

Терапевтические гликопротеины: способ пробоподготовки для профилирования N-гликанов моноклональных антител

М.Ю. Неронова , И.А. Каргополов  , А.А. Меринов , А.А. Калмыкова ,
Е.В. Зубарева 

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Заводская, стр. 273, пос. Вольгинский, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Каргополов Иван Андреевич; kargopolov@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Гликановый профиль – критический параметр качества лекарственных средств (ЛС) на основе моноклональных антител (МкАТ), контроль которого обязателен при разработке и выпуске каждой серии ЛС. Актуальность работы обусловлена необходимостью разработки воспроизводимого протокола пробоподготовки для анализа гликанового профиля, адаптированного к условиям стандартной физико-химической лаборатории и не требующего применения коммерческих наборов ограниченной доступности.

ЦЕЛЬ. Разработать альтернативный способ пробоподготовки для количественной характеристики гликанового профиля терапевтических антител без использования коммерческих наборов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объекты исследования – лекарственные средства на основе МкАТ: омализумаб, устекинумаб, канакинумаб, тоцилизумаб, натализумаб и иммуноглобулин класса G2, специфичный к рецептору PD-1. N-гликаны отщепляли от МкАТ пептид-N-гликозидазой (ПНГаза F), затем присоединяли к ним флуоресцентные метки – 2-аминобензамид (2-АВ) или 2-аминобензойную кислоту (2-АА) или InstantАВ и очищали пробы от посторонних примесей. Для анализа смесей гликанов использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию гидрофильного взаимодействия с детектированием флуоресценции (HILIC-FLD) на оборудовании Alliance e2695 и Acquity Arc Bio с детектором флуоресценции FLR 2475. Гликановый профиль оценивали по содержанию функциональных групп гликанов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В работе подобраны следующие условия пробоподготовки N-гликанов терапевтических МкАТ: инкубация с 2 мЕД ПНГазой F на 100 мкг белка в 10 мМ трис-HCl (pH 8,0) в течение 3 ч при температуре 37 °С без предварительной денатурации белка; окрашивание гликанов 2-АА в течение 1,5 ч при 65 °С; удаление избытка красителя путем экстракции ацетонитрилом. Осаждение ацетонитрилом меченых 2-АА гликанов пригодно для очистки и концентрирования проб. Применение метода HILIC-FLD позволило определять в пробах минорные гликаны с содержанием до 0,1–0,2%. Сравнение наших данных с данными, полученными при использовании коммерческого набора, указало на приемлемую сопоставимость результатов хроматографического анализа. При пробоподготовке важно учитывать структурные особенности конкретных МкАТ, например для высокосиалированных МкАТ обоснован контроль десиалирования в процессе окрашивания.

ВЫВОДЫ. Разработанный способ пробоподготовки пригоден для анализа омализумаба, канакинумаба и натализумаба. Предложенные аналитические подходы к пробоподготовке будут также полезны при разработке методики анализа гликанового профиля других гликопротеинов с использованием метода HILIC-FLD.

Ключевые слова: моноклональные антитела; контроль качества; HILIC; 2-аминобензамид; 2-аминобензойная кислота; жидкостная хроматография; пробоподготовка; N-гликаны; гликопротеины

Для цитирования: Неронова М.Ю., Каргополов И.А., Меринов А.А., Калмыкова А.А., Зубарева Е.В. Терапевтические гликопротеины: способ пробоподготовки для профилирования N-гликанов моноклональных антител. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-727>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке АО «ГЕНЕРИУМ».

Потенциальный конфликт интересов. Авторы являются сотрудниками АО «ГЕНЕРИУМ». При написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных.

Therapeutic glycoproteins: sample preparation for N-glycan profiling of monoclonal antibodies

Maria Yu. Neronova , Ivan A. Kargopolov ✉, Artem A. Merinov ,
Alena A. Kalmykova , Ekaterina V. Zubareva 

GENERIUM JSC, 273 Zavodskaya St., Volginsky, Vladimir Region, 601125, Russian Federation

✉ Ivan A. Kargopolov; kargopolov@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Glycan profile is a critical quality parameter for therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) that is consistently estimated during development and release of each drug batch. The need to develop a reproducible sample preparation protocol for glycan profiling brings about the relevance of the study. The profile should be adapted to the conditions of a standard physicochemical laboratory, so that it avoids using commercial preparation kits that are currently in short supply.

AIM. This study aimed to develop an alternative sample preparation procedure for quantitation of glycans in therapeutic monoclonal antibodies without using commercial kits.

MATERIALS AND METHODS. Omalizumab, ustekinumab, canakinumab, tocilizumab, natalizumab, and human anti-PD IgG2 were used as the study objects. N-glycans were released from mAbs by peptide-N-glycosidase (PNGase F) and labeled with fluorescent tags 2-aminobenzamide (2-AB) or 2-aminobenzoic acid (2-AA) or InstantAB. Subsequently, glycan samples were cleaned from impurities. Glycan compounds were analyzed using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC-FLD) on Alliance e2695 and Acquity Arc Bio chromatographic systems equipped with FLR 2475 fluorescence detector. The glycan profile was assessed by the content of functional glycan groups.

RESULTS. Conditions for preparing therapeutic mAbs N-glycans were chosen as follows: incubation with 2 mEU PNGase F per 100 µg protein in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) at 37 °C for 3 h without protein denaturation; derivatization of glycans with 2-AA at 65 °C for 1.5 h; extraction of 2-AA excess with acetonitrile. Centrifugation of labeled glycans with acetonitrile is suitable for purification and concentration of samples. Minor glycans with a content not more than 0.1–0.2% were determined using HILIC-FLD. Comparison with data obtained using a commercial kit for sample preparation indicated acceptable comparability of the results. When preparing the samples, we took into account structural features of specific mAbs, for instance, desialylation control during the staining was found necessary for high-sialylated mAbs.

CONCLUSIONS. The developed sample preparation procedure is suitable for the analysis of N-glycans of omalizumab, canakinumab and natalizumab and may be used to develop the analysis methods of the glycan profile of other glycoproteins using HILIC-FLD mode.

Keywords: monoclonal antibodies; quality control; HILIC; 2-aminobenzamide; 2-aminobenzoic acid; liquid chromatography; sample preparation; N-glycans; glycoproteins

For citation: Neronova M.Yu., Kargopolov I.A., Merinov A.A., Kalmykova A.A., Zubareva E.V. Therapeutic glycoproteins: sample preparation for N-glycan profiling of monoclonal antibodies. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-727>

Funding. The study was conducted as part of applied research project funded by GENERIUM JSC.

Disclosure. There is a potential conflict of interest related to the authors' affiliation with GENERIUM JSC. However, when writing this paper, the authors were guided by considerations of the scientific value of the material obtained and declare impartiality in their data assessment.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из перспективных направлений в фармацевтической отрасли является разработка биотехнологических лекарственных средств (ЛС) на основе рекомбинантных моноклональных антител (МкАТ) – высокоспецифичных гликопротеинов с уникальными терапевтическими свойствами. Функции МкАТ зависят от посттрансляционных модификаций, включая гликозилирование – процесс присоединения остатков олигосахаридов или гликанов к органическим молекулам [1]. Существует 3 вида гликозилирования белков: N-гликозилирование остатков аспарагина, O-гликозилирование остатков серина, треонина и гидроксипролина и C-гликозилирование α-маннопиранозой остатка триптофана¹. В данной статье будут рассмотрены только N-гликаны (далее по тексту – гликаны). Для большинства терапевтических иммуноглобулинов класса G (IgG) характерно N-гликозилирование остатков аспарагина в Fc-фрагменте тяжелой цепи; в Fab-фрагменте гликаны встречаются значительно реже.

Гликопротеины живых клеток обычно неоднородны по структурам гликозилирования, за исключением случаев направленной гликоинженерии [2]. Гликановый профиль, или гликопрофиль, – это совокупная характеристика структуры, состава и относительного содержания олигосахаридных модификаций полипептидных цепей гликопротеинов. Гликопрофиль определяется как свойствами самого белка, например количеством сайтов гликозилирования, так и внешними факторами, например штаммом-продуцентом и условиями культивирования [3, 4]. Гликопрофиль оказывает прямое влияние на фармакокинетику лекарственного препарата (ЛП) через регуляцию связывания с рецепторами, распределения и выведения [5]. Известно, что от типа гликанов зависят эффекторные функции терапевтических МкАТ, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность и комплемент-зависимая цитотоксичность [6]. Поэтому оценка гликопрофиля антител обязательна при их разработке, производстве и рутинном контроле [1, 7] и регламентируется нормативными документами².

Для биоаналогичных ЛП [3] дополнительно требуется экспериментально подтвердить сопоставимость состава гликанов по функциональным группам с референтным препаратом³.

Для оценки гликопрофиля МкАТ гликаны, как правило, группируют по функциональным отличиям. По влиянию на фармакокинетику и эффекторные свойства антител гликаны разделяют на галактозилированные, афукозилированные, олигоманнозные и сиалированные формы [9]. Дополнительно рассчитывают суммарное содержание гликанов с терминальными остатками N-гликолилнейраминовой кислоты и двойной галактозы, иммуногенных для человека [5, 6]. Комплексный анализ гликанового профиля включает оценку сайтов гликозилирования, качественного и количественного состава присоединенных гликанов. Исследования проводятся на уровнях гликопротеинов, гликопептидов, отдельных гликанов и составляющих их моносахаридов [10] с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), капиллярного электрофореза и масс-спектрометрии [11, 12]. Наиболее сбалансированным в плане доступности и информативности представляется анализ отщепленных от белка гликанов с дериватизацией флуоресцентными красителями (флуорофорами) [13, 14]. Для отщепления N-гликанов используют либо пептид-N-гликозидазу F (ПНГаза F)⁴, либо химические реактивы, например гидроксилламин с гидроксидом лития [15] или гипохлорит кальция [16]. Ферменты производят меньше побочных продуктов и не повреждают уже отщепленные гликаны, но при работе с ними может потребоваться предварительная денатурация белка для доступа к сайтам гликозилирования [17, 18]. При селективном отщеплении гликанов на конце олигосахарида образуется реакционная группа, которая используется для присоединения флуорофора.

2-аминобензамид (2-AB) и 2-аминобензойная кислота (2-AA) были одними из первых флуоресцентных красителей, предложенных для мечения гликанов [19–21], и наличие нескольких баз данных⁵ облегчает интерпретацию результатов анализа. Однако реакция восстановления аминирования требует нагрева

¹ Решение Коллегии ЕЭК от 11.08.2020 № 100 (ред. от 25.10.2022) «О Фармакопее Евразийского экономического союза». 2.1.2.56 Анализ гликанов в гликопротеинах.

² Там же.

³ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁴ AdvanceBio N-Glycanase (PNGase F) ≥2.5 U/mL; Agilent Technologies Inc, 2019.

⁵ <https://glycosmos.org/glycostore/uplc>

<http://glycibase.nibr.ie/glycibase.html>

<https://web.expasy.org/glycomod>

<https://glytoucan.org/Structures>

до 40–70 °С в кислой среде в течение 1–3 ч; для повышения стабильности продуктов реакции требуется также восстановление лабильных оснований Шиффа. Существует способ дериватизации гликанов активированными эфирами флуоресцентных соединений [13]. При помощи N-гидроксисукцинимидного эфира проводится карбоксилирование концевой аминокислотной группы гликана с образованием амидной связи с флуорофором⁶. Данный принцип положен в основу некоторых коммерчески доступных красителей [22–24], использование которых обеспечивает полную дериватизацию гликанов при комнатной температуре и слабощелочном значении pH за 3–5 мин. Такой подход проще, чем реакция с 2-AB или 2-AA. Вместе с тем при наличии в образцах свободных аминокислот или других нуклеофильных компонентов перед окрашиванием снижают их концентрацию до ≤ 100 мкМ⁷ либо нейтрализуют, например с помощью глицеральдегида [25]. При этом реакция восстановительного аминирования гликанов не чувствительна к присутствию солей, детергентов и других нуклеофильных компонентов [19].

Другим аспектом пробоподготовки гликанов является удаление избыточного флуоресцентного красителя после дериватизации. Пики на хроматограмме, соответствующие несвязанному флуорофору и продуктам его побочных реакций, могут перекрывать или искажать целевые пики гликанов. Наиболее распространенный метод очистки – твердофазная экстракция (ТФЭ) с использованием гидрофильных сорбентов [26, 27]. Другой способ – жидко-жидкофазная экстракция неполярными органическими растворителями [27] либо осаждение гликанов среднеполярными растворителями, например ацетоном, с последующим центрифугированием и высушиванием осадка [28].

В мировой практике для анализа гликанового профиля используются коммерческие наборы на основе твердофазной экстракции [29–31], однако их основной недостаток – высокая стоимость [32, 33]. В связи с этим актуальной научно-практической задачей является разработка и валидация способов пробоподготовки, которые бы позволили получать результаты, сопоставимые с признанными эталонными наборами, но при этом были бы доступны для любой лаборатории. В качестве референсного набора мы использовали GlykoPrep – один из распространенных коммерческих наборов

для пробоподготовки к анализу гликанов методом HILIC-FLD [13, 34, 35].

Цель работы – разработать альтернативный способ пробоподготовки для количественной характеристики гликанового профиля терапевтических антител без использования коммерческих наборов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В исследовании использовали препараты омализумаба, иммуноглобулина класса G2, специфичного к рецептору PD-1 (IgG2 к PD-1, МНН не присвоено), устекинумаба, канакинумаба, тоцилизумаба и натализумаба (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия).

Реактивы: трис (Merck, Германия, кат. № 1.08386.9025); гидрофосфат натрия гептагидрат (Merck, кат. № 1.06574); дигидрофосфат натрия моногидрат (Merck, кат. № S9638); пептид-N-гликозидаза F (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); 2-аминобензойная кислота, 2-AA (Acros Organics, США, кат. № 10491); 2-аминобензамид, 2-AB (HiMeida, Индия, кат. № RM6597); цианоборгидрид натрия, ЦБГН (Merck, кат. № 15615-9); уксусная кислота (NeoFroxx, Германия, кат. № LC-7006.1); диметилсульфоксид, ДМСО (Merck, кат. № 472301); формиат аммония (Acros Organics, кат. № AC40115); ацетонитрил (Scharlab, Испания, кат. № AC0378); муравьиная кислота (Scharlab, Испания, кат. № AC10760050).

Набор для подготовки проб N-гликанов GlykoPrep (кат. № GP96NG-LB) получен от Agilent (США). Набор включает GlykoPrep Digestion Module (кат. № GS96-RX), GlykoPrep InstantAB Labeling Module (кат. № GS96-LB), GlykoPrep Cleanup Module (кат. № GS96-CU).

Оборудование

В работе использовали хроматографические системы Alliance e2695 и Acquity Arc Bio (Waters, США), оснащенные детектором флуоресценции FLR 2475 (Waters). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Empower3 (Waters) и MS Excel 2010 (Microsoft, США).

Методы

Пробоподготовку с использованием набора GlykoPrep проводили в соответствии с методикой, рекомендованной производителем набора, и окрашиванием InstantAB (IAB)⁸. Перед анализом в режиме HILIC 20 мкл образцов смешивали

⁶ <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/bioconjugation-technical-handbook.pdf>

⁷ <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715004793en.pdf>

⁸ GlykoPrep rapid N-glycan preparation with InstantAB™. Product code GP96NG-L; Agilent, USA.

с 40 мкл ацетонитрила. При инъекциях более 1–3 мкл избыток воды в пробе может вызвать уширение, деформацию и даже расщепление пиков некоторых гликанов, так как содержание ацетонитрила в начальных условиях градиента составляет 75%.

Пробоподготовка "в растворе". 100 мкг белка исследуемых образцов растворяли в 100 мкл буферного раствора, содержащего 10 мМ трис (рН 8,5). Дегликозилирование проводили в течение 3 ч при температуре 37 °С в присутствии 2–4 МЕД ПНГазы F. Дериватизацию отщепленных гликанов проводили путем внесения 10 мкл раствора для мечения (0,36 М 2-АА и 0,8 М ЦБГН, растворенные в смеси ДМСО:уксусная кислота 7:3 об./об.). Пробы инкубировали в течение 1,5 ч при 65 °С. После осаждения белка центрифугированием отбирали супернатант, который разводили ацетонитрилом до финальной концентрации 94%. После перемешивания проб гликанов осаждали центрифугированием. Осадок промывали ацетонитрилом дважды, затем пробы высушивали при 65 °С. Сухой остаток растворяли в воде, разбавляли ацетонитрилом в соотношении 1:1 и анализировали на хроматографе.

Хроматографическое разделение гликанов проводили на колонке AdvanceBio Glycan Map 2,1×150 мм с размером частиц 2,7 мкм (Agilent, США, кат. № 683775-913), термостатированной при температуре 45 °С. Использовали подвижные фазы (ПФ): ПФ А – 0,1 М аммония формиат (рН 4,5), ПФ Б – ацетонитрил. Хроматографию проводили при скорости потока 0,4 мл/мин в линейном градиенте с 75–67% ПФ Б за 45 мин. Инжектировали по 5 мкл образцов и детектировали флуоресценцию при длинах волн возбуждения 360 нм и эмиссии 425 нм (2-АА и 2-АВ). Для IАВ длины волн возбуждения и эмиссии – 277 и 344 нм.

Обработка хроматографических данных. Пики гликанов интегрировали с помощью ПО, после чего методом внутренней нормализации оценивали индивидуальное содержание пиков. Структуры гликанов ранее определяли с помощью хромато-масс-спектрометрии и затем идентифицировали по базам данных⁹. Содержание функциональных групп определяли суммированием относительных площадей пиков индивидуальных гликанов. В группу галактозилированных гликанов (Gal) включали G1[6], G1[3], G1F[6], G1F[3] и G2F; афукозилированных гликанов (Afuc) – G0-N, G0, G1[6], G1[3] и G2;

олигоманнозных гликанов (Man) – Man3 и Man5; сиалированных гликанов (Sial) – G1FS1[3], A1F и A2F. Для устекинумаба, произведенного в клеточной линии мышины миеломы Sp2/0, в сумму сиалированных гликанов (Sial) включали гликанов H4N4F1Sg1, H5N4F1Sg1, H6N4F1Sg1, H5N4F1Sg2.

Перед анализом исследуемых образцов проводили проверку пригодности системы по образцу гликанов исследуемых антител, полученных с помощью набора GlykoPrep, в соответствии с Решением Коллегии ЕЭК¹⁰. Критерии оценки пригодности включали: фактор асимметрии, эффективность колонки, предел количественного определения (ПКО) и относительное стандартное отклонение (RSD, %) времени удерживания и содержания контрольного пика, а также разрешение критических пар пиков.

Статистическая обработка данных¹¹ включала вычисления среднего арифметического, среднеквадратичного отклонения (SD) и RSD. Доверительный интервал (ДИ) представляет собой интервал значений среднего арифметического ± 3 SD. ДИ рассчитывали для содержания каждой группы гликанов при оценке сопоставимости результатов анализа двумя методиками пробоподготовки. Для этого рассчитывали среднее арифметическое значение и SD относительной площади суммы пиков, используя данные по трем независимым пробоподготовкам ЛП (набор GlykoPrep).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние денатурации белка на анализ гликанов

Денатурация гликопротеина необходима в случаях, когда углеводные остатки в нативной конформации молекулы расположены в участках, недоступных для действия ПНГазы F, либо когда они частично экранированы другими посттрансляционными модификациями, например соседними O-гликанами. Однако у иммуноглобулинов класса G, как правило, N-гликаны присоединяются только в пределах СН2-домена каждой тяжелой цепи. Эти участки находятся на поверхности белковой молекулы и обычно доступны для фермента даже без предварительной денатурации [36]. При пробоподготовке коммерческим набором предусмотрена денатурация образцов 3–5 М гуанидин гидрохлоридом, в связи с чем проверено влияние денатурации на результаты испытания. Поскольку гуанидин гидрохлорид не удаляется из проб

⁹ <https://glycosmos.org/glycostore/uplc>

¹⁰ Решение Коллегии ЕЭК от 11.08.2020 № 100 (ред. от 25.10.2022) «О Фармакопее Евразийского экономического союза». 2.1.2.36 Хроматографические методы разделения.

¹¹ Решение Коллегии ЕЭК от 11.08.2020 № 100 (ред. от 25.10.2022) «О Фармакопее Евразийского экономического союза». 2.3.13.0 Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний.

при жидкофазной экстракции ацетонитрилом, использовали термическую денатурацию, влияние которой на эффективность отщепления гликанов оценивали на примере анализа IgG2 к PD-1. Пробоподготовку образцов проводили путем инкубации при температуре 99 °С в течение 5 мин без добавления денатурирующих агентов химической природы для предотвращения ингибирования ПНГазы F. Типовая хроматограмма гликопрофиля представлена на *рисунке 1*; площади пиков представлены в *таблице S1* (дополнительная информация¹²), а сравнительные данные по содержанию гликановых групп – в *таблице S2* (дополнительная информация).

Установлено, что денатурация оказывает минимальное влияние как на интенсивность сигнала (площади пиков различаются в $\leq 1,3$ раза), так и на определение содержания основных гликановых групп, при этом разница составляет от 0,1 до 1,6%. Отклонения от результатов по относительному содержанию групп гликанов в сравнении с данными, полученными с использованием коммерческого набора, также сопоставимы в пределах ДИ для галактозилированных и сиалирированных гликанов; отклонения для афукозилированных и олигоманнозных гликанов $\leq 2,8\%$. Таким образом, этап денатурации нецелесообразно включать в протокол пробоподготовки МкАТ с типичным профилем гликозилирования Fc-фрагмента и отсутствием дополнительных сайтов гликозилирования Fab-фрагмента. Все объекты исследования подходят под данное требование.

Выбор состава буферного раствора

Максимальная активность ПНГазы F достигается подбором состава буферного раствора.

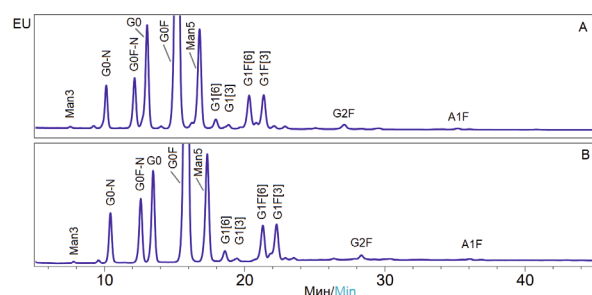


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Хроматограммы гликопрофиля иммуноглобулина класса G2, специфичного к рецептору PD-1: А – пробоподготовка с использованием GlykoPrep; В – пробоподготовка «в растворе». EU – сигнал флуоресценции, мВ.

Fig. 1. Glycoprofile chromatograms of immunoglobulin G2 specific to the PD-1 receptor: A, GlykoPrep sampling protocol; B, in-solution protocol; EU, fluorescence signal, mV.

Для разведения образца анти-PD-1 IgG2 в эксперименте протестировали буферный раствор, содержащий 50 мМ натрия фосфата двузамещенного (рН 7,5) или 10 мМ трис (рН 8,0) (*таблица S3*, дополнительная информация). При использовании обоих растворов результаты эксперимента были сопоставимыми для галактозилированных и сиалирированных гликанов; при использовании 10 мМ Трис – также и для олигоманнозных гликанов, что послужило основанием для выбора данного буфера.

Выбор продолжительности дегликозилирования и соотношения фермент/белок

Продолжительность инкубации с ПНГазой F и реакции мечения гликанов должны быть достаточными для детектирования минорных компонентов гликопрофиля. Условия дегликозилирования оптимизировали при оценке кинетики реакции в интервале от 1 до 21 ч. Дополнительно исследовали влияние разного соотношения ПНГазы F/белок – 2 и 4 мЕД на 100 мкг белка. Результаты эксперимента приведены на *рисунке 2*; сводные данные приведены в *таблице S4* (дополнительная информация).

На графиках (*рис. 2*) прослеживается тенденция к снижению содержания олигоманнозных гликанов при увеличении времени инкубации, что, в свою очередь, влияет на распределение и других гликановых групп. Это может быть связано с неравномерностью отщепления ферментом различных гликанов от белка. Оптимальное время инкубации составило 3 ч (результаты определения содержания олигоманнозных гликанов сопоставимы с таковыми при использовании коммерческого набора). Таким образом, увеличение концентрации фермента до 4 мЕД при инкубации в течение 3 ч не оказывало значимого влияния на интенсивность сигнала гликанов (данные не приведены), а различия по содержанию групп гликанов не превышало 0,6%. В дальнейших экспериментах использовали соотношение 2 мЕД ПНГазы F на 100 мкг белка.

Влияние времени и температуры на дериватизацию гликанов

Реакция мечения с использованием 2-АА протекает более эффективно в кислой среде и при повышенной температуре в отличие от реакции с красителем IAB в составе коммерческого набора. J.C. Vigge с соавт. [20] продемонстрировали, что оптимальный температурный диапазон для данной реакции составляет 60–70 °С, однако такие условия были протестированы

¹² <https://doi.org/10.17632/5r3hiz82tr.1>

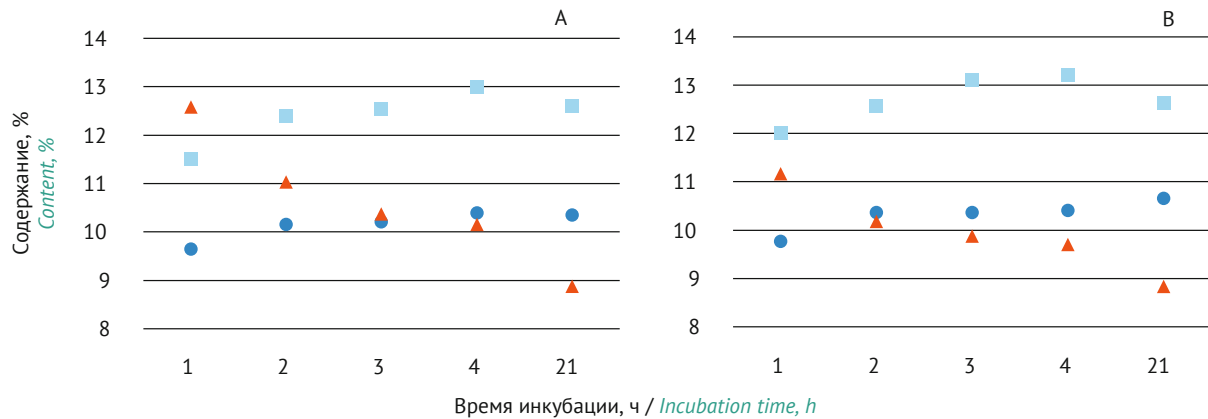


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Содержание гликановых групп иммуноглобулина класса G2, специфичного к рецептору PD-1 при инкубации с пептид-N-гликозидазой F: А – 2 мЕД; В – 4 мЕД. ● Gal – галактозилированные гликаны; ■ Afuc – афукозилированные гликаны; ▲ Man – олигоманнозные гликаны.

Fig. 2. Content of glycan groups of human anti-PD IgG2 during incubation with peptide-N-glycosidase F: A, 2 mEU; B, 4 mEU. ● Gal, galactosylated glycans; ■ Afuc, afucosylated glycans; ▲ Man, oligomannose glycans.

только на некоторых моносиалированных гликанах, характерных для МкАТ.

Для уточнения параметров реакции при анализе МкАТ мы оценили кинетику мечения гликанов на примере канакинумаба и устекинумаба при температурах 37, 50 и 65 °С в интервале от 10 мин до 21 ч. Разница по содержанию гликановых групп канакинумаба, гликопрофиль которого типичен для IgG (рис. 3), на протяжении эксперимента не превышала 1%, но содержание афукозилированных и олигоманнозных гликанов достоверно отличалось в сравнении с результатами, полученными с использованием коммерческого набора (рис. 4А–С и таблицы S5 и S6, дополнительная информация), несмотря на достижение максимальной интенсивности сигнала примерно за 1,5–3 ч (рис. 4D). При этом детектировались даже минорные гликаны с содержанием 0,1–0,2%. Например, для первого пика Man3 соотношение сигнал/шум, рассчитанное согласно требованиям Европейской фармакопеи, достигало 30 за 1,5 ч окрашивания (табл. S6, дополнительная информация).

На основании совокупных данных для дальнейших исследований гликопрофиля МкАТ был выбран режим дериватизации при температуре 65 °С в течение 1,5 ч как приемлемый компромисс между чувствительностью, стабильностью и производительностью метода.

Устекинумаб, производимый в клеточной линии мышинной миеломы Sp2/0, отличается повышенным содержанием иммуногенных сиалированных гликанов с остатками N-гликолилнейраминовой кислоты (Neu5Gc) [37]. Их содержание рекомендуется дополнительно контролировать в ЛП [38]. Для анализа

гликопрофиля устекинумаба был использован более крутой градиент элюирования – от 75 до 62% ПФ Б за 45 мин, что позволило элюировать все сиалированные гликаны до конца разделяющего градиента (рис. 5 и табл. S7, дополнительная информация).

Согласно данным литературы остатки сиаловых кислот лабильны при низких значениях pH, особенно при повышенных температурах. Установлено, что десиамирование происходит тем интенсивнее, чем выше температура и продолжительнее время инкубации. В частности, T. Watanabe с соавт. [39] на модели гликанов, полученных из эритропоэтина, показали, что полисиалированные структуры быстрее теряют остатки сиаловых кислот по сравнению с моносиалированными.

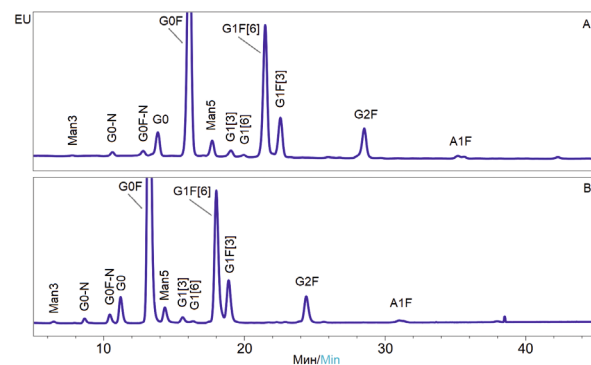


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Хроматограммы гликопрофиля канакинумаба: А – пробоподготовка с использованием GlykoPrep; В – пробоподготовка «в растворе». EU – сигнал флуоресценции, мВ.

Fig. 3. Glycoprofile chromatograms of canakinumab: A, GlykoPrep sampling protocol; B, in-solution protocol. EU, fluorescence signal, mV.

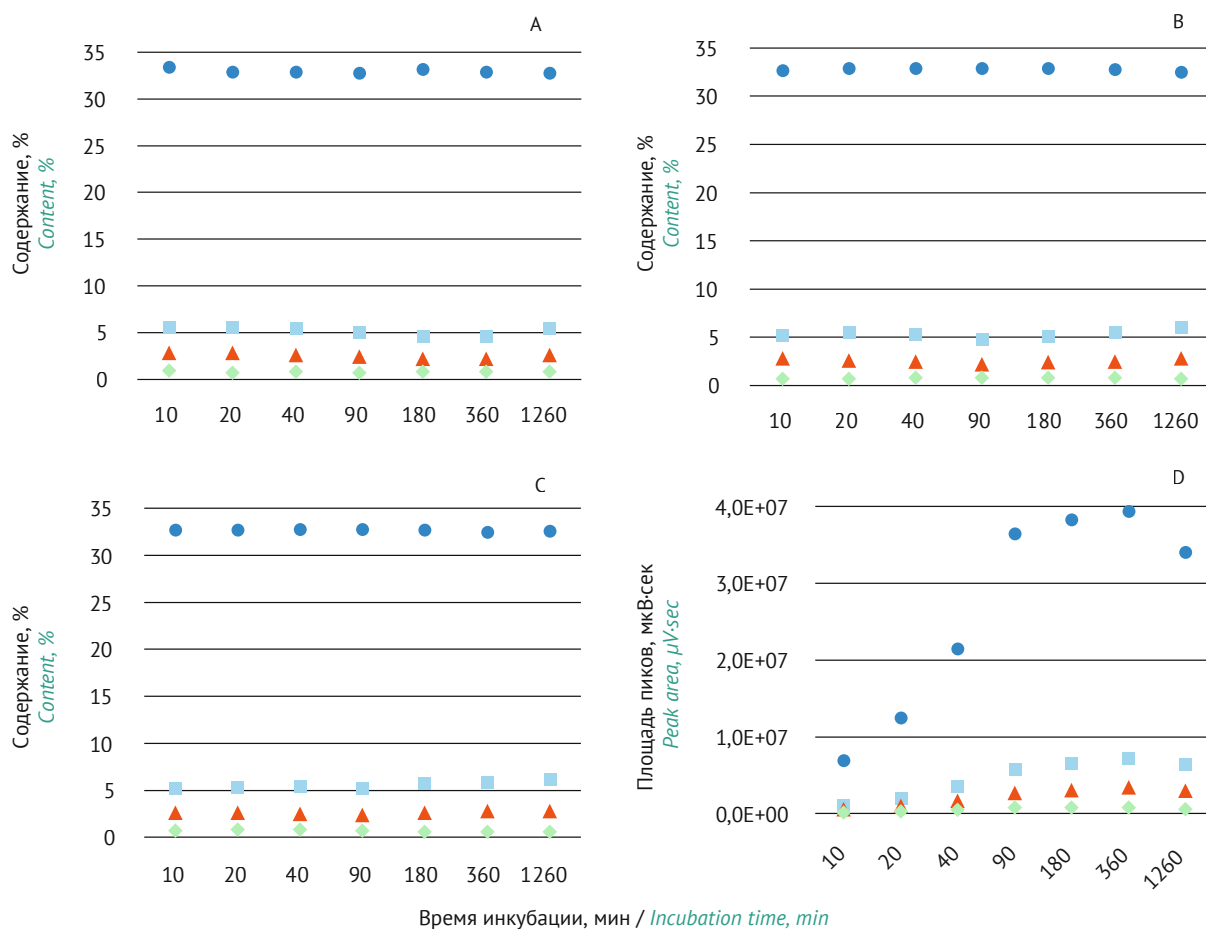


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Содержание гликановых групп канакинумаба при инкубации с 2-аминобензойной кислотой: А – 37 °С; В – 50 °С; С – 65 °С; D – площади пиков гликановых групп канакинумаба при инкубации с 2-аминобензойной кислотой, 65 °С. ● Gal – галактозилированные гликаны; ■ Afuc – афукозилированные гликаны; ▲ Man – олигоманнозные гликаны; ◆ Sial – сиалированные гликаны.

Fig. 4. Content of canakinumab glycan groups during incubation with 2-aminobenzoic acid: A, 37 °C; B, 50 °C; C, 65 °C; D, peak area of canakinumab glycan groups during incubation with 2-aminobenzoic acid, 65 °C. ● Gal, galactosylated glycans; ■ Afuc, afucosylated glycans; ▲ Man, oligomannose glycans; ◆ Sial, sialylated glycans.

Результаты эксперимента подтвердили чувствительность сиалированных форм гликанов к повышенной температуре. Выраженный эффект десиалирования наблюдался только при 65 °С (рис. 6С, D; табл. S8, дополнительная информация). Через 1,5 ч инкубации при 65 °С содержание сиалированных гликанов составило 23,2%, что на 1,4% ниже по сравнению с образцами, выдержанными при температуре 37 °С (24,6%). Увеличение продолжительности инкубации до 21 ч усиливало наблюдаемый эффект: разница в содержании сиалированных форм достигла 5,3% (19,2 и 24,5% при значениях температуры 65 и 37 °С соответственно). Полученные данные согласуются с результатами Т. Watanabe с соавт. [39]. В условиях быстрой дериватизации

красителем IAB эффект десиалирования проявляется в меньшей степени. Несмотря на расхождения в содержании сиалированных форм устекинумаба с данными, полученными при использовании коммерческого набора, были определены оптимальные диапазоны продолжительности инкубации (40–180 мин) и температур (37–50 °С), при которых наблюдается устойчивый результат по содержанию сиалированных форм на уровне 24,4±0,1%.

Сравнение использования разных красителей

Краситель 2-AA в концентрации ≥15%, в том числе в виде солей и эфиров, классифицируется как прекурсор списка I¹³, оборот которого в Российской Федерации ограничен и в отношении

¹³ Постановление Правительства Российской Федерации от 30 июня 1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации».

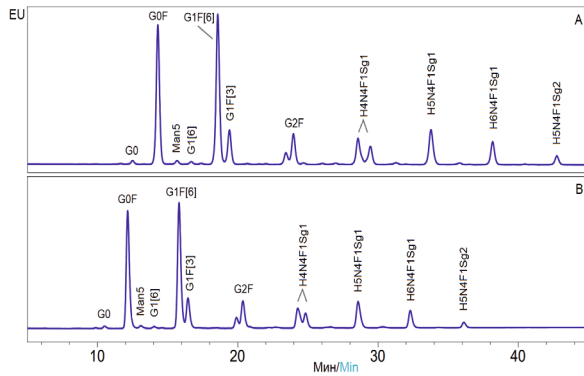


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Хроматограммы гликопрофиля устекинумаба: А – пробоподготовка с использованием Glyko-Prep, В – пробоподготовка «в растворе». Sg – остатки N-гликолилнейраминавой кислоты; EU – сигнал флуоресценции, мВ.

Fig. 5. Glycoprofile chromatograms of ustekinumab: A, Glyko-Prep sampling protocol; B, in-solution protocol; Sg, N-glycolylneuraminic acid residues; EU, fluorescence signal, mV.

которого устанавливаются общие меры контроля. 2-AB, в отличие от 2-AA, не включен в список прекурсоров и более удобен для рутинного использования. Пробоподготовку образцов тоцилизумаба с 2-AB и хроматографический анализ гликанового профиля провели в указанных выше условиях, результаты представлены на *рисунке 7* и в *таблице S9* (дополнительная информация).

При использовании красителя 2-AB в сочетании с хроматографической колонкой AdvanceBio Glycan Map (Agilent) выявлено недостаточное разрешение критических пар пиков гликанов G0F и Man5 (1,35), а также G0F-N и G0 (0,93). Это привело к переоценке содержания олигоманнозных форм тоцилизумаба (3,0 и 2,6% при дериватизации 2-AB и 2-AA соответственно). В связи с этим предпочтение было отдано красителю 2-AA, несмотря на ограничения его оборота. В режиме HILIC удерживание и разделение гликанов в первую очередь определяется их углеводной частью. Природа флуоресцентной метки – гидрофобность, заряд или способность к специфическим взаимодействиям, также может оказывать влияние на селективность разделения. Кроме того, сорбенты от разных производителей отличаются по пористости структуры и плотности иммобилизации модификаторов, что влияет на их взаимодействие с окрашенными гликанами и обуславливает вариации в селективности хроматографического разделения при использовании одной и той же метки. Альтернативные HILIC-колонки XBridge Glycan BEH Amide (Waters) демонстрируют более высокое разрешение

критической пары G0F и Man5 даже при использовании 2-AB¹⁴ (данные не представлены).

Подбор условий очистки гликанов

После этапа дериватизации проводится очистка и концентрирование окрашенных гликанов. В ряде статей описано использование картриджей или планшетов с сорбентами для ТФЭ [26, 27] или полупрепаративной ВЭЖХ, причем для каждого сорбента и колонки подбирают специальные условия кондиционирования, промывки и элюции гликанов. Затем собранные фракции гликанов можно сконцентрировать либо сразу инжестрировать в хроматограф.

Жидкостная экстракция – более удобный и экономичный, чем ТФЭ, вариант, который позволяет достигнуть высокой степени очистки проб и высокого выхода гликанов. При добавлении к водному раствору гликанов 15–17 объемных частей ацетонитрила, перемешивании и центрифугировании проб при 10000 g в течение 2–5 мин гликаны выпадают в осадок. После удаления надосадочной жидкости вновь добавляют растворитель и повторяют процедуру не менее 2 раз. После высушивания осадок, содержащий гликаны, растворяют в воде.

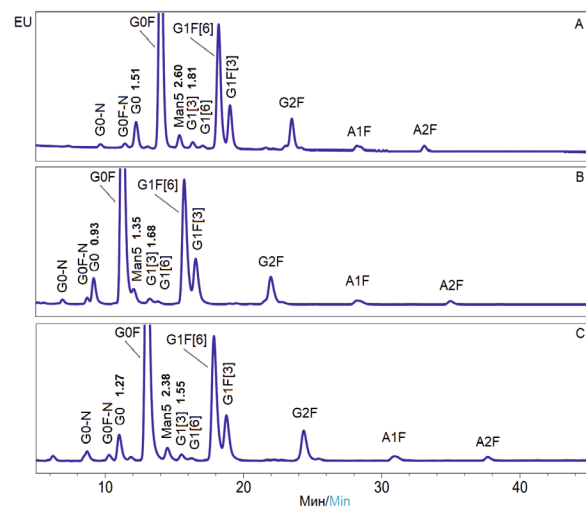


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 7. Хроматограммы гликопрофиля тоцилизумаба: А – пробоподготовка с использованием GlykoPrep; В – пробоподготовка «в растворе» с 2-аминобензамидом; С – пробоподготовка «в растворе» с 2-аминобензойной кислотой. Числа над пиками показывают разрешение с предыдущим пиком. EU – сигнал флуоресценции, мВ.

Fig. 7. Glycoprofile chromatograms of toclizumab: A, Glyko-Prep protocol; B, in-solution protocol with 2-aminobenzamide; C, in-solution protocol with 2-aminobenzoic acid. Numbers above peaks show resolution with previous peak. EU, fluorescence signal, mV.

¹⁴ <https://help.waters.com/content/dam/waters/en/support/usermanuals/2023/720004882en/720004882en.pdf>

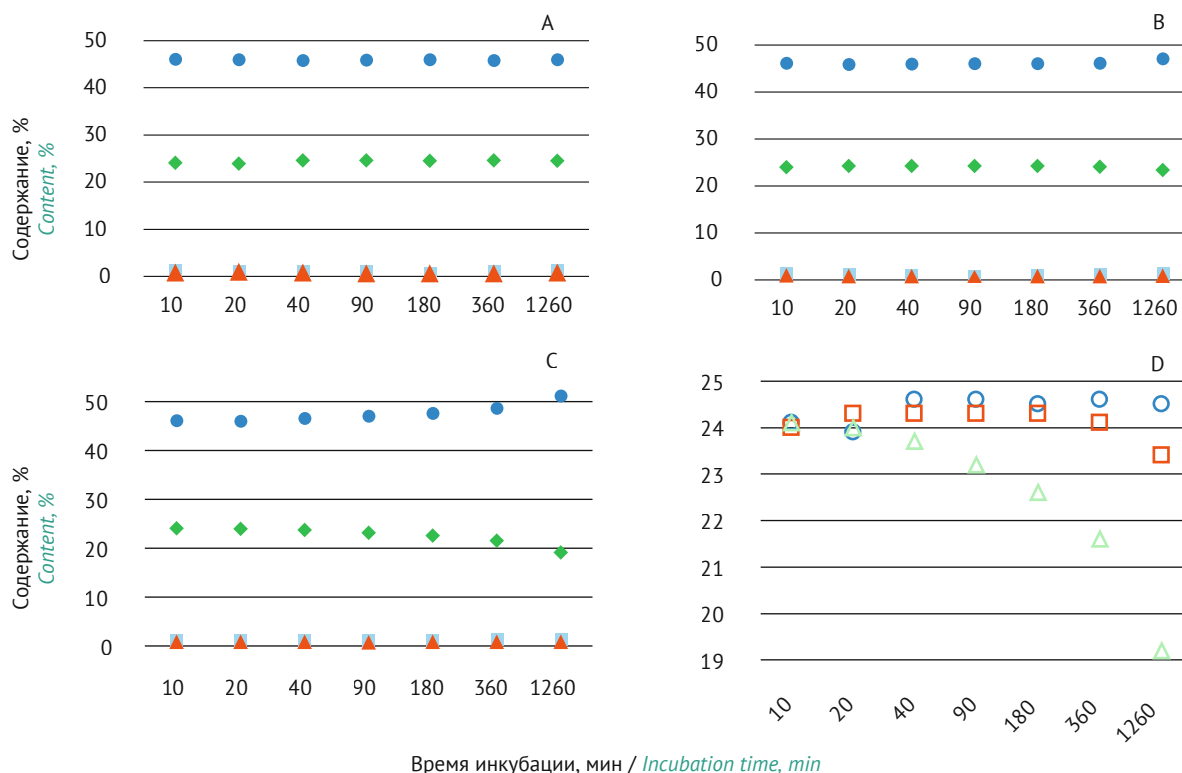


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Содержание гликановых групп в образце устекинумаба при инкубации с 2-аминобензойной кислотой: А – 37 °С; В – 50 °С; С – 65 °С; D – содержание сиалированных гликанов при разных температурах. ● Gal – галактозилированные гликаны; ■ Afuc – афукозилированные гликаны; ▲ Man – олигоманнозные гликаны; ◆ Sial – сиалированные гликаны. ○ Sial(37 °С) – сиалированные гликаны при 37 °С; □ Sial(50°С) – сиалированные гликаны при 50 °С; △ Sial(65°С) – сиалированные гликаны при 65 °С.

Fig. 6. Content of glycan groups in ustekinumab sample during incubation with 2-aminobenzoic acid: A, 37 °C; B, 50 °C; C, 65 °C; D, content of sialylated glycans at different temperatures. ● Gal, galactosylated glycans; ■ Afuc, afucosylated glycans; ▲ Man, oligomannose glycans; ◆ Sial, sialylated glycans. ○ Sial(37 °C), sialylated glycans at 37 °C; □ Sial(50°C), sialylated glycans at 50 °C; △ Sial(65°C), sialylated glycans at 65 °C.

Поскольку присутствующие в пробе примеси белков могут загрязнять аналитические колонки, для продления срока их службы используют защитные предколонки или растворяют осадок, содержащий гликаны, в 50–70% растворе этанола, в котором белки малорастворимы.

Изначально при разработке условий очистки использовали ацетон для экстракции красителя 2-АА. Согласно данным М. Rabst с соавт. [28], предполагалось, что анилиновые красители могут образовывать с кетоном основания Шиффа, что может привести к повышению эффективности экстракции. Однако в ходе экспериментов мы обнаружили, что и ацетонитрил достаточно эффективно экстрагирует 2-АА и 2-АВ. Отметим, что использование ацетонитрила для жидкофазной экстракции флуоресцентных красителей ранее не описывалось. В известных протоколах данный растворитель используется либо на этапе ТФЭ [40, 41], либо для разделения белка и гликанов перед дериватизацией [41], либо перед этапом ТФЭ для осаждения окрашенных гликанов [42].

Сравнение условий пробоподготовки для анализа гликанов

Сравнение результатов, полученных при использовании двух протоколов пробоподготовки – разработанного нами и GlykoPrep, было проведено на примере трех препаратов МкАТ: омализумаба, канакинумаба и натализумаба. Результаты определения содержания галактозилированных и афукозилированных групп гликанов находились в пределах ДИ, рассчитанных для данных, полученных с использованием коммерческого набора (рис. S1 и рис. S2, табл. S10–S12, дополнительная информация). Для содержания олигоманнозных и сиалированных групп гликанов средние отличия между результатами анализа с разными протоколами пробоподготовки не превышали 0,5 и 0,4% соответственно.

Выводы

1. Разработан способ пробоподготовки для количественной характеристики гликанового профиля

- терапевтических антител без использования коммерческих наборов, который характеризуется воспроизводимостью и чувствительностью флуориметрического детектирования. Установлена сопоставимость содержания групп гликанов с результатами, полученными при использовании коммерческого набора.
2. Инкубация с пептид-N-гликозидазой F в буферном растворе, содержащем трис-HCl (pH 8,0), при температуре 37 °C в течение 3 ч без предварительной денатурации белка позволила упростить пробоподготовку без потери чувствительности определения.
 3. Использование 2-аминобензойной кислоты (2-АА) в качестве флуоресцентной метки обеспечивает устойчивое окрашивание гликанов и достаточное разрешение пиков при высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия с детектированием флуоресценции. Инкубация образцов при температуре 65 °C в течение 1,5 ч оптимальна для проведения реакции дериватизации гликанов антител, у которых содержание группы сиалированных гликанов составляет $\leq 3\%$ от общего содержания.
 4. При температуре >50 °C и pH $<5,5$ наблюдается частичное десиалирование гликанов, поэтому для МкАТ, содержащих более 3–5% сиалированных гликанов, режим дериватизации необходимо подбирать экспериментально.
 5. Сочетание флуоресцентной метки и аналитической колонки оказывает существенное влияние на разрешение критических пар пиков гликанов. Использование колонки AdvanceBio Glycan Map и красителя 2-АА позволяет достичь более высокого разрешения пары G0F и Man5 (2,38) по сравнению с 2-АВ (1,35).
 6. Для очистки проб от избытка красителя 2-АА целесообразна замена твердофазной экстракции на жидкофазную экстракцию ацетонитрилом.
 7. Предложенные подходы к пробоподготовке могут быть рекомендованы при разработке методики для рутинного анализа гликанового профиля моноклональных антител класса G, обеспечивая баланс между аналитической точностью, доступностью реагентов и технологической простотой.

Литература / References

1. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. *Essentials of glycobiology*. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022.
2. Mimura Y, Katoh T, Saldova R, et al. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: Challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell*. 2018;9(1):47–62. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0433-3>
3. Beck A, Debaene F, Diemer H, et al. Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies. *J Mass Spectrom*. 2015;50(2):285–97. <https://doi.org/10.1002/jms.3554>
4. Chirino AJ, Mire-Sluis A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. *Nat Biotechnol*. 2004;22(11):1383–91. <https://doi.org/10.1038/nbt1030>
5. Zhou Q, Qiu H. The mechanistic impact of N-glycosylation on stability, pharmacokinetics, and immunogenicity of therapeutic proteins. *J Pharm Sci*. 2019;108(4):1366–77. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.029>
6. Majewska N, Tejada ML, Betenbaugh MJ, Agarwal N. N-Glycosylation of IgG and IgG-like recombinant therapeutic proteins: Why is it important and how can we control it? *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2020;11:311–38. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-102419-010001>
7. Hajba L, Szekrényes Á, Borza B, Guttman A. On the glycosylation aspects of biosimilarity. *Drug Discov Today*. 2018;23(3):616–25. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.009>
8. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009;32(2):107–21. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.11.005>
9. Boune S, Hu P, Epstein AL, Khawli LA. Principles of N-linked glycosylation variations of IgG-based therapeutics: Pharmacokinetic and functional considerations. *Antibodies (Basel)*. 2020;9(2):22. <https://doi.org/10.3390/antib9020022>
10. Ikegami T. Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of biopharmaceutical drugs and therapeutic peptides: A review based on the separation characteristics of the hydrophilic interaction chromatography phases. *J Sep Sci*. 2019;42(1):130–213. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801074>
11. De Leoz MLA, Duewer DL, Fung A, et al. NIST interlaboratory study on glycosylation analysis of monoclonal antibodies: Comparison of results from diverse analytical methods. *Mol Cell Proteomics*. 2020;19(1):11–30. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001677>
12. Cajic S, Hennig R, Grote V, et al. Removable dyes – the missing link for in-depth N-glycan analysis via multi-method approaches. *Engineering*. 2023;26(4):132–50. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.02.016>
13. Kinoshita M, Yamada K. Recent advances and trends in sample preparation and chemical modification for glycan analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;207:114424. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114424>
14. Keser T, Pavic T, Lauc G, Gornik O. Comparison of 2-amino-benzamide, procainamide and rapifluor-MS as derivatizing agents for high-throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan analysis. *Front Chem*. 2018;6:324. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00324>
15. Kameyama A, Dissanayake SK, Thet Tin WW. Rapid chemical de-N-glycosylation and derivatization for liquid chromatography of immunoglobulin N-linked glycans. *PLoS One*. 2018;13(5):e0196800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196800>
16. Zhang Q, Lasanajak Y, Song X. Oxidative release of natural glycans: Unraveling the mechanism for rapid N-glycan glycomics analysis. *Anal Chem*. 2024;96(42):16750–7. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c03246>

17. Magnelli P, Guthrie E, Taron CH, et al. Deglycosylation reagents and methods. US Patent No. US 9964548 B2; 2018. <https://patents.google.com/patent/US9964548B2/en>
18. Tiwold EK, Gyorgypal A, Chundawat SPS. Recent advances in biologic therapeutic N-glycan preparation techniques and analytical methods for facilitating biomanufacturing automation. *J Pharm Sci.* 2023;112(6):1485–91. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.012>
19. Anumula KR, Dhume ST. High resolution and high sensitivity methods for oligosaccharide mapping and characterization by normal phase high performance liquid chromatography following derivatization with highly fluorescent anthranilic acid. *Glycobiology.* 1998;8(7):685–94. <https://doi.org/10.1093/glycob/8.7.685>
20. Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, et al. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem.* 1995;230(2):229–38. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1468>
21. Jeong YR, Kim SY, Park YS, Lee GM. Simple and robust N-glycan analysis based on improved 2-aminobenzoic acid labeling for recombinant therapeutic glycoproteins. *J Pharm Sci.* 2018;107(7):1831–41. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.03.013>
22. Kimzey M, Gyenes A. Compounds for labeling amine-containing compounds, and their use. US Patent No. US 20180156809 A1; 2018. <https://patents.google.com/patent/US20180156809A1/en>
23. Brousmiche DW, Yu Y-Q, Lauber M. Rapid fluorescence tagging of glycans and other biomolecules with enhanced MS signals. US Patent No. US 10436790 B2; 2014. <https://patents.google.com/patent/US10436790>
24. Baginski T. Compounds and methods for rapid labeling of N-glycans. US Patent No. US 8445292 B2; 2013. <https://patents.google.com/patent/US8445292B2/en>
25. Kimzey M. Use of mild electrophiles to reduce artifacts in analyzing glycans released from glycoproteins or glycopeptides. US Patent No. US 20190170763 A1; 2019. <https://patents.google.com/patent/US20190170763A1/en>
26. Stöckmann H, Duke RM, Millán Martín S, Rudd PM. Ultrahigh throughput, ultrafiltration-based n-glycomics platform for ultraperformance liquid chromatography (ULTRA(3)). *Anal Chem.* 2015;87(16):8316–22. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01463>
27. Kinoshita M, Nakatani Y, Yamada K, et al. A rapid and facile preparation of APTS-labeled Nglycans by combination of ion pair-assisted extraction and HILIC-SPE for routine glycan analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2021;195:113875. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113875>
28. Pabst M, Kolarich D, Pörtl G, et al. Comparison of fluorescent labels for oligosaccharides and introduction of a new postlabeling purification method. *Anal Biochem.* 2009;384(2):263–73. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.09.041>
29. Xie Y, Mota LM, Bergin A, et al. High-throughput and high-sensitivity N-glycan profiling: A platform for biopharmaceutical development and disease biomarker discovery. *Anal Biochem.* 2021;623:114205. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114205>
30. Trbojević-Akmačić I, Lageveen-Kammeijer GSM, Heijs B, et al. High-throughput glycomic methods. *Chem Rev.* 2022;122(20):15865–913. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01031>
31. Sun X, Tao L, Yi L, et al. N-glycans released from glycoproteins using a commercial kit and comprehensively analyzed with a hypothetical database. *J Pharm Anal.* 2017;7(2):87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.004>
32. Helali Y, Delporte C. Updates of the current strategies of labeling for N-glycan analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2024;1237:124068. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124068>
33. Aich U, Lakbub J, Liu A. State-of-the-art technologies for rapid and high-throughput sample preparation and analysis of N-glycans from antibodies. *Electrophoresis.* 2016;37(11):1468–88. <https://doi.org/10.1002/elps.201500551>
34. Reusch D, Habegger M, Maier B, et al. Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles – part 1: Separation-based methods. *MAbs.* 2015;7(1):167–79. <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.986000>
35. Segu Z, Stone T, Berdugo C, et al. A rapid method for relative quantification of N-glycans from a therapeutic monoclonal antibody during trastuzumab biosimilar development. *mAbs.* 2020;12(1):1750794. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1750794>
36. Subedi GP, Barb AW. The structural role of antibody N-glycosylation in receptor interactions. *Structure.* 2015;23(9):1573–83. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.015>
37. Cantin G, Liu Q, Shah B, et al. Analytical and functional similarity of the biosimilar candidate ABP 654 to ustekinumab reference product. *Drugs R D.* 2023;23(4):421–38. <https://doi.org/10.1007/s40268-023-00441-7>
38. Alt N, Zhang TY, Motchnik P, et al. Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals.* 2016;44(5):291–305. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.06.005>
39. Watanabe T, Inoue N, Kutsukake T, et al. Labeling conditions using a 2-aminobenzamide reagent for quantitative analysis of sialo-oligosaccharides. *Biol Pharm Bull.* 2000;23(3):269–73. <https://doi.org/10.1248/bpb.23.269>
40. Li M, Shen S, Letarte S, Flick T. Discovery and characterization of novel G0 glycan isomers in an afucosylated therapeutic antibody using liquid chromatography – mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2025;36(5):1034–40. <https://doi.org/10.1021/jasms.4c00474>
41. Аскретков АД, Шаталов ДО. Разработка методики определения профиля гликозилирования в субстанции экулизумаб и иных моноклональных антителах. В кн.: Марданлы СГ, Помазанов ВВ, Киселева ВА, ред. *Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации.* Орехово-Зуево; 2021. С. 30–6. Askretkov AD, Shatalov DO. Development of a methodology for determining the glycosylation profile in eculizumab and other monoclonal antibodies. In: Mardanyly SG, Pomazanov VV, Kiseleva VA, eds. *Prospects for the introduction of innovative technologies in medicine and pharmacy.* Orekhovo-Zuevo; 2021. P. 30–6 (In Russ.). EDN: NCOEMC
42. Zhang Q, Azzam T, Lasanajak Y, et al. Oxidative release of natural glycans (ORNG): Preparation of truncated N-glycans for engineering glycoproteins. *Chem Eur J.* 2025;31:e202501020. <https://doi.org/10.1002/chem.202501020>

Дополнительная информация. Таблицы S1–S12, рисунки S1 и S2, подтверждающие выводы этого исследования, находятся в открытом доступе в Mendeley Data по адресу: <https://doi.org/10.17632/5r3hjz82tr.1>

Additional information. Tables S1–S12, figures S1 and S2, supporting the findings of this study, are publicly available at Mendeley Data: <https://doi.org/10.17632/5r3hjz82tr.1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.Ю. Неронова** — концепция и дизайн исследования, выполнение экспериментов, анализ данных, обсуждение и редактирование текста рукописи, формулировка выводов и утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **И.А. Каргополов** — концепция и дизайн исследования, выполнение экспериментов и анализ данных, написание и обсуждение текста рукописи, формулировка выводов; **А.А. Меринов** — обработка и анализ данных, написание текста рукописи; **Е.В. Зубарева** — формулировка выводов, обсуждение и редактирование текста рукописи; **А.А. Калмыкова** — выполнение экспериментов и анализ данных.

Благодарности. Авторы благодарны коллективу АО «ГЕНЕРИУМ» за помощь в организации экспериментальной работы и сборе данных.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.Yu. Neronova** conceptualized and designed the study, conducted experiments and analyzed data, discussed, revised the manuscript, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication. **I.A. Kargopolov** conceptualized and designed the study, conducted the experiments, processed and analysed data, drafted and discussed the manuscript, and formulated the conclusions. **A.A. Merinov** processed and analysed data and drafted the manuscript. **E.V. Zubareva** discussed and revised the manuscript, and formulated the conclusions; **A.A. Kalmykova** conducted the experiments and analyzed the data.

Acknowledgements. The authors are grateful to the team of GENERIUM JSC for their help in organizing the experiments and collecting the data.

Об авторах / Authors

Неронова Мария Юрьевна / Maria Yu. Neronova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6029-4563>

Каргополов Иван Андреевич / Ivan A. Kargopolov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6049-9322>

Меринов Артем Андреевич / Artem A. Merinov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-1768-8992>

Калмыкова Алена Александровна / Alena A. Kalmykova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9452-7879>

Зубарева Екатерина Валерьевна / Ekaterina V. Zubareva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6178-0050>

Поступила 01.10.2025

После доработки 17.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Online First 10.04.2026

Received October 1, 2025

Revised February 17, 2026

Accepted March 13, 2026

Online First April 10, 2026