



ペプチドマッピング

Biologics Explorer 2.0 クイックガイド

Genedata Expressionist® のテクノロジーを搭載



ペプチドマッピング: 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) ペプチドマッピングワークフローの一般的なガイドライン

パート B: 特異的なワークフローとアプリケーション

- 1) 特異的なペプチドのマッピングワークフローのガイドライン:
 - Pepmap_Simple
 - Pepmap_Extended
 - Pepmap_Comparative
 - Pepmap_ReviewSnapshots

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



ペプチドマッピング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、主に酵素分解されたバイオ医薬品用分子のペプチドマッピング分析用に設計されています。
 - 配列の網羅性と確認
 - 糖ペプチド分析
 - 翻訳後修飾(PTM)の分析
 - 標的 PTM のプロファイリング
 - ジスルフィド結合 (DSB) の分析
 - 共役分析
 - 配列バリエーション分析 (SVA)
- 同一分子の複製サンプルに対するバッチ分析が可能です。
 - 詳細な特性解析
 - 複数サンプルの比較: プロセス開発、装置メソッド開発
 - ストレステスト
 - 還元サンプルと非還元サンプルの比較

パート A

ソフトウェアとワークフロー

2. BIOLOGICS EXPLORER の使い方



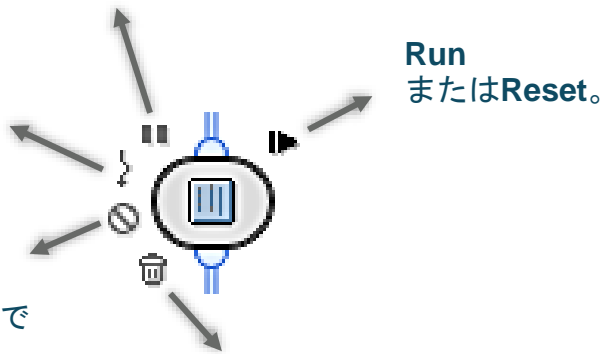
Biologics Explorer の使い方

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

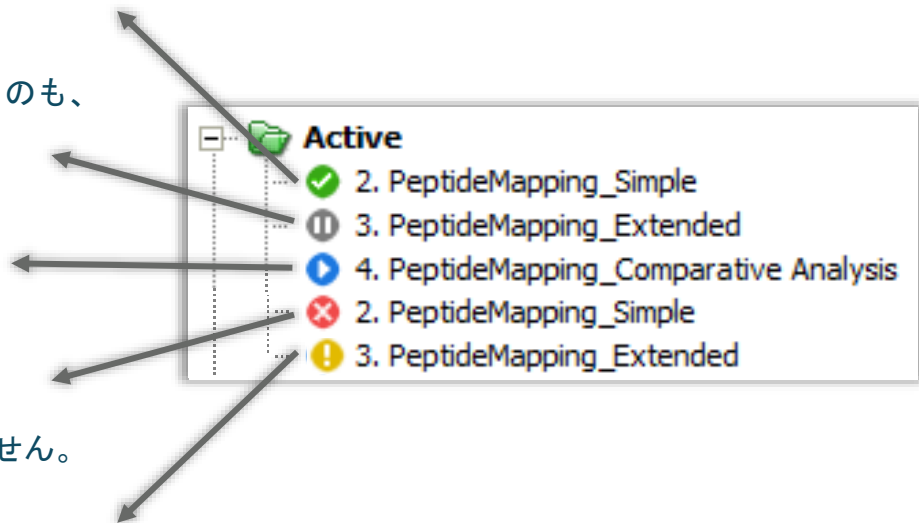
完了したアクティビティノードはありません。
ワークフローを開始する準備ができています。

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。

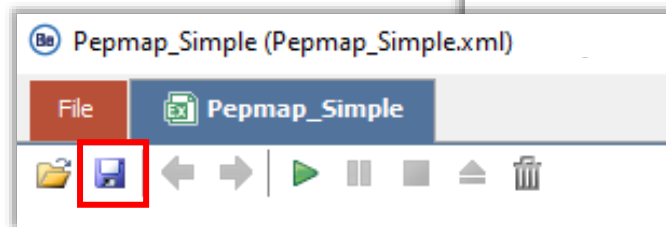
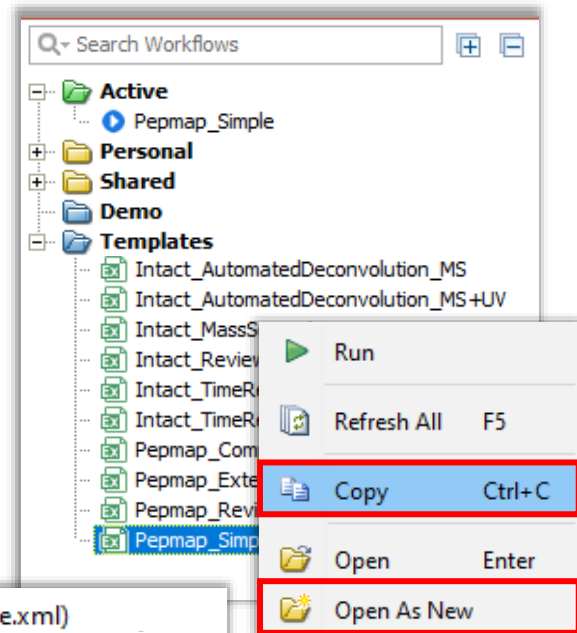


Biologics Explorer の使い方: 一般的な概要

ワークフローの開始と保存

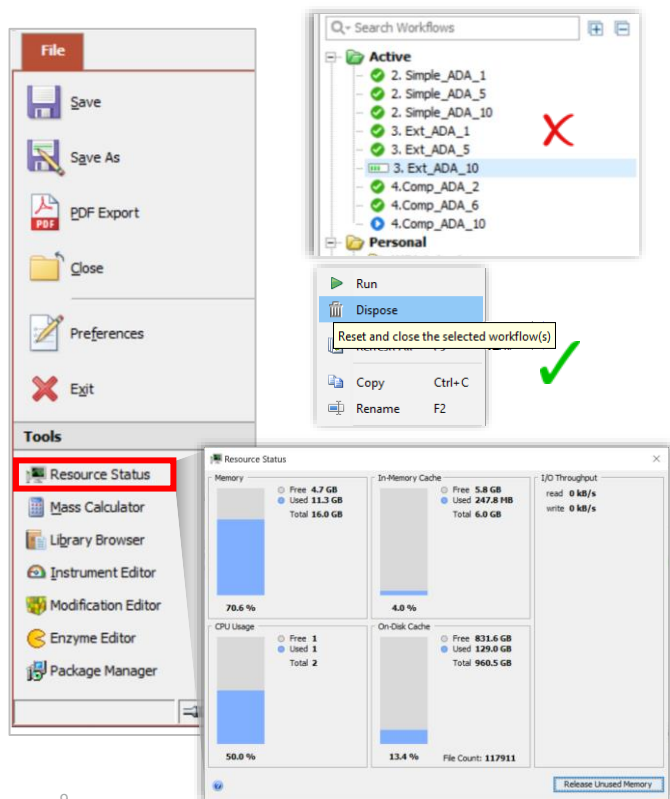
ワークフローを開くには、次のいずれかを実行します。

- 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: 一般的な概要

リソースの正しい使い方に関する推奨事項

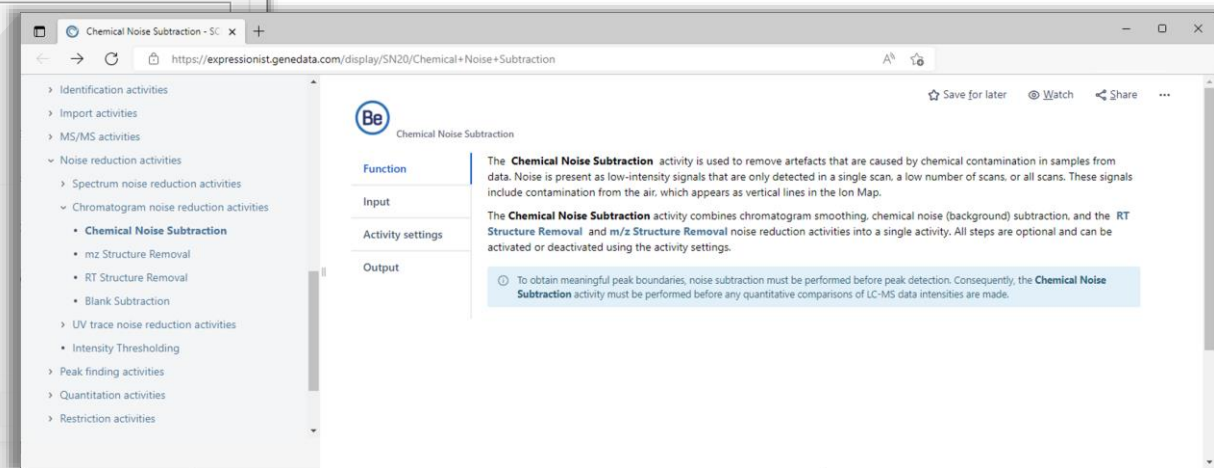
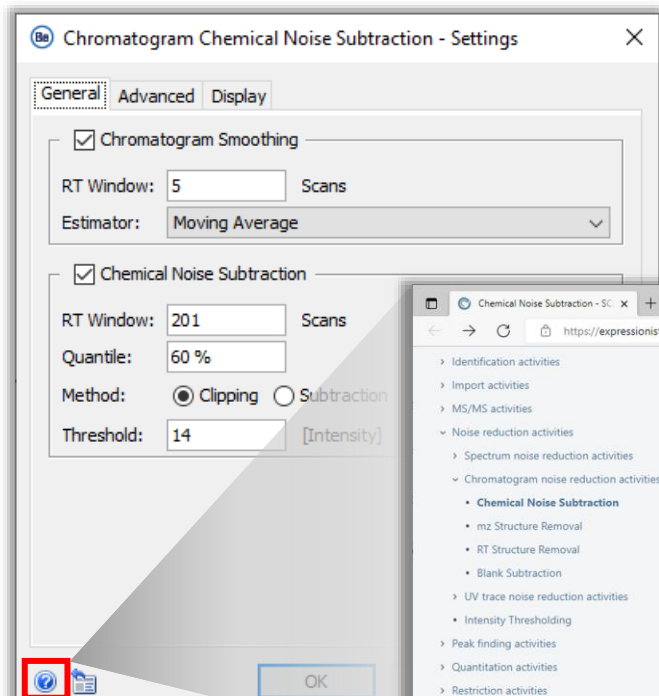


- ベストプラクティスに従って、Biologics Explorer に十分なメモリと計算能力があることを確認します。
 - 一度に実行するワークフローは1つだけにしてください。一部のアクティビティノードは非常に多くのリソースを消費します。コプロセッシングによって、利用可能なリソースがすべて使い果たされてしまう恐れがあります。
 - メモリを節約するため、最適化されたワークフローでは、可能な限りごみ箱アイコンを有効にしておきます。
 - データを確認し、結果を保存した後、新たな分析を開始する前に、ワークフローをリセットまたは破棄します。
 - *Save Snapshot* アクティビティノードを使用すると、完了した結果を保存したり、*Pepmap_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。
 - ペプチドマッピングワークフローで処理するファイルは、4 GB を超えないようにしてください。

Biologics Explorer の使い方: 一般的な概要

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

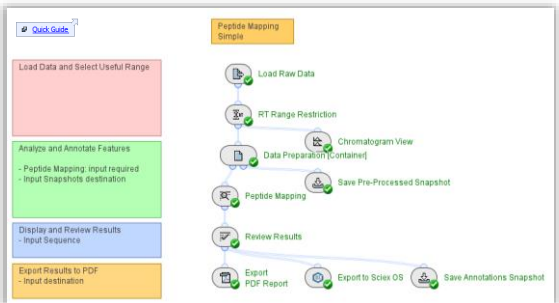
ソフトウェアとワークフロー

3. ペプチドマッピングワークフローの一般的なガイドライン

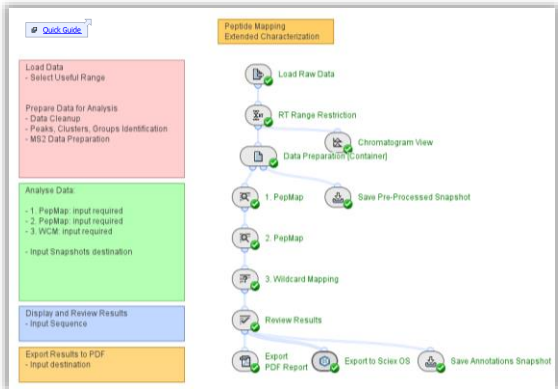


一般的なペプチドマッピングワークフローのガイドライン

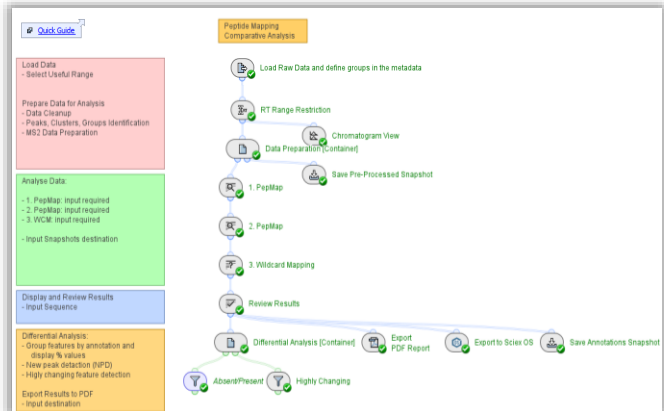
ワークフローの種類



Pepmap_Simple



Pepmap_Extended



Pepmap_Comparative



Pepmap_ReviewSnapshots

一般的なペプチドマッピングワークフローのガイドライン

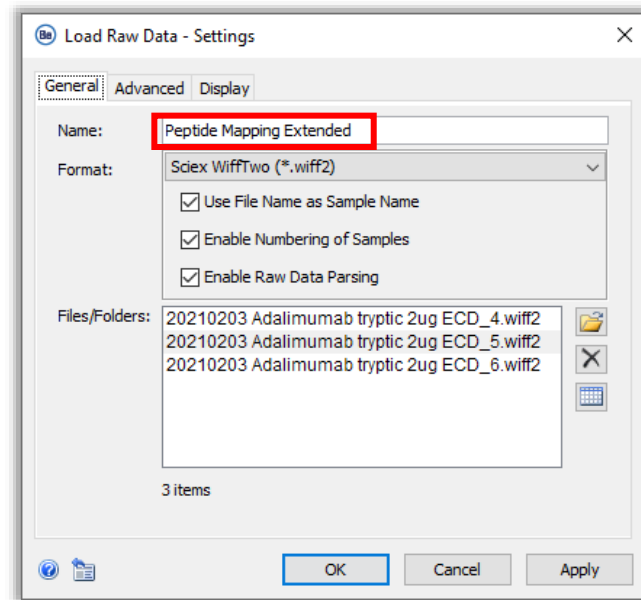
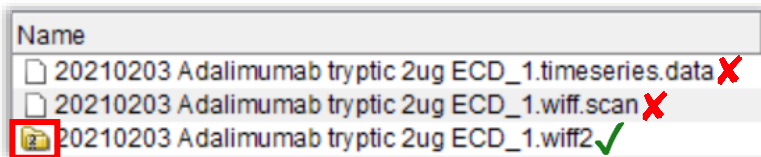
ペプチドマッピングワークフローの共通アクティビティノード

- A. *Load Raw Data*
- B. *RT Range Restriction*
- C. *Chromatogram View*
- D. *Data Preparation [Container]*
 - i. *Chromatogram Chemical Noise Subtraction*
 - ii. *Chromatogram RT Alignment*
 - iii. *Chromatogram Peak Detection*
 - iv. *Chromatogram Isotope Clustering*
 - v. *Singleton Filter*
 - vi. *Charge and Adduct Grouping*
 - vii. *MS/MS Consolidation*
 - viii. *MS/MS Peak Detection*
 - ix. *MS/MS Deisotoping*
- E. *Peptide Mapping*
- F. *Review Results*
- G. レポートとエクスポート

Load Raw Data: 分析名とデータファイルの追加

General タブ。

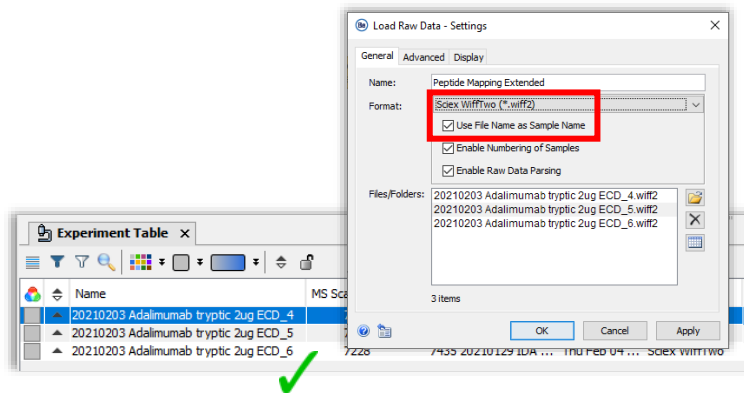
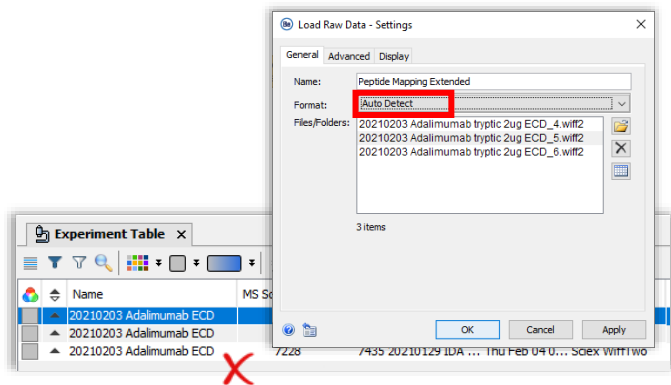
- **Name** フィールドに入力して、分析を定義します。
- 生データファイル をアップロードします。📁
 - wiff または wiff2 コンテナファイルのみを選択します。
 - ZenoTOF 7600 システムからのデータを分析する場合は、wiff ファイルではなく、wiff2 ファイルのみを使用してください。
 - 同じ名前の補助ファイルを選択しないでください。



- wiff1 または wiff2 コンテナ内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て開きます。
 - 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 Raw Data: フォーマット

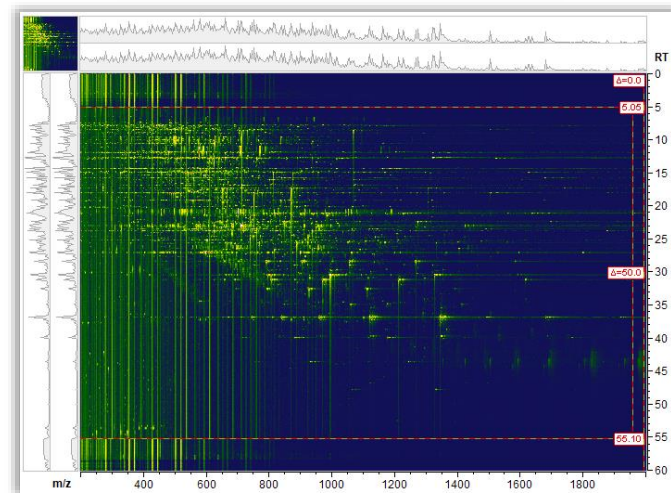
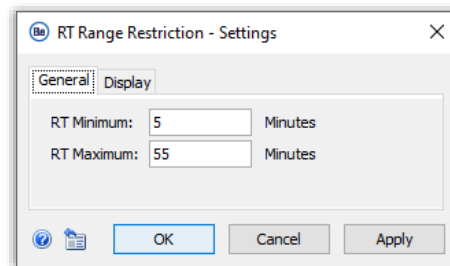
- wiff または wiff2 コンテナ内の個々のサンプルファイルが同じ名前である場合は、**Auto Detect** オプションを使用しないでください。
- Experiment Table* に固有のサンプル名が存在し、*Review Results* に各サンプルの正しい定量情報が表示されることを確認するには、以下の手順に従います。
 - Format** ドロップダウンリストで、**Sciex Wiff** または **Sciex WiffTwo** のいずれかを選択します。
 - ZenoTOF 7600システムで取得したデータには wiff2 のみを使用します。
 - Use File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



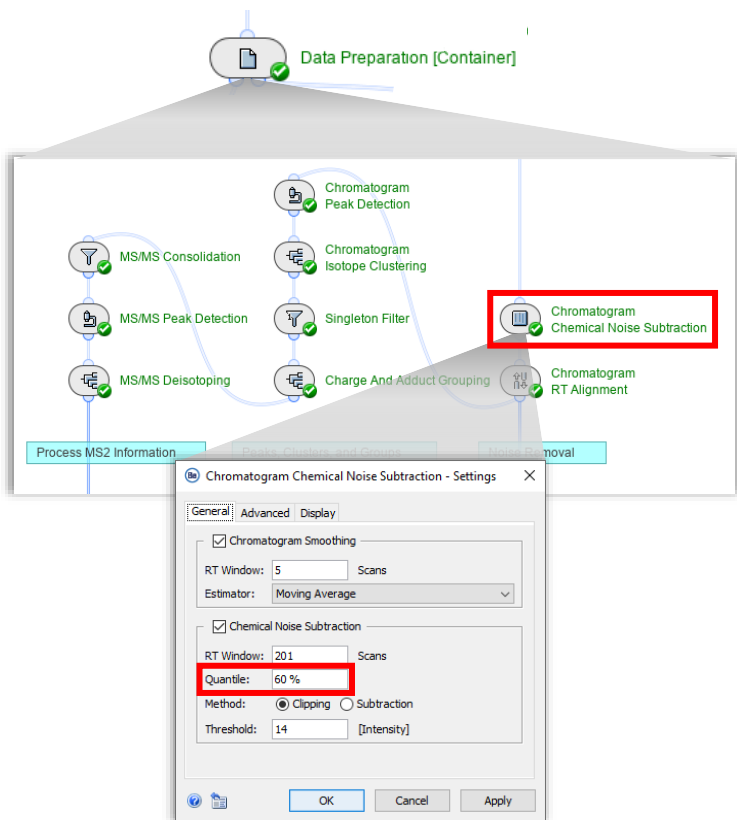
RT 範囲の制限

- *Load Raw 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）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。

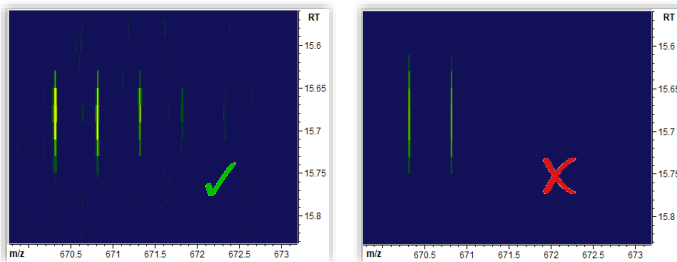
注: フィールドが空白の場合は、RT の全範囲が使用されます。



Data Preparation: 化学ノイズの減算 - 分位数



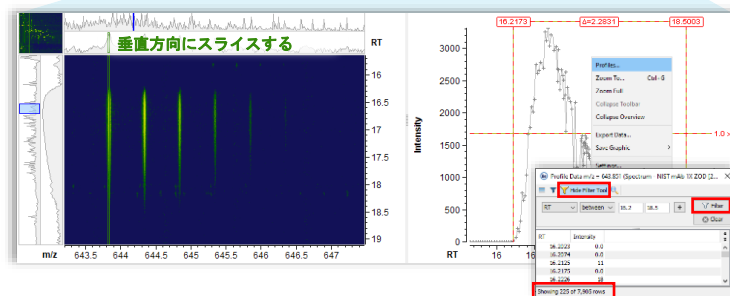
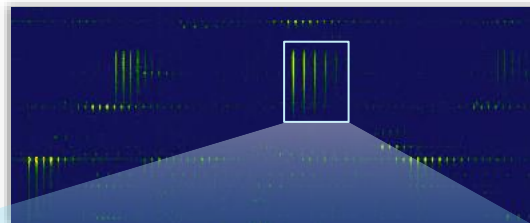
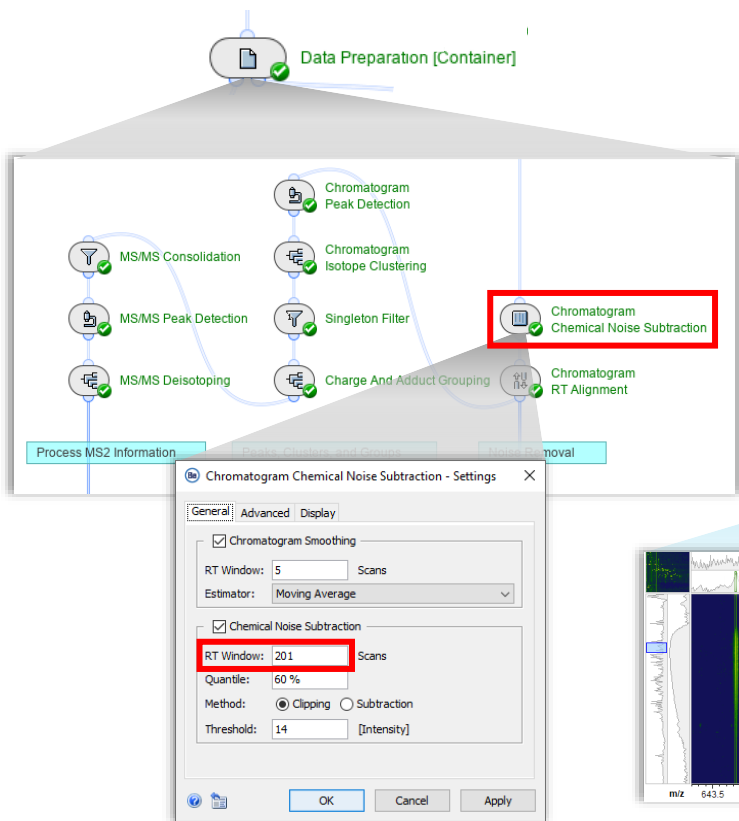
- デフォルトのノイズ除去が厳しすぎる場合のみ、この設定を変更します。その識別基準は次のとおりです。
- 一重 (+1) または二重 (+2) 荷電クラスターからの低強度同位体ピーク、または目的の低強度クラスターからの低強度同位体ピークの消失。
- 非常に広い (拡張 RT) ピークのテールの過剰なカットオフ。



- 目的のクラスターが影響を受けたり、上記のような不要なピークの修飾が頻繁に現れたりする場合は、**Quantile** を 50% などの低い値に設定してください。

Data Preparation: 化学ノイズの減算 - RT Window

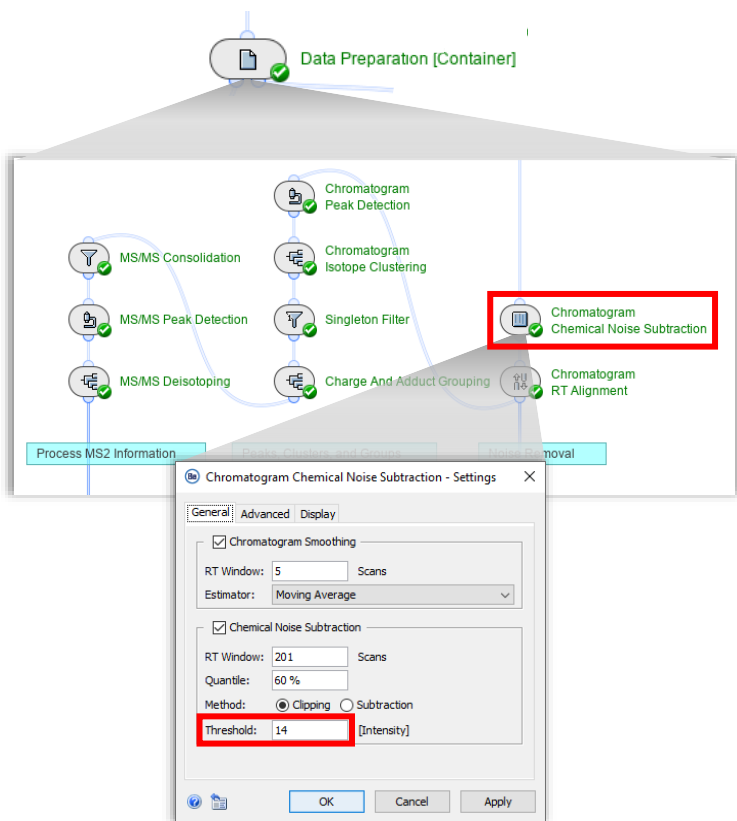
- データセット内の最大のピークが 50 スキャン未満の場合は、**RT Window** を小さくします（たとえば 101 スキャンまたは 151 スキャンにします）。
 - 経験則上、**RT Window** はデータセットの最大ピークを横切るスキャン数の少なくとも 2 倍であるべきです。



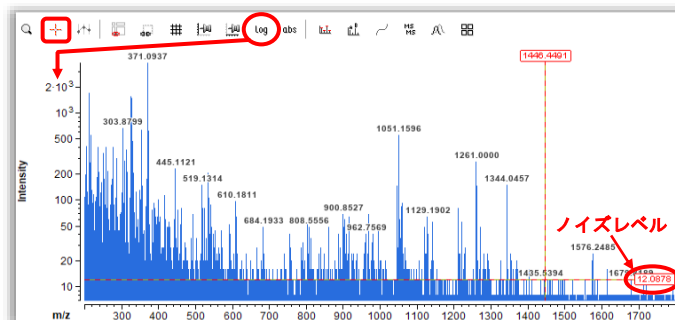
スキャン回数を決定する手順は以下のとおりです。

- イオンマップの中で、他の機能よりも長い RT で伸びている機能の位置を確認します。
- 垂直方向にスライスして、抽出イオンクロマトグラムを生成します。
- 抽出イオンクロマトグラムのウィンドウで右クリックし、**Profiles** を選択します。
- Advanced Filter Tool**  を使用して、ピークの RT 範囲を選択します。

Data Preparation: 化学ノイズの減算 - しきい値

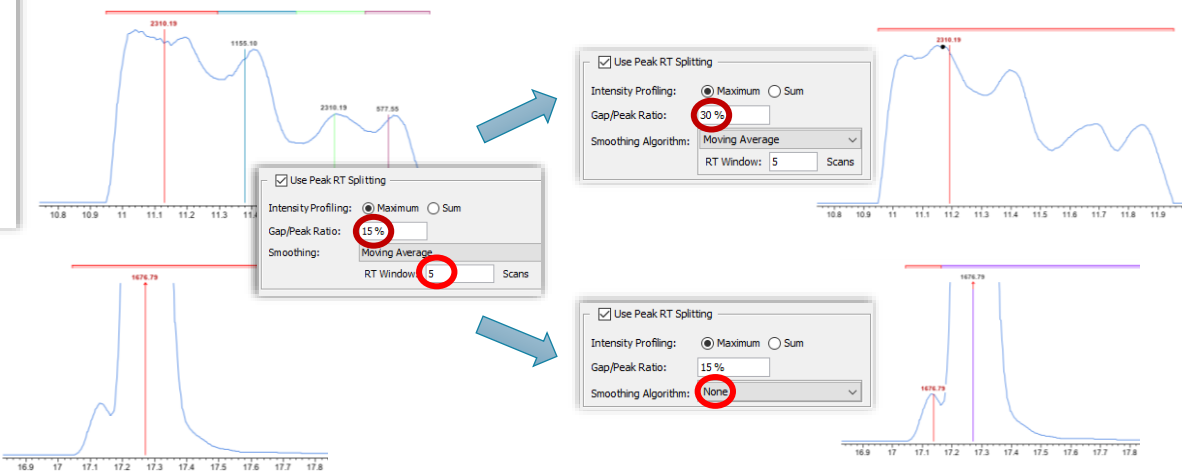
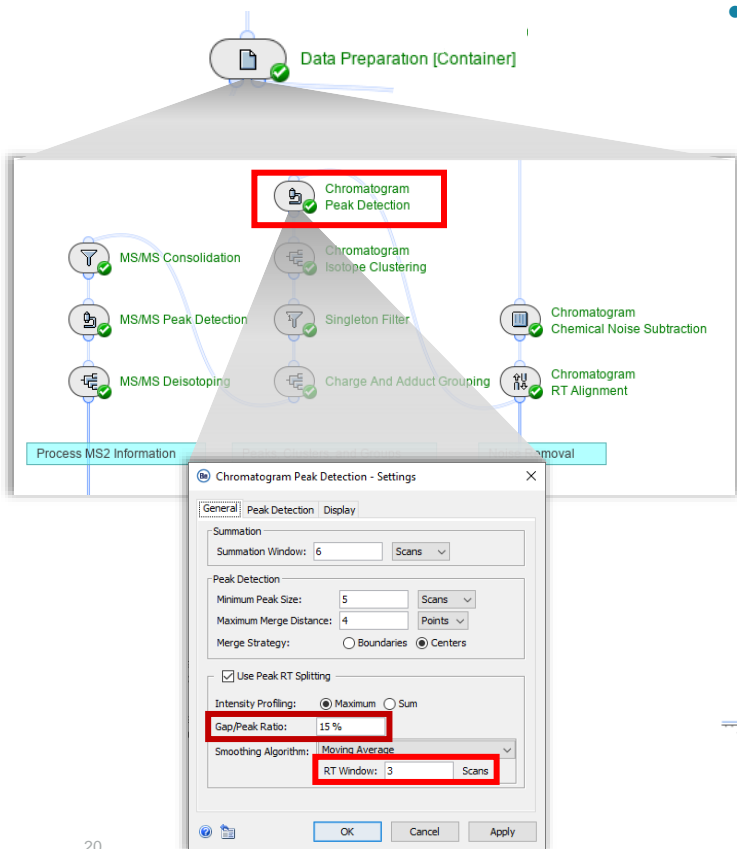


- ノイズレベルが *Chromatogram Chemical Noise Subtraction* アクティビティで事前に設定した **Threshold** 値と大きく異なる場合は、この設定を変更します。
- ノイズレベルを測定し、適切な **Threshold** 強度値を決定する手順は、次のとおりです。
 - 質量スペクトルの強度軸を、ノイズレベルが読めるようになるまでドラッグして拡大するか、ツールバーのアイコンで軸をリニアから対数スケールに変更します。
 - 十字キーツール \pm でノイズレベルの強度を測定します。

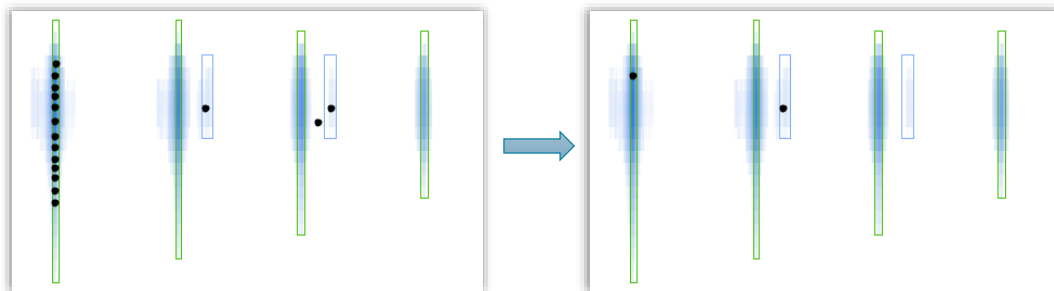
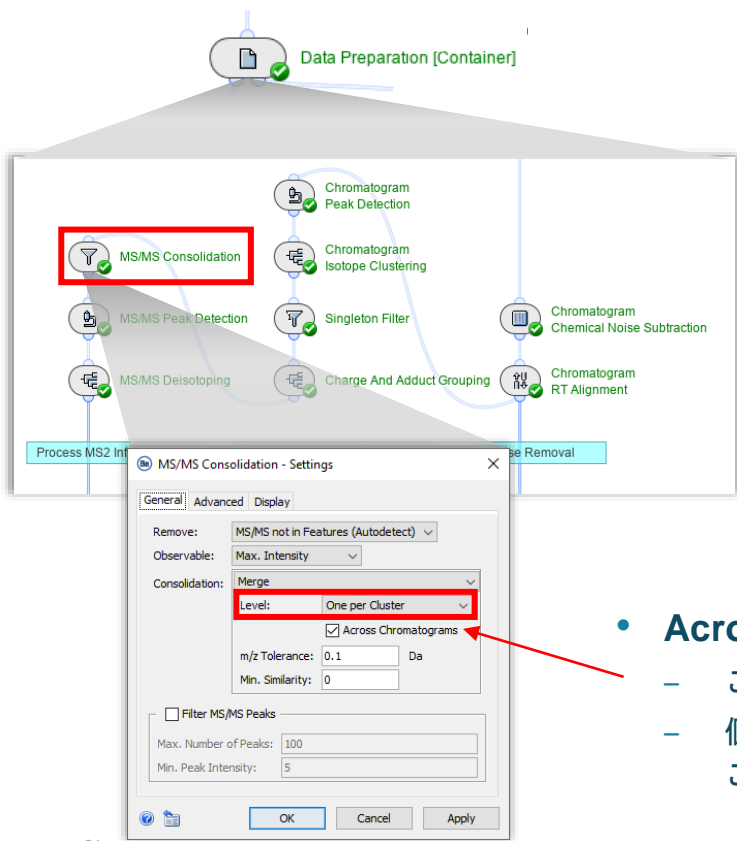


Data Preparation: Chromatogram Peak Detection

- RT 方向の近くの溶出成分のピークスプリットは、必要に応じて修飾できます。
 - スプリットを減らすには、**Gap/Peak Ratio** を大きくします。
 - スプリットの感度を上げるには、**Smoothing** を減らすか、または削除します。



Data Preparation: MS/MS Consolidation

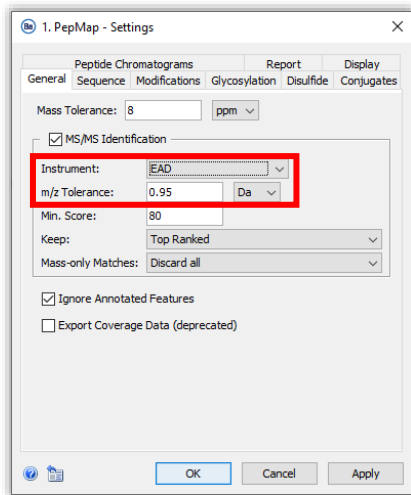


- このアクティビティノードは、等価なピークとクラスターにまたがる MS/MS データをマージします。

 - Consolidation により、MS/MS スペクトルが改善され、より多くの同定が可能になります。
 - MS/MS スペクトルが曖昧すぎる場合は、Consolidation によって偽陽性を減らすことができます。
- Across Chromatograms** をマージするオプションがあります。

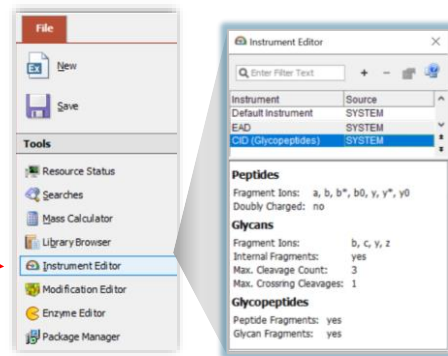
 - これにより、テクニカルレプリケートでの同定に対する信頼性が向上します。
 - 個々のサンプルの配列の網羅性を評価する場合は、このオプションを使用しないでください。

Peptide Mapping: 設定を行う (1)



General タブ:

- **Instrument:** 特異的な実験準備に応じて選択します。
 - レビューまたは修飾するには、**File > Tools > Instrument Editor** に移動します。



m/z Tolerance:

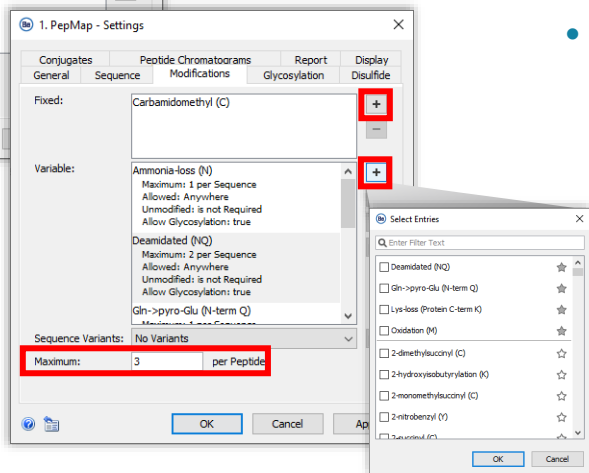
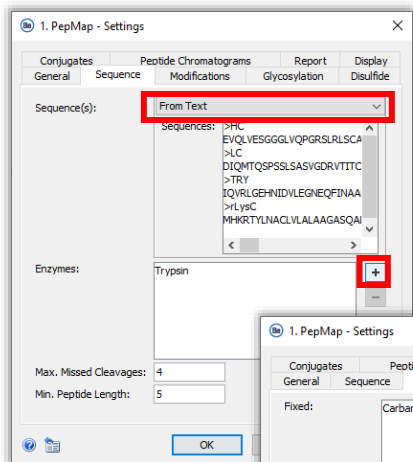
- デフォルト値 (0.95 Da) は、MS の質量精度を反映したものではありません。MS/MS の前処理が m/z に与える潜在的な影響を緩和するために、同定のために可能な選択肢を増やしてくれます。
 - ZenoTOF 7600 システムを使用して生成したデータを分析する場合は、**m/z Tolerance** を 20 ppm に下げます。**m/z Tolerance** は、他の MS システムを使用して生成したデータを分析する場合も 20 ppm に下げることができます。
 - **m/z Tolerance** を下げると、偽陽性や曖昧なアノテーションの生成数が制限されます。
- たとえば、データの誤差分布が広い場合など、必要に応じてデフォルト値を大きくすることができます。

Peptide Mapping: 設定を行う (2)



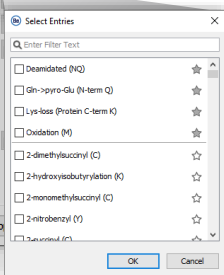
Sequence タブ:

- **Sequence(s):** テキストとして貼り付けるか、FASTA ファイルとしてアップロードします。
 - 酵素の特異性、欠落した開裂の最大数、最小ペプチド長は必要に応じて調整できます。
- **Enzymes:** システムが設定した酵素とユーザー定義酵素のリストを表示するには、右の + を使用して **Select Entries** ダイアログを開きます。

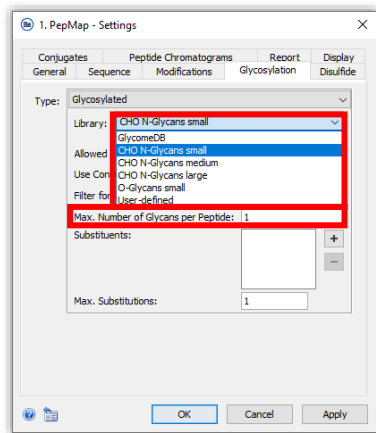


Modifications タブ:

- 右の + を使用して **Select Entries** ダイアログを開くと、**Fixed** または **Variable** 修飾の候補リストが表示されます。
 - よく使用する修飾は、星のアイコンを選択するとお気に入りに追加できます。
 - アルキル化の過不足を分析するには、システインなどの標的アミノ酸に対して **Variable** にアルキル化試薬を設定します。

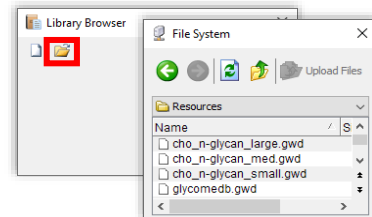


Peptide Mapping: 設定を行う (3)



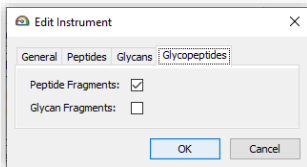
Glycosylation タブ:

- **Library:** システムが設定したライブラリ、またはユーザー定義のライブラリを選択します。
 - 糖鎖ライブラリをレビューまたは修飾するには、**File > Tools > Library Browser > Resources** に移動します。
- **Max. Number of Glycans per Peptide :** 検索を進めるために許可される推定糖ペプチド候補数のしきい値があります（詳細は次頁を参照）。
 - **Allowed Sites: Only N-linked:** 一般に、ペプチドあたりのコンセンサス配列の候補は少ないので、*N*-糖鎖付加の探索は一般に探索条件に対してトレランスが高くなります。
 - *N*-結合型糖鎖は 1 ペプチドあたり最大 4 個まで許容されます。
 - 欠落した開裂や可変修飾の数は探索時間に影響を与えます。
 - **Allowed Sites: Only O-linked:** すべてのセリンとスレオニン（S と T）残基は *O*-糖鎖付加の候補部位です。
 - 多くの糖鎖付加部位を含む長いペプチドは、推定糖ペプチド候補数とその後の処理時間に大きな影響を与えます。
 - たとえば、RP/KP で開裂が制限されないようにトリプシン/P を設定するなど、短いペプチドになる酵素を使用すると、探索時間を短縮し、候補の総数を制限するのに役立ちます。



注: **Edit Instrument** の設定で、糖ペプチドの **Glycan Fragments** を無効にすると、複雑な糖鎖探索に必要な時間が短縮されます。

CID モードで取得したデータについては、**Glycan Fragments** を有効にすることが推奨されます。



Peptide Mapping: 設定を行う (4)

トリプシンで消化したエタネルセプトの O-結合型糖鎖に対して許容される探索の組み合わせの例:

Enzyme: トリプシン
Missed cleavages: 1

Glycans/ peptide	Size of glycan library				
	3	4	5	6	7
3	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✗
5	✓	✓	✗	✗	✗
6	✗	✗	✗	✗	✗
7	✗	✗	✗	✗	✗

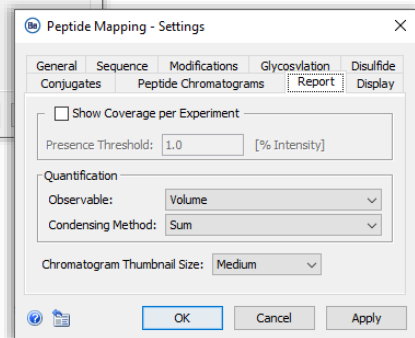
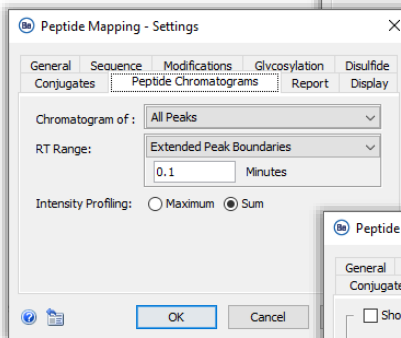
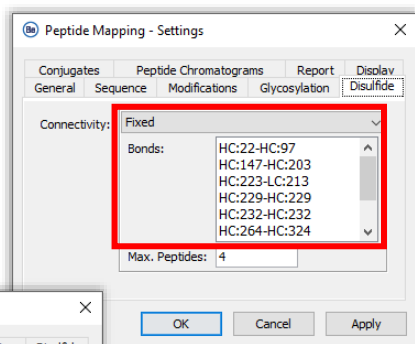
Enzyme: トリプシン /P
Missed cleavages: 0

Glycans/ peptide	Size of glycan library				
	3	4	5	6	7
3	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✗
6	✓	✓	✓	✗	✗
7	✓	✓	✓	✗	✗

Glycosylation タブ:

- さまざまな要素を組み合わせで推定糖ペプチド候補数を算出し、探索を進めるかどうかを決定します。
 - 糖鎖ライブラリに含まれる糖鎖の数（置換基を含む）。
 - 目的の糖鎖を含む最小のライブラリサイズを使用します。
 - Filter for Core Structures** を選択すると、候補を限定できます。
 - ペプチドあたりの糖鎖数の最大許容値。
 - 分子で想定される値を超えないようにします。値を小さくすると、より大きなライブラリを使用でき、その逆も同様です。
 - ペプチド上の理論的な糖鎖付加部位。
 - これには、欠落した開裂の数と酵素の特異性が寄与します。
- その他の探索パラメータは、全体の探索時間に寄与します。
 - 完了までの時間を短縮するには、以下を行います。
 - Edit Instrument** の設定で **Glycan fragments** を無効にします。
 - ペプチドあたりの可変修飾とその数を最小にします。
 - ペプチドの最小長を最大にします。
 - ペプチドあたりの糖鎖数を減らします。
 - 糖鎖ライブラリのサイズを縮小します。

Peptide Mapping: 設定を行う (5)



Disulfide タブ:

- 非還元サンプルの場合: **Connectivity** を **Fixed** に設定します。たとえば HC:22-HC:97 のように、想定されるジスルフィド結合を正しい構文で指定します。
 - 鎖の名前は、**Sequence** タブで指定したものと一致している必要があります。
- 還元サンプルの場合: **Connectivity** を **None** に設定します。

Peptide Chromatograms タブ:

- これらの設定は、このアクティビティの結果を表示する際のペプチドクロマトグラムのレイアウトを制御するものであり、変更する必要はありません。

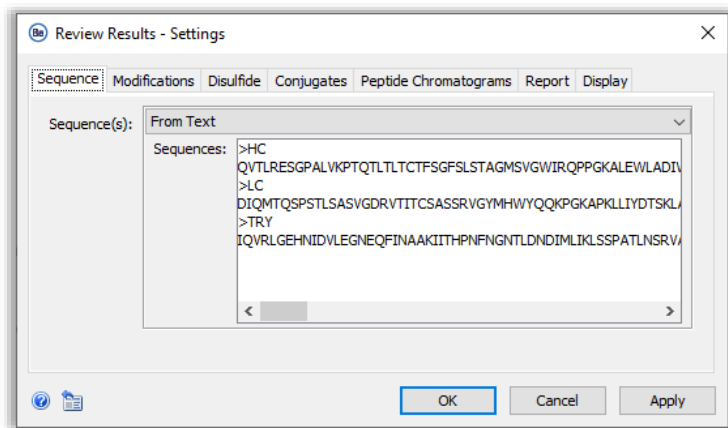
Report タブ:

- QTOF システムを使用して取得したデータについては、**Observable** に **Volume** を設定することを推奨します。

Review Results: 設定を行う



Review Results



Sequence タブ:

- **Sequence(s):** テキストとして貼り付けるか、FASTA ファイルとしてアップロードします。
 - *Peptide Mapping* アクティビティノードと *Review Results* アクティビティノードで同じ FASTA タンパク質配列を使用します。

Review Results: ペプチドマッピングの結果をレビューする



Review Results

- *Review Results* アクティビティノードを開き、直前の *Peptide Mapping* アクティビティノードと組み合わせた結果をレビューします。

The screenshot shows the SCIEX software interface with the following components:

- Peptide Map:** A sequence alignment view showing peptide sequences (DYAMH...VWR, ADSVEGR...FTISR, LAVY...CAK, SASTK...GSP) with highlighted regions.
- Fragment Spectra Viewer:** A mass spectrum plot showing Intensity vs. m/z. The x-axis ranges from 0 to 3000, and the y-axis ranges from 0 to 1500. A major peak is labeled 'Peptide' at approximately m/z 1605. Other peaks are labeled with charge states: Z1+1, Z4+2, Z1+1, Z14+1.
- Peptide Table:** A table listing identified peptides with their ranges, modifications, and calculated masses. The 'Review' button in the toolbar is circled in red. The table content is also highlighted with a red box.

✓ X	Range	Peptide	Modifications	Mod. Locations	Glycans	Calc. Mass	Fla
✓	1 HC[1-16]	EVQLVESGGGLVQPGR	Glu->pyro-Glu	[N-term E]		1605.85	
✓	2 HC[1-16]	EVQLVESGGGLVQPGR				1623.86	
✓	3 HC[1-16]	EVQLVESGGGLVQPGR	(+356.21558)	[Q3]		1980.07	✓
✓	4 HC[1-19]	EVQLVESGGGLVQGRSLR	Glu->pyro-Glu	[N-term E]		1962.06	
✓	5 HC[1-19]	EVQLVESGGGLVQGRSLR				1980.08	
✓	6 HC[1-38]	EVQLVESGGGLVQGRSLRSLCAASGFTDDYAMHWVR	Carbamidom...	[C22]		4195.04	
✗	7 HC[1-38]	EVQLVESGGGLVQGRSLRSLCAASGFTDDYAMHWVR	Carbamidom...	[C22] [M34]		4211.03	
✓	8 HC[1-43]	EVQLVESGGGLVQGRSLRSLCAASGFTDDYAMHWVRQ...	Carbamidom...	[C22]		4676.3	

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、ペプチドの数量が自動的に再計算されます。

Review Results: 異性体の識別



Review Results

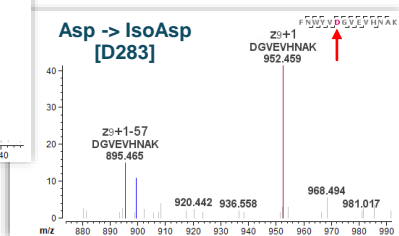
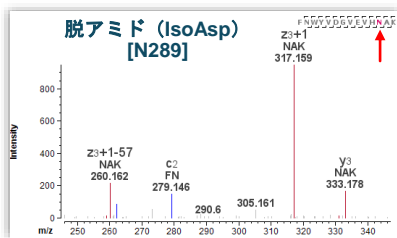
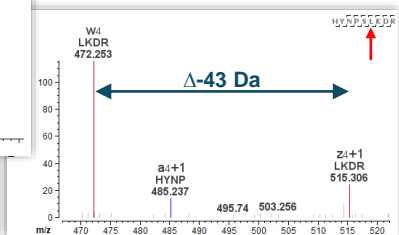
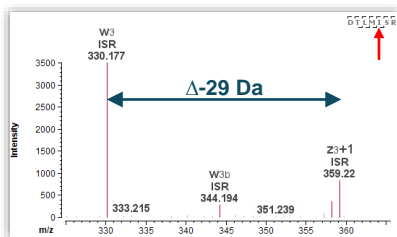
- EAD を使用した MS/MS 分析では、診断用の内部フラグメントイオンが生成され、アミノ酸残基の異性体識別が可能になります。

- ロイシン (Leu) またはイソロイシン (Ile) の存在は、以下のようにして確認します。

- イオンは MS/MS スペクトルで w_n または w_{nb} とアノテーションされています。
- ロイシン: 対応する $z+1$ イオンから 43 Da の質量シフトをした w_n イオン。
- イソロイシン: 対応する $z+1$ イオンから 29 Da の質量シフトをした w_n イオン。

- アスパラギン酸 (Asp) またはイソアスパラギン酸 (IsoAsp) の存在は、以下のようにして確認します。

- イオンは MS/MS スペクトルで c_n+57 または z_m+1-57 とアノテーションされています。
- MSMS スペクトルでアノテーションされた c_n+57 または z_m+1-57 イオンは、イソアスパラギン酸の存在を意味します。
- アスパラギン酸は、ペプチド骨格にメチレン基がないため、これらの診断用内部フラグメントイオンを生成しません。



注: 最適な結果を得るためには、*Peptide Mapping* アクティビティノードで <20 ppm の *m/z Tolerance* を使用してください。

Review Results: 異性体の識別 (環化と脱アミド化)



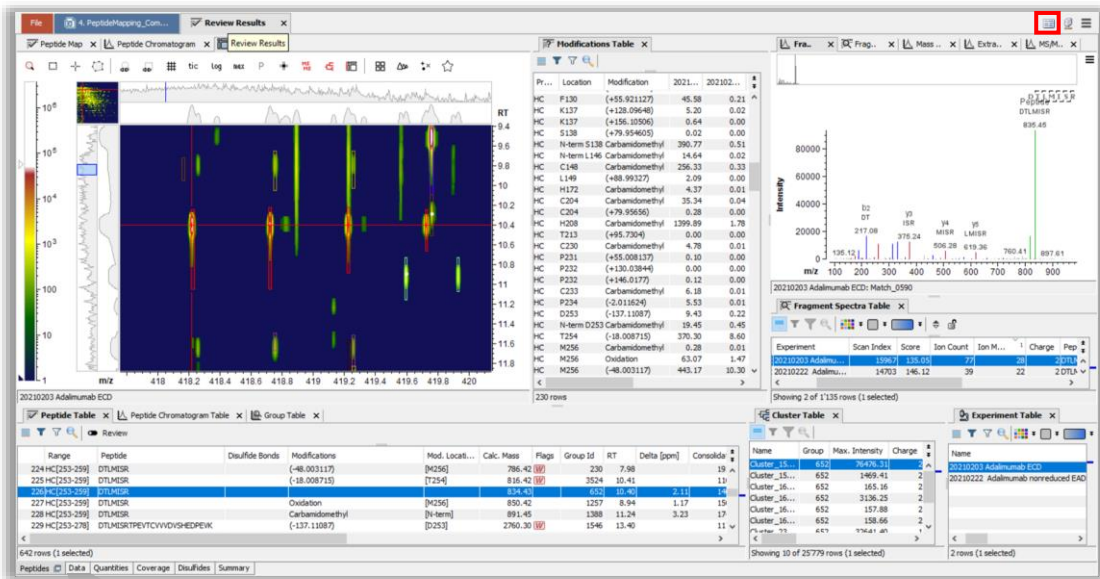
Review Results


✓ X	Range	Peptide	Disulfide Bonds	Modifications	Mod. Locat...
	39 TRY[45-54]	LSSPATLNSR			
	40 TRY[55-62]	VATVSLPR			
	10 HC[278-291]	FNWYVDGVEVHNAK		Asp->IsoAsp	[D283]
	29 HC[413-419]	LTVDKSR		Asp->IsoAsp	[D416]
	32 LC[45-52]	LLIYDTSK		Asp->IsoAsp	[D49]
	8 HC[259-277...]	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK=VSVLTVLHQDWLNGKEYKCK	HC:264->HC:324	Deamidated	[N318]
	12 HC[278-291]	FNWYVDGVEVHNAK		Deamidated	[N289]
	11 HC[278-291]	FNWYVDGVEVHNAK		Deamidated (IsoAsp)	[N279]
	13 HC[278-291]	FNWYVDGVEVHNAK		Deamidated (IsoAsp)	[N289]
	17 HC[305-320]	VSVLTVLHQDWLNGK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	18 HC[305-320]	VSVLTVLHQDWLNGK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	20 HC[305-323]	VSVLTVLHQDWLNGKEYK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	21 HC[305-323]	VSVLTVLHQDWLNGKEYK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	22 HC[305-323]	VSVLTVLHQDWLNGKEYK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	14 HC[292-304]	TKPREEQYNSTYR		G0F	[N300]
	15 HC[292-304]	TKPREEQYNSTYR		G1F	[N300]
	7 HC[252-258]	DTLMISR		Oxidation	[M255]

- データレビューを容易にするために、関連する修飾を限定できます。
例：
 - Asp → IsoAsp
 - 脱アミド
 - 脱アミド (IsoAsp)
- MS/MS スペクトルに含まれる診断用内部フラグメントイオンを使用して同定を検証し、必要に応じて結果を Accepted または Reject とします。

Review Results: カスタムレイアウトの作成

保存したレイアウトをクリックで保存するか、または読み込みます。



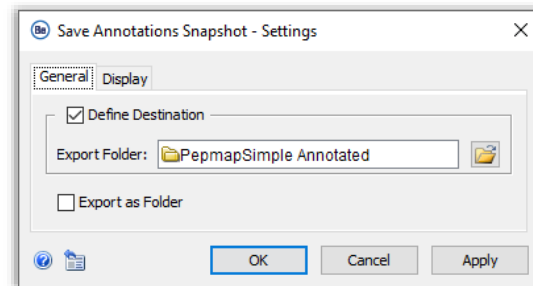
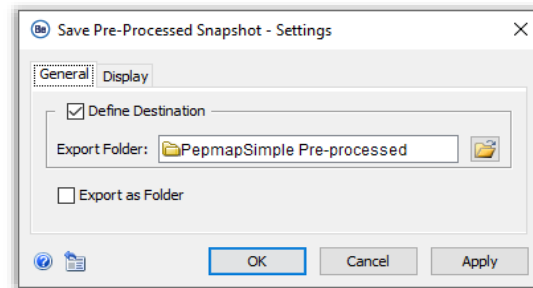
des Data  Q

クリックして Data タブのウィンドウを切り離します。

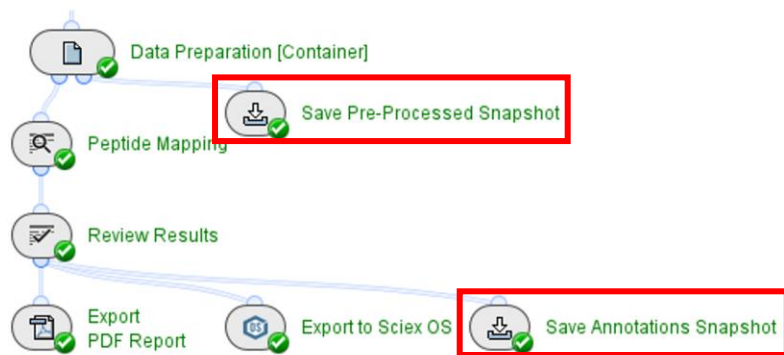
- 各ペインは切り離して新しい場所にドッキングできます。
- 切り離れたペインがドッキングされる位置は、青いボックスで強調表示されます。
- イオンマップを **Peptides** タブに移動するには、以下の手順に従います。
 1. **Data** タブを選択し、アイコンをクリックして **Data** タブのウィンドウを切り離します。
 2. イオンマップや **Data** タブウィンドウのペインは、ドッキングを解除して **Peptides** タブの新しい場所にドラッグできます。
- お気に入りのレイアウトを保存しておいて、レイアウトアイコンからアクセスすることができます。

レポート: スナップショットとレポートの保存先を定義する

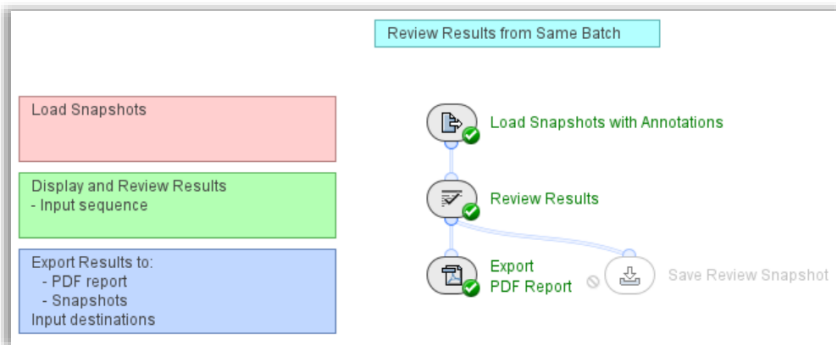
- 結果を保存するフォルダーを選択します。
- 2種類の結果が保存されます。
 - **Snapshots:**
 - スナップショットは、中間結果を sbf ファイルとして恒久的に保存したものです。
 - 前処理済みデータから保存されるスナップショットには、*Chromatogram Chemical Noise Subtraction* の後に生成された中間結果、および *Chromatogram RT Alignment* が保存されます。
 - *Review Results* の後に保存されるスナップショットには、機能のアノテーションを含むすべての中間情報が保存されます。
 - **PDF Reports。** これには以下が埋め込まれています:
 - 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 ファイル)。
 - 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。



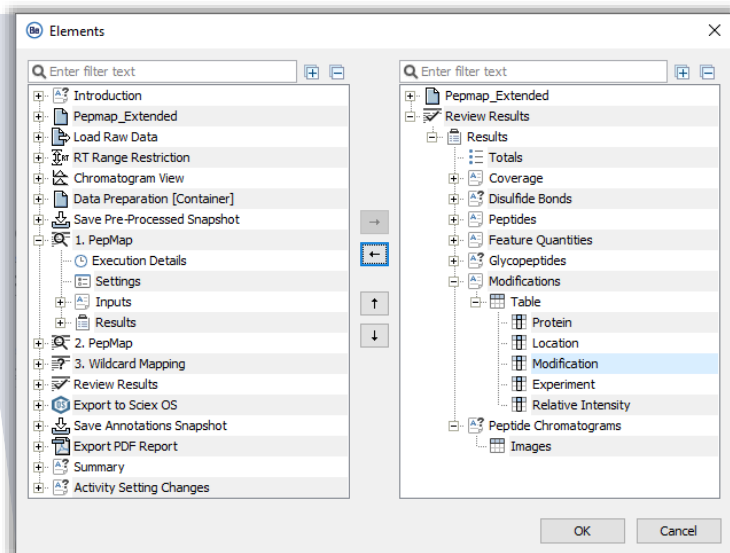
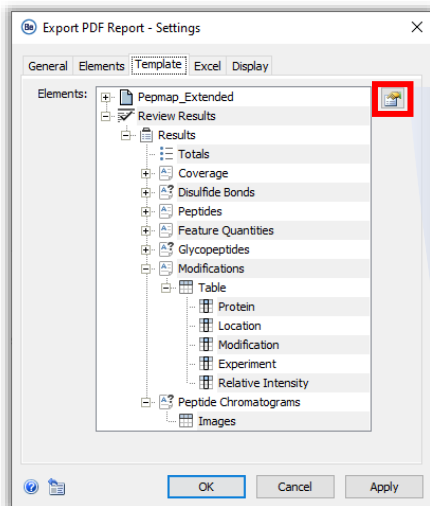
レポート: 中間結果を保存する



- ワークフロー全体を通して、異なるアクティビティノード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、Pepmap_ReviewSnapshots ワークフローの *Load Snapshots* アクティビティノードで sbf ファイルを開きます。
 - Save Annotations Snapshot* からスナップショットを読み込んで、同じデータセットからの結果をレビューします。
 - Save Pre-processed Snapshot* からスナップショットを読み込んで、異なるバッチの結果を分析します。
- また、保存した sbf ファイルは、どのワークフローでも *Load Raw Data* アクティビティノードに読み込むことができます。
 - Save Annotations Snapshot* からスナップショットを読み込み、ペプチドマッピングに必要なノード以外のすべてのアクティビティをバイパスして、分析に追加する探索を増やします。

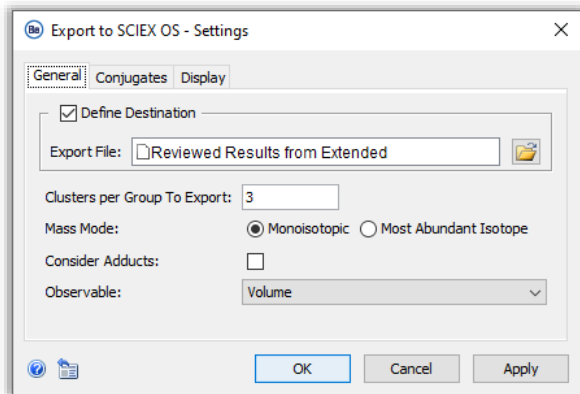
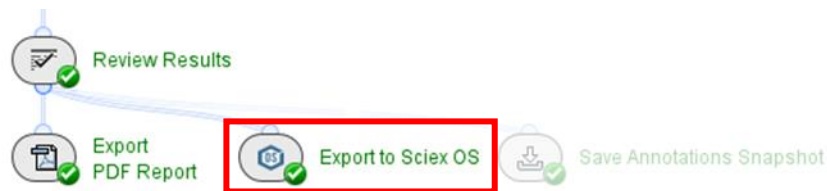


レポート: *Export PDF Report*



- **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表をカスタマイズします。

レポート: *Export to SCIEX OS*



• General タブ:

- レビュー結果の保存先を定義します。
- たとえば、各グループに必要なクラスターの数など、エクスポートの要件を定義します。

• *Export to SCIEX OS* アクティビティノードは *Wildcard Mapping* アクティビティノードと組み合わせ使用しないてください。

- *Wildcard Mapping* アクティビティノードは、関連するワークフローでバイパスできます。

注: *Export to SCIEX OS* アクティビティノードでエクスポートされる修飾位置は、タンパク質ではなく、ペプチドに対する相対位置です。たとえば、DTL[M]ISRは、M255 ではなく M4 となります。

パート B

ワークフローとアプリケーション

特異的なペプチドのマッピングワークフロー
のガイドライン

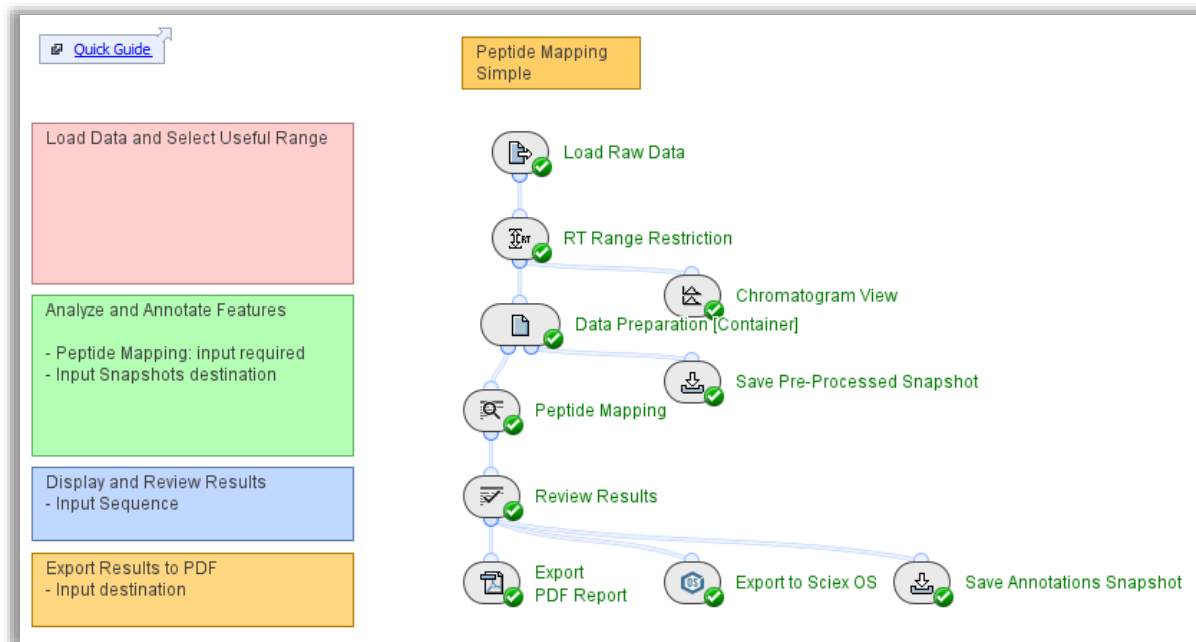


シンプルなペプチド マッピング

ワークフロー別のガイドライン

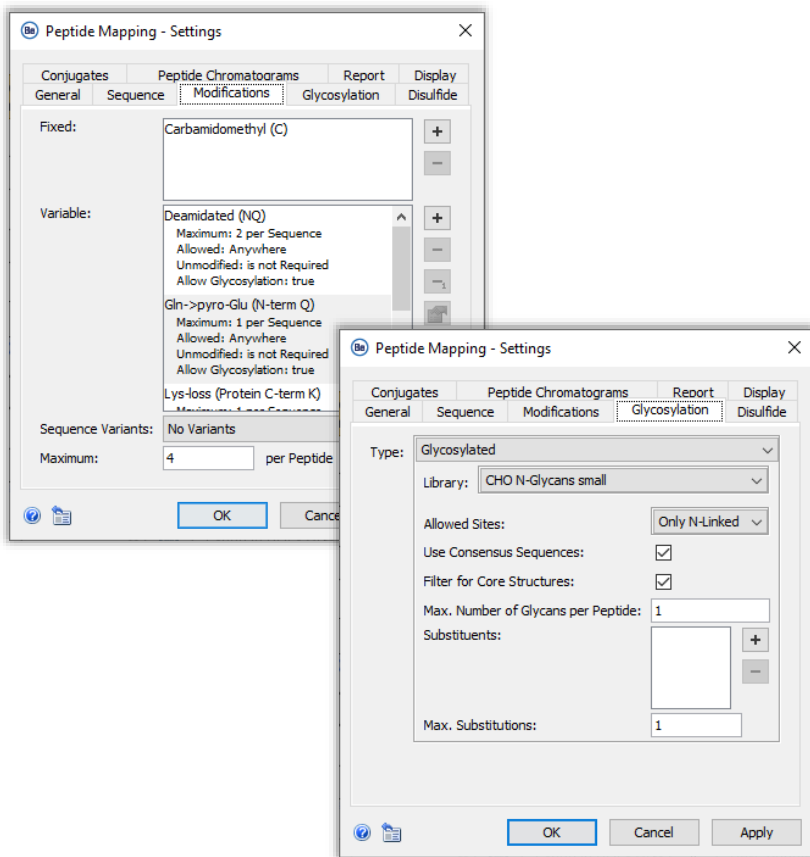


シンプルなペプチドマッピングのワークフロー: デザイン



Pepmap_Simple

シンプルなペプチドマッピングのワークフロー: 概要



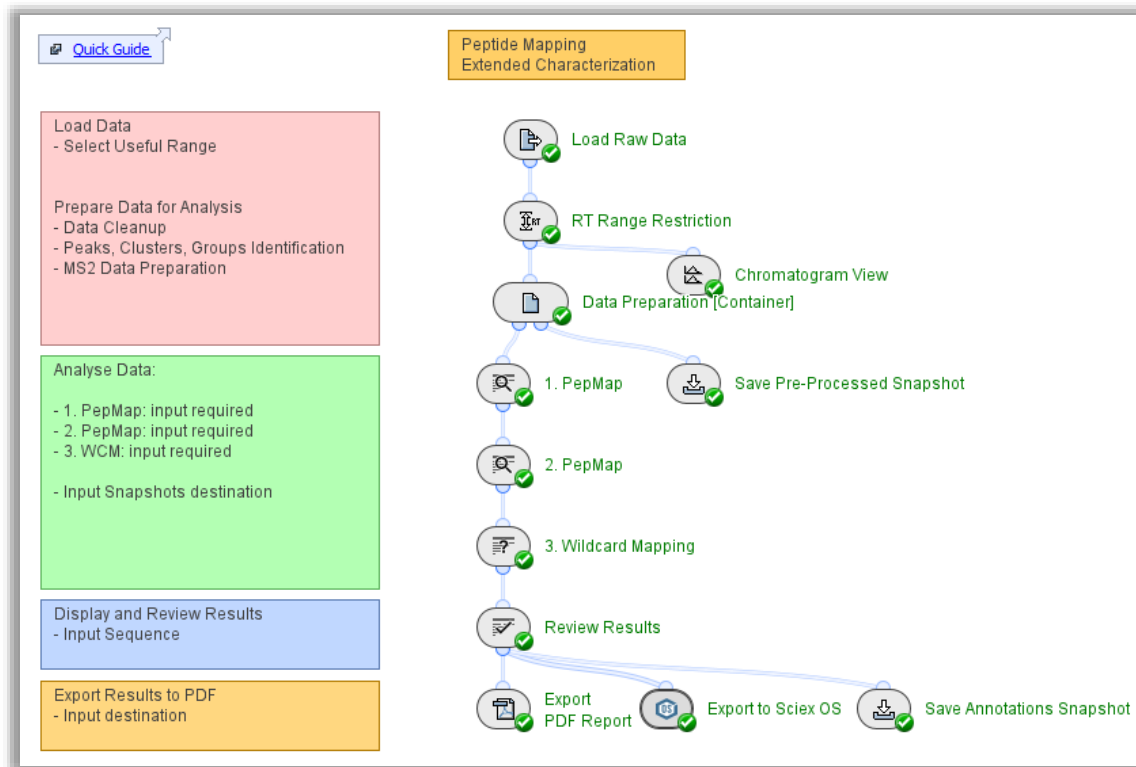
- このワークフローは、バイオ医薬品の非複合分子のルーチン分析を行う場合に使用します。
- *Peptide Mapping* アクティビティノードの検索パラメータの組み合わせにより、一般的に想定されるペプチドやグリコシル化などの修飾を識別します。

拡張ペプチドマッピング

ワークフロー別のガイドライン

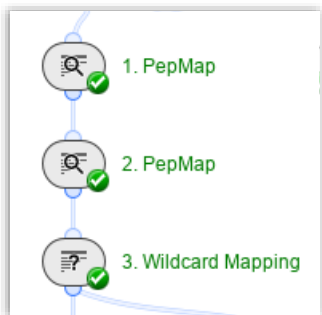


拡張ペプチドマッピングのワークフロー: デザイン



Pepmap_Extended

拡張ペプチドマッピング



- より包括的なペプチドマッピングの分析を行うために、最大 3 つの連続するアクティビティノードからの結果を組み合わせ、偽陽性を最小限に抑えながら探索空間を拡大することができます。

1. PepMap

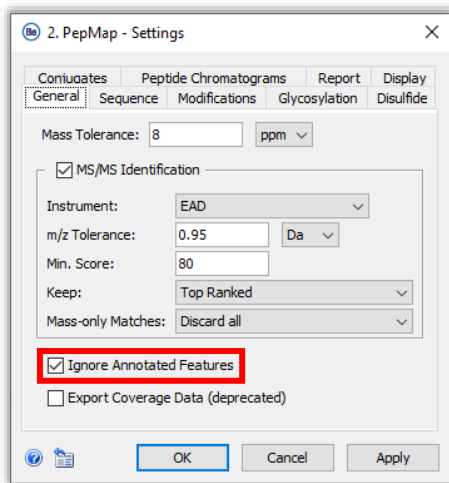
- 最も想定されるペプチドと修飾を識別します。

2. PepMap

- サンプルをより深く掘り下げます。
- **Ignore Annotated Features:** 前回の探索で得られたアノテーションのない機能のみを考慮するようにします。

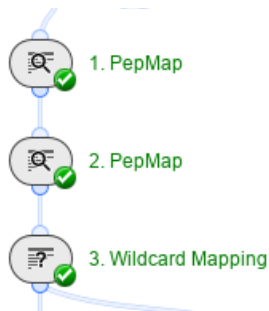
3. Wildcard Mapping

- 想定外の修飾を探索します。これは後に、1.PepMap または 2.PepMap のアクティビティノードに追加できます。



注: N- および O-糖鎖付加が想定されるバイオ医薬品の場合は、1.PepMap を使用して想定される N-糖鎖を同定することで偽陽性が減少します。また、2.PepMap は特徴があまりはっきりしないことが多い O-糖鎖に集中します。

ステップワイズペプチドマッピング: 応用例



- 必要な分析の種類に応じて、連続する3つのペプチドマップステップを組み合わせることができます。

例 1: 非還元サンプルのジスルフィド結合 (DSB) 分析。

- この種の分析に固有の主要な設定:

1. PepMap

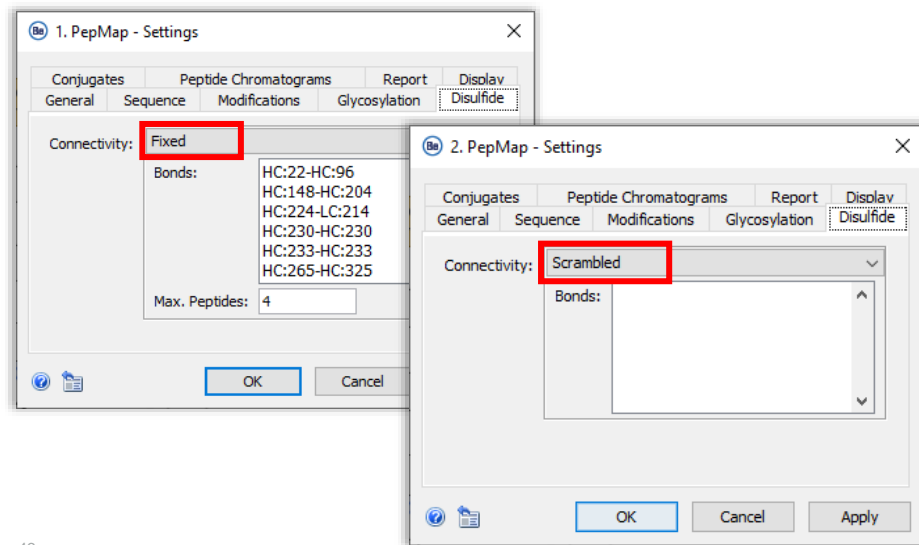
- Sequence タブ: Enzyme - 完全に特異的。
- Disulfide タブ: Fixed Connectivity.
 - 想定されるジスルフィド結合を正しい構文で定義します (HC:22-HC:96)。

2. PepMap

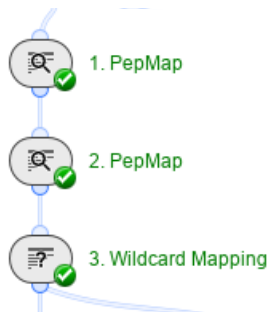
- Sequence タブ: Enzyme - 完全に特異的。
- Disulfide タブ: Scrambled Connectivity.

3. Wildcard Mapping

- 未知の修飾に関連するその他のアノテーションには、All Peptide Candidates。



ステップワイズペプチドマッピング: 応用例



- 必要な分析の種類に応じて、連続する3つのペプチドマップステップを組み合わせることができます:

例 2: 翻訳後修飾 (PTM) 分析。

- この種の分析に固有の主要な設定:

1. PepMap

- Sequence タブ: Enzyme - 完全に特異的。
- Modifications タブ: 豊富な修飾と想定される修飾。

2. PepMap

- Sequence タブ: Enzyme - 半特異的。
- Modifications タブ: 想定される修飾のリストを短縮したもの。

または:

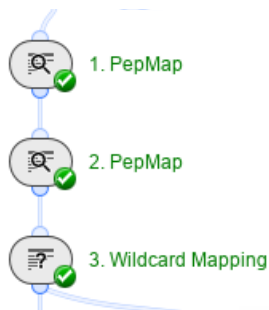
- Sequence タブ: Enzyme - 完全に特異的。
- Modifications タブ: 低量で想定される、あまり一般的でない修飾の代替セット。

3. Wildcard Mapping

- 未知の修飾に関連するアノテーションには、**All Peptide Candidates**。

The screenshots illustrate the configuration for PTM analysis. The '2. PepMap - Settings' window shows the 'Sequence' tab with 'Enzyme' set to 'SemiTrypsin'. The 'Modifications' tab is also visible, showing a list of PTMs. The 'Select Entries' dialog shows the selection of 'SemiTrypsin' from a list of enzymes. The 'Properties' window at the bottom shows various PTM options, including Oxidation, Trp->Kynurenin, and others.

ステップワイズペプチドマッピング: 応用例



- 必要な分析の種類に応じて、連続する3つのペプチドマップステップを組み合わせることができます:

例 3: 配列バリエーション分析 (SVA)。

- この種の分析に固有の主要な設定:

1. PepMap

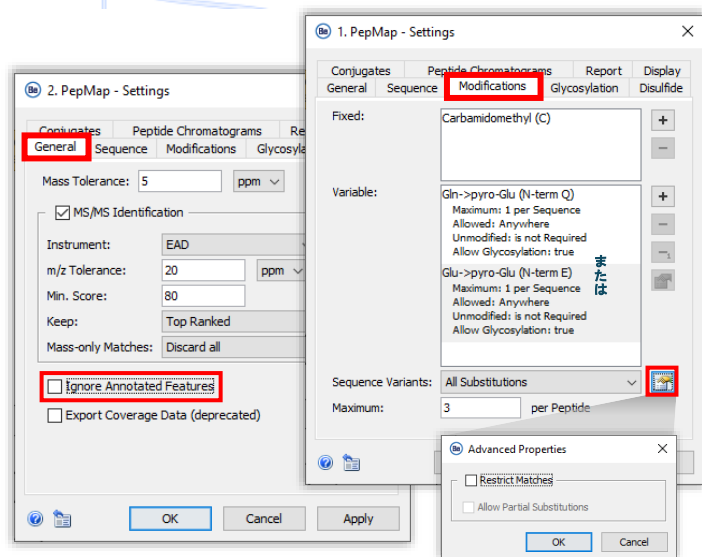
- Sequence** タブ: **Enzyme** - 完全に特異的。欠落した開裂なし。
- Modifications** タブ。固定化アルキル化 (cys) で、可変修飾は優勢型に限定 (たとえば、ピログルタミン酸)。**Sequence Variants - All Substituents (Restrict Matches)** はチェックボックスをオフに)。

2. PepMap

- General** タブ: **Mass Tolerance** は低い値に。**Ignore Annotated Features** はチェックボックスをオフに。
- Sequence** タブ: **Enzyme** - 半特異的。欠落した開裂は 1-2。
- Modifications** タブ。過アルキル化を検出するために、一般的に変更されたアミノ酸の可変アルキル化、およびその他の想定されるすべての可変修飾。

3. Wildcard Mapping

- Only Annotated Peptides** で。
 - Review Results* を使用して、同じ機能に関する追加のアノテーションを比較し、偽陽性を除外します。

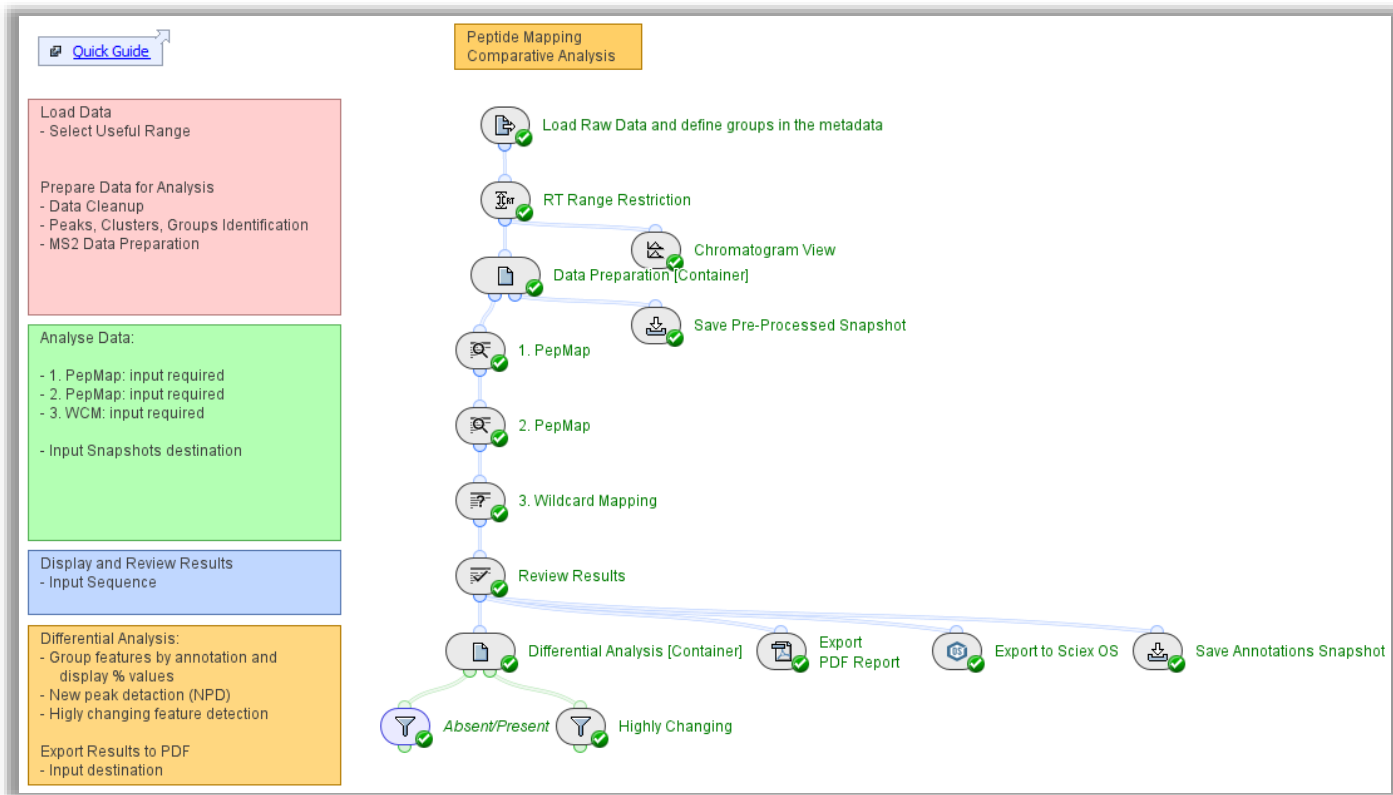


比較ペプチドマッピング

ワークフロー別のガイドライン



比較ペプチドマッピングのワークフロー: デザイン



Pepmap_Comparative

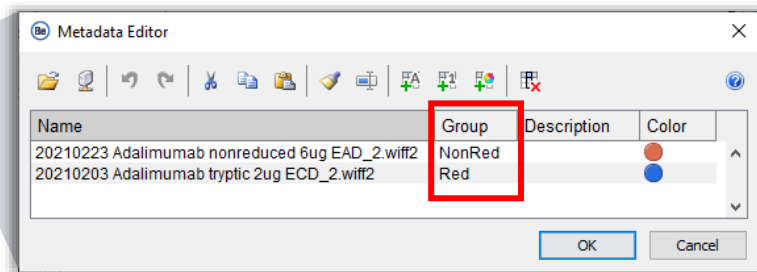
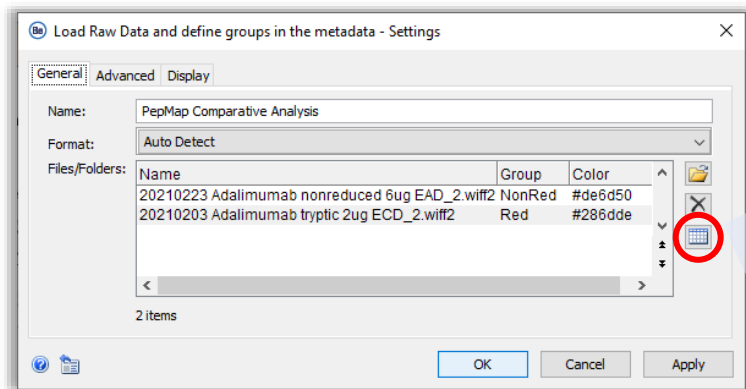
比較ペプチドマッピング



これらの統計アクティビティノードは、ワークフローで比較する2つのサンプルグループ間で有意に異なる機能を識別します。

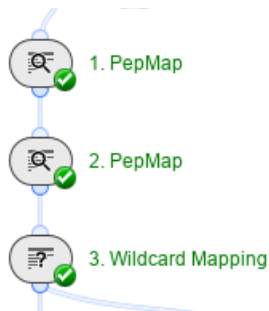
- 緑色の線で結ばれたアクティビティノードには、統計ツールが含まれています。
- これらの統計アクティビティノードは、2つのデータセットを比較し、以下のどちらかに該当するペプチドをレポートするために使用します。
 - 一方のサンプルセットには存在しないが、他方のサンプルセットには存在する。
 - サンプルセット間の倍率変化の差が指定されている。
- 使用例:
 - 還元サンプルと非還元サンプルを比較する。
 - ストレスのあるサンプルとないサンプルを比較する。
 - 参照サンプルと新しいバッチのサンプルを比較する。

Load Raw Data とグループの定義



- **General** タブで表アイコンをクリックし、**Metadata Editor** を開きます。
 - 比較するファイルの **Group** 名を指定します。
 - オプションで、**Color** 列を追加し、各グループに色を定義します。

ステップワイズペプチドマッピング: 応用例



- 必要な分析の種類に応じて、連続する3つのペプチドマップステップを組み合わせることができます:

例 1: 還元サンプルと非還元サンプルを比較するための DSB 分析。

- この種の分析に固有の主要な設定:

1. PepMap

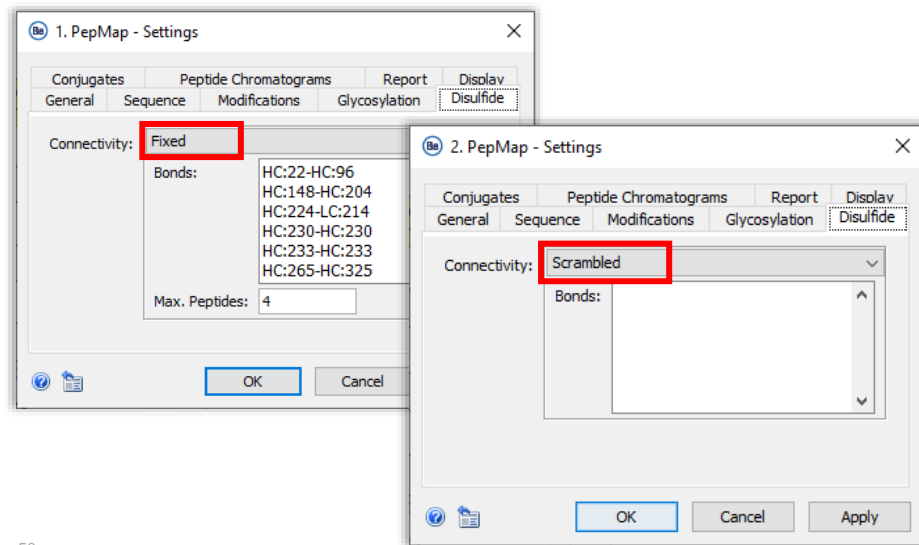
- Sequence** タブ: 完全に特異的。
- Disulfide** タブ: **Fixed Connectivity**.
 - 想定されるジスルフィド結合を正しい構文で定義します (HC:22-HC:96)。
- Modifications** タブ: 可変アルキル化 (cys)。

2. PepMap

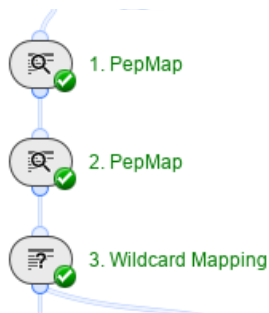
- Sequence** タブ: 完全に特異的。
- Disulfide** タブ: **Scrambled Connectivity**.

3. Wildcard Mapping

- 未知の修飾に関連するその他のアノテーションには、**All Peptide Candidates**。



ステップワイズペプチドマッピング: 応用例



- 必要な分析の種類に応じて、連続する3つのペプチドマップステップを組み合わせることができます:

例 2: ストレストテストとロット間のばらつきに関する比較分析。

- この種の分析に固有の主要な設定:

1. PepMap

- Sequence** タブ: 完全に特異的。
- Modifications** タブ: 豊富な修飾と想定される修飾。

2. PepMap

- Sequence** タブ: 非特異的酵素。
- Modifications** タブ: 想定される修飾のリストを短縮したもの。

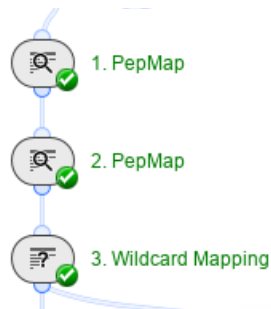
または:

- Sequence** タブ: 完全に特異的。
- Modifications** タブ: 低量で想定される、あまり一般的でない修飾の代替セット。

3. Wildcard Mapping

- その他のアノテーションには、**All Peptide Candidates**。

ステップワイズペプチドマッピング: 応用例



- 必要な分析の種類に応じて、連続する3つのペプチドマップステップを組み合わせることができます:

例 3: 野生型 (WT) と突然変異体サンプルの比較のための SVA。

- この種の分析に固有の主要な設定:

1. PepMap

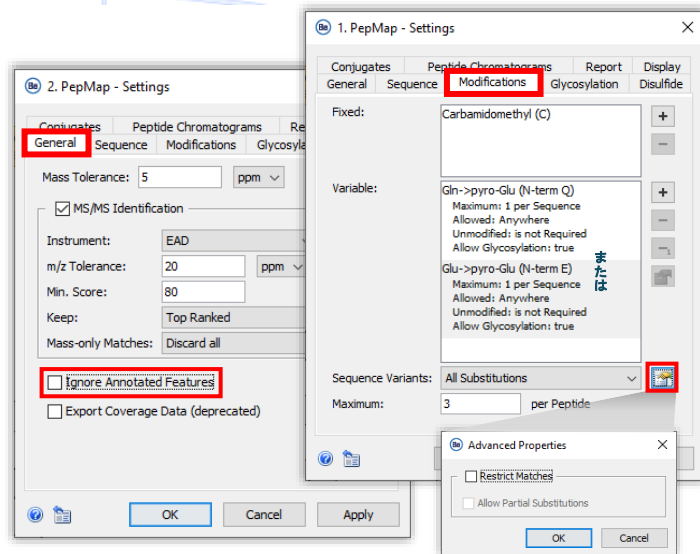
- Sequence** タブ: **Enzyme** - 完全に特異的。欠落した開裂なし。
- Modifications** タブ。固定化アルキル化 (cys) で、可変修飾は優勢型に限定 (たとえば、ピログルタミン酸)。**Sequence Variants - All Substituents (Restrict Matches)** はチェックボックスをオフに。

2. PepMap

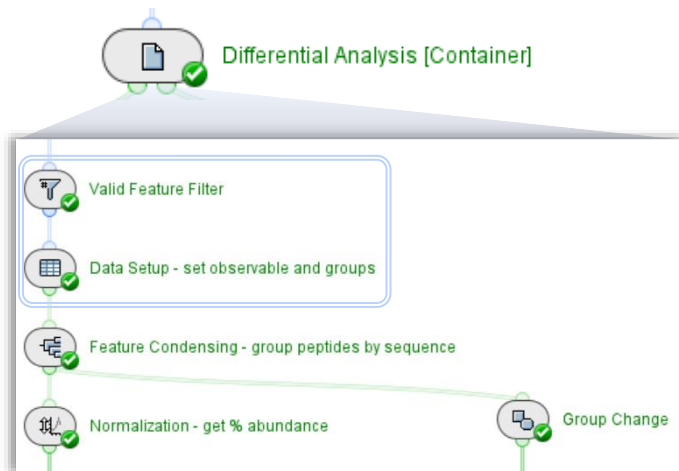
- General** タブ: **Mass Tolerance** は低い値に。**Ignore Annotated Features** はチェックボックスをオフに。
- Sequence** タブ: **Enzyme** - 半特異的。欠落した開裂は 1-2。
- Modifications** タブ。過アルキル化を検出するために、一般的に変更されたアミノ酸の可変アルキル化、およびその他の想定されるすべての可変修飾。

3. Wildcard Mapping

- Only Annotated Peptides** で。
- Review Results* を使用して、同じフィーチャーに関する追加のアノテーションを比較し、偽陽性を除外します。



Differential Analysis アクティビティノードの設定



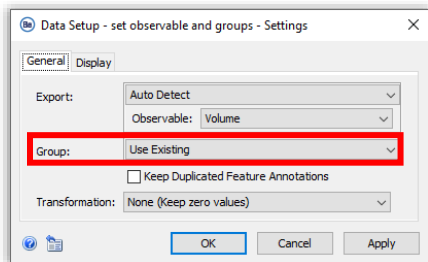
- **Group Change:** 実験グループ間の相対的な差と倍率変化の差を計算します。
 - 複数の実験グループが存在する場合は、どの2グループ間においても、報告された変化が最大差となります。

- **Valid Feature Filter:** 設定したしきい値を下回る機能、および設定した%または実験数を下回る機能を削除します。
 - このフィルタリングにより、重要でない差分や、ノイズやアーチファクトによる信号が除去されます。想定されるペプチドが存在しない場合は、この設定を最適化します。
- **Data Setup:** フィルタリングや統計処理の入力として使用するデータを行列形式で準備します。
 - グループを *Load Raw Data* で設定しなかった場合は、ここで定義できます。

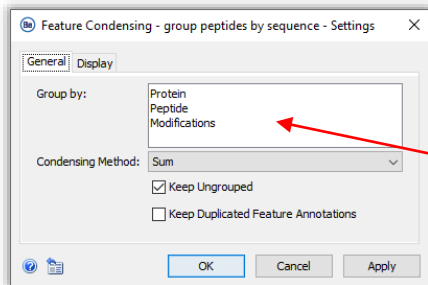
- **Feature Condensing:** アノテーションに基づいて機能をグループ化します。
 - 作成した各グループに対して、単一の強度値を算出します。
- **Normalization:** さらなる統計分析のための比較基準を提供します。
 - **Percent Abundance:** 数値は各実験の各グループの全メンバーの合計値です。各数値を対応するグループからの合計で除し、100 を乗じます。

注: 設定は、以前のアクティビティノードにリンクされています。 *Feature Condensing* を編集する前に、*Data Setup* を実行してください。

Differential Analysis: データ準備

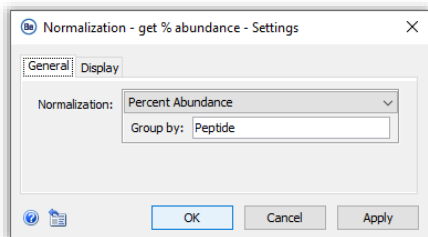


- メタデータ表を編集して、*Load Raw Data* アクティビティノードでグループを定義します（優先オプション）。
- 必要に応じて、*Data Setup* アクティビティノードで **Group: Manually** を使用してグループを定義し、各サンプルをグループに割り当てます。



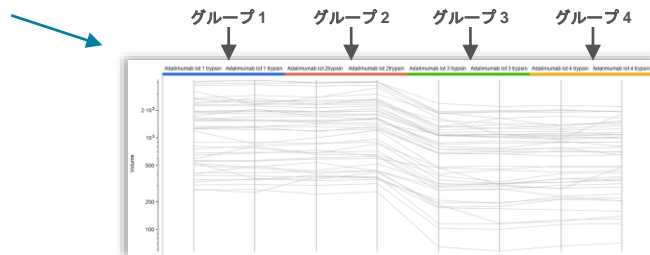
- *Feature Condensing*: 既存のアノテーションをもとに機能を組み合わせ、グループごとに単一の強度値（合計、平均、中央、最大）を算出します。たとえば、同じタンパク質の同じペプチドで、同じ修飾を施したものは、この設定を使用して合計されます。

– *Feature Condensing* の設定を編集する前に、*Data Setup* アクティビティノードを実行します。

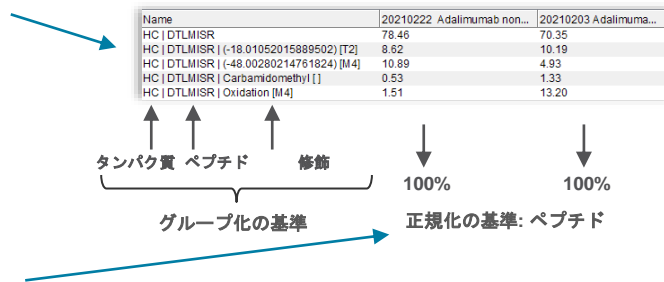


- *Normalization*: これは、選択したアノテーションの種類に対する凝縮された機能の **Percent Abundance** をレポートします。たとえば、**Group by** を **Peptide** とした場合、存在比はペプチド単位で算出されます。**Group by** が空白の場合、存在比はサンプル全体で計算されます。

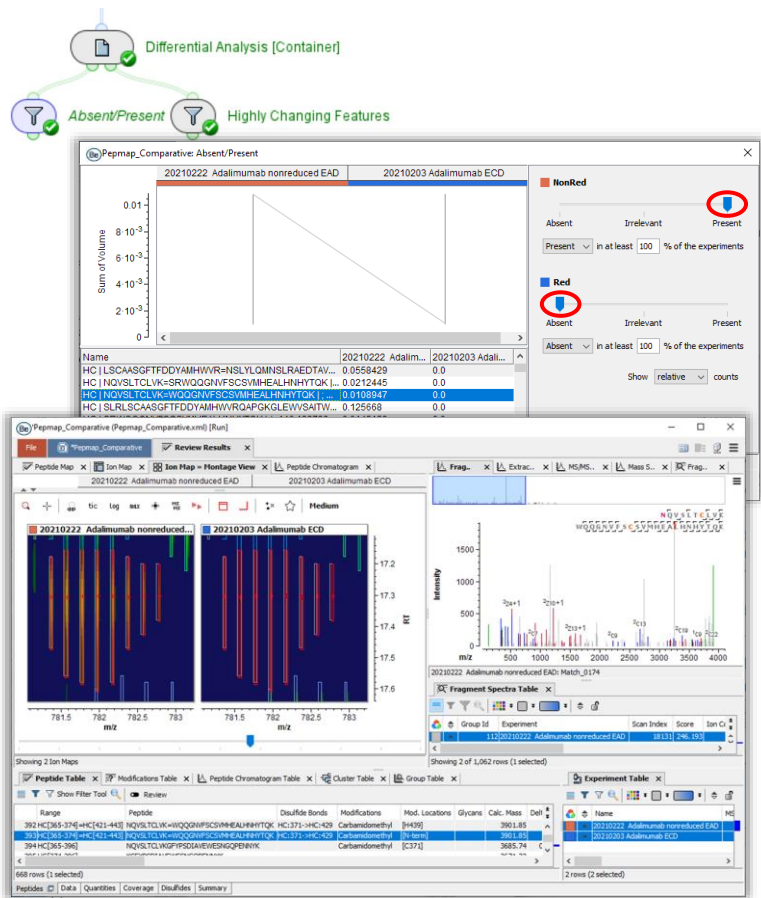
ロット間の同等性



DSB 分析



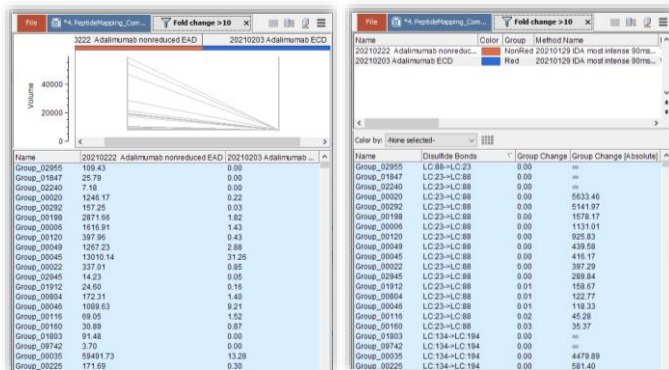
変化の激しい新機能の検出



- **Absent/Present** アクティビティノードにより、**New Peak Detection (NPD)** の使用が容易になります。

- スライダーは、アクティビティノードの実行時に開く入力ウィンドウに適用されます。
- スライダーを動かすと結果がフィルタリングされます。たとえば、DSB 分析の場合、機能は還元サンプルでは **Absent**、非還元サンプルでは **Present** となることが期待されます。

- **Highly Changing Features** の場合は、アクティビティノードの設定で希望する最小倍率変化量を設定する必要があります。



Highly Changing - Settings

General Display

Max. Rank:

Max. P-value:

Min. Change:

OK Cancel Apply

選択を同期してデータレビューを容易にする

The screenshot displays the SCIEX software interface with three windows open:

- Peptide Chromatogram:** Shows chromatograms for '20210222 Adalimumab nonreduced EAD' and '20210203 Adalimumab ECD'.
- Peptide Map:** Shows a heatmap of peptide data. A red circle highlights the 'Synchronize selection' button.
- Review Results:** Shows a table of peptide data with columns: Name, Peptide, Disulfide Bonds, Modifications, Mod. Locations, Glycans, Calc. Mass, Flags, Comment, Group Id, RT, Adduct States.

Name	Peptide	Disulfide Bonds	Modifications	Mod. Locations	Glycans	Calc. Mass	Flags	Comment	Group Id	RT	Adduct States
8*HC[1-38]	EVQLVESGGGLVQP...		Carbamidom...	[C22]		4195.04				11389	25... M+SH
20*HC[17-38]	SLRLSCAAGFTFDY...		2*Carbamid...	[C22 M34]		2646.21			400	18...	M+SH ; M+H ; M+H1 ; M+H2
21*HC[20-34]	LSCAAGFTFDYAM		Carbamidom...			1654.66			2506	24...	M+2H ; M+2H1 ; M+H1 ; M+H2

3つのウィンドウを開き、Review Results で Synchronize selection を有効にすると、動的リンクが可能になります。



保存された結果のレビュー

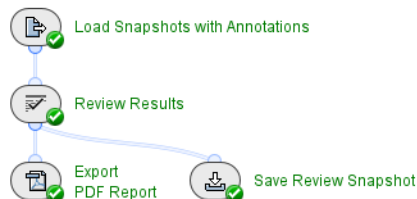
ワークフロー別のガイドライン



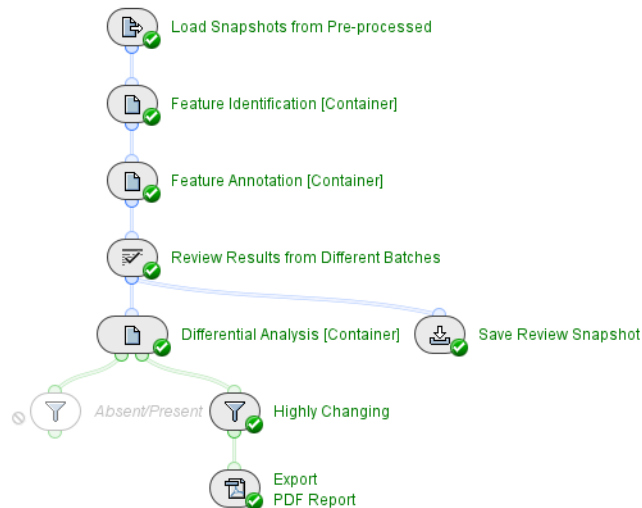
ペプチドマッピングスナップショットをレビューするワークフロー: デザイン

[Quick Guide](#)

Review Results from Same Batch



Review Results from Different Batches



Load Snapshots

Display and Review Results
- Input sequence

Export Results to:
- PDF report
- Snapshots
Input destinations

Load Snapshots

Analyze Data:
- Identify and group features
- Annotate features
- Input required

Display and Review Results
- Input Sequence

Differential Analysis:
- Group features by annotation and display % values
- Absent/Present features analysis
- Highly changing features detection

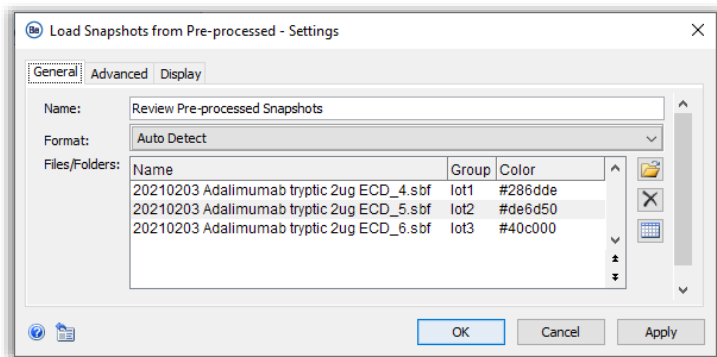
Export Results to PDF
- Input destination

Pepmap_ReviewSnapshots

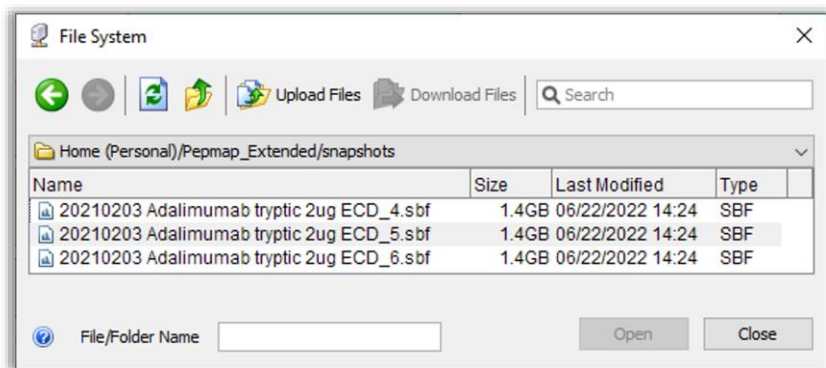


The Power of Precision

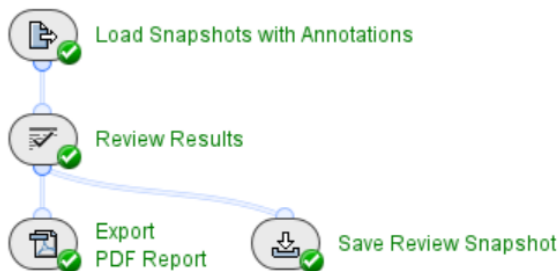
同じバッチの結果をレビューする



- 他のペプチドマッピングワークフローで複数のサンプルを分析した場合、各サンプルがそれぞれの sbf ファイルを生成します。
- 保存したスナップショットを Pepmap_ReviewSnapshots ワークフローに読み込む場合は、親フォルダー内の個々の sbf ファイルをすべて選択します。
 - 親フォルダーを選択した場合、データは読み込まれません。

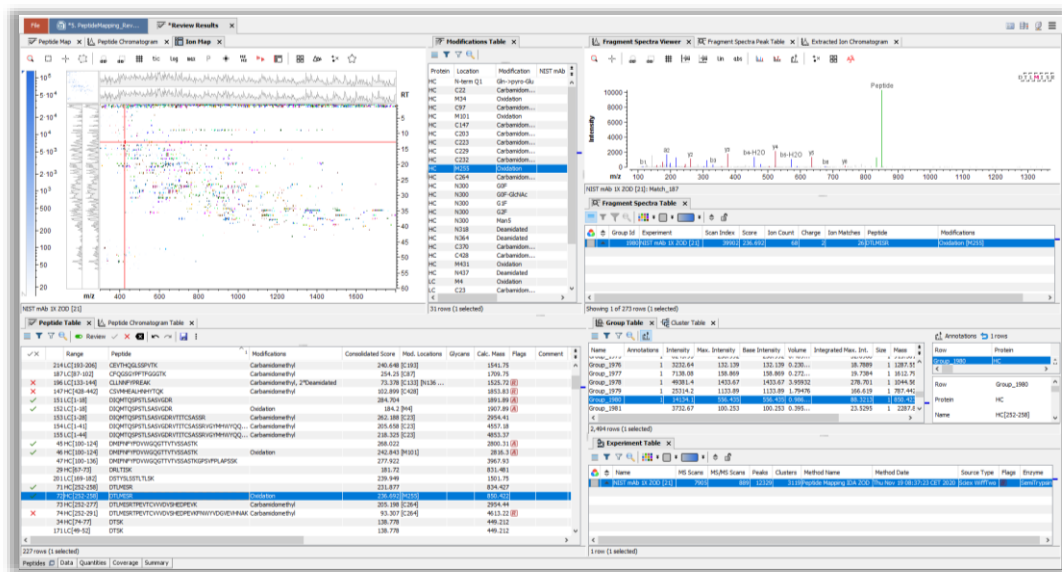


同じバッチの結果をレビューする

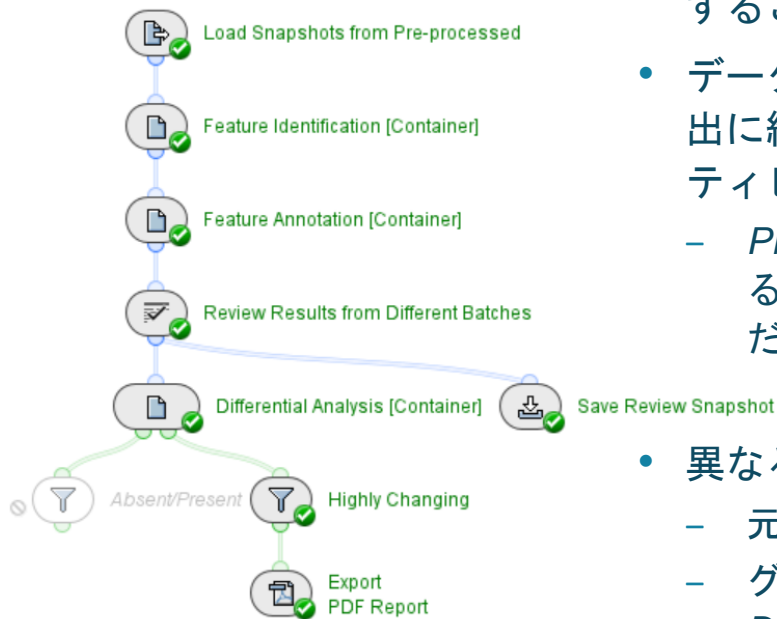


- このワークフローは、以前と一緒に分析し、ペプチドのアノテーションを持つサンプルの過去の結果をレビューするために使用します。

- Review Results** アクティビティノードには、過去に受け入れ / 却下されたペプチドを含め、**Flags** 列に該当する項目がある前回の分析結果のコピーが開きます。
- その後さらにレビューを行い、必要に応じて、レビューしたスナップショットを保存することができます。



異なるバッチの結果をレビューする



- 異なる分析のデータを個別に前処理し、スナップショットを結合することができます。
- データには、*RT Alignment* と共通の *Peak Detection* を含む機能検出に続いて、機能アノテーションのための *Peptide Mapping* アクティビティノードが必要です。
 - Pre-processed Snapshots* を使用して同じバッチのデータを処理する場合は、*RT Alignment* アクティビティノードをバイパスしてください。
- 異なるサンプルグループ間の比較も可能です。
 - 元のワークフローで定義したグループは維持されます。
 - グループを事前に定義しなかった場合は、*Load Snapshots* または *Data Setup* アクティビティノード内で定義できます。



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-05-13063-JA-C