

## Spectrophotometric Direct Peptide Reactivity Assay (Spectro-DPRA)를 위한 펩타이드의 보관조건에 따른 품질 변성 연구

박교현<sup>†</sup>, 서정아<sup>†</sup>, 김배환\*

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

### The Stability Study of Peptide for the Spectrophotometric Direct Peptide Reactivity Assay (Spectro-DPRA) according to Storage Conditions

Kyo-Hyun Park<sup>†</sup>, Jung-Ah Seo<sup>†</sup>, Bae-Hwan Kim\*

Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

**ABSTRACT.** The Spectrophotometric direct peptide reactivity assay (Spectro-DPRA) is now in process for the development and validation of evaluation on skin-sensitizing chemicals. The cysteine peptides (Ac-RFAACAA-COOH) and lysine peptides (Ac-RFAAKAA-COOH) is used for Spectro-DPRA.

The objective of this study is to confirm the stability of cysteine and lysine peptides which are used for Spectro-DPRA through the storage conditions. We analyzed the stability of peptide using HPLC according to the conditions, such as storage temperature and storage period.

The peptide powders of cysteine and lysine were stable on storage  $-80^{\circ}\text{C}$ , for 6 and 12 month. And 10 mM stock peptides of cysteine and lysine were also stable on storage  $-70^{\circ}\text{C}$ , for 1, 3 and 6 month. But 10 mM stock peptides of cysteine were denatured and not stable on storage  $-20^{\circ}\text{C}$ , for 1 month.

Taken together, peptides powder for Spectro-DPRA should be stored under  $-80^{\circ}\text{C}$ , less than 12 month. And, 10 mM stock peptides should be also stored under  $-70^{\circ}\text{C}$ , less than 6 month.

**KEY WORDS:** Spectro-DPRA, cysteine, lysine, peptides, stability

## Introduction

분자량이 작은 다양한 감작성 물질은 피부 단백질과 결합을 통해 감작성을 일으키는 헵텐화 과정이 일어난다(Adam et al., 2011; Chipinda et al. 2011). 헵텐화 과정 중 감작성 물질과 단백질이 결합 시 주로 cysteine 또는 lysine 아미노산과 결합하게 된다(Ahlfors et al. 2003; Divkovic et al. 2005). 현재

이 반응을 도태로 direct peptide reactivity assay (DPRA)가 개발되어 OECD test guideline 442C 등 재되어져 있으며, 이 시험법은 피부감작성 adverse outcome pathway (AOP) 중 key event 1으로 지정되어 세계적으로 많이 활용되고 있다(OECD TG 442C; Gerberick et al., 2008).

단백질의 반응성을 평가하는 DPRA는 cysteine 함유 peptide (Ac-RFAACAA-COOH) 또는 lysine 함유 peptide (Ac-RFAAKAA-COOH)와 시험물질을 *in vitro*에서 반응시킨 후 peptide 소실정도를 측정하는 것으로 LC-MS, HPLC 등 분석적인 기법을 이용하여 평가된다(Natsch and Gfeller, 2008). 분석기법을 이용하면 생성된 adduct가 무엇인지 구체적으로 알 수 있고 소량의 물질도 분석할 수 있으나, 고가의 장비 및 분석 기술이 필요하고 다량의 시료를 처리하기 위해서는 상당한 시간이 소요되는 단점이 있다.

Received: 9 December 2019

Revised: 16 December 2019

Accepted: 16 December 2019

<sup>†</sup> Kyo-Hyun Park and Jung-Ah Seo were equally contributed

\* Corresponding author: Bae-Hwan Kim

Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Tel: 82-53-580-5933 Fax: 82-53-580-5933

E-mail: kim9399@kmu.ac.kr

Spectrophotometric DPRA(Spectro-DPRA)는 기존 DPRA의 단점을 보완하여 개발된 감작성 평가법으로 96 well plate를 이용하여 시험물질의 감작성도를 평가함으로써 단시간에 다량의 물질을 평가할 수 있는 장점이 있다(Cho et al., 2014). 또한, 기존 DPRA에서 사용되는 peptide는 동일하게 사용되지만 기존 DPRA에 비해 상대적으로 사용되는 시험물질과의 반응비가 낮으며, 시험물질과 peptide간의 반응을 유리 vial이 아닌 96 well plate에 소량 적용함으로써 기존 DPRA에 비해 동일한 양의 peptide로 최대 6배의 시험물질을 처리할 수 있다.

하지만 사용되는 peptide는 소량 합성이 어려워 대부분의 제조사에서는 최소주문량을 정해두고 판매하고 있는 실정이며, 시험에 사용되는 peptide가 극소량임으로 시험에 사용된 후 잔여 peptide는 보관에 어려움이 따른다. 보관의 부주의로 인해 peptide의 품질이 변성될 경우 시험물질의 감작성을 정확하게 판정할 수 없다.

본 연구는 Spectro-DPRA에서 사용되는 peptide의 보관조건을 제시하기 위함으로, 제조사에서 공급받은 peptide powder 그대로  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 6개월, 12개월간 보관하여 변성여부를 확인하였고, peptide stock solution 형태로 희석하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 1개월, 3개월, 6개월간 보관 후 변성여부를 확인하였다. 시험기관에서 초저온냉동고를 소유하지 않을 경우를 대비하여 peptide stock solution 형태로 희석하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 1개월간 보관 후 변성여부를 확인하였다. Peptide stock solution은 Spectro-DPRA의 시험법을 참고하여 용매와 농도를 설정하였다.

## Materials and Methods

### 1. Peptide 제작

Peptide인 cysteine(Ac-RFAACAA-COOH, 순도 96%, 분자량 750.35)과 lysine(Ac-RFAAKAA-COOH, 순도 98%, 분자량 775.43)은 (주)Peptron(Taejeon, Korea)에서 주문 제작하였다.

### 2. Peptide 보관조건

품질 분석을 위한 peptide 보관조건은 Fig.1과 같다. 공급처에서 수급 받은 powder 상태의 peptide를  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 6개월, 12개월 보관 후 변성여부를 확인하였다. 또한, cysteine peptide는 dimethyl sulfoxide에,

lysine peptide는 distilled water에 10 mM로 희석하여 200  $\mu\text{L}$  씩 E-tube에 분주하였으며, 희석한 peptide stock solution을  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 1개월, 3개월, 6개월 보관하고,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 1개월 보관 후 peptide의 변성여부를 확인하였다. Peptide이 변성이 확인되었을 시에는 재분석을 진행하였다.

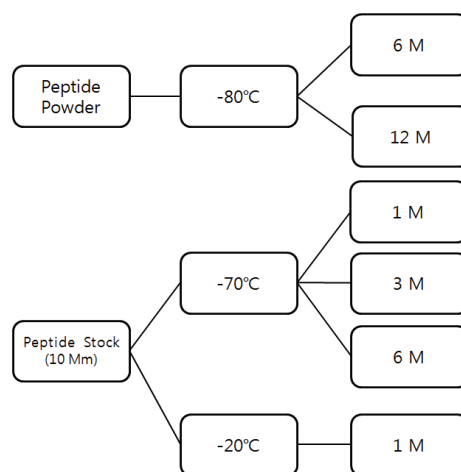


Fig 1. Storage conditions in peptides

### 3. 고성능 액체 크로마토그래피 (High-performance liquid chromatography; HPLC) 분석

Cysteine 및 lysine peptide의 변성정도를 확인하기 위해 Table 1의 분석 조건에 따라 HPLC (Prominence HPLC, Shimadzu Co, Ltd, Kyoto, Japan)를 이용하여 분석하였다. 분석 농도별 보관 전 상태를 기준으로 HPLC peak area를 비율로 비교하였다. 또한, 분석기기의 재현성을 확인하기 위해 retention time의 변이를 평가하였다.

Table 1. HPLC conditions for peptide

Instrument	SHIMADZU Prominence HPLC
Column	Shiseido capcell pak C18, 5 $\mu\text{m}$ , 120 $\text{\AA}$ Column (4.6 * 50 mm)
Column Temp	Room temperature
Detector	220 nm
Flow Rate	1.01 mL/min
Mobile phase	(A) 0.1% TFA water (B) 0.1% TFA acetonitrile
Gradient (%)	3-10% B in 2 min 10-40% B in 10 min 40%-60% B in 1 min 60-3% B in 4 min

## Results

### 1. Peptide powder stability (-80°C, 6, 12개월 보관)

-80°C에서 6개월, 12개월 간 보관 된 peptide powder의 품질은 Table 2, Fig. 2와 같다. 분석기기의 재현성을 확인을 위한 retention time은 같은 peptide일 때 보관기간에 따른 큰 차이가 없었다. Cysteine peptide의 경우 보관 전 초기 peak area가 97.132% 이며, 6개월과 12개월 보관 시 각각 98.942%, 97.450%로 변성이 없는 것을 확인하였다. Lysine peptide의 경우 보관 전 초기 peak area가 98.436% 이며, 6개월과 12개월 보관 시 각각 98.860%, 98.141%로 cysteine과 마찬가지로 변성이 없는 것을 확인하였다.

Table 2. Peptide powder stability by HPLC chromatogram (-80°C, 6, 12M)

Peptide	Temp.	Month	Cysteine		Lysine	
			R.T. <sup>1)</sup> (min)	Area (%)	R.T. <sup>1)</sup> (min)	Area (%)
Powder	-80°C	0	8.308	97.132	6.942	98.436
		6	8.475	98.942	7.100	98.860
		12	8.825	97.450	7.450	98.141

<sup>1)</sup> R.T : Retention time

### 2. Peptide stock solution stability (-70°C, 1, 3, 6개월 보관)

-70°C에서 1개월, 3개월, 6개월 간 보관 된 peptide stock solution의 품질은 Table 3, Fig. 3과 같다. 분석기기의 재현성을 확인을 위한 retention time은 같은 peptide일 때 보관기간에 따른 큰 차이가 없었다.

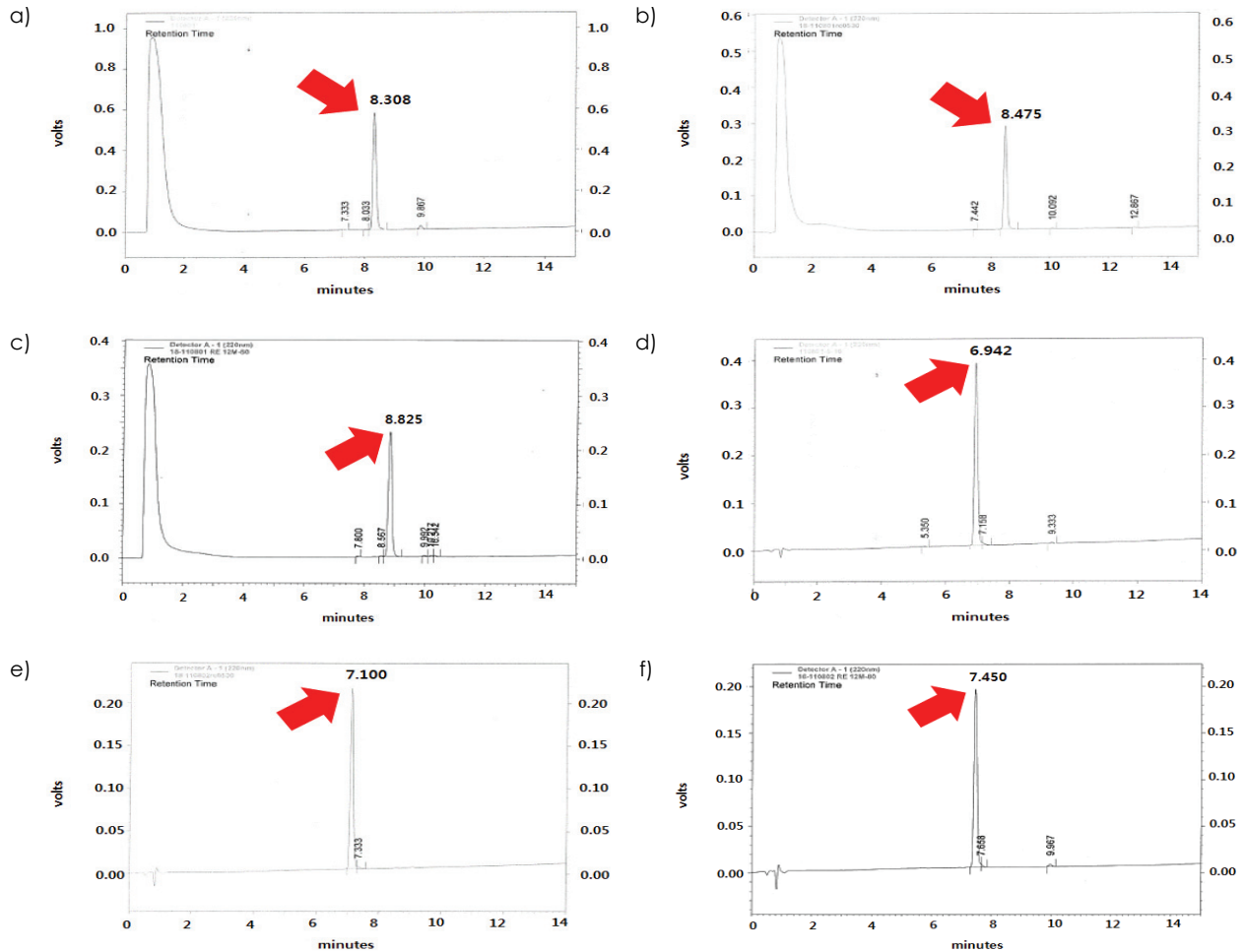


Fig 2. HPLC chromatogram of a) cysteine powder, b) cysteine powder storage of -80°C and 6 month, c) cysteine powder storage of -80°C and 12 month, d) lysine powder, e) lysine powder storage of -80°C and 6 month, and f) lysine powder storage of -80°C and 12 month

Cysteine peptide의 경우 보관 전 초기 peak area가 98.815% 이며, 1개월과 3개월, 6개월 보관 시 각각 95.085%, 95.350%, 95.076%로 변성이 없는 것을 확인하였다. Lysine peptide의 경우 보관 전 초기 peak area가 97.315% 이며, 1개월과 3개월, 6개월 보관 시 각각 97.102%, 96.538%, 96.951%로 변성이 없는 것을 확인하였다.

Table 3. Peptide stock solution stability by HPLC chromatogram (-70°C, 1, 3, 6M)

Peptide	Temp.	Month	Cysteine		Lysine	
			R.T. <sup>1)</sup> (min)	Area (%)	R.T. <sup>1)</sup> (min)	Area (%)
Stock solution	-70°C	0	8.492	98.815	7.083	97.315
		1	8.500	95.085	7.125	97.102
		3	8.467	95.350	7.050	96.538
		6	8.725	95.076	7.308	96.951

<sup>1)</sup> R.T : Retention time

### 3. Peptide stock solution stability (-20°C, 1개월 보관)

-20°C에서 1개월 간 보관 된 peptide stock solution의 품질은 Table 4, Fig. 3과 같다. 분석기기의 재현성을 확인을 위한 retention time은 같은 peptide일 때 보관기간에 따른 큰 차이가 없었다. Cysteine peptide의 경우 보관 전 초기 peak area는 98.815% 이었으나 Fig. 3e와 같이 1개월 보관 시 peak area가 매우 낮아졌으며 면적은 53.717%로 변성된 것으로 판단된다. Lysine peptide의 경우 보관 전 초기 peak area는 97.375%이며, 1개월 보관 시 97.383%로 변성이 없는 것을 확인하였다. 변성된 것으로 판단된 -20°C에서 1개월 간 보관 된 cysteine peptide는 재분석을 진행한 결과 Table 5, Fig. 4과 같았다. 같은 retention time에 1차 분석 결과 peak area는 보관 전 초기 98.815%에서 53.717%로 낮아졌으며, retention time 10.100에서 peak area가 44.874%로 증가하였다. 2차 분석 결과에서도 peak area는 52.759%로 낮아졌으며, retention time 10.067에서 peak area가 45.883%로 증가하였다. 이는 peptide가 dimer형태로 변성됨으로써 생긴 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 peptide stock solution은 보관온도인 -20°C에서 1개월만 보관하여도 안정성이 약 50%정도 떨어지는 결과를 보여 보관온도가 중요하다는 사실을 제시하고 있다.

Table 4. Peptide stock solution stability by HPLC chromatogram (-20°C, 1M)

Peptide	Temp.	Month	Cysteine		Lysine	
			R.T. <sup>1)</sup> (min)	Area (%)	R.T. <sup>1)</sup> (min)	Area (%)
Stock solution	-20°C	0	8.492	98.815	7.083	97.315
		1	8.550	53.717	7.075	97.383

<sup>1)</sup> R.T : Retention time

Table 5. Cysteine peptide stock solution by HPLC chromatogram (-20°C, 1M)

Peptide	Temp.	Month	1 <sup>st</sup> analysis		2 <sup>nd</sup> analysis	
			Cysteine		Cysteine	
			R.T. <sup>1)</sup> (min)	Area (%)	R.T. <sup>1)</sup> (min)	Area (%)
Stock solution	-20°C	1	8.550	53.717	8.508	52.759
			10.100	44.874	10.067	45.883

<sup>1)</sup> R.T : Retention time

## Discussion

DPRA는 피부감작에 대한 AOP 중 Key event 1에 해당하는 실험법으로서 OECD에 등재된 시험법 중 합텐결합에 기초한 유일한 시험법이다(Gerberick et al., 2008). 하지만 장시간의 시험시간으로 인해 분석 샘플의 제한이 있으며, 분석 장비의 비용 및 실험자의 숙련도가 필요하므로 많은 기관에서 시험을 진행하기가 어려웠다. 이러한 단점을 보완하기 위해 개발된 Spectro-DPRA의 보급을 위해서는 다양한 시험조건이 설정되어야 하며, 본 연구에서는 시험에 사용되는 peptide 보관조건에 대해 품질변성 연구를 진행하였다.

제조사에서 공급된 peptide는 일반적으로 초저온 냉동고에 보관하게 되며, 보관기간에 대한 가이드라인은 현재 마련되어있지 않다. 질소화합물인 단백질, peptide, 아미노산은 자체적으로 산화가 일어난다고 알려져 있으므로 정확한 실험결과를 도출하기 위해서는 peptide 보관의 가이드라인을 마련하는 것은 필수 불가결하다(Krogull and Fennema 1987).

시험자는 제조사에게 powder 형태의 peptide를 공급받은 후 최대 12개월 이내에 stock solution 형태로 희석하게 되므로 최대기간을 12개월로 설정 후 powder 형태의 peptide에 대해 안정성을 확인하였다. 또한, stock solution 형태로 희석 후 1개월, 3개월, 6개월로 나누어 안정성을 확인하였으며, 시험분석기관 사정에 따라 초저온냉동고 사용이 불가피 할 경우를 예상하여 일반 냉동고에 보관한 peptide에 대한 안정성도 함께 확인하였다.

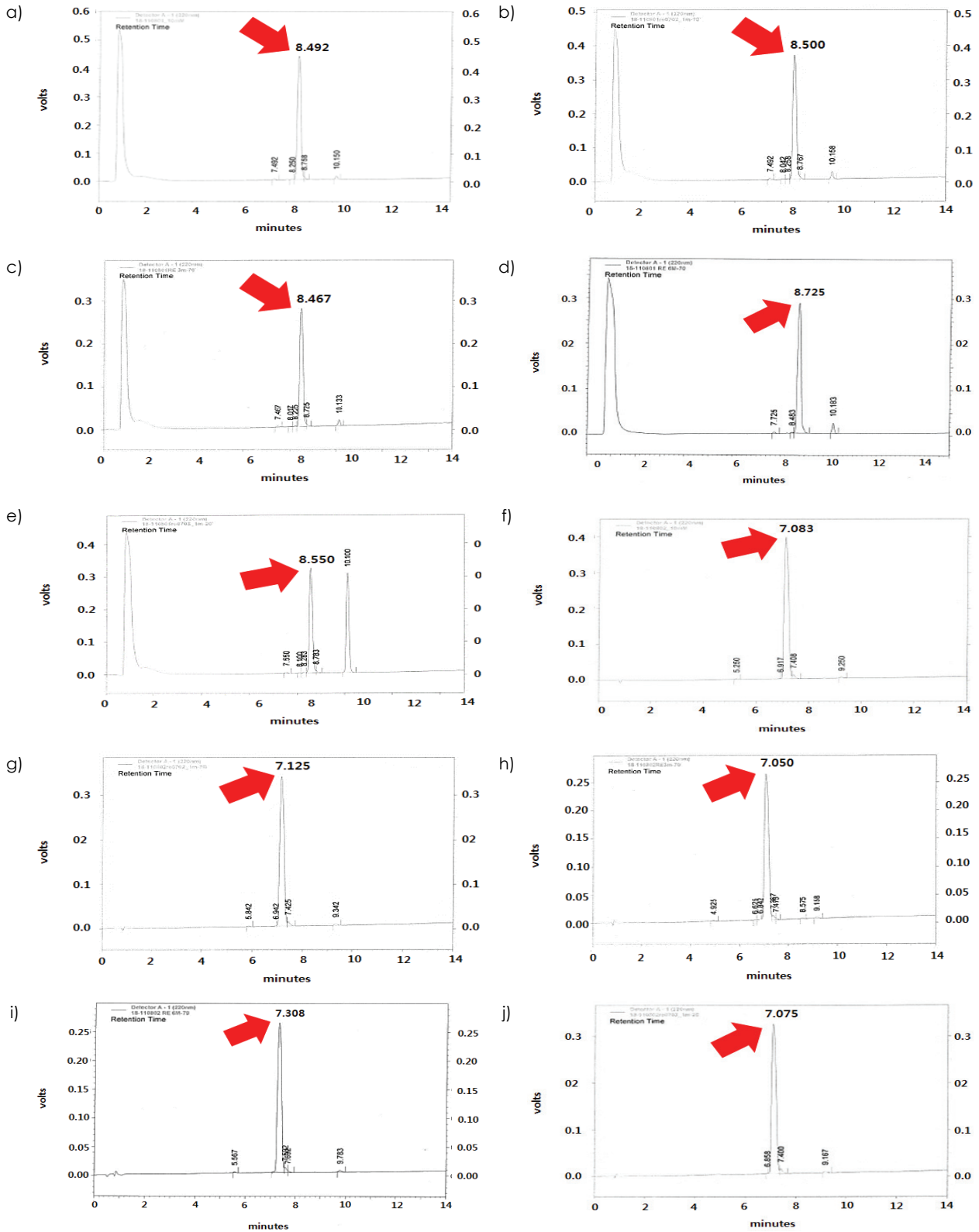


Fig 3. HPLC chromatogram of a) cysteine stock solution, b) cysteine stock solution storage of -70°C and 1 month, c) cysteine stock solution storage of -70°C and 3 months, d) cysteine stock solution storage of -70°C and 6 months, e) cysteine stock solution storage of -20°C and 1 month, f) lysine stock solution, g) lysine stock solution storage of -70°C and 1 month, h) lysine stock solution storage of -70°C and 3 months, i) lysine stock solution storage of -70°C and 6 months, and j) lysine stock solution storage of -20°C and 1 month

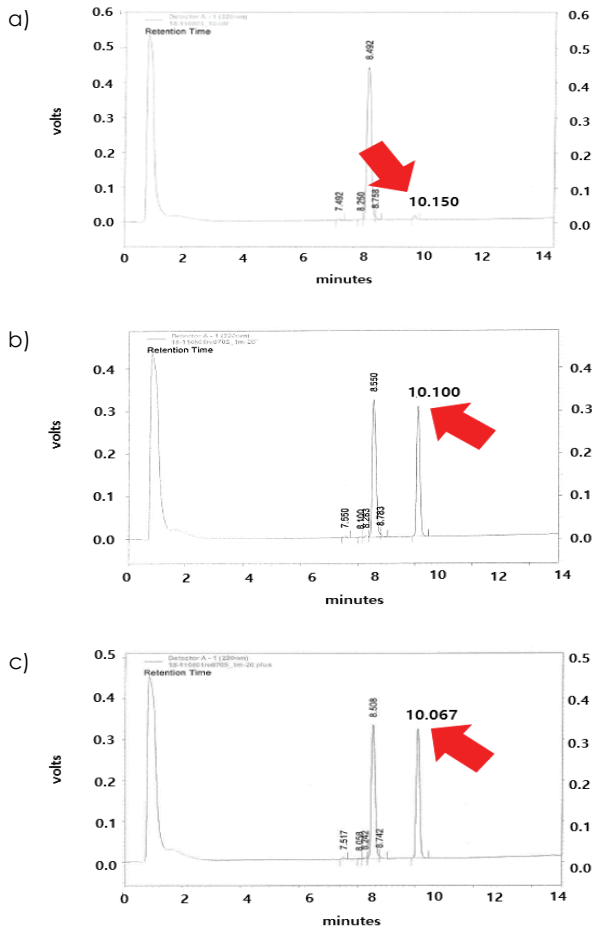


Fig 4. HPLC chromatogram of a) cysteine stock solution, b) cysteine stock solution storage of -20°C and 1 month, 1<sup>st</sup> analysis c) cysteine stock solution storage of -20°C and 1 month, 2<sup>nd</sup> analysis

일반 냉동고의 온도인 -20°C를 제외하고 모든 실험에서 변성된 peptide는 확인할 수 없었다. 시험군의 retention time을 비교했을 때 거의 유사하게 확인되어 시험의 재현성을 확인할 수 있었으며, peak area 값 또한 유사한 정도로 확인되어 peptide의 변성이 없는 것으로 해석되었다. Lysine peptide는 -20°C에서 안정하였으나, -20°C에서 1개월 보관한 cysteine peptide의 경우 peak area가 98%에서 53%로 감소하며 retention time이 10.100분일 때 44.874% area로 증가하는 것으로 보아 변성이 확인되었다. 변성여부를 다시 재확인하기 위해, -20°C에서 보관한 cysteine peptide를 재분석 실시한 결과 peak area가 98%에서 52%로 감소하며 retention time이 10.067분일 때 45.883% area로 증가하였다. 2차에 걸친 분석에서

동일한 결과를 확인하여, 위 보관온도에서 보관 시 peptide가 dimer 형태로 변성된 것으로 판단되었다.

본 연구를 통해 현재 연구가 진행 중인 Spectro-DPRA의 SOP 작성에 도움이 될 것이라고 사료된다.

## Acknowledgements

본 연구는 2019년도 식품의약품안전처의 연구개발비(19182대체기495)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

Adam J, Pichler WJ, Yerly D. (2011) Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 71, 701–07.

Ahlfors SR, Sterner O, Hansson C. (2003) Reactivity of contact allergenic haptens to amino acid residues in a model carrier peptide, and characterization of formed peptide-hapten adducts. *Skin Pharmacology and Physiology*. 16, 59-68.

Chipinda, I.; Hettick, J.M.; Siegel, P.D. (2011) Haptenation: Chemical reactivity and protein binding. *Journal of Allergy*, 839682.

Cho SA, Jeong YH, Kim JH, Kim S, Cho JC, Heo Y, Suh KD, Shin K, An S. (2014) Method for detecting the reactivity of chemicals towards peptides as an alternative test method for assessing skin sensitization potential. *Toxicology Letters*, 225, 185–191.

Divkovic M, Pease CK, Gerberick GF, Basketter DA. (2005) Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis*, 53, 189-200.

Gerberick F, Aleksic M, Basketter D, Casati S, Karlberg AT., Kern P, Kimber I, Lepoittevin JP, Natsch A, Ovigne JM, Rovida C, Sakaguchi H, Schultz T. (2008) Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers: The report and recommendations of ECVAM Workshop 64. *Alternatives to Laboratory Animals*, 36, 215–242.

Krogull MK, Fennema O. (1987) Oxidation of tryptophan in the presence of oxidizing methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 66-70.

Natsch A, Gfeller H. (2008) LC-MS-based characterization of the peptide reactivity of chemicals to improve the in vitro prediction of the skin sensitization potential. *Toxicological Sciences*, 106, 464–478.

OECD. (2019). OECD guideline for the testing of chemicals, Section 4 : Health effects, Test No. 442C. In *Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)*. OECD.