc-слитые белки, структура которых состоит из эффекторного домена, чаще всего представленного эпитопным участком регуляторного белка, и Fc-фрагмента иммуноглобулина G1 [7]. Такое строение терапевтической молекулы обеспечивает высокую специфичность действия и продленный, в сравнении с молекулой эффекторного белка, период полувыведения. Главной особенностью таких ЛП является нали-

чие множественных участков гликозилирования. Изменения в профиле гликозилирования существенно влияют на фармакокинетические параметры и вероятность развития побочных реакций [8].

Вследствие высокой гетерогенности структуры слитых белков, описание особенностей их молекулярного строения требует разработки подходов, специфичных к конкретному белку.

Этанерцепт (Энбрел, Pfizer, Inc.) представляет собой белок, состоящий из двух молекул внеклеточной лиганд-связывающей части рецептора фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), каждая из которых сшита с кристаллизующимся фрагментом IgG1 человека (рисунок 1). Рецепторная часть молекулы инактивирует TNF $\alpha$ , препятствуя развитию вызванного этим цитокином воспалительного процесса. Наличие в структуре этанерцепта Fc-фрагмента IgG1 значительно удлиняет его период полувыведения из организма. Область Fc содержит шарнирный участок, связующий константные регионы IgG1 – домены CH2 и CH3, домен CH1 отсутствует [9, 10].

В связи с особенностями производства этанерцепта в клеточных линиях китайского хомячка, конечный продукт представляет собой высокогликозилированный белок. Теоретические участки гликозилирования (рисунок 1) включают: 2 участка N-гликозилирования и 18 участков O-гликозилирования в TNFR-домене, 1 участок N-гликозилирования в Fc-домене. Многообразие числа и видов гликанов опреде-

<sup>1</sup> Colley K. J., Varki A., Haltiwanger R. S., Kinoshita T. Cellular Organization of Glycosylation. In: Essentials of Glycobiology 4th edition [Internet]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579926/> Accessed: 17.11.2022.

ляет макро- и микрогетерогенность структуры этанерцепта [11, 12].

Исследования, направленные на описание гликанового профиля Fc-слитых белков чаще всего проводятся методом пептидного картирования на платформе высокоэффективной жидкостной хроматографии тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) [13–17]. Преимуществом данного метода является возможность характеристики сразу нескольких ПТМ за один анализ [18].

Характеризация гликозилирования с помощью пептидного картирования подразумевает расщепление белка на пептиды перед инструментальным анализом. Для большинства ЛП мАТ, которые содержат консенсусный участок гликозилирования в Fc-регионе, достаточным условием является применение классической протеазы трипсин, расщепляющей аминокислотные связи по а.к. аргинин и лизин в тех случаях, когда за ними не следует пролин. Обильное содержание этой аминокислоты в TNFR-регионе ограничивает возможность эффективного расщепления трипсином на участке R122–R185 последовательности этанерцепта [17]. В результате образуются высокомолекулярные пептиды, содержащие несколько участков гликозилирования.

Для получения меньших по длине и сложности пептидов прибегают к двойному протеолизу. Такой подход включает использование, помимо трипсина, других протеаз, усиливающих разрывы по характерным для трипсина связям или же имеющих комплементарность к другим остаткам аминокислот. Наиболее популярными протеазами являются Asp-N, имеющая дополнительную специфичность к аспарагиновой кислоте [19, 20], Lys-C, гидролизующая C-концевые связи с лизином [21] и Glu-C, специфичная к глутаминовой кислоте [22].

В данном исследовании, в качестве альтернативы предложена эндопротеаза Arg-C, гидролизующая аминокислотные связи по C-терминальному участку а.к. аргинин без ограничения по пролину [23]. Для установления ее эффективности, результаты гликопептидного картирования сравнивали с комбинацией трипсина с Asp-N.

**Цель исследования:** разработка подходов двойного протеолиза, позволяющих провести гликопептидное картирование Fc-слитого белка этанерцепта с использованием протеазы Arg-C.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые образцы биологических препаратов перед анализом вынимали из морозильной камеры и размораживали в естественных условиях до температуры окружающей среды.

**Подготовка проб.** Этанерцепт (Энбрел лиофилизат для приготовления раствора, для подкожного введения 50 мг, срок годности до 02.2023 года, Pfizer, Inc., США) очищали с использованием ультрамембранных фильтров Amicon Ultra 0,5 мл – 30 кДа (Merck Millipore, Германия). Аликвоту ретентанта, содержащую 20 мкг белка в среде 25 мМ ТРИС-буфера (pH 7.5)/0.1 %

Rapigest (Waters Corporation, США) термостатировали 15 мин при 80 °С. Дисульфидные связи восстанавливали дитиотреитолом (чистота ≥98 %, Sigma-Aldrich, США) (5 мМ в растворе) в течение 20 мин при 60 °С. Алкилирование проводили с использованием йодацетамида (чистота ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, США) (15 мМ в растворе), 45 мин в темноте.

Для O-гликопептидного картирования предварительно проводили N-дегликозилирование образца гликозидазой F (PNGase F, 10 000 ед/мл, чистота ≥95 %, Promega, США). Аликвоту, содержащую 20 мкг белка, обрабатывали 2 мкл PNGase F (20 мкг белка: 1 мкл PNGase F) 4 часа при 37 °С. N-дегликозилированный белок очищали с использованием ультрамембранных фильтров Amicon Ultra 0,5 мл – 30 кД.

Протеолиз с использованием трипсина (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США) проводили в среде 50 мМ бикарбоната аммония (pH 7.8) при соотношении фермент: субстрат 1:20 (w/w), в течение 4 часов при 37 °С. После трипсинолиза дополнительно проводили второе ферментативное расщепление с использованием Arg-C (Arg-C, Seq. Grade, Promega, США) или Asp-N (Asp-N, Seq. Grade, Roche, Германия).

Для Arg-C протеолиза предварительно в реакционную смесь добавляли ДТТ до концентрации восстанавливающего реагента – 5 мМ. Гидролиз проводили в течение 4 часов при 37 °С. Соотношение фермент: субстрат составляло 1:20 (w/w).

Протеолиз Asp-N проводили при соотношении фермент: субстрат 1:20 (w/w), в течение 16 часов, 37 °С.

Ферментативные реакции терминировали закислением pH среды, центрифугировали и переносили надосадочную жидкость в виалы для инструментального анализа.

**Основное оборудование.** Хроматограф жидкостной Waters Acquity UPLC с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором Xevo G2-XS QToF (Waters Corporation, США).

Программно-аппаратный комплекс сбора и обработки результатов MassLynx Software версии 4.1 (Waters Corporation, США).

Данные обрабатывались с помощью ПО UNIFI (версия 1.8) с опцией для биофармацевтических исследований (Waters Corporation, США) в автоматическом и ручном режиме. Аннотация модифицированных пептидов осуществлялась по диагностическим B- и Y-ионам гликанов, а.к. последовательность подтверждалась по соотношению сиквенс-специфичных b- и y-ионов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ O-гликопептидов этанерцепта

Для уменьшения сложности образцов предварительно гидролизу трипсин/Arg-C было проведено удаление N-гликанов с помощью эндогликозидазы PNGase F.

Фрагментные масс-спектры в MS<sup>E</sup>-режиме образованы диссоциацией активированной соударениями с инертным газом, что позволяет идентифицировать принадлежность пептида к гликозилированному виду по присутствию специфичных фрагментов остатков сахаров, оксоний-ионов [24, 25]. Как показано на рисунке 2 и в таблице 1 после ВЭЖХ-МС/ВР анализа исследуемого гидролизата было обнаружено 4 вида O-гликозилированных пептидов, три из которых локализованы в связующем регионе (T18, T19, T22) и один в области эффекторного домена этанерцепта (T1). Спектры MS<sup>E</sup> обнаруженных гликопептидов исследовались вручную для подтверждения постулируемых структур.

Идентифицированные виды гликопептидов этанерцепта содержат O-гликаны с ядром типа 1 (C1) состава H1N1-Ser/Thr, удлинённого одной или двумя остатками сиаловой кислоты (рисунок 2). Пептиды LPAQVAFIPYAPPEPGSTCR (T1), SMAPGAVHLPQPVSTR (T19) и THICPPCPAPELLGGPSVFLFPPK (T245) являются продуктами разрыва по специфичным трипсину связями, были идентифицированы ранее в комбинированных гидролизатах [17, 20]. O-гликопептид T1 имеет три потенциальных участка гликозилирования, которые представлены O-гликановыми формами N1H1S1 и N1H1S2 в положении T8 [26]. Пептид T19 имеет три потенциальных участка. Два участка гликозилированы в положениях S186, S199, S200 [17] структурами

N1H1S1, N1/N1H1S1, N1H1/N1H1S1 и N1H1S1/N1H1S1. Гликопептиды T22 шарнирного региона представлены видами N1H1S1 и N1H1S2, которые располагаются на единственном участке T245. Согласно предыдущим исследованиям O-гликозилирование шарнирной области не было описано для IgG1, в то время как для Fc-слитых белков сообщалось о присутствии нескольких модифицированных участков [15–17, 20].

Пептиды T18 являются продуктами Arg-C-расщепления и гликозилированы формами N1H1S1 и N1H1S2. В исследовании [17] были идентифицированы три формы триптического пептида C(121)–R(185), содержащие единственное ядро C1 после десиалирования образцов. Вследствие высокой молекулярной массы исследуемого пептида, а также наличия множества остатков пролина достоверно установить участок O-гликозилирования в исследовании [17] не удалось.

В ферментативном гидролизате Arg-C пептид T18 представлен в свободном и гликозилированном видах. На рисунке 3 представлены комбинированные MS<sup>E</sup>-фрагментные спектры деконволюции пептида T18 (А) и его гликозилированного варианта (Б). Серии b- и y-ионов обоих фрагментных спектров подтверждают аминокислотную последовательность T18. Как показано на рисунке 3 (Б) фрагментация молекулярного иона гликопептида T18 (RT 24.12, m/z 1180.8611, 3<sup>+</sup>) демонстрирует присутствие гликана по характер-

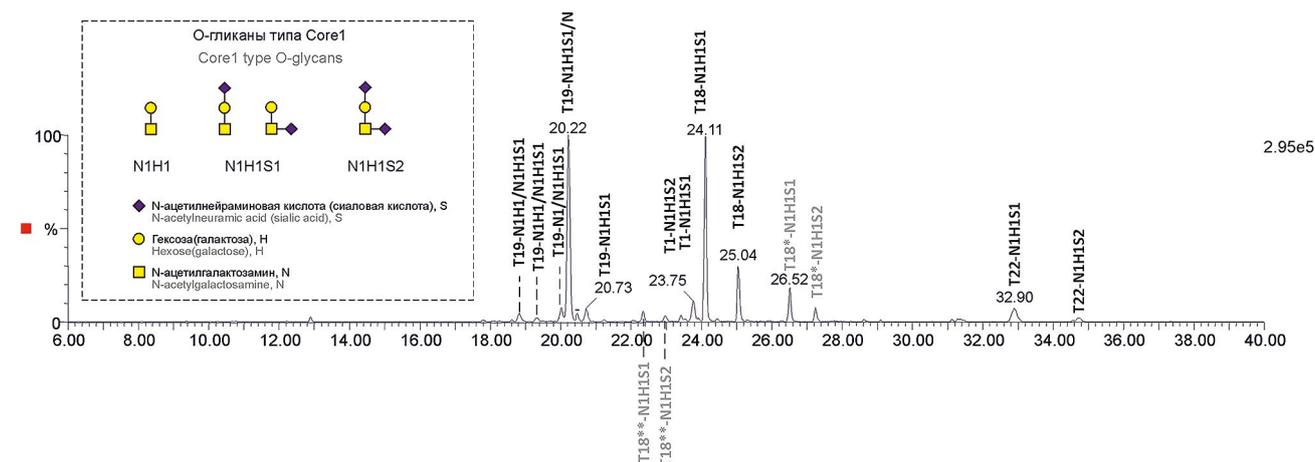
Таблица 1. Идентификация O-гликопептидов этанерцепта

Table 1. Etanercept O-glycopeptides identification

	Пептид/вид O-гликозилирования Peptide/O-glycosylation type	Состав Content	RT	[M + H] <sup>+</sup>	b/y
				(Δppm)	
T1	LPAQVAFIPYAPPEPGSTCR	H/M n/m	24.71	2062.0062(0.0)	29
	LPAQVAFIPYAPPEPGSTCR	N1H1S1	23.88	2718.2364(0.9)	12
	LPAQVAFIPYAPPEPGSTCR	N1H1S2	23.75	3009.3310(0.6)	13
T18	PHQICNVVAIPGN*ASMDAVCTSTSPTR	H/M n/m	23.72	2884.3421(1.2)	39
	PHQICNVVAIPGN*ASMDAVCTSTSPTR	N1H1S1	24.12	3540.5687(0.7)	28
	PHQICNVVAIPGN*ASMDAVCTSTSPTR	N1H1S2	25.06	3831.6641(0.6)	18
T19	SMAPGAVHLPQPVSTR	H/M n/m	19.63	1647.8623(-0.7)	4
	SMAPGAVHLPQPVSTR	N1H1/N1H1S1	18.83/19.33	2669.2248(0.5) 2669.2237(0.1)	10/9
	SMAPGAVHLPQPVSTR	N1/N1H1S1	20.02	2507.1713(0.3)	8
	SMAPGAVHLPQPVSTR	N1H1S1/N1H1S1	20.23	2960.3213(0.9)	12
	SMAPGAVHLPQPVSTR	N1H1S1	20.73	2304.0920(0.4)	10
T22	THICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	H/M n/m	31.35	2844.4581(0.2)	36
	THICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	N1H1S1	32.90	3500.6875(0.7)	29
	THICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	N1H1S2	34.74	3791.7825(0.5)	12

**Примечание.** Моноизотопные массы (M + H<sup>+</sup>) получены с использованием алгоритма MaxEnt 3, реализованным в ПО UNIFI. Времена удерживания соответствуют вершине пика выделенной ионной хроматограммы для каждого иона-прекурсора. Символом «\*» отмечены участки аспарагина, дезамидированного в аспарагиновую кислоту после удаления N-гликанов. Сокращение «n/m» – немодифицированный пептид.

**Note.** Monoisotopic masses (M + H<sup>+</sup>) were obtained using the MaxEnt 3 algorithm implemented in the UNIFI software. The retention times correspond to the top of the peak of the isolated ion chromatogram for each precursor ion. The symbol "\*" marks the areas of asparagine deamidated to aspartic acid after the removal of N-glycans. The abbreviation "n/m" is an unmodified peptide.



**Рисунок 2.** Масс-хроматограмма оксониум-ионов остатков моносахаридов ( $204.087^+$ ,  $366.14^+$ ,  $274.092^+$ ,  $292.103^+$ ,  $657.235^+$ ,  $819.288$ ,  $0.005$  ppm), полученная после ВЭЖХ-МС/МС анализа гидролизата трипсин/Arg-C + PNGase F.

**Примечание.** Оксониум-ионы с  $m/z = 204$  и  $366$  соответствуют общим структурам  $[\text{HexNAc}]^+$  и  $[\text{HexHexNAc}]^+$  соответственно. Ионы с  $m/z = 292$ ,  $274$  и  $657$  соответствуют сialiрированным видам  $[\text{Neu5Ac}]^+$ ,  $[\text{Neu5Ac-H2O}]^+$  и  $[\text{HexNAcHexNeu5Ac}]^+$ . Символом «\*» отмечены пептиды образованные разрывом связи N160/Q161

**Figure 2.** Mass chromatogram of oxonium ions of monosaccharide residues ( $204.087^+$ ,  $366.14^+$ ,  $274.092^+$ ,  $292.103^+$ ,  $657.235^+$ ,  $819.288$ ,  $0.005$  ppm) obtained after HPLC-MS/MS analysis of trypsin/Arg-C + PNGase F hydrolyzate.

**Note.** Oxonium ions with  $m/z = 204$  and  $366$  correspond to the general structures  $[\text{HexNAc}]^+$  and  $[\text{HexHexNAc}]^+$ , respectively. Ions with  $m/z = 292$ ,  $274$  and  $657$  correspond to the sialylated species  $[\text{Neu5Ac}]^+$ ,  $[\text{Neu5Ac-H2O}]^+$  and  $[\text{HexNAcHexNeu5Ac}]^+$ . The symbol "\*" marks the peptides formed by the cleavage of the H160/Q161 bond

ным низкомолекулярным оксониум-ионам  $m/z$  204 ( $\text{HexNAc}^+$ ),  $m/z$  366 ( $\text{HexHexNAc}^+$ ) и  $m/z$  274 ( $\text{NeuAc}^+$ ). Пики  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ионов 3249.4744 а.е.м., 3087.84207 а.е.м. и 2884.3401 а.е.м. свидетельствуют о разрывах Y-типа и наличии в структуре пептида моносиалированного гликана состава N1H1S1. На расположение гликозилированного участка в позиции T26 пептида (T184 а.к. цепи этанерцепта) указывает присутствие  $u_3$ -иона, экпированного остатком HexNAc и видов с последовательным удлинением углеводной цепи остатками гексозы и нейраминовой кислоты.

Два дополнительных пика, обозначенных на рисунке 2 символом «\*» представляют собой укороченные варианты пептида T18 по дополнительному участку N160/Q161. Набор гликозилированных по участку T184 вариантов пептида Q161–M174 идентичен полноразмерному пептиду.

Гликопептиды высокогликозилированного региона TNFRSQHTQTRPEPSTAPSTSFLPMGSPPAEGSTGDEPK идентифицированы не были, что согласуется с литературными данными [20]. Данный участок может содержать до 11-ти потенциальных сайтов O-гликозилирования, и был идентифицирован только после предварительного отщепления терминальных сиаловых кислот [17, 27].

Отсутствие гликозилирования на некоторых потенциальных участках можно объяснить конформационными особенностями белка. В ходе «сборки» гликанов в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи часть сайтов гликозилирования может оказаться недоступной для ферментов синтеза гликанов, а, следовательно, участки остаются незанятыми.

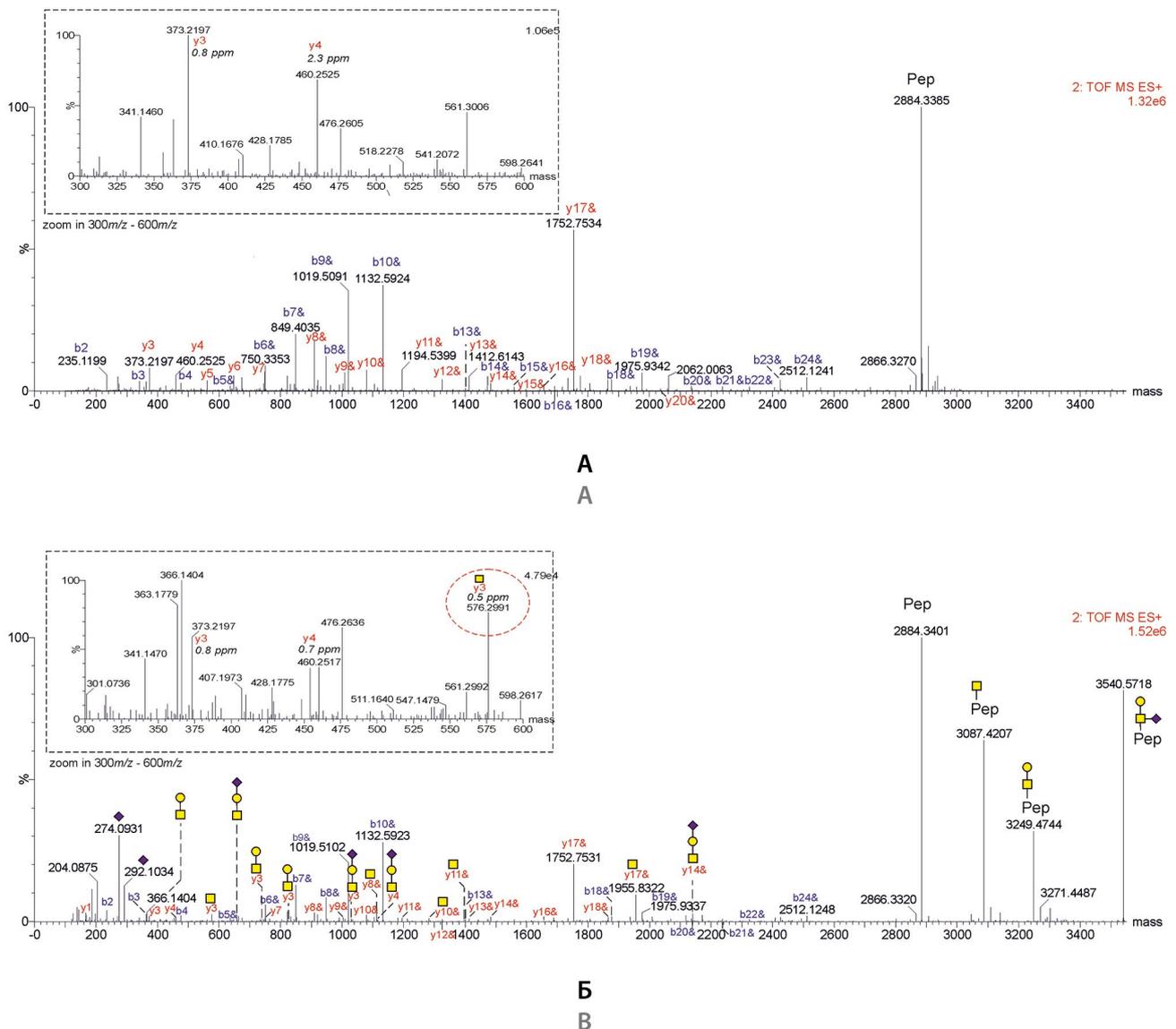
Для сравнения эффективности подхода трипсин/Arg-C был проведен ферментативный гидролиз с использованием комбинации трипсин/Asp-N. На рисунке 4 представлены данные относительного содержания O-гликопептидов этанерцепта, полученные при разных способах протеолиза.

Пептиды T1/D1 и T22/D34 показали наименьшую выраженность сialiрирования. Относительное содержание гликозилированных форм T1/D1 суммарно составляло 5.9 % (Asp-N) и 6.6 % (Arg-C), гликозилированных видов T22 – 5.4 % (Asp-N) и 6.3 % (Arg-C). Более половины видов пептидов T18/D28 было гликозилировано согласно полученным данным: 46.7 % N1H1S1 и 11.2 % N1H1S2 для протеолиза Asp-N, 48.6 % N1H1S1 и 11.4 % N1H1S2 для протеолиза Arg-C. Агликон пептида T19/D29 детектировался на уровне менее 0.1 % при использовании обоих подходов. При этом наиболее выраженными были дважды гликозилированные виды данного гликопептида: N1H1S1/N1H1S1 64.6 % (Asp-N) или 67.6 % (Arg-C) и N1H1/N1H1S1 17.4 % (Asp-N) или 16.4 (Arg-C).

Следует отметить, что пептиды с дополнительным участком разрыва в положении N160/Q161 наблюдались также и в Asp-N/трипсин гидролизатах этанерцепта.

### **N-гликопептидное картирование**

Исследование участков N-гликозилирования проводилось без предварительного десialiрирования для возможности идентификации N-гликанов этанерцепта в нативном состоянии.



**Рисунок 3.** Комбинированные MS<sup>5</sup>-спектры деконволюции пептида T18 (А) и его гликозилированного варианта (Б) в гидролизате Arg-C

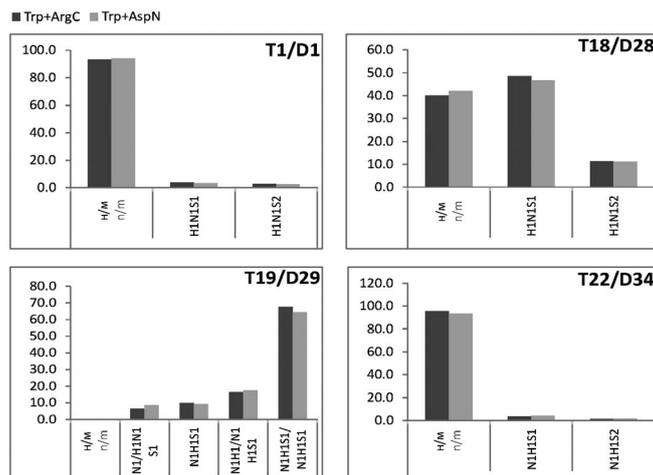
**Figure 3.** Combined MS<sup>5</sup> deconvolution spectra of T18 peptide (A) and its glycosylated variant (B)

Fc-домен этанерцепта гликозилирован на участке N317, включенном в состав пептида EEQYNSTYR. Пептиды TNFR-региона, полученные в результате трипсин/Arg-C гидролиза, PGTETSDVVKPCAPGTFNNTTSSTDICR и RHQICNVVAIRPGNASMDAVCTSTSPTR, гликозилированы в положениях N149 и N171 соответственно. Список идентифицированных гликопептидов гидролизата трипсин/Arg-C представлен в таблице 2.

Профиль N-гликозилированных пептидов N-317 типичен для Fc-фрагмента большинства моноклональных антител, где основные типы гликанов представляют собой преимущественно несиалированные формы и однократно сиалированный дигалактозилированный гликан G2F + S1. Обнаруженные гликановые структуры TNFR наоборот представляли в основном

сиалированные виды. Участок N149 в большей степени гликозилирован афукозилированными, сиалированными гликанами и их вариантами, содержащими фукозу на первичном остатке N-ацетилглюкозамина. При использовании предложенного подхода с Arg-C на участке N149 была идентифицирована однократно галактозилированная и сиалированная гликоформа (G1F + S1), о присутствии данного вида гликозилирования так же сообщалось в предыдущих исследованиях [19, 20].

Особенностью подхода трипсин/Arg-C является идентификация пептидов, содержащих одновременно N-гликозилированный участок N171 и O-гликозилированный участок T184. На рисунке 5 представлена точная масс-хроматограмма выделенных максимальных ионов гликопептидов N171.



**Рисунок 4.** Относительное содержание О-гликозилированных участков этанерцепта в комбинированных гидролизатах трипсин/Arg-C и трипсин/Asp-N

**Figure 4.** Relative content of O-glycosylated sites in combined hydrolyzites trypsin/Arg-C and trypsin/Asp-N

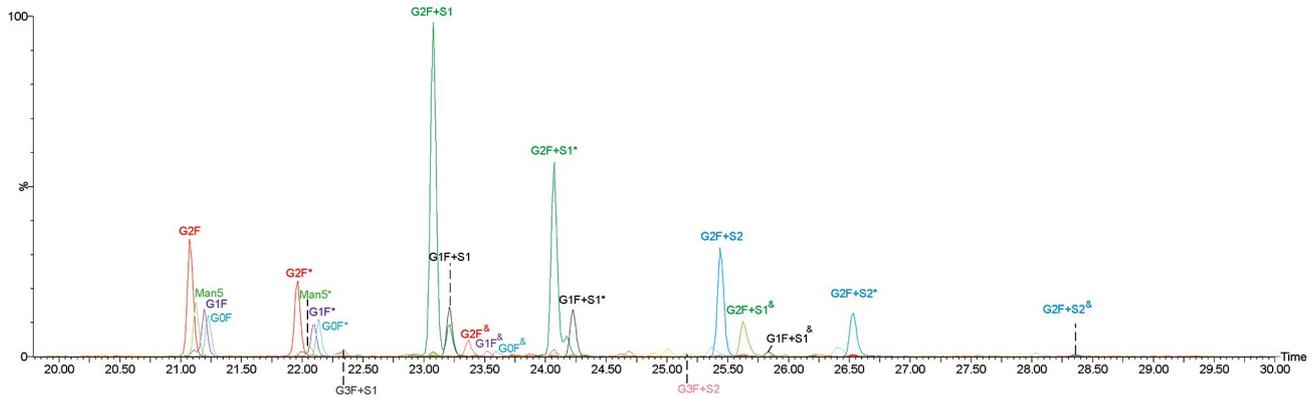
**Таблица 2.** Гликоформы пептидов этанерцепта, идентифицированные в гидролизатах трипсин/Arg-C

**Table 2.** Etanercept glycopeptides, identified in trypsin/Arg-C hydrolysates

Вид Тип	$[M + H]^+$ (Δppm), RT (мин)			
	$[M + H]^+$ (Δppm), RT (min)			
	EEQYNSTYR N317	PGTETSDVVKPCAPGTFNSNTTSSTDICR N-149	PHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTR N-171	N-171/T-184
Man5	2405.9311(-1.6), 6.64	4361.7995(-2.4), 17.17	4099.7709(-1.6), 21.13	4755.9954(-2.0), 22.07* _&
G0	2487.9857(-0.9), 7.02	4443.8511(-2.7), 17.23	-	-
G0-GN	2284.9039(-2.1), 7.02	-	-	-
G0F	2634.0443(-0.6), 7.27	4589.9069(-3.1), 17.17	4327.8793(-2.1), 21.23	4984.1061(-2.0), 22.14* 5275.2045(-1.3), 23.58*
G0F-GN	2430.9633(-1.3), 7.27	-	4124.8020 (-1.7), 21.23	4781.8102(-2.5), 22.11* 5072.1248(-1.4), 23.66*
G1	2650.0383(-0.9), 7.03	4605.9035(-2.7), 17.16	-	-
G1-GN	-	4402.8287(-1.8), 17.12	-	-
G1F	2796.0970(-0.6), 7.26	4751.9623(-2.4), 17.11	4489.9317(-2.1), 21.20	5146.1614(-1.5), 22.10* 5437.2547(-1.8), 23.53*
G1F-GN	2593.0171(-0.9), 7.26	4548.8856(-1.9), 17.06	4286.8622(0.1), 21.16	4943.0845(-1.0), 22.06* _&
G1F+S1	-	-	4780.9935 (2.3), 23.21	5437.2540(-1.9), 24.23* 5728.3518(-1.4), 25.81*
G2	-	4767.9574(-2.4), 17.12	-	-
G2F	2958.1485(-1.0), 7.28	4914.0169(-2.0), 17.05	4651.9866(-1.6), 21.08	5308.2216(0.0), 21.62* 5599.3065(-1.9), 23.37*
G2+S1	-	5059.0548(-1.8), 18.69	-	-
G2F+S1	3249.2443(-0.8), 9.32	5205.1113(-2.1), 18.61	4943.0766(-2.6), 23.08	5599.3205(0.6), 22.73* 5890.3997(-2.2), 25.63*
G2+S2	-	5350.1521(-1.4), 20.48	-	-
G2F+S2	-	5496.2105(-1.3), 20.37 5496.2252(1.4), 20.75	5234.1790(-1.1), 25.44	5890.4204(1.3), 23.86* 6181.4959(-1.9), 28.21*
G3F+S1	-	4453.7520(-3.4), 17.66	5308.2089(-2.4), 22.34	-
G3F+S2	-	-	5599.3070(-1.8), 25.16	-

**Примечание.** Моноизотопные массы ( $M + H^+$ ) получены с использованием алгоритма MaxEnt 3, реализованным в ПО UNIFI. Времена удерживания соответствуют вершине пика выделенной ионной хроматограммы для каждого иона-прекурсора. Надстрочными символами отмечены гликопептиды, содержащие дополнительный участок О-гликозилирования в положении T184 состава N1H1S1 «\*» или N1H1S2 «&».

**Note.** Monoisotopic masses ( $M + H^+$ ) were obtained using the MaxEnt 3 algorithm implemented in the UNIFI software. The retention times correspond to the top of the peak of the isolated ion chromatogram for each precursor ion. Superscript symbols mark glycopeptides containing an additional O-glycosylation site at position T184 of the composition N1H1S1 "\*" or N1H1S2 "&".



**Рисунок 5.** Масс-хроматограмма N-гликопептидов участка N171 гидролизата трипсин/Arg-C.

**Примечание.** Символами «\*» и «&» обозначены смешанные формы гликопептидов, содержащие дополнительный O-гликан вида N1H1S1 или N1H1S2 соответственно

**Figure 5.** Chromatogram of site N171 N-glycopeptides in trypsin/Arg-C hydrolysis.

**Note.** The symbols "\*" and "&" denote mixed forms of glycopeptides containing an additional O-glycan of the N1H1S1 or N1H1S2 type, respectively

Образующиеся N-гликопептиды представляли собой формы G2F, моно- и дисиазированные варианты G2F, менее интенсивными вариантами были Man5, GOF, G1F и G1F + S1. Дополнительно были идентифицированы гибриды, представляющие собой те же варианты N-гликопептидов N171 с дополнительным участком O-гликозилирования в положении T184, оккупированным видами N1H1S1 (\*) и N1H1S2 (&).

Хроматографическое разделение основных гликопептидов N171 на обращенной фазе достигается за счет присутствия терминальных сиаловых кислот, которые сильнее удерживаются и элюируют позднее. Несиазированные формы разделяются в соответствии с количеством галактозных единиц [28, 29].

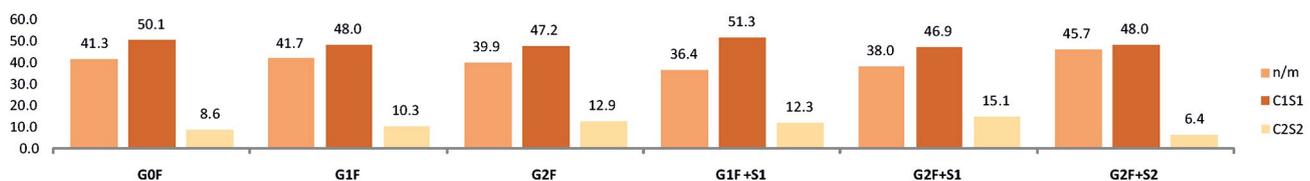
Согласно данным O-гликопептидного картирования было установлено, что ~40 % пептидов N171 ферментативного гидролизата трипсин/Arg-C представлены в свободном виде, тогда как O-гликозилированные варианты представляли собой ~50 % и ~10 % видов N1H1S1 и N1H1S2 соответственно. Как видно из рисунка 6 данное соотношение сохраняется для гибридных N- и O-гликоформ. Присутствие пептида, содержащего свободный участок T184, позволяет использовать подход трипсин/Arg-C для проведения оценки относительного содержания N-гликоформ участка N171.

Для сравнения эффективности подхода трипсин/Arg-C был проведен ферментативный гидролиз с использованием комбинации трипсин/Asp-N. На рисунке 7 приведены данные оценки относительного содержания гликозилированных форм пептидов этанерцепта, идентифицированных в образцах, полученных при различных способах ферментализации.

Результаты количественной оценки профилей N-гликозилированных участков этанерцепта с использованием двух подходов демонстрируют сходные результаты. Следует отметить, что для оценки N-гликопептидов N171 в гидролизате трипсин/Arg-C использовался пептид, не содержащий O-гликанов.

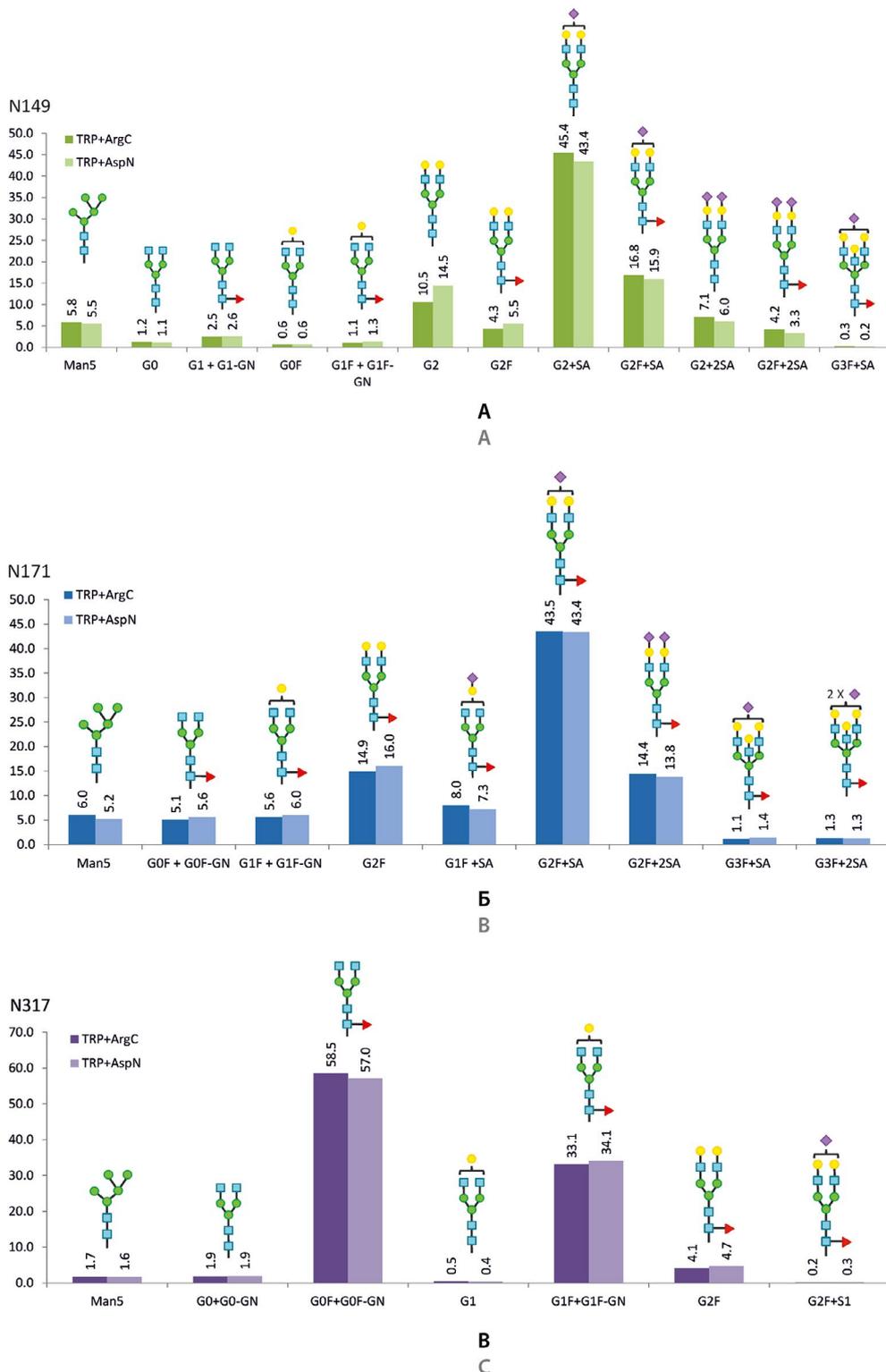
Разработанный подход может стать альтернативой классическим методам проведения ферментативного гидролиза для пептидного картирования. Преимуществом использования Arg-C служит ее большая коммерческая доступность в сравнении с Asp-N. При этом разработанный подход обладает схожей эффективностью ферментализации и достоверностью результатов.

Из данных следует, что эффективность идентификации отдельных сайтов гликозилирования методом ВЭЖХ-МС/МС затрудняется с увеличением числа гликозилированных сайтов, включенных в индиви-



**Рисунок 6.** Соотношение O-гликозилированных форм на участке T184 с указанием формы N-гликана N171

**Figure 6.** The ratio of O-glycosylated forms at the T184 site indicating the form of N-glycan N171



**Рисунок 7.** Сравнение относительного количества (%) гликозилированных форм пептидов этанерцепта, содержащих участки гликозилирования в положениях N149 (А), N171 (Б), N317 (В), в ферментативных гидролизатах

**Figure 7.** Comparison of relative content (%) of peptides, glycosylated at N149 (A), N171 (B), N317 (C) sites obtained using both approaches

дуальный пептид. Использование комбинаций трипсина и эндопротеиназ минимизирует сложность образцов. Ограничением подхода трипсин/Arg-C является образование N/O-гликозилированного

пептида. Однако после проведения предварительного O-гликопептидного картирования N-гликоформы данного участка могут быть идентифицированы однозначно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования нами были разработаны подходы гликопептидного картирования, включающие использование комбинации протеаз трипсин и Arg-C, которые позволяют надежно и воспроизводимо определять локализацию участков и формы N- и O-гликозилирования этанерцепта. Результаты научной работы могут использоваться для проведения исследований сопоставимости биоподобных лекарственных средств, оценки качества при изменении технологии производства ЛП, при разработке новых биотехнологических ЛП.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kostin K. B., Shanava L. A. Key trends in the development of the Russian pharmaceutical market amidst uncertainty. *Journal of Economics, Entrepreneurship and Law*. 2022;12(5):1639–1658. (In Russ.) DOI: 10.18334/epp.12.5.114635.
- Fischer S., Hoernschemeyer J., Mahler H.-C. Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(1):42–50. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.04.021.
- Jefferis R. Posttranslational modifications and the immunogenicity of biotherapeutics. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:5358272. DOI: 10.1155/2016/5358272.
- Xu Y., Wang D., Mason B., Rossomando T., Li N., Liu D., Cheung J. K., Xu W., Raghava S., Katiyar A., Nowak C., Xiang T., Dong D. D., Sun J., Beck A., Liu H. Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies. *MAbs*. 2019;11(2):239–264. DOI: 10.1080/19420862.2018.1553476.
- Eon-Duval A., Broly H., Gleixner R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnology Progress*. 2012;28(3):608–622. DOI: 10.1002/btpr.1548.
- Kaur H. Characterization of glycosylation in monoclonal antibodies and its importance in therapeutic antibody development. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2021;41(2):300–315. DOI: 10.1080/07388551.2020.1869684.
- Goffe B., Cather J. C. Etanercept: An overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003;49(2):105–111. DOI: 10.1016/j.jaad.2003.554.
- Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(6):1866–1884. DOI: 10.1002/jps.24444.
- Brockhaus M., Gentz R., Zlatko D., Lesslauer W., Lotscher H., Schlaeger E.-J. Human TNF receptor fusion protein. US Patent 8063182. 2011. Available at: <https://patents.google.com/patent/US8063182B1/> Accessed: 03.08.2022.
- Tracey D., Klareskog L., Sasso E. H., Salfeld J. G., Tak P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008;117(2):244–279. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.10.001.
- Gur A., Oktayoglu P. Advances in biologic agents for the treatment of rheumatoid arthritis. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 2010;9(1):24–34. DOI: 10.2174/187152310790711656.
- Wohlschlager T., Scheffler K., Forstenlehner I. C., Skala W., Senn S., Damoc E., Holzmann J., Huber C. G. Native mass spectrometry combined with enzymatic dissection unravels glycoform heterogeneity of biopharmaceuticals. *Nature Communications*. 2018;9(1):1713. DOI: 10.1038/s41467-018-04061-7.
- Fazel R., Guan Y., Vaziri B., Krisp C., Heikaus L., Saadati A., Hidayat S. N., Gaikwad M., Schlüter H. Structural and in vitro functional comparability analysis of Altebre<sup>TM</sup>, a proposed etanercept biosimilar: Focus on primary sequence and glycosylation. *Pharmaceuticals*. 2019;12(1):14. DOI: 10.3390/ph12010014.
- Duivelshof B. L., Murisier A., Camperi J., Fekete S., Beck A., Guillelme D., D'Atri V. Therapeutic Fc-fusion proteins: Current analytical strategies. *Journal of Separation Science*. 2021;44(1):35–62. DOI: 10.1002/jssc.202000765.
- Zhu L., Guo Q., Guo H., Liu T., Zheng Y., Gu P., Chen X., Wang H., Hou S., Guo Ya. Versatile characterization of glycosylation modification in CTLA4-Ig fusion proteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *MAbs*. 2014;6(6):1474–1485. DOI: 10.4161/mabs.36313.
- Stavenhagen K., Gahoual R., Dominguez Vega E., Palmese A., Ederveen A. L. H., Cutillo F., Palinsky W., Bierau H., Wuhrer M. Site-specific N- and O-glycosylation analysis of atacept. *MAbs*. 2019;11(6):1053–1063. DOI: 10.1080/19420862.2019.1630218.
- Houel S., Hilliard M., Yu Y. Q., McLoughlin N., Martin S. M., Rudd P. M., Williams J. P., Chen W. N- and O-glycosylation analysis of etanercept using liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry equipped with electron-transfer dissociation functionality. *Analytical Chemistry*. 2014;86(1):576–584. DOI: 10.1021/ac402726h.
- Graf T., Heinrich K., Grunert I., Wegele H., Habberger M., Bulau P., Leiss M. Recent advances in LC-MS based characterization of protein-based bio-therapeutics – mastering analytical challenges posed by the increasing format complexity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;186(113251):113251. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113251.
- Cho I. H., Lee N., Song D., Jung S. Y., Bou-Assaf G., Sosic Z., Zhang W., Lyubarskaya Y. Evaluation of the structural, physicochemical, and biological characteristics of SB4, a biosimilar of etanercept. *MAbs*. 2016;8(6):1136–1155. DOI: 10.1080/19420862.2016.1193659.
- Montacir O., Montacir H., Springer A., Hinderlich S., Mahboudi F., Saadati A., Parr M. K. Physicochemical characterization, glycosylation pattern and biosimilarity assessment of the fusion protein Etanercept. *The Protein Journal*. 2018;37(2):164–179. DOI: 10.1007/s10930-018-9757-y.
- Kleemann G. R., Beierle J., Nichols A. C., Dillon T. M., Pipes G. D., Bondarenko P. V. Characterization of IgG1 immunoglobulins and peptide-Fc fusion proteins by limited proteolysis in conjunction with LC-MS. *Analytical Chemistry*. 2008;80(6):2001–2009. DOI: 10.1021/ac701629v.
- Yu L., Xiao G., Zhang J., Remmele R. L., Eu M., Liu D. Identification and quantification of Fc fusion peptidobody degradations by limited proteolysis method. *Analytical Biochemistry*. 2012;428(2):137–142. DOI: 10.1016/j.ab.2012.06.002.
- Giansanti P., Tsiatsiani L., Low T. Y., Heck A. J. R. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nature Protocols*. 2016;11(5):993–1006. DOI: 10.1038/nprot.2016.057.
- Carr S. A., Huddleston M. J., Bean M. F. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry: Analysis of N- and O-linked glycopeptides by LC-MS. *Protein Science*. 1993;2(2):183–196. DOI: 10.1002/pro.5560020207.
- Huddleston M. J., Bean M. F., Carr S. A. Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests. *Analytical Chemistry*. 1993;65(7):877–884. DOI: 10.1021/ac00055a009.
- Huang L.-J., Lin J.-H., Tsai J.-H., Chu Y.-Y., Chen Y.-W., Chen S.-L., Chen S.-H. Identification of protein O-glycosylation site and corresponding glycans using liquid chromatography-tandem mass spectrometry via mapping accurate mass and retention time shift. *Journal of Chromatography A*. 2014;1371:136–145. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.10.046.
- Srikanth J., Agalyadevi R., Babu P. Targeted, Site-specific quantitation of N- and O-glycopeptides using 18O-labeling and product ion based mass spectrometry. *Glycoconjugate Journal*. 2017;34(1):95–105. DOI: 10.1007/s10719-016-9733-8.
- Wang B., Tsybovsky Y., Palczewski K., Chance M. R. Reliable determination of site-specific in vivo protein N-glycosylation based on collision-induced MS/MS and chromatographic retention time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2014;25(5):729–741. DOI: 10.1007/s13361-013-0823-6.
- Kozlik P., Goldman R., Sanda M. Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nano-LC. *Electrophoresis*. 2017;38(17):2193–2199. DOI: 10.1002/elps.201600547.