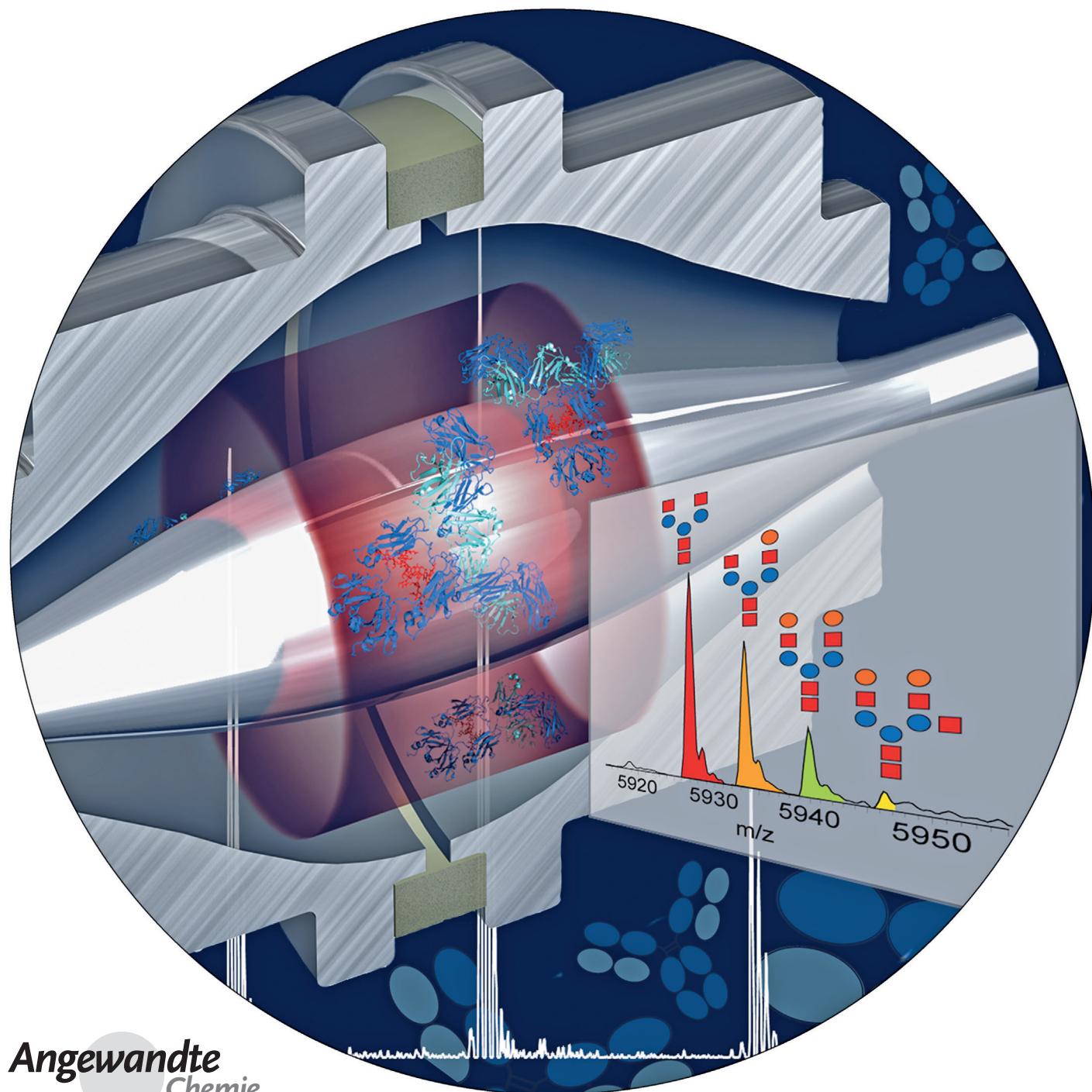


Etablierung eines Orbitrap-Analysators zur Charakterisierung von intakten Antikörpern mittels nativer Massenspektrometrie**

Sara Rosati, Rebecca J. Rose, Natalie J. Thompson, Esther van Duijn,
Eugen Damoc, Eduard Denisov, Alexander Makarov und Albert J. R. Heck*



Eine Hauptklasse der von der biopharmazeutischen Industrie entwickelten therapeutischen Biomoleküle sind monoklonale Antikörper (mAbs), deren Popularität sich hauptsächlich durch ihre hohe Antigen-Spezifität begründet. Therapeutische mAbs werden für zahlreiche Krankheiten entwickelt, wobei der Fokus vor allem auf Krebs- und immunologischen Erkrankungen liegt.^[1] Alle derzeit für den klinischen Gebrauch zugelassene Antikörper bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und somit insgesamt ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa aufweisen. Auf Antikörpern basierende Biopharmazeutika sind oft aus komplexen und heterogenen Molekülen zusammengesetzt, weshalb eine Reihe verschiedener analytischer Methoden zur vollständigen Charakterisierung erforderlich ist.

In diesem Zusammenhang erwächst der Massenspektrometrie (MS) eine zunehmende Bedeutung für die mAbs-Analytik.^[2] MS ist dabei vielseitig einsetzbar, z.B. zur Strukturaufklärung, Charakterisierung von Glykan-Profilen, Lokalisierung von Disulfidbrücken, Bestimmung posttranskriptionaler Modifikationen oder zur Kartierung von Epitopen.^[3] Für die meisten dieser Anwendungen wird die massenspektrometrische Analyse auf Peptidebene durchgeführt. Dies erfordert vor der eigentlichen Analyse zahlreiche Probenvorbereitungsschritte; u.a. Denaturierung, Reduktion, Alkylierung, enzymatischer Verdau und Glykanfreisetzung, wobei jeder dieser Schritte Unwägbarkeiten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit mit sich bringt.

Prinzipiell ist die direkte MS-Analyse intakter Antikörper, entweder in denaturierter oder nativer Form, ein unkomplizierterer Ansatz. Während die MS-Analytik unter denaturierenden Bedingungen mittlerweile routinemäßig eingesetzt wird,^[2b,c] entwickelt sich MS unter nichtdenaturierenden Bedingungen, d.h. native MS, ebenfalls zu einer praktikablen Alternative zur genauen Messung des Moleküls.

languagewichts intakter Antikörper. Native MS, wie kürzlich definiert,^[4] wird eingesetzt, um die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen und Proteinkomplexen aufzuklären. So können Informationen erhalten werden, die mithilfe anderer Verfahren nicht zugänglich sind, wodurch eine vollständigere Charakterisierung der Antikörper ausgehend von einer einzelnen Analyse möglich ist. Bewährte Anwendungen nativer MS reichen von Antikörper-Antigen-Bindungsstudien^[5] über die Evaluierung struktureller Eigenschaften, Dynamiken und Wechselwirkungsstärken^[6] bis hin zu qualitativer und halbquantitativer Analyse von mAb-Mischungen.^[7] Eine Weiterentwicklung der analytischen Plattform hinsichtlich Empfindlichkeit, Massengenauigkeit, Auflösungsvermögen und Robustheit würden die Analyse nativer, intakter Antikörper dabei substanziell verbessern. In Richtung dieses Ziels haben wir die native MS kürzlich durch den Einsatz eines modifizierten Orbitrap-Massenanalysators weiterentwickelt, sodass eine signifikante Leistungssteigerung im Vergleich zu den für diese Messungen üblicherweise eingesetzten TOF-Instrumenten erreicht wurde (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).^[2b,8] Anfänglich haben wir die Leistungsfähigkeit dieser neuen Plattform durch die Analyse sehr großer Proteinkomplexe, z.B. GroEL (800 kDa) aus *E. coli* und das 20S-Proteasom (730 kDa) aus *S. cerevisiae*, demonstriert.^[9] Hier stellen wir die enorme Vielseitigkeit der neuen Orbitrap-Plattform im Rahmen der Charakterisierung von mAbs vor, wodurch das Erreichen dringender Erfordernisse der biopharmazeutischen Industrie möglich wird.

Eine der Herausforderungen in der Charakterisierung von IgGs ist die in beiden schweren Ketten vorkommende N-verknüpfte Glykosylierungstelle. Die Charakteristiken dieser Glykankette sind stark abhängig von der Zelllinie, die zur Proteinexpression eingesetzt wird, und beeinflussen sowohl die Bindung des Antikörpers zum entsprechenden Fc-Rezeptor als auch dessen Halbwertszeit im Serum.^[10] Daher ist eine umfassende Charakterisierung der verschiedenen Glykanketten für therapeutische mAbs unumgänglich. Abbildung 2 zeigt native Massenspektren von deglykosylierten und glykosylierten IgGs (ca. 146 kDa) die mit statischer Nano-Electrospray-Ionisation auf einem modifizierten Exactive-Plus-Instrument (Abbildung 1, siehe auch *Experimentelles*) aufgenommen wurden. Die Moleküllionen sind typischen nativen ESI-MS-Spektren entsprechend nur über wenige Ladungszustände verteilt (hauptsächlich von 23+ bis 27+). Die verschiedenen Glykoformen der Antikörper sind dabei eindeutig grundliniengetrennt, wodurch eine exakte Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Glykanen möglich ist ($\Delta M_w = 162$ Da, entspricht dem Molekulargewicht eines Hexose-Moleküls (Galactose), Abbildung 2 b). Das in diesem Spektrum erzielte Auflösungsvermögen ermöglicht die Auflösung von kleinen Massenunterschieden bis hin zu 25 Da, wodurch die Identifizierung von unterschiedlichen Modifizierungen wie Glykosylierung, C-terminale Lysin-Abspaltung oder sogar von Primärsequenzmutationen ermöglicht wird. Um dies zu verdeutlichen, haben wir die verschiedenen Glykoformen eines Antikörper-basierten Konstrukts mit einem sehr heterogenen Glykanmuster aufgeklärt und zugeordnet (Abbildung 2 c). Diese Daten können darüber hinaus bereits durch eine einzelne Analyse innerhalb weniger Se-

[*] S. Rosati,^[+] Dr. R. J. Rose,^[+] Dr. N. J. Thompson, Dr. E. van Duijn, Prof. A. J. R. Heck
Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics
Bijvoet Centre and Utrecht Institute of Pharmaceutical Sciences
Utrecht University and Netherlands Proteomics Center
Padualaan 8, Utrecht 3584 CH (Niederlande)
E-Mail: a.j.r.heck@uu.nl
Homepage: bioms.chem.uu.nl
Dr. E. Damoc, Dr. E. Denisov, Dr. A. Makarov
Thermo Fisher Scientific (Bremen)
Hanna-Kunath-Straße 11, Bremen 28199 (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch STW (Projekt 10805), das PRIME-XS-Projekt, Förderungsnummer 262067, und durch das PROSPECTS Netzwerk (Förderungsnummer HEALTH-F4-2008-201648), welche beide im Zuge des 7. Rahmenprogramms der Europäischen Union finanziert werden. Dank geht an The Netherlands Proteomics Center, Teil der Netherlands Genomics Initiative für die großzügige finanzielle Unterstützung. Die Autoren danken Merus und Genmab für die Unterstützung und die Bereitstellung von Materialien. Wir danken Christian K. Frese für die Übersetzung dieses Artikels aus dem Englischen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201206745> zu finden.

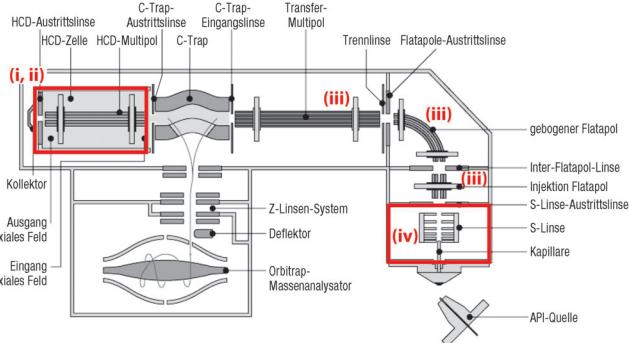


Abbildung 1. Aufbau des modifizierten Exactive-Plus-Geräts (Thermo Fisher Scientific, Deutschland); im Detail beschrieben in Lit. [9]. Die Modifizierungen umfassen: (i) Lagerung von Ionen in der HCD-Zelle anstatt in der C-trap um die Ionen effizienter einzufangen und die Desolvatisierung zu erhöhen, (ii) manuelle Regulierung des Xe-Gasdrucks in der HCD-Zelle, (iii) Anpassung der Spannungen an den Flatapol- und Transfermultipolen, (iv) Aktivierung von „In-source“-Dissoziationsenergie und (v) modifizierte Software zur Anwendung der maximalen RF-Spannungen an allen RF-Multipolen (inklusive der C-trap), um Messungen im Massenbereich bis m/z 30000 zu ermöglichen.

kunden aufgenommen werden, wodurch üblicherweise nur wenige Femtomol pro Probe benötigt werden. Die zuverlässige Zuordnung von Modifizierungen der Antikörper kann in diesen Spektren durch eine spektrale Auflösung von bis zu 12000 im m/z -Bereich um 6000 zusammen mit einer hohen Massengenaugigkeit ($< 1.5 \text{ Da}/\delta = 10 \text{ ppm}$, d.h. 0.001 %) erreicht werden. Für denaturierte Antikörper kann mit FT-ICR im niedrigeren m/z -Bereich sogar ein noch höheres Auflösungsvermögen erreicht werden, was allerdings zu Lasten von Empfindlichkeit und Detektionsgeschwindigkeit geht.^[11]

Durch die sich verändernden Produktionsabläufe in der pharmazeutischen Industrie hin zur Herstellung von synthetischen Konstrukten, z.B. coexprimierten Mischungen, Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten oder Antikörper-DNA-Konjugaten, wird die Probenkomplexität, neben der bereits aus Glykanen und anderen Modifizierungen resultierenden strukturellen Heterogenität, weiter erhöht. Mischungen mehrerer monoklonaler Antikörper erfreuen sich als potenzielle therapeutische Wirkstoffklasse aufgrund synergistischer Effekte bei minimalen zusätzlichen Kosten zunehmender Beliebtheit, erfordern jedoch auch neue, speziell entwickelte analytische Verfahren.^[7,12] Um das Leistungsvermögen des Orbitrap-Analysators in dieser Hinsicht zu untersuchen, haben wir eine komplexe Mischung bestehend aus zehn deglykosylierten monoklonalen Antikörpern analysiert (Abbildung 3a). Für jeden Ladungszustand (Abbildung 3a,b) wurden neun verschiedene Peaks detektiert, welche eindeutig den individuellen Komponenten der Mischung durch Messung des jeweiligen exakten Molekulargewichts zugeordnet werden können. Nur die Peaks zweier Komponenten, die sich nur durch eine Massendifferenz von 20 Da (entspricht $< 0.8 \text{ Th}$) unterscheiden, konnten nicht komplett differenziert werden. (Anmerkung: Die Breite der Isotopenverteilung eines Antikörpers entspricht ca. 25 Da.)^[2b] Das experimentelle spektrale Auflösungsvermögen der Orbitrap ermöglicht darüber hinaus auch die Analyse von glykosylierten mAbs (Abbildung 3c,d). Jede der vier verschiedenen IgG-Spezies führt zu

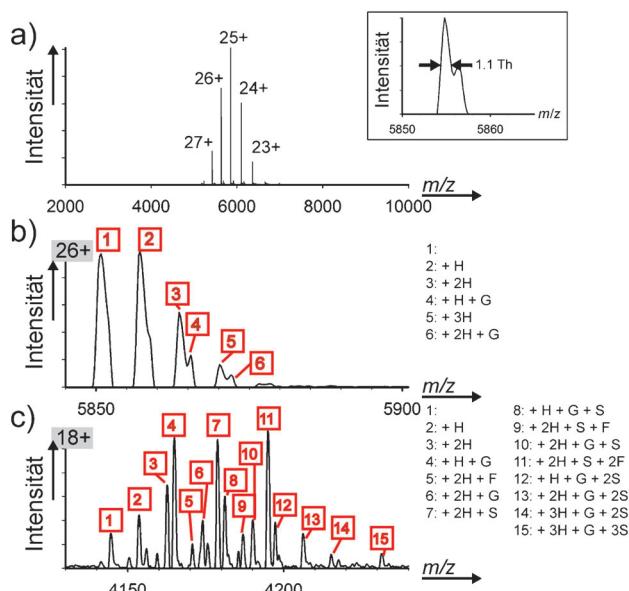


Abbildung 2. Analyse von Antikörper-Glykanformen mit nativer Orbitrap MS. Native Massenspektren von IgG mit zunehmend komplexen Glykanprofilen: a) Das komplette native Spektrum eines deglykosylierten IgG zeigt, dass alle Ionensignale auf fünf Hauptladungszustände verteilt sind ($23 \leq z \leq 27$). Die aus diesem Spektrum bestimmte exakte Masse (146.352.4 Da) weicht nur um $\delta = 2 \text{ ppm}$ von der theoretisch berechneten Masse ab (146.352.6 Da). Hervorgehoben ist der Ladungszustand 25+ mit einer Peakbreite von 1.1 Th. b,c) Native Massenspektren eines einzelnen Ladungszustands eines glykosylierten intakten IgGs (b) bzw. eines hochglykosylierten IgG-Halbmoleküls (c), bei dem die Signale der verschiedenen Glykoformen grundliniengetrennt sind. Basierend auf der m/z -Differenz zwischen den Peaks (162 Da, Hexose/Galactose, H; 203 Da, GlcNAc, G; 146 Da, Fucose, F; 291 Da, Sialinsäure, S) wurden die individuellen Glykoformen den Peaks zugeordnet (siehe auch die Liste rechts im Spektrum).

fünf gut aufgelösten Peaks die jeweils fünf verschiedenen Glykanstrukturen zugeordnet werden können. Aus dem Spektrum wird auch ersichtlich, dass alle Antikörper dieselben Glykanmodifizierungen zu gleichen Anteilen aufweisen. Daraus folgt, dass sowohl die relative Anzahl der vier Antikörperkomponenten also auch deren Glykanprofile durch eine einzelne Orbitrap-MS-Analyse bestimmt werden kann.

Ähnliche Ergebnisse wie die oben beschriebenen können auch auf einer Q-TOF-Plattform erzielt werden, was jedoch unter „nativen“ Bedingungen nur mit geringerem Auflösungsvermögen möglich ist (Abbildung S1).^[7,8] Wir erklären das höhere Auflösungsvermögen größtenteils mit der deutlich besseren Desolvatisierung der Ionen, welche in der Ionenquelle und in der Xenon-gefüllten HCD-Zelle der Orbitrap stattfindet. Ein potenzieller Vorteil von nativer MS ist, dass das Signal auf nur wenige Ladungszustände konzentriert wird, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit von sich überlappenden Ionen anderer Proteine reduziert. Mit nativer MS ist es weiterhin ebenso möglich, nichtkovalente Wechselwirkungen, z.B. Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Wechselwirkungen, simultan zu messen. Dies umfasst im Zusammenhang mit mAbs unter anderem die Untersuchung von Antikörper-Antigen-Bindung,^[5,13] nichtkovalent gebundenen Antikörperstrukturen^[6] und von Oligomerisierung/Aggrega-

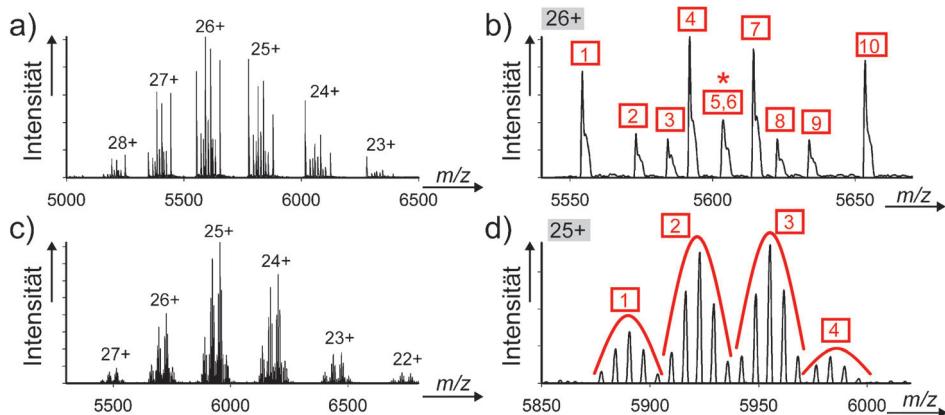


Abbildung 3. Analyse einer Kombinationsmischung von Antikörpern mit nativer Orbitrap-MS: a) Komplettes natives Massenspektrum einer Mischung von zehn deglykosylierten IgG Antikörpern und b) eine Vergrößerung des Ladungszustands 26+. Durch die gut aufgetrennten Ionensignale und die Messung der genauen Massen können acht von zehn Komponenten eindeutig zugeordnet und relativ quantifiziert werden. Die mit einem Sternchen markierten Signale stammen von zwei Komponenten, deren Molekulargewicht sich nur um 20 Da (0.8 Th) voneinander unterscheidet. c) Komplettes natives Massenspektrum einer aus vier glykosylierten Antikörpern zusammengesetzten Mischung und d) eine Vergrößerung des Ladungszustands 25+. Auch hier ermöglichen die gut aufgetrennten Ionensignale und die Messung der genauen Massen die eindeutige Identifizierung und relative Quantifizierung von allen vier Antikörpern. Dadurch wird ersichtlich, dass die Glykanmuster der vier Antikörper sehr ähnlich sind.

tion.^[14] Die Etablierung dieser Art von Analysen auf der Orbitrap-Plattform ermöglichte es uns als nächstes, nichtkovalente Antikörperspezies und Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen zu analysieren.

IgG4-Moleküle können als Dimere nichtkovalent gebundener Paare von schweren und leichten Ketten vorkommen. Das Entfernen der an Disulfidbrücken reichen Scharnier-Region ($\text{IgG}4\Delta\text{hinge}$) verstärkt diesen Effekt, und durch Punktmutationen kann die Stärke der Assoziation der schweren Ketten weiter modifiziert werden.^[6] Im Rahmen dieser Studie haben wir auf einer Orbitrap eine $\text{IgG}4\Delta\text{hinge}$ -Variante mit schwacher Bindungskonstante ($K_D > 100 \mu\text{M}$) und eine weitere mit deutlich höherer Affinität der schweren Ketten ($K_D < 1 \text{ nm}$) analysiert. Die Orbitrap-Massenspektren enthalten ein 75 kDa schweres Monomer für das zuerst genannte Konstrukt (Abbildung S2a) und eine dimere Spezies mit einem Molekulargewicht von 150 kDa für das letztgenannte Konstrukt (Abbildung S2b). Diese repräsentieren erwartungsgemäß die „halben“ und „intakten“ Strukturen und belegen somit, dass die nichtkovalente Assoziation der schweren Ketten während der Orbitrap-Analyse erhalten bleibt.

Antikörper-Antigen-Studien sind zweifellos von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung therapeutischer Antikörper. Bei der Analyse von Proteinen mit nativer MS werden deren dreidimensionale Struktur und folglich auch die Bindungseigenschaften zumindest teilweise aufrechterhalten.^[13] Nach der Inkubation von monoklonalen IL6-IgG1-Antikörpern mit dem entsprechenden Antigen wurde ein natives Massenspektrum dieser Mischung aufgenommen. Die Analyse ergibt drei Ladungszustandscluster, die dem Antikörper mit keinem, einem und zwei gebundenen IL6-Molekülen entsprechen (Abbildung 4). Dies beweist, dass die Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen während der

Analyse erhalten bleibt und dass die Ladungszustandscluster der verschiedenen Komplexe deutlich voneinander getrennt sind. Native MS auf einer Orbitrap ist daher eine effektive und effiziente Methode zur Untersuchung von Antikörper-Antigen-Bindung und liefert im Unterschied zu anderen Techniken, welche nur die durchschnittliche Bindung messen, Informationen über jeden individuellen Bindungszustand.

Von einem experimentellen Standpunkt aus gesehen ist die Analyse monoklonaler Antikörper mit nativer MS schnell und empfindlich. Ausgehend von einer aufgereinigten Proteinlösung beschränkt sich die weitere Probenvorbereitung ausschließlich auf den Entsalzungs- oder Pufferaustauschschritt und die eigentliche Mes-

sung kann innerhalb einer Minute durchgeführt werden. Die erfolgreiche Analyse eines monoklonalen IgG-Antikörpers bis hinunter zu einer Konzentration von nur 1 nm verdeutlicht die Empfindlichkeit unserer Methode. Abbildung S3 zeigt als Beispiel ein unbearbeitetes Spektrum einer 15-sekündigen Aufnahme von einer 5 nm Lösung. Ein Ladungszustandscluster mit einem Signal-Rausch-Verhältnis > 10 ist eindeutig erkennbar. Bei einer geschätzten Flussrate der hier eingesetzten Nano-ESI-Kapillaren von $1 \mu\text{L h}^{-1}$ entspricht dies ungefähr 20 Attomol.

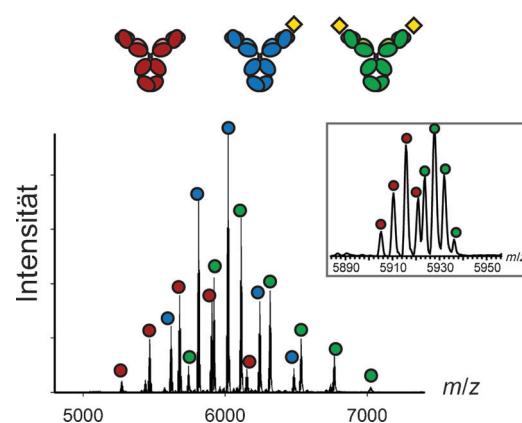


Abbildung 4. Untersuchung der Antikörper-Antigen-Bindung mit nativer Orbitrap-MS. Natives Massenspektrum eines anti-IL6-Antikörpers, der mit dem IL6-Antigen inkubiert wurde. Es ergeben sich drei gut aufgetrennte Ladungszustandscluster welche dem ungebundenen mAb (rote Kreise, 147.639.2 Da), mAb-IL6 (blaue Kreise, 168.547.5 Da) und mAb-(IL6)₂ (grüne Kreise, 189.452.8 Da) entsprechen (siehe auch die schematischen Strukturen). Die Vergrößerung des m/z -Bereichs 5890–5950 zeigt die Auftrennung der Glykoformen der verschiedenen Spezies mit ähnlichen m/z -Werten. Die hier angegebenen Massen entsprechen den häufigsten Glykoformen.

Diese hoch empfindlichen und experimentell einfachen Analysen stellen eine sehr leistungsstarke Methode zur Proteincharakterisierung dar. Das verbesserte Auflösungsvermögen des Orbitrap-Analysators im hohen *m/z*-Bereich ist sehr vorteilhaft zur Untersuchung naturgemäß heterogener Proteine wie Antikörper. Die Grundlinientrennung verschiedener Ionen mit geringen Massenunterschieden ermöglicht die verlässliche qualitative und potenziell auch quantitative Charakterisierung von Antikörpermischungen, verschiedener Glykosylierungszustände einzelner Antikörper, nichtkovalenter Wechselwirkungen und Antikörper-Antigen-Bindung. Die hier vorgestellte Technik ermöglicht die Analyse sehr komplexer Mischungen unterschiedlicher Verbindungen und könnte z. B. auch genutzt werden, um Verunreinigungen oder Abbauprodukte von mAbs, diverse post-transkriptionale Modifizierungen an mAbs oder mAb-Wirkstoffkonjugate zu untersuchen. Native MS auf einer Orbitrap stellt daher eine extrem leistungsstarke Möglichkeit zur Charakterisierung von Antikörpern dar, und wir sind insbesondere davon überzeugt, dass diese Technik die Analytik therapeutischer Antikörper innerhalb der pharmazeutischen Industrie signifikant verbessern kann.

Experimentelles

Antikörperproben, produziert in HEK293T-Zellen, wurden von Merus und Genmab freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle aufgereinigten Proteine wurden in Ammoniumacetat (100 mM oder 150 mM, pH 7 oder 7.5) mit 10- oder 5-kDa-MWCO-Zentrifugationsfiltersäulen (Vivaspin 500; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) ausgetauscht. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm bestimmt, und die Proben wurden auf 2 µm verdünnt. Falls erforderlich wurde die enzymatische Deglykosylierung der Antikörper durch Inkubation von 25 µg Protein mit einer Einheit N-Glycosidase F (PNGaseF; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bei 37°C über Nacht durchgeführt. Für die Antikörper-Antigen-Bindungsstudien wurden die Proteine im Antikörper/Antigen-Verhältnis 1:4 gemischt. Zur Untersuchung der Empfindlichkeit wurde eine Verdünnungsreihe eines deglykosylierten IgG1 bis hinunter zu einer Konzentration von 1 nM angesetzt.

Ungefähr 1–2 µL jeder Probe wurden in goldbeschichteten Glas-Nano-ESI-Kapillaren (hausintern hergestellt) appliziert. Eine Spannung von 1.2 bis 1.6 kV wurde zwischen Kapillare und Massenspektrometer angelegt. Die Daten wurden auf einem modifizierten Exactive-Plus-Gerät im Massenbereich von 400–30000 Th aufgenommen. Die Ionen wurden für verbesserte Empfindlichkeit und Desolvatisierung in die HCD-Zelle transportiert, bevor sie über C-Trap zur Orbitrap transferiert wurden. Der Stickstoff-Druck in der HCD-Zelle wurde mithilfe eines manuellen Ventils dem jeweiligen Experiment angepasst. Die Spannungs-„Offsets“ an den Flatapoll- und Transportmultipolen wurden manuell eingestellt, um die Transmission großer Proteinkomplexe zu erhöhen. Das Auflösungsvermögen wurde der jeweiligen Messung entsprechend zwischen 9000 und 70000 bei 200 *m/z* angepasst. „In-source“-Dissoziation wurde aktiviert (100–200 V), um die Desolvatisierung zu unterstützen. Die Massenkalibrierung wurde unter Verwendung von Ammoniumhexafluorophosphat-Clustern oder Caesiumiodid durchgeführt.

Eingegangen am 20. August 2012,
veränderte Fassung am 2. Oktober 2012
Online veröffentlicht am 22. November 2012

Stichwörter: Analytische Methoden · Antikörper · Biopharmazie · Native Massenspektrometrie · Orbitrap

- [1] J. M. Reichert, *MABS* **2011**, *3*, 76–99.
- [2] a) P. V. Bondarenko, T. P. Second, V. Zabrouskov, A. A. Makarov, Z. Zhang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 1415–1424; b) Z. Zhang, H. Pan, X. Chen, *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 147–176; c) A. Beck, S. Cianferani, A. Van Dorsselaer, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4637–4646.
- [3] a) S. L. Wu, H. Jiang, Q. Lu, S. Dai, W. S. Hancock, B. L. Karger, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 112–122; b) D. Bagal, J. F. Valliere-Douglass, A. Balland, P. D. Schnier, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6751–6755; c) S. Sundaram, A. Matathia, J. Qian, J. Zhang, M. C. Hsieh, T. Liu, R. Crowley, B. Parekh, Q. Zhou, *MABS* **2011**, *3*, 505–512; d) L. Mauko, A. Nordborg, J. P. Hutchinson, N. A. Lacher, E. F. Hilder, P. R. Haddad, *Anal. Biochem.* **2011**, *408*, 235–241; e) S. Y. Huang, Y. T. Hsieh, C. H. Chen, C. C. Chen, W. C. Sung, M. Y. Chou, S. F. Chen, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4900–4906.
- [4] A. J. Heck, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 927–933.
- [5] C. Atmanene, E. Wagner-Rousset, M. Malissard, B. Chol, A. Robert, N. Corvaia, A. Van Dorsselaer, A. Beck, S. Sanglier-Cianferani, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6364–6373.
- [6] R. J. Rose, A. F. Labrijn, E. T. van den Bremer, S. Loverix, I. Lasters, P. H. van Berk, J. G. van de Winkel, J. Schuurman, P. W. Parren, A. J. Heck, *Structure* **2011**, *19*, 1274–1282.
- [7] S. Rosati, N. J. Thompson, A. Barendregt, L. J. Hendriks, A. B. Bakker, J. de Kruif, M. Throsby, E. van Duijn, A. J. Heck, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7227–7232.
- [8] a) J. Siemiatkoski, Y. Lyubarshkaya, D. Houde, S. Tep, R. Mhatre, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 410–419; b) E. Wagner-Rousset, A. Bednarczyk, M. C. Bussat, O. Colas, N. Corvaia, C. Schaeffer, A. Van Dorsselaer, A. Beck, *J. Chromatogr. B* **2008**, *872*, 23–37; c) C. W. Damen, W. Chen, A. B. Chakraborty, M. van Oosterhout, J. R. Mazzeo, J. C. Gebler, J. H. Schellens, H. Rosing, J. H. Beijnen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 2021–2033; d) J. F. Valliere-Douglass, W. A. McFee, O. Salas-Solano, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2843–2849.
- [9] R. J. Rose, E. Denisov, A. Makarov, A. J. R. Heck, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 1084–1086.
- [10] a) D. Houde, Y. Peng, S. A. Berkowitz, J. R. Engen, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1716–1728; b) J. Zalevsky, A. K. Chamberlain, H. M. Horton, S. Karki, I. W. Leung, T. J. Sproule, G. A. Lazar, D. C. Roopenian, J. R. Desjarlais, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 157–159.
- [11] a) S. G. Valeja, N. K. Kaiser, F. Xian, C. L. Hendrickson, J. C. Rouse, A. G. Marshall, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8391–8395; b) L. Fornelli, E. Damoc, P. M. Thomas, N. L. Kelleher, K. Aizikov, E. Denisov, A. Makarov, Y. O. Tsypin, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, DOI: 10.1074/mcp.M112.019620.
- [12] a) T. Logtenberg, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 390–394; b) J. de Kruif, A. Kramer, R. Nijhuis, V. van der Zande, R. den Blanken, C. Clements, T. Visser, R. Keehnen, M. den Hartog, M. Throsby, T. Logtenberg, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *106*, 741–750.
- [13] a) M. Oda, S. Uchiyama, M. Noda, Y. Nishi, M. Koga, K. Mayanagi, C. V. Robinson, K. Fukui, Y. Kobayashi, K. Morikawa, T. Azuma, *Mol. Immunol.* **2009**, *47*, 357–364; b) M. A. Tito, J. Miller, N. Walker, K. F. Griffin, E. D. Williamson, D. Despeyroux-Hill, R. W. Titball, C. V. Robinson, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 3503–3509.
- [14] B. Kürker, V. Filipe, E. van Duijn, P. T. Kasper, R. J. Vreeken, A. J. Heck, W. Jiskoot, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2197–2204.