



インタクト質量分析

Biologics Explorer 2.0 クイックガイド

Genedata Expressionist® のテクノロジーを搭載



インタクト質量分析: Biologics Explorer クイックガイド

このガイドの内容

パート A: ソフトウェアとワークフロー:

- 1) アプリケーションの概要
- 2) Biologics Explorer の使い方
- 3) インタクトワークフローの一般的なガイドライン
- 4) 特異的なインタクトワークフローのガイドライン:
 - MS または MS & UV データによる自動デコンボリユーション
 - MS または MS & UV データによる時間分解デコンボリユーション (TRD)
 - インタクトマススクリーニング
 - 保存された結果のレビュー

インタクト質量分析: Biologics Explorer クイックガイド

このガイドの内容

パート B: 用途に応じた絞り込み設定

- 変性インタクトタンパク質
- ネイティブインタクトタンパク質
- 抗体薬物複合体
- サブユニット解析
- フラグメント解析
- 同等性試験または希釈系列
- ストレステスト

パート A

ソフトウェアとワークフロー

1. アプリケーションの概要



インタクトマスワークフロー用アプリケーションの概要

- これらのワークフローは、主に単一サンプルの分析用に設計されています。
 - インタクト質量確認
 - 糖鎖付加パターン分析
 - 翻訳後修飾(PTM)の特性解析
 - 薬物抗体比 (DAR) の計算
- また、サンプル間でクロマトグラフィーが一定であれば、バッチ分析も可能です。
 - 複数サンプルのスクリーニング (プロセス開発、装置メソッド開発)
 - ロット間の同等性検査
 - イノベーター対バイオシミラーの同等性検査
 - ストレステスト
- 以下のタイプの分子が分析できます。
 - 全タンパク質 (ネイティブまたは変性タンパク質)
 - タンパク質サブユニット / フラグメント
 - 多量体タンパク質
 - タンパク質混合物
 - 薬物複合体

パート A

ソフトウェアとワークフロー

2. BIOLOGICS EXPLORER の使い方



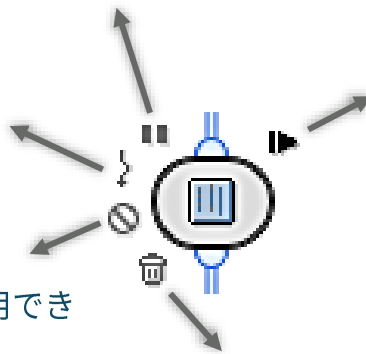
Biologics Explorer の使い方

アクティビティノードアイコン

Pause: ここでワークフローを一時停止します。
以降のタスクはすべてアクティブのままです。

Bypass: ワークフロー実行時にはこのタスクをスキップします。

Block: ワークフローを停止します。
このタスクとそれ以降のタスクは使用できなくなります（灰色）。



Run
または**Reset**。

Trash: 中間データを保存しません。
このアイコンを有効にすると、この特定のアクティビティノードの結果が表示されなくなります。
ごみ箱アイコンを使用するとメモリを節約できます。
この機能は、ワークフローの設定を最適化した後に使用してください。

Biologics Explorer の使い方

ワークフローアイコン

ワークフロー完了

すべてのアクティビティノードが正常に完了しました。

ワークフローの一時停止

アクティビティノードの中には、正常に完了したのもの、まだ開始していないものもあります。

ワークフロー準備完了

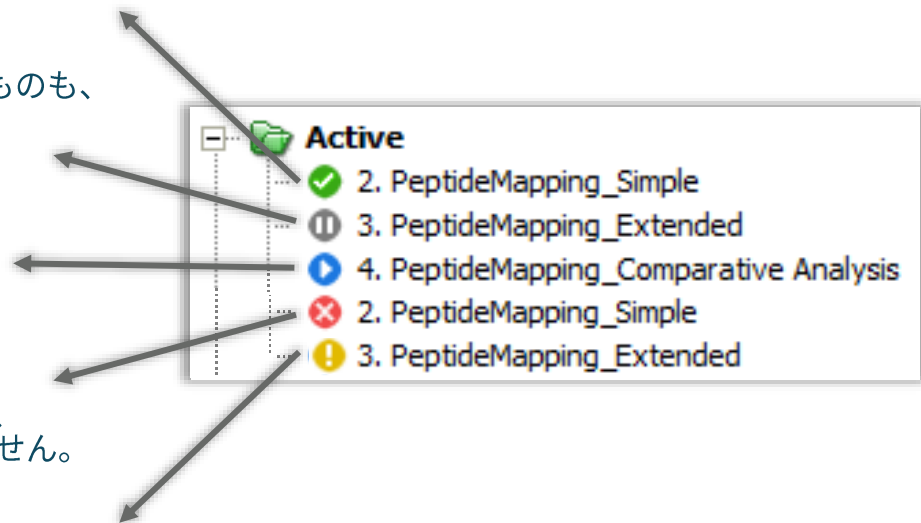
完了したアクティビティノードはありません。
ワークフローを開始する準備ができています。

ワークフローエラー

一部のアクティビティノードは正常に完了しましたが、少なくとも1つのアクティビティノードが実行できません。

ワークフロー警告

一部のアクティビティノードが未完了です。

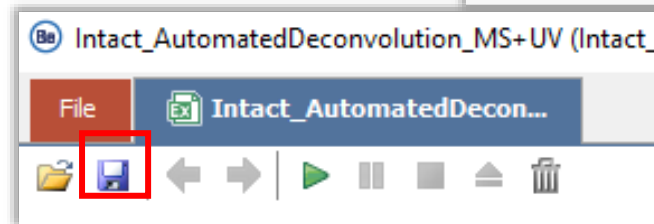
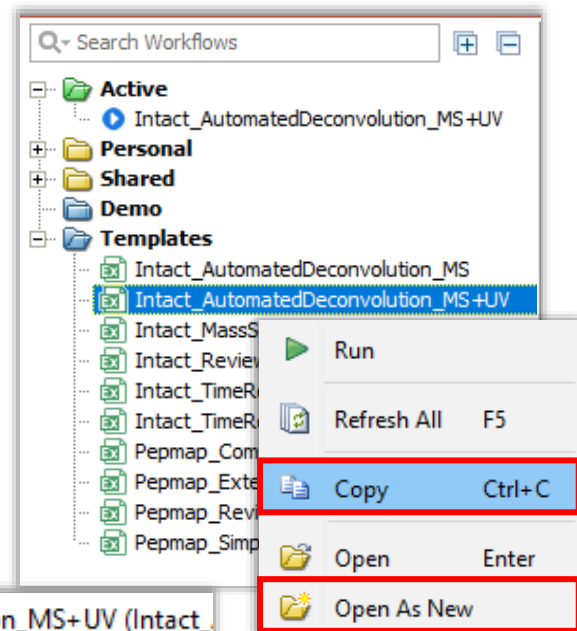


Biologics Explorer の使い方

ワークフローの開始と保存

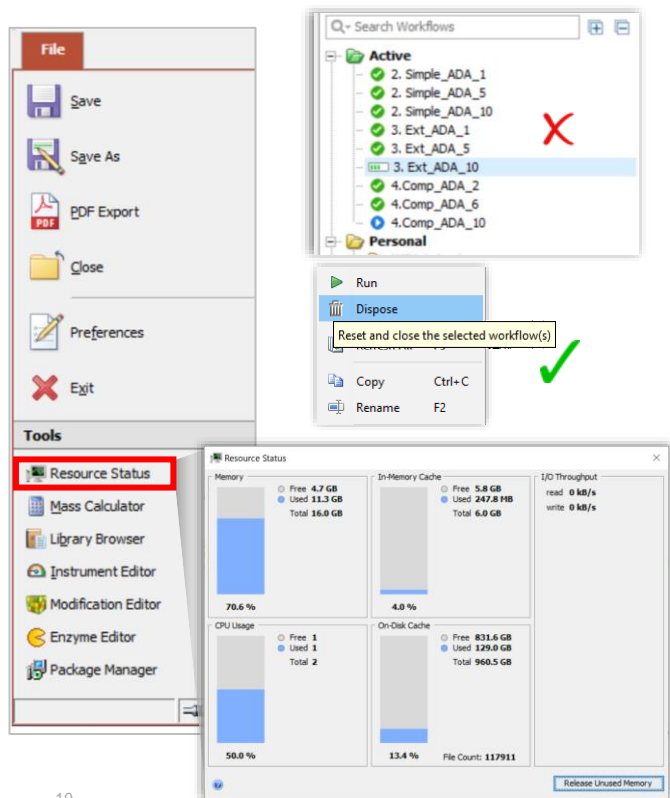
ワークフローを開くには、次のいずれかを実行します。

- ワークフローを **Templates** フォルダからコピーします。
 1. ワークフローを右クリックし、**Copy** を選択します。
 2. **Personal** フォルダを右クリックし、**Paste** を選択します。
- **Templates** フォルダにあるワークフローをダブルクリックして開き、**Save** アイコンを使用して **Personal** フォルダに保存します。
- **Templates** フォルダ内のワークフローを右クリックし、**Open As New** を選択して開きます。Save アイコンを使用して **Personal** フォルダに保存します。



Biologics Explorer の使い方

リソースの正しい使い方に関する推奨事項

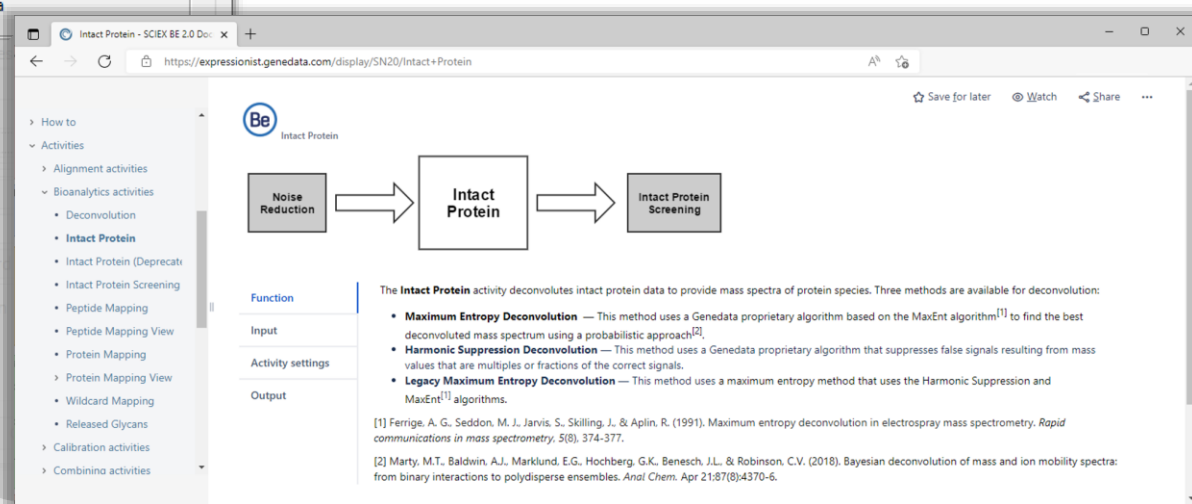
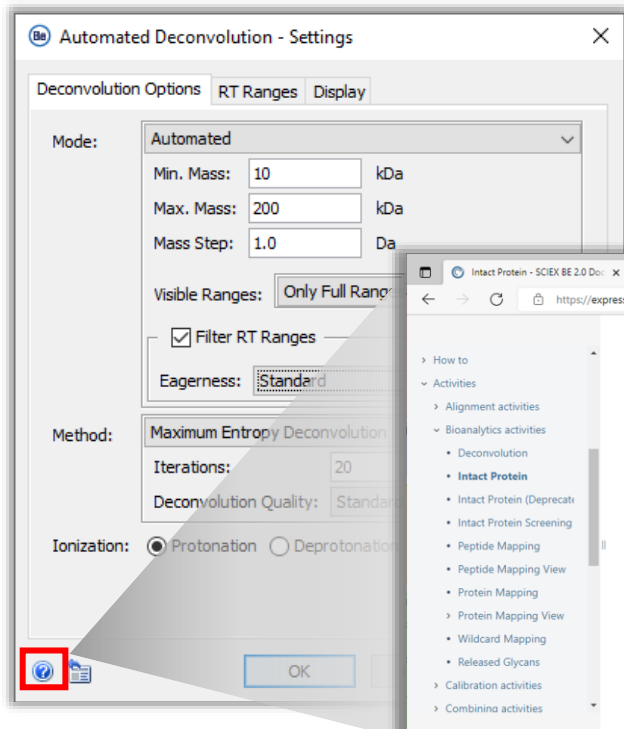


- ベストプラクティスに従って、Biologics Explorer に十分なメモリと計算能力があることを確認します。
 - 一度に実行するワークフローは1つだけにしてください。一部のアクティビティノードは非常に多くのリソースを消費します。コプロセッシングによって、利用可能なリソースがすべて使い果たされてしまう恐れがあります。
 - メモリを節約するため、最適化されたワークフローでは、可能な限りごみ箱アイコンを有効にしておきます。
 - データを確認し、結果を保存した後、新たな分析を開始する前に、ワークフローをリセットまたは破棄します。
 - *Save Snapshot* アクティビティノードを使用すると、完了した結果を保存したり、*Intact_ReviewSnapshots* ワークフローでレビューを行ったりできます。
- 処理用コンピュータには、250 GB 以上の空きディスク容量と 6 GB 以上のインメモリキャッシュが必要です。
 - インタクトタンパク質ワークフローで処理するファイルは、12 GB を超えないようにしてください。

Biologics Explorer の使い方

オンラインヘルプへのアクセス

- 個々のアクティビティノードやその設定については、? アイコンをクリックして関連するヘルプページを参照してください。



パート A

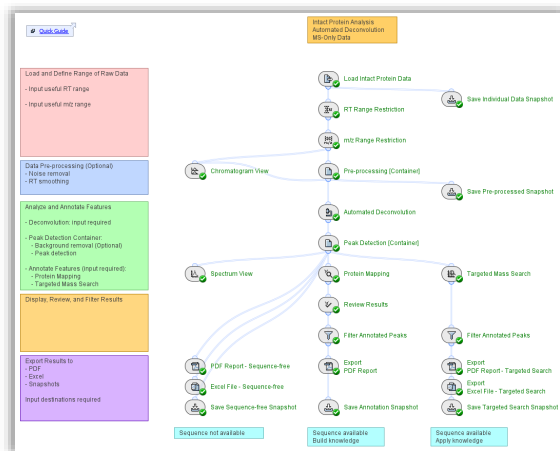
ソフトウェアとワークフロー

3. インタクトワークフローの一般的なガイドライン

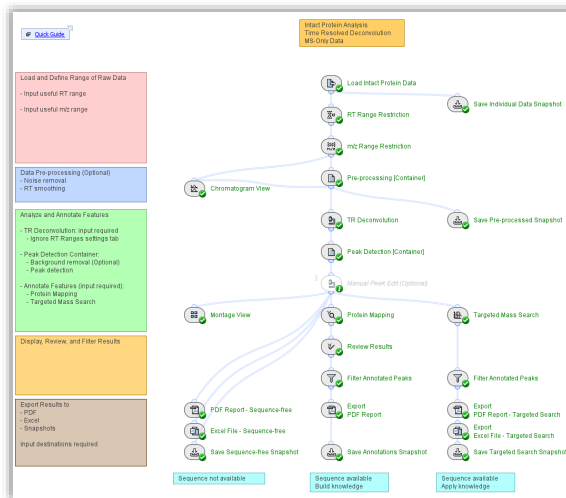


一般的なインタクトワークフローのガイドライン

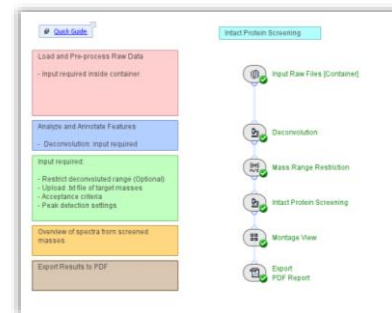
ワークフローの種類



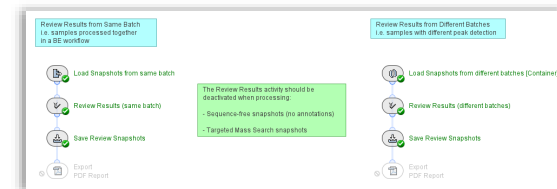
Intact_Automated
デコンボリユーション
 UV 処理あり / なし



Intact_TimeResolved
デコンボリユーション
 UV 処理あり / なし



Intact_MassScreening



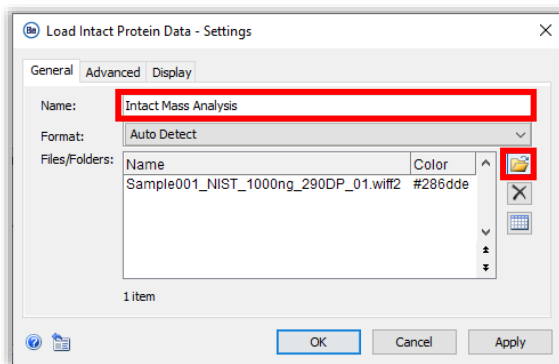
Intact_ReviewSnapshots

一般的なインタクトワークフローのガイドライン

インタクトマスワークフローの共通アクティビティノード

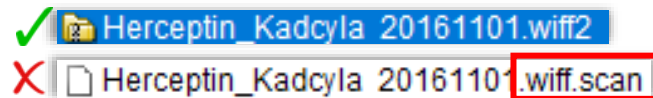
- A. *Load Intact Protein Data*
- B. *RT Range Restriction と m/z Range Restriction*
- C. *m/z Grid*
- D. *Spectrum Baseline Subtraction*
- E. *Chromatogram Chemical Noise Subtraction*
- F. *UV Processing [Container]*
- G. *Chromatogram View*
- H. *Feature Filter*
- I. *Protein Mapping*
- J. *Targeted Mass Search*
- K. *Annotate UV Peaks from MS*
- L. レポートとエクスポート

Load Intact Protein Data: フォーマット (自動検出)

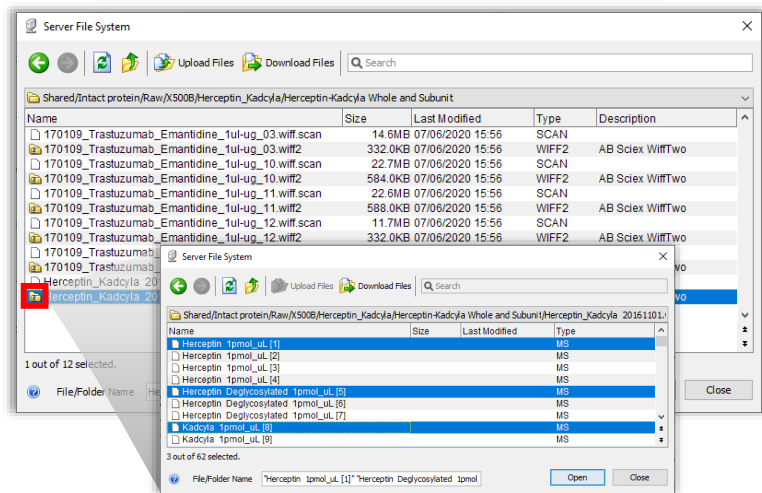


General タブ。

- **Name** フィールドに入力して、分析を定義します。
- 生データファイル をアップロードします。
 - wiff または wiff2 コンテナファイルのみを選択します。
 - ZenoTOF 7600 システムからのデータを分析する場合は、wiff2 ファイルのみを使用します (wiff ファイルは使用しないでください)。
 - 同じ名前の補助ファイルを選択しないでください。

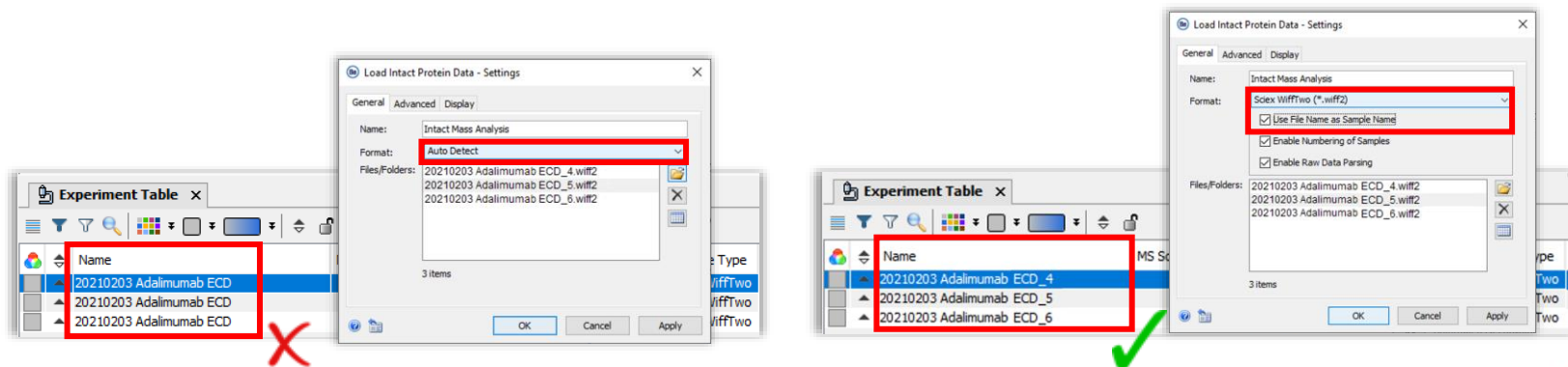


- wiff1 または wiff2 コンテナを開いて、その中のファイルを表示するには、wiff または wiff2 コンテナをダブルクリックします。
 - 埋め込みファイルのリストからアップロードするファイルを選択します。



Load Intact Protein Data: フォーマット

- wiff または wiff2 コンテナ内の個々のサンプルファイルが同じ名前である場合は、**Auto Detect** オプションを使用しないでください。
- *Experiment Table* に固有のサンプル名が存在し、*Review Results* に各サンプルの正しい定量情報が表示されることを確認するには、以下の手順に従います。
 1. **Format** ドロップダウンリストで、**Sciex Wiff** または **Sciex WiffTwo** のいずれかを選択します。
 - ZenoTOF 7600システムで取得したデータには wiff2 のみを使用します。
 2. **Use File Name as Sample Name** チェックボックスをオンにします。

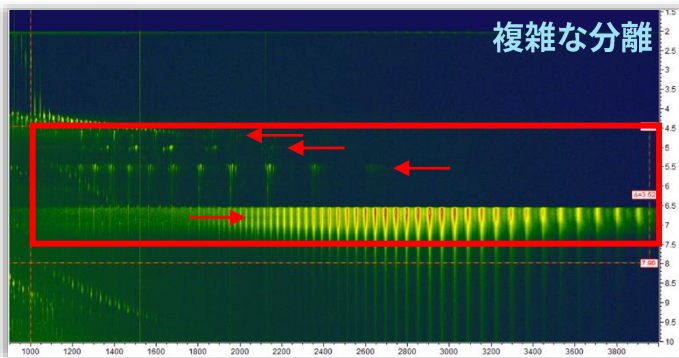
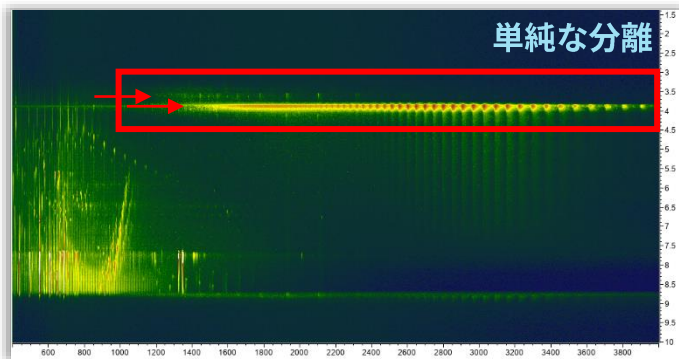


RT と m/z の範囲の制限

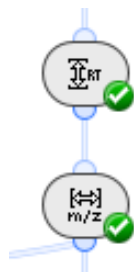
- *Load Intact Protein Data* アクティビティノードを実行し、データの読み込みが完了したら開きます（ダブルクリック）。



- 意味のあるデータが存在する保持時間（RT）と質量電荷比（ m/z ）の範囲を特定します。
 - バルブの切り替えやカラム洗浄による漂遊信号を除きます。
 - 分離範囲に着目します。
 - 低質量の微量成分やコンタミに関心がない限り、分析は標的タンパク質の溶出範囲に限定してください。



RT と m/z の範囲の制限



RT Range Restriction

m/z Range Restriction

- 特定された有用な RT と m/z の範囲を入力します。
- 入力ボックスが空欄の場合、RTまたは m/z の全範囲が使用されます。

RT Range Restriction - Settings

General Display

RT Minimum: 3.2 Minutes

RT Maximum: 4.2 Minutes

OK Cancel Apply

m/z Range Restriction - Settings

General Display

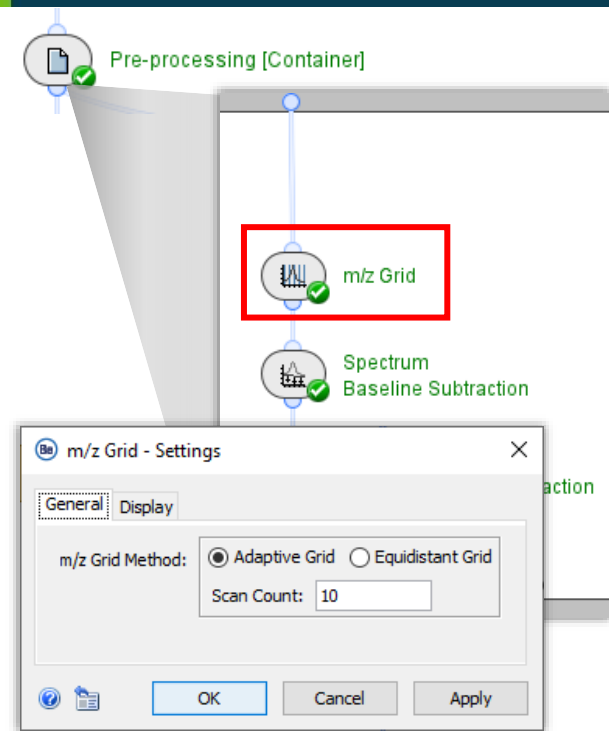
m/z Minimum: 1000 Da

m/z Maximum: Da

OK Cancel Apply

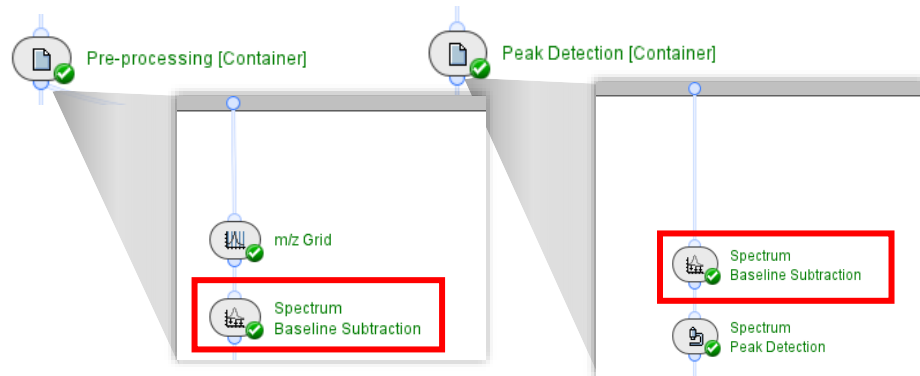
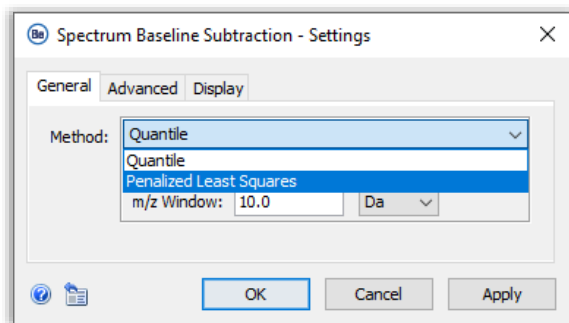
m/z Grid

- 複数のデータファイルを扱う場合は、*m/z Grid* アクティビティノードを使用して、すべてのデータファイルが同じ *m/z* 位置でサンプリングされ、ピーク検出されるようにします。
- デフォルト設定は **Adaptive Grid** です。
 - このグリッドはデータ密度に適応します。
 - この設定は、質量範囲の広いサンプルを分析する場合に使用します。
- **Equidistant Grid** 設定は、複製サンプルや、サンプル不足またはノイズの多いピークを含むデータを分析する場合に使用します。
 - **Equidistant Grid** 間隔を最適値にすることで、高質量ピークをオーバーサンプリングすることなく、目的の低質量ピークに十分なデータポイントが提供されます。



Spectrum Baseline Subtraction

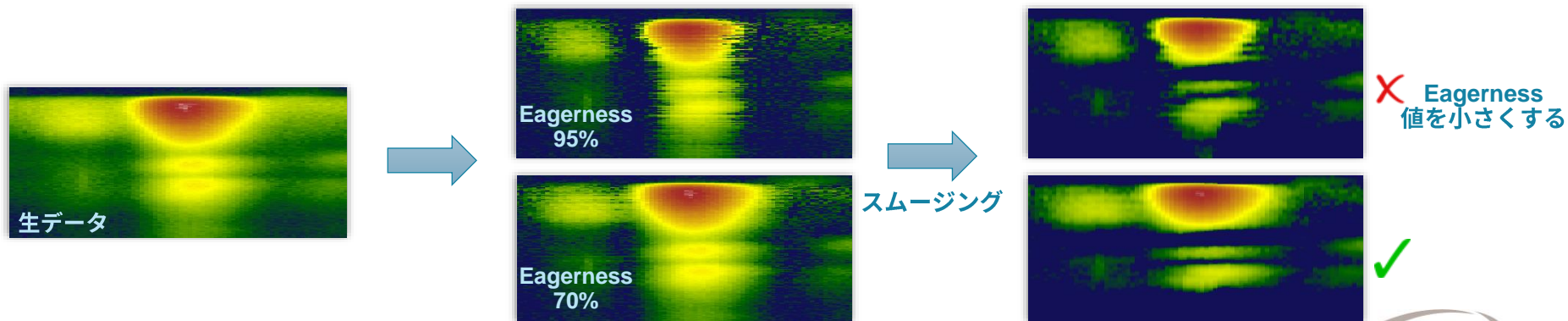
- *Spectrum Baseline Subtraction* は、バックグラウンドノイズを除去し、デコンボリューションされたデータにおけるサテライトピークの生成を制限することにより、デコンボリューションを改善します。
- このアクティビティノードは、デコンボリューション後に使用してピーク検出を改善することもできます。



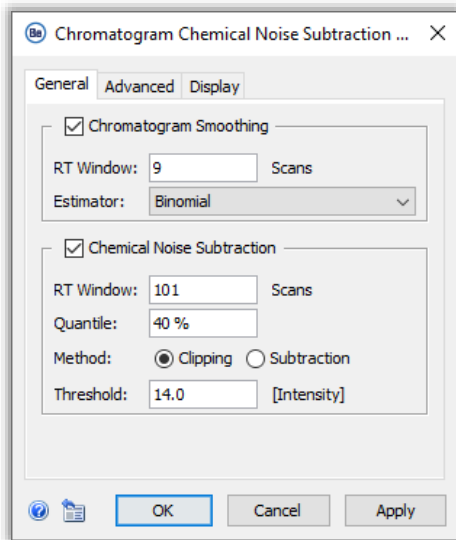
- **Quantile** 減算はすべての信号に影響を与えます。
 - その後のスムージングはほとんど不要です。
 - 高分解能データで使用了した場合、**Penalized Least Squares** よりはるかに高速です。
 - インタクト全タンパク質の分析では、意味のある信号を除去しないよう、注意して使用する必要があります。
- **Penalized Least Squares** 減算は、低強度の信号のみに影響を与えます。

Spectrum Baseline Subtraction

- **Penalized Least Squares** は、大きなピーク間の谷の高さを減少させるので、デコンボリューションされたスペクトルのサテライトピークが減少します。
 - 特に **Time Resolved Deconvolution** と併用する場合や、高分解能のデータ（サブユニットやフラグメントなど）を使用する場合は、時間がかかることがあります。
- **Eagerness** の値が高い（90%以上）場合は、*Chromatogram Chemical Noise Subtraction* アクティビティノードで大規模な **Smoothing** を行う必要があります。
 - ヒートマップの機能がスムージング後も不規則な境界を示す場合は、**Eagerness** 値を小さくします。



Chromatogram Chemical Noise Subtraction



Chromatogram Smoothing は、ピークの RT プロファイルを改善するために使用します。

- **Eagerness** の値が高い場合は特に、**Penalized Least Squares** (*Spectrum Baseline Subtraction*) の後にスムージングを行う必要があります。

- **Estimator:**

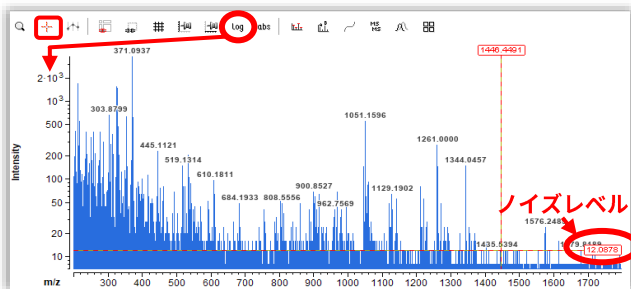
- **Moving Average** は、**RT Window** 内のデータポイントの平均強度を使用して、追加のデータポイントを生成します。そのため、高い値を設定すると、ピーク幅は大きくなりますが、ピークボリュームは保存されます。
- **Binomial** は、**Moving Average** の反復形式で、ピーク幅への影響が少ない方法です。

Chemical Noise Subtraction は、以下のことに役立ちます。

- ネイティブデータでよく見られる広いピークやロングテールのピークを低減できます。
- サテライトピークを抑制し、TRD によるピーク検出力を向上させます。

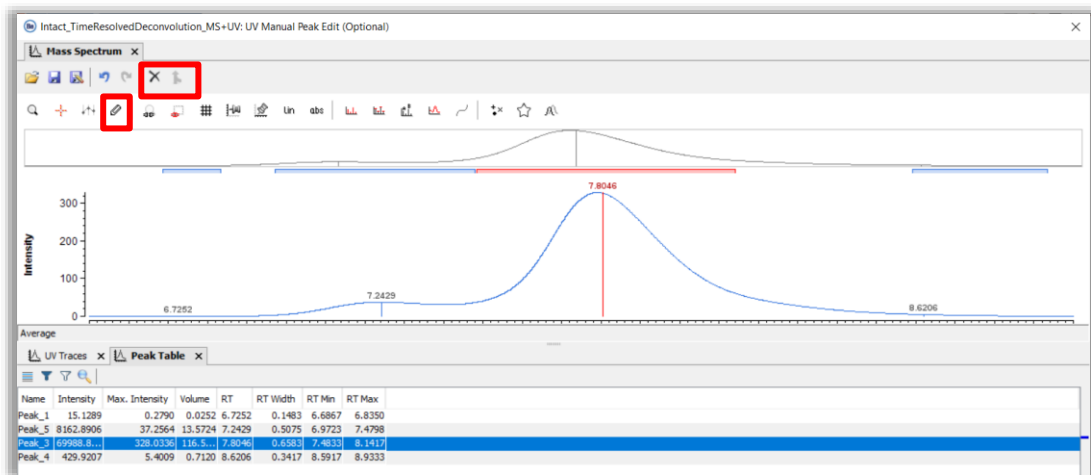
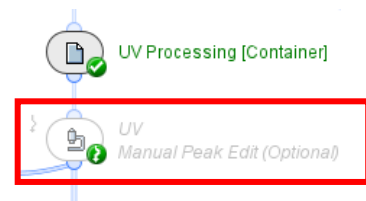
- **設定:**

- **RT Window:** 値を大きくすると、減算するデータが少なくなります。
- **Quantile:** 値を小さくすると、減算するデータが少なくなります。
- **Threshold:** ノイズレベルを検査し、適切な強度値を決定します。
 1. 質量スペクトルの強度軸を、ノイズレベルが読めるようになるまでドラッグして拡大するか、ツールバーのアイコンで軸をリニアから対数スケールに変更します。
 2. 十字キーツール $+$ でノイズレベルの強度を測定します。



UV Processing: UV Manual Peak Edit

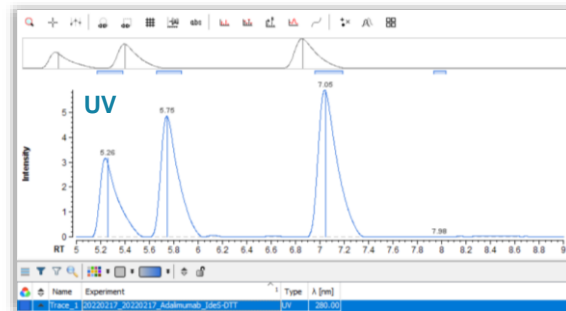
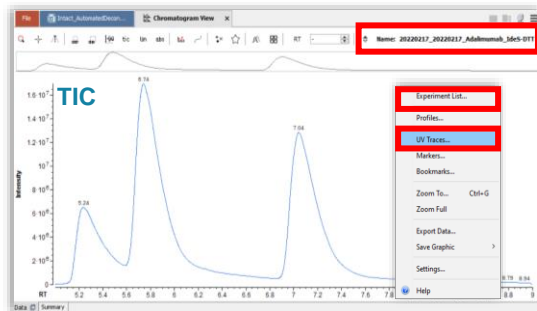
- このアクティビティは、デフォルトではバイパスされます。
- *UV Manual Peak Edit* を使用すると、UV クロマトグラム内のピーク検出を次のようにして手動で絞り込むことができます。
 - 目的のピークの境界を変更する。
 - 重なり合ったピークを分割する。
 - 不要なピークを削除する。
 - 新たなピークを描き出す。



- *UV Manual Peak Edit* は、困難なピークの *UV Peak Detection* パラメータを最適化するための便利な代替手段となります。

Chromatogram View

- *Chromatogram View* は、各サンプルの前処理を行う前後の TIC クロマトグラムを可視化するものです。
- プロット上で右クリックすると、**Experiment List** と、*UV Processing* を行う前後の **UV Chromatograms** にアクセスできます。

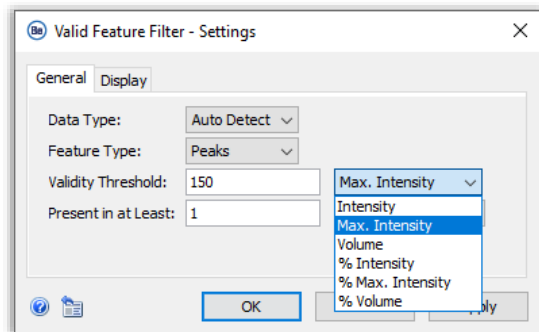
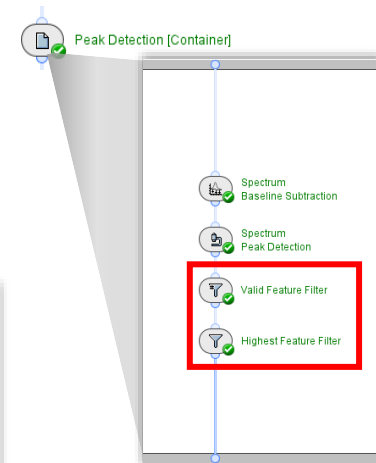


- **Experiment List** から複数のクロマトグラムを選択し、重ね合わせたり反転させたりしてミラービューを生成できます。

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

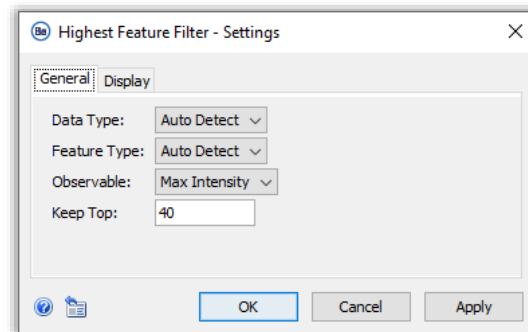
Feature Filter

- *Feature Filter* アクティビティノードを使用して、含めるピークの数制限して、最も関連性の高いピークのみを残し、ノイズに由来するピークを除外することが可能です。
 - ピークのフィルタリングが不要な場合は、**Bypass** アイコンで使用を制限します。



Valid Feature Filter

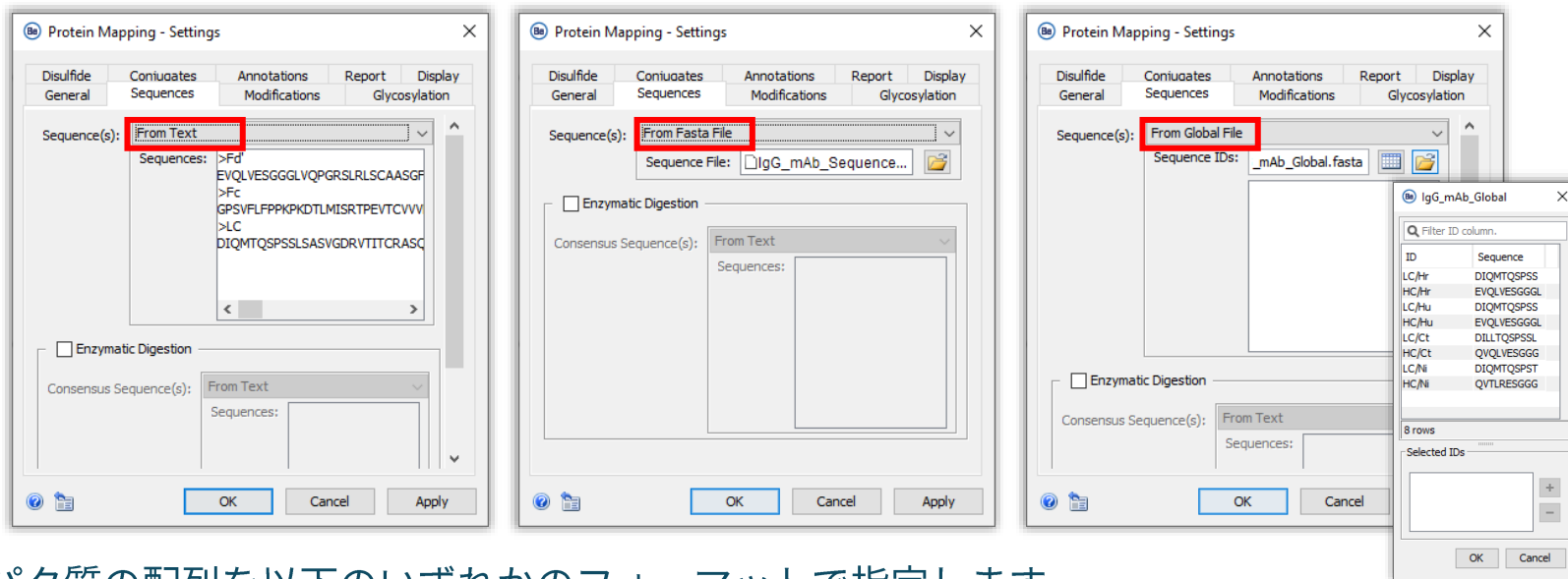
- 各ピークが含まれていると判定されるために存在していなければならない最小のピーク強度と実験のパーセンテージを定義します。



Highest Feature Filter

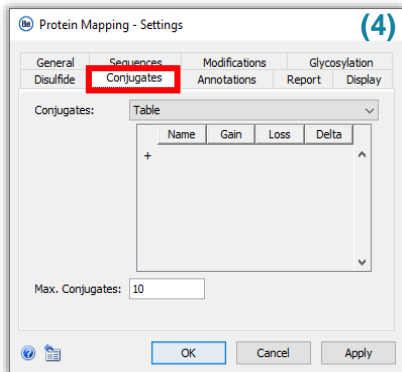
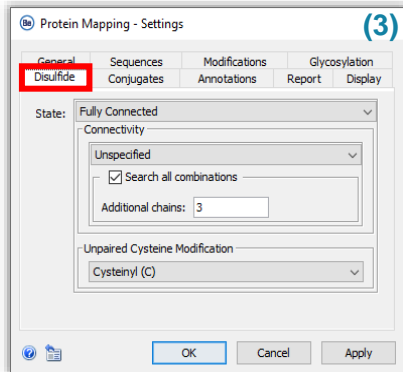
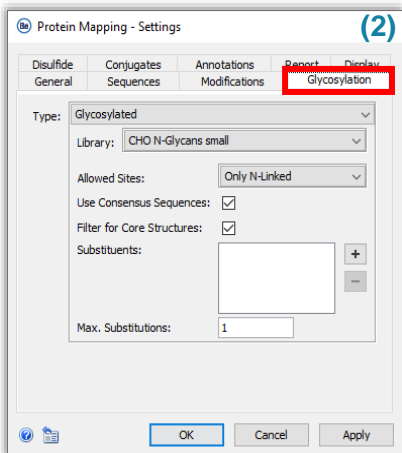
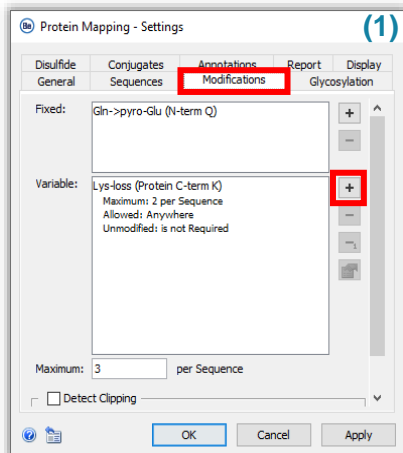
- 特定された各 RT 範囲で、最多なピークのうちいくつをレポートするかを定義します。

Protein Mapping: 配列



- タンパク質の配列を以下のいずれかのフォーマットで指定します。
 - **From Text:** タンパク質の配列を **Sequences** ボックスで指定します。
 - **From Fasta File:** 目的の配列を含む fasta ファイルをアップロードします。
 - **From Global File:** 複数のエントリを持つ fasta ファイルをアップロードします。使用する配列は、追加のポップアップウィンドウから選択できます。

Protein Mapping: Modifications



1. Fixed と Variable の PTM を指定します。

- N 末端 E を持つタンパク質配列では、修飾形態が支配的になることはないと予測されるので、Glu-pyroGlu (N 末端 E) を可変修飾として設定することをお勧めします。

2. 糖鎖付加パラメータを指定します。

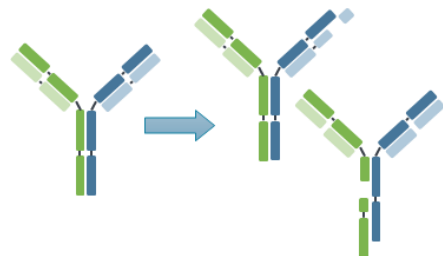
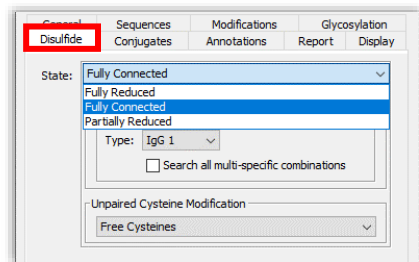
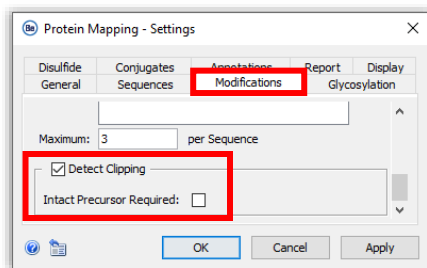
- Type** を **Glycosylated** または **Deglycosylated** に設定します。
 - Deglycosylated** は、すべての *N*-糖鎖付加コンセンサスサイトで脱アミド化イベントを想定しているため、可変修飾として脱アミド化を指定する必要はありません。
 - Glycosylated** に使用する糖鎖ライブラリを選択します。

3. システイン接続性の種類を指定します。

- モノクローナル抗体とその接続されていないサブユニットの両方に一緒にアノテーションを行うことができます。遊離システインに対して可変翻訳後修飾を設定することができます。

4. 標的タンパク質が抗体薬物複合体の場合は、複合体の名前と質量を指定します。

Protein Mapping: Detect Clipping



- **Detect Clipping** 機能は、クリッピングの可能性がある (*in silico*) 質量と、データから検出したピークをマッチングします。
- **Modifications** タブで **Detect Clipping** を選択すると、任意の配列位置で発生した単一のクリッピングイベントに由来する MS ピークを同定することができます。
 - この設定では、ジスルフィド結合が **Fully Connected** または **Fully Reduced** である必要があります。（部分的に還元されたサンプルの分析はサポートされていません）。
 - **Detect Clipping** 機能は、**Sequences** タブの **Enzymatic Digestion** 機能と組み合わせて使用できません。
- 定義された探索空間内での組み合わせの可能性の数を制限する必要があります。変数が多すぎると、以下の結果が生じる恐れがあります。
 - ⚠ ワークフローの処理時間が長くなる、またはワークフローを完了まで実行できない。
 - ⚠ 偽陽性の検出が多く、過剰なデータレビューが必要になる。

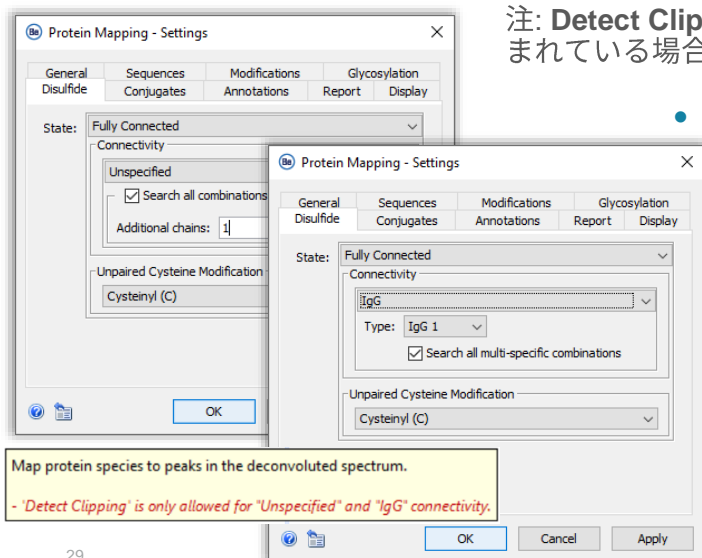
Protein Mapping: Detect Clipping の推奨事項

- 特異的なピークに焦点を当てて探索空間を制限するための一般的なガイダンス。
 - クリッピングイベントに由来する可能性が低いピークを除去するには、*Feature Filter* アクティビティノードを使用します。
 - クリッピングイベントの可能性が低いピークを削除するには、TRD ワークフローで *Manual Peak Edit* を使用します。
 - 存在することが知られていて、妥当な量で存在する修飾のみを探索します。
 - 選択したライブラリの可変修飾の数と糖鎖の数を最小限に抑えます。たとえば、糖鎖プロファイルの大部分（95%）を占める糖型のみを含めます。

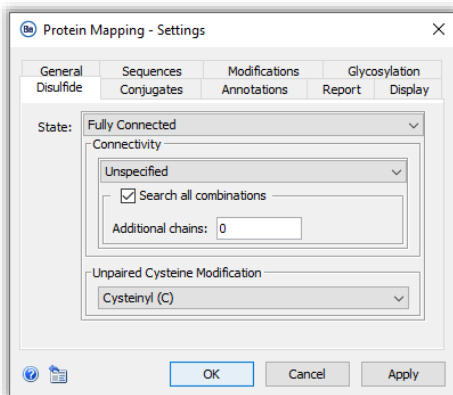
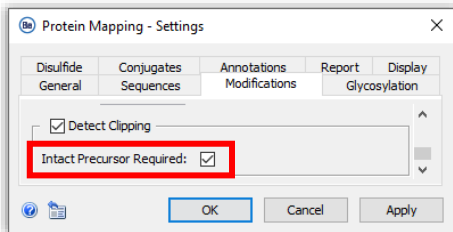
注: **Detect Clipping** は、*Protein Mapping* 探索で Lys-Loss（タンパク質 C 末端 K）が修飾として含まれている場合、C末端リジンの損失を重複したアノテーションとしてレポートします。

• Detect Clipping と Disulfide タブ設定の組み合わせ。

- ジスルフィド結合したタンパク質に由来する短縮種を検出するには、**Unspecified** または **IgG** 接続性で **Fully Connected** を選択します。
 - **Intact Precursor Required** を選択した場合は、**Search all combinations** を選択すると **Additional chains** は 0 に設定する必要があります。
 - **Intact Precursor Required** を選択しなかった場合は、**Search all combinations** を選択すると **Additional chains** を 0 または 1 に設定できます。
- 還元型 IdeS 消化物から断片のクリップを識別するには、それぞれの断片を個別に調査することが推奨されます。

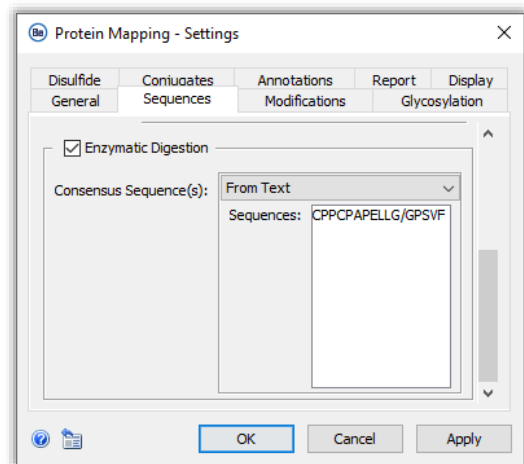


Protein Mapping: Detect Clipping - Intact Precursor Required



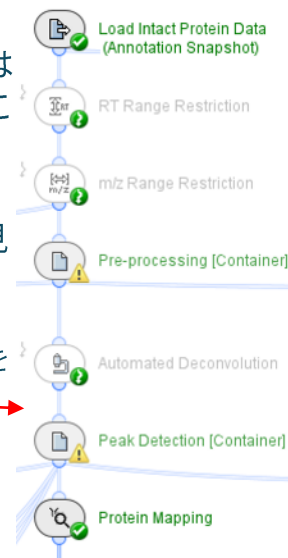
- **Intact Precursor Required** を選択した場合、同じ修飾を持つ非短縮タンパク質もデータ中に同定された場合のみ、修飾を含む短縮タンパク質が同定されます。
- **Intact Precursor Required** を選択した場合、検索時間は増加しますが、偽陽性は減少します。
 - このアルゴリズムは、同定されたすべての短縮型が、完全な長さの非短縮型と一致することを確認するものです。
 - 非短縮のマッチングがない短縮型は排除されます。
- **Intact Precursor Required** と **Disulfide** タブ設定の組み合わせ。
 - **Intact Precursor Required** は必ず以下のいずれかと一緒に使用します。
 - **Connectivity: IgG. Search all multi-specific combinations** を必要に応じて選択できます。
 - **Connectivity: Unspecified. Search all combinations** を選択する場合、**Additional chains**は0にします。

Protein Mapping: 酵素的開裂



- 酵素的開裂は、MS 分析用のタンパク質サブユニットを生成するサンプル調製戦略です。
- **Enzymatic Digestion** を選択し、**Consensus Sequence** を指定して、タンパク質マッピングの開裂点を定義します。

- 複数のコンセンサスサイトを追加した場合、アルゴリズムはすべての位置に開裂があると想定し、それらが代替であることは想定しません。
- たとえば CPPCPAPELLG/GPSVF と CPPCPAPELLGG/PSFV のように、1つのコンセンサス配列の周辺で非特異的な開裂を見つけるには、それぞれを個別に探索します。
 - そのためには、ワークフローを順次実行します。Save Annotations Snapshotからの出力は、要求されていないアクティビティノードをバイパスして再分析できます。



- **Enzymatic Digestion** の使用時に、以下を行います。
 - **Disulfide** タブで **Unspecified** を選択します。
 - **Modifications** タブで **Detect Clipping** を選択しないでください。

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.

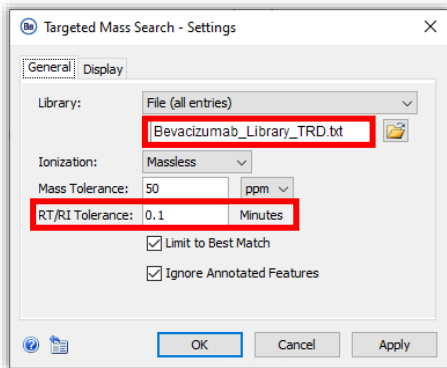
- 'Detect Clipping' and 'Enzymatic Digestion' can not be both activated at the same time.

Targeted Mass Search

- Targeted Mass Search 用の入力ライブラリは、Excel で編集可能なタブ区切りのテキストファイルである必要があります。



Targeted Mass Search



- **Automated Deconvolution** ワークフローのフォーマット:

- 1 列目 (Mass) は必須です。

- **Time Resolved Deconvolution** ワークフローのフォーマット:

- 最初の 2 列 (RT と Mass) は必須です。

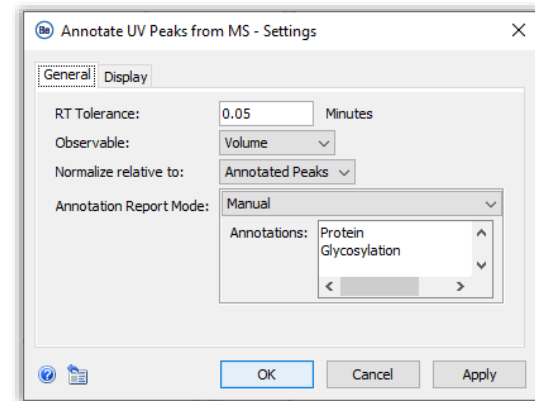
Mass	Protein	Disulfide Bonds	Modifications	Glycosylation
23173.51646	Hein			
46245.01703	LC-LC		5*5-5	
147833.4673	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	G0F + G0F-GlcNAc
148036.6602	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	2*G0F
148198.801	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	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

RT	Mass	Protein	Modifications	Glycosylation
5.33	25400.3676	Fc		G1F
5.295	25332.1262	Fc		G0F
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	

- 必要に応じて、必要でない列を削除したり、追加情報を提供するために列を挿入したりします。
- クロマトグラフィーのシフトを考慮して、**RT/RI Tolerance** を調整します。

Annotate UV Peaks from MS

- このアクティビティでは、MS のピーク情報を使用して、UV トレースの対応するピークにアノテーションを付けます。
 - 対応するピークが、指定した **RT Tolerance** 内に溶出する必要があります。
- また、UV の吸光度から、UV ピークの相対比が算出されます。
 - UV 吸光度の値を正規化するために、タンパク質配列が必要です。
 - UV 正規化係数が計算できない場合、アクティビティノードに**黄色の警告**が表示されます。
 - Time Resolved Deconvolution** では、UVの正規化はできません。
 - UV の正規化が *Targeted Mass Search* に適用できないのは、このアクティビティノードにはタンパク質配列が含まれないためです。



Experiment Table		Peak Table	
Name	RT	Area	Height
20190615_Bevacuzumab_10ug_OC_100mM_Am			

1 row (1 selected)

Data | UV Quantities | **Summary**

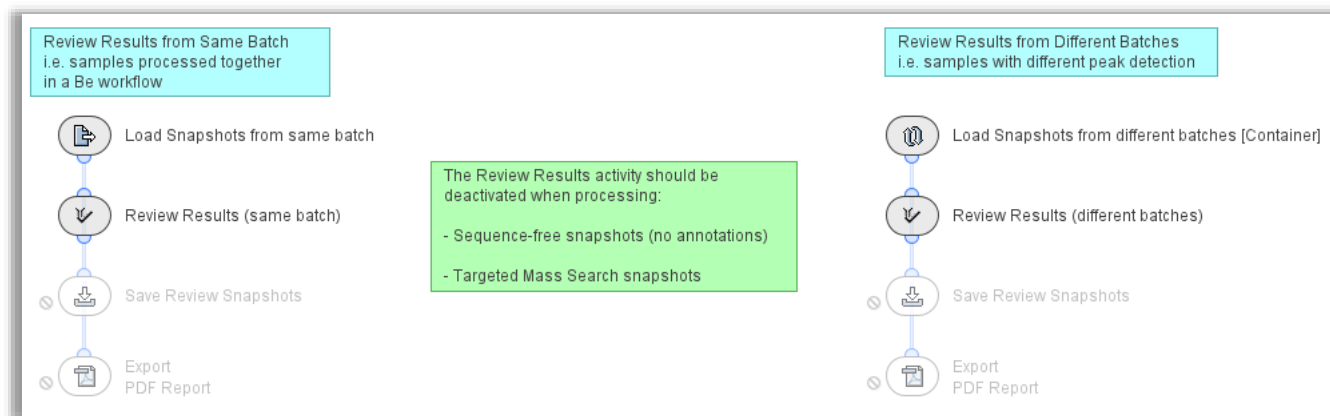
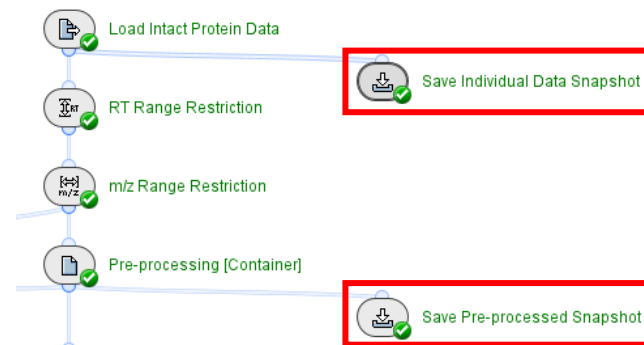


Annotate UV Peaks from MS

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.

レポート: Save Snapshots

- ワークフロー全体の異なる各ステージの後に中間結果を保存します。
 - Save Snapshot* アクティビティノードは、処理済みデータの必要なプロパティを含むファイル (sbf) を作成します。
- 保存されたデータを確認するには、Intact_ReviewSnapshots ワークフローの *Load Snapshots* アクティビティノードで保存された sbf ファイルを開きます。



レポート: Save Snapshots

- 結果を保存するフォルダーを選択するか、作成します。
 - デフォルトの位置は、C:\ProgramData\Sciex\BiologicsExplorer\data\data\user です。

スナップショット保存のオプションは以下のとおりです。

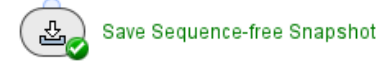
1. *Save Individual Data Snapshot.* 生データを sbf フォーマットに変換します。同じ wiff または wiff2 コンテナ内の複数のサンプル、および同一ラン内の複数の実験は、個別のスナップショットとして保存されます。
2. *Save Pre-processed Snapshot.* デコンボリューション前のデータクリーンアップ、RT アライメントの中間結果を保存します。
3. *Save Sequence-free Snapshot.* *Peak Detection*, 後に保存され、デコンボリューション後のピーク情報を保存します。タンパク質の配列は不要です。
4. *Save Annotation Snapshot.* レビュープロセス後に保存され、フィルタリングや手動レビューの結果とともに、機能アノテーションを含むすべての中間情報が保存されます。
5. *Save Targeted Search Snapshot.* *Filter Annotated Peaks* の後に保存され、*Targeted Mass Search* を使用してアノテーションを行った後のピーク情報を保存します。
6. *Save Review Snapshots:* *Intact_ReviewSnapshots* ワークフローでレビュープロセス後に保存されます。*Save Annotation Snapshot* と同様に、すべての情報を保存します。



Save Individual Data Snapshot



Save Pre-processed Snapshot



Save Sequence-free Snapshot



Save Annotation Snapshot



Save Targeted Search Snapshot



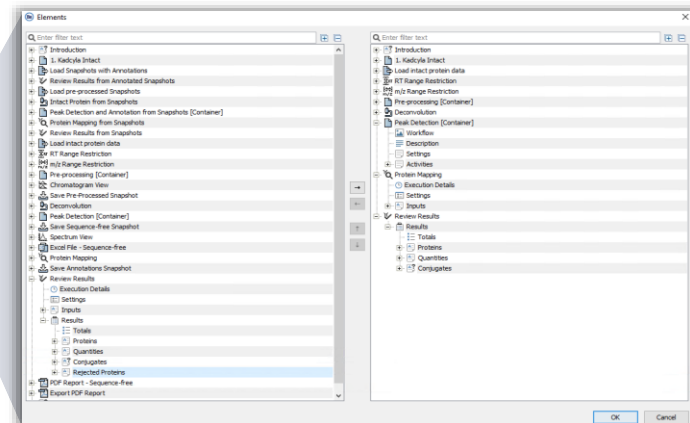
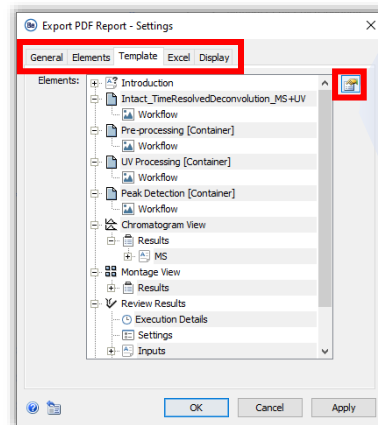
Save Review Snapshots

レポート: *Export PDF Report*



- *Export PDF Report* アクティビティノードは、以下を生成します。
 - PDF ドキュメント。
 - デコンボリューションによるスペクトル情報を含む Excel ファイル。
 - 結果の生成に使用する設定を含む、Executed ワークフローファイル (xml)。
 - xml ファイルを開くには、Biologics Explorer ワークフローのホームページにドラッグ & ドロップします。

- **General** タブ: エクスポートするレポートの保存先を定義します。
- **Template** タブ: レポートの内容をカスタマイズします。
- **Excel** タブ: レポートと一緒にエクスポートする追加の表をカスタマイズします。



レポート: Excel ファイルの保存またはエクスポート

- 生成された Excel ファイルには、ピークに関連する定量情報が含まれています。
 - Automated Deconvolution:** 定量的な情報は、**Maximum Intensity** としてエクスポートされます。
 - Time Resolved Deconvolution:** 定量的な情報を **Volume** として出力します。

Name	Mass	RT	Mass Wdth	RT Height	Area	Mass Min	Mass Max	RT Min	RT Max	
20220217_20220217_Adamimamab_ids-DTT.2 [2]	3206.03833	25332.38	5.290895	18	0.448657	8.0742	25323.5	25341.5	5.157967	5.606333
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	528.773926	25366.3	5.351897	18	0.49255	8.8659	25357.5	25375.5	5.19315	5.6857
Peak_03	785.77265625	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	258.5281272	25250.36	5.359016	7	0.254433	2.278633	25246.5	25253.5	5.201942	5.57375
Peak_08	536.6027832	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	23933.47	6.040324	12	0.474958	5.6995	23386.5	23396.5	5.8704	6.345358
Peak_16	806.7955322	23834.23	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	421.1587524	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

- 結果を保存するフォルダーを選択するか、作成します。
 - デフォルトの位置は、C:\ProgramData\Sciex\BiologicsExplorer\data\data\user です。

パート A

ソフトウェアとワークフロー

特異的なインタクトワークフローのガイドライン

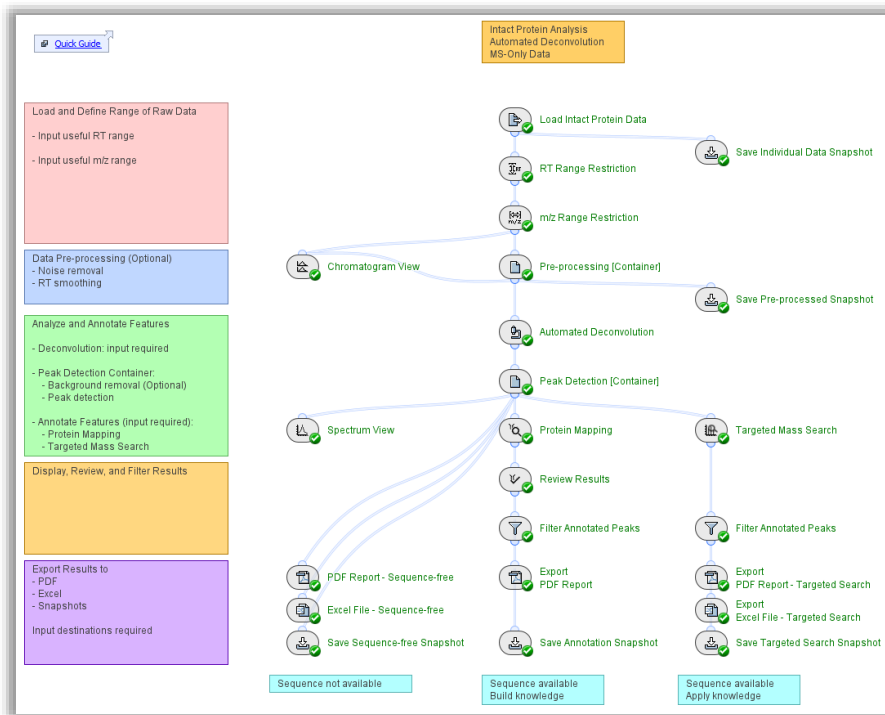


MS または MS & UV データによる自動デコンボリューション

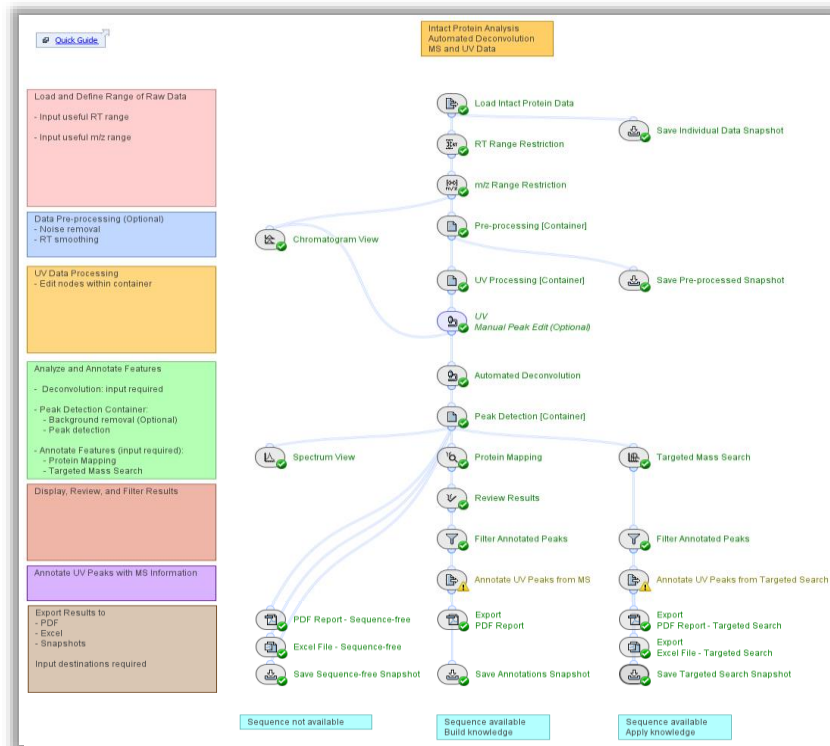
ワークフローのガイドライン



自動デコンボリューションワークフロー: デザイン



Intact_AutomatedDeconvolution_MS ワークフロー



Intact_AutomatedDeconvolution_UV+MS ワークフロー

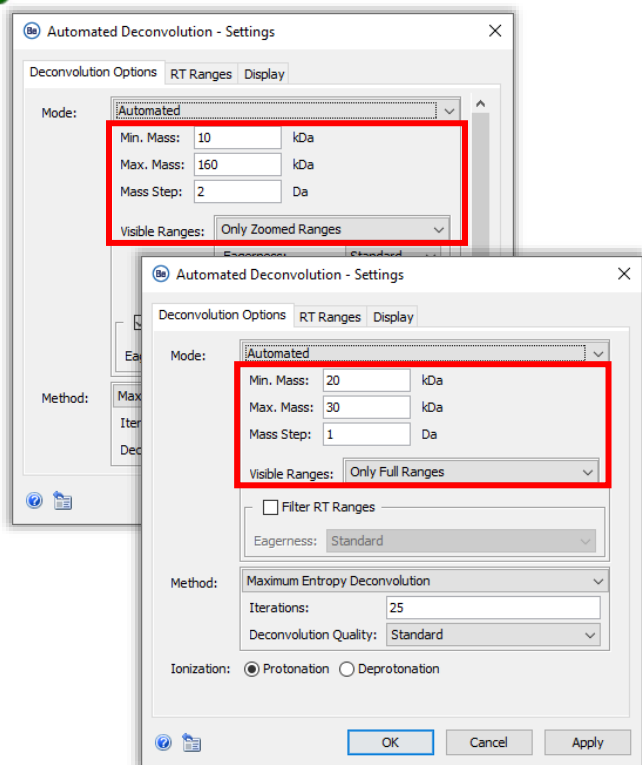
自動デコンボリューションワークフロー: 概要

- **Automated Deconvolution** は、対象種がクロマトグラフィー的によく分解されている場合に最適です。
- **Biologics Explorer** ソフトウェアは、複数のサンプルをまとめて分析する場合（バッチ分析）、共通のピーク検出方法を適用します。
 - アノテーションと定量化の一貫性を確保するために、類似するデータを使用します。たとえば、すべてのインタクトタンパク質やすべてのサブユニットデータセットのみをまとめて分析します。
 - ピーク強度が大きく変動する複数のサンプルを分析する場合は、スライド‘*Automated Deconvolution: Manual RT Ranges*’で、ワークフロー設定の最適化に関する説明を参照してください。

Automated Deconvolution: Deconvolution Options



Automated Deconvolution



Deconvolution Options タブで設定を行い、デコンボリューションされたスペクトルの関連する質量範囲と可視化のオプションを定義します。

- **質量範囲:**

- 複数の化学種を分析する場合は、顕著な高調波ピークを防ぐために、広い質量範囲を使用します。
- 狭い質量範囲を使用し、単一のエンティティ（化合物）に集中させます。

- **Visible Ranges** は、結果の表示方法を制御します。

- 同じ RT 範囲に複数の成分が検出された場合は、**Only Zoomed Ranges** を使用します。

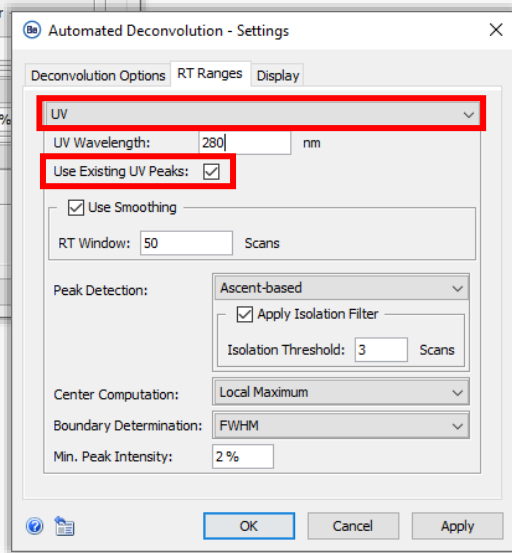
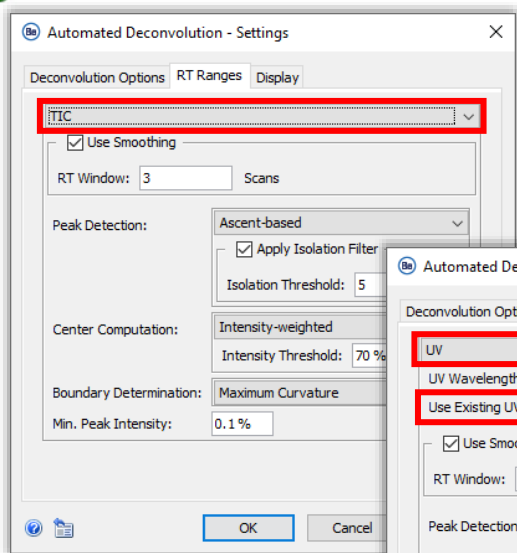
- デコンボリューションの前後でピークのデータポイント数が同じになるような **Mass Step** 値を設定します。

- 同位体分解データの場合は 0.1 Da - 0.2 Da。
- サブユニット（低分解能データ）の場合は 1 Da。
- インタクトタンパク質（低分解能データ）の場合は 2 Da。
- データポイントが少ない場合は 3 Da。

Automated Deconvolution: RT Ranges



Automated Deconvolution



- **RT Ranges** タブで設定を行い、目的とする RT 領域を特定します。

- リストから以下のオプションのいずれかを選択します。

- **TIC:** トータルイオンクロマトグラムを使用して RT 範囲を特定します。

- **Manual:** RT 範囲を手動で定義します。

- **UV:** UV データのピークに基づいて RT 範囲を定義します。

- UV データを使用して RT の範囲を定義するには、以下の手順に従います。

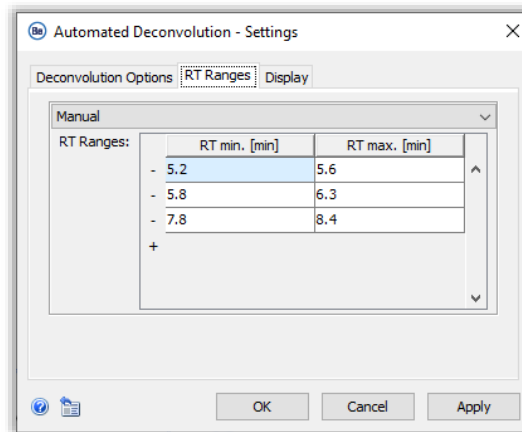
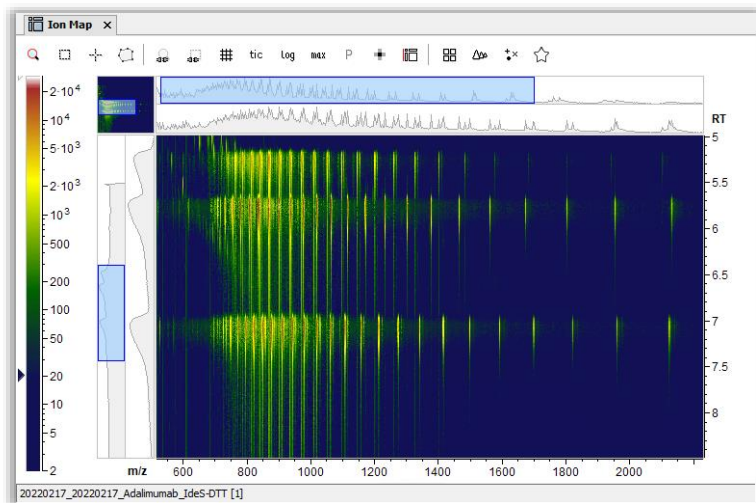
- Intact_AutomatedDeconvolution_UV+MS ワークフローを使用します。
- **UV Wavelength** を定義します。
- **Use Existing UV Peaks** を選択します。このタブの後続のピーク検出設定は無視されます。

Automated Deconvolution: Manual RT Ranges



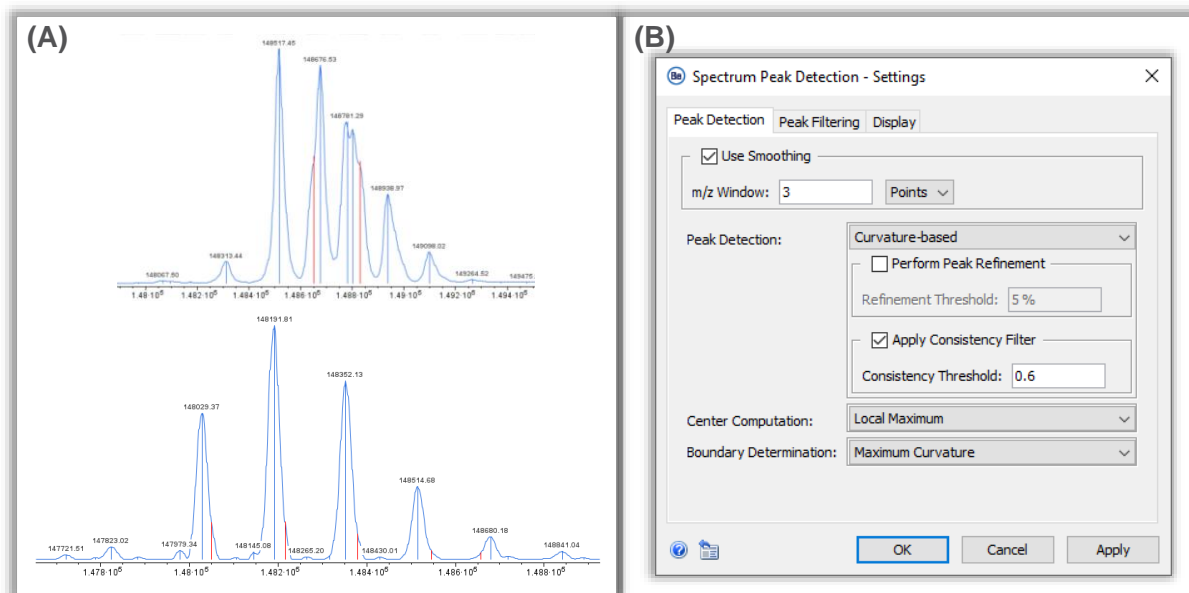
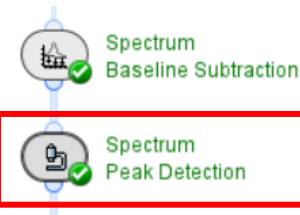
Automated Deconvolution

- バッチ分析でサンプル間でシグナル強度が大きく異なる場合は、手動で RT の範囲を定義します。
 - たとえば、希釈系列や時間経過の実験で。
- **RT Ranges** タブで **Manual** モードを選択します。



Spectrum Peak Detection

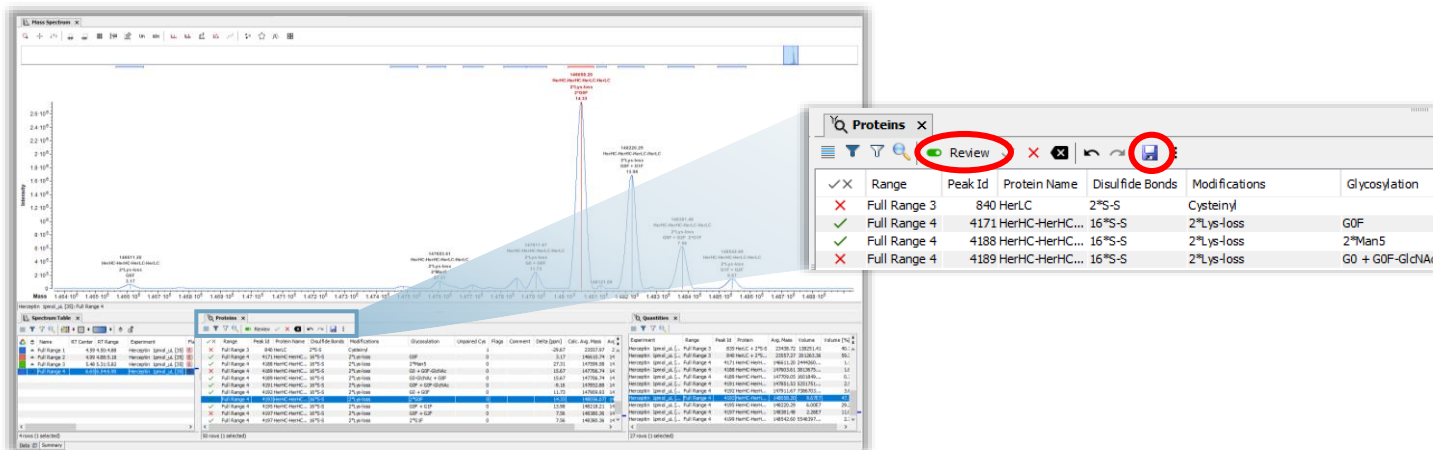
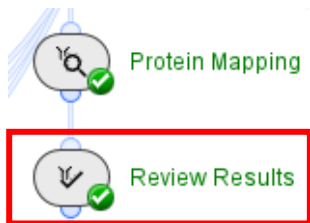
- デフォルトの設定 (**Ascent-based** ピーク検出) は、ほとんどの使用例で最適です。
- **Curvature-based** ピーク検出を使用して、ショルダーピークを分解します。
 - パラメータの詳細な説明は、オンラインヘルプを参照してください。



- Curvature-based** ピーク検出を使用してショルダーピークを分解する際に生成されるデコンボリューションされたスペクトル。
- スペクトル中のショルダーピークを分解するために使用した設定例。

Review Results: アノテーションの受け入れと排除

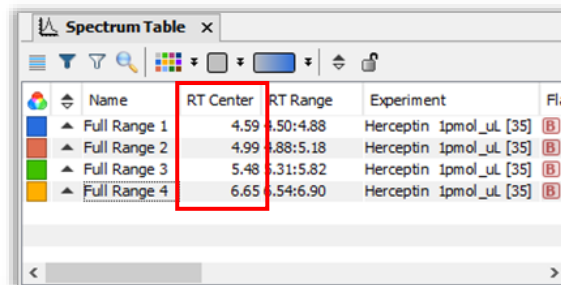
- **Review Results** アクティビティノードを開きます。
 1. **Review** モードを有効にし、関連するすべてのピークについて1つのアノテーションを受け付けます。
 2. その他の冗長なアノテーションはすべて排除します。
 3. **Save** をクリックして変更を適用します。アクティビティノードが再度実行され、数量が自動的に再計算されます。



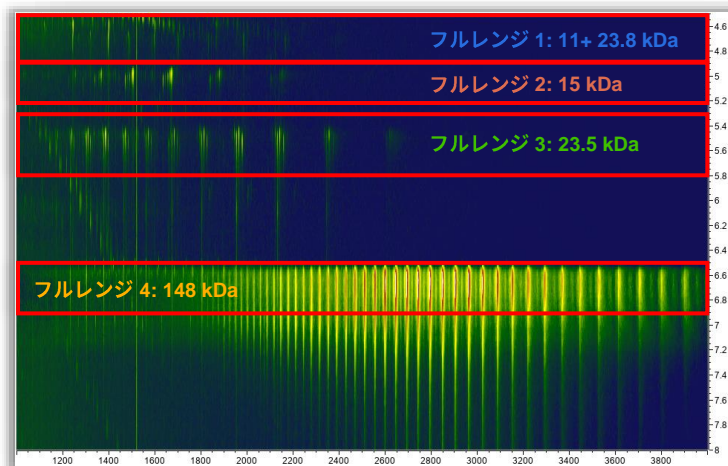
- **Review Results** は、複雑な糖鎖付加パターンを持つタンパク質の分析や、抗体薬物複合体が薬物抗体比 (DAR) の値を正しく算出するために重要なステップです。

Review Results: Spectrum Table

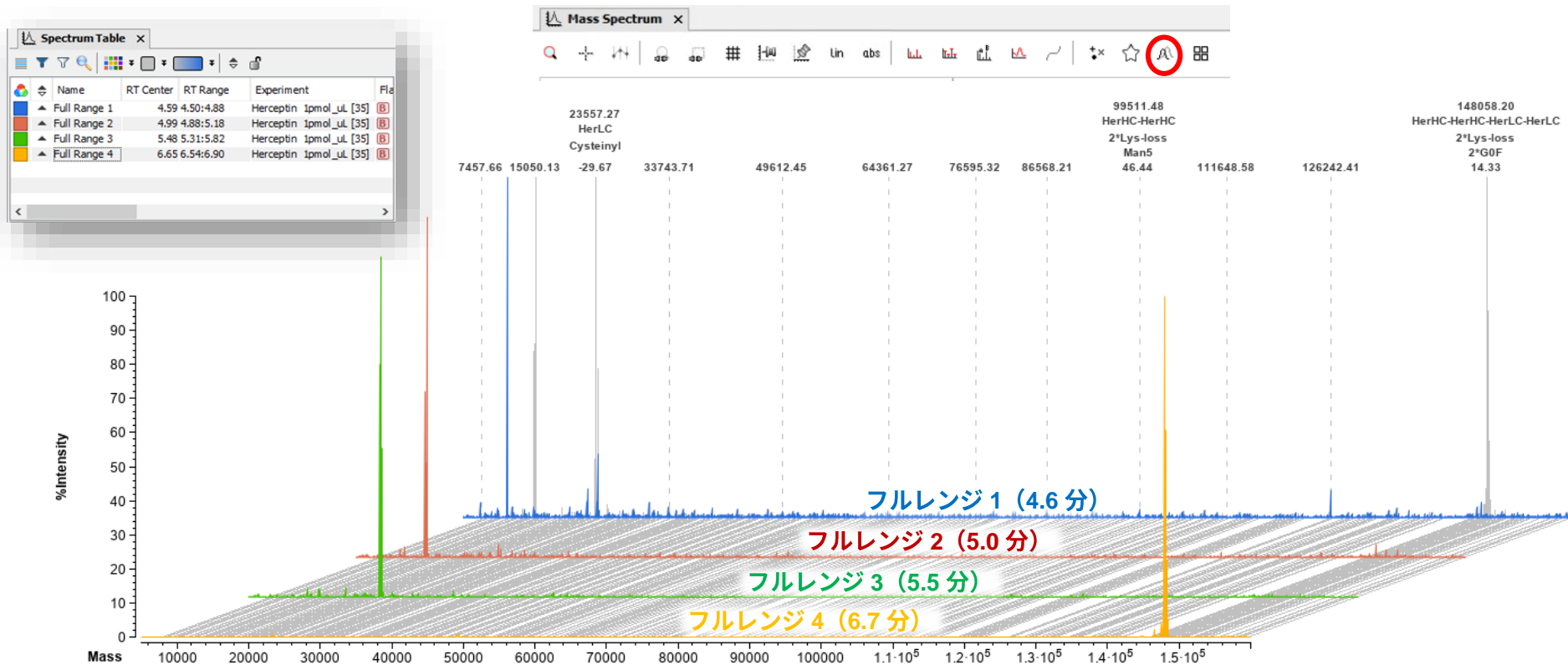
- **Spectrum Table** には、検出された RT の範囲と、検出されたタンパク質の信号の **RT Center** がリストアップされます。
- 各時間範囲内の全スキャンを合計し、デコンボリューションして対応するスペクトルを生成します。



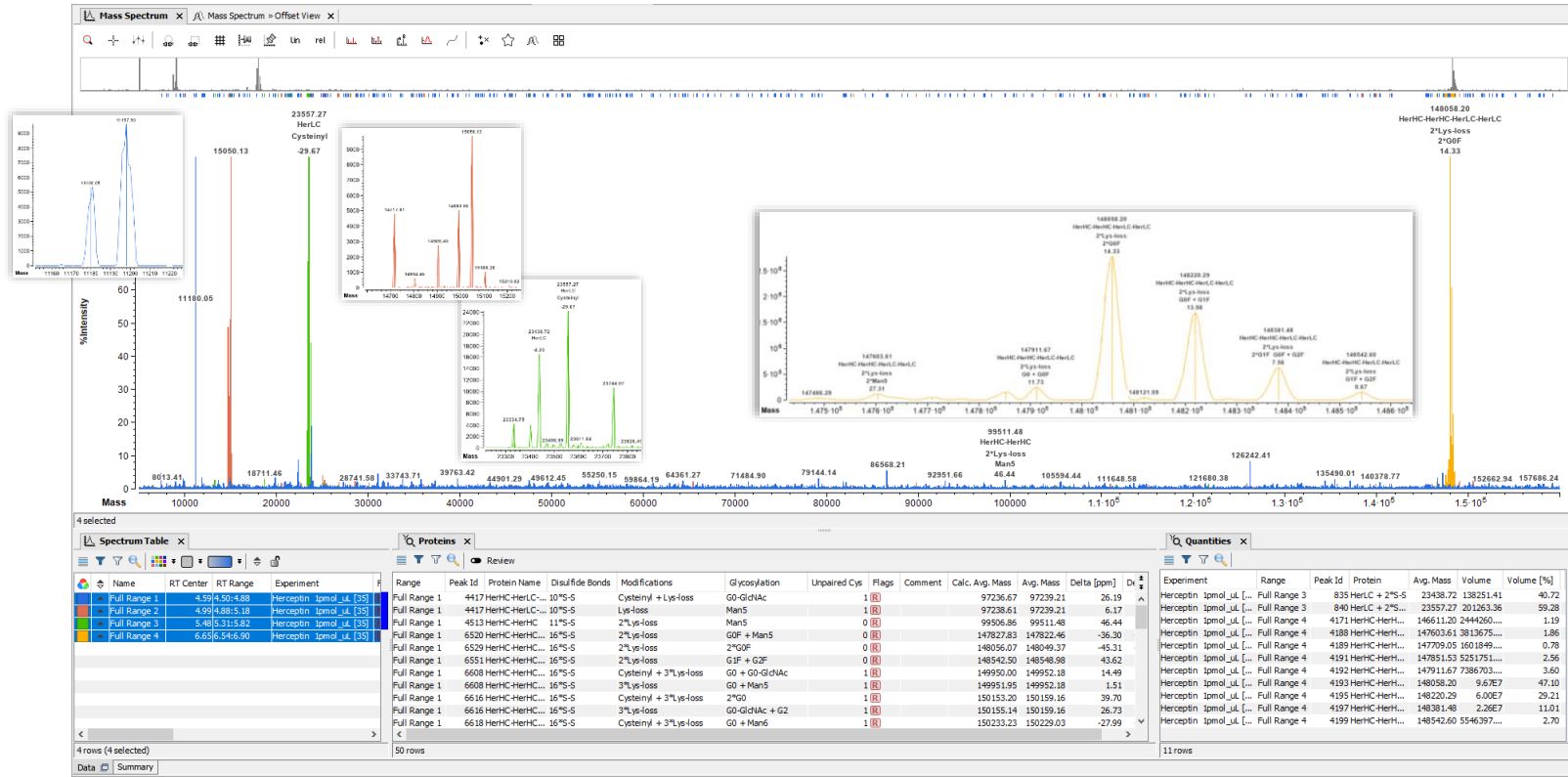
Name	RT Center	RT Range	Experiment	File
Full Range 1	4.59	4.50:4.88	Herceptin 1pmol_ul [35]	B
Full Range 2	4.99	4.88:5.18	Herceptin 1pmol_ul [35]	B
Full Range 3	5.48	5.31:5.82	Herceptin 1pmol_ul [35]	B
Full Range 4	6.65	6.54:6.90	Herceptin 1pmol_ul [35]	B



Review Results: スペクトルオフセットビュー



Review Results: スペクトルオーバーラップビュー

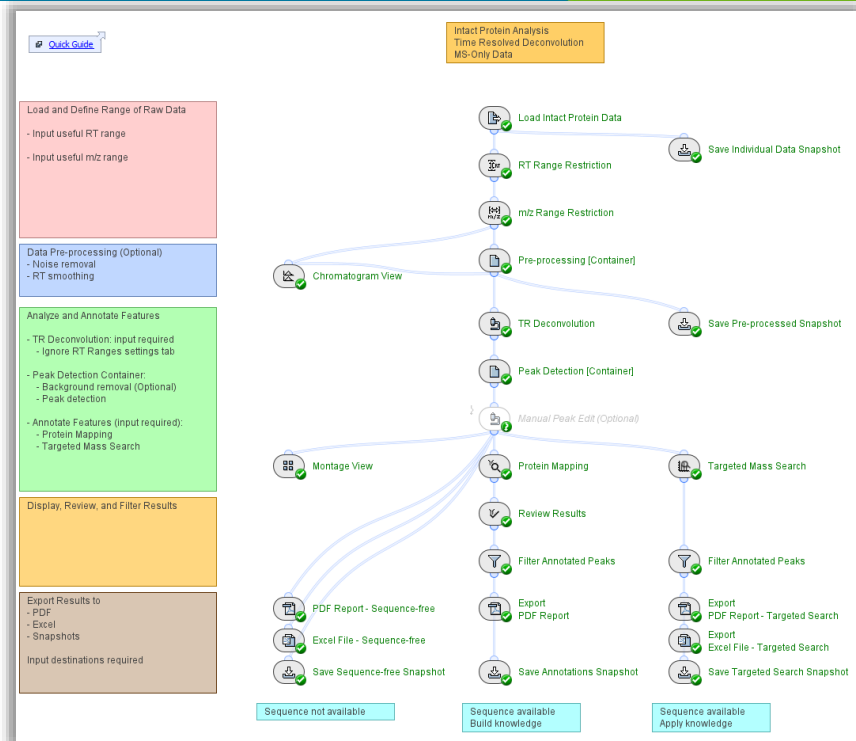


MS または MS & UV データによる時間分解デコンボリューション

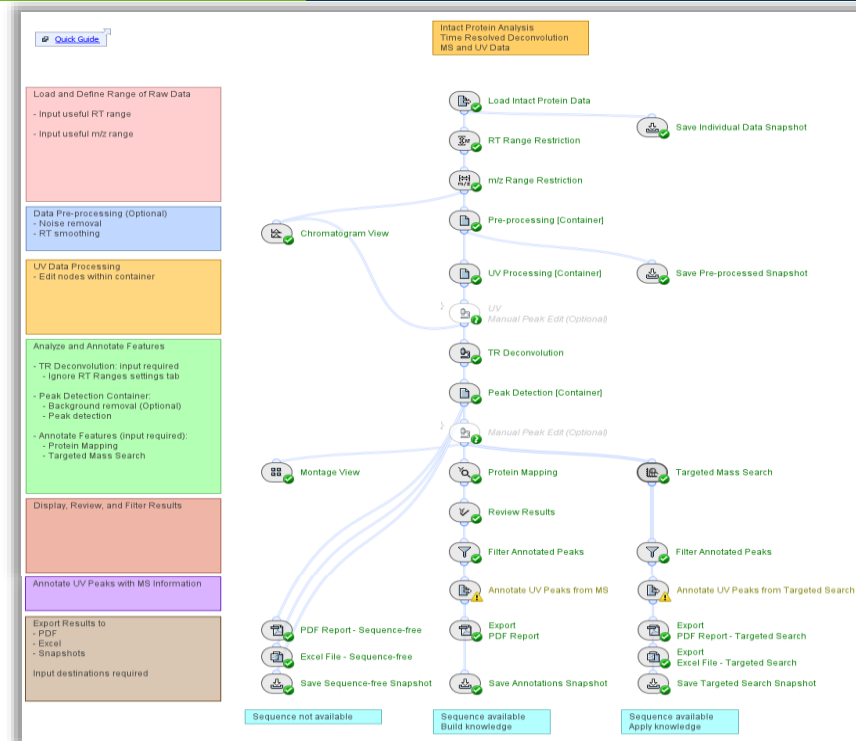
ワークフロー別のガイドライン



TRD ワークフロー: デザイン



Intact_TimeResolvedDeconvolution_MS ワークフロー

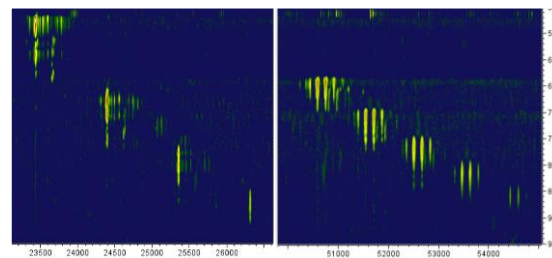
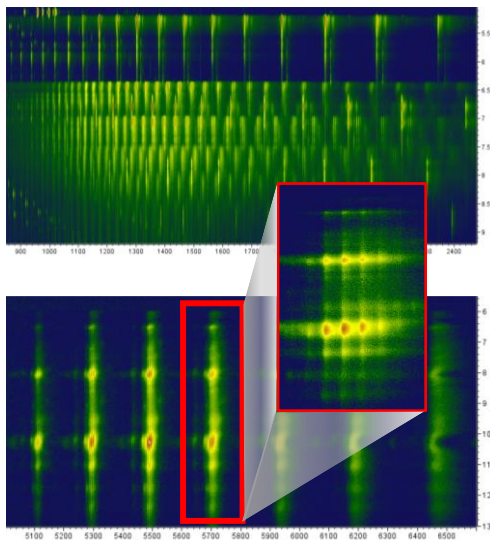


Intact_TimeResolvedDeconvolution_UV+MS ワークフロー

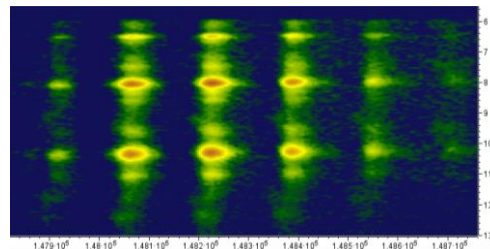
TRD ワークフロー: 概要

- **TRD** は、質量が類似し、クロマトグラフィープロファイルが重複する複数の成分を分析する際に、ロバストな定量化を行うために不可欠です。
- **TRD** はまた、修飾プロテオフォームの特性解析において、たとえば酸化、部分還元、付加体などに関連するピークの詳細を提供し、深い洞察を提供します。

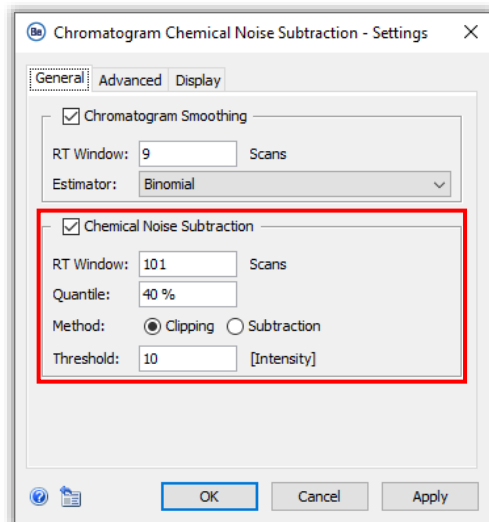
TRD 前
(m/z)



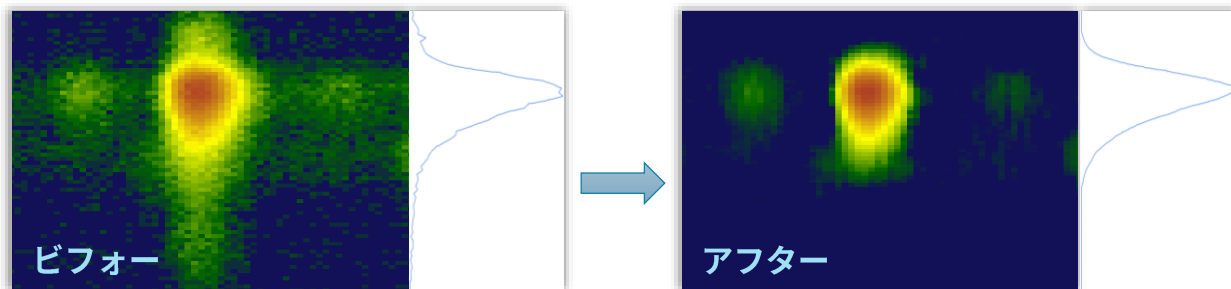
TRD 後
(質量)



Chemical Noise Subtraction: 最適化



- **Chemical Noise Subtraction** は、TRD データで使用するにより、以下の方法でピークを抑制し、ピーク検出を向上させます。
 - 広いピークの広範囲なテーリングを除去する。
 - 全体のバックグラウンドノイズを低減する。

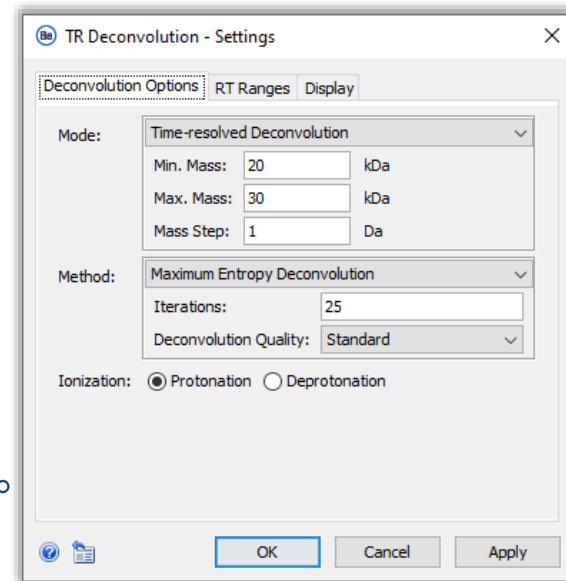


- 設定値の一般的な範囲:
 - **RT Window**: 最大ピークで約 1.3 倍のスキャン数。
 - **Quantile**: 40-50%。
- 設定による影響度のまとめ:
 - **RT Window** が大きい = 減算されるデータ量が少ない。
 - **Quantile** が高い = 減算されるデータ量が多い。

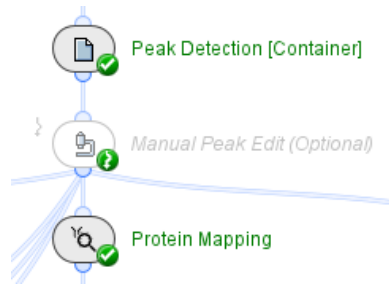
TR Deconvolution: データ分析速度への影響

TRD は、自動デコンボリューションよりもコンピュータリソースを多く必要とするアルゴリズムです。

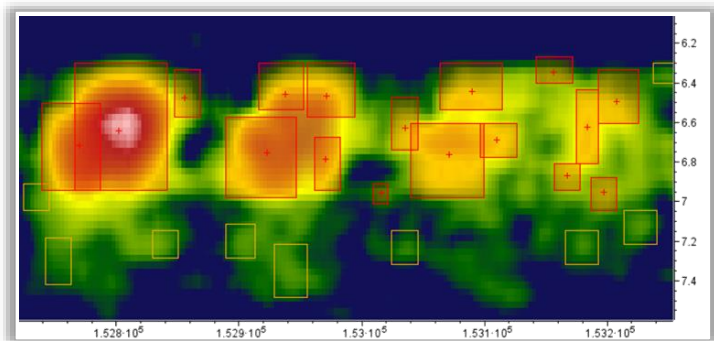
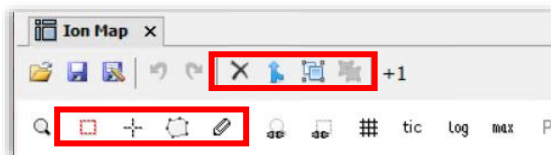
- デコンボリューションされた質量範囲とデータ密度は、処理時間に大きな影響を与えます。
 - フラグメント / サブユニットデータセットは、モノクローナル抗体データセット全体よりもデータ密度が高いことが多いです。
- **Min./Max. Mass** と **Mass Step** は、各データセット用に最適化する必要があります。
 - 特定のデータセットに適用できる場合は、質量範囲を小さくし、質量ステップを大きくすることで、必要な処理時間を短縮できます。
- **TRD** を選択した場合、**RT Ranges** タブの設定は無視されます。
 - デコンボリューションは RT の全範囲で実行され、デコンボリューションされたイオンマップが生成されます。



Manual Peak Edit (オプション)

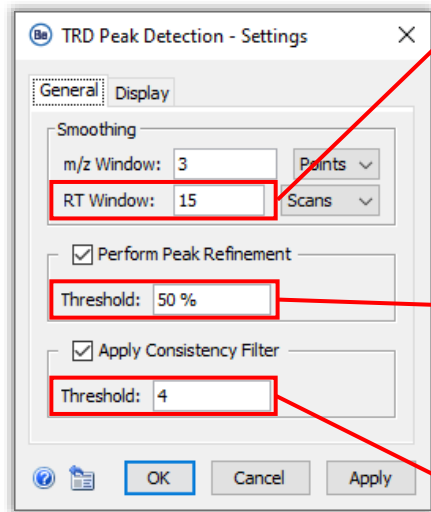


- このアクティビティは、デフォルトではバイパスされます。
- デコンボリューションされたイオンマップから自動検出されたピークは、*Manual Peak Edit* を使用して、以下の方法で絞り込むことができます。
 - ピークの境界を変更する。
 - 重なり合ったピークを分割する。
 - ピークを削除する。
 - 新たなピークを描き出す。



- *Manual Peak Edit* を使用して、重複する成分の強度分布を正確に個々のピークに割り当てます。
 - これにより、複雑な分析でも非常に細かい部分まで取り込むことができます。

TRD Peak Detection: 最適化



RT (↕) に沿って分割されるピークの数に影響を与えます。

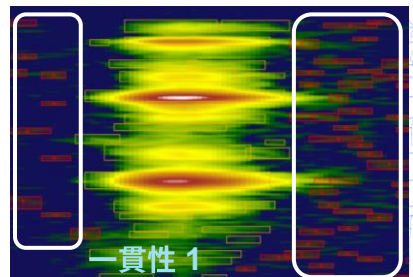
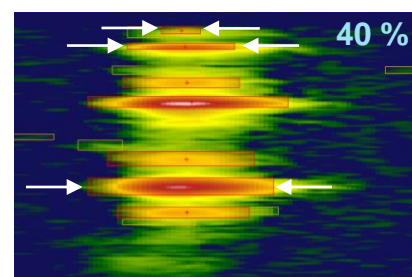
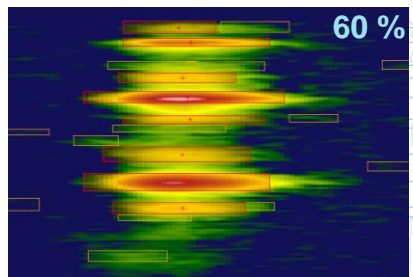
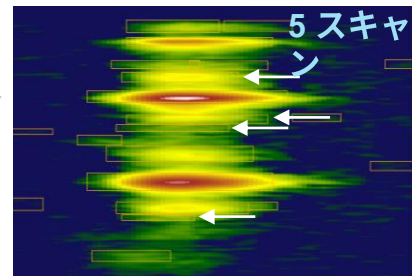
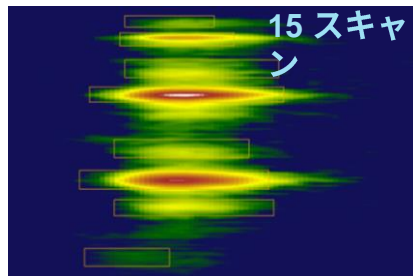
値が小さい = RT 方向に分割が増加する。

質量軸 (↔) に沿ったピークの数と幅に影響を与えます。

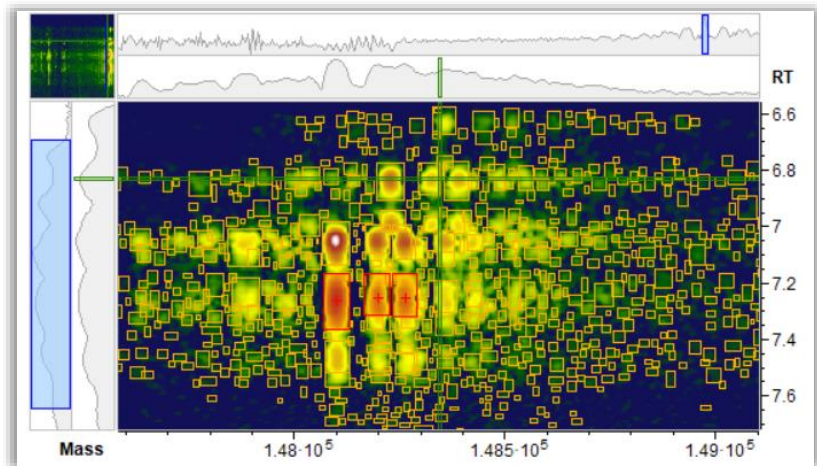
値が低い = m/z 方向にピークが分割される確率が高い。

感度に影響を与えるため、バックグラウンドピークの数に影響を与えます。

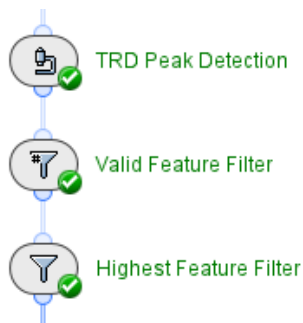
値が低い = m/z 分割が増加する。



TRD Peak Detection: 最適化

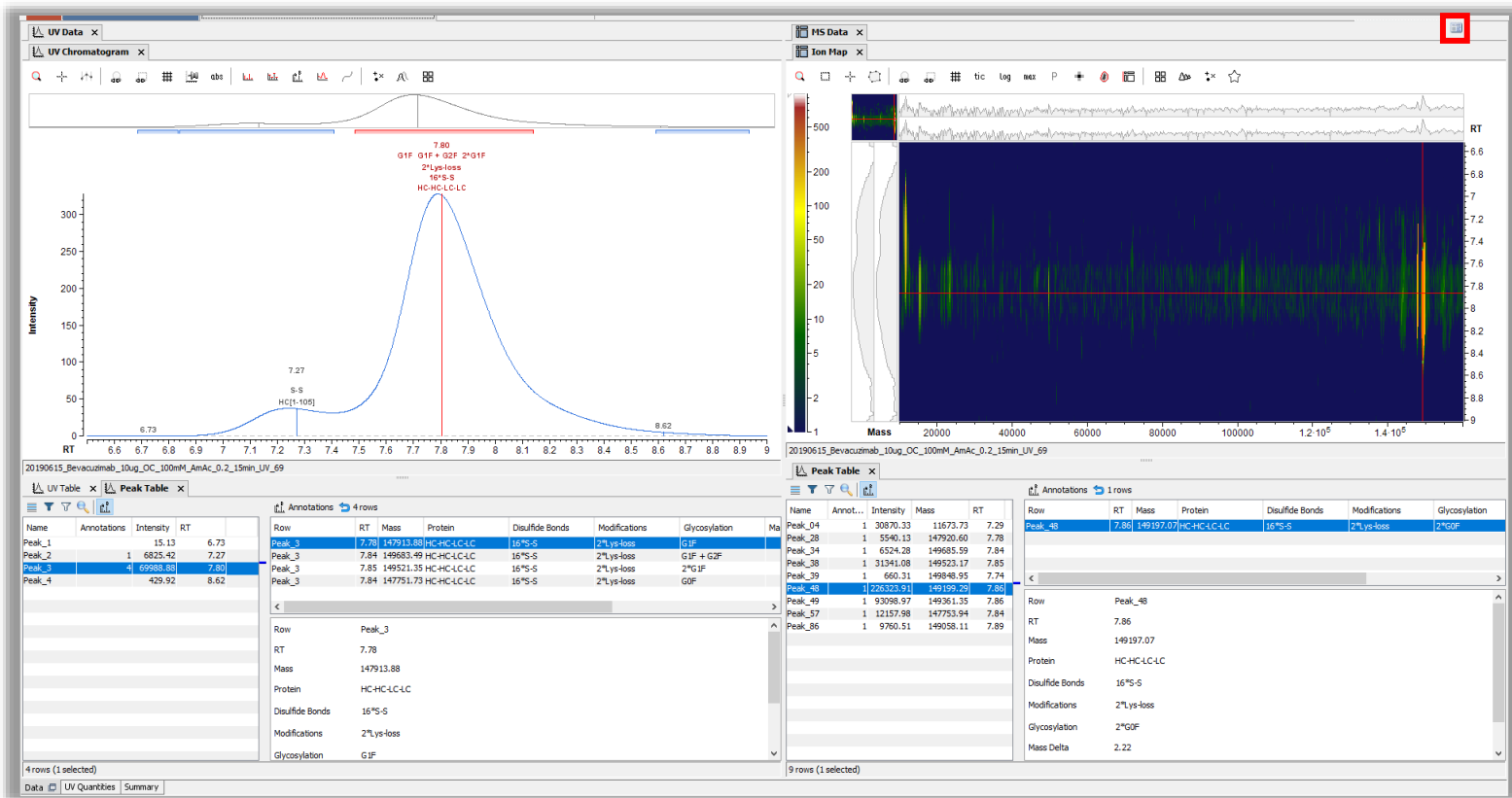


- デコンボリューションされた複雑なイオンマップに複数の小さな機能が検出された場合:
 - **Consistency Filter Threshold** を高くする (2 または 3 にする) ことで、感度を低くすることができます。



- アクティビティノード *Valid Feature Filter* および *Highest Feature Filter* は、選択した機能の数を減らすためにも使用できます。

TRD の結果を UV データで確認するための推奨レイアウト



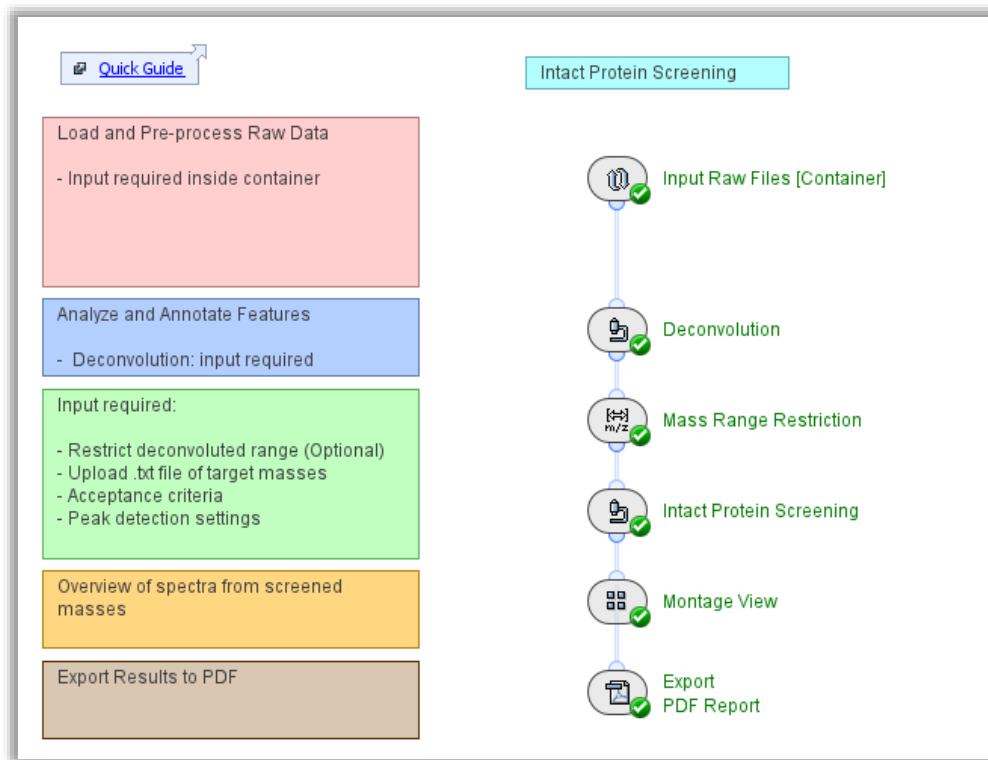
– お気に入りのレイアウトを保存しておいて、レイアウトアイコンからアクセスすることができます。

インタクトマススク リーニング

ワークフロー別のガイドライン



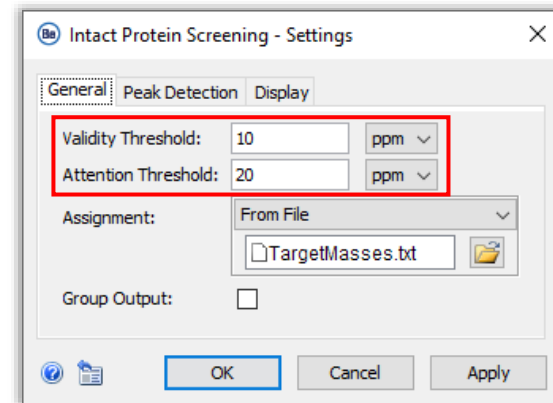
インタクトマススクリーニングのワークフロー: デザイン



Intact_MassScreening

インタクトマススクリーニングのワークフロー: 概要


- このワークフローでは、大量なサンプルをハイスループットでスクリーニングするために、迅速なデコンボリューションを可能にしています。
- 指定した質量信頼性 (ppm または Da) の範囲内で、目的の質量が存在するかどうかを検証できます。
- ビジュアルサマリー表では、各サンプルが以下のように識別されます。
 - 有効 (✓) : 算出質量が Validity Threshold を下回る。
 - 臨界 (!!) : 算出質量が Validity Threshold と Attention Threshold の間にある。
 - 無効 (✗) : 算出質量が Attention Threshold を上回る。

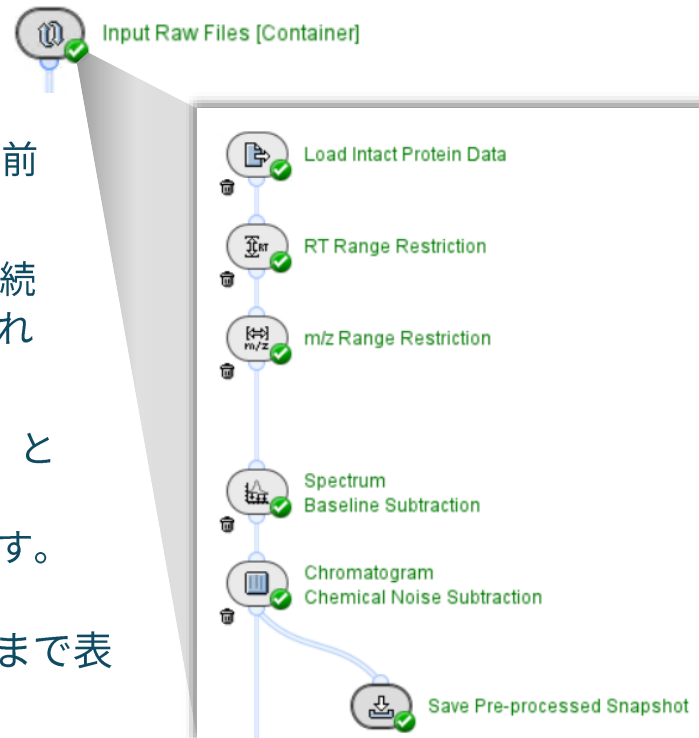


Zoomed Range 3

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	✗
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	✓

インタクトマススクリーニングのワークフロー: 概要

- ハイスループットスクリーニングに使用するコンピュータメモリを低減するために、以下の仕組みが備わっています。
 - *Input Raw Files* コンテナは、バッチ内の各サンプルを個別に前処理するために反復プロセスを使用します。
 - **Trash**  がコンテナではデフォルトで有効になっており、後続のアクティビティノードに渡された中間結果がすぐに削除されるようになっています。
 - 各前処理サンプルの前処理結果は、スナップショット (sbf) として保存できるので、必要に応じて他のインタクト質量分析ワークフローで使用して、さらに詳しく調べることが可能です。
- *Montage View* アクティビティノードは、最大 200 サンプルまで表示できます。
 - 200 を超えるサンプルをスクリーニングする場合は、*Montage View* アクティビティノードをバイパスできます。

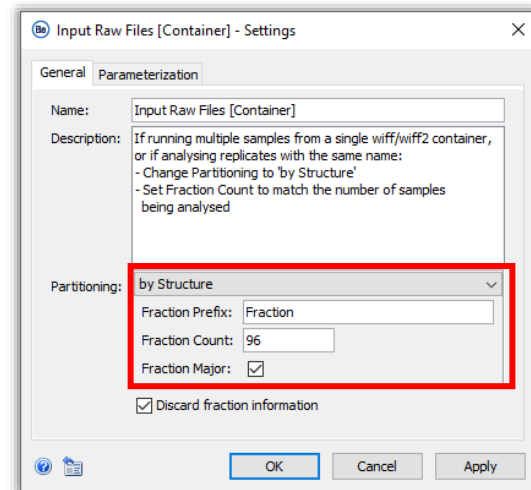
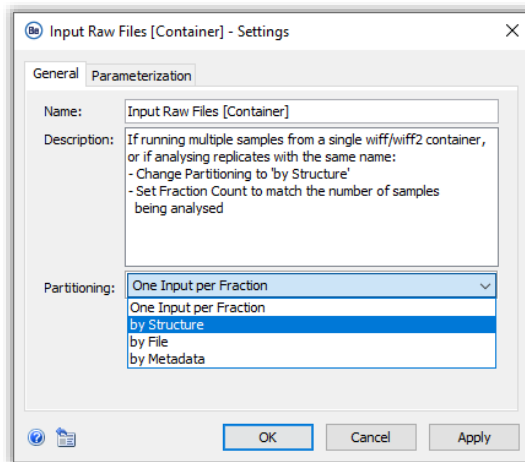
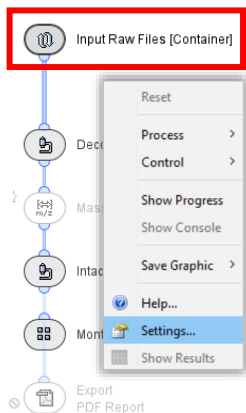


インタクトマススクリーニングのワークフロー: 条件と動作

- 各サンプルについて、複数の質量を検索することが可能ですが、提出されたサンプルは一定の条件を満たす必要があります。
 - サンプルは、たとえばインタクトタンパク質、サブユニット、フラグメントなど、同じ分子タイプに属している必要があります。
 - サンプルは、クロマトグラフィーが一定で、成分数が同じで、予測されるデコンボリューションの範囲が同様であることが必要です。
 - サンプルは、**Full** または **Zoomed RT Ranges** のいずれかが同じ数でなければなりません。
- ワークフローは、次のような動作をするように設計されています。
 - 各サンプルのデコンボリューションされた RT 範囲 (**Full** または **Zoomed RT Range**) の最高値のピークを個別に検出し、質量リストに基づいて単一のマッチングに割り当てます。
 - 結果にアノテーションは含まれません。
 - 検出された質量の値をレポートします。

Input Raw Files: 同じ名前のレプリカの分析

- 以下について、*Input Raw Files* コンテナの設定を変更する必要があります。
 - 同じファイル名の複製サンプルの分析。
 - 1つの wiff または wiff2 コンテナ内から複数の異なるサンプルをロードする場合。



(1) *Input Raw Files [Container]* を右クリックし、Settings にアクセスします。

(2) **Partitioning** を **by Structure** に変更します。

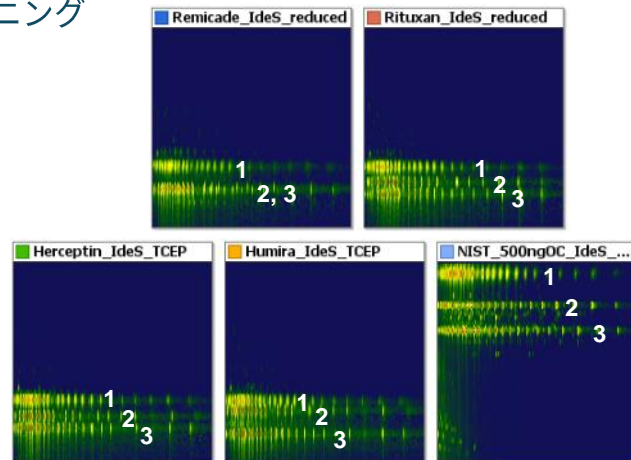
(3) 読み込んだサンプル数を **Fraction Count** として指定します。

Deconvolution: 複雑なデータセットに対応する最適化

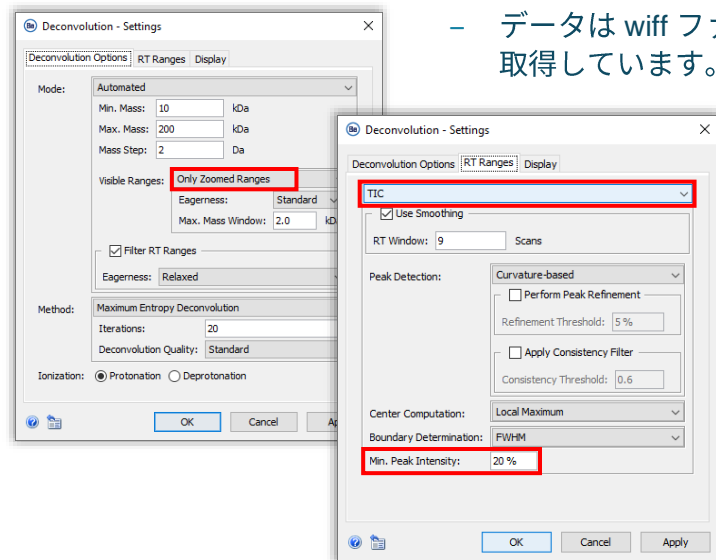


Deconvolution

- テンプレートのワークフローは、非常に複雑なスクリーニングアプリケーションを表しています。
 - 異なるモノクローナル抗体に由来する3つの標的成分（モノクローナル抗体フラグメント）が存在します。
 - クロマトグラフィーに一貫性がありません。
 - Fc/2糖型は同程度の強度を持ち、強度の順番はサンプル間で変化しています。
 - データは wiff ファイルと wiff2 ファイルの両方から取得しています。



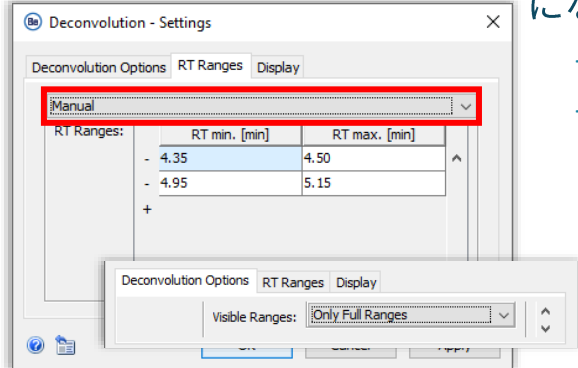
- この種のデータセットに潜在する課題を克服するために、以下を行います。
 - TIC を使用して、各サンプルに対する特定の RT 範囲を自動的に同定します。
 - Min. Peak Intensity** を 20%（またはそれ以上）に設定し、デコンボリューションされた RT 範囲をターゲットフラグメントに関連するものに限定します。
 - Only Zoomed Ranges** を使用します。これは、分子の種類が同じと想定して、同じバッチ内のすべてのスクリーニングサンプルで同じであると予測されるからです。



Deconvolution: 存在する / しない RT 範囲に対する最適化



Deconvolution

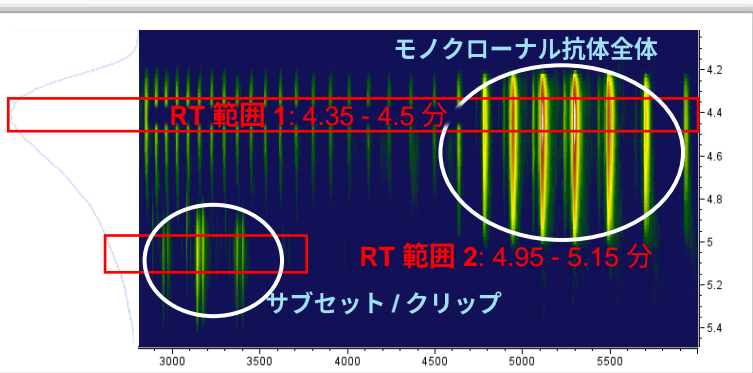


スクリーニングワークフローを使用して分析する使用例では、以下のようになります。

- 主な標的成分: モノクローナル抗体全体（常に想定されるもの）。
- 既知の副産物: 存在してもしなくてもよい、接続不良のサブユニット。
- **TIC** を使用して RT 範囲を同定すると、サンプルごとに RT 範囲の数変動する結果となります。このため、スクリーニングのワークフローが阻害されます。

成分が存在しないこともある場合の **RT Ranges** の最適な設定は、以下のとおりです。

- **Manual** を使用して、各成分の時間範囲を指定します（溶出プロファイルの頂点に焦点を当てた小さな RT ウィンドウ）。
- **Visible Ranges** を **Only Full Ranges** に設定します。
- ワークフローは、以下の場合に完了します。
 - クロマトグラフィーが、サンプルバッチ全体で一貫している。
 - 成分同士の間に分離がある。

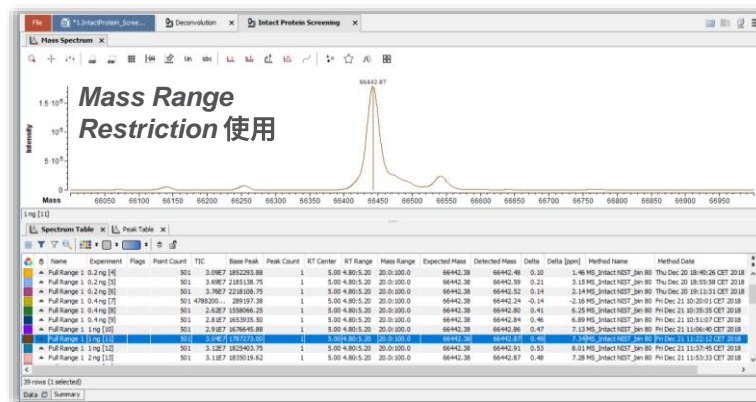
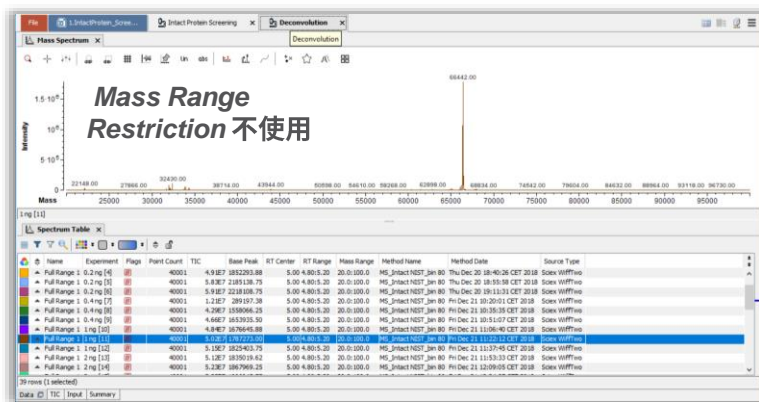


Mass Range Restriction



Mass Range Restriction

- このアクティビティは、デフォルトではバイパスされます。
- *Mass Range Restriction* を使用すると、デコンボリューションされたスペクトルの可視化を特異的な標的質量に制限することができます。
 - **Only Full Ranges** を使用する場合は、この制限が引き続き適用されます。
 - このアクティビティノードは、**Only Zoomed Ranges** の代わりに使用できます。

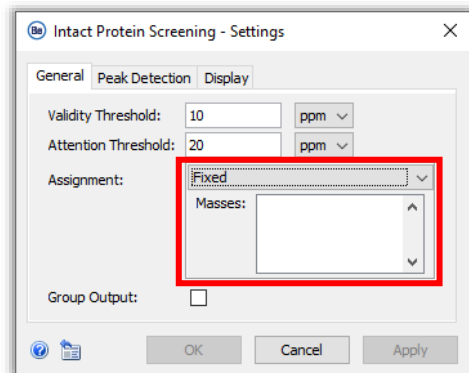


Intact Protein Screening の標的質量を定義する

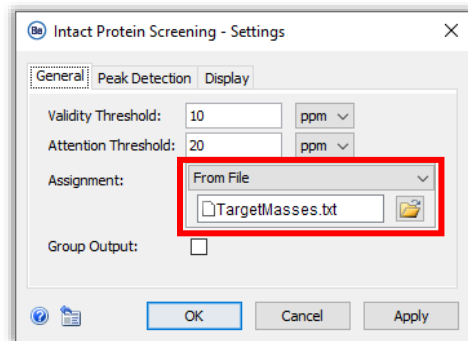


Intact Protein Screening

- スクリーニングの対象とする質量を指定します。



- すべてのサンプルで同じ質量を想定している場合は、**Assignment** を **Fixed** に変更し、**Masses** セクションに値を入力します。



- サンプル間で異なる質量を想定している場合は、**Assignment** を **From File** に変更し、各サンプルの標的質量を含む txt ファイルをアップロードします。

- Peak Detection** のデフォルト設定を変更する必要はありません。

Intact Protein Screening: 標的質量のファイル形式

スクリーニング用の txt ファイルを作成する手順は、以下のとおりです。

1. サンプル名と標的質量を含む表を作成します。表のヘッダーは含めないでください。

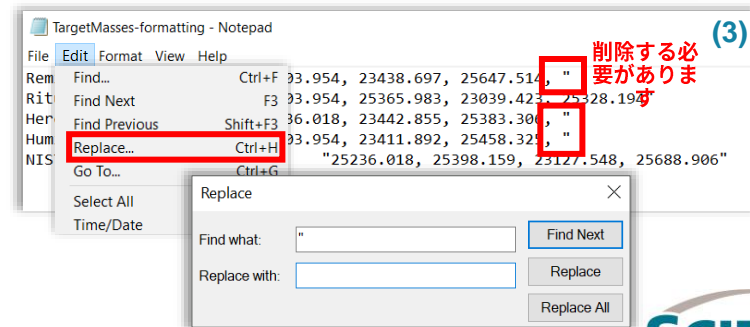
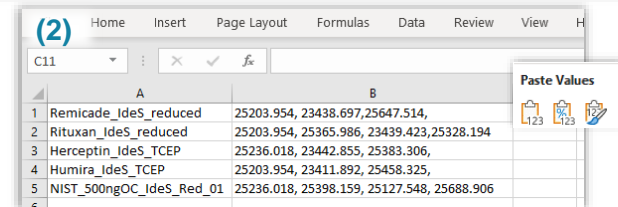
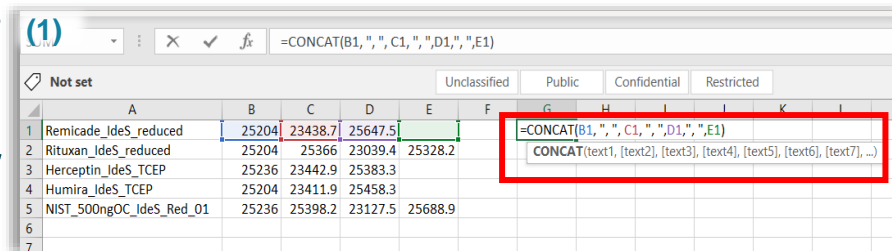
- Excel の CONCATENATE 関数を使用して、標的質量を含む列を 1 つの列にまとめます。
- フォーマット “,” に注目してください。

2. 表から式を削除します。

- 連結された列をコピーし、Paste Values を選択します。
- 元の列を削除して、2 列の表を作成します。
- スプレッドシートを txt ファイルとして保存します。

3. txt ファイルを開き、不要な文字を削除します。

- 重複するコンマや質量配列の末尾にあるコンマを手動で削除します。
- “がある場合: Replace ツールを使用して “ をスペースに置き換えます。その後、txt ファイルを保存します。

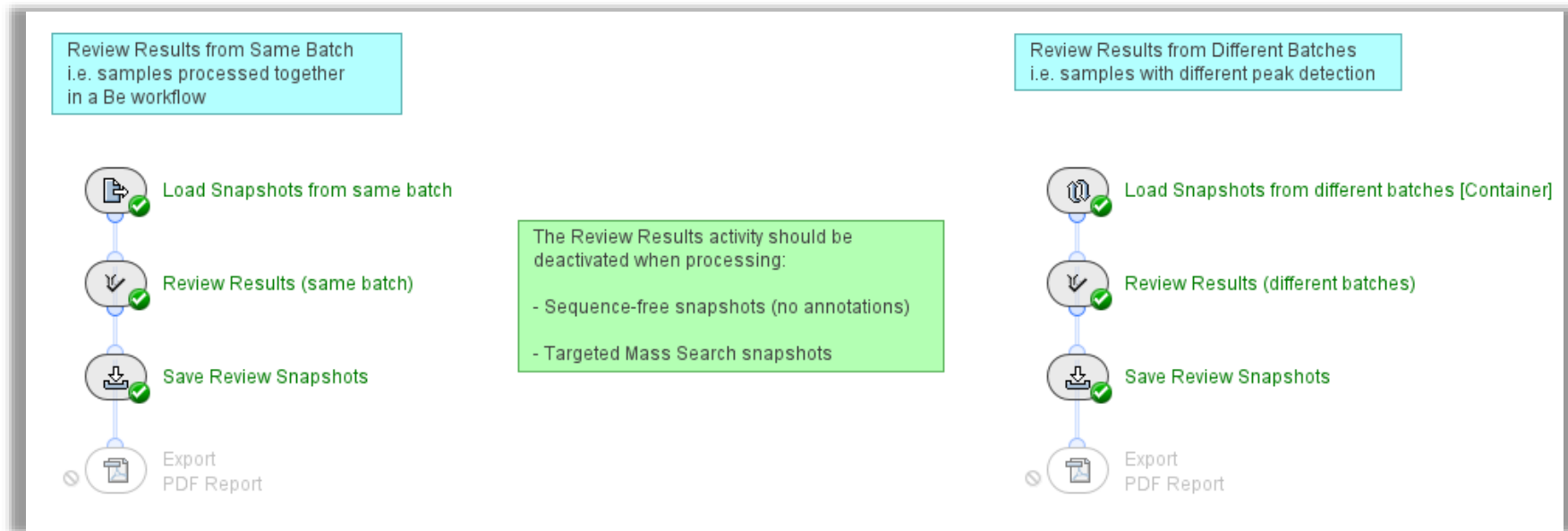


保存された結果の レビュー

ワークフロー別のガイドライン



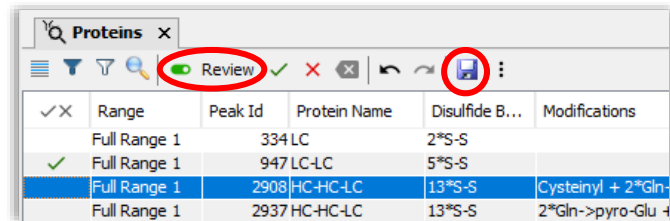
保存された結果をレビューするワークフロー: デザイン



Intact_ReviewSnapshots

保存された結果をレビューするワークフロー: 概要

- これらのワークフローでは、Biologics Explorer ソフトウェアでインタクтомスワークフローから保存したすべてのスナップショット (sbf) を開くことができます。
 - 同じバッチまたは異なるバッチで分析したデータを使用して、過去の分析結果を表示します。
 - さらにレビューを行い、必要に応じて最初のレビュープロセスで受け入れられた結果、または却下された結果を変更します (*Annotations Snapshots* のみ)。
- Sequence-free*、*Targeted Mass Search*、*Individual Data*、および *Pre-processed Snapshots* を使用する場合は、*Review Results* アクティビティノードをバイパスします。
 - これらのスナップショットには、*Review Results* で必要とされる配列情報は含まれていません。
- さらにレビューを行った後、修飾した *Annotations Snapshots* を *Review Snapshots* として保存するか、または結果を PDF レポートとしてエクスポートします。



The screenshot shows the 'Proteins' window in Biologics Explorer. The 'Review' tab is active, indicated by a green circle and a checkmark. A table below displays protein data with columns for Range, Peak Id, Protein Name, Disulfide B..., and Modifications. The third row is highlighted in blue.

✓ 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

パート B

ワークフローのアプリケーション

用途に応じた絞り込み設定

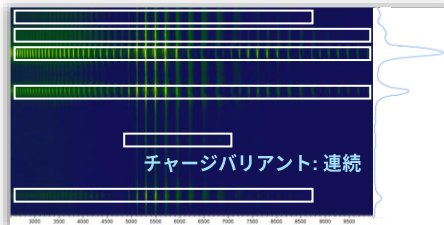
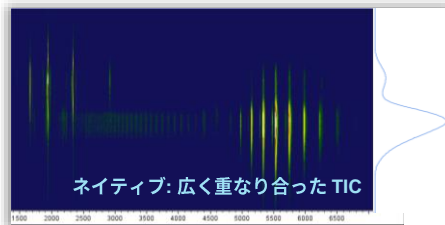
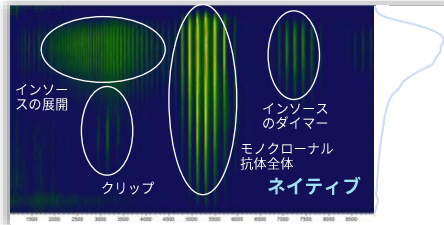
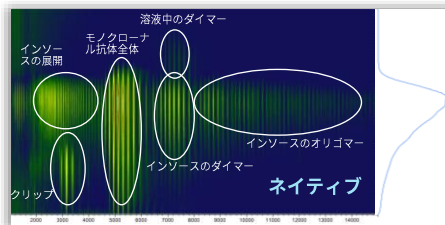
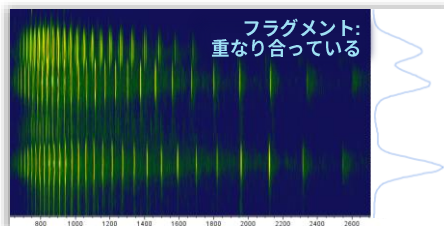
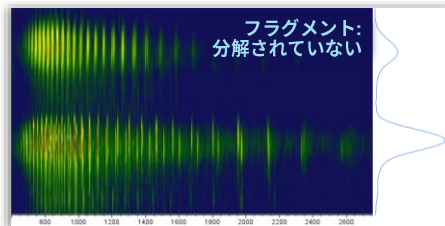


時間分解デコンボリューションまたは自動デコンボリューションの選択

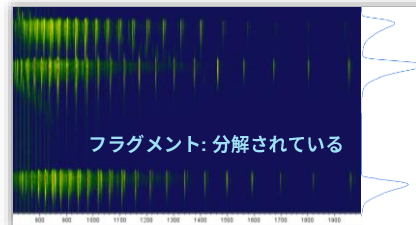
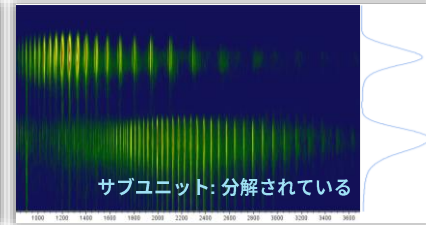
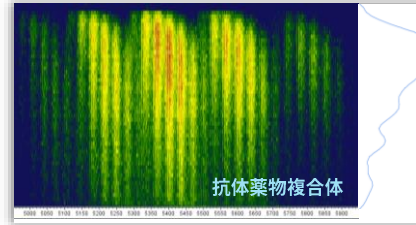
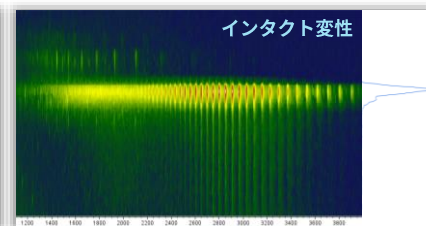
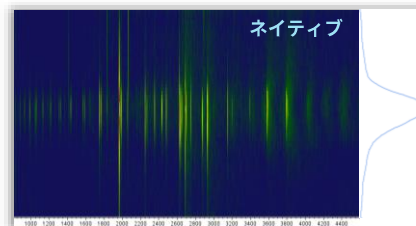
- **Automated:** デコンボリューションの範囲は自動的に決定されます。
 - クロマトグラフィー的によく分解されている化学種にお勧めします。
- **Time-resolved:** デコンボリューションは、RT 内に各スキャンで完了します。
 - 分解能の低い複雑な混合物を含むデータにお勧めします。
 - デコンボリューションされたデータの 2D イオンマップ表示を作成し、重なり合ったピークや分解されていないピークをより見やすくすることができます。
 - 重なり合ったピークや分解されていないピークの定量を簡素化します。

時間分解 / 自動デコンボリューションの使用例

時間分解デコンボリューション の主な使用例: 複合クロマトグラフィー



自動デコンボリューションの 主な使用例: 簡易クロマトグラフィー



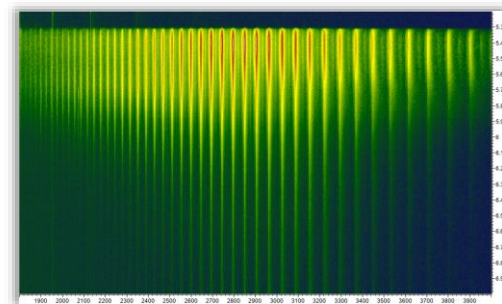
変性インタクトタンパク質

変性タンパク質: 単一のエンティティ

フォーカス: 単一の標的タンパク質。
着目した副産物はありません。

推奨する初期設定:

サンプルタイプ:	単一の変性タンパク質
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (可視化およびレポートの場合)。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹	RT Window: 5 - 9 (目標は、単一の RT 範囲を識別することです)。 Isolation Threshold: 5 - 15 (スキャン周波数によります)。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50 (使用する分解能力によります)。
Glycosylation ²	ライブラリの選択により、 Deglycosylated または Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Connected. Connectivity: IgG (該当する場合。該当しない場合は指定します)。



変性インタクトタンパク質

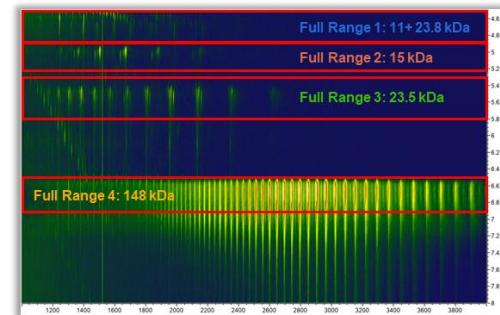
変性タンパク質: 複雑なサンプル

フォーカス: すべての可視 RT 範囲。

低質量分解生成物（未接続のサブユニット、クリップ）を含みます。

推奨する初期設定:

サンプルタイプ:	変性タンパク質およびその不純物 / 分解生成物
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution Intact_TimeResolvedDeconvolution (複数の重複する RT 範囲の場合)
Deconvolution range ¹	10 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Zoomed Ranges (可視化およびレポートの場合)。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹ (TRD では無視します)	RT Window: 3 - 5 Isolation Threshold: 3 - 7 Min. Peak Intensity: <1% または、すべての範囲を手動入力することで、より高い感度と効率性を実現します。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50 (使用する分解能力によります)。
Glycosylation ²	ライブラリの選択により、Deglycosylated または Glycosylated。
Disulfide ²	State: Fully Connected。 Connectivity: Unspecified + 3 Additional chains。 CysteinyI (対になっていないシステインの場合)。



不純物を含む変性インタクトタンパク質

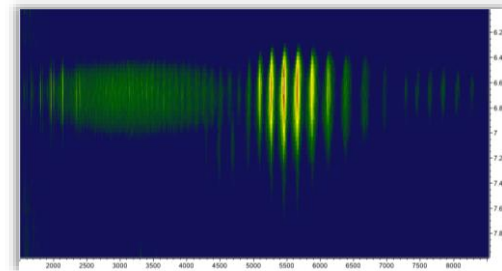
ネイティブインタクトタンパク質

ネイティブタンパク質: 単一のエンティティ

フォーカス: 単一の標的タンパク質。
着目した副産物はありません。

推奨する初期設定:

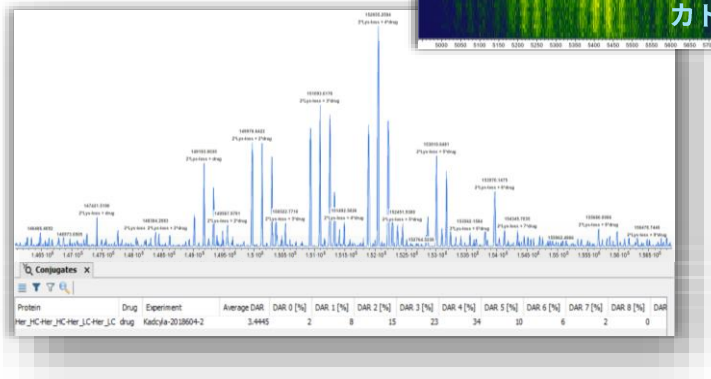
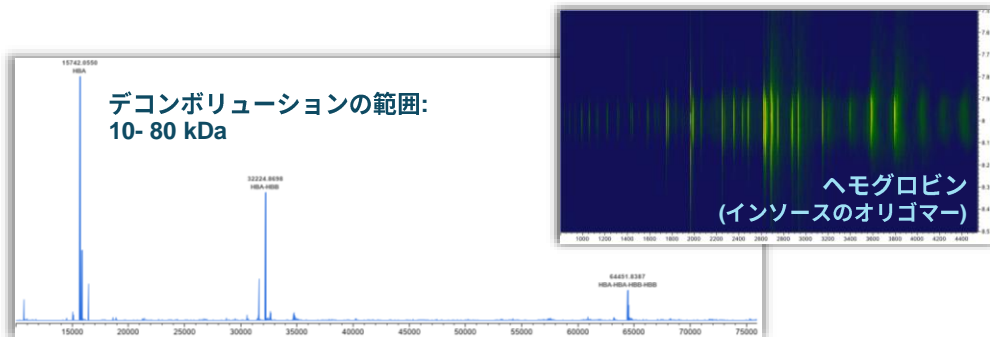
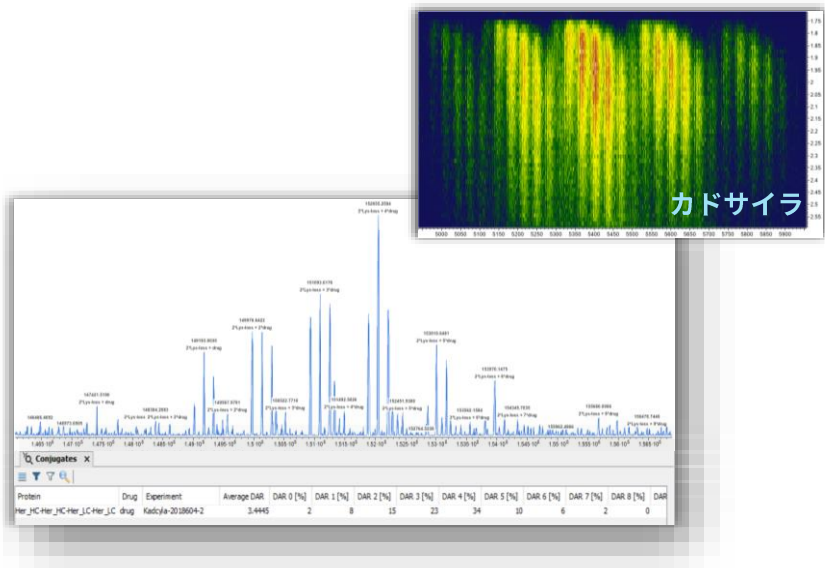
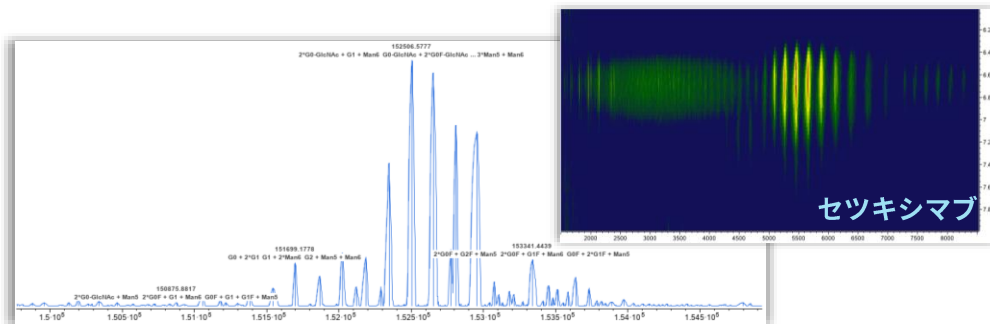
サンプルタイプ:	単一のネイティブタンパク質
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (可視化およびレポートの場合)。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹	RT Window: 5 - 9 (目標は、単一の RT 範囲を識別することです)。 Isolation Threshold: 5 - 15 (スキャン周波数によります)。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50 (使用する分解能力によります)。
Glycosylation ²	ライブラリの選択により、 Deglycosylated または Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Connected. Connectivity: IgG (該当する場合。該当しない場合は指定します)。



ネイティブインタクトタンパク質

ネイティブタンパク質: 単一のエンティティ

フォーカス: 単一の標的タンパク質。
着目した副産物はありません。



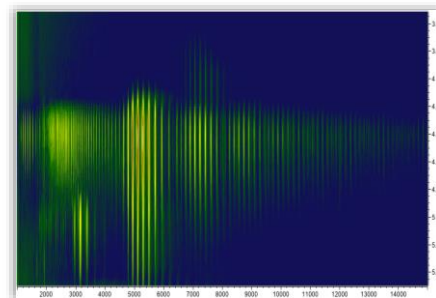
ネイティブタンパク質: 複雑なサンプル

フォーカス: すべての可視 RT 範囲。

低質量分解生成物（未接続のサブユニット、クリップ）を含みます。

推奨する初期設定:

サンプルタイプ:	ネイティブタンパク質およびその不純物 / 分解生成物
Suggested workflow	Intact_TimeResolvedDeconvolution（複数の重複する RT 範囲の場合）。 Intact_AutomatedDeconvolution（ピークが分解された場合）。
Deconvolution range ¹	10 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Zoomed Ranges （可視化およびレポートの場合）。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹ (TRD では無視します)	RT Window: 3 - 5 Isolation Threshold: 5 - 15（成分間の分離によります）。 Min. Peak Intensity: <1% または、すべての範囲を手動入力することで、より高い感度と効率性を実現します。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50（使用する分解能力によります）。
Glycosylation ²	ライブラリの選択により、 Deglycosylated または Glycosylated 。
Disulfide ²	State: <i>Fully Connected</i> 。 Connectivity: <i>Unspecified + 3 Additional chains</i> 。 CysteinyI （対になっていないシステインの場合）。

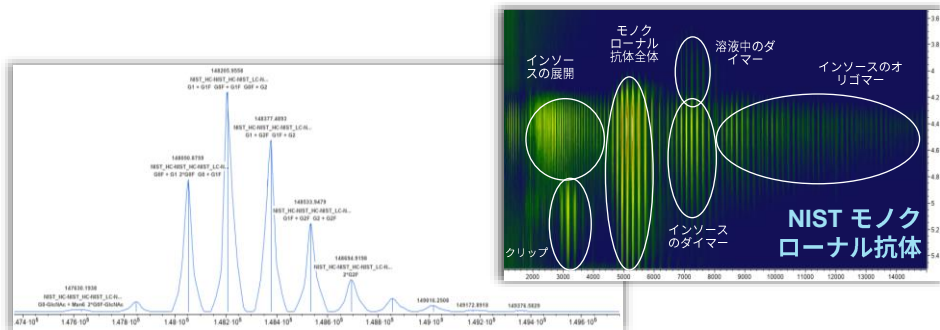
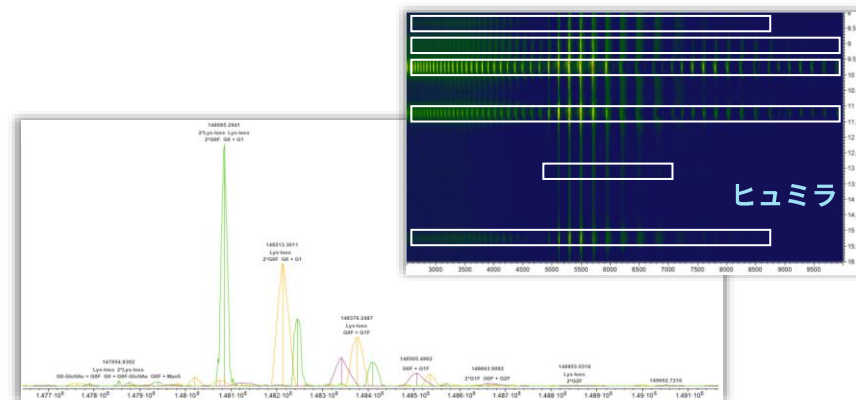
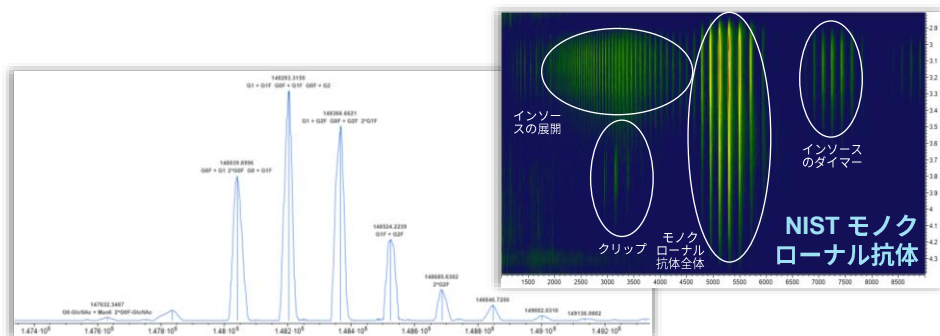


ネイティブの複雑なサンプル

ネイティブタンパク質: 複雑なサンプル

フォーカス: すべての可視 RT 範囲。

低質量分解生成物（未接続のサブユニット、クリップ）を含みます。



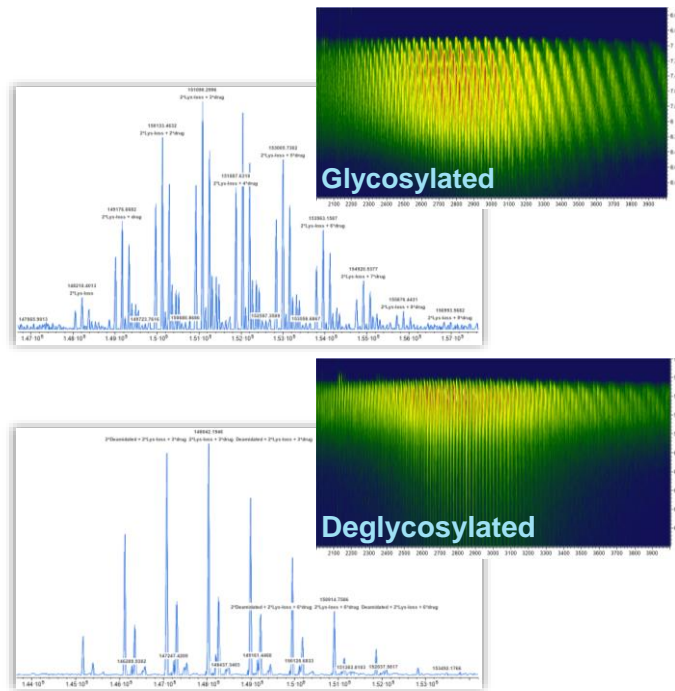
抗体藥物複合体

抗体薬物複合体: 全タンパク質

フォーカス: 単一の標的タンパク質。
着目した副産物はありません。

推奨する初期設定:

サンプルタイプ:	抗体薬物複合体: 変性
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (可視化およびレポートの場合)。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹	すべての ADC 信号を含む単一の RT 範囲を手動で入力します。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50 (使用する分解能力によります)。
Glycosylation ²	ライブラリの選択により、 Deglycosylated または Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Connected. Connectivity: IgG (該当する場合。該当しない場合は指定します)。
Conjugates ²	複合体の名前と質量を指定します。
Other notes	<i>Review Results:</i> 薬物抗体比 (DAR) の正しい算出を可能にするために、冗長なアノテーションを削除します。

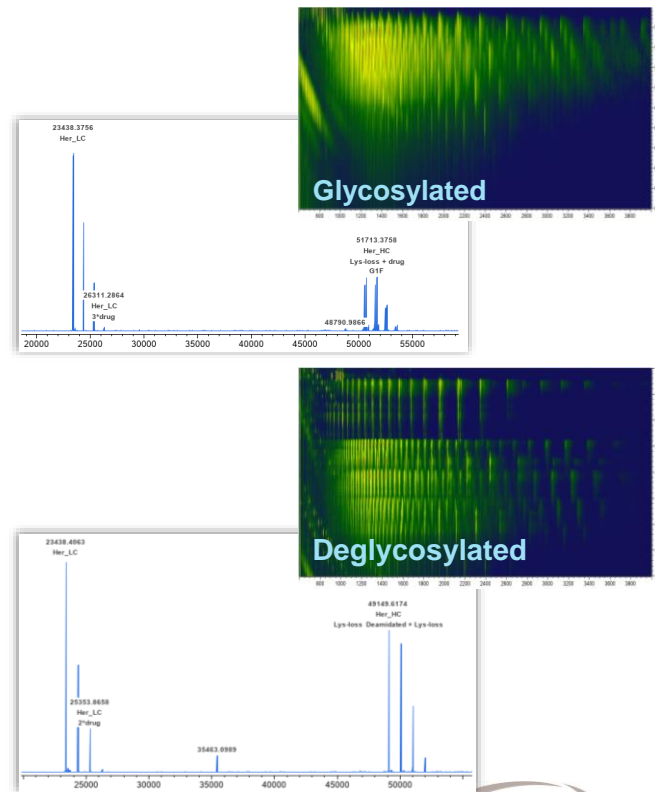


抗体薬物複合体: サブユニット

フォーカス: 還元抗体薬物複合体。

推奨する初期設定:

サンプルタイプ:	抗体薬物複合体: 変性および還元
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	10 kDa - 60 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (可視化およびレポートの場合)。
Mass step (Da) ¹	1 - 2
RT Ranges ¹	すべての ADC 信号を含む単一の RT 範囲を手動で入力します。
Mass Tolerance (ppm) ²	10 - 20 (使用する分解能力によります)。
Glycosylation ²	ライブラリの選択により、 Deglycosylated または Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Reduced
Conjugates ²	複合体の名前と質量を指定します。
Other notes	<i>Review Results:</i> 薬物抗体比 (DAR) の正しい算出を可能にするために、冗長なアノテーションを削除します。



サブユニット解析

サブユニット解析

フォーカス: 重鎖と軽鎖。

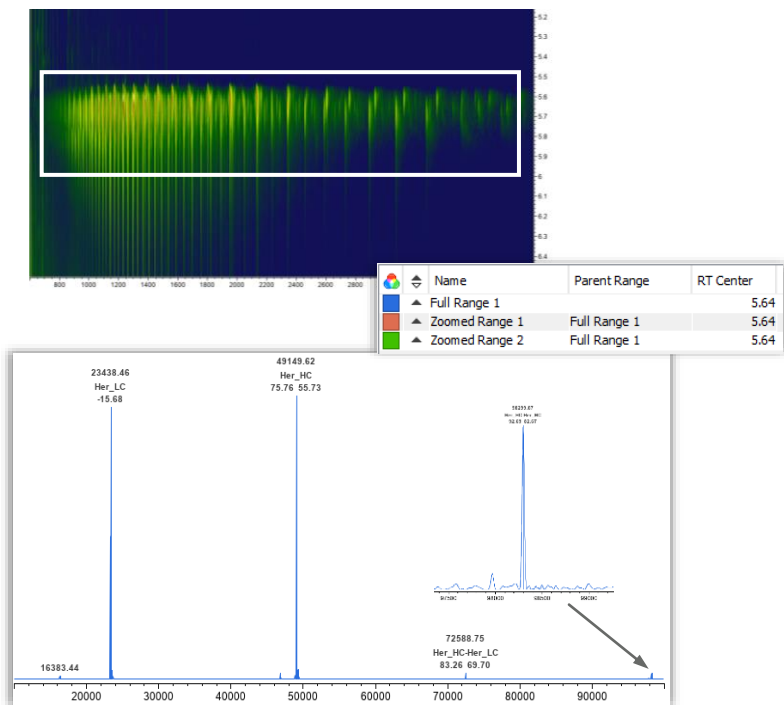
推奨する初期設定:

サンプルタイプ:	HC と LC に還元されたタンパク質
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution Intact_TimeResolvedDeconvolution (複雑な修飾があるフラグメントの場合)。
Deconvolution range ¹	20 kDa - 60 kDa または 20 kDa - 110 kDa で部分的に接続されたサブユニットを識別します。 Visible Ranges: All Ranges (特にサブユニットが分離されていない場合)。
Mass step (Da) ¹	1 - 2
RT Ranges ¹ (TRD では無視します)	RT Window: 3 - 9 Isolation Threshold: 3 - 10 (成分間の分離によります)。 または、連続性の高い多くのピークの全範囲を手動で入力します。
Mass Tolerance (ppm) ²	10 - 20 (キャリブレーションの精度による)。
Glycosylation ²	ライブラリの選択により、 Deglycosylated または Glycosylated 。
Disulfide ²	サブユニットを分離 - State: Fully Reduced 。 部分的に接続されたサブユニット - State: Partially Reduced, Connectivity: IgG 。 オプション: 還元鎖間結合の探索。

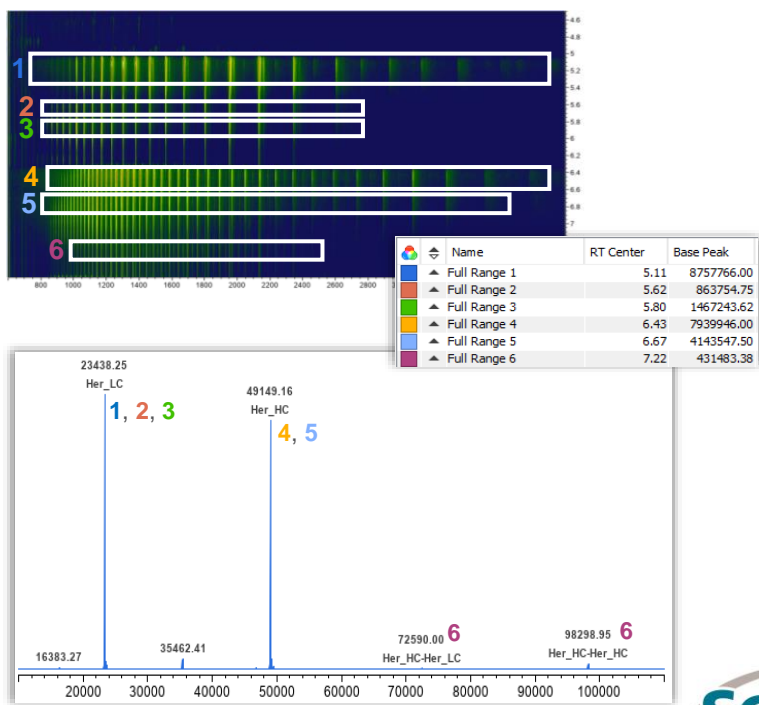
サブユニット解析

フォーカス: 重鎖と軽鎖。

完全還元



部分接続



フラグメント解析

フラグメント解析

フォーカス: IdeS 消化タンパク質をさらに還元した場合、またはしない場合。

推奨する初期設定:

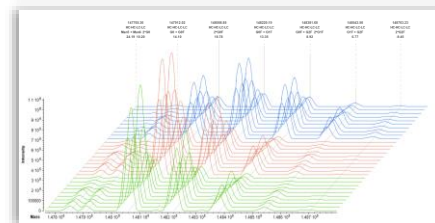
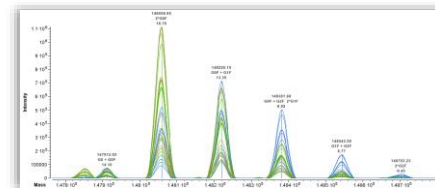
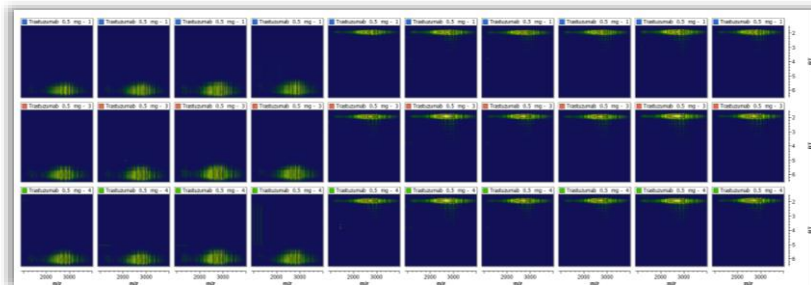
サンプルタイプ:	F(ab') ₂ および ScFc、または LC、Fd' および ScFc
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution Intact_TimeResolvedDeconvolution (複雑な修飾があるフラグメントの場合)。
Deconvolution range ¹	20 kDa - 110 kDa または 20 kDa - 30 kDa (還元フラグメント使用) Visible Ranges: Only Zoomed Ranges または All Ranges を使用することで、より良く可視化できます (フラグメントが共溶出している場合も)。
Mass step (Da) ¹	1 - 2
RT Ranges ¹ (TRD では無視します)	RT Window: 3 - 9 Isolation Threshold: 3 - 10
Mass Tolerance (ppm) ²	10 - 20 (キャリブレーションの精度による)。
Glycosylation ²	ライブラリの選択により、 Deglycosylated または Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Connected. Connectivity: Unspecified + 3 Additional chains. Free Cysteines (対になっていないシステインの場合)。 State: Fully Reduced (還元フラグメントの場合)。
配列	各フラグメント配列 (Fc/2、LC、および Fd') が別々にリストアップされている必要があります。

同等性試験 または 希釈系列

同等性試験

推奨する初期設定:

サンプルタイプ:	全タンパク質
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (可視化およびレポートの場合)。
Mass step (Da)¹	2
RT Ranges¹	すべての標的タンパク質信号を含む単一の RT 範囲を手動で入力します。
Mass Tolerance (ppm)²	20 - 50 (使用する分解能力によります)。
Glycosylation²	ライブラリの選択により、 Deglycosylated または Glycosylated 。
Disulfide²	State: Fully Connected. Connectivity: IgG (該当する場合。該当しない場合は指定します)。
Notes	一貫したピークアノテーションと定量化のために、レビュー結果からライブラリを作成し、 <i>Targeted Mass Search</i> に使用します。



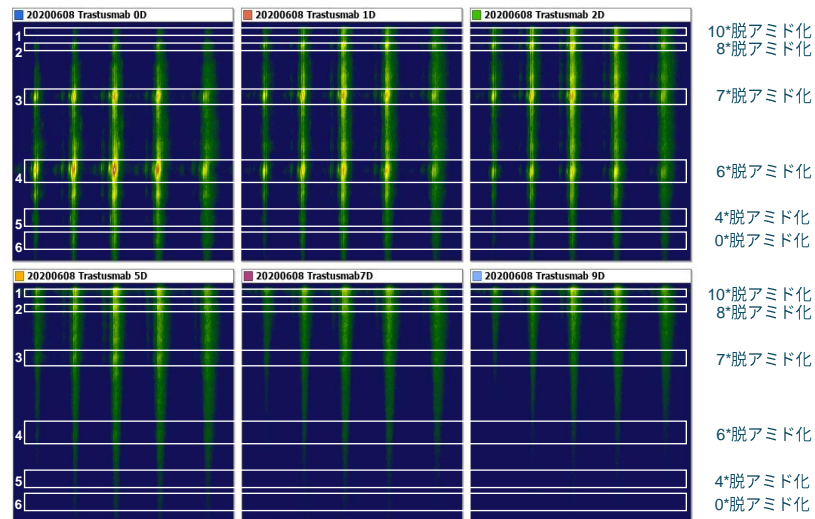
- 参照モノクローナル抗体
- バイオシミラー 1
- バイオシミラー 2

ストレステスト

ストレステスト

推奨する初期設定:

サンプルタイプ:	全タンパク質
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges (可視化およびレポートの場合)。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹	すべてのサンプルで共通のピークを検出し、意味のある相対定量を行うために、すべての RT 範囲を手動で入力します。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50 (使用する分解能力によります)。
Glycosylation ²	ライブラリの選択により、 Deglycosylated または Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Connected. Connectivity: IgG (該当する場合。該当しない場合は指定します)。
Notes	一貫したピークアノテーションと定量化のために、レビュー結果からライブラリを作成し、 <i>Targeted Mass Search</i> に使用します。





The Power of Precision

詳細な情報については、
SCIEX Web サイト
(sciex.com) を参照するか、
以下の連絡先までお問い合わせ
してください:

sciex.com/contact-us

sciex.com/request-support



商標 / ライセンス

SCIEX の臨床検査薬ポートフォリオは、体外診断用です。要処方。製品は一部の国では入手できません。入手方法については、最寄りの営業担当者にお問い合わせいただくか、または <https://sciex.com/diagnostics> を参照してください。その他の製品は、研究用にのみ使用できます。診断目的での使用はできません。

本書に記載されている商標または登録商標は、関連するロゴを含め、米国またはその他の特定の国の AB Sciex Pte.Ltd. または各所有者の財産です (sciex.com/trademarks を参照してください)。

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