



원형 질량 분석

Biologics Explorer 2.0 빠른 시작 안내서

Genedata Expressionist® 제공



원형 질량 분석: Biologics Explorer 빠른 시작 안내서

이 안내서의 내용

파트 A: 소프트웨어와 워크플로:

- 1) 어플리케이션 개요
- 2) Biologics Explorer 사용
- 3) 원형 질량 분석 워크플로에 대한 일반 지침
- 4) 특정 원형 질량 분석 워크플로에 대한 지침:
 - MS 데이터 또는 MS/UV 데이터를 사용한 자동 디콘볼루션
 - MS 데이터 또는 MS/UV 데이터를 사용한 TRD(시간 분해 디콘볼루션)
 - 원형 질량 분석 스크리닝
 - 저장된 결과 검토

원형 질량 분석: Biologics Explorer 빠른 시작 안내서

이 안내서의 내용

파트 B: 특정 어플리케이션에 대한 세부 설정

- 변성 원형 단백질
- 비변성 원형 단백질
- 항체 약물 포함체
- 서브유닛 분석
- 단편 분석
- 비교동등성 검사 또는 희석 시리즈
- 응력 검사

파트 A

소프트웨어와 워크플로

1. 어플리케이션 개요



원형 질량 분석 워크플로의 어플리케이션 개요

- 다음 워크플로는 주로 단일 샘플 분석에 사용됨:
 - 원형 질량 확인
 - PTM(번역 후 변형) 특성화
 - 글리코실화 패턴 분석
 - DAR(약물-항체 비율) 계산
- 크로마토그래피가 모든 샘플에서 일관된 경우 배치 분석도 가능:
 - 여러 샘플의 스크리닝(프로세스 개발, 기기 방법 개발)
 - 로트 간 비교동등성 연구
 - 이노베이터 대 바이오시밀러 비교동등성 연구
 - 응력 검사
- 분석 가능한 분자 유형:
 - 완전 단백질(비변성 또는 변성)
 - 단백질 혼합물
 - 단백질 서브유닛/단편
 - 약물 포함체
 - 다량체 단백질

파트 A

소프트웨어와 워크플로

2. BIOLOGICS EXPLORER 사용



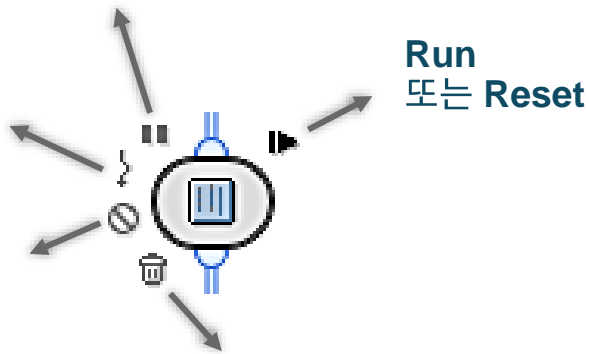
Biologics Explorer 사용

활동 노드 아이콘

Pause: 여기서 워크플로를 일시 중지합니다.
모든 후속 작업은 활성 상태를 유지합니다.

Bypass: 워크플로를 실행할 때 이 작업을 건너뛸니다.

Block: 워크플로를 중지합니다.
이 작업과 모든 후속 작업을 사용할 수 없게 됩니다(회색).



Trash: 중간 데이터를 저장하지 않습니다.
이 아이콘이 활성화되면 특정 활동 노드의 결과를 볼 수 없습니다.
Trash 아이콘을 사용하면 메모리가 절약됩니다. 워크플로 설정이 최적화된 후 이 기능을 사용하십시오.

Biologics Explorer 사용

워크플로 아이콘

워크플로 완료

모든 활동 노드가 완료되었습니다.

워크플로 일시 중지

일부 활동 노드가 완료되었지만 일부는 아직 시작되지 않았습니다.

워크플로 준비

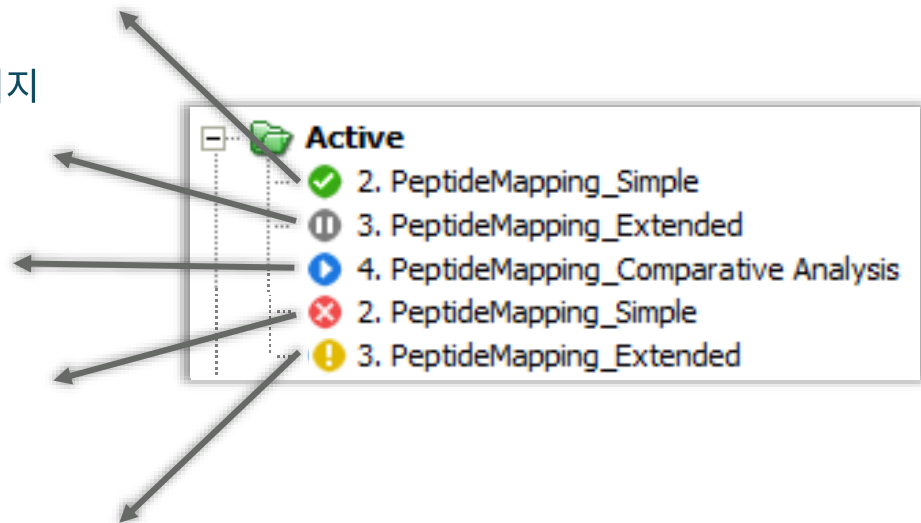
완료된 활동 노드가 없습니다. 워크플로를 시작할 준비가 되었습니다.

워크플로 오류

일부 활동 노드가 완료되었지만 하나 이상의 활동 노드를 실행할 수 없습니다.

워크플로 경고

일부 활동 노드가 완료되지 않았습니다.

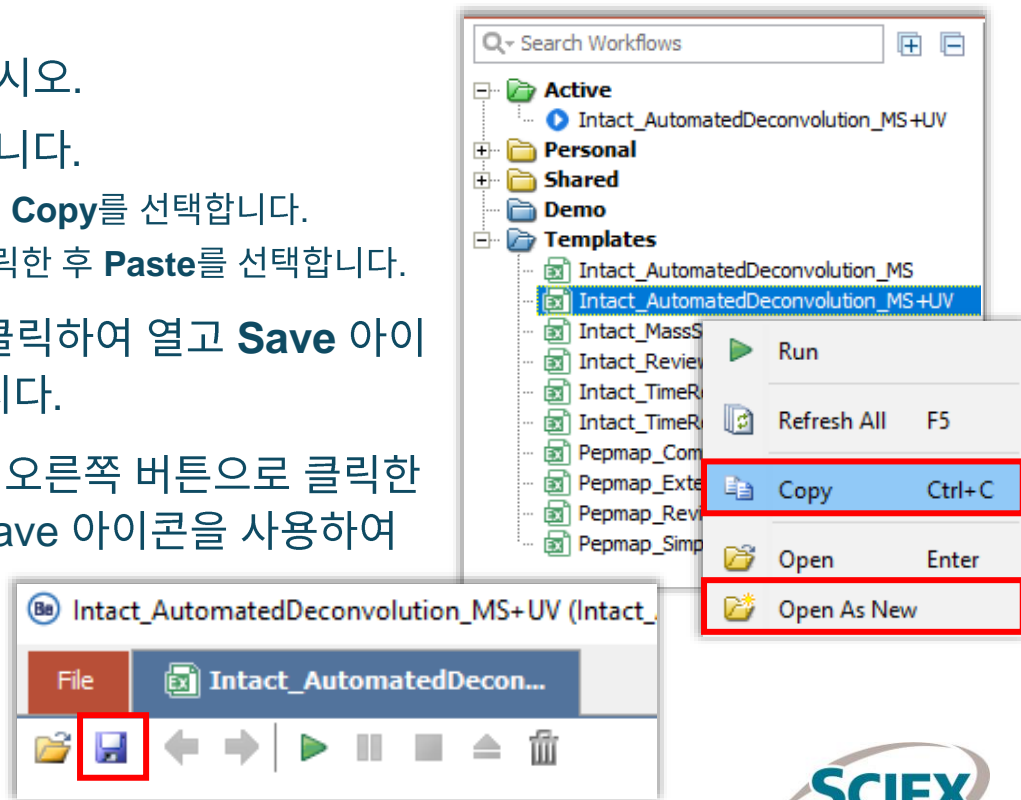


Biologics Explorer 사용

워크플로 시작 및 저장

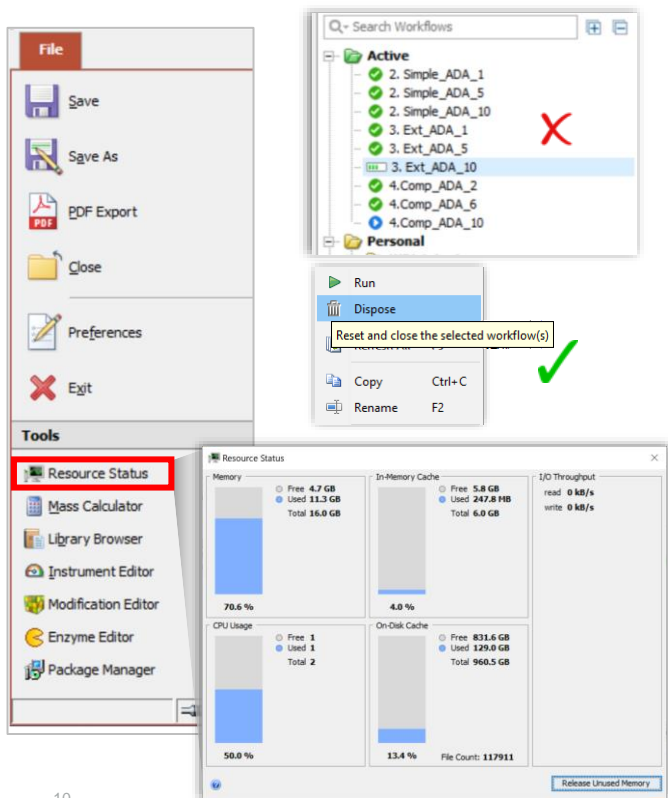
워크플로를 열려면 다음 중 하나를 수행하십시오.

- **Templates** 폴더에서 워크플로를 복사합니다.
 1. 워크플로를 마우스 오른쪽 버튼으로 클릭한 후 **Copy**를 선택합니다.
 2. **Personal** 폴더를 마우스 오른쪽 버튼으로 클릭한 후 **Paste**를 선택합니다.
- **Templates** 폴더에서 워크플로를 두 번 클릭하여 열고 **Save** 아이콘을 사용하여 **Personal** 폴더에 저장합니다.
- **Templates** 폴더에서 워크플로를 마우스 오른쪽 버튼으로 클릭한 후 **Open As New**를 선택하여 엽니다. Save 아이콘을 사용하여 **Personal** 폴더에 저장합니다.



Biologics Explorer 사용

올바른 리소스 사용을 위한 권장 사항

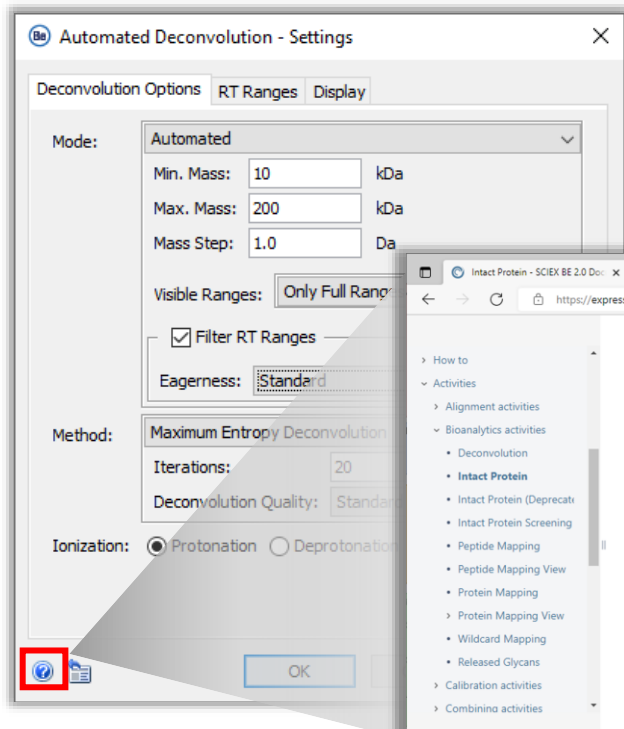


- 모범 사례를 따라 Biologics Explorer의 메모리와 컴퓨팅 성능이 충분한지 확인하십시오.
 - 한 번에 하나의 워크플로만 실행: 일부 활동 노드는 리소스를 매우 많이 사용합니다. 동시에 처리하면 사용 가능한 모든 리소스를 다 쓸 수도 있습니다.
 - 메모리를 절약하려면 최적화된 워크플로에서 가능할 때마다 Trash 아이콘을 활성화하십시오.
 - 데이터를 검토하고 결과를 저장한 후 새 분석을 시작하기 전에 워크플로를 재설정하거나 삭제하십시오.
 - *Save Snapshot* 활동 노드를 사용하여 완료된 결과를 *Intact_ReviewSnapshots* 워크플로에 저장하거나 검토하도록 설정하십시오.
- 처리 컴퓨터에 최소 250GB의 여유 디스크 공간과 6GB의 메모리 내 캐시가 있어야 합니다.
 - 원형 단백질 워크플로에 대해 처리 중인 파일은 최대 12GB를 초과하면 안 됩니다.

Biologics Explorer 사용

온라인 도움말 액세스

- 개별 활동 노드 및 해당 설정에 대한 정보를 보려면 ? 아이콘을 클릭하여 관련 도움말 페이지를 확인하십시오.



The **Intact Protein** activity deconvolutes intact protein data to provide mass spectra of protein species. Three methods are available for deconvolution:

- **Maximum Entropy Deconvolution** — This method uses a Genedata proprietary algorithm based on the MaxEnt algorithm^[1] to find the best deconvoluted mass spectrum using a probabilistic approach^[2].
- **Harmonic Suppression Deconvolution** — This method uses a Genedata proprietary algorithm that suppresses false signals resulting from mass values that are multiples or fractions of the correct signals.
- **Legacy Maximum Entropy Deconvolution** — This method uses a maximum entropy method that uses the Harmonic Suppression and MaxEnt^[1] algorithms.

[1] Ferrige, A. G., Seddon, M. J., Jarvis, S., Skilling, J., & Aplin, R. (1991). Maximum entropy deconvolution in electrospray mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 5(8), 374-377.

[2] Marty, M.T., Baldwin, A.J., Marklund, E.G., Hochberg, G.K., Benesch, J.L., & Robinson, C.V. (2018). Bayesian deconvolution of mass and ion mobility spectra: from binary interactions to polydisperse ensembles. *Anal Chem*. Apr 21;87(8):4370-6.

파트 A

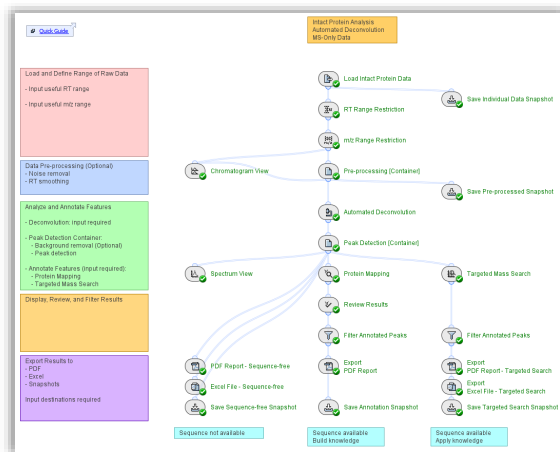
소프트웨어와 워크플로

3. 원형 질량 분석 워크플로에 대한 일반 지침

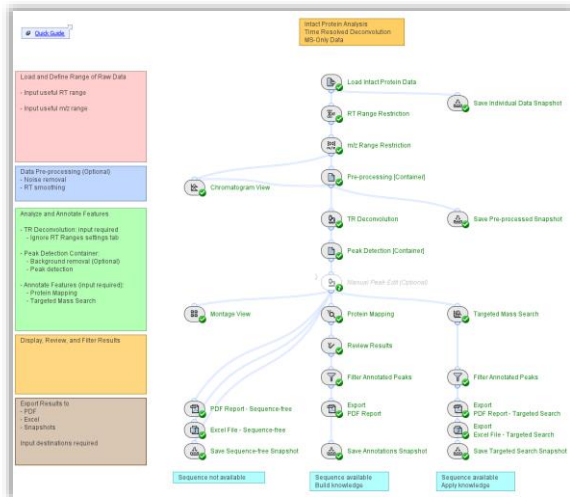


원형 질량 분석 워크플로에 대한 일반 지침

워크플로 유형



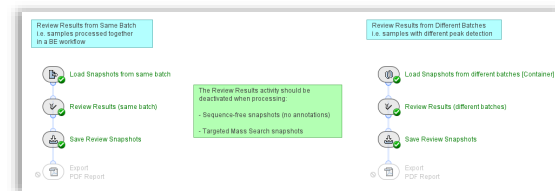
Intact_Automated Deconvolution
UV 처리 포함/제외



Intact_TimeResolved Deconvolution
UV 처리 포함/제외



Intact_MassScreening



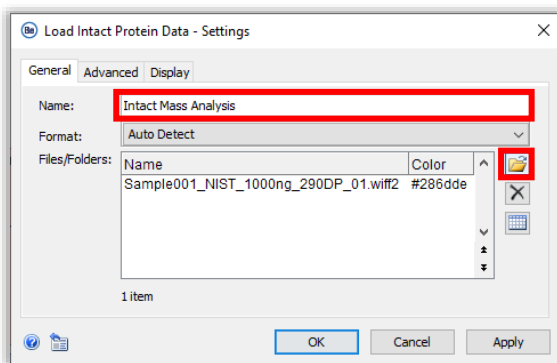
Intact_ReviewSnapshots

원형 질량 분석 워크플로에 대한 일반 지침

원형 질량 분석 워크플로의 공통 활동 노트

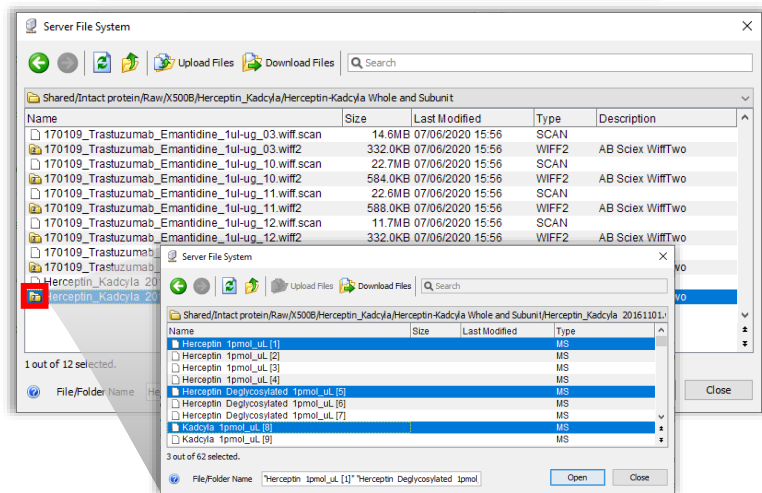
- A. *Load Intact Protein Data*
- B. *RT Range Restriction* 및 *m/z Range Restriction*
- C. *m/z Grid*
- D. *Spectrum Baseline Subtraction*
- E. *Chromatogram Chemical Noise Subtraction*
- F. *UV Processing [Container]*
- G. *Chromatogram View*
- H. 피쳐 필터
- I. *Protein Mapping*
- J. *Targeted Mass Search*
- K. *Annotate UV Peaks from MS*
- L. 보고 및 내보내기

Load Intact Protein Data: Format (Auto Detect)



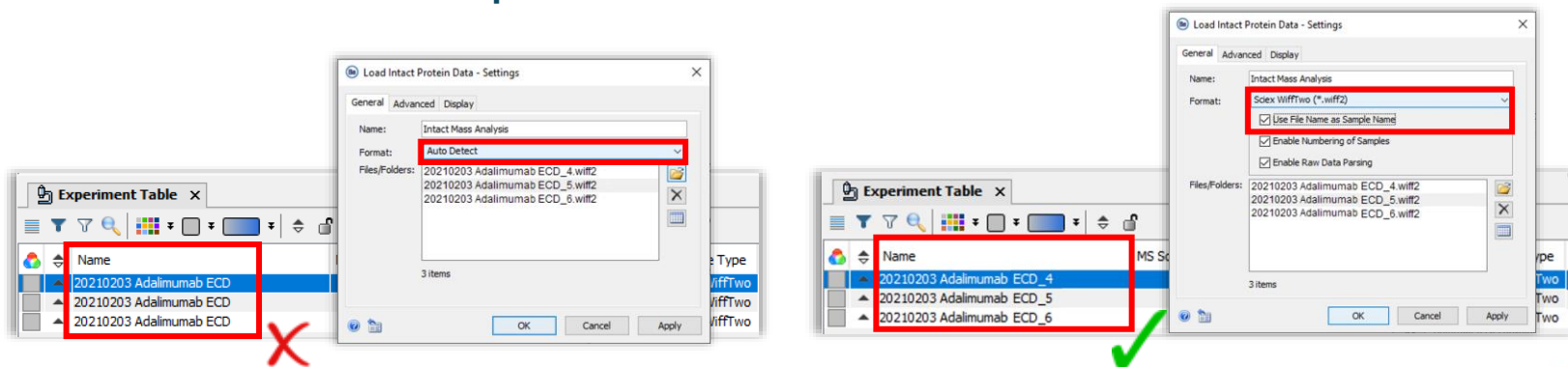
General 탭

- **Name** 필드에 분석을 정의하는 이름 입력
- 원시 데이터 파일 업로드 📁:
 - wiff 또는 wiff2 컨테이너 파일만 선택합니다.
 - ZenoTOF 7600 시스템에서 데이터를 분석하는 경우 wiff2 파일만 사용합니다(wiff 파일 사용 안 함).
 - 이름이 같은 보조 파일을 선택하지 않습니다.
- ✓ Herceptin_Kadcyla 20161101.wiff2
 - ✗ Herceptin_Kadcyla 20161101.wiff.scan
- wiff1 또는 wiff2 컨테이너를 열고 포함된 파일을 보려면 wiff 또는 wiff2 컨테이너를 두 번 클릭합니다.
 - 포함된 파일 목록에서 업로드할 파일을 선택합니다.



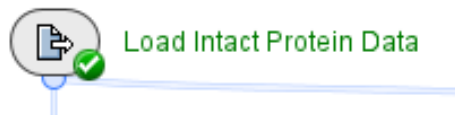
Load Intact Protein Data: Format

- wiff 또는 wiff2 컨테이너에 포함된 개별 샘플 파일의 이름이 같은 경우 **Auto Detect** 옵션을 사용하지 않습니다.
- 다음을 수행하여 *Experiment Table*에 있는 샘플 이름이 고유하고 *Review Results*에 각 샘플에 대한 올바른 정량적 정보가 표시되는지 확인합니다.
 - Format** 드롭다운 목록에서 **Sciex Wiff** 또는 **Sciex WiffTwo**를 선택합니다.
 - ZenoTOF 7600 시스템을 사용하여 획득한 데이터의 경우 wiff2만 사용하십시오.
 - Use File Name as Sample Name** 확인란을 선택합니다.

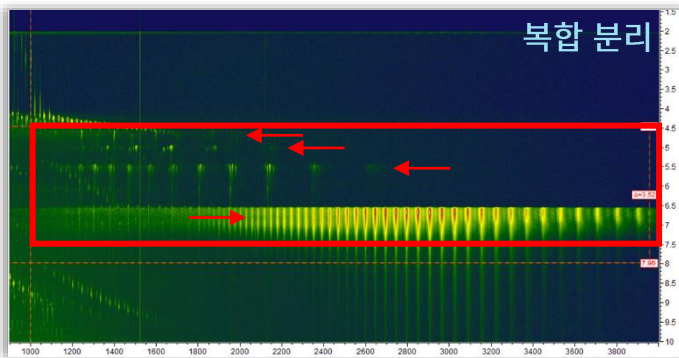
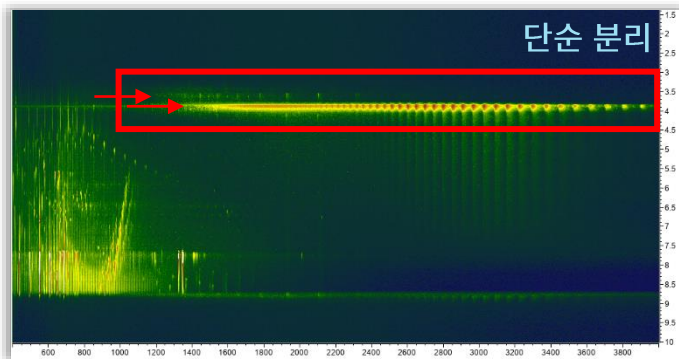


RT 및 m/z 범위 제한

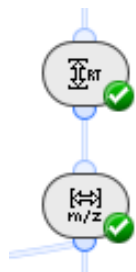
- *Load Intact Protein Data* 활동 노드를 실행한 후 데이터 로드가 완료되면 두 번 클릭하여 엽니다.



- 의미 있는 데이터가 있는 RT(머무름 시간) 및 질량 대 전하 비(m/z) 범위를 식별합니다.
 - 밸브 전환 또는 컬럼 세척으로 인한 표류 신호를 제외합니다.
 - 분리 범위에 초점을 맞춥니다.
 - 낮은 질량의 미량 성분 또는 오염 물질이 관심 대상인 경우 외에는 분석을 표적 단백질 용리 범위로 제한합니다.



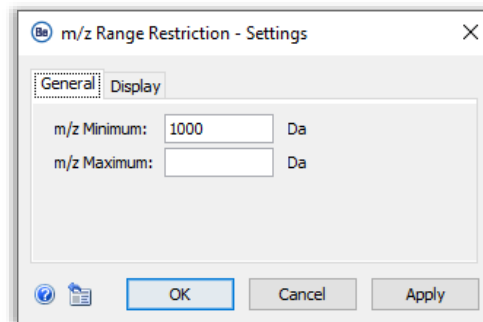
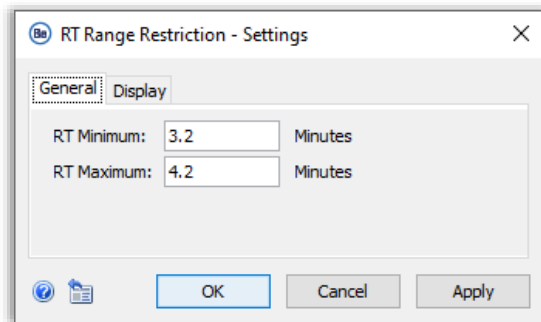
RT 및 m/z 범위 제한



RT Range Restriction

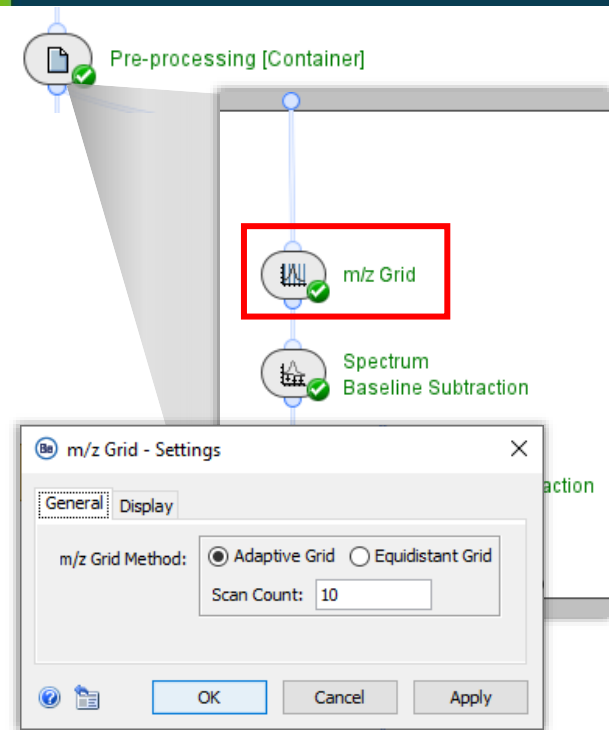
m/z Range Restriction

- 식별된 유용한 RT 및 m/z 범위를 입력합니다.
- 입력 상자를 비워 두면 전체 RT 또는 m/z 범위가 사용됩니다.



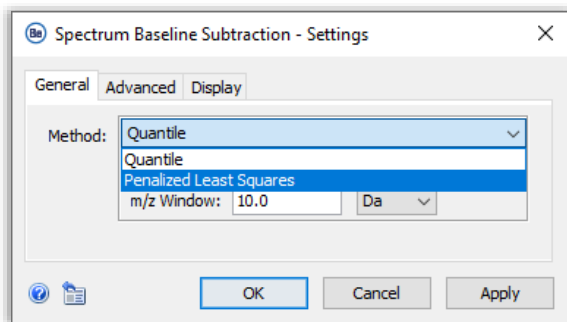
m/z Grid

- 여러 데이터 파일로 작업할 때 *m/z Grid* 활동 노드를 사용하여 피크 검출을 위해 모두 동일한 *m/z* 위치에서 샘플링되는지 확인합니다.
- 기본 설정은 **Adaptive Grid**입니다.
 - 이 그리드는 데이터 밀도에 맞게 최적화됩니다.
 - 질량 범위가 큰 샘플을 분석하려면 이 설정을 사용합니다.
- 반복 샘플, 언더샘플링 데이터 또는 노이즈가 심한 피크를 분석하려면 **Equidistant Grid** 설정을 사용합니다.
 - **Equidistant Grid** 간격의 최적 값은 높은 질량 피크를 오버샘플링하지 않고 관심 있는 낮은 질량 피크에 대해 충분한 데이터 요소를 제공합니다.

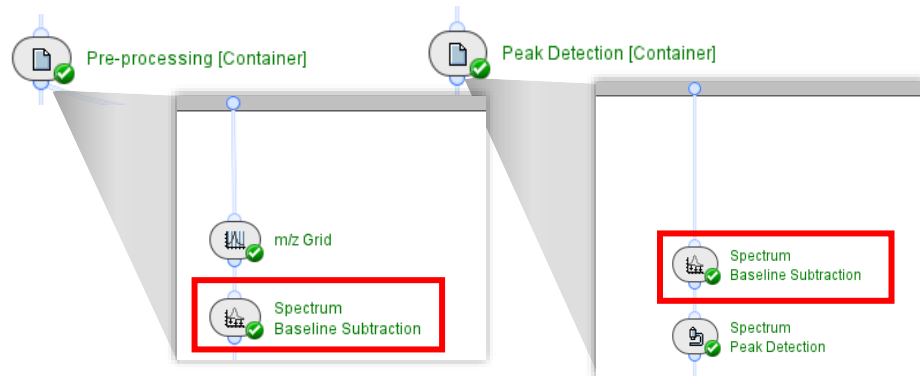


Spectrum Baseline Subtraction

- *Spectrum Baseline Subtraction*은 배경 노이즈를 제거하고 디콘볼루션 데이터에서 위성 피크의 생성을 제한하여 디콘볼루션을 향상시킵니다.
- 이 활동 노드는 디콘볼루션 후 피크 검출을 개선하기 위해 사용할 수도 있습니다.

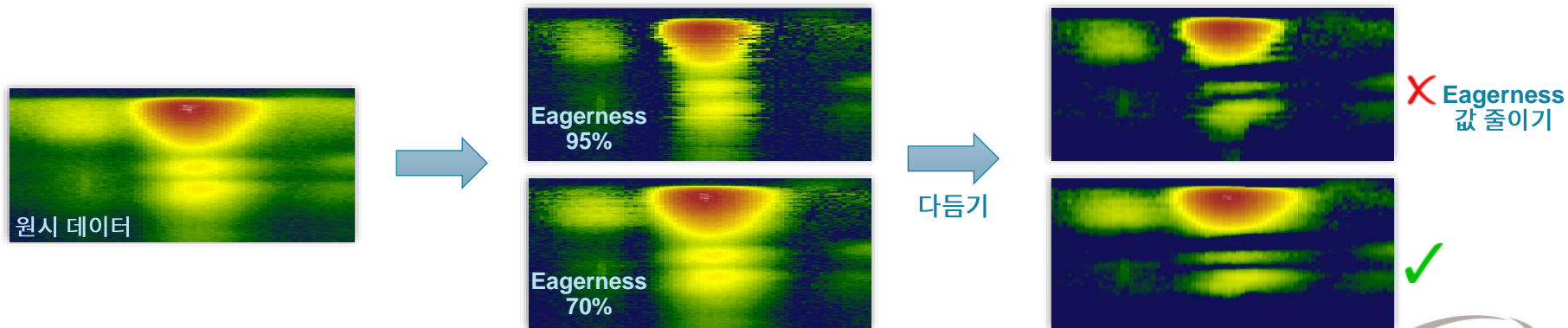


- **Quantile** 감산은 모든 신호에 영향을 줍니다.
 - 나중에 다듬기를 수행할 필요가 거의 없습니다.
 - 고분해능 데이터와 함께 사용할 경우 **Penalized Least Squares**보다 훨씬 빠릅니다.
 - 의미 있는 신호가 제거되지 않도록 원형 완전 단백질을 분석하는 동안 주의해서 사용해야 합니다.
- **Penalized Least Squares** 감산은 강도가 낮은 신호에만 영향을 줍니다.

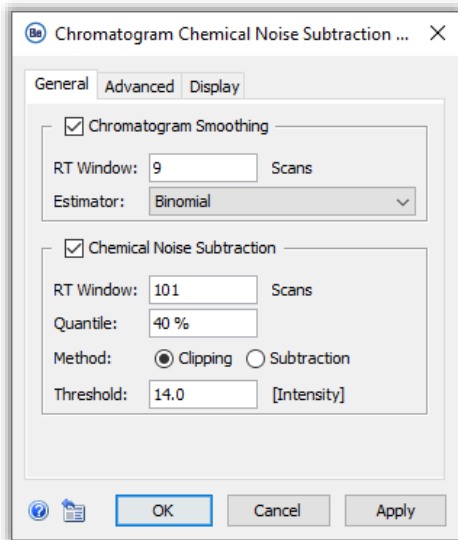


Spectrum Baseline Subtraction

- **Penalized Least Squares**는 큰 피크 사이의 밸리 높이를 줄여 디콘볼루션 스펙트럼에서 위성 피크를 줄입니다.
 - 이 방법은 특히 **Time Resolved Deconvolution** 및 분해능이 더 높은 데이터(예: 서브유닛, 단편)와 함께 사용할 경우 시간이 많이 걸릴 수 있습니다.
- 높은 **Eagerness** 값(90% 초과)을 사용하려면 *Chromatogram Chemical Noise Subtraction* 활동 노드에 광범위한 **Smoothing**이 필요합니다.
 - 다듬기 후에도 열 지도의 피처에서 불규칙한 테두리가 계속 표시되면 **Eagerness** 값을 줄입니다.



Chromatogram Chemical Noise Subtraction



Chromatogram Smoothing은 피크의 RT 프로필을 개선하는 데 사용됩니다.

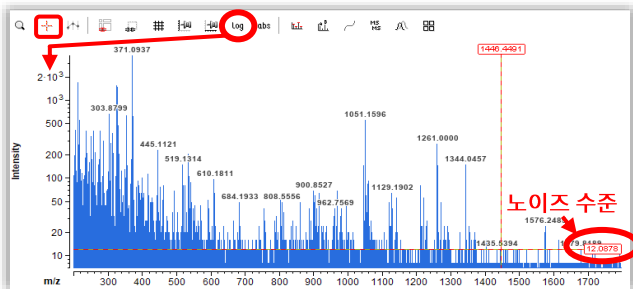
- *Spectrum Baseline Subtraction*에서 **Penalized Least Squares**를 사용한 후 특히 높은 **Eagerness** 값이 사용된 경우 다듬기가 필요합니다.
- **Estimator:**
 - **Moving Average**는 **RT Window**에서 데이터 요소의 평균 강도를 사용하여 추가 데이터 요소를 생성합니다. 따라서 값이 높으면 피크 폭이 증가하지만 피크 부피는 유지됩니다.
 - **Binomial**은 반복된 형태의 **Moving Average**로, 피크 폭에 미치는 영향이 적습니다.

Chemical Noise Subtraction은 다음을 지원합니다.

- 네이티브 데이터에서 흔히 관찰되는 폭이 넓거나 꼬리가 긴 피크를 줄입니다.
- TRD를 사용하여 위성 피크를 억제하고 피크 검출을 향상시킵니다.

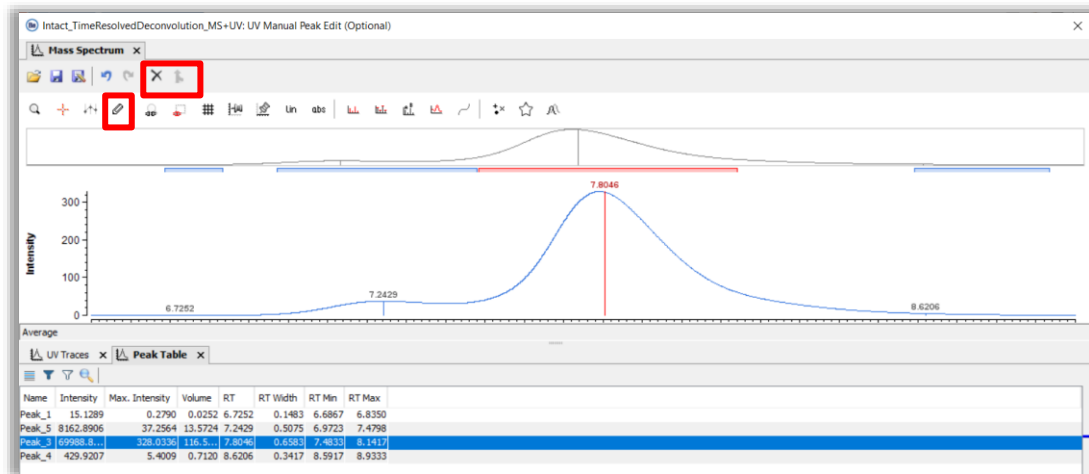
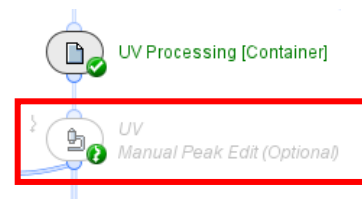
• **설정:**

- **RT Window:** 더 적은 데이터를 빼려면 값을 늘립니다.
- **Quantile:** 더 적은 데이터를 빼려면 값을 줄입니다.
- **Threshold:** 노이즈 수준을 검사하여 적절한 강도 값을 결정합니다.
 1. 노이즈 수준을 읽을 수 있을 때까지 질량 스펙트럼 강도 축을 끌어 확장하거나, 도구 모음 아이콘을 사용하여 축을 선형 눈금에서 로그 눈금으로 변경합니다.
 2. 십자선 도구를 사용하여 노이즈 수준의 강도를 측정합니다.



UV Processing: UV Manual Peak Edit

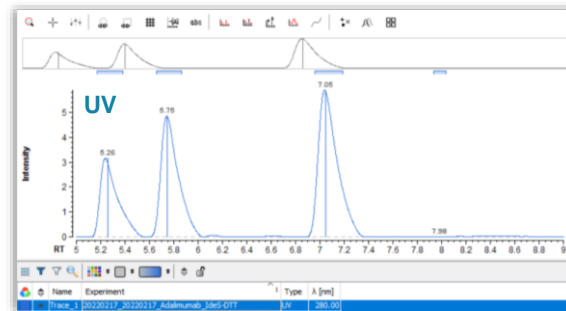
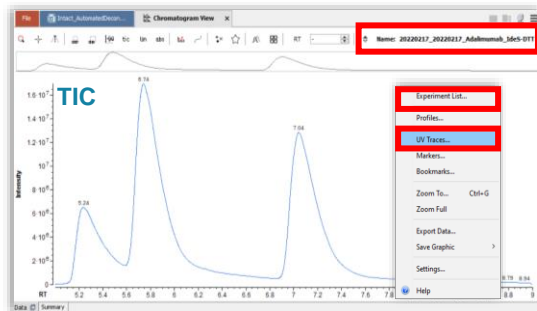
- 이 활동은 기본적으로 생략됩니다.
- *UV Manual Peak Edit*를 사용하면 다음과 같이 UV 크로마토그램 내에서의 피크 검출을 수동으로 구체화할 수 있습니다.
 - 관심 피크의 경계 변경
 - 겹치는 피크 분할
 - 원하지 않는 피크 삭제
 - 새 피크 그리기



- *UV Manual Peak Edit*는 어려운 피크에 대한 *UV Peak Detection* 매개 변수를 최적화하는 데 편리한 대안이 될 수 있습니다.

Chromatogram View

- *Chromatogram View*는 전처리 전후에 각 샘플의 TIC 크로마토그램을 시각화합니다.
- 플롯을 마우스 오른쪽 버튼으로 클릭하여 *UV Processing* 전후의 **Experiment List** 및 **UV Chromatograms**에 액세스할 수 있습니다.



- **Experiment List**에서 여러 크로마토그램을 선택한 후 중첩하거나 대칭 이동하여 미리 보기를 생성할 수 있습니다.

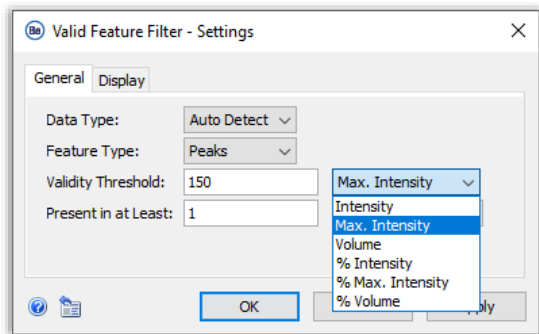
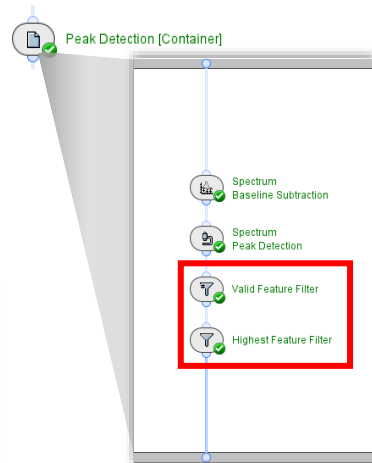
A screenshot of the Experiment List window showing a table of experiments. The table has columns for Name, Scans, and Method Name. Two rows are visible, both with the same name and method name. A red box highlights a button in the toolbar above the table.

Name	Scans	Method Name
20190615_Bevacuzimab_10ug_OC_100mM_AmAc_0.2_15min_UV_69	74	SEC MS Method Optimised 15
20190615_Bevacuzimab_10ug_OC_100mM_AmAc_0.2_15min_UV_...	74	SEC MS Method Optimised 15

피쳐 필터

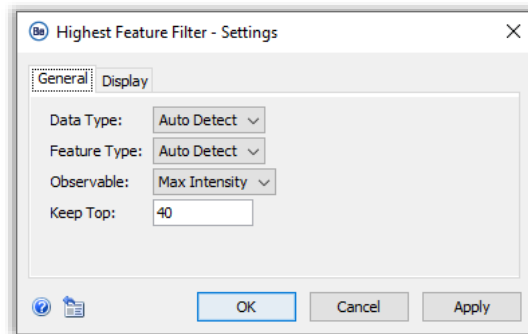
- *Feature Filter* 활동 노드를 사용하면 포함되는 피크 수를 제한하여 가장 관련 있는 피크만 유지하고 노이즈에서 발생하는 피크를 제외할 수 있습니다.

- 피크 필터링이 필요하지 않은 경우 사용을 제한하려면 **Bypass** 아이콘을 사용합니다.



Valid Feature Filter

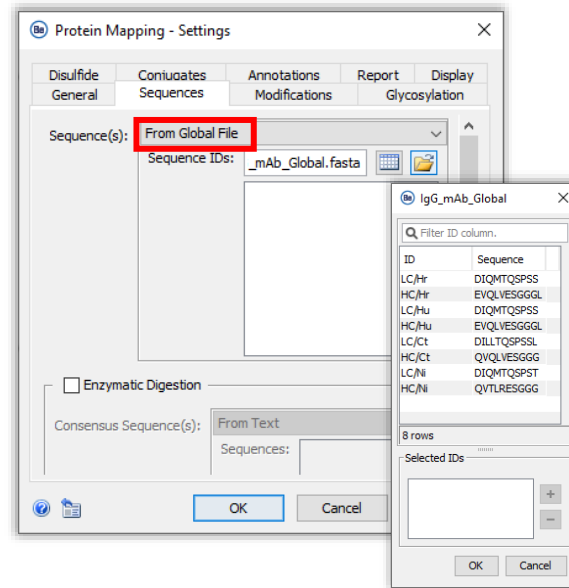
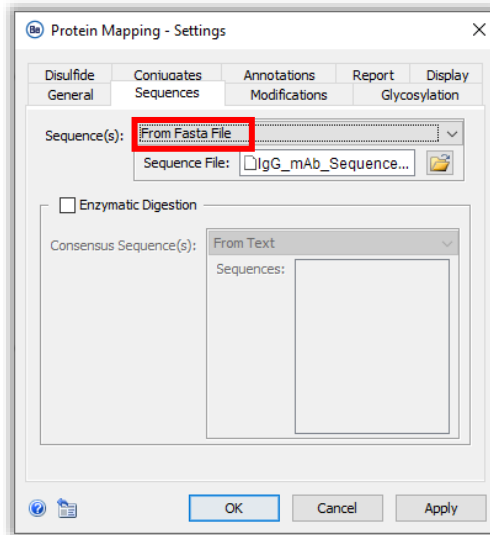
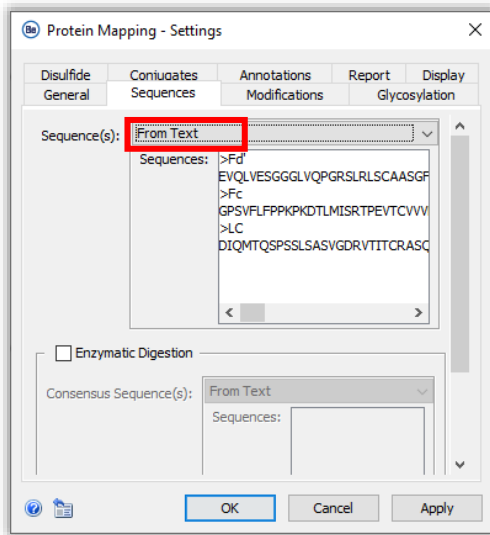
- 실험에서 각 피크가 포함되어야 하는 최소 피크 강도 및 백분율을 정의합니다.



Highest Feature Filter

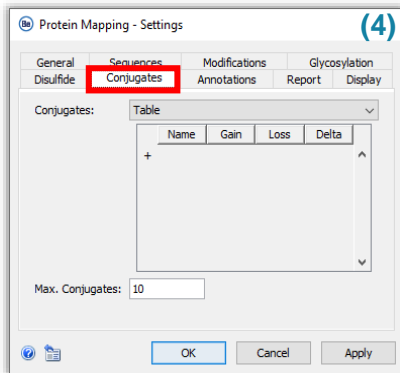
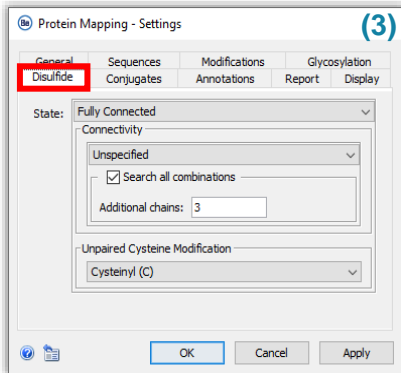
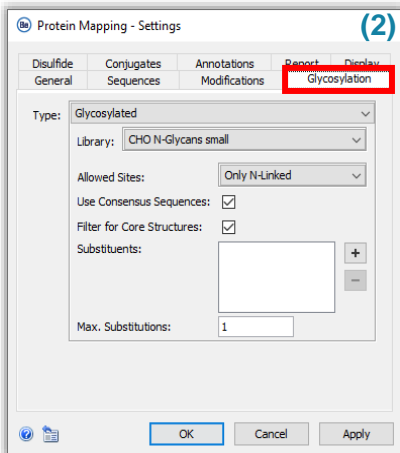
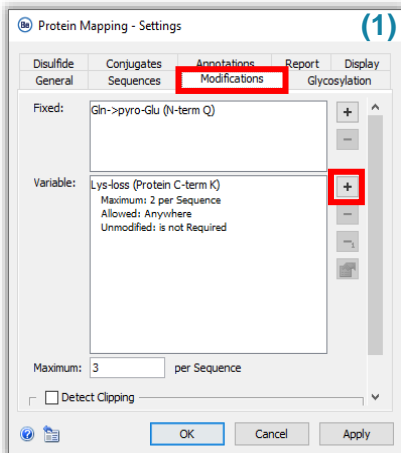
- 식별된 각 RT 범위에서 존재비가 가장 높은 것으로 보고할 피크의 수를 정의합니다.

Protein Mapping: Sequences



- 다음 형식 중 하나를 사용하여 단백질 시퀀스를 지정합니다.
 - **From Text: Sequences** 상자에 단백질 시퀀스를 지정합니다.
 - **From Fasta File**: 관심 있는 시퀀스가 포함된 fasta 파일을 업로드합니다.
 - **From Global File**: 추가 팝업 창에서 사용할 시퀀스를 선택할 수 있는 여러 항목이 포함된 fasta 파일을 업로드합니다.

Protein Mapping: Modifications



1. Fixed 및 Variable PTM을 지정합니다.

- N-term E를 전달하는 단백질 시퀀스의 경우, 변형된 형태가 우세하지 않을 것으로 예상되므로 Glu-pyroGlu (N-term E)를 가변 변형으로 설정하는 것이 좋습니다.

2. 글리코실화 매개 변수를 지정합니다.

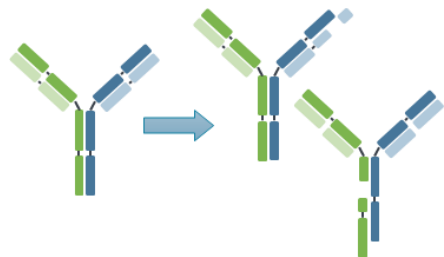
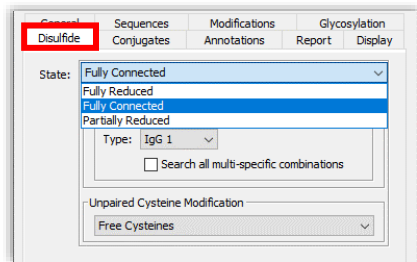
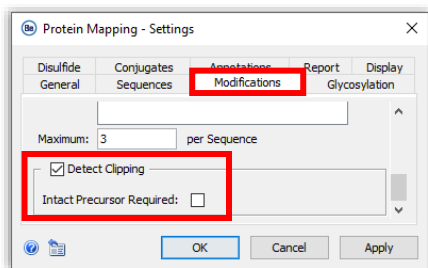
- Type**을 **Glycosylated** 또는 **Deglycosylated**로 설정합니다.
 - Deglycosylated**는 모든 N-글리코실화 공통 부위에서 탈아미드화 이벤트를 가정하므로 탈아미드화를 가변 변형으로 지정할 필요가 없습니다.
 - Glycosylated**에 사용할 글리칸 라이브러리를 선택합니다.

3. 시스테인 연결 유형을 지정합니다.

- mAbs 및 연결되지 않은 서브유닛에 모두 주석을 달 수 있습니다. 자유 시스테인에 대해 가변 PTM을 설정할 수 있습니다.

4. 표적 단백질이 ADC인 경우 포함체의 이름과 질량을 지정합니다.

Protein Mapping: Detect Clipping

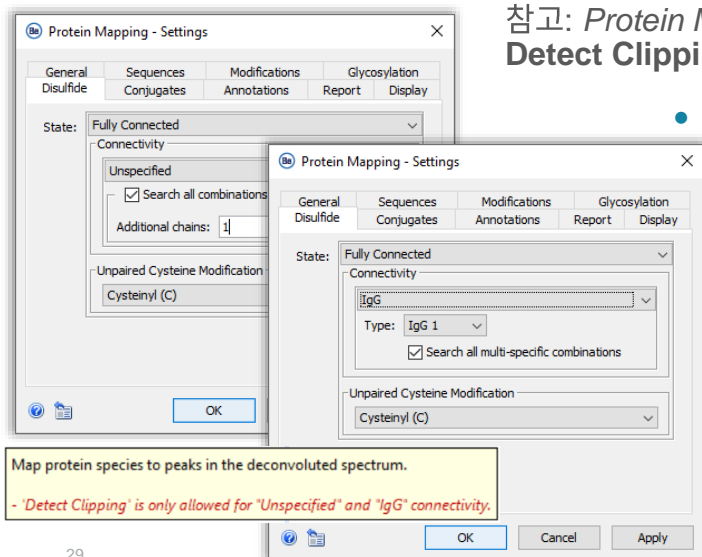


- **Detect Clipping** 기능은 데이터에서 검출된 피크를 사용하여 잠재적(인 실리콘) 클리핑 이벤트에 대해 질량을 매칭합니다.
- 임의의 시퀀스 위치에서 단일 클리핑 이벤트에서 발생하는 MS 피크를 식별하려면 **Modifications** 탭의 **Detect Clipping**을 선택합니다.
 - 이 설정을 사용하려면 이황화 결합 상태가 **Fully Connected** 또는 **Fully Reduced**여야 합니다. 부분 환원된 샘플의 분석은 지원되지 않습니다.
 - **Detect Clipping** 기능은 **Sequences** 탭의 **Enzymatic Digestion** 기능과 함께 사용할 수 없습니다.
- 정의된 검색 공간 내에서 조합 가능성의 수가 제한되어야 합니다. 변수가 너무 많으면 다음과 같은 결과가 발생합니다.
 - ⚠ 워크플로 처리 시간이 길어지거나, 완료될 때까지 실행할 수 없는 워크플로가 있습니다.
 - ⚠ 높은 수준의 가양성 식별로 인해 과도한 데이터 검토가 필요합니다.

Protein Mapping: Detect Clipping 권장 사항

- 특정 관심 피크에 초점을 맞춰 검색 공간을 제한하기 위한 일반적인 지침:
 - Feature Filter* 활동 노드를 사용하여 클리핑 이벤트에서 파생될 가능성이 낮은 피크를 제거합니다.
 - TRD 워크플로의 *Manual Peak Edit*를 사용하여 클리핑 이벤트에서 발생할 가능성이 낮은 피크를 삭제합니다.
 - 적절한 수준으로 존재하는 것으로 알려진 변형만 검색합니다.
 - 선택한 라이브러리의 글리칸 수와 가변 변형의 수를 최소로 유지합니다. 예를 들어 글리칸 프로필의 대부분(95%)을 구성하는 글리코형만 포함합니다.

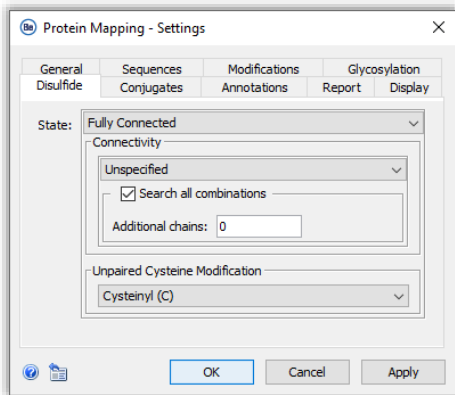
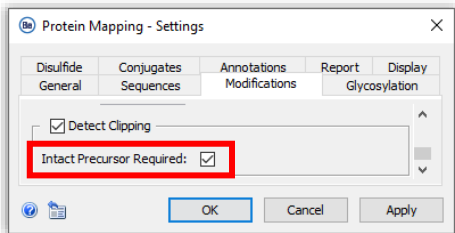
참고: *Protein Mapping* 검색에 Lys-Loss (Protein C-term K)도 변형으로 포함된 경우 **Detect Clipping**은 C-terminal lysine loss를 중복 주석으로 보고합니다.



• Detect Clipping과 Disulfide 탭 설정 조합:

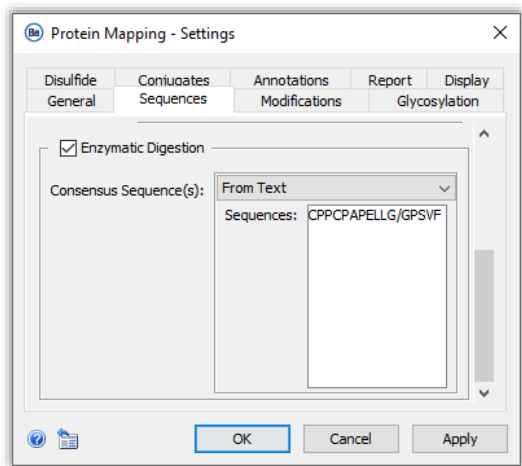
- 이황화 결합 단백질에서 발생하는 절단된 종을 감지하려면 **Fully Connected**를 **Unspecified** 또는 **IgG** 연결과 함께 선택합니다.
 - Intact Precursor Required**를 선택하면 **Search all combinations**를 선택할 때 **Additional chains**를 0으로 설정해야 합니다.
 - Intact Precursor Required**를 선택하지 않으면 **Search all combinations**를 선택할 때 **Additional chains**를 0 또는 1로 설정할 수 있습니다.
- 환원 IdeS 분해에서 단편 클립을 식별하려면 각 단편을 개별적으로 조사하는 것이 좋습니다.

Protein Mapping: Detect Clipping - Intact Precursor Required

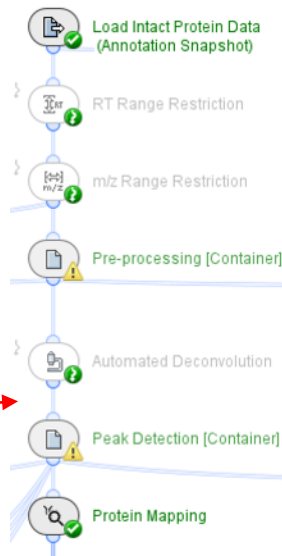


- **Intact Precursor Required**를 선택하면 변형을 포함하는 절단된 단백질의 식별은 동일한 변형을 전달하는 절단되지 않은 형태도 데이터에서 식별되는 경우에만 가능합니다.
- **Intact Precursor Required**를 선택하면 검색 시간이 길어지지만 가양성이 줄어듭니다.
 - 이 알고리즘은 식별된 모든 절단 형태가 전체 길이의 절단되지 않은 형태와 매칭되는지 확인합니다.
 - 절단되지 않은 매칭 항목이 없는 절단 형태는 거부됩니다.
- **Intact Precursor Required**와 **Disulfide** 탭 설정 조합:
 - **Intact Precursor Required**는 다음 중 하나와 함께 사용해야 합니다.
 - 필요한 경우 **Connectivity: IgG. Search all multi-specific combinations**를 선택할 수 있습니다.
 - **Connectivity: Unspecified. Search all combinations**를 **0 Additional chains**와 함께 선택할 수 있습니다.

Protein Mapping: 효소 분열



- 효소 분열은 MS 분석을 위한 단백질 서브유닛을 생성하는 샘플 준비 전략입니다.
- **Enzymatic Digestion**을 선택하고 **Consensus Sequence**를 제공하여 단백질 매핑의 분열 지점을 정의합니다.
 - 공통 부위가 여러 개 추가되면 대체되는 것이 아니라 모든 위치에 분열이 있다고 가정합니다.
 - CPPCPAPELLG/GPSVVF 및 CPPCPAPELLGG/PSFV와 같은 단일 공통 시퀀스 주변의 비특이적 분열을 찾으려면 각각 개별적으로 검색하십시오.
 - 이렇게 하려면 워크플로를 순차적으로 실행합니다. 불필요한 활동 노드를 건너뛰고 *Save Annotations Snapshot*의 출력을 다시 분석할 수 있습니다.



Peak Detection [Container]

Protein Mapping

Map protein species to peaks in the deconvoluted spectrum.

- Enzymatic cleavages are only allowed for "Unspecified" connectivity.

Map protein species to peaks in the deconvoluted spectrum.

- 'Detect Clipping' and 'Enzymatic Digestion' can not be both activated at the same time.

- **Enzymatic Digestion**을 사용하는 경우:

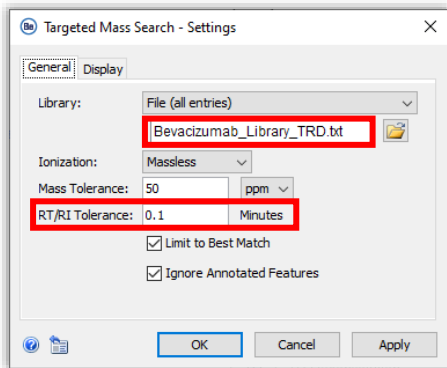
- **Disulfide** 탭에서 **Unspecified** 연결을 선택합니다.
- **Modifications** 탭에서 **Detect Clipping**을 선택하지 않습니다.

Targeted Mass Search

- *Targeted Mass Search*를 위한 입력 라이브러리는 Excel에서 편집할 수 있는 탭으로 구분된 텍스트 파일 형식이어야 합니다.



Targeted Mass Search



- **Automated Deconvolution** 워크플로의 형식:

- 첫 번째 열(Mass)은 필수입니다.

Mass	Protein	Disulfide Bonds	Modifications	Glycosylation
23173.51646	Hc-Hc-LC-LC	2*5-5		
46245.01703	LC-LC	5*5-5		
147833.4673	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	G0F + G0F-GlcNAc
148036.6602	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	2*G0F
148198.801	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	G0F + G1F
148360.9419	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	2*G1F
148523.0827	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	G1F + G2F
148685.2236	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	2*G2F

- **Time Resolved Deconvolution** 워크플로의 형식:

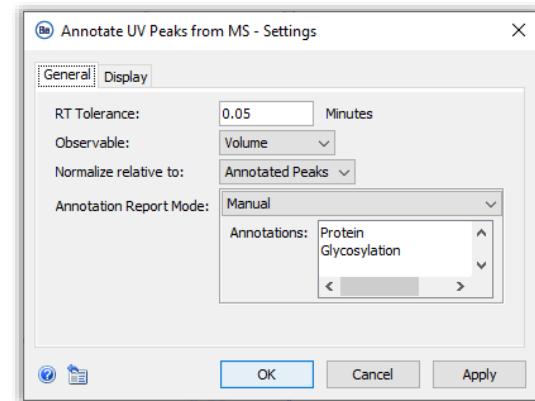
- 처음 두 열(RT, Mass)은 필수입니다.

RT	Mass	Protein	Modifications	Glycosylation
5.295	25332.1262	Fc		G1F
5.354	25366.0948	Fc	Lys-loss	G1F
5.347	24975.7083	Fc	Lys-loss	Man5
5.362	25203.9537	Fc	Lys-loss	G0F
5.35	25000.7609	Fc	Lys-loss	G0F-GlcNAc
6.048	23411.8919	LC		
8.042	25458.247	Fd		
8.044	25440.309	Fd	Glu->pyro-Glu	

- 필요에 따라 열을 삽입하여 추가 정보를 제공하거나 필요 없는 열을 제거합니다.
- 크로마토그래픽 변화를 고려하여 **RT/RI Tolerance**를 조정합니다.

Annotate UV Peaks from MS

- 이 활동은 MS 피크 정보를 사용하여 UV 트레이스에서 해당 피크에 주석을 겁니다.
 - 해당 피크는 지정된 **RT Tolerance** 내에서 용리되어야 합니다.
- UV 흡광도를 기반으로 UV 피크의 상대 비율도 계산됩니다.
 - UV 흡광도 값을 정규화하려면 단백질 시퀀스가 필요합니다.
 - UV 정규화 인자를 계산할 수 없으면 활동 노드에 **노란색 경고**가 표시됩니다.
 - **Time Resolved Deconvolution**에는 UV 정규화를 사용할 수 없습니다.
 - 이 활동 노드는 단백질 시퀀스를 포함하지 않으므로 *Targeted Mass Search*에 UV 정규화를 적용할 수 없습니다.



Experiment Table		Peak Table	
Name	RT	Area	Height
20190615_Bevacuzumab_10ug_OC_100mM_Am			

1 row (1 selected)

Data | UV Quantities | **Summary**



Annotate UV Peaks from MS

Start Time 13:28:14 04/11/22

Complete Time 13:28:14 04/11/22

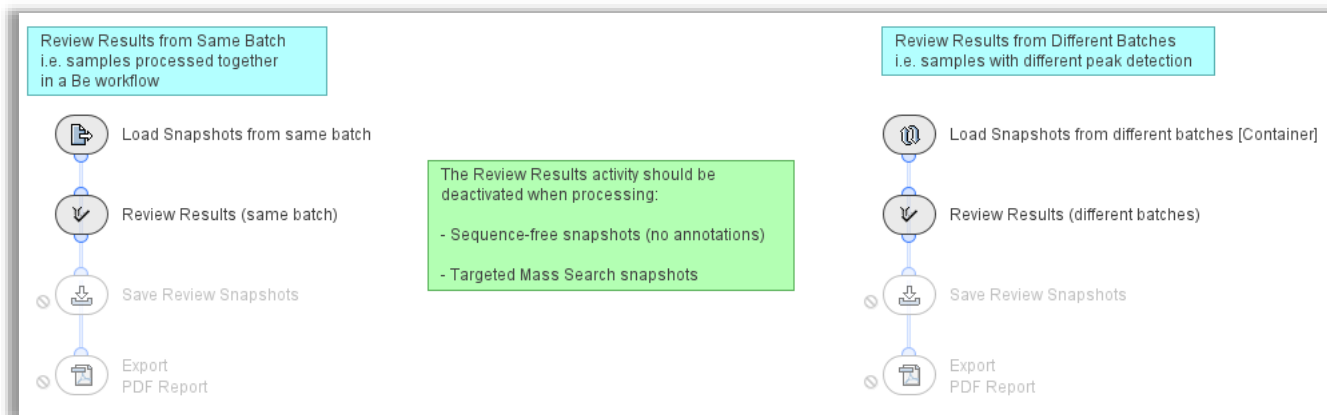
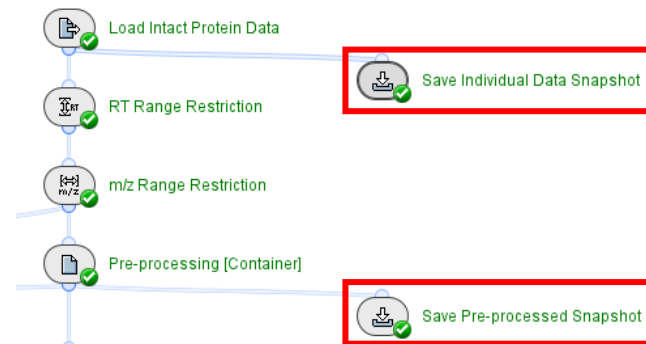
Elapsed Time 3 msec

Status Suspicious

Message The normalized UV absorbances could not be computed due to missing and/or duplicated annotations.

보고: *Save Snapshots*

- 워크플로 전체에서 여러 단계를 수행한 후 중간 결과를 저장합니다.
 - *Save Snapshot* 활동 노드는 처리된 데이터의 필수 속성이 포함된 파일(sbf)을 생성합니다.
- 저장된 데이터를 검토하려면 *Intact_ReviewSnapshots* 워크플로의 *Load Snapshots* 활동 노드에서 저장된 sbf 파일을 엽니다.



보고: *Save Snapshots*

- 결과를 저장할 폴더를 선택하거나 생성합니다.
 - 기본 위치: C:\ProgramData\Sciex\BiologicsExplorer\data\data\user

스냅샷 저장 옵션:

1. *Save Individual Data Snapshot*: 원시 데이터를 sbf 형식으로 변환합니다. 동일한 wiff 또는 wiff2 컨테이너의 여러 샘플과 동일한 실행에서 수행되는 여러 실험이 개별 스냅샷으로 저장됩니다.
2. *Save Pre-processed Snapshot*: 디콘볼루션 전에 데이터 정리 및 RT 정렬의 중간 결과를 저장합니다.
3. *Save Sequence-free Snapshot*: *Peak Detection* 후 저장되며, 단백질 시퀀스 없이도 디콘볼루션 이후의 피크 정보를 저장합니다.
4. *Save Annotation Snapshot*: 검토 프로세스 후 저장되며, 피쳐 주석을 포함한 모든 중간 정보를 필터링 및 수동 검토 결과와 함께 저장합니다.
5. *Save Targeted Search Snapshot*: *Filter Annotated Peaks* 후 저장되며, *Targeted Mass Search*를 사용하여 주석 이후의 피크 정보를 저장합니다.
6. *Save Review Snapshots*: 검토 프로세스 후 *Intact_ReviewSnapshots* 워크플로에 저장됩니다. *Save Annotation Snapshot*과 같이 모든 정보를 저장합니다.



Save Individual Data Snapshot



Save Pre-processed Snapshot



Save Sequence-free Snapshot



Save Annotation Snapshot

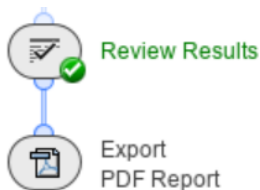


Save Targeted Search Snapshot



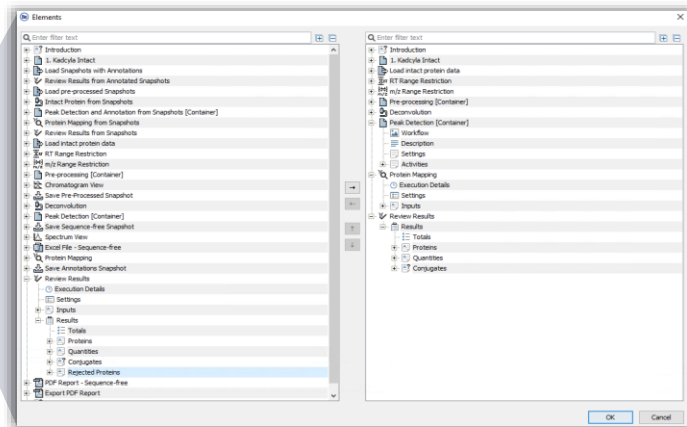
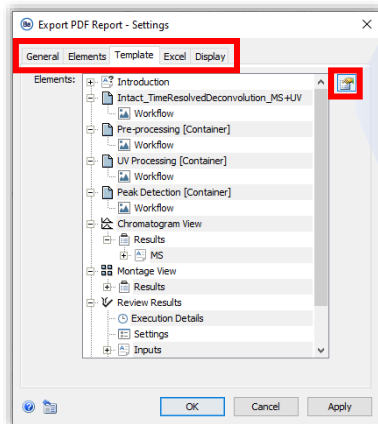
Save Review Snapshots

보고: *Export PDF Report*



- *Export PDF Report* 활동 노드는 다음을 생성합니다.
 - PDF 문서
 - 디콘볼루션의 스펙트럼 정보가 포함된 Excel 파일
 - 결과를 생성하는 데 사용된 설정을 포함하는 실행된 워크플로(xml)
 - xml 파일을 열려면 Biologics Explorer 워크플로 홈 페이지로 파일을 끌어서 놓습니다.

- **General** 탭: 내보낸 보고서의 대상을 정의합니다.
- **Template** 탭: 보고서 내용을 사용자 지정합니다.
- **Excel** 탭: 보고서와 함께 내보낼 추가 테이블을 사용자 지정합니다.



보고: Excel 파일 저장 또는 내보내기

- 생성된 Excel 파일에는 피크와 관련된 정량적 정보가 포함되어 있습니다.
 - **Automated Deconvolution:** 정량적 정보를 **Maximum Intensity**로 내보냅니다.
 - **Time Resolved Deconvolution:** 정량적 정보를 **Volume**으로 내보냅니다.

Name	Mass	RT	Mass Wdth	RT Height	Area	Mass Min	Mass Max	RT Min	RT Max	
20220217_20220217_Adamimab_ideS-DTT.2 [2]	3206.03833	2532.38	5.250895	18	0.448667	8.0742	25323.5	25341.5	5.157967	5.60633
Peak_00	480.4490356	25494.41	5.245409	12	0.28145	3.3774	25488.5	25500.5	5.157967	5.439417
Peak_01	432.8087769	25223.43	5.343585	12	0.369408	4.4329	25219.5	25231.5	5.19315	5.562558
Peak_02	5228.773926	25366.3	5.351897	18	0.49255	8.8659	25357.5	25375.5	5.19315	5.6857
Peak_03	785.7726525	24976.16	5.344246	16	0.351825	5.6292	24968.5	24984.5	5.201942	5.553767
Peak_04	1240.089233	25001.06	5.344819	15	0.360617	5.40925	24994.5	25009.5	5.201942	5.562558
Peak_05	207.4940948	25142.44	5.304126	5	0.263867	1.319333	25140.5	25145.5	5.201942	5.465808
Peak_06	23351.86328	25204.28	5.362964	20	0.439775	8.7955	25194.5	25214.5	5.201942	5.641717
Peak_07	258.5281372	25550.26	5.350916	7	0.325433	2.378933	25446.5	25453.5	5.201942	5.573775
Peak_08	536.6027892	24838.63	5.337205	11	0.325433	3.579767	24832.5	24843.5	5.210733	5.536167
Peak_09	223.7139282	25136.6	5.322132	4	0.272667	1.090667	25134.5	25138.5	5.210733	5.4834
Peak_10	1393.563965	25185.9	5.364173	12	0.4046	4.8552	25178.5	25190.5	5.210733	5.615333
Peak_11	231.4377747	25250.44	5.357551	8	0.334233	2.673867	25245.5	25253.5	5.210733	5.544967
Peak_12	424.6436462	25204.39	5.85781	12	0.158317	1.8998	25198.5	25210.5	5.78245	5.940767
Peak_13	67678.54688	23412.21	6.044723	21	0.510142	10.71298	23403.5	23424.5	5.826425	6.336567
Peak_14	307.2645874	22546.69	5.997263	9	0.263867	2.3748	22543.5	22552.5	5.8704	6.134267
Peak_15	2944.370605	23393.47	6.040324	12	0.474958	5.6995	23386.5	23396.5	5.8704	6.345358
Peak_16	806.7955322	23634.23	6.039181	10	0.422183	4.221833	23429.5	23439.5	5.8792	6.301383
Peak_17	1119.460815	23457.05	6.050581	11	0.430983	4.740817	23450.5	23461.5	5.8792	6.310183
Peak_18	1142.189697	23464.35	6.050805	4	0.430975	1.7239	23462.5	23466.5	5.888	6.318975
Peak_19	431.1587524	22630.68	6.056369	4	0.395792	1.583167	22628.5	22632.5	5.896792	6.292583



Excel File - Sequence-free



Export
Excel File - Targeted Search

- 결과를 저장할 폴더를 선택하거나 생성합니다.
 - 기본 위치: C:\ProgramData\Sciex\BiologicsExplorer\data\data\user

파트 A

소프트웨어와 워크플로

특정 원형 질량 분석 워크플로 지침

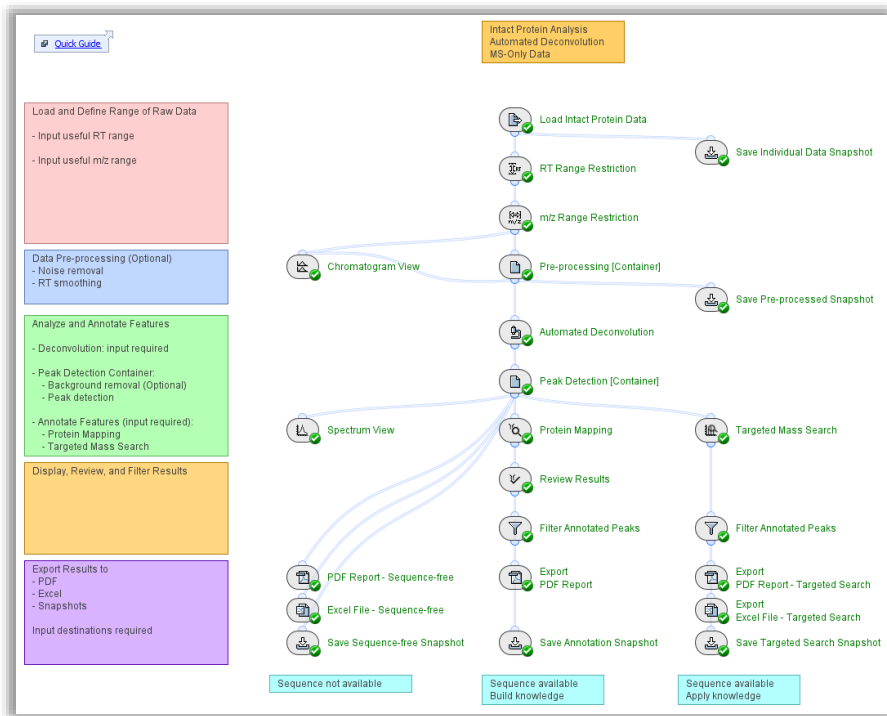


MS 데이터 또는 MS/UV 데이터를 사용한 자동 디콘볼루션

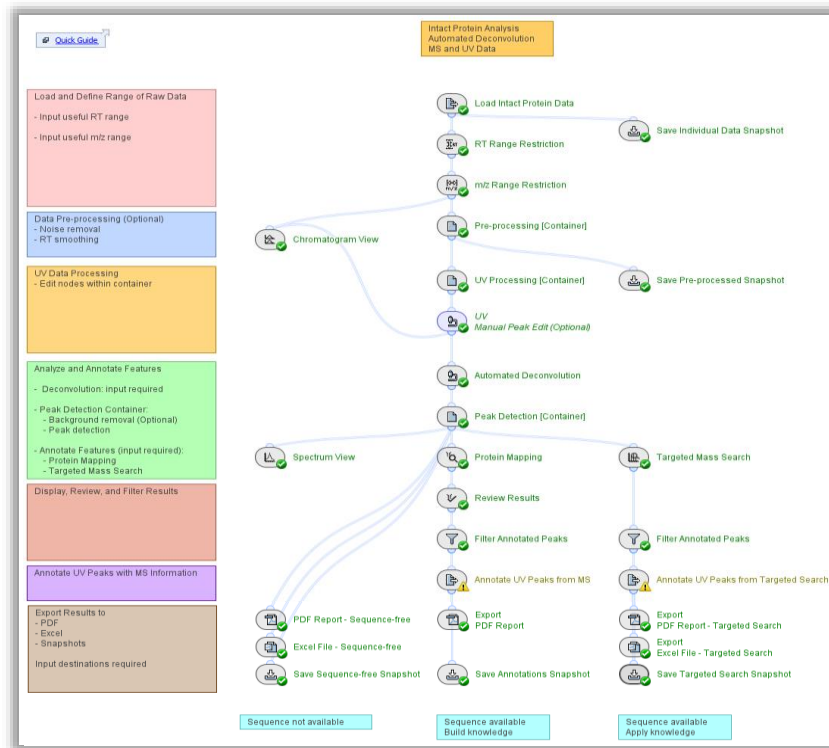
워크플로 지침



자동 디콘볼루션 워크플로: 설계



Intact_AutomatedDeconvolution_MS 워크플로



Intact_AutomatedDeconvolution_UV+MS 워크플로

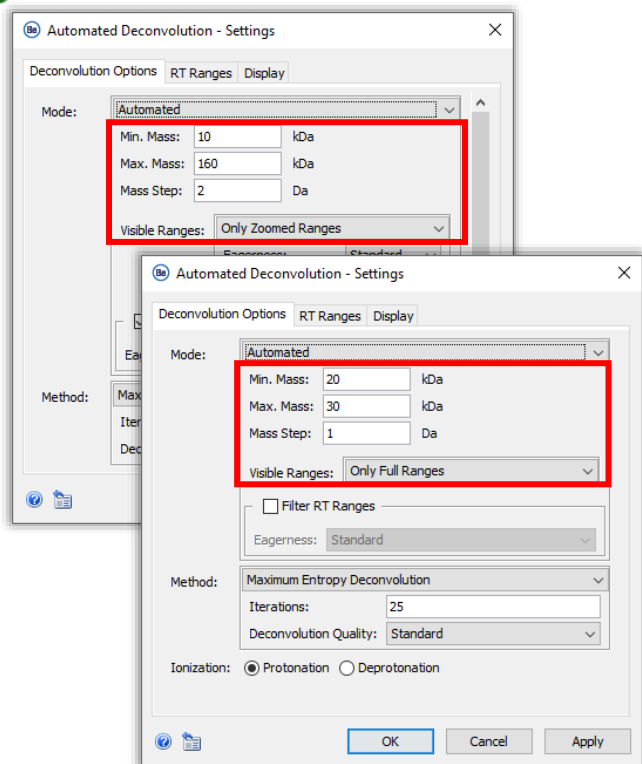
자동 디콘볼루션 워크플로: 개요

- **Automated Deconvolution**은 관심 종이 크로마토그래피 분석으로 잘 분해될 때 최적입니다.
- **Biologics Explorer** 소프트웨어는 여러 샘플을 함께 분석(배치 분석)할 때 공통 피크 검출 방식을 적용합니다.
 - 주석 및 정량화를 일관되게 하려면 유사한 데이터를 사용하십시오. 예를 들어 모든 원형 단백질 또는 모든 서브유닛 데이터 세트만 함께 분석합니다.
 - 피크 강도가 매우 가변적인 여러 샘플을 분석하는 경우 '*Automated Deconvolution*: 수동 RT 범위' 슬라이드에서 워크플로 설정 최적화에 대한 지침을 참조하십시오.

Automated Deconvolution: Deconvolution Options



Automated Deconvolution



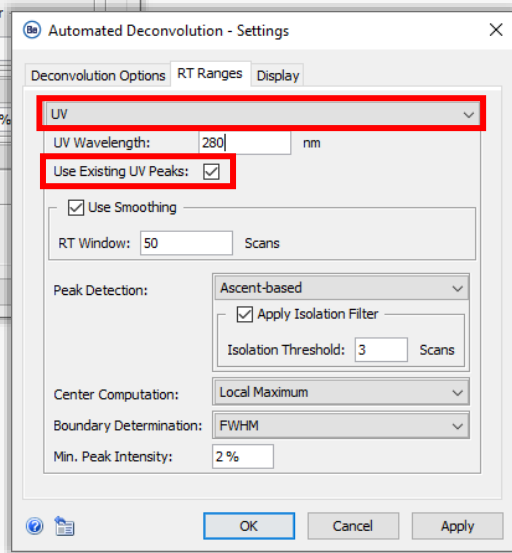
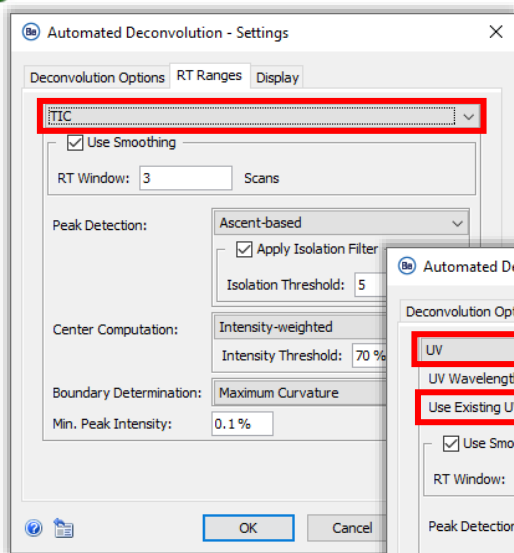
Deconvolution Options 탭에서 설정을 구성하여 디콘볼루션 스펙트럼에 대한 관련 질량 범위 및 시각화 옵션을 정의합니다.

- 질량 범위:**
 - 여러 종을 분석할 때 고조파 피크가 두드러지지 않게 하려면 넓은 질량 범위를 사용합니다.
 - 단일 엔터티에 초점을 맞추려면 좁은 질량 범위를 사용합니다.
- Visible Ranges**는 결과가 표시되는 방식을 제어합니다.
 - 동일한 RT 범위에서 여러 구성 요소가 감지되는 경우 **Only Zoomed Ranges**를 사용합니다.
- 디콘볼루션 전후의 피크에서 동일한 수의 데이터 요소를 생성하는 **Mass Step** 값을 설정합니다.
 - 0.1Da ~ 0.2Da: 동위원소 분해 데이터
 - 1Da: 서브유닛(분해능이 낮은 데이터)
 - 2Da: 원형 단백질(분해능이 낮은 데이터)
 - 3Da: 필요한 데이터 요소가 적은 경우

Automated Deconvolution: RT 범위



Automated Deconvolution



- **RT Ranges** 탭에서 설정을 구성하여 관심 RT 영역을 식별합니다.

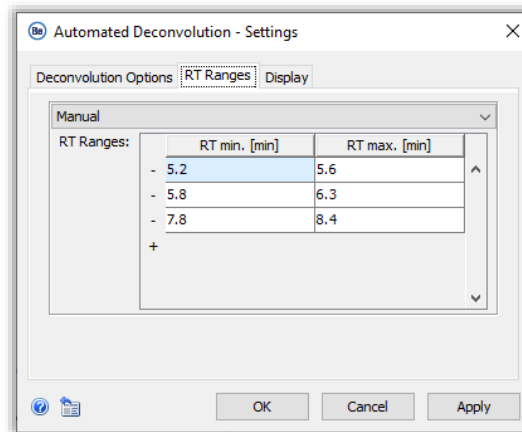
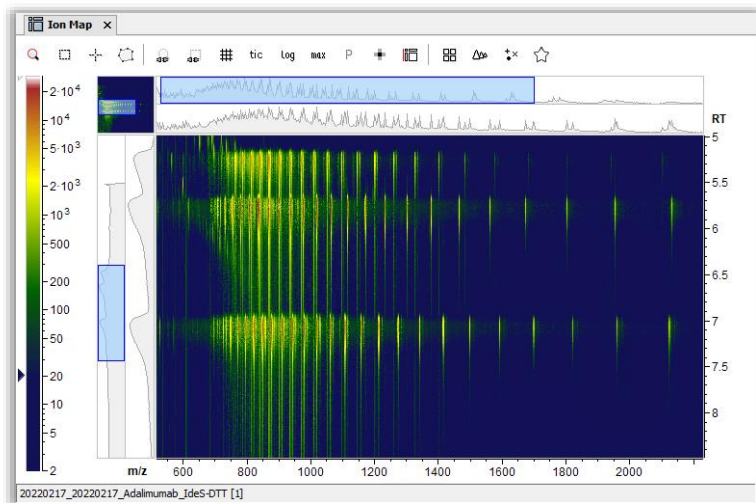
- 목록에서 다음 옵션 중 하나를 선택합니다.
 - **TIC**: 총 이온 크로마토그램을 사용하여 RT 범위를 식별합니다.
 - **Manual**: RT 범위를 수동으로 정의합니다.
 - **UV**: UV 데이터의 피크를 기반으로 RT 범위를 정의합니다.
- UV 데이터를 사용하여 RT 범위를 정의하려면:
 - Intact_AutomatedDeconvolution_UV+MS 워크플로를 사용합니다.
 - **UV Wavelength**를 정의합니다.
 - **Use Existing UV Peaks**를 선택합니다. 이 탭의 후속 피크 검출 설정은 무시됩니다.

Automated Deconvolution: 수동 RT 범위



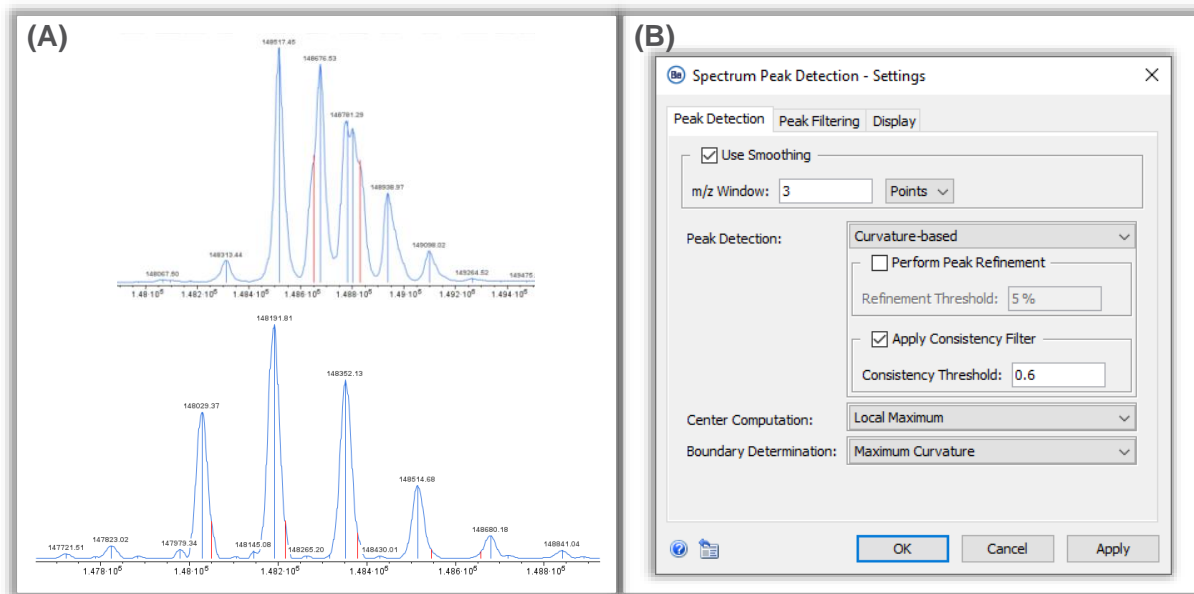
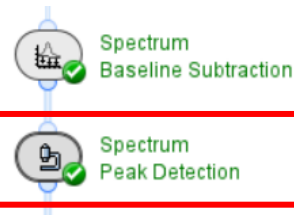
Automated Deconvolution

- 배치 분석에서 샘플 간에 신호 강도가 크게 다른 경우 RT 범위를 수동으로 정의합니다.
 - 예: 희석 시리즈 또는 시간 경로 실험
- **RT Ranges** 탭에서 **Manual** 모드를 선택합니다.



Spectrum Peak Detection

- 대부분의 경우 기본 설정(**Ascent-based** 피크 검출)이 최적입니다.
- 솔더 피크를 분해하려면 **Curvature-based** 피크 검출을 사용합니다.
 - 매개 변수에 대한 자세한 설명은 온라인 도움말을 참조하십시오.



- A. **Curvature-based** 피크 검출을 사용하여 솔더 피크를 분해할 때 생성된 디콘볼루션 스펙트럼
- B. 표시된 스펙트럼에서 솔더 피크를 분해하는 데 사용된 설정의 예

Review Results: 주식 수락 및 거부

- *Review Results* 활동 노드 열기:

1. **Review** 모드를 활성화하고 모든 관련 피크에 대해 하나의 주석을 수락합니다.
2. 다른 모든 중복 주석을 거부합니다.
3. **Save**를 클릭하여 변경 내용을 적용합니다. 활동 노드가 다시 실행되어 수량이 자동으로 다시 계산됩니다.

Protein Mapping

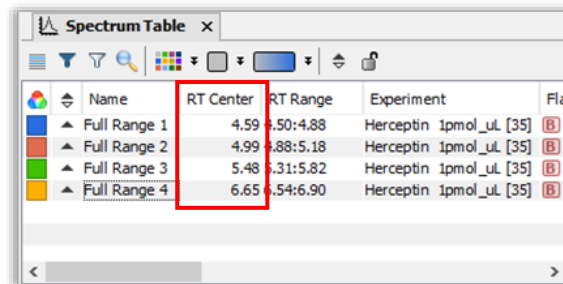
Review Results

✓/✗	Range	Peak Id	Protein Name	Disulfide Bonds	Modifications	Glycosylation
✗	Full Range 3	840	HerLC	2*S-S	Cysteiny	
✓	Full Range 4	4171	HerHC-HerHC...	16*S-S	2*Lys-loss	G0F
✓	Full Range 4	4188	HerHC-HerHC...	16*S-S	2*Lys-loss	2*Man5
✗	Full Range 4	4189	HerHC-HerHC...	16*S-S	2*Lys-loss	G0 + G0F-GlcNAc

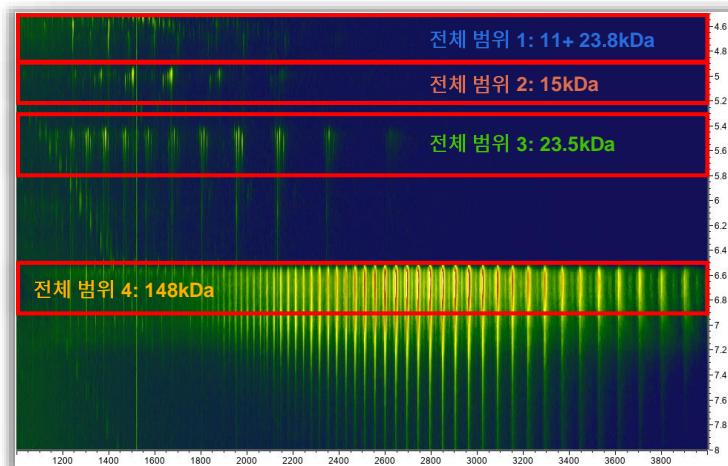
- *Review Results*는 복잡한 글리코실화 패턴이 있는 단백질을 분석하고 ADC가 DAR 값을 올바르게 계산하는 데 중요한 단계입니다.

Review Results: 스펙트럼 테이블

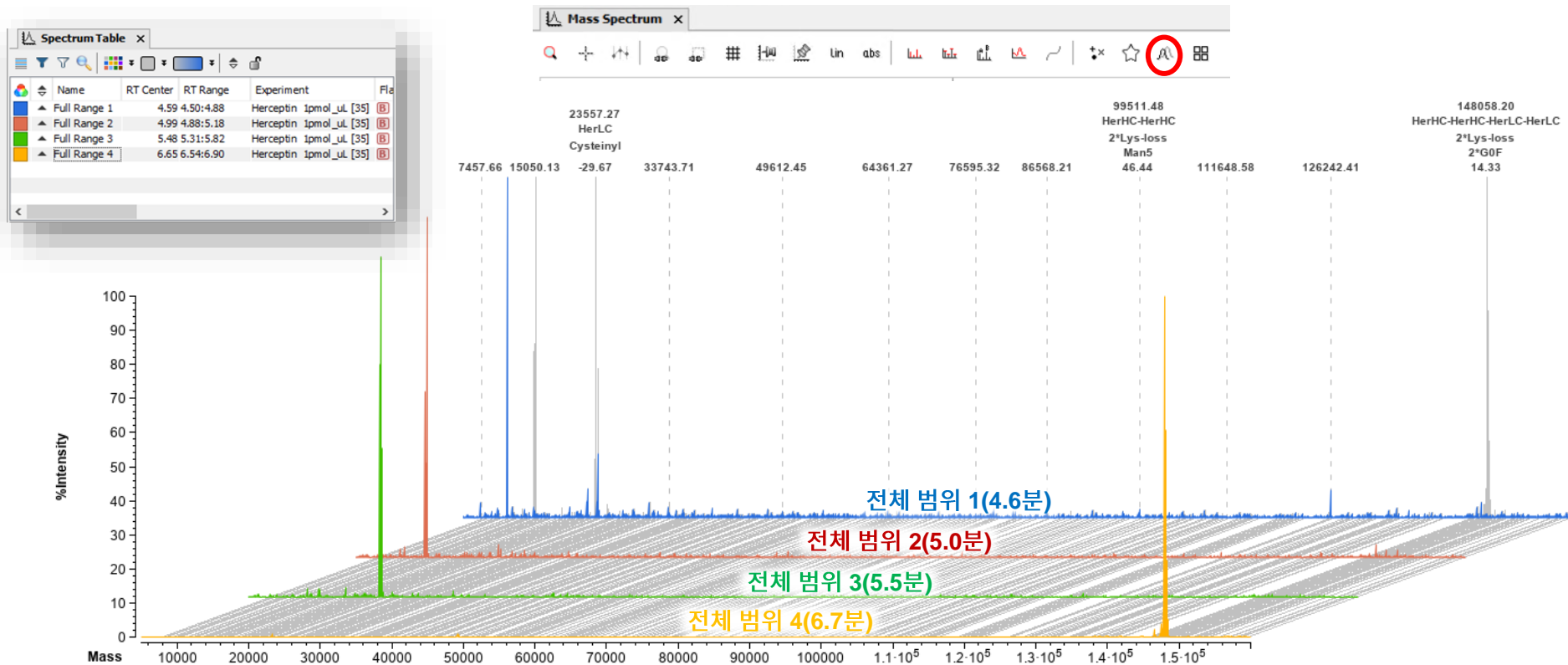
- **Spectrum Table**에는 감지된 단백질 신호의 **RT Center**와 감지된 RT 범위가 나열됩니다.
- 각 시간 범위 내의 모든 스캔이 합산되고 디콘블루션되어 해당 스펙트럼을 생성합니다.



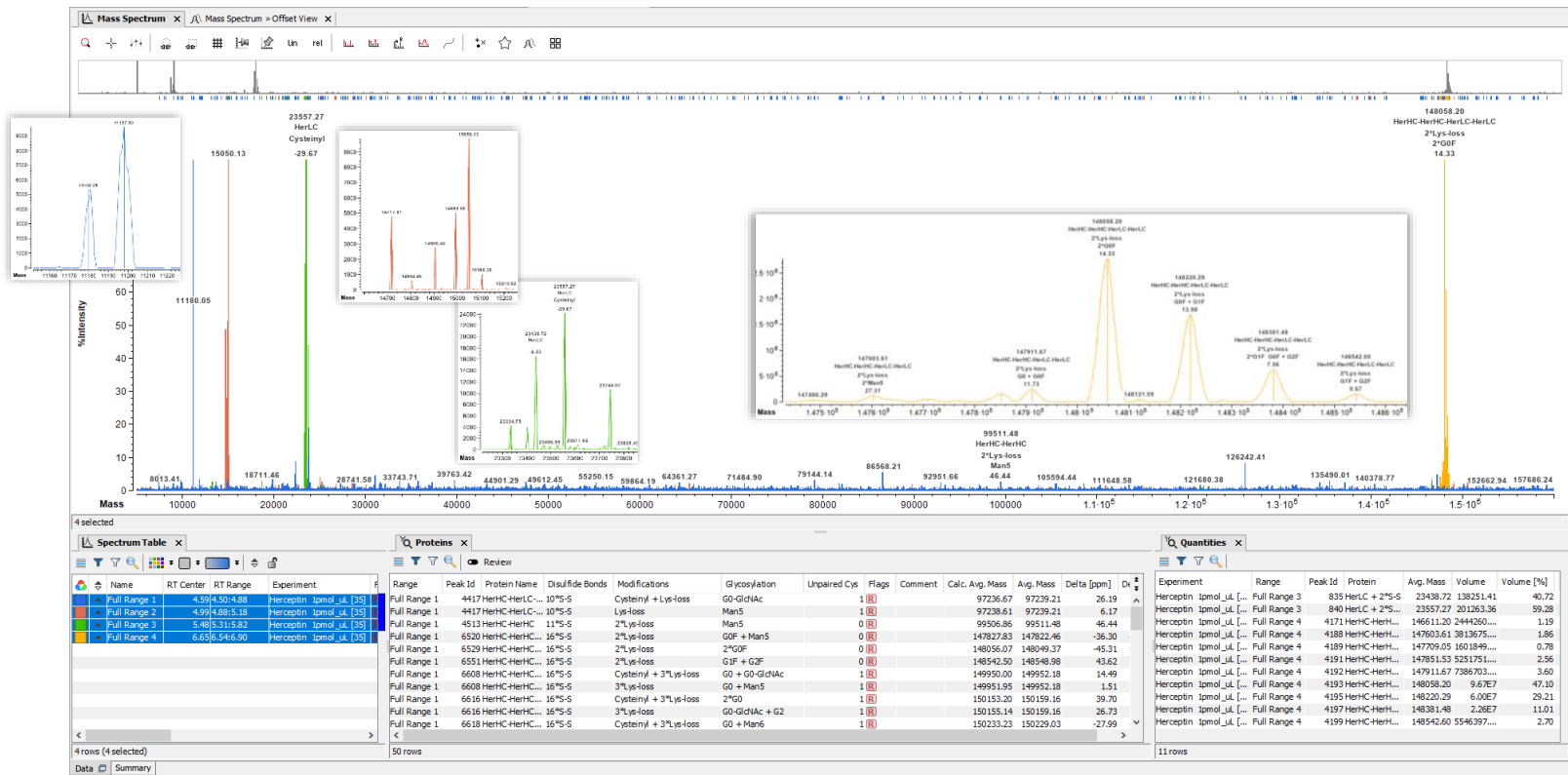
Name	RT Center	RT Range	Experiment	File
▲ Full Range 1	4.59	4.50:4.88	Herceptin 1pmol_ul [35]	B
▲ Full Range 2	4.99	4.88:5.18	Herceptin 1pmol_ul [35]	B
▲ Full Range 3	5.48	5.31:5.82	Herceptin 1pmol_ul [35]	B
▲ Full Range 4	6.65	6.54:6.90	Herceptin 1pmol_ul [35]	B



Review Results: 스펙트럼 오프셋 보기



Review Results: 스펙트럼 겹침 보기

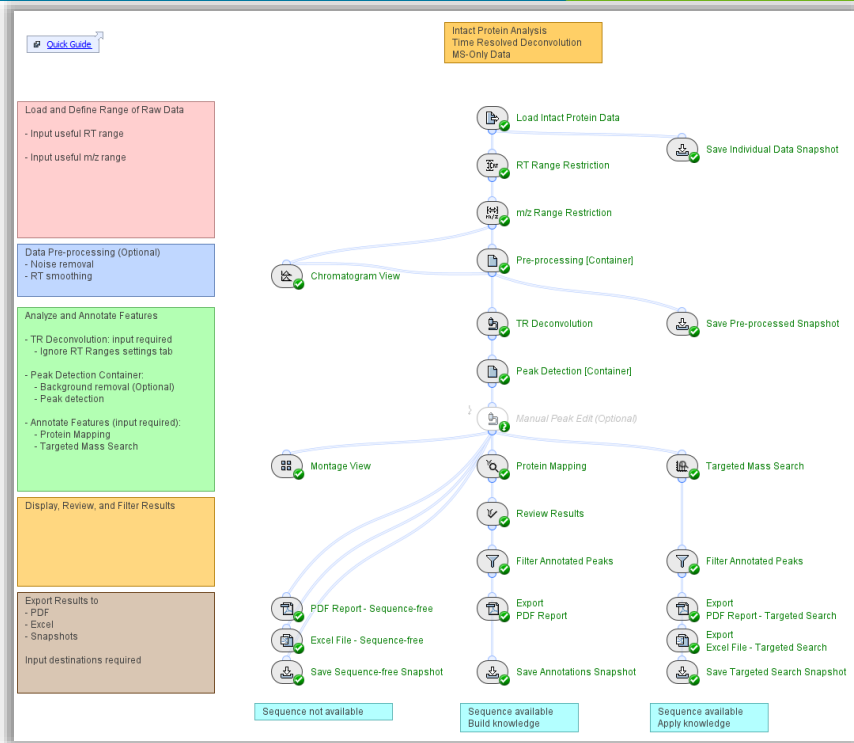


MS 데이터 또는 MS/UV 데이터를 사용한 시간 분해 디콘볼루션

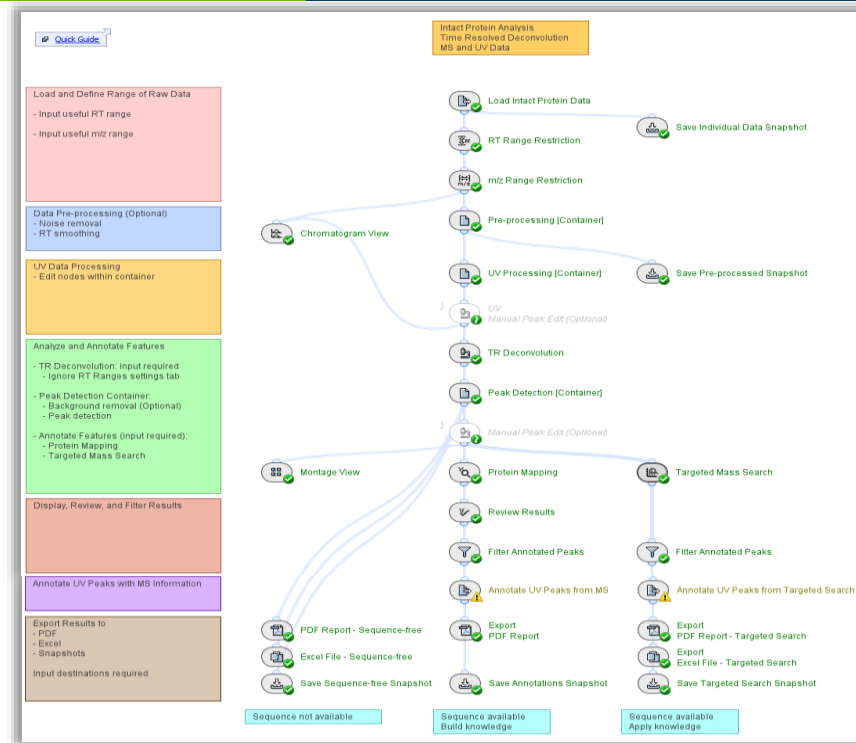
워크플로별 지침



TRD 워크플로: 설계



Intact_TimeResolvedDeconvolution_MS 워크플로



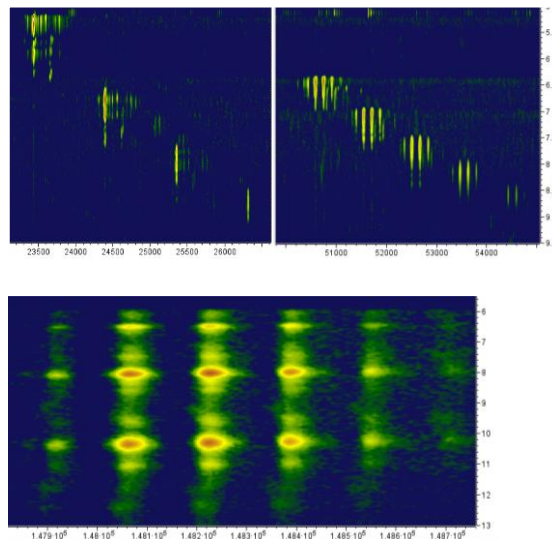
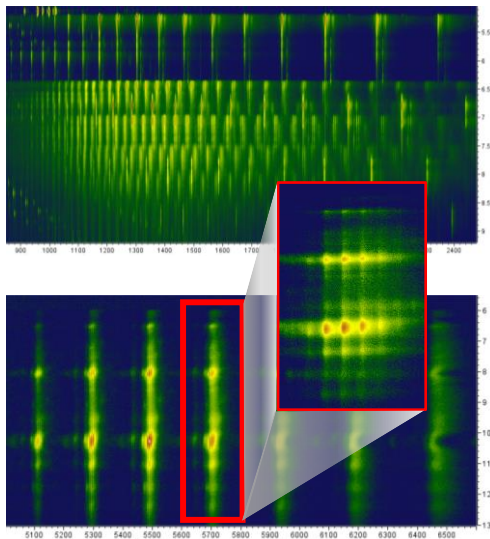
Intact_TimeResolvedDeconvolution_UV+MS 워크플로



TRD 워크플로: 개요

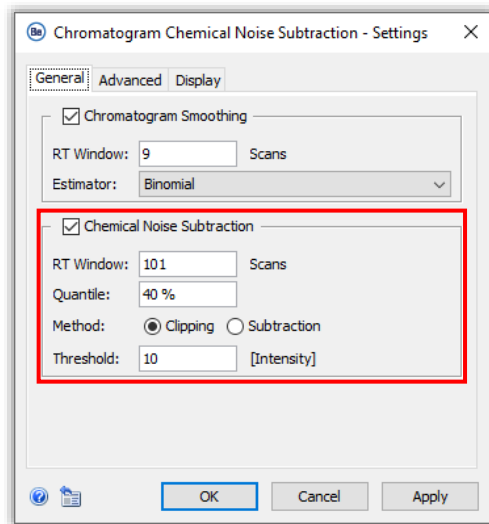
- **TRD**는 질량이 비슷하고 크로마토그래픽 프로필이 겹치는 여러 구성 요소를 분석하는 동안 강력한 정량화를 위해 필요합니다.
- 또한 **TRD**는 산화, 부분 환원 및 부가물 등과 관련된 피크의 세부 정보를 제공하여 변형된 단백질형의 특성화 중에 이러한 정보를 충분히 활용할 수 있습니다.

TRD 전
(m/z)

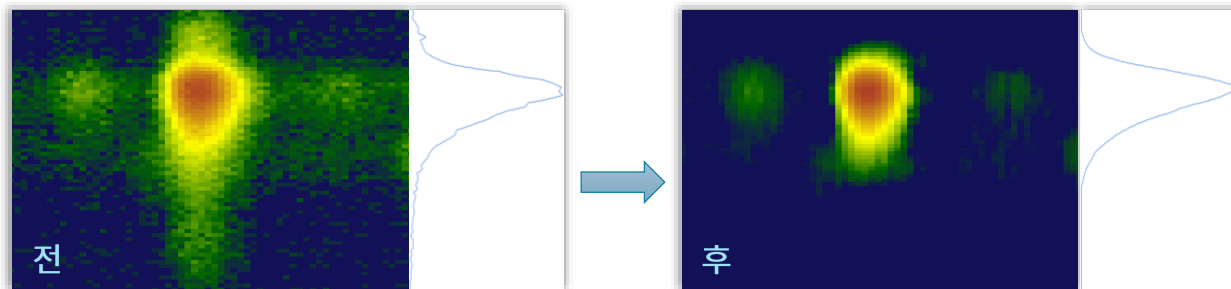


TRD 후
(질량)

Chemical Noise Subtraction: 최적화



- **Chemical Noise Subtraction**은 TRD 데이터에 사용되어 다음과 같은 방법으로 위성 피크를 억제하고 피크 검출을 향상시킵니다.
 - 넓은 피크의 광범위한 테일링을 제거합니다.
 - 전체적인 배경 노이즈를 줄입니다.



- **표준 설정 범위:**

- **RT Window:** 최대 피크에서 스캔 수의 약 1.3배
- **Quantile:** 40 ~ 50%

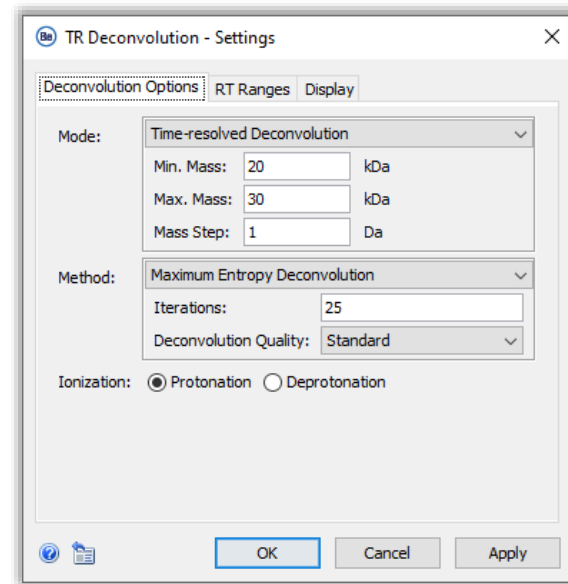
- **설정 결과 요약:**

- **RT Window**가 클수록 감산되는 데이터가 적음
- **Quantile**이 높을수록 감산되는 데이터가 많음

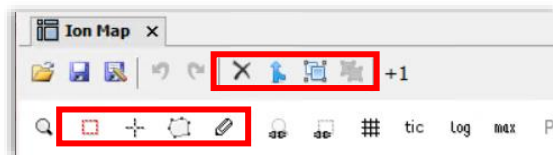
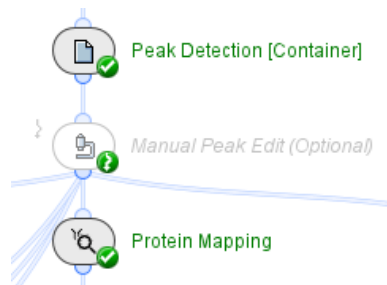
TR Deconvolution: 데이터 분석 속도에 미치는 영향

TRD는 Automated Deconvolution보다 컴퓨터 리소스를 더 많이 사용하는 알고리즘입니다.

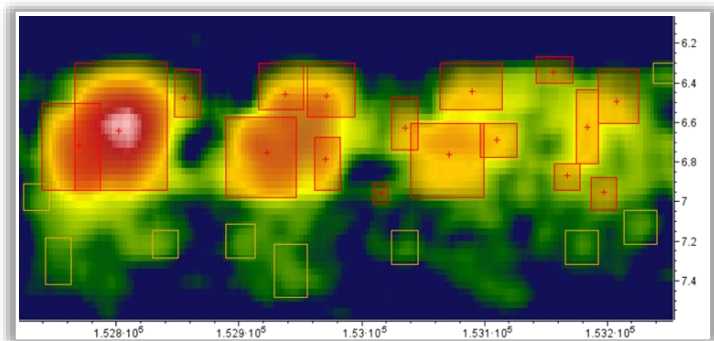
- 디콘볼루션된 질량 범위와 데이터 밀도는 처리 시간에 상당한 영향을 미칩니다.
 - 단편/서브유닛 데이터 세트의 데이터 밀도가 전체 mAb 데이터 세트보다 더 높은 경우가 많습니다.
- **Min./Max. Mass**와 **Mass Step**은 각 데이터 세트에 대해 최적화되어야 합니다.
 - 특정 데이터 세트에 적용 가능한 경우 질량 범위가 더 작고 질량 스텝이 더 클수록 필요한 처리 시간을 줄일 수 있습니다.
- **TRD**를 선택하면 **RT Ranges** 탭의 설정이 무시됩니다.
 - 전체 RT 범위를 대상으로 디콘볼루션이 발생하여 디콘볼루션 이온 맵을 생성합니다.



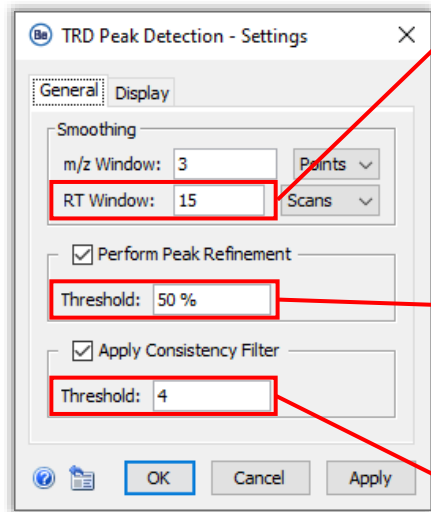
Manual Peak Edit(선택 사항)



- 이 활동은 기본적으로 생략됩니다.
- *Manual Peak Edit*를 사용하면 디콘볼루션 이온 맵에서 자동으로 검출된 피크를 다음과 같이 구체화할 수 있습니다.
 - 피크의 경계 변경
 - 겹치는 피크 분할
 - 피크 삭제
 - 새 피크 그리기
- *Manual Peak Edit*를 사용하여 겹치는 구성 요소의 강도 분포를 개별 피크에 정확하게 재할당합니다.
 - 이렇게 하면 복잡한 분석의 매우 미세한 세부 사항을 캡처할 수 있습니다.



TRD Peak Detection: 최적화



RT(↕)를 따라 분할된 피크 수에 영향을 줍니다.

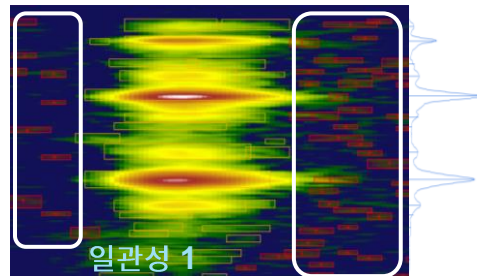
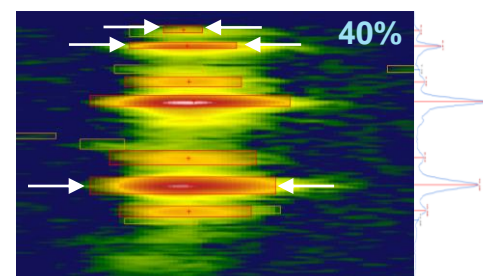
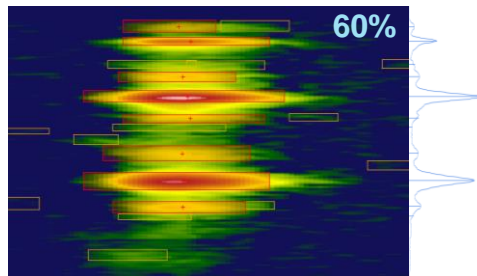
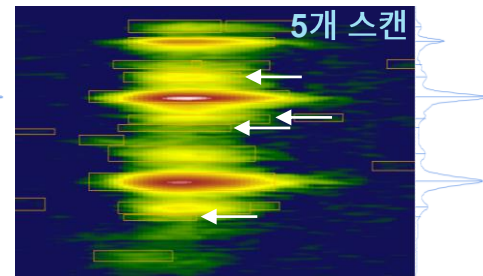
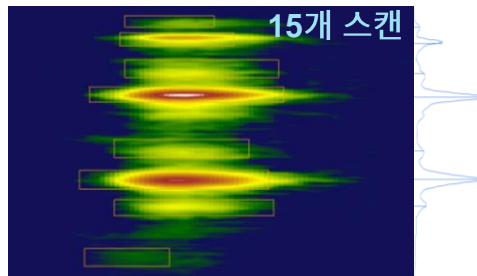
값이 낮을수록 RT 방향으로 분할이 증가함

질량 축(↔)을 따라 피크의 수와 폭에 영향을 줍니다.

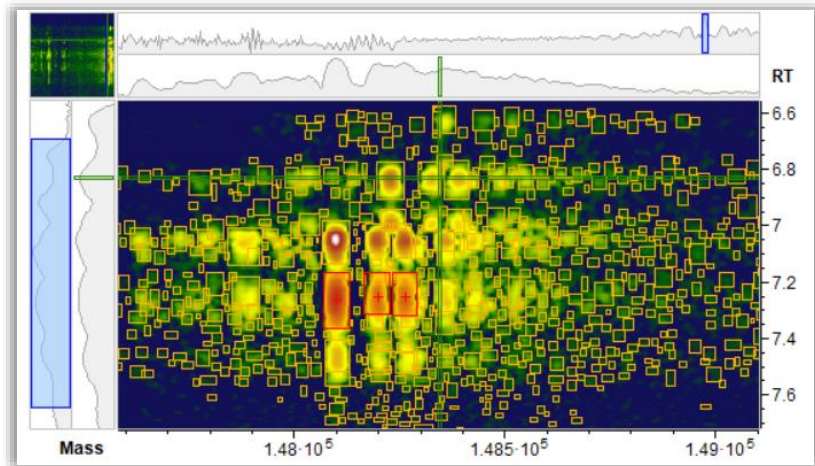
값이 낮을수록 피크가 m/z 방향으로 분할될 확률이 높음

감도에 영향을 주어 배경 피크 수에도 영향을 줍니다.

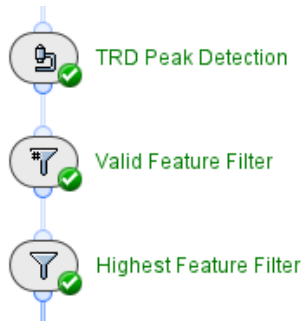
값이 낮을수록 m/z 분할이 증가함



TRD Peak Detection: 최적화

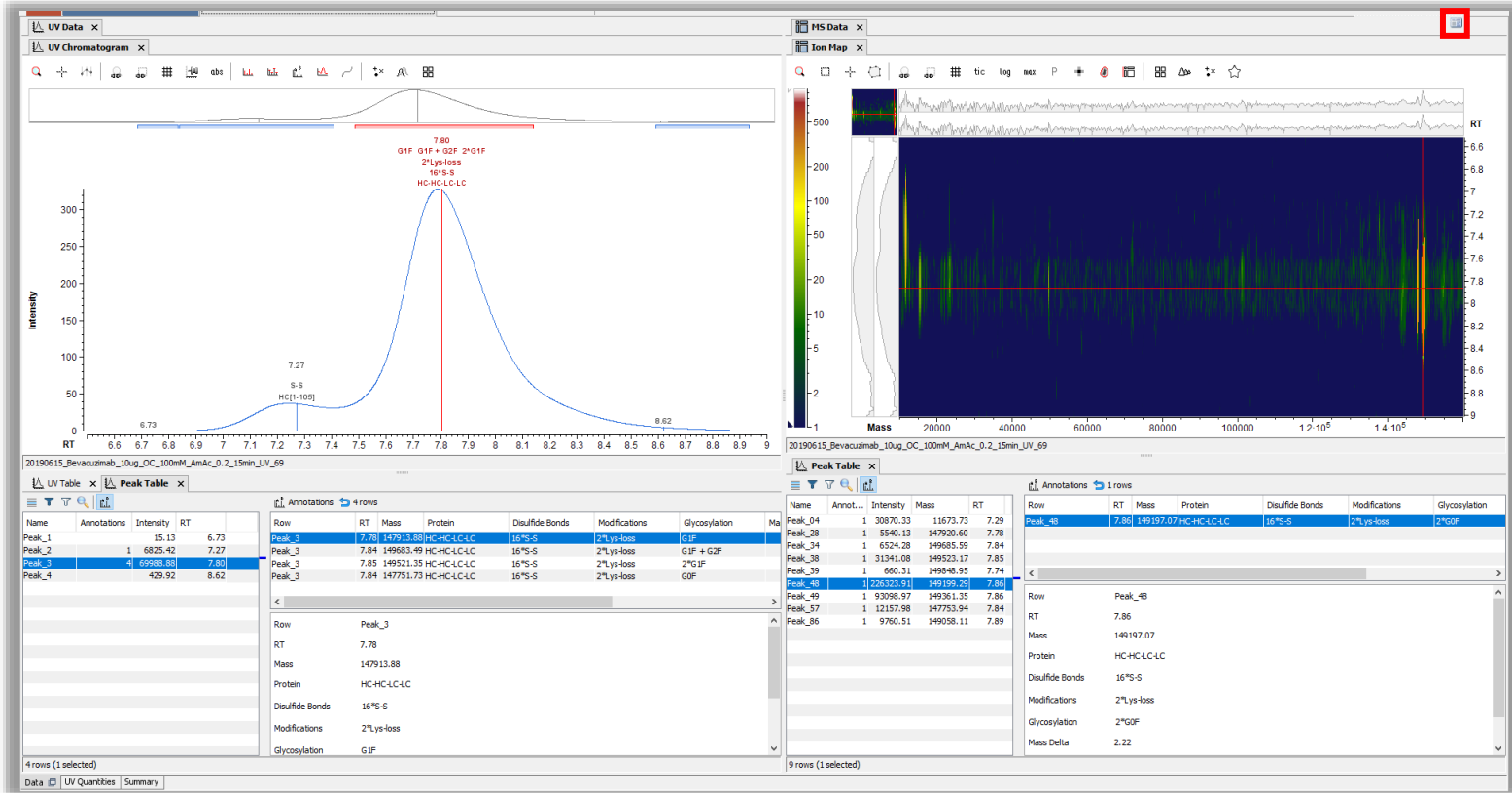


- 복잡한 디콘볼루션 이온 맵에서 여러 개의 작은 피처가 감지되는 경우:
 - **Consistency Filter Threshold**를 2 또는 3으로 높여 감도를 낮출 수 있습니다.



- *Valid Feature Filter* 및 *Highest Feature Filter* 활동 노드를 사용하면 선택한 피처의 수를 줄일 수도 있습니다.

UV 데이터를 사용한 TRD 결과를 검토하기 위한 권장 레이아웃



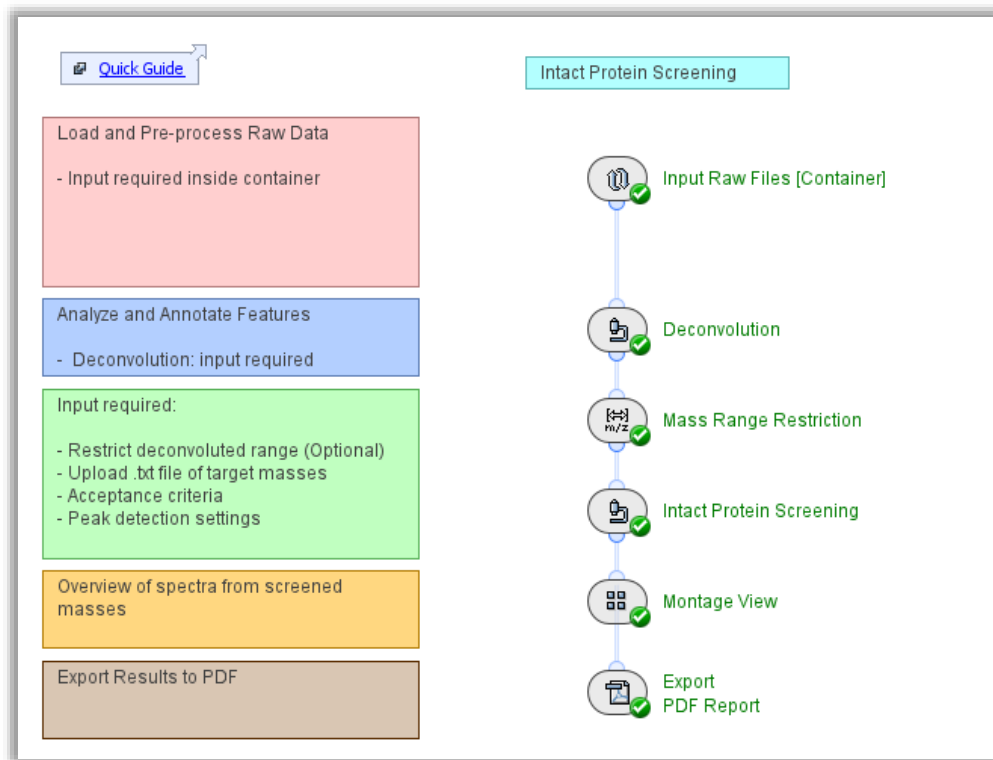
- Layout 아이콘으로 자주 사용하는 레이아웃을 저장하고 액세스할 수 있습니다.

원형 질량 분석 스크리닝

워크플로별 지침



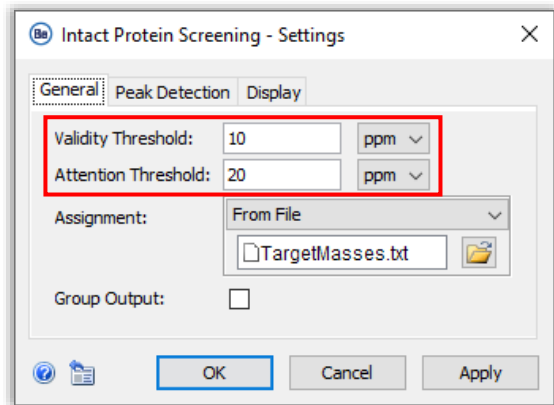
원형 질량 분석 스크리닝 워크플로: 설계



Intact_MassScreening

원형 질량 분석 스크리닝 워크플로: 개요

- 이 워크플로는 대규모 샘플 배치의 고속 대량 스크리닝을 위한 빠른 디콘볼루션을 제공합니다.
- 지정된 질량 신뢰 한계(ppm 또는 Da) 내에 목표 질량이 있는지 여부를 확인할 수 있습니다.
- 시각적 요약 테이블에서는 각 샘플을 다음과 같이 식별합니다.
 - **Valid(✓)**: 계산된 질량이 Validity Threshold 값 미만입니다.
 - **Critical(!!)**: 계산된 질량이 Validity Threshold와 Attention Threshold 값 사이입니다.
 - **Invalid(x)**: 계산된 질량이 Attention Threshold 값을 초과합니다.



Zoomed Range 3

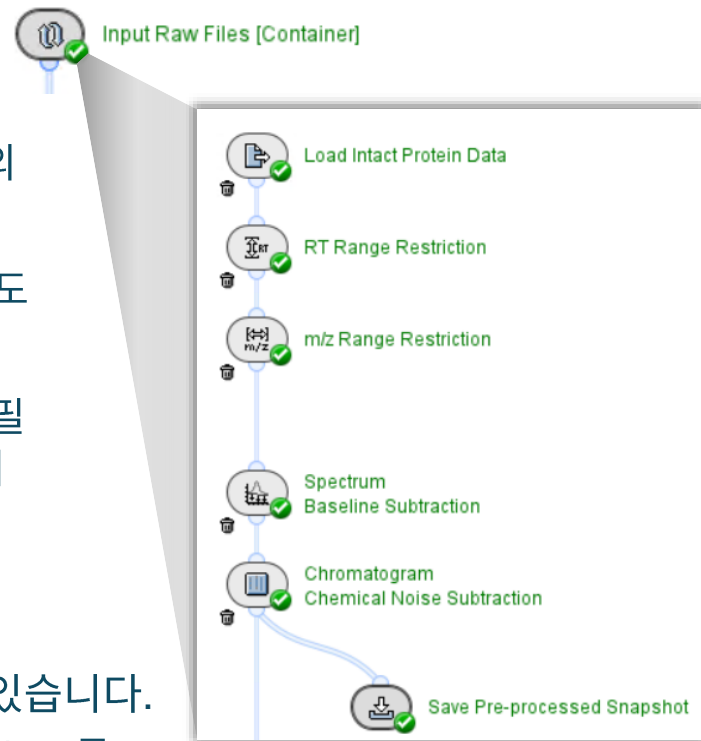
Name	Expected Mass	Detected Mass	Delta [Da]	Delta [ppm]	Valid
Remicade_IdeS_reduced	25647.51	25647.35	-0.17	-6.0	✓
Rituxan_IdeS_reduced	25328.19	25327.79	-0.41	-16.0	x
Herceptin_IdeS_TCEP	25383.31	25383.14	-0.16	-6.0	✓
Humira_IdeS_TCEP	25458.33	25457.95	-0.37	-15.0	!!
NIST_500ngOC_IdeS_Red_01	25688.91	25688.72	-0.19	-7.0	✓

원형 질량 분석 스크리닝 워크플로: 개요

- 고속 대량 스크리닝에 사용되는 계산 메모리를 줄이려면:

- *Input Raw Files* 컨테이너는 반복 프로세스를 사용하여 배치의 각 샘플을 개별적으로 전처리합니다.
- **Trash** 🗑️ 중간 결과가 후속 활동 노드에 전달되는 즉시 삭제되도록 컨테이너에서 기본적으로 활성화되어 있습니다.
- 전처리된 각 샘플의 전처리 결과를 스냅샷(sbf)으로 저장하여 필요한 경우 추가 조사를 위해 다른 원형 질량 분석 워크플로에서 사용할 수 있습니다.

- *Montage View* 활동 노드는 최대 200개의 샘플을 표시할 수 있습니다.
 - 200개가 넘는 샘플을 스크리닝하는 경우 *Montage View* 활동 노드를 건너뛸 수 있습니다.

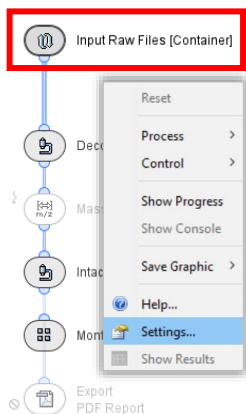


원형 질량 분석 스크리닝 워크플로: 조건 및 동작

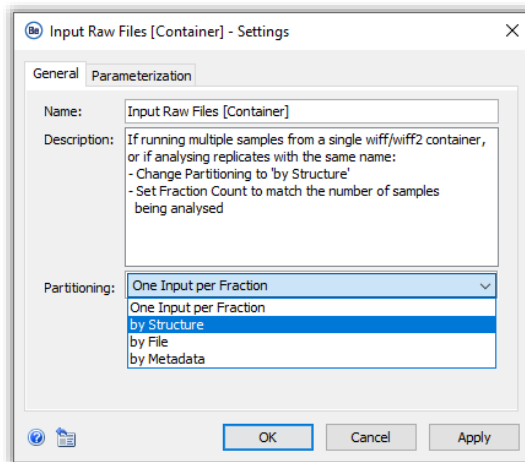
- 각 샘플에 대해 둘 이상의 질량을 검색할 수 있지만 제출된 샘플에서 특정 조건이 충족되어야 합니다.
 - 샘플은 동일한 분자 유형(예: 원형 단백질, 서브유닛 또는 단편)에 속해야 합니다.
 - 샘플은 크로마토그래피가 일관되고, 구성 요소 수가 동일하고, 예상 디콘볼루션 범위가 비슷해야 합니다.
 - 샘플은 **Full RT Ranges** 또는 **Zoomed RT Ranges** 수가 동일해야 합니다.
- 이 워크플로는 다음과 같은 동작을 수행하도록 되어 있습니다.
 - 각 샘플의 각 디콘볼루션 RT 범위(**Full** 또는 **Zoomed RT Range**)에서 최고 피크가 개별적으로 검출되고 질량 목록을 기반으로 단일 매칭 항목에 할당됩니다.
 - 결과에 주석이 포함되지 않습니다.
 - 검출된 질량의 값이 보고됩니다.

Input Raw Files: 이름이 같은 반복 샘플 분석

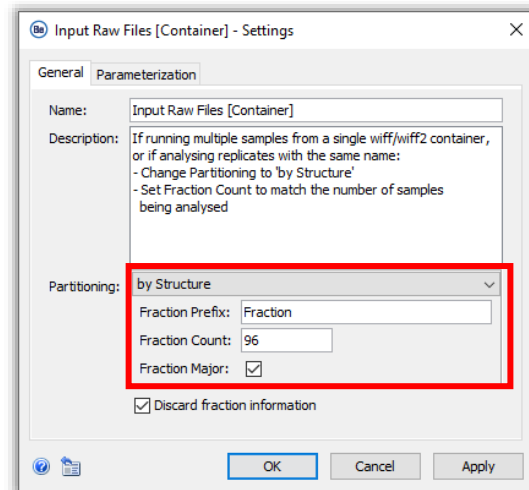
- 다음 작업을 위해 *Input Raw Files* 컨테이너 설정을 변경해야 합니다.
 - 파일 이름이 같은 반복 샘플 분석
 - 단일 wiff 또는 wiff2 컨테이너 내에서 서로 다른 여러 샘플 로드



(1) *Input Raw Files [Container]*를 마우스 오른쪽 버튼으로 클릭하여 Settings에 액세스



(2) Partitioning을 by Structure로 변경

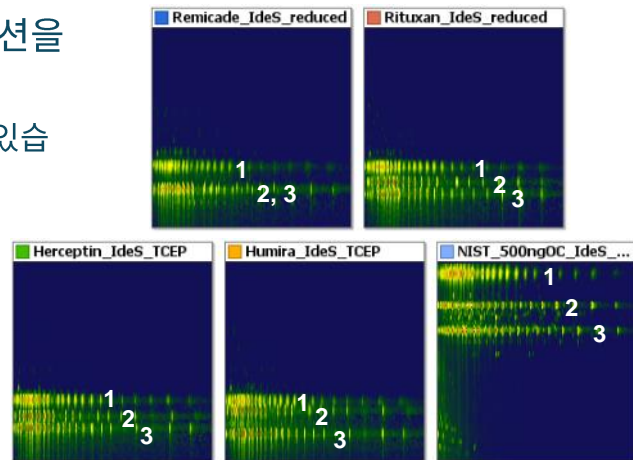


(3) 로드된 샘플 수를 Fraction Count 값으로 지정

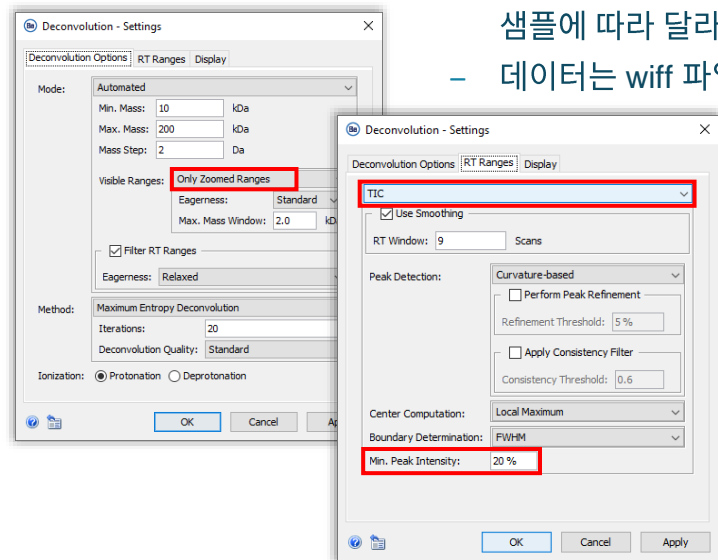
Deconvolution: 복잡한 데이터 세트에 맞게 최적화



- 템플릿 워크플로는 매우 복잡한 스크리닝 어플리케이션을 나타냅니다.
 - 서로 다른 mAb의 세 가지 대상 구성 요소(mAb 단편)가 있습니다.
 - 일관성 없는 크로마토그래피가 있습니다.
 - Fc/2 글리코형은 강도가 서로 유사하고 강도 순서는 샘플에 따라 달라집니다.
 - 데이터는 wiff 파일과 wiff2 파일에서 모두 제공됩니다.



- 이 유형의 데이터 세트에서 나타날 수 있는 문제를 해결하려면:
 - **TIC**를 사용하여 각 샘플의 특정 RT 범위를 자동으로 식별합니다.
 - **Min. Peak Intensity** 값을 20% 이상으로 설정하여 디콘볼루션 RT 범위의 수를 대상 단편과 관련된 범위로 제한합니다.
 - 샘플의 분자 유형이 동일하다고 가정할 때 같은 배치에서 스크리닝된 모든 샘플에 대해 범위가 동일할 것으로 예상되므로 **Only Zoomed Ranges**를 사용합니다.



Deconvolution: 있는/없는 RT 범위에 맞게 최적화



Deconvolution

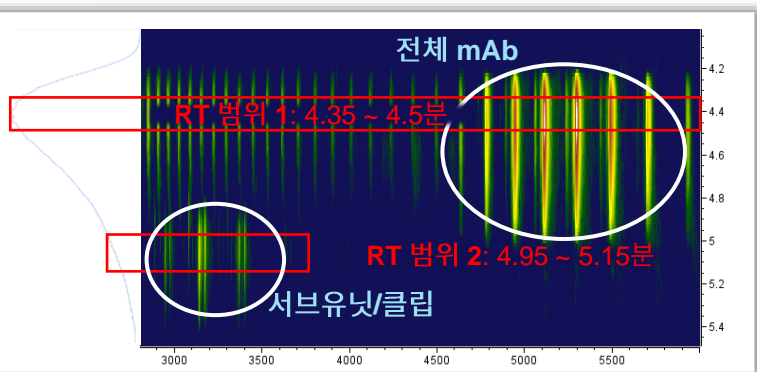
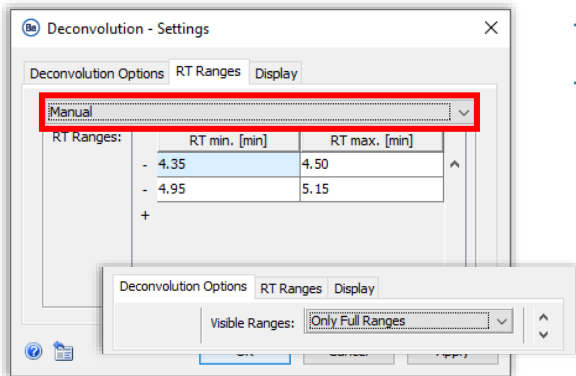
스크리닝 워크플로를 사용하여 분석하는 사용 사례의 경우:

- 주 대상 구성 요소: 전체 mAb(항상 예상됨)
- 알려진 부산물: 잘못 연결된 서브유닛(있거나 없을 수 있음)

- **TIC**를 사용하여 RT 범위를 식별하면 샘플당 RT 범위의 수가 달라집니다. 이로 인해 스크리닝 워크플로를 수행할 수 없습니다.

구성 요소가 없을 수도 있는 경우 **RT Ranges**의 최적 설정:

- **Manual**을 사용하여 각 구성 요소의 RT 범위를 지정합니다 (용리 프로필의 정점에 초점을 맞춘 작은 RT 범위).
- **Visible Ranges**를 **Only Full Ranges**로 설정합니다.
- 다음에 해당하는 경우 워크플로가 완료됩니다.
 - 샘플 배치 전체에서 크로마토그래피가 일관됩니다.
 - 구성 요소 사이에 분리가 있습니다.

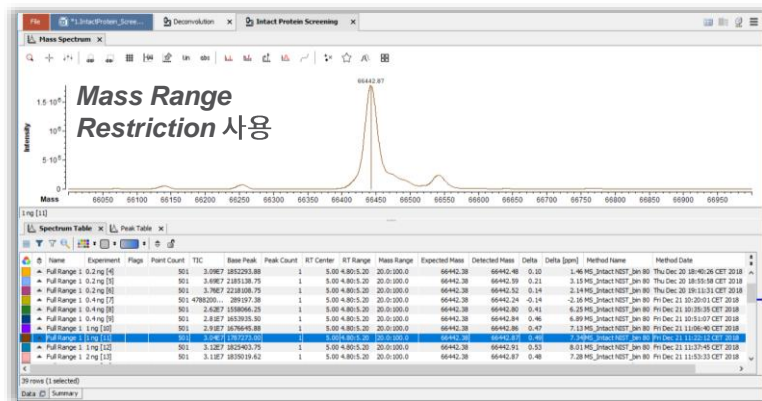
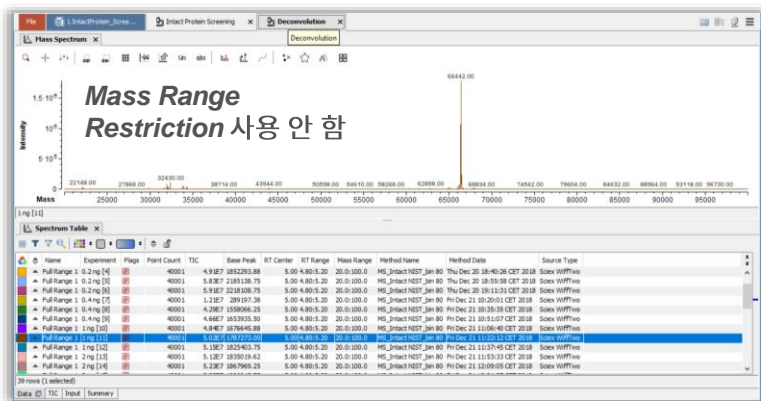


Mass Range Restriction



Mass Range Restriction

- 이 활동은 기본적으로 생략됩니다.
- *Mass Range Restriction*을 사용하여 디콘볼루션 스펙트럼의 시각화를 특정 목표 질량으로 제한할 수 있습니다.
 - **Only Full Ranges**를 사용하는 경우 이 제한이 계속 적용됩니다.
 - 이 활동 노드는 **Only Zoomed Ranges** 대신 사용할 수 있습니다.



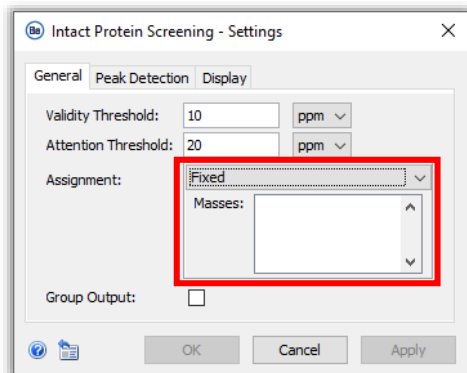
Intact Protein Screening을 위한 목표 질량 정의



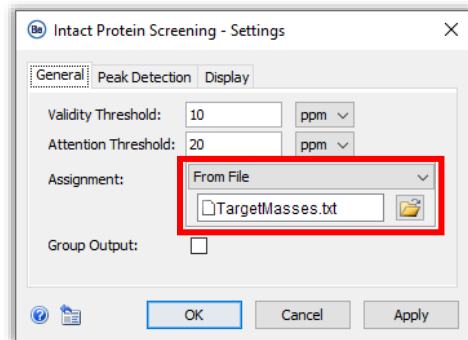
Intact Protein Screening

- 스크리닝을 위한 관심 질량 지정:

- 모든 샘플에서 동일한 질량이 예상되는 경우 **Assignment**를 **Fixed**로 변경하고 **Masses** 섹션에 값을 입력합니다.



- 샘플 간에 다른 질량이 예상되는 경우 **Assignment**를 **From File**로 변경하고 각 샘플의 목표 질량이 포함된 txt 파일을 업로드합니다.



- 기본 **Peak Detection** 설정을 변경할 필요가 없습니다.

Intact Protein Screening: 목표 질량 파일 형식

스크리닝을 위한 txt 파일을 생성하려면:

1. 샘플 이름과 목표 질량을 포함하는 테이블을 생성합니다.
테이블 머리글은 포함하지 마십시오.

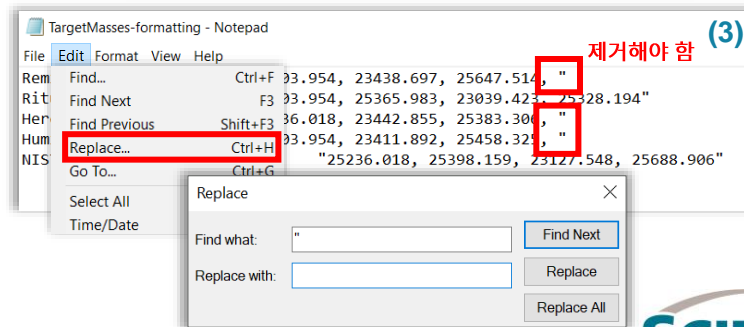
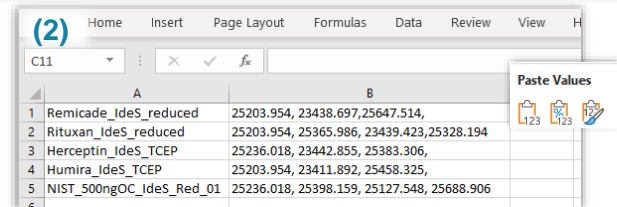
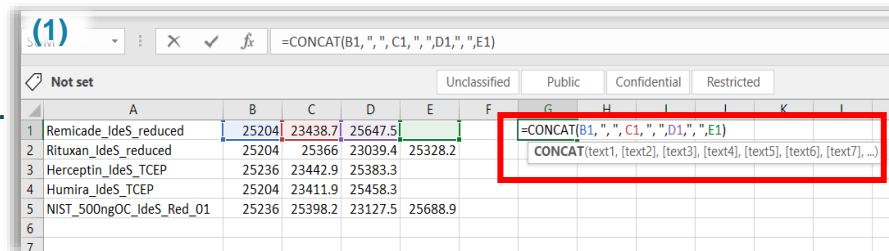
- Excel의 CONCATENATE 함수를 사용하여 목표 질량이 포함된 열을 하나의 열로 결합합니다.
- ";" 형식에 유의하십시오.

2. 테이블에서 수식을 제거합니다.

- 연결된 열을 복사하고 값 붙여넣기를 선택합니다.
- 원래 열을 삭제하여 2열 테이블을 생성합니다.
- 스프레드시트를 txt 파일로 저장합니다.

3. txt 파일을 열고 불필요한 추가 문자를 제거합니다.

- 중복 심표 또는 질량 시퀀스 끝에 있는 심표를 수동으로 제거합니다.
- "가 있는 경우: 바꾸기 도구를 사용하여 "를 공백으로 바꿉니다. 그런 다음 txt 파일을 저장합니다.



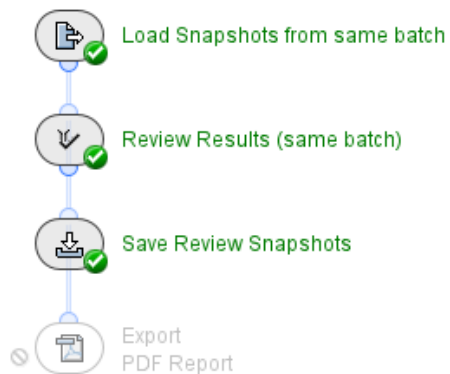
저장된 결과 검토

워크플로별 지침



저장된 결과 검토 워크플로: 설계

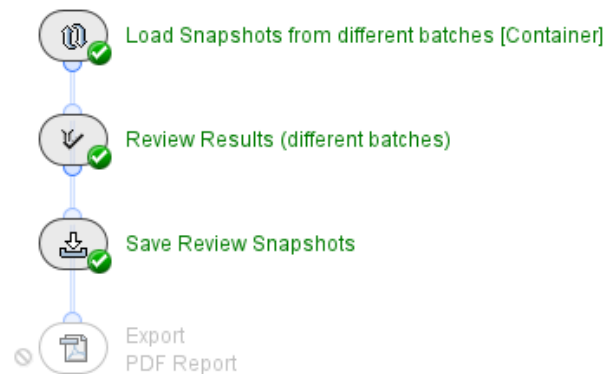
Review Results from Same Batch
i.e. samples processed together
in a Be workflow



The Review Results activity should be deactivated when processing:

- Sequence-free snapshots (no annotations)
- Targeted Mass Search snapshots

Review Results from Different Batches
i.e. samples with different peak detection



Intact_ReviewSnapshots

저장된 결과 검토 워크플로: 개요

- 이러한 워크플로는 Biologics Explorer 소프트웨어의 원형 질량 분석 워크플로에서 저장된 모든 스냅샷(sbf)을 열 수 있습니다.

- 동일한 배치 또는 다른 배치에서 분석된 데이터를 사용하여 이전 분석의 결과를 봅니다.
- 추가 검토를 완료하고 필요한 경우 초기 검토 프로세스에서 수락 또는 거부된 결과를 변경합니다(*Annotations Snapshots*에만 해당).

✓ X	Range	Peak Id	Protein Name	Disulfide B...	Modifications
	Full Range 1	334 LC		2*S-S	
✓	Full Range 1	947 LC-LC		5*S-S	
	Full Range 1	2908	HC-HC-LC	13*S-S	Cysteinylyl + 2*Gln
	Full Range 1	2937	HC-HC-LC	13*S-S	2*Gln->pyro-Glu

- *Sequence-free, Targeted Mass Search, Individual Data* 및 *Pre-processed Snapshot*을 사용하는 경우 *Review Results* 활동 노드를 건너뛵니다.
 - 이러한 스냅샷에는 *Review Results*에 필요한 시퀀스 정보가 포함되어 있지 않습니다.
- 추가 검토 후 수정된 *Annotations Snapshots*를 *Review Snapshots*로 저장하거나, 결과를 PDF 보고서로 내보냅니다.

파트 B

워크플로 어플리케이션

특정 어플리케이션에 대한 세부 설정



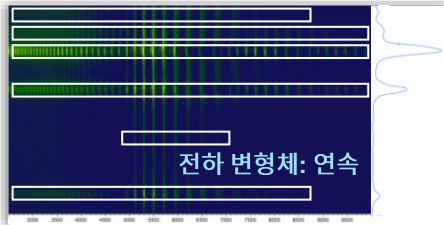
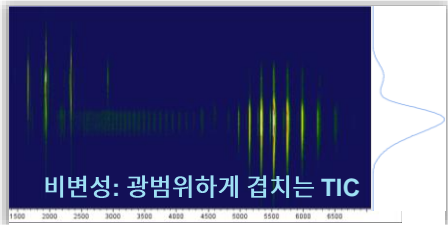
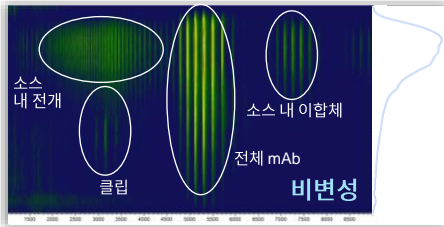
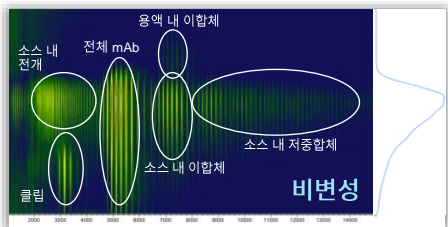
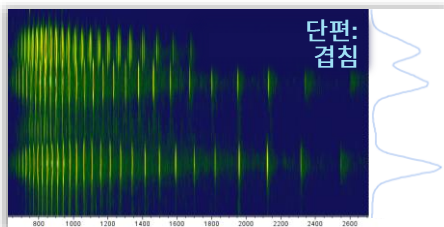
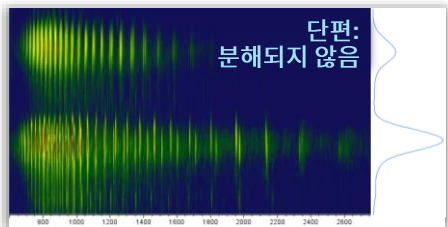
Time-Resolved Deconvolution 또는 Automated Deconvolution 선택

- **Automated:** 디콘볼루션 범위가 자동으로 결정됩니다.
 - 크로마토그래피 분석으로 잘 분해되는 종에 권장됩니다.
- **Time-resolved:** RT의 각 스캔에서 디콘볼루션이 완료됩니다.
 - 잘 분해되지 않는 복합 혼합물이 포함된 데이터에 권장됩니다.
 - 디콘볼루션된 데이터의 2D 이온 맵 보기를 생성하여 겹치거나 분해되지 않은 피크를 더 잘 표시할 수 있습니다.
 - 겹치거나 분해되지 않은 피크의 정량화를 단순화합니다.

Time-Resolved Deconvolution 및 Automated Deconvolution 사용 사례

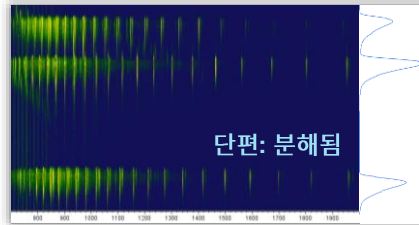
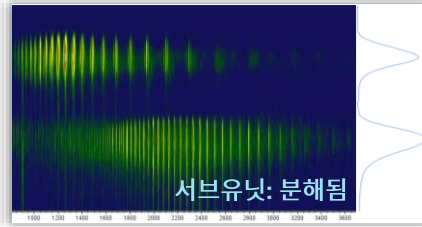
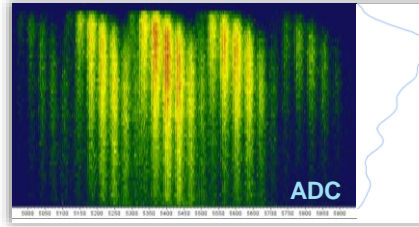
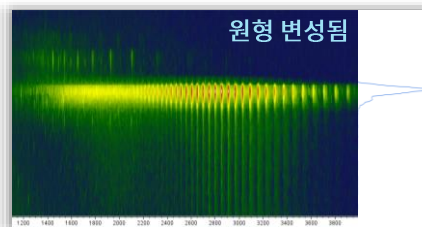
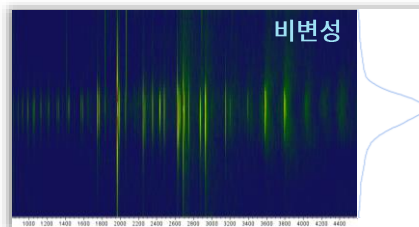
Time-Resolved Deconvolution

의 주요 사용 사례:
복합 크로마토그래피



Automated Deconvolution

의 주요 사용 사례:
단순 크로마토그래피



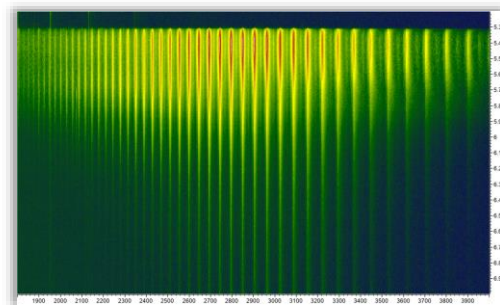
변성 원형 단백질

변성 단백질: 단일 엔터티

집중: 단일 표적 단백질
관심 부산물 없음

초기 설정(추천):

샘플 유형:	단일 변성 단백질
추천 워크플로	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140kDa ~ 160kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (시각화 및 보고용)
Mass step(Da) ¹	2
RT Ranges ¹	RT Window: 5 ~ 9(목표: 단일 RT 범위 식별) Isolation Threshold: 5 ~ 15(스캔 주파수에 따라 다름)
Mass Tolerance(ppm) ²	20 ~ 50(사용된 분해능에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated (라이브러리 선택)
Disulfide ²	State: Fully Connected Connectivity: IgG (해당하는 경우, 그 외에는 다르게 지정)



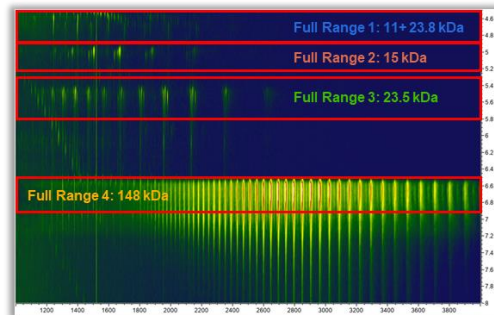
변성 원형 단백질

변성 단백질: 복합 샘플

집중: 표시되는 모든 RT 범위
저질량 분해산물 포함(연결되지 않은 서브유닛, 클립)

초기 설정(추천):

샘플 유형:	변성 단백질 및 불순물/분해산물
추천 워크플로	Intact_AutomatedDeconvolution Intact_TimeResolvedDeconvolution(여러 RT 범위가 겹치는 경우)
Deconvolution range ¹	10kDa ~ 160kDa Visible Ranges: Only Zoomed Ranges (시각화 및 보고용)
Mass step(Da) ¹	2
RT Ranges ¹ (TRD의 경우 무시)	RT Window: 3 ~ 5 Isolation Threshold: 3 ~ 7 Min. Peak Intensity: <1% 또는 더 높은 감도와 효율성 향상을 위해 모든 범위를 수동으로 입력
Mass Tolerance(ppm) ²	20 ~ 50(사용된 분해능에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated(라이브러리 선택)
Disulfide ²	State: Fully Connected Connectivity: Unspecified + 3 Additional chains CysteinyI (쌍이 없는 시스테인의 경우)



불순물이 포함된 변성 원형 단백질

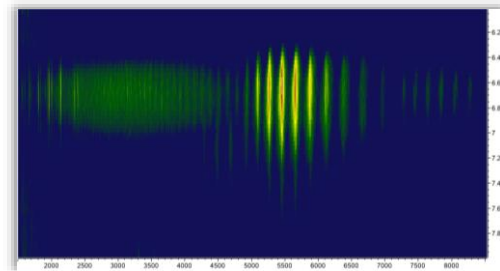
비변성 원형 단백질

비변성 단백질: 단일 엔터티

집중: 단일 표적 단백질
관심 부산물 없음

초기 설정(추천):

샘플 유형:	단일 비변성 단백질
추천 워크플로	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140kDa ~ 160kDa Visible Ranges: Only Full Ranges(시각화 및 보고용)
Mass step(Da) ¹	2
RT Ranges ¹	RT Window: 5 ~ 9(목표: 단일 RT 범위 식별) Isolation Threshold: 5 ~ 15(스캔 주파수에 따라 다름)
Mass Tolerance(ppm) ²	20 ~ 50(사용된 분해능에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated(라이브러리 선택)
Disulfide ²	State: Fully Connected Connectivity: IgG(해당하는 경우, 그 외에는 다르게 지정)



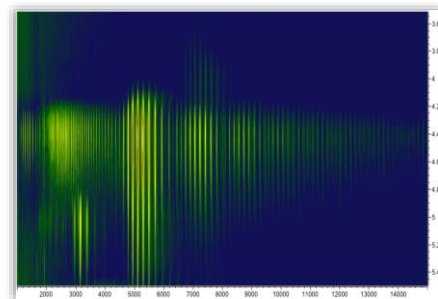
비변성 원형 단백질

비변성 단백질: 복합 샘플

집중: 표시되는 모든 RT 범위
저질량 분해산물 포함(연결되지 않은 서브유닛, 클립)

초기 설정(추천):

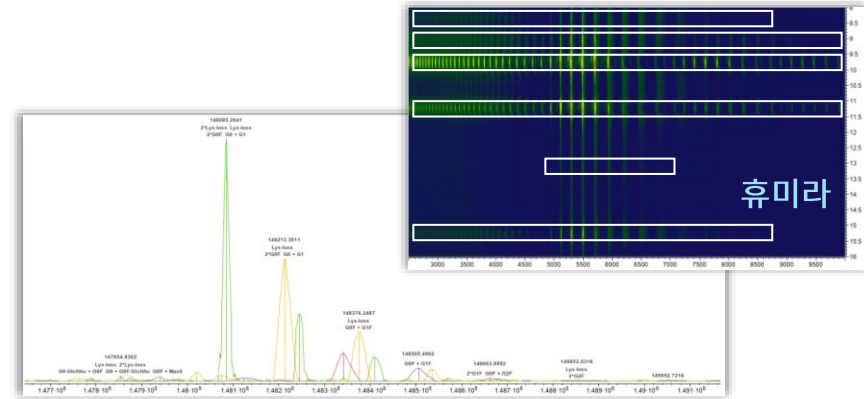
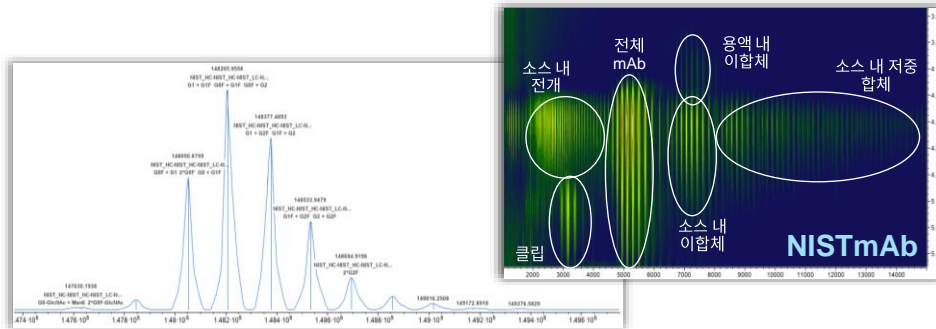
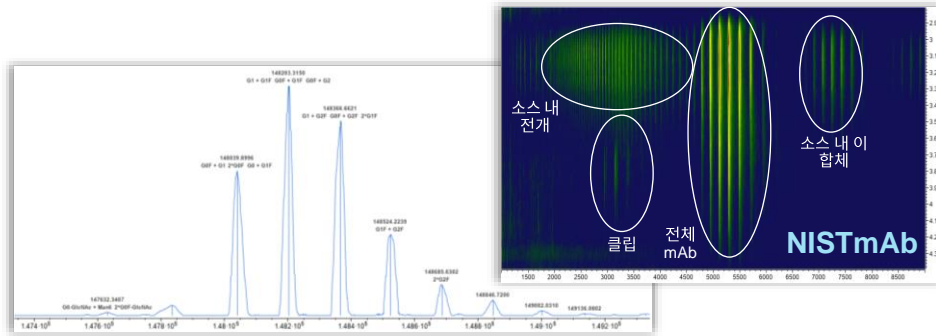
샘플 유형:	비변성 단백질 및 불순물/분해산물
추천 워크플로	Intact_TimeResolvedDeconvolution(여러 RT 범위가 겹치는 경우) Intact_AutomatedDeconvolution(피크가 분해되는 경우)
Deconvolution range ¹	10kDa ~ 160kDa Visible Ranges: Only Zoomed Ranges (시각화 및 보고용)
Mass step(Da) ¹	2
RT Ranges ¹ (TRD의 경우 무시)	RT Window: 3 ~ 5 Isolation Threshold: 5 ~ 15(구성 요소 간 분리에 따라 다름) Min. Peak Intensity: <1% 또는 더 높은 감도와 효율성 향상을 위해 모든 범위를 수동으로 입력
Mass Tolerance(ppm) ²	20 ~ 50(사용된 분해능에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated (라이브러리 선택)
Disulfide ²	State: <i>Fully Connected</i> Connectivity: Unspecified + 3 Additional chains CysteinyI (쌍이 없는 시스테인의 경우)



비변성 복합 샘플

비변성 단백질: 복합 샘플

집중: 표시되는 모든 RT 범위
저질량 분해산물 포함(연결되지 않은 서브유닛, 클립)



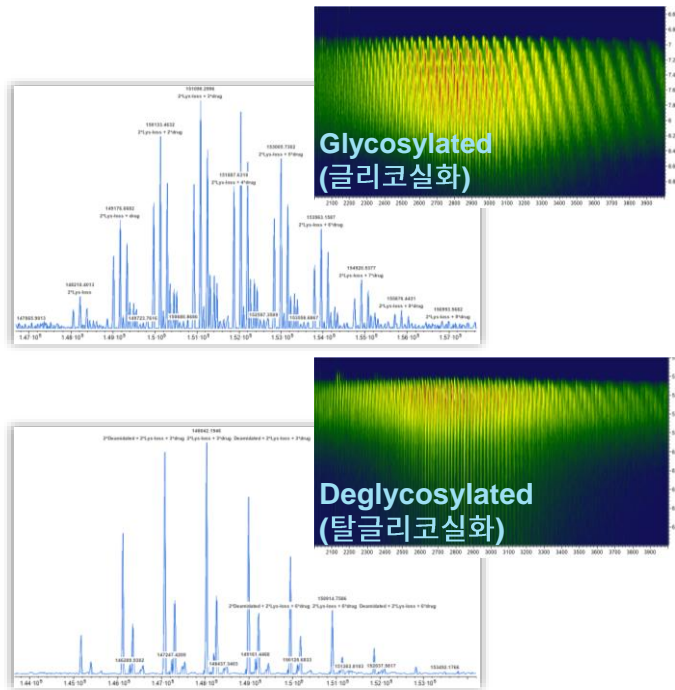
항체 약물 포합체

ADC: 완전 단백질

집중: 단일 표적 단백질
관심 부산물 없음

초기 설정(추천):

샘플 유형:	ADC: 변성
추천 워크플로	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140kDa ~ 160kDa Visible Ranges: Only Full Ranges(시각화 및 보고용)
Mass step(Da) ¹	2
RT Ranges ¹	모든 ADC 신호가 포함된 단일 RT 범위를 수동으로 입력
Mass Tolerance(ppm) ²	20 ~ 50(사용된 분해능에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated(라이브러리 선택)
Disulfide ²	State: Fully Connected Connectivity: IgG(해당하는 경우, 그 외에는 다르게 지정)
Conjugates ²	포합체의 이름과 질량 지정
기타 참고 사항	Review Results: DAR을 올바르게 계산할 수 있도록 중복 주석을 제거합니다.

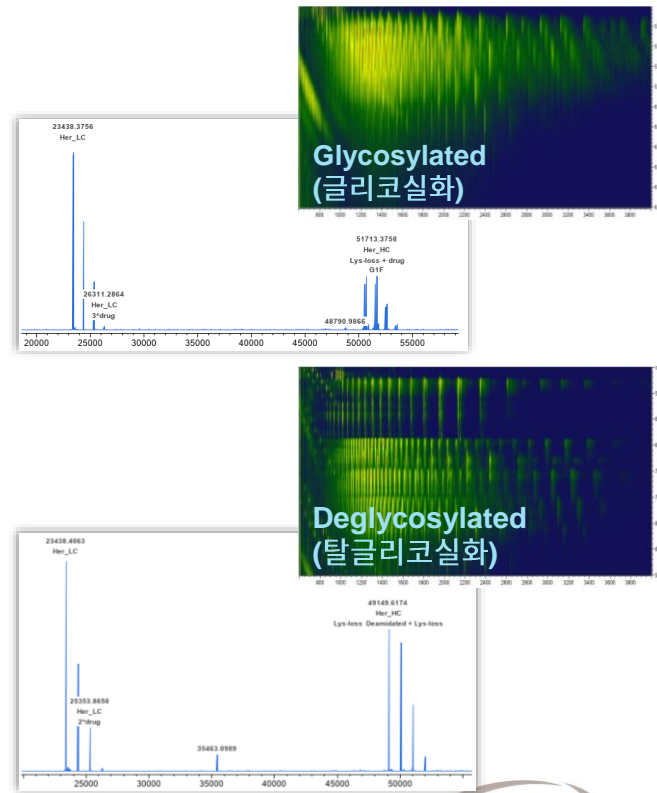


ADC: 서브유닛

집중: ADC 환원

초기 설정(추천):

샘플 유형:	ADC: 변성 및 환원
추천 워크플로	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	10kDa ~ 60kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (시각화 및 보고용)
Mass step(Da) ¹	1 ~ 2
RT Ranges ¹	모든 ADC 신호가 포함된 단일 RT 범위를 수동으로 입력
Mass Tolerance(ppm) ²	10 ~ 20(사용된 분해능에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated(라이브러리 선택)
Disulfide ²	State: Fully Reduced
Conjugates ²	포합체의 이름과 질량 지정
기타 참고 사항	<i>Review Results:</i> DAR을 올바르게 계산할 수 있도록 중복 주석을 제거합니다.



서브유닛 분석

서브유닛 분석

집중: HC(중사슬)와 LC(경사슬)

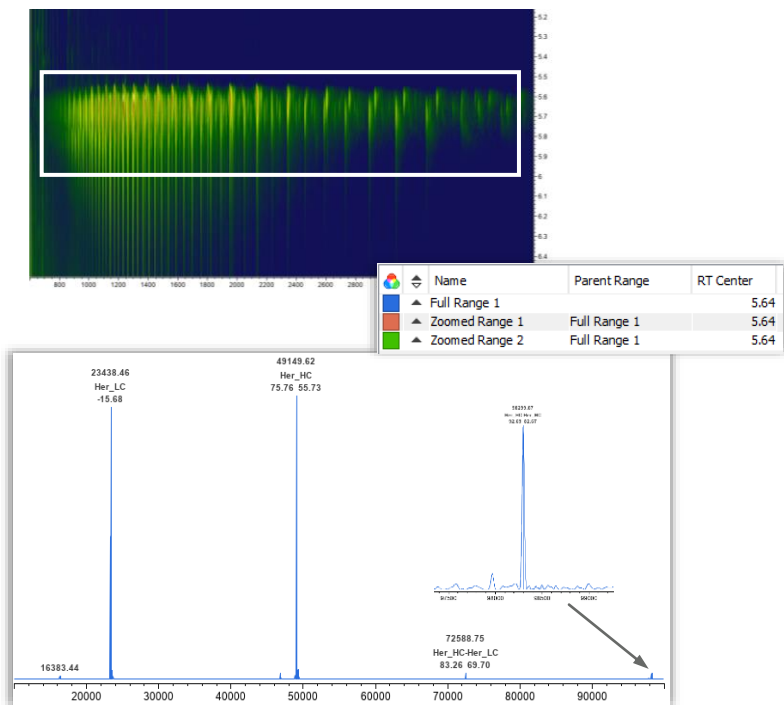
초기 설정(추천):

샘플 유형:	HC 및 LC로 환원된 단백질
추천 워크플로	Intact_AutomatedDeconvolution Intact_TimeResolvedDeconvolution(복합적 변형이 적용된 단편의 경우)
Deconvolution range ¹	20kDa ~ 60kDa 또는 20kDa ~ 110kDa(목표: 부분적으로 연결된 서브유닛 식별) Visible Ranges: All Ranges (특히 서브유닛이 분리되지 않은 경우)
Mass step(Da) ¹	1 ~ 2
RT Ranges ¹ (TRD의 경우 무시)	RT Window: 3 ~ 9 Isolation Threshold: 3 ~ 10(구성 요소 간 분리에 따라 다름) 또는 매우 인접한 여러 피크에 대해 모든 범위를 수동으로 입력
Mass Tolerance(ppm) ²	10 ~ 20(교정 정확도에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated(라이브러리 선택)
Disulfide ²	분리된 서브유닛 - State: Fully Reduced 부분적으로 연결된 서브유닛 - State: Partially Reduced, Connectivity: IgG 선택 사항: 환원된 사슬 내 결합 검색

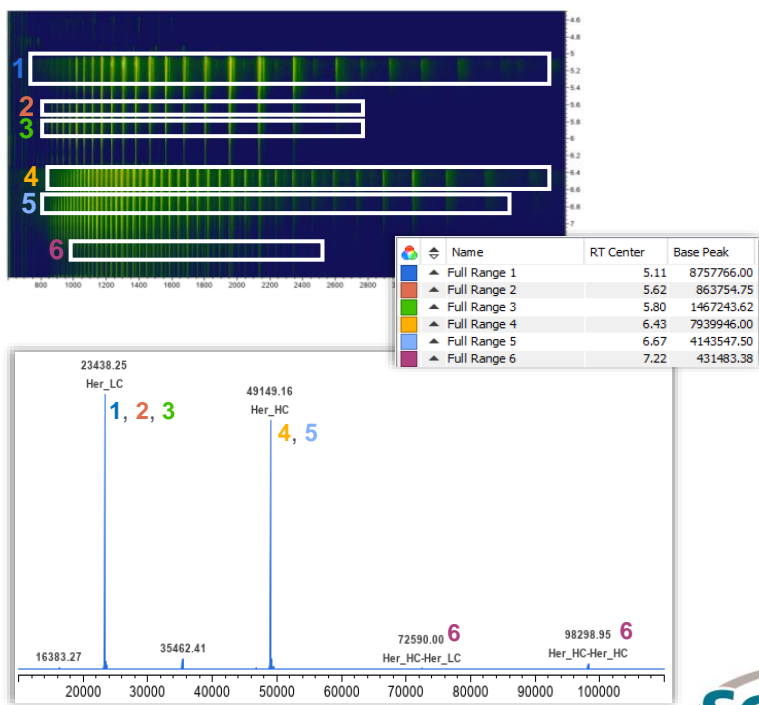
서브유닛 분석

집중: HC(중사슬)와 LC(경사슬)

완전 환원



부분적 연결



단편 분석

단편 분석

집중: IdeS 분해 단백질(추가 환원 여부 관계 없음)

초기 설정(추천):

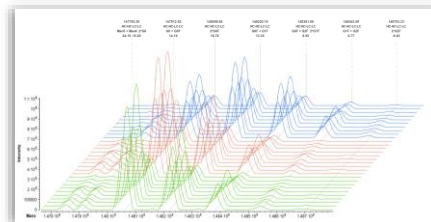
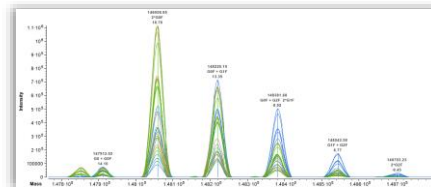
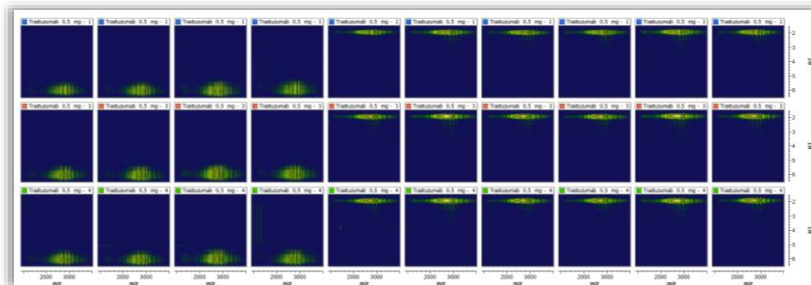
샘플 유형:	F(ab') ₂ 및 ScFc 또는 LC, Fd' 및 ScFc
추천 워크플로	Intact_AutomatedDeconvolution Intact_TimeResolvedDeconvolution(복합적 변형이 적용된 단편의 경우)
Deconvolution range ¹	20kDa ~ 110kDa 또는 20kDa ~ 30kDa(환원된 단편 포함) Visible Ranges: Only Zoomed Ranges 또는 All Ranges (단편이 동시 용리되더라도 향상된 시각화를 위해 사용)
Mass step(Da) ¹	1 ~ 2
RT Ranges ¹ (TRD의 경우 무시)	RT Window: 3 ~ 9 Isolation Threshold: 3 ~ 10
Mass Tolerance(ppm) ²	10 ~ 20(교정 정확도에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated(라이브러리 선택)
Disulfide ²	State: Fully Connected. Connectivity: Unspecified + 3 Additional chains Free Cysteines (쌍이 없는 시스테인의 경우). State: Fully Reduced (환원된 단편의 경우)
Sequence	각 단편 시퀀스(Fc/2, LC, Fd')를 개별적으로 나열해야 함

비교동등성 검사 또는 희석 시리즈

비교동등성 검사

초기 설정(추천):

샘플 유형:	완전 단백질
추천 워크플로	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140kDa ~ 160kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (시각화 및 보고용)
Mass step(Da) ¹	2
RT Ranges ¹	모든 표적 단백질 신호가 포함된 단일 RT 범위를 수동으로 입력
Mass Tolerance (ppm) ²	20 ~ 50(사용된 분해능에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated(라이브러리 선택)
Disulfide ²	State: Fully Connected Connectivity: IgG(해당하는 경우, 그 외에는 다르게 지정)
참고 사항	일관된 피크 주석 및 정량화를 위해 검토 결과에서 라이브러리를 생성하여 <i>Targeted Mass Search</i> 에 사용합니다.



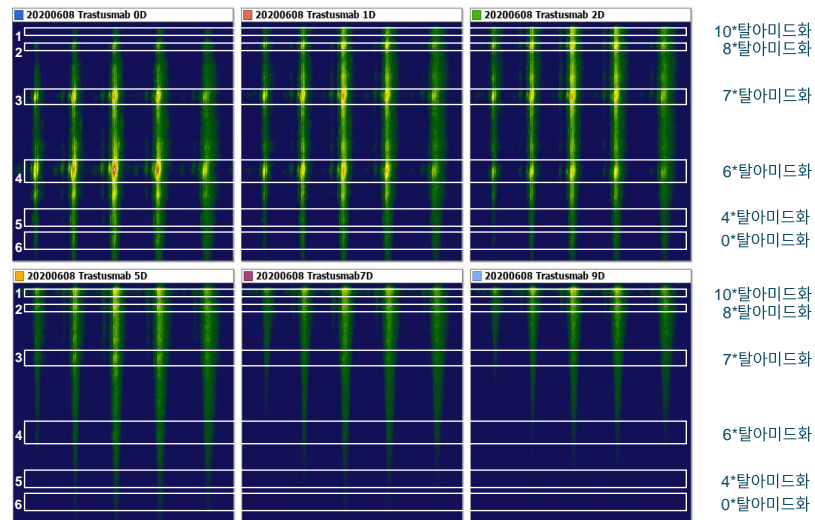
- 기준 mAb
- 바이오시밀러 1
- 바이오시밀러 2

응력 검사

응력 검사

초기 설정(추천):

샘플 유형:	완전 단백질
추천 워크플로	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140kDa ~ 160kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (시각화 및 보고용)
Mass step(Da) ¹	2
RT Ranges ¹	모든 샘플에서 공통 피크 검출 및 의미 있는 상대 정량화를 위해 모든 RT 범위를 수동으로 입력
Mass Tolerance (ppm) ²	20 ~ 50(사용된 분해능에 따라 다름)
Glycosylation ²	Deglycosylated 또는 Glycosylated(라이브러리 선택)
Disulfide ²	State: Fully Connected Connectivity: IgG(해당하는 경우, 그 외에는 다르게 지정)
참고 사항	일관된 피크 주석 및 정량화를 위해 검토 결과에서 라이브러리를 생성하여 Targeted Mass Search에 사용합니다.





The Power of Precision

자세한 내용은 SCIEX 웹 사이트
(sciex.com)를 참조하거나, 다음 방
법 중 하나를 사용하여 당사로 문의하
십시오.

sciex.com/contact-us
sciex.com/request-support



상표/라이선스

SCIEX 임상 진단 포트폴리오는 체외 진단용입니다. 의사 처방에 의해서만 사용 가능합니다. 일부 국가에서는 제품을 사용할 수 없습니다. 사용 가능 여부는 현지 영업 담당자에게 문의 하거나 <https://sciex.com/diagnostics> 페이지를 참조하십시오. 다른 모든 제품은 연구 목적으로만 사용됩니다. 진단 절차에 사용하지 마십시오.

관련 로고를 포함하여 여기에 언급된 상표 및/또는 등록 상표는 미국 및/또는 기타 특정 국가에서 AB Sciex Pte. Ltd. 또는 해당 소유자의 자산입니다(sciex.com/trademarks 참조).

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-IDV-05-13547-KR-C