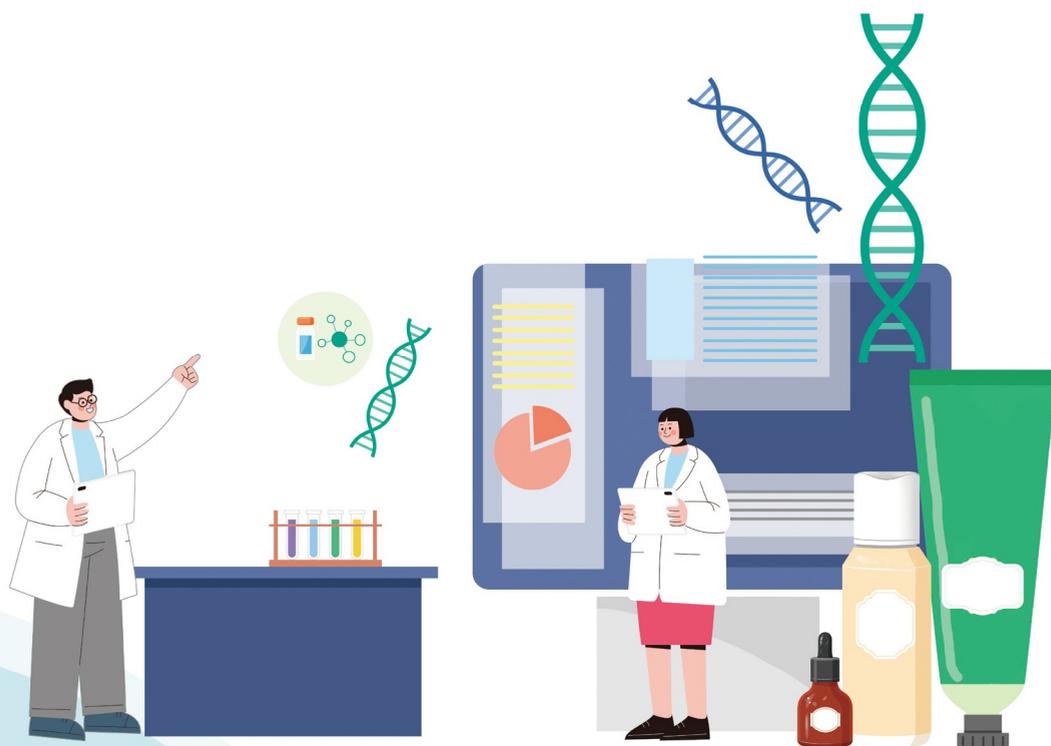


국민안심이 기준입니다
YOUR SAFETY IS OUR STANDARD

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 가이드라인

In Chemico 피부감작성 시험법, kDPRA

2022. 10.



식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭	화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 <i>(In Chemico)</i> 피부감작성 시험법, KDPPRA) 가이드라인(민원인 안내서)
-----------	---

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	※ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 : _____)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
※ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서 · 안내서 구분	<input type="checkbox"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(※지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(※안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	※ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2022년 10월 11일

담당자
 확 인(부서장)

강 남 희
 이 윤 속

이 안내서는 화장품 등 피부감작성 동물대체시험법(*In Chemico* 피부감작성 시험법, kDPRA) 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2022년 10월 11일 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ “민원인 안내서”란 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 특수독성과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-5153, 5155

팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-1231-01	2022. 10.	화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (<i>In Chemico</i> 피부감작성 시험법, kDPRA) 가이드라인(민원인 안내서) 제정

목 차

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(*In Chemico* 피부감작성 시험법, kDPRA) 가이드라인
(민원인 안내서)



I. 요약문	1
1. 개요	1
2. 시험원리	2
3. 제한점 및 고려사항	3
4. 시험방법	4
5. 데이터 및 보고서 작성	6
6. 인정요건	7
7. 시험결과 및 보고	9
II. 번역문	10
III. 원문	30

I

요약문

1 ▶ 개요

kDPRA 시험법은 시스테인(cysteine)을 함유한 인공 펩타이드에 대한 시험물질의 반응성을 시간 및 농도에 따라 정량화하여 단백질 반응성이라 일컫는 피부감작 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)의 분자 수준 개시 반응(molecular initiating event)을 예측하는 방법으로서, UN GHS 기준에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질(non-subcategory 1A)로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구분하는 화학적(*in chemico*) 시험법 (*In Chemico* 피부감작성 시험법, kinetic Direct Peptide Reactivity Assay, kDPRA)이다.

본 시험법은 반응속도상수(kinetic rate constant)를 계산한 다음, 시험물질의 최대 반응속도상수(maximum rate constant)($\log k_{\max}$ value in $s^{-1}M^{-1}$) 로그를 사용하여 UN GHS에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질[non-subcategory 1A(예: UN GHS subcategory 1B 또는 no category)]로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구분한다. 이론적 고찰(theoretical consideration)을 기반으로 시험물질과 피부 단백질 간 반응의 속도상수를 이용하여 주어진 양의 화학물질로부터 형성된 항원 단백질(epitope)의 양을 알아내거나, 반대로 감작성 발현 유도에 필요한 만큼의 항원 단백질을 형성하는데 필요한 시험물질 용량을 알아낸다.

본 시험법의 단백질 반응성에 대한 정보만으로는 시험물질이 피부감작성이 없다고 결론을 내리기 어려우며, 본 시험법으로 얻어진 데이터는 다른 생체외(*in vitro*) 시험법들과 비시험법(기준 유사화합물에 대한 정보 등)으로부터 얻어진 다른 정보들과 조합하여 피부감작 통합독성 평가(Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) 맥락에서 사용될 수 있도록 한다.

본 시험법을 사용하는 실험실은 가이드라인에 제시된 9개의 숙련도 물질(부록 2)을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하고 가이드라인에서 제시하고 있는 인정요건 모두를 만족시키는 결과값만이 유효한 것으로 인정된다.

2 ▶ 시험원리

kDPRA는 *in chemico* 시험법인 DPRA(TG442C Appendix 1 참조)를 변형한 시험법이다. kDPRA는 DPRA(Direct Peptide Reactivity Assay)에서도 사용되는 시스테인-펩타이드(Ac-RFAACAA-COOH)를 사용하는 반면 라이신을 함유한 펩타이드(Ac-RFAAKAA-COOH)는 사용하지 않는다. kDPRA와 DPRA에서 시험 펩타이드의 최종 농도(0.5 mM)와 반응 배지(25% acetonitrile in phosphate buffer)는 동일하다. DPRA는 단일 시점(≥ 24 h)에서 시험물질의 한 가지 농도만을 측정하는 반면, kDPRA는 $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 에서 5개 농도와 6개의 시점에서 병렬반응(parallel reaction)을 수행한다. monobromobimane(mBrB; CAS 74235-78-2)을 추가하여 반응을 멈춘 다음 각 반응시간 후의 시스테인-펩타이드 잔여 농도를 측정한다. 고(高)반응성, 비(非)형광 mBrB는 펩타이드 모델이 결합하지 않은 시스테인 잔기(moiety)와 반응하여 형광복합체(fluorescent complex)를 형성하며, 이를 측정하여 소실되지 않은 펩타이드 농도를 정량화한다. 최고 농도의 소실율이 역치(threshold)인 13.89%를 초과하고, 이러한 소실율이 펩타이드 단독 대조군 대비 통계적으로 높은 경우 추가적인 계산이 이루어져야 한다.

각 시점에서 시험물질의 농도 대비 소실되지 않은 펩타이드 농도의 자연로그(natural logarithm) 도표를 그린다. 선형적 관계가 관찰되는 경우(상관계수 > 0.90), $[\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}]$ 에서의 반응속도상수를 계산하기 위해 도표의 기울기를 결정하고 이를 배양시간으로 나눈다. 여기서 나온 값을 $[\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}]$ 에서 속도상수로 전환하고 로그를 계산한다. 모든 시점에서 관찰된 최댓값은 k_{max} 로 간주되며 이러한 최대속도상수가 kDPRA의 일차 판독값이다. 이를 이용하여 시험물질과 시험 펩타이드 반응의 최대반응속도를 정량화한다. 이후 시스테인-펩타이드 소실의 반응속도로 UN GHS에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질(non-subcategory 1A)로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구별한다. $\log k_{\text{max}} \geq -2.0$ 를 가진 화학물질은 UN GHS subcategory 1A로 예측된다.

3 ▶ 제한점 및 고려사항

본 시험법은 공유결합(covalent binding)이 아닌 다른 메커니즘을 통해 단백질과 반응하는 것으로 알려진 금속화합물(metal compounds)에는 적용할 수 없다. 나아가 kDPRA는 시스테인-펩타이드와의 반응성만을 측정하므로 라이신 반응성만을 가진 강한 감작성 물질(예: 할로겐화 아실; acyl-halides, 페놀에스터; phenolesters, 알데하이드; aldehydes)은 kDPRA의 적용 가능 범위에서 제외된다. 그러나 현재까지 극히 일부의 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질만이 라이신 잔여물에만 반응하는 것으로 알려져 있다. 더불어 DPRA 또는 ADRA(Amino acid Derivative Reactivity Assay)가 강한 라이신 반응성을 가지는 것을 감안할 때 단계적 전략(tiered strategy)에서는 이러한 불확실성이 줄어들 수 있다. 펩타이드와 공유결합하지 않고 산화를 촉진시키는 시험물질(cysteine dimerization)은 펩타이드 소실 측정량을 높일 가능성이 있어 위양성으로 예측되거나 실제보다 높은 반응 등급이 부여될 수 있다. 여기에 기술된 kDPRA 시험법은 대사계(metabolic system)를 모두 포함하지 않는 *in chemico* 시험법이다. 효소에 의한 생체활성(bioactivation)으로 피부감작성을 유발하는 화학물질(pro-hapten)의 반응성은 본 시험법으로는 정확히 검출할 수는 없다. 그러나 강한 피부감작성 물질 식별의 경우, 약한 피부감작성 물질의 식별보다는 pro-hapten 검출한계가 두드러지게 나타나지는 않았다. 비생물학적 변형(abioc transformation)을 거쳐 피부감작성을 나타내는 화학물질(pre-hapten) 대부분의 경우 *in chemico* 시험법으로 올바르게 감지되는 것으로 보고되었다. 동시에 급속히 산화되는 pre-hapten은 전반적인 반응속도를 늦추는 산화 유도기(lag-phase)로 인해 거의 모든 *in vitro* 피부감작성 시험법에서와 마찬가지로 kDPRA에서 과소예측 될 수 있다. 위의 내용에 비추어, kDPRA로 획득한 subcategory 1A 분류로 이어지지 않는 시험결과는 현재 알려진 제한점의 맥락에서 해석되어야 한다.

kDRPA는 UN GHS에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질(non-subcategory 1A)로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구분하는데 사용될 수 있다. DPRA 또는 ADRA 등의 다른 시험법과 조합하여 사용하거나 IATA 또는 DA 등의 통합접근법에서 사용되는 경우 다른 key-event 기반 시험법과 마찬가지로 피부감작성에 대한 좀 더 종합적인 분석을 위해 kDPRA의 수행능력에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

4 ▶ 시험방법

4.1 시스테인-펩타이드 용액의 조제

- 1) 순도 95% 이상의 합성 펩타이드(Ac-RFAACAA-COOH)를 함유한 시스테인 저장용액(Stock Solution)은 시험물질과 함께 반응(배양)시키기 직전에 조제한다.
- 2) 시스테인-펩타이드의 최종농도는 아세토니트릴(acetonitrile)에 용해되는 시험물질의 경우 pH 7.5 인산완충용액(phosphate buffer)에서 0.667 mM이며, pH 7.5 phosphate buffer에서 용해되는 시험물질의 경우 1.0 mM이다.

4.2 시험용액 조제

- 1) 분석하기 전 적절한 용매에 시험물질의 용해 여부를 확인해야 한다. 시험물질을 녹인 용액은 육안으로 보기에 투명해야 한다.
- 2) 시험물질을 완전히 용해할 수 있는 비반응성(non-reactive), 수용성(water-miscible) 용매를 사용해야 한다. 적절한 용매는 아세토니트릴이며, 아세토니트릴에서 용해되지 않는 물질의 경우 pH 7.5 phosphate buffer에서 가용성(solubilization)을 평가한다. 펩타이드 용액의 안정성에 영향을 주지 않는 다른 용매들도 사용할 수 있다. DMSO를 용매로 사용하는 것은 펩타이드 이합체화(dimerization)를 유발할 수 있으므로 지양해야 한다.
- 3) 시험물질의 순도를 고려하여 시험물질을 유리 바이알(vial)에 칭량한 후, 용매에 녹여 20 mM 용액으로 조제한다. 시험물질 희석액은 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mM 농도로 연속 희석하여 준비한다.

4.3 양성대조군, 용매대조군, 시험물질대조군 및 공대조군 조제

- 1) 양성대조군(Positive Control, PC): 시험 직전 신나믹알데하이드(cinnamic aldehyde)를 아세토니트릴에 20 mM 농도로 용해하고, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mM 농도로 준비한 연속 희석액을 사용한다.
- 2) 용매대조군(Vehicle Control, VC): 버퍼와 용매에 각각 용해한(시험물질 및 양성대조군 미포함) 펩타이드로, 음성대조군으로 간주한다. 시험물질 또는 양성대조군 배양 용액의 펩타이드 소실은 각각의 용매대조군 대비 계산한다.

- 3) 시험물질대조군: 본 시험법은 펩타이드 없이 용매와 버퍼에 용해한 각 시험물질 농도의 시험물질대조군을 포함한다. 이들 대조군은 monobromobimane(mBrB) 간섭 등을 평가하기 위해 시험물질의 형광 측정 간섭[자가형광 및 퀸칭(quenching)] 검출에 사용되며, 또한 기준 측정값(background measurement)으로 사용된다.
- 4) 공대조군(Blank Control, BC): 기준 측정값으로 사용되며 시험물질, PC, 펩타이드를 제외한 용매와 버퍼를 사용하여 준비한다.

4.4 시험물질과 시스테인-펩타이드 용액과의 반응

- 1) 시험물질과 양성대조군(PC)의 연속 희석액은 96-well microtiter plate(적용 플레이트)에 준비한다. 이후 각 노출시간별로 kDPRA 프로토콜에서 권장하는 것과 같이 사전에 정해진 배열에 따라 해당하는 시약(펩타이드 저장용액, 용매 및 버퍼 용액)을 넣어 96-well black assay plate(시험 플레이트)를 준비한다. 각 시험물질 농도는 3반복(triplicate)으로 분석되어야 한다. 적용 플레이트의 시험물질과 PC 희석액을 시험 플레이트에 넣어 반응을 개시한다.
- 2) 시험물질 용액을 펩타이드 용액에 넣은 직후에 시험물질의 수용성이 낮아 침전이 관찰되는 경우 용액 속에 펩타이드와 반응할 수 있는 시험물질이 얼마나 남아있는지 알 수 없으므로, 이러한 경우 양성 결과($\log k_{\max} \geq -2.0$)는 사용할 수 있지만 음성 결과(반응하지 않았거나 $\log k_{\max} < -2.0$ 의 결과)는 주의를 기울여서 해석해야 한다.
- 3) 시험물질과 PC를 넣은 다음 공기 차단 접착 호일로 플레이트를 밀봉하고 최소 200 rpm에서 5분간 섞어준다.
- 4) 시험 플레이트 용액은 mBrB 용액을 추가하기 전 $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 온도에서 빛을 차단한 채로 다수의 배양(노출)시간(예: 10, 30, 90, 150, 210, 1440 min)을 사용하여 배양한다. 물질에 따라 최적의 시점을 조사하기 위해 배양시간은 변경될 수 있다(1440 min의 경우 DPRA 배양시간에 해당하므로 항상 시험해야 한다). 배양 (노출)시간은 시험물질과 PC 희석액을 시험 플레이트에 적용한 이후부터 mBrB를 추가하기 전까지의 시간 간격이다.

4.5 형광 측정

- 1) 원하는 배양(노출)시간에 도달하면 빛을 차단한 상태에서 새로 준비한 mBrB 용액(3 mM in acetonitrile)을 시험 플레이트(노출시간별로 하나씩)의 well에 빠르게 적용한다.
- 2) 공기 차단 접착 호일로 플레이트를 밀봉하고 최소 200 rpm에서 5분간 섞어준다.

- 3) 390 nm 여기필터(excitation filter)와 480 nm 방출필터(emission filter)를 사용하여 형광 강도를 측정한다.

5 ▶ 데이터 및 보고서 작성

5.1 데이터 평가

DM-ALM 프로토콜에서 제공하는 자동 계산 엑셀 템플릿을 데이터 평가에 사용해야 한다. 자세한 설명은 DB-ALM protocol no. 217에서 제공한다.

- 1) 각 노출(배양)시간 't'에 대해 아래의 매개변수가 계산된다.
 - 12개 공대조군(BC) 형광 강도의 산술평균과 표준편차
 - 12개 용매대조군(VC) 형광 강도의 산술평균과 표준편차
 - VC 값을 보정하기 위해 VC 값에서 평균 BC 값을 빼준다.
 - 각 시험물질과 PC 농도에 대해 보정된 시험물질 또는 PC 값을 계산하기 위해 시험물질과 대조군 값을 각각의 획득된 값에서 빼준다.
- 2) 노출시간별 각 시험물질 농도의 상대적 펩타이드 소실율(%)을 결정하기 위해 아래의 계산을 수행한다.

$$\text{상대적 펩타이드 소실율}[\%] = \left[1 - \left(\frac{\text{보정된 시험물질 또는 PC 값}}{\text{보정된 VC의 평균}} \right) \right] \times 100$$

- 3) 각 시험물질 농도 별로 3개 반복시험(replicates)의 산술평균과 표준편차를 계산한다 (노출시간별로 계산). 3개 반복시험에서 측정된 펩타이드 농도가 12개 VC well에서 농도와 비교하여 통계적으로 유의미하게 낮은지 판단하기 위해 student's t-test를 수행한다. 주어진 시간에 최대 시험물질 농도(최종 시험물질농도 5 mM)에서 13.89% 이상(≥)의 펩타이드 소실이 관찰되는 경우, 그 차이가 VC와 통계적으로 다른 경우 kDPRA의 반응속도상수는 아래에 기술된 것과 같이 결정된다. 이러한 '양성 기준'은 DPRA의 시스템 단독 예측 모델의 펩타이드 반응 양성 기준에 근거한다. 양성 기준이 충족되지 않는 경우 해당 시험물질은 28단락에 나오는 예측 모델에 따라 반응하지 않는 것으로 간주한다.

각 시점 별 시험물질의 농도 대비 소실되지 않은 펩타이드 농도의 자연로그값은 도표로 그려진다(plot). 선형적 관계가 관찰되는 경우(상관계수 > 0.99), 곡선의 기울기가 결정된다. 이러한 음성 기울기의 절댓값은 관찰된 반응속도상수와 호응한다(mM^{-1} 에서 유사일차반응속도상수(pseudo first order rate constants) k_{observed}). 각 노출시간별 k_{observed} 값으로부터 농도 및 배양(노출)시간 't' 별 반응속도상수(k_t)를 아래와 같이 계산한다.

$$k_t [M^{-1}s^{-1}] = k_{\text{observed}} \times \frac{1000}{60 t}$$

여기서 't'는 분으로 표시한 노출시간이다. 선형적 관계가 관찰되지 않는 경우 27단락 (ii)의 권고사항을 수행한다.

6 ▶ 인정요건

6.1 시험(Run)의 유효성 충족 기준

- 1) 양성대조군(PC): 90 min에서 PC의 $\log k$ ($\log k_{90 \text{ min}}$)는 1.75 에서 $-1.40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 내에 있어야 한다. 반응이 통계적으로 유의미하지 않는 등의 이유로 $\log k_{90 \text{ min}}$ 을 얻을 수 없는 경우 150 min에서의 값($\log k_{150 \text{ min}}$)을 고려할 수 있으며, 그 값은 -1.90 에서 $-1.45 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 내에 있어야 한다.
- 2) 용매대조군(VC): 플레이트 내 12개 VC 값의 변동계수는 6개 노출시간 중 최소 5개에서 12.5% 미만(<)이어야 한다.

이 기준 중 하나라도 충족시키지 못하면 데이터는 폐기하고 재시험해야 한다.

6.2 시험물질 결괏값의 유효성 충족 기준

- 1) 중단 시점(Interrupted time-course): 시험물질에 따라 조사된 최적의 시점 중 초기 시점에 현저한 양의 펩타이드 소실이 관찰된다면, 시험물질 고유의 비선형 반응 또는 실험상황에서의 변수(experimental variation)가 있는 것이다. 이러한 경우 해당 run을 재수행한다. 동일한 양상이 반복되는 경우 시험물질 고유의 비선형 반응이 있는 것이며 초기 시점에서 관찰된 반응속도상수를 수용한다.

- 2) 비선형 농도-반응: 농도-반응이 비선형적으로 나타나는 경우는 거의 없지만 분명한 소실에 대해서는 주의를 기울여야 한다. 이러한 경우 회귀 분석은 $R^2 < 0.90$ 이기 때문에 기울기로 속도상수를 계산하지 않는다. 그 대신 다음의 공식에 따라 개별 소실값을 기반으로 속도상수를 계산할 수 있다.

$$k = [\ln(100/(100 - dp))]/(E \times t)$$

‘dp’는 소실율(%)이며 ‘E’는 시험물질의 농도, ‘t’는 배양(노출)시간이다. 이 공식에 따른 속도상수는 한계점인 13.89% 이상의 소실값과 함께 각 시점 ‘t’와 각 농도 ‘E’ 별로 계산된다. 각 시점 ‘t’에서 서로 다른 농도의 평균값을 계산하며 어느 한 시점에서의 최고 속도에 대한 k_{max} 를 기록한다.

이 경우 이러한 비선형적 움직임이 시험물질 고유의 성질 때문인지 실험상 오류 때문인지 확인하기 위해 재시험을 수행해야 한다. 비선형성이 다시 나타나는 경우 개별 소실값에 기반한 이러한 대안적인 속도 계산이 최종 평가에 사용된다.

- 3) 자가형광 또는 퀘칭(quenching) 등의 형광 간섭: 펩타이드 없이 시험물질만 있는 대조군 well을 기반으로 하여 시험물질로 인한 자가형광 및 퀘칭의 발생을 감지할 수 있다. 시험물질대조군 well에서 측정되는 자가형광에 대한 값을 보정하기 때문에 자가형광이 낮은 경우에는 이것이 문제가 되지 않지만, 자가형광이 높은 경우 펩타이드 대사체(peptide-adduct)의 형광과 자가형광이 완전히 가산(additive)되지 않을 수 있으며, 자가형광값을 빼줌으로써 소실을 명확하게 확인할 수 있는데, 이는 펩타이드 신호가 측정되지 않은 것이 아니라 비가산성(non-additivity) 때문이다. 그러므로 관찰된 소실이 시간과 관련이 있는지 확인해야 한다. 시간과 관련되지 않으면서 자가형광이 관찰되면 자가형광으로부터의 소실이 발생하는 것으로 가정할 수 있다. 형광 퀘칭은 ‘거짓소실(pseudo-depletion)’로 이어질 수 있지만, 이는 즉각적으로 발생하며 이로 인한 펩타이드 소실은 시간이 지남에 따라 증가하지 않는다. 두 가지 조건을 모두 충족하는 경우 퀘칭으로 인해 소실이 발생한 것으로 간주한다. 이러한 경우는 잘 발생하지 않는다. 결과에서 이유를 명백하게 알 수 없다면 run을 반복할 수 있으나 명백한 경우에는 반복이 필요 없다. 이러한 경우 자가형광 또는 퀘칭이 발생하지 않는 다른 형광 프로브(fluorescent probe)로 반응을 측정할 수 없다면, 해당 물질은 kDPRA에서 평가될 수 없다.

7 ▶ 시험결과 및 보고

시험결과보고서에는 시험물질, 대조물질, 펩타이드 정보, 양성 대조물질의 정보 및 조제 기록 등에 대한 정보가 포함되어야 하며 형광분석 기기(파장 설정을 포함한 형광광도계 정보) 및 숙련도 시험결과 등이 수록되어야 한다.

II

번역문(OECD TG442C)

생체의 피부감작성 시험법: kDPRA

In chemico Skin Sensitisation: kinetic Direct Peptide Reactivity Assay(kDPRA)

초기 고려사항, 적용가능성 및 제한점

1. kDPRA는 시스테인(cysteine)을 함유한 인공 펩타이드에 대한 시험물질의 반응성을 시간 및 농도에 따라 정량화하여 단백질 반응성이라 일컫는 피부감작성 AOP의 분자 수준 개시 반응(molecular initiating event)을 평가하기 위해 제안되었다(1)(2). 반응속도상수(kinetic rate constant)를 계산한 다음, 시험물질의 최대 반응속도상수(maximum rate constant)($\log k_{\max}$ value in $s^{-1}M^{-1}$) 로그를 사용하여 UN GHS 기준에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질[non-subcategory 1A(예: UN GHS subcategory 1B 또는 no category)]로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구분한다(3). 이론적 고찰(theoretical consideration)을 기반으로 시험물질과 피부 단백질 간 반응의 속도상수를 이용하여 주어진 양의 화학물질로부터 형성된 항원 단백질(epitope)의 양을 알아내거나, 반대로 감작성 발현 유도에 필요한 만큼의 항원 단백질을 형성하는데 필요한 시험물질 용량을 알아낸다. 180개의 화학물질을 평가하여 얻은 경험적 근거(empirical evidence)에 따르면 OECD 442C, 442D, 442E에서 사용된 모든 매개변수(parameter) 가운데 반응속도상수가 피부감작성(potency)의 가장 큰 결정 요인이었다(3).

2. kDPRA는 실제 훈련(hands-on training) 없이도 실험실로 전수가능한 것으로 나타났다(4). 검증연구에 사용된 24개 시험물질의 경우 UN GHS subcategory 1A 판정에 있어 kDPRA의 전반적인 실험실내 재현성(within-laboratory reproducibility)은 96%였으며 평균 실험실간 재현성(between laboratory reproducibility)은 88%였다(4). kDPRA의 적용가능범위에 해당하는 180개 시험물질에 대한 검증연구 결과(4)와 다른 연구결과(3)에 따르면 kDPRA는 LLNA 결과와 비교하여 균형 정확도(balanced accuracy) 85%, 민감도(sensitivity) 84%(38/45), 특이도(specificity) 86%(116/135)로 UN GHS에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질(non-subcategory 1A)로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구분할 수 있다는 것을 보여준다(3). kDPRA 시험결과를 DASS(Defined Approaches for Skin

Sensitization)에 대한 Test Guideline의 맥락에서 컴파일된 OECD LLNA 결과와 비교하는 경우에도 비슷한 수행능력(performance)을 나타냈다(15)¹⁾. 더불어, 비록 인체 참고 데이터에 상당한 불확실성이 있지만 인체 피부감작성 데이터(5)(6)가 있는 123개 시험물질(총 180개 중)의 예측 결과는 균형 정확도 76%, 민감도 64%(21/33), 특이도 89%(80/90)(3)였다²⁾. 나아가, 비동물 피부감작성 시험법을 평가하는 경우 LLNA 및 기타 동물시험이 인체의 반응을 완전히 반영하지 못한다는 점에 주목해야 한다. 비교해보자면, kDPRA 평가에 사용된 123개 물질의 데이터 세트에 근거하여 LLNA는 UN GHS subcategory 1A 식별에서 균형 정확도 73%, 민감도 55%(18/33), 특이도 91%(82/90)를 나타냈다. 가용한 데이터 전체를 기반으로 kDPRA의 적용 가능 범위는 다양한 유기작용그룹(organic functional group), 반응 기전(reaction mechanism), 피부감작성 역가(*in vivo* 연구에 기반) 및 물리화학적 특성을 포함하는 것으로 나타났다(3). 독립된 전문평가(peer review)(16)에서 kDPRA는 UN GHS에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질(non-subcategory 1A)로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구분하기에 과학적으로 유효한 것으로 간주되었다(7). 그러므로 kDPRA는 규제 체제에 따라 i) UN GHS Category 1 피부감작성 물질로 식별되는 화학물질의 “sub-categorization”을 위해 아래에 기술된 시험법으로 사용되거나 ii) 양성 시험결과를 이용하여 화학물질을 UN GHS subcategory 1A로 직접 분류함으로써 단독으로 사용될 수 있다.

3. 본 시험가이드라인에 사용되는 “시험물질(test chemical)”이라는 용어는 시험에 사용되고 있는 물질을 의미하며 물질(substances) 또는 혼합물(mixtures)에 대한 kDPRA의 적용가능성과는 관련이 없다. 본 시험법은 공유결합(covalent binding)이 아닌 다른 메커니즘을 통해 단백질과 반응하는 것으로 알려진 금속화합물(metal compounds)에는 적용할 수 없다. 나아가 kDPRA는 시스테인-펩타이드와의 반응성만을 측정하므로 라이신 반응성만을 가진 강한 감작성 물질(예: 할로젠화 아실; acyl-halides, 페놀에스터; phenolesters, 알데하이드; aldehydes)은 kDPRA의 적용 가능 범위에서 제외된다. 그러나 현재까지 극히 일부의 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질만이 라이신 잔여물에만 반응하는 것으로 알려져 있다. 더불어 DPRA 또는 ADRA가 강한 라이신 반응성을 가지는 것을 감안할 때 단계적 전략(tiered strategy)에서는 이러한 불확실성이 줄어들 수 있다. 펩타이드와 공유결합하지 않고 산화를 촉진시키는 시험물질(cysteine

1) DASS(Defined Approaches for Skin Sensitization)에 대한 Test Guideline의 맥락에서 컴파일된 LLNA 데이터세트와 비교하여 균형 정확도는 85%, 민감도 82% (31/38), 특이도 88% (102/116) 였다.
 2) DASS(Defined Approaches for Skin Sensitization)에 대한 Test Guideline의 맥락에서 컴파일된 인체 피부 감작 데이터 세트와 비교하여 균형 정확도는 67%, 민감도 53% (9/17), 특이도 81% (25/31) 였다.

dimerization)은 펩타이드 소실 측정량을 높일 가능성이 있어 위양성으로 예측되거나 실제보다 높은 반응 등급이 부여될 수 있다. 여기에 기술된 kDPRA 시험법은 대사계(metabolic system)를 모두 포함하지 않는 *in chemico* 시험법이다. 효소에 의한 생체활성(bioactivation)으로 피부감작성을 유발하는 화학물질(pro-hapten)의 반응성은 본 시험법으로는 정확히 검출할 수는 없다. 그러나 강한 피부감작성 물질 식별의 경우, 약한 피부감작성 물질의 식별보다는 pro-hapten 검출한계가 두드러지게 나타나지는 않았다(3). 비생물학적 변형(abiotic transformation)을 거쳐 피부감작성을 나타내는 화학물질(pre-hapten) 대부분의 경우 *in chemico* 시험법으로 올바르게 감지되는 것으로 보고되었다(8)(9). 동시에 급속히 산화되는 pre-hapten은 전반적인 반응속도를 늦추는 산화 유도기(lag-phase)로 인해 거의 모든 *in vitro* 피부감작성 시험법에서와 마찬가지로 kDPRA에서 과소예측될 수 있다. 위의 내용에 비추어, kDPRA로 획득한 subcategory 1A 분류로 이어지지 않는 시험결과는 현재 알려진 제한점의 맥락에서 해석되어야 한다(부록 1 참조). 즉, 방향족아민(aromatic amines), 카테콜(catechols) 또는 하이드로퀴논(hydroquinones)은 산화가 발생하는 경우에도 약한 반응성 확인을 위해 추가 데이터를 필요로 할 수 있으며, DPRA 또는 ADRA 등에 따른 라이신 잔여물에만 반응하는 acyl-halides, phenol-esters 또는 aldehydes는 약한 반응성 확인을 위해 추가 데이터를 필요로 할 수 있다.

4. 시험에 사용되는 시험물질은 최종농도 20 mM에서 적절한 용매에 용해될 수 있어야 한다(12~13단락 참조). 20 mM에서 용해되지 않는 시험물질도 k_{max} 값(kDPRA에서 시험되는 물질의 반응속도(reaction kinetics)로부터 결정된 $s^{-1}M^{-1}$ 에서의 최대속도상수, 24단락 참조)이 산출되는 경우 20 mM 보다 낮은 농도에서 시험 될 수 있다. 이 경우 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 예측으로 이어지는 양성 결과($\log k_{max} \geq -2.0$)는 사용할 수 있지만 음성 결과로는 확실한 결론($\log k_{max} < -2.0$)을 내릴 수 없다.

5. kDPRA는 시험물질의 자가형광(autofluorescence) 가능성, 형광물질 퀸칭(quenching), 또는 시약(모노브로모비메인; monobromobimane)과의 상호작용에 주의를 기울여야 하는 형광 판독을 사용한다. 특히, 16단락에 기술된 바와 같이 각각의 시험물질에 대한 대조군을 시험에 포함시키고, 결정된 펩타이드 소실과 별개로 배양시간을 평가하는 것이 중요하다. 나아가, 일차 SH-기(thiol)를 가진 시험물질의 경우 monobromobimane과 상호작용하여 발광이 증가하므로 kDPRA로 시험 될 수 없다. 끝으로 kDPRA의 시험조건(neutral, aqueous conditions)에서 분해되어 자유 SH-기를 방출하는 화학물질 또한 유사한 한계를 가질 수 있다.

6. kDPRA의 검증연구에서 조성(composition)이 알려진 다성분 물질(multi-constituent substances) 및 혼합물(mixture)을 시험하지는 않았지만, 기술적으로는 이러한 물질도 kDPRA에 적용 가능한 것으로 간주한다. 이러한 경우 단일 순도(single purity)는 성분(물은 제외) 비율의 합으로 결정하며, 단일 분자량(single apparent molecular weight)은 혼합물에서 각 성분(물은 제외)의 분자량과 이들 각각의 비율을 고려하여 결정할 수 있다. 이렇게 계산된 순도와 분자량으로 20 mM 용액을 준비하는데 필요한 시험물질의 양을 계산할 수 있다. 조성이 알려진 혼합물 및 다성분 물질에서 얻은 결과는 비선형적(non-linear)으로 나타날 수 있으므로 27단락에 기술되어 있는 조항을 활용해야 한다. 조성이 알려져 있지 않거나 가변적인 혼합물 및 물질, 복잡한 반응성 생성물, 또는 생물제제(UVCB 물질)의 경우 정의된 몰비(molar ratio)가 필요한 kDPRA에 적용될 수 없다. 혼합물, 시험하기 어려운 화학물질(예: 불안정한 물질) 또는 본 가이드라인의 적용 가능 범위에 명확히 포함되지 않는 시험물질을 시험하려는 경우에는 이러한 시험의 결과가 과학적으로 유의미한 결과를 산출할 것인지에 대한 사전 고찰이 필요하다. 끝으로 특정 카테고리 물질에 대해 kDPRA를 적용할 수 없음을 보여주는 증거가 있는 경우 이러한 물질에 kDPRA를 적용해서는 안 된다.

7. kDRPA는 UN GHS에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질(non-subcategory 1A)로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구분하는데 사용될 수 있다(3). DPRA 또는 ADRA 등의 다른 시험법과 조합하여 사용하거나 IATA 또는 DA 등의 통합접근법에서 사용되는 경우 다른 key-event 기반 시험법과 마찬가지로 피부감작성에 대한 좀 더 종합적인 분석을 위해 kDPRA의 수행 능력에 대한 추가적인 연구가 필요하다(3)(10).

시험법의 원칙

8. kDPRA는 *in chemico* 시험법인 DPRA(TG442C Appendix 1 참조)를 변형한 시험법이다. kDPRA는 DPRA에서도 사용되는 시스테인-펩타이드(Ac-RFAACAA-COOH)를 사용하는 반면 라이신을 함유한 펩타이드는 사용하지 않는다. kDPRA와 DPRA에서 시험 펩타이드의 최종농도(0.5 mM)와 반응 배지(25% acetonitrile in phosphate buffer)는 동일하다. DPRA는 단일 시점(≥ 24 h)에서 시험물질의 한 가지 농도(시스테인-펩타이드의 경우 5 mM)만을 측정하는 반면, kDPRA는 $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 에서 5개 농도(5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 mM)와 6개의 시점(10, 30, 90, 150, 210, 1440 min)에서 병렬반응(parallel reaction)을 수행한다. monobromobimane (mBrB; CAS 74235-78-2)을 추가하여 반응을 멈춘 다음 각 반응시간 후의 시스테인-펩타이드 잔여 농도를

측정한다. 고(高)반응성, 비(非)형광 mBrB는 펩타이드 모델이 결합하지 않은 시스테인 잔기(moiety)와 반응하여 형광복합체(fluorescent complex)를 형성하며, 이를 측정하여 소실되지 않은 펩타이드 농도를 정량화한다. 최고 농도의 소실율이 역치(threshold)인 13.89%(DPRA의 시스테인 단독 펩타이드 모델에서 양성 판정에 사용된 질사 값)를 초과하고, 이러한 소실율이 펩타이드 단독 대조군 대비 통계적으로 높은 경우 추가적인 계산이 이루어져야 한다(그렇지 않은 경우 28단락에 보여지는 예측모델에 따라 해당 시험물질은 비(非)반응성으로 간주된다). 각 시점에서 시험물질의 농도 대비 소실되지 않은 펩타이드 농도의 자연로그(natural logarithm) 도표를 그린다. 선형적 관계가 관찰되는 경우(상관계수 > 0.90), $[\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}]$ 에서의 반응속도상수를 계산하기 위해 도표의 기울기를 결정하고 이를 배양시간으로 나눈다. 여기서 나온 값을 $[\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}]$ 에서 속도상수로 전환하고 로그를 계산한다. 모든 시점에서 관찰된 최댓값은 k_{max} 로 간주되며 이러한 최대속도상수가 kDPRA의 일차 판독값이다. 이를 이용하여 시험물질과 시험 펩타이드 반응의 최대반응속도를 정량화한다. 이후 시스테인-펩타이드 소실의 반응속도로 UN GHS에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질(non-subcategory 1A)로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구별한다. $\log k_{\text{max}} \geq -2.0$ 를 가진 화학물질은 UN GHS subcategory 1A로 예측된다. 또한, Kinetic 비율 상수는 유해성 평가에 필요한 연속적인 규모에서 시험물질의 피부감작성 역가 평가를 위해 IATA나 DA와 같은 통합접근법에 사용될 수 있다(3)(10).

9. 실험실은 kDPRA를 일상적으로 사용하기 전에 부록 2에 제시된 9개의 숙련도 물질을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다.

시험절차

10. 본 시험법은 산업계에서 조율한 검증연구에 사용된 프로토콜인 kDPRA DB-ALM protocol no 217(11)을 기반으로 한다. 실험실에서 본 시험법을 적용 및 사용하는 경우 kDPRA DB-ALM protocol no 217을 사용할 것이 권장된다. kDPRA의 주요 요소와 절차는 아래에 기술되어 있다.

시스테인-펩타이드 준비

11. 순도 95% 이상의 합성 펩타이드(Ac-RFAACAA-COOH)를 함유한 시스테인 저장용액(Stock Solution)은 시험물질과 함께 반응시키기 직전에 조제한다. 시스테인-펩타이드의 최종농도는 아세토니트릴(acetonitrile)에 용해되는 시험물질의 경우 pH 7.5 인산완충용액(phosphate

buffer)에서 0.667 mM이며, pH 7.5 phosphate buffer에서 용해되는 시험물질의 경우 1.0 mM이다.

시험물질 준비

12. 시험 수행 전 적절한 용매에서 시험물질의 용해 여부를 확인해야 한다. 시험물질을 완전히 용해할 수 있는 비반응성(non-reactive), 수용성(water-miscible) 용매를 사용해야 한다. 용해도는 육안검사로 확인하는데, 투명한 용액이 형성되면 해당 시험물질이 용해된 것을 확인하기에 충분한 것으로 간주한다. 선호되는 용매는 아세토니트릴이다. 아세토니트릴에서 용해되지 않는 물질의 경우 pH 7.5 phosphate buffer에서 가용성(solubilization)을 평가한다. 이 외의 용매가 시험에 사용된 적은 없지만, 모든 대조군이 동일한 용매로 준비될 수 있고, 양성대조군과 숙련도 물질에서 얻은 반응속도가 26단락과 부록 2에 각각 기술된 범위 내에 들어가는 등 시험법을 간섭하지 않는다는 것이 증명되는 경우 다른 용매를 사용할 수 있다. DMSO를 용매로 사용하는 것은 펩타이드 이합체화(dimerization)를 유발할 수 있으므로 지양해야 한다.

13. 시험물질은 유리 바이알에 넣고 무게를 칭량해야 하며 시험 직전 12단락에 기술된 적절한 용매를 사용하여 20 mM 용액을 준비한다. 시험물질 희석액은 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mM 농도로 연속 희석하여 준비한다.

대조군 준비

14. 신나믹알데하이드(Cinnamic aldehyde, CAS 104-55-2; $\geq 95\%$ 순도)를 양성대조군(Positive Control, PC)으로 사용하며, 시험 직전 아세토니트릴에 20 mM 농도로 용해한다. 그런 다음 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mM 농도로 양성대조군 연속 희석액을 준비한다. 본 시험법에서는 정확한 반응속도를 측정하여 양성대조군의 지속 사용을 통해 실험실 간(검증연구 데이터 비교) 및 실험실 내(과거 대조군 비교)의 정량적 비교가 가능하므로 다른 양성대조군의 사용은 권장하지 않는다.

15. 음성대조군으로 간주되는 용매대조군(Vehicle Control, VC)은 버퍼와 용매에 각각 용해한(시험물질 및 양성대조군 미포함) 펩타이드이다. 시험물질 또는 양성대조군 배양 샘플의 펩타이드 소실은 각각의 용매대조군 대비 계산된다.

16. 본 시험법은 펩타이드 없이 용매와 버퍼에 용해한 각 시험물질 농도의 시험물질대조군을 포함한다. 이들 대조군은 monobromobimane 간섭 등을 평가하기 위해 시험물질의 형광 측정 간섭[자가형광 및 퀸칭(quenching)] 식별에 사용되며, 또한 기준 측정값(background

measurement)으로 사용된다.

17. 공대조군(Blank Control, BC)은 기준 측정값으로 사용되며 시험물질, PC, 펩타이드를 제외한 용매와 버퍼를 사용하여 준비한다.

시험물질과 시스테인-펩타이드 용액의 반응

18. 시험물질과 PC의 연속 희석액을 96-well microtiter plate(적용 플레이트)에 준비한다. 이후 각 노출시간별로 kDPRA 프로토콜(11)에서 권장하는 것과 같이 사전에 정해진 배열에 따라 해당하는 시약(펩타이드 저장용액, 용매 및 버퍼 용액)을 넣어 96-well black assay plate(시험 플레이트)를 준비한다. 각 시험물질 농도는 3반복(triplicate)으로 분석되어야 한다. 적용 플레이트의 시험물질과 PC 희석액을 시험 플레이트에 넣어 반응을 개시한다. 시험물질 용액을 펩타이드 용액에 넣은 직후에 시험물질의 수용성이 낮아 침전이 관찰되는 경우 용액 속에 펩타이드와 반응할 수 있는 시험물질이 얼마나 남아 있는지 알 수 없다. 이러한 경우 양성 결과($\log k_{\max} \geq -2.0$)는 사용할 수 있지만 음성결과(반응하지 않았거나 $\log k_{\max} < -2.0$ 의 결과)는 주의를 기울여서 해석해야 한다(최대 20 mM 농도에서 용해되지 않는 물질의 시험에 대해 기술한 4단락의 조항 참조). 시험물질과 PC를 넣은 다음 공기 차단 접착 호일로 플레이트를 밀봉하고 최소 200 rpm에서 5분간 섞어준다. 시험 플레이트 용액은 mBrB 용액을 추가하기 전 $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 온도에서 빛을 차단한 채로 다수의 배양(노출)시간(예: 10, 30, 90, 150, 210, 1440 min)을 사용하여 배양한다. 물질에 따라 최적의 시점을 조사하기 위해 배양시간은 변경될 수 있다(빠르게 반응하는 물질의 경우 배양시간을 단축하는 것이 더 적절할 수 있음). 그러나 1440 min의 경우 DPRA 배양시간에 해당하므로 항상 시험해야 한다. 배양(노출)시간은 시험물질과 PC 희석액을 시험 플레이트에 적용한 이후부터 mBrB를 추가하기 전까지의 시간 간격이다.

형광 측정

19. 원하는 배양(노출)시간에 도달하면 빛을 차단한 상태에서 새로 준비한 mBrB 용액(3 mM in acetonitrile)을 시험 플레이트(노출시간 별로 하나씩)의 well에 빠르게 적용한다. 공기 차단 접착 호일로 플레이트를 밀봉하고 최소 200 rpm에서 5분간 섞어준다. 그런 다음 390 nm 여기필터(excitation filter)와 480 nm 방출필터(emission filter)를 사용하여 형광 강도를 측정한다.

데이터 및 보고서 작성

데이터 평가

20. DM-ALM 프로토콜에서 제공하는 자동 계산 엑셀 템플릿을 데이터 평가에 사용해야 한다. 자세한 설명은 DB-ALM protocol no. 217에서 제공한다(11).

21. 각 노출(배양)시간 't'에 대해 아래의 매개변수가 계산된다.

- 12개 공대조군(BC) 형광 강도의 산술평균과 표준편차
- 12개 용매대조군(VC) 형광 강도의 산술평균과 표준편차
- VC 값을 보정하기 위해 VC 값에서 평균 BC 값을 빼준다.
- 각 시험물질과 PC 농도에 대해 보정된 시험물질 또는 PC값을 계산하기 위해 시험물질과 대조군 값을 각각의 획득된 값에서 빼준다.

22. 노출시간별 각 시험물질 농도의 상대적 펩타이드 소실율(%)을 결정하기 위해 아래의 계산을 수행한다.

$$\text{상대적 펩타이드 소실율}[\%] = \left[1 - \left(\frac{\text{보정된 시험물질 또는 PC 값}}{\text{보정된 VC의 평균}} \right) \right] \times 100$$

23. 각 시험물질 농도 별로 3개 반복시료(replicates)의 산술평균과 표준편차를 계산한다(노출시간별로 계산). 3개 반복시료에서 측정된 펩타이드 농도가 12개 VC well에서 농도와 비교하여 통계적으로 유의미하게 낮은지 판단하기 위해 student's t-test를 수행한다.

24. (i) 주어진 시간에 최대 시험물질 농도(최종 시험물질농도 5 mM)에서 13.89% 이상(\geq)의 펩타이드 소실이 관찰되는 경우, (ii) 그 차이가 VC와 통계적으로 다른 경우 kDPRA의 반응속도 상수는 아래에 기술된 것과 같이 결정된다. 이러한 '양성 기준'은 DPRA의 시스템인 단독 예측 모델의 펩타이드 반응 양성 기준에 근거한다. 양성 기준이 충족되지 않는 경우 해당 시험물질은 28단락에 나오는 예측 모델에 따라 반응하지 않는 것으로 간주한다.

각 시점 별 시험물질의 농도 대비 소실되지 않은 펩타이드 농도의 자연로그값은 도표로 그려진다(plot). 선형적 관계가 관찰되는 경우(상관계수 > 0.99), 곡선의 기울기를 결정한다. 이러한 음성 기울기의 절댓값은 관찰된 반응속도상수에 해당한다[mM⁻¹에서 유사일차반응속도상수

(pseudo first order rate constants) $k_{observed}$]. 각 노출시간별 $k_{observed}$ 값으로부터 농도 및 배양(노출)시간 't' 별 반응속도상수(k_t)를 아래와 같이 계산한다.

$$k_t [M^{-1}s^{-1}] = k_{observed} \times \frac{1000}{60 t}$$

여기서 't'는 분으로 표시한 노출시간이다. 선형적 관계가 관찰되지 않는 경우 27단락 (ii)의 권고사항을 수행한다.

인정기준

26. 시험(run)이 유효한 것으로 간주되기 위해서는 아래의 기준을 충족해야 한다. 하나라도 충족되지 않는 경우 run을 재수행해야 한다.

- a. PC: 90 min에서 PC의 $\log k(\log k_{90 \text{ min}})$ 는 1.75 에서 $-1.40 M^{-1}s^{-1}$ 내에 있어야 한다. 반응이 통계적으로 유의미하지 않는 등의 이유로 $\log k_{90 \text{ min}}$ 를 얻을 수 없는 경우 150 min에서의 값($\log k_{150 \text{ min}}$)을 고려할 수 있으며, 그 값은 -1.90 에서 $-1.45 M^{-1}s^{-1}$ 내에 있어야 한다.
- b. VC: 플레이트 내 12개 VC 값의 변동계수는 6개 노출시간 중 최소 5개에서 12.5% 미만()이어야 한다.

27. 결과에 영향을 줄 수 있는 조건의 가능성 확인을 위해 시험물질로 얻은 데이터를 추가로 평가한다.

- (i) 중단 시점(Interrupted time-course): 시험물질에 따라 조사된 최적의 시점 중 초기 시점에 현저한 양의 펩타이드 소실이 관찰된다면, 시험물질 고유의 비선형 반응 또는 실험상황에서의 변수(experimental variation)가 있는 것이다. 이러한 경우 해당 run을 재수행한다. 동일한 양상이 반복되는 경우 시험물질 고유의 비선형 반응이 있는 것이며 초기 시점에서 관찰된 반응속도상수를 수용한다.
- (ii) 비선형 농도-반응: 농도-반응이 비선형적으로 나타나는 경우는 거의 없지만 분명한 소실에 대해서는 주의를 기울여야 한다. 이러한 경우 회귀 분석은 $R^2 < 0.90$ 이기 때문에 기울기로 속도상수를 계산하지 않는다. 그 대신 다음의 공식에 따라 개별 소실값을 기반으로 속도상수를 계산할 수 있다.

$$k = [\ln(100/(100 - dp))]/(E \times t)$$

‘dp’는 소실율(%)이며 ‘E’는 시험물질의 농도, ‘t’는 배양(노출)시간이다. 이 공식에 따른 속도상수는 한계점인 13.89% 이상의 소실값과 함께 각 시점 ‘t’와 각 농도 ‘E’ 별로 계산된다. 각 시점 ‘t’에서 서로 다른 농도의 평균값을 계산하며 어느 한 시점에서의 최고 속도에 대한 k_{max} 를 기록한다.

이 경우 이러한 비선형적 움직임이 시험물질 고유의 성질 때문인지 실험상 오류 때문인지 확인하기 위해 재시험을 수행해야 한다. 비선형성이 다시 나타나는 경우 개별 소실값에 기반한 이러한 대안적인 속도 계산이 최종 평가에 사용된다.

- (iii) 자가형광 또는 퀘칭(quenching) 등의 형광 간섭: 펩타이드 없이 시험물질만 있는 대조군 well을 기반으로 하여 시험물질로 인한 자가형광 및 퀘칭의 발생을 감지할 수 있다. 시험물질대조군 well에서 측정되는 자가형광에 대한 값을 보정하기 때문에 자가형광이 낮은 경우에는 이것이 문제가 되지 않지만, 자가형광이 높은 경우 펩타이드 대사체(peptide-adduct)의 형광과 자가형광이 완전히 가산(additive)되지 않을 수 있으며, 자가형광값을 빼줌으로써 소실을 명확하게 확인할 수 있는데, 이는 펩타이드 신호가 측정되지 않은 것이 아니라 비가산성(non-additivity) 때문이다. 그러므로 관찰된 소실이 시간과 관련이 있는지 확인해야 한다. 시간과 관련되지 않으면서 자가형광이 관찰되면 자가형광으로부터의 소실이 발생하는 것으로 가정할 수 있다. 형광 퀘칭은 ‘거짓소실’로 이어질 수 있지만 이는 즉각적으로 발생하며 이로 인한 펩타이드 소실은 시간이 지남에 따라 증가하지 않는다. 두 가지 조건을 모두 충족하는 경우 퀘칭으로 인해 소실이 발생한 것으로 간주한다. 이러한 경우는 잘 발생하지 않는다. 결과에서 이유를 명백하게 알 수 없다면 run을 반복할 수 있으나 명백한 경우에는 반복이 필요 없다. 이러한 경우 자가형광 또는 퀘칭이 발생하지 않는 다른 형광 프로브(fluorescent probe)로 반응을 측정할 수 없다면, 해당 물질은 kDPRA에서 평가될 수 없다(기술적 한계)(부록 1의 Section II DB-ALM 프로토콜 참조).
- (iv) 상기 모든 내용은 DB-ALM에 자세히 기술되어 있으며 데이터를 평가하는 경우 DB-ALM 프로토콜과 함께 제공된 엑셀 템플릿에서 자동 알림이 생성된다.

예측 모델

28. kDPRA는 UN GHS에 따라 subcategory 1A로 분류되지 않는 물질(non-subcategory 1A)로부터 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질을 구별하기 위해 시스테인-펩타이드 소실의 속도를 사용한다(3). 시험법으로 얻은 subcategory 1A로 분류되지 않는 결과는 3단락과 부록 1에 기술되어 있는 제한점의 맥락에서 해석해야 한다.

〈표 1〉 kDPRA 예측 모델

반응속도	kDPRA 예측
$\log k_{\max} \geq -2.0$	UN GHS subcategory 1A
Non-reactive or $\log k_{\max} < -2.0$	Not categorised as UN GHS subcategory 1A* (non-subcategory 1A)

* UN GHS No Category로부터 UN GHS subcategory 1B를 구별하기 위해서는 추가 정보가 필요하다. 사용 목적(예: IATA, DA)에 따라 본 정보는 kDPRA를 수행하기 전 또는 후에 산출될 수 있다.

29. $\log k_{\max}$ 결과가 kDPRA에서 계산된 경계선 범위에 들어가는 역치(threshold)인 -2.0에 근접한 경우(-1.93에서 -2.06 사이) 확정적 예측이 이뤄질 수 없다. 이러한 경우, 확정적 예측을 하기 위해 재시험 및/또는 추가 데이터가 필요하다.

30. 반응속도상수는 유해성 평가를 위해 필요한 확장된 규모에서 시험물질의 피부감작성 역가(potency)를 평가하기 위해 IATA 또는 DA 등의 통합적 접근법에서 사용될 수 있다.

시험결과 보고

31. 시험결과 보고서는 다음의 정보를 포함하여야 한다.

시험물질 및 대조군(양성대조군 및 용매대조군)

○ 단일성분 화합물

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별자 등과 같은 화학적 특징
- 물리적 성상, 형태, 용해도, 분자량 및 기타 물리화학적 성질
- 순도 및 불순물의 종류
- 해당하는 경우 시험 전처리방법(예, 가온 및 분쇄)

- 시험 농도
- 보관 조건과 안정성
- 양성대조군에 대한 추가 정보
 - 적합한 분석 인정기준을 보여주는 과거 양성대조군 결과에 대한 참고자료
- 용매 또는 대조군에 대한 추가 정보
 - 사용된 용매 또는 대조군 및 이들의 성분
 - 각 시험물질에 대한 용매 선정의 근거
 - 아세토니트릴의 경우 펩타이드 안정성에 대한 시험결과의 영향

펩타이드

- 공급사, 로트, 순도

형광분석

- 파장 설정을 포함한 형광광도계 정보(모델명, 종류)

숙련도 시험

- 시험시설이 시험법을 일상적으로 사용하기 전 숙련도 물질 시험을 통해 시험법 사용에 있어서의 숙련도를 증명했다는 것에 대한 문서

시험결과의 고찰

- 모든 의도치 않은 시험절차의 변경에 대한 설명
- kDPRA 시험법으로 획득한 시험결과 및 이들 결과가 29단락에서 기술한 범위 내에 있는지에 대한 고찰
- 배양시간 종료 시 반응혼합물 내 펩타이드의 형태 및 침전물을 다시 용해하거나 원심분리하였는지 등을 포함한 모든 관련된 관찰 결과에 대한 기술

결론

참고문헌

- (1) Wareing, B., Urbisch, D., Kolle, S. N., Honarvar, N., Sauer, U. G., Mehling, A. and Landsiedel, R., (2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data. *Toxicol In Vitro* 45, 134-145.
- (2) Roberts, D. W. and Natsch, A., (2009) High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 592-603.
- (3) Natsch, A., Haupt, T., Wareing, B., Landsiedel, R., and Kolle, S.N., (2020) Predictivity of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for sensitizer potency as-sessment and subclassification. *ALTEX*, 37(4), 652-664
- (4) Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaart, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A., (2020) The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial. *ALTEX*, 37(4), 639-651, DOI: 10.14573/altex.2004291.
- (5) Hoffmann S., Kleinstreuer N., Alépée N., Allen D., Api A. M., Ashikaga T., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Goebel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Lalko J. F., Martinozzi-Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Parakhia R., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D., Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol*, 2018. 48(5): p. 344-358.
- (6) Basketter, D. A., Alepee, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinozzi-Teissier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M. and Templier, M., (2014) Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.
- (7) International ad hoc Expert Panel, (2020) Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA) as a modified version of the DPRA assay according to OECD TG 442C, to extend its regulatory applicability to identify UN GHS Subcategory 1A.

- (8) S. Casati, K. A., B.D. Asturiol, D. Basketter, S. Dimitrov, C. Dumont, A.T. Karlberg, J. P. Lepoittevin, G. Patlewicz, D. Roberts, A. Worth, (2016) Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479> last accessed 27.05.206.
- (9) Urbisch, D., Becker, M., Honarvar, N., Kolle, S. N., Mehling, A., Teubner, W., Wareing, B. and Landsiedel, R., (2016) Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.
- (10) Natsch, A., Emter, R., Gfeller, H., Haupt, T. and Ellis, G., (2015) Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. *Toxicol. Sci.* 143, 319-32.
- (11) DB-ALM Protocol 217: The kinetic Direct Peptide Reactivity assay (kDPRA). Accessible at http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrcopendata/EURLECVAM/datasets/DBALM/LAEST/online/DBALM_docs/217_P_kDPRA_final_27Oct20.pdf.
- (12) Manuscript in preparation: Borderline ranges for in chemico and in vitro skin sensitization OECD test guideline methods determined from ring trials
- (13) ICCVAM, ICCVAM Test Method Evaluation Report: Usefulness and Limitations of the Murine Local Lymph Node Assay for Potency Categorization of Chemicals Causing Allergic Contact Dermatitis in Humans. 2011. NIH Publication 11-7709.
- (14) ECETOC, ECETOC Document No. 46: Potency Values from the Local Lymph Node Assay: Application to Classification, Labelling and Risk Assessment. 2008.
- (15) OECD (2021), Validation report: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 337 Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) OECD (2021), Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 338. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

용어 정의

정확도(Accuracy): 시험결과와 참고치의 일치 정도. 시험수행에 대한 평가 척도 및 상관성(relevance)의 한 측면. 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 일치성(concordance)과 정확도(Accuracy)는 같은 의미로 쓰임⁽¹⁾.

독성발현경로(AOP, Adverse Outcome Pathway): 분자수준의 시작단계를 거쳐서 생체내(*in vivo*) 유해반응까지 표적 화합물 또는 유사한 화합물 그룹으로부터 일어나는 일련의 사건⁽²⁾

변동계수(Coefficient of variation): 동일 반복시료로부터 얻은 데이터의 변동성을 나타내며 표준편차를 평균으로 나눈 값. 100을 곱하여 백분율로 나타냄

DA(Defined Approach): DA는 예측결과 산출을 위해 정해진 정보 출처에서 생산된 데이터(*in silico* 예측결과, *in chemico*, *in vitro* 데이터)에 적용되는 고정된 데이터 해석절차(예: 통계적 모델, 수학적모델)로 구성된다.

DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay

EURL ECVAM: the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing.

유해성(Hazard): 물질이 생명체, 생태계 또는 특정 인구집단에 노출될 때 유해영향을 야기할 가능성이 있는 물질 또는 상황(situation)의 본질적 특성

통합독성 평가(IATA, Integrated Approach to Testing and Assessment): 화학물질 또는 화학그룹의 유해성 동정(잠재력), 유해성 특성(효력), 안전성 평가(잠재력, 효력 또는 노출)를 위하여 사용되는 구조적 접근 방법. 유해성 잠재력, 위험성 및 심화 추적 필요성에 관한 규제결정을 위하여 모든 관련 데이터를 전략적으로 통합하고 경중을 가림으로써 최소한의 시험만 수행하도록 함

kDPRA: kinetic Direct Peptide Reactivity Assay

K_{max} : kDPRA에서 시험한 물질의 반응속도(reaction kinetics)로 결정한 $s^{-1}M^{-1}$ 에서의 최대반응상수(24단락 참조)

LLNA: TG429 국소림프절시험법(murine Local Lymph Node Assay)(2010년 제정)

분자적 초기 현상(Molecular Initiating Event): 독성발현경로의 시작단계로서 분자수준에서 화학물질에 의해 유도되는 생물계의 변화

혼합물(Mixture): 서로 반응하지 않는 두 가지 이상의 화학물질로 구성된 혼합물질 또는 용액⁽¹⁾

단일성분 화합물(Mono-constituent substance): 정량적인 구성에 따라 정의되며 하나의 주요 성분이 적어도 80% (w/w) 이상인 물질

다성분 화합물(Multi-constituent substance): 두 가지 이상의 주요성분의 양이 $\geq 10\%$ (w/w) 및 $< 80\%$ (w/w)인 물질. 다성분 물질은 생산과정의 산물. 혼합물과 다성분 물질의 차이는 혼합물은 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 섞어서 얻고 다성분 물질은 화학반응의 산물임

양성대조물질(Positive control): 시험계의 모든 구성요소를 포함하고 양성반응을 유도한다고 알려진 물질을 처리한 군. 시간에 따른 양성대조물질 반응의 변동성을 평가할 수 있다는 확신을 갖기 위하여 양성반응의 범위가 초과해서는 안 됨

Pre-haptens: 비생물학적 변형을 거쳐 피부감작성을 나타내는 화학물질

Pro-haptens: 피부감작성 발현을 위해 효소에 의한 생체활성(bioactivation)이 필요한 화학물질

표준참조물질(Reference control): 한 시험계의 모든 구성요소를 포함하면서 아무런 처리를 하지 않는 시험물질. 시험물질을 처리하기 위해 사용된 용매 또는 부형제 및 동일한 용매 또는 부형제로 녹인 시험물질로 처리한 시료의 기본반응(baseline response)을 정하기 위해 사용된 다른 대조 물질. 음성대조물질과 함께 시험될 때 표준참조물질은 용매 또는 부형제가 시험계와 상호작용 하는지 보여줌

상관성(Relevance): 시험과 관심효과의 관련성 및 시험이 특정 목적에 의미 있고 유용한지에 대한 설명. 상관성은 시험이 얼마나 관심 생물학적 효과를 정확하게 측정하고 예측하는지 나타내며 상관성은 시험법의 정확도(일치성)를 내포함⁽¹⁾

신뢰도(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내·실험실 간 재현성(reproducibility)으로 평가됨⁽¹⁾

재현성(Reproducibility): 동일한 방법으로 동일한 물질을 시험하였을 때 나온 결과의 일치(신뢰도 참조)⁽¹⁾

민감도(Sensitivity): 시험법으로 모든 양성 또는 활성 물질이 정확하게 분류되는 비율. 민감도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요한 고려사항임⁽²¹⁾

특이도(Specificity): 시험법으로 모든 음성 또는 비활성 물질이 정확하게 분류되는 비율. 특이도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요한 고려사항임⁽²¹⁾

물질(Substance): 생산과정을 통해 얻어지거나 자연상태로 얻어진 화학원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물을 포함함. 그러나 해당물질의 안정성이나 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외함⁽¹⁾

시스템 적합성(System suitability): 분석 배치를 운전하기 전에 표준물질을 분석하여 기기 성능(예, 민감도)을 판정⁽²²⁾

시험물질(Test chemical): 시험할 때 무엇을 사용하였는지 언급할 때 사용됨

UN GHS(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): 물리적, 보건적, 환경적 유해성의 수준 및 표준화된 유형에 따른 화학물질(물질 또는 복합화합물)의 분류체제로 픽토그램(pictogram), 표시방법, 유해 사항, 사전 주의사항 및 안전정보지 등의 소통 방식을 통해 화학물질의 유해 정보를 전달하여 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자 및 응급처치자 등)과 환경을 보호하고자 제시된 체계⁽³⁾

UVCB(Substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials): 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성으로 이루어진 화합물, 복잡한 반응산물 또는 생물학적 물질

검증된 시험법(Validated test method): 특정한 목적에 대한 상관성과 신뢰도를 충족시키고 과학적으로 입증된 원리에 근거한 시험법. 절대적으로 완벽하게 검증된 시험법은 없지만 특정한 목적과 관련됨⁽¹⁾

부록 1. kDPRA에 대해 알려진 제한점

아래의 표는 kDPRA에 대해 알려진 제한점의 요약을 제공한다.

물질등급/간섭	과소예측 및 간섭 가능성의 이유	데이터 해석	예시 물질
금속 및 무기 화합물	공유결합이 아닌 다른 메커니즘으로 단백질과 반응하는 것으로 알려짐	시험할 수 없음	Nickel sulphate : 7786-81-4
하이드로퀴논 (hydroquinone), 카테콜(catechol), 방향족아민 (aromatic amine)	산화 시간 지연으로 인해 반응율을 명백하게 감소시킬 수 있음	$\log k_{\max} < -2.0$ 결과는 산화 이후 낮은 반응이 확인될 수 있는 경우에만 수용 가능함	Paraphenylenediamine; 106-50-3; Human and LLNA 1A
티올(thiol) 또는 티올 유도물질 (releaser)	일차 티올기(SH-)를 가지거나 시험조건에서 분해되는 시험물질은 감지 프로브(probe)와 반응할 수 있음	티올 반응 프로브(probe)에 의한 유도체화를 가진 시험물질은 kDPRA에서 시험될 수 없음. HPLC 등의 다른 시험 펩타이드 속도 데이터가 필요함 (본 가이드라인에는 없는 내용)	Thioglycerol; 96-27-5; LLNA UN GHS category 1B; 인체데이터 없음
DPRA 또는 ADRA에서 관찰된 것과 같이 라이신에만 반응하는 시험물질	kDPRA는 시스테인-펩타이드와의 반응만을 측정함	아미노기(NH ₂ -)와 반응하지만 DPRA 또는 ADRA의 SH-기와는 반응하지 않는 물질의 $\log k_{\max} < -2.0$ 결과는 확정적이지 않음	일부 acylhalides, phenolesters 또는 aldehydes, Dihydrocoumarin, 119-84-6; LLNA UN GHS category 1B; 인체데이터 없음, Glutaric aldehyde; 111-30-8; 인체 및 LLNA UN GHS category 1A
Pro-hapten	효소에 의한 생체활성이 있어야 피부감작성 발현이 가능한 시험물질	Pro-hapten이 명확한 물질은 과소측정 될 수 있음. 단, pro-hapten이 명확한 물질(direct hapten이나 pre-hapten으로 작용하지 않는 물질 포함) 및 강한 알레르기 유발 물질은 희귀함	Diethylenetriamine; 111-40-0 (인체 1A, LLNA UN GHS category 1)
형광 감지 범위에서 들뜨는(excitation) 형광물질	시험물질 또는 mBrB-펩타이드 부가물의 형광이 가산(additive) 되지 않으면 거짓 소실이 관찰됨	시험법의 간섭을 평가하기 위해 DB-ALM 프로토콜 No 217의 고찰을 따를 것	Tetrachlorosalicyl anilide; 1154-59-; 인체 및 LLNA UN GHS category 1A

물질등급/간섭	과소예측 및 간섭 가능성의 이유	데이터 해석	예시 물질
기기의 방출범위 내에서 흡수하는 시험물질	시험물질이 mBrB-펩타이드 부가물의 발광을 퀘칭(quenching)하는 경우 거짓소실이 관찰됨	시험법의 간섭을 평가하기 위해 DB-ALM 프로토콜 No 217의 고찰을 따를 것	Vanillin, 121-33-5; LLNA NC; 인체데이터 없음
구성이 알려지지 않은 혼합물, 구성이 알려지지 않거나 가변적인 물질, 복잡한 반응 산물, 또는 생물학적제제	발간된 논문에 kDPRA의 적용가능성에 대한 정보 없음	없음	UVCBs, 화학물질 배출물(chemical Emissions), 조성이 가변적이거나 완전히 알려지지 않은 제품 및 제제
물 또는 아세토니트릴에 용해할 수 없거나 수용성 용매와 호환하지 않는 시험물질	충분한 노출에 도달할 수 있을지 알 수 없음	이러한 경우 UN GHS subcategory 1A 피부감작성 물질로 시험물질을 식별하는데에 $\log k_{max} > -2.0$ 가 사용될 수 있지만 $\log k_{max} < -2.0$ 의 경우에는 명확한 결론을 도출할 수 없음 12단락에 주어진 전제에 따라 다른 용매가 사용될 수 있음	없음
반응용액에서 침전되는 시험물질	충분한 노출에 도달할 수 있을지 불확실함. 시험물질의 낮은 용해도로 인해 시험물질 용액을 펩타이드 용액에 추가하는 즉시 침전이 관찰되는 경우, 얼마만큼의 시험물질이 펩타이드와 반응하기 위해 용액에 남아 있는지 확신할 수 없음	이러한 경우 양성결과($\log k_{max} \geq -2.0$)는 사용될 수 있지만 음성결과(미반응 또는 $\log k_{max} < -2.0$ 의 결과)는 신중하게 해석해야 함 (kDPRA에서 최대 20 mM 농도에 용해되지 않는 물질의 시험에 대해 기술한 4단락의 조항 참조)	Methyl-2- nonynoate5; 111-80-8; LLNA NC
시스테인-펩타이드 산화를 촉진하는 시험물질		펩타이드 반응의 과대 측정 가능성이 있음	DMSO

부록 2. 시험법 숙련을 위한 시험물질

In Chemico 피부감작성 시험법: kDPRA

본 Appendix에 기술된 시험법을 정기적으로 사용하기 전 실험실은 Table 1에서 권장하는 숙련도 물질 9개 중 최소 8개에 대하여 예상되는 kDPRA 예측을 올바르게 획득하고, 숙련도 물질 9개 중 7개에 대한 각각의 참고 범위 내에 들어오는 시스테인 속도상수 $\log k_{\max}$ 를 획득하여 기술적 숙련도를 증명해야 한다. 이들 숙련도 물질은 피부감작성 유해성과 역가에 대한 반응 범위를 잘 나타낼 수 있도록 선정되었다. 기타 선정 기준으로는 상업적 이용가능성, 고품질 *in vivo* 참고데이터 및 kDPRA로 산출한 고품질 *in vitro* 데이터 보유 여부, 검증연구에 참여한 실험실 내 시험법의 성공적인 적용을 증명하기 위해 산업계가 조율한 검증연구에서 사용되었을 것 등이 있다.

〈표 1〉 kDPRA 숙련도 시험물질

숙련도물질	CASRN	물리적 성상	<i>In vivo</i> 예측 ¹	UN GHS 카테고리 LLNA	UN GHS 카테고리 인체	kDPRA 예측 ²	\log k_{\max} 범위 ²
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	고체	감작성 물질 (extreme)	1A	1A	1A	(-0.8) – (-0.4)
Methylisothiazolinone	2682-20-4	고체	감작성 물질 (extreme)	1A	1A	1A	(-0.5) – (-0.1)
Oxazolone	15646-46-5	고체	감작성 물질 (extreme)	1A	데이터 없음	1A	(-0.3) – (0.0)
Methyl-2-octynoate	111-12-6	액체	감작성 물질 (strong)	1A	1A	1A	(-1.6) – (-1.2)
Isoeugenol	97-54-1	액체	감작성 물질 (moderate)	1A	1A	1A	(-1.4) – (-1.1)
2,3-Butanedione	431-03-8	액체	감작성 물질 (weak)	1B	데이터 없음	Non-1A (1B 또는 NC)	(-3.2) – (-2.1)
Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	97-90-5	액체	감작성 물질 (weak)	1B	1B	Non-1A (1B 또는 NC)	(-2.8) – (-2.1)
4-Methoxyacetophenone	100-06-1	고체	비감작성 물질	No Cat. ³	No Cat. ³	Non-1A (1B 또는 NC)	반응하지 않음
Chlorobenzene	108-90-7	액체	비감작성 물질	No Cat. ³	No Cat. ³	Non-1A (1B 또는 NC)	반응하지 않음

¹*In vivo* 유해성(및 역가) 예측은 LLNA 데이터(13)에 기반한다. *In vivo* 역가는 ECETOC에서 제안한 기준(14)을 사용하여 산출되었다.

²반올림한 범위는 7개의 실험실에서 산출된 최소 14개 $\log k_{\max}$ 결정값에 기반하여 결정되었다.

³UN GHS에 따른 비감작성 물질

III

원문(OECD TG442C)

OECD/OCDE

442C

APPENDIX III

In Chemico Skin Sensitisation: kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA)

INITIAL CONSIDERATIONS, APPLICABILITY AND LIMITATIONS

1. The kDPRA is proposed to address the molecular initiating event of the skin sensitisation AOP - namely, protein reactivity - by quantifying the reactivity of test chemicals towards a synthetic model peptide containing cysteine in a time- and concentration dependent manner (1) (2). Kinetic rate constants are calculated and the logarithm of the maximum rate constant ($\log k_{\max}$ value in $s^{-1}M^{-1}$) for a tested substance is then used to support the discrimination of UN GHS subcategory 1A skin sensitisers (subcategory 1A) from those not categorised as subcategory 1A (non-subcategory 1A) i.e., subcategory 1B or no category according to UN GHS (3). Based on theoretical consideration, the rate constant of the reaction between a test chemical and skin proteins will determine the amount of epitope formed from a given amount of chemical or, vice-versa, determine the dose needed to form the amount of epitope needed for induction of sensitization to occur and it is thus a rate limiting and potency determining step. Based on empirical evidence when evaluating 180 chemicals, the rate constant was shown to be the strongest determinant of potency among all evaluated parameters measured in OECD 442C, 442D and 442E (3).
2. The kDPRA proved to be transferable to laboratories without hands-on training (4). For the 24 test chemicals tested during the validation study, the overall within-laboratory reproducibility of kDPRA for assigning UN GHS subcategory 1A was 96% and the average between-laboratory reproducibility was 88% (4). Results from the validation study (4) as well as from other published studies (3) encompassing 180 test chemicals that fall within kDPRA's applicability domain indicate that kDPRA allows to discriminate UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as subcategory 1A (non-subcategory 1A) according to UN GHS with a balanced accuracy of 85%, a sensitivity of 84% (38/45), and a specificity of 86% (116/135) relative to LLNA results (3). Similar performances were obtained when comparing kDPRA outcomes with the OECD LLNA database compiled within the context of the Test Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitization (15)⁴. In addition, the prediction for 123 test chemicals (out of the 180) having human skin sensitisation data (5) (6) has a balanced accuracy of 76%, a sensitivity of 64% (21/33), and a specificity of 89% (80/90) (3), although the human reference data are subject to a significant uncertainty⁵. Furthermore, when evaluating non-animal methods for skin sensitisation, it should be kept in mind that the

⁴ A balanced accuracy of 85%, a sensitivity of 82% (31/38), and a specificity of 88% (102/116) were found relative to LLNA dataset compiled within the context of the Test Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitization (15).

⁵ A balanced accuracy of 67%, a sensitivity of 53% (9/17), and a specificity of 81% (25/31) were found relative to human skin sensitisation dataset compiled within the context of the Test Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitization (15).

OECD/OCDE

442C

LLNA test as well as other animal tests may not fully reflect the situation in the species of interest, which is humans. For comparison, based on a data set of 123 chemicals used to evaluate the kDPRA vs. human sensitising potential, the LLNA showed a 73% balanced accuracy, a 55% (18/33) sensitivity and a 91% (82/90) specificity for the identification of UN GHS subcategory 1A. On the basis of the overall data available, kDPRA's applicability domain was shown to include a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potencies (as determined in *in vivo* studies), and physicochemical properties (3). Following an independent peer review (16), the kDPRA was considered to be scientifically valid to discriminate UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as 1A (non-subcategory 1A) according to UN GHS (7). The kDPRA can therefore be used (i) as a follow-up test method for sub-categorisation of chemicals identified as UN GHS Category 1 skin sensitisers, or (ii) on its own by using positive results for direct classification of a chemical into UN GHS subcategory 1A, depending on the regulatory framework.

3. The term "test chemical" is used in this Test Guideline to refer to what is being tested and is not related to the applicability of the kDPRA to the testing of substances and/or mixtures. This test method is not applicable to the testing of metal compounds, which are known to react with proteins via mechanisms other than covalent binding. Furthermore, kDPRA only measures reactivity with the cysteine peptide, so that strong sensitisers having an exclusive lysine-reactivity, such as some acyl-halides, phenol-esters or aldehydes are outside of the applicability domain of kDPRA. However, only few UN GHS subcategory 1A skin sensitisers are known currently to react exclusively with lysine residues. In addition, considering exclusive strong Lysine-reactivity from the DPRA or ADRA in a tiered strategy may reduce this uncertainty. Test chemicals that do not covalently bind to the peptide but promote its oxidation (i.e. cysteine dimerisation) could lead to a potential over estimation of peptide depletion, resulting in possible false positive predictions and/or assignment to a higher reactivity class. The test method described in this Appendix of the Test Guideline is an *in chemico* method that does not encompass a metabolic system. Reactivity of chemicals that require enzymatic bioactivation to exert their skin sensitisation potential (i.e. pro-haptens) cannot be reliably detected by the test method. However, the limitation for detecting pro-haptens was found to be less pronounced when identifying strong sensitisers as compared to the identification of weak sensitisers (3). The majority of chemicals that become sensitisers after abiotic transformation (i.e. pre-haptens) were reported to be correctly detected by *in chemico* test methods (8) (9). However, spontaneously rapidly oxidizing pre-haptens may be under-predicted by kDPRA (as in any *in vitro* skin sensitisation assay) due to a lag-phase for oxidation which reduces the overall reaction rate. In the light of the above, results obtained with the test method that do not lead to subcategory 1A categorisation should be interpreted in the context of the currently known limitations (see also Annex 1 of this Appendix), i.e.:
 - aromatic amines, catechols or hydroquinones may require further data to confirm their weak reactivity even under oxidizing conditions, and
 - acyl-halides, phenol-esters or aldehydes specifically reacting with Lysine-residue according to e.g. the DPRA or ADRA, may require further data to confirm their weak reactivity.
4. To be tested, a test chemical should be soluble in an appropriate solvent at a final concentration of 20 mM (see paragraphs 12-13). Test chemicals that are not soluble at this concentration may still be tested at lower concentrations as long as a k_{\max} value (i.e., the maximum rate constant (in $s^{-1}M^{-1}$) determined from the reaction kinetics for a tested substance in the kDPRA (see paragraph 24)), can be derived. In such a case, a positive result leading to a UN GHS subcategory 1A skin sensitization prediction (i.e. $\log K_{\max} \geq -2.0$) could still be used, but no firm conclusion should be drawn from a negative result (i.e., non-reactive or $\log k_{\max} < -2.0$ outcome).

OECD/OCDE

442C

5. The kDPRA uses a fluorescence readout which requires attention for potential test chemical autofluorescence, fluorescence quenching or interaction with the reagent (monobromobimane). In particular, it is important to include the respective test chemical controls as described in paragraph 16 and to assess the incubation time dependence of the determined peptide depletion. Furthermore, test chemicals with primary SH-group (thiols) cannot be tested with the kDPRA as the thiol group can interact with the monobromobimane (see paragraph 8) leading to enhanced fluorescence. Finally, chemicals decomposing under the conditions of the assay (neutral, aqueous conditions) and releasing a free SH-group will be prone to the same limitations.
6. The kDPRA is considered to be technically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures of known composition, although such substances were not tested during the validation studies. In this case, a single purity may be determined by the sum of the proportion of its constituents (excluding water), and a single apparent molecular weight may be determined by considering the individual molecular weights of each component in the mixture (excluding water) and their individual proportions. The resulting purity and apparent molecular weight can then be used to calculate the weight of test chemical necessary to prepare a 20 mM solution. Results obtained with mixtures and multi-constituent substances of known composition can lead to a non-linear behaviour, so that the provisions described in paragraph 27(ii) should be used. Regarding mixtures and substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials (i.e. UVCB substances), the current model cannot be used due to the need for defined molar ratios. In any case, when considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this Guideline, upfront consideration should be given to whether the results of such testing will yield results that are meaningful scientifically. Finally, in cases where evidence can be demonstrated on the non-applicability of the test method to specific categories of chemicals, the test method should not be used for those specific categories of chemicals.
7. The kDPRA can be used for the discrimination of UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as subcategory 1A (non-subcategory1A) according to UN GHS (3). As for any key-event based test method, the performance of kDPRA will have to be further assessed when used in combination with other assays such as DPRA or ADRA, and within integrated approaches such as IATA or DA for a more comprehensive analysis of skin sensitisation (3) (10).

PRINCIPLE OF THE TEST

8. The kDPRA is a modification of the *in chemico* test method DPRA (described in Appendix I of this Test Guideline). The kDPRA uses the cysteine peptide (Ac-RFAACAA-COOH) also used in the DPRA, while it does not use a lysine containing peptide. The final concentration of the test peptide (0.5 mM) and the reaction medium (25% acetonitrile in phosphate buffer) is identical in the kDPRA and in the DPRA. While the DPRA measures only at one concentration of the test chemical (5 mM for the cysteine peptide) and at one time point (≥ 24 h), the kDPRA performs parallel reactions at five concentrations (5, 2.5, 1.25, 0.625 and 0.3125 mM) and at six time-points (10, 30, 90, 150, 210 and 1440 min) at $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$. Residual concentration of the cysteine peptide after the respective reaction time is measured after stopping the reaction by the addition of monobromobimane (mBrB; CAS 74235-78-2). The highly reactive and non-fluorescent mBrB rapidly reacts with unbound cysteine moieties of the model peptide to form a fluorescent complex which is measured in order to quantify the non-depleted peptide concentration. If the depletion of the highest concentration surpasses the threshold of 13.89% (cut-off used in the DPRA for positivity in the cysteine only prediction model) and this depletion is statistically significant vs. controls with peptide

OECD/OCDE

442C

only, further calculations are performed (otherwise the test chemical is considered to be non-reactive according to the prediction model shown in paragraph 28). The natural logarithm of the non-depleted peptide concentrations is plotted vs. the concentration of the test chemical at each time point. If a linear relationship is observed (correlation coefficient > 0.90), the slope of this curve is determined and divided by the incubation time to calculate the rate constant in [$\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$]. This value is transformed to the rate constant in [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$] and the logarithm is calculated. The maximum value observed at any time point is taken as the $\log k_{\text{max}}$, and this maximum rate constant is the primary read-out of the test. It gives a quantification of the maximum kinetic rate of the reaction of the test chemical with the test peptide. Kinetic reaction rates of the cysteine peptide depletion are then used to discriminate UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as 1A (non-subcategory 1A) according to UN GHS. Chemicals with a $\log k_{\text{max}} \geq -2.0$ are predicted as UN GHS subcategory 1A. The kinetic rate constant may be further used in integrated approaches such as IATA or DA to assess the skin sensitisation potency of a test chemical in a continuous scale as needed for risk assessment (3) (10).

9. Prior to routine use of this test method, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the nine proficiency substances listed in Annex 2 of this Appendix.

PROCEDURE

10. This test method is based on the kDPRA DB-ALM protocol no 217 (11) which represents the protocol used for the industry-coordinated validation study. It is recommended that this protocol is used when implementing and using the method in a laboratory. The main components and procedures for the kDPRA are described below.

Preparation of the cysteine-peptide

11. The stock solution of the cysteine containing synthetic peptide (Ac-RFAACAA-COOH) of purity equal to or higher than 95% should be freshly prepared just before the incubation with the test chemical. The final concentration of the cysteine peptide should be 0.667 mM in pH 7.5 phosphate buffer for test chemical soluble in acetonitrile and 1.0 mM for chemicals soluble in pH 7.5 phosphate buffer.

Preparation of the test chemical

12. Solubility of the test chemical in an appropriate vehicle should be assessed before performing the assay. A non-reactive, water-miscible vehicle able to completely dissolve the test chemical should be used. Solubility is checked by visual inspection where the forming of a clear solution is considered sufficient to ascertain that the test chemical is dissolved. The preferred vehicle is acetonitrile. When a substance is not soluble in acetonitrile, solubilisation in pH 7.5 phosphate buffer should be assessed. Further vehicles have not been tested yet but may be used if it is demonstrated that the vehicle does not interfere with the assay, e.g. all controls should be prepared using the same vehicle, and the reaction rates obtained for the positive control and for the proficiency chemicals should fall within the ranges described in paragraph 26 and Annex 2 of this Appendix, respectively. It is important to note that use of DMSO as a vehicle should be avoided as it may lead to peptide dimerisation.
13. The test chemical should be pre-weighed into glass vials and dissolved immediately before testing to prepare a 20 mM solution using the appropriate vehicle as described in paragraph 12. Test chemical dilutions are prepared by serial dilution to obtain concentrations of 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 mM.

OECD/OCDE

442C

Preparation of controls

14. Cinnamic aldehyde (CAS 104-55-2; $\geq 95\%$ food-grade purity) should be used as positive control (PC). It is dissolved at a concentration of 20 mM in acetonitrile immediately before testing. Serial dilutions are then prepared to obtain PC concentrations of 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 mM. Use of other positive controls is not recommended since in this assay an exact reaction rate is measured and consistent use of the positive control allows quantitative comparison between laboratories, with validation study data and as intra-laboratory historical control.
15. A vehicle control (VC), considered as the negative control, includes the peptide dissolved in buffer and vehicle respectively but no test chemical nor PC. The peptide-depletion of test chemical or PC incubated samples is calculated relative to the respective VC.
16. The assay also includes test chemical controls at the respective test chemical concentration in the vehicle and buffer but without peptide. This set of controls is used for the identification of interference of the test chemical with the fluorescence measurement (autofluorescence and quenching) to assess e.g., interference with monobromobimane and as a background measurement.
17. A blank control (BC) is used as a background measurement and is prepared with vehicle and buffer but without test chemical, PC, or peptide.

Incubation of the test chemical with the cysteine peptide solution

18. Serial dilutions of the test chemical and PC are prepared in a 96-well microtiter plate referred to as the application plate. Further, a 96-well black assay plate for each exposure time is prepared, referred to as the assay plates, by adding the relevant reagents (i.e., peptide stock solution, vehicle and buffer solution) according to a predefined plate layout such as recommended within the kDPRA protocol (11). Each test chemical concentration should be analysed in triplicate. The reaction is started by adding the test chemical and PC dilutions from the application plates to the assay plates. If a precipitate is observed immediately upon addition of the test chemical solution to the peptide solution, due to low aqueous solubility of the test chemical, one cannot be sure how much test chemical remained in the solution to react with the peptide. In such a case, a positive result (i.e. $\log k_{\max} \geq -2.0$) could still be used, but a negative result (i.e., non-reactive or $\log k_{\max} < -2.0$ outcome) should be interpreted with due care (see also provisions in paragraph 4 for the testing of chemicals not soluble up to a concentration of 20 mM in the kDPRA). After adding the test chemical and PC, plates are sealed with gas-tight adhesive foil and shaken at least 200 rpm for 5 min. Assay plates solution should be incubated in the dark at $25 \pm 2.5^\circ \text{C}$ for several incubation (exposure) times, i.e. 10, 30, 90, 150, 210, and 1440 min before addition of mBrB solution. Incubation times may be adapted to investigate the most relevant time points for a specific chemical (e.g., shorter incubation times might be more suitable for fast reacting chemicals). However, 1440 min should always be tested, as it corresponds to the incubation time of the DPRA. The incubation (exposure) time is the time interval from the application of the test chemical and PC dilutions to the assay plate until the addition of mBrB.

Fluorescence measurement

19. When the desired incubation (exposure) time is reached, freshly prepared mBrB solution (3 mM in acetonitrile) is added rapidly to the wells of the assay plates (one per exposure time) in the dark. Plates are sealed with gas-tight adhesive foil and shaken at least 200 rpm for 5 min. Fluorescence intensity is then determined using an excitation filter of 390 nm and an emission filter of 480 nm.

OECD/OCDE

442C

DATA AND REPORTING

Data evaluation

20. An automated Excel-evaluation spreadsheet is available with the DB-ALM protocol and should be used for data evaluation. Detailed instructions are provided in the DB-ALM protocol no. 217 (11).
21. For each incubation (exposure) time 't' the following parameters are calculated:
- The arithmetic mean and standard deviation of the fluorescence intensity of the 12 blank controls (BC);
 - The arithmetic mean and standard deviation of the fluorescence intensity of the 12 vehicle controls (VC);
 - The mean BC value is subtracted from the VCs to obtain corrected VC values.
 - For each test chemical and PC concentration, the respective test chemical control value is subtracted from their obtained values to calculate corrected test chemical or PC values.

22. To determine the relative peptide depletion in % for each test chemical concentration per exposure time, the following calculation is performed:

$$\text{relative peptide depletion [\%]} = \left[1 - \left(\frac{\text{corrected test chemical or PC value}}{\text{mean of corrected VC}} \right) \right] \times 100\%$$

23. For each test chemical concentration, the arithmetic mean and standard deviation of the three replicates is calculated (per exposure time). A student's t-test is performed to test whether the peptide concentrations measured in the three replicates is statistically significantly lower as compared to the concentration in the 12 VC wells.
24. In the kDPRA, reaction kinetic rate constants are determined as explained below if (i) a peptide depletion of $\geq 13.89\%$ is observed at the highest test chemical concentration (final test chemical concentration 5 mM) at a given time and if (ii) the difference is statistically different from the VC. This 'positivity criterion' is based on the 'positive' criterion for peptide reactivity in the cysteine only prediction model of the DPRA described in Appendix I of this test guideline. If the positive criterion is not met, the test chemical is considered to be non-reactive according to the prediction model shown in paragraph 28.

The natural logarithm of the non-depleted peptide concentrations (100-relative peptide depletion (%)) is plotted vs. the concentration of the test chemical at each time point. If a linear relationship is observed (correlation coefficient > 0.90), the slope of this curve is determined. The absolute value of this negative slope corresponds to the observed reaction kinetic constant (pseudo first order rate constants k_{observed} in mM^{-1}). From the k_{observed} value for each exposure time, the reaction kinetic constant (k_t) per concentration and incubation (exposure) time 't' is calculated as follows:

$$k_t [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}] = k_{\text{observed}} \cdot \frac{1000}{60 \cdot t}$$

with 't' being the exposure time in minutes. If no linear relationship is observed (i.e., correlation coefficient < 0.90), the recommendations within paragraph 27.ii should be followed.

25. For each exposure time 't' with a correlation > 0.90 , the decimal logarithm ($\log k_t$) is calculated and the highest value is determined as $\log k_{\text{max}}$.

OECD/OCDE

442C

Acceptance criteria

26. The following criteria should be met for a run to be considered valid. If one or more of these criteria is not met the run should be repeated.

- a. PC: the log k of the PC at 90 min ($\log k_{90 \text{ min}}$) should be within the following range: -1.75 to -1.40 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. If no $\log k_{90 \text{ min}}$ is obtained in case of e.g., reactivity is not yet statistically significant, the value at 150 min ($\log k_{150 \text{ min}}$) can be taken into account and should lie in the following range: -1.90 to -1.45 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.
- b. VC: The coefficient of variance of the 12 VC values of a plate should be < 12.5% for at least 5 of the 6 exposure times.

27. The data obtained for the test chemical are further assessed to check for possible conditions which may affect results:

- (i) Interrupted time-course: If significant peptide depletion is observed at early time-points but not at following time points, there is either an intrinsic non-linear reaction for the test chemical or an experimental variation. In such cases the run is repeated. If the same pattern is reproducible, a non-linear kinetic is proven and the rate-constant observed at early time points is accepted.
- (ii) Non-linear concentration-response: There are few cases where the concentration-response is not linear, but clear depletion is noted. In such cases no rate constant is calculated by the slope method, as regression coefficient is $R^2 < 0.90$. Alternatively, rate constants can also be calculated based on individual depletion values according to the formula:

$$k = [\ln(100/(100 - dp))]/(E \times t)$$

Where 'dp' is depletion in %, 'E' is the concentration of test chemical and 't' is the incubation (exposure) time. Rate constants according to this formula are calculated at each time point 't' and at each concentration 'E' with depletion values above the threshold of 13.89%. For each time point 't' the average of the values for the different concentrations is taken, and then again the $\log k_{\text{max}}$ for the highest rate at any given time point is reported.

In such a case a repetition should be performed to check whether this non-linear behaviour is intrinsic to the test chemical, or whether an experimental variation is the cause. If the non-linearity is reproducible, this alternative rate calculation based on the individual depletion values is used for the final rating.

- (iii) Fluorescence interference, namely autofluorescence or fluorescence quenching: Based on the control wells with test chemical only in absence of the test peptide, incidences of autofluorescence and fluorescence quenching by the test chemical can be detected. As the values are corrected for the autofluorescence recorded in the test chemical control wells, this shall not be a problem for low autofluorescence, but with a high autofluorescence, the fluorescence of the peptide-adduct and the autofluorescence may not be fully additive, and subtraction of autofluorescence may lead to apparent depletion, which is not due to loss of peptide signal but to this non-additivity. Thus, one should check whether the observed depletion is time dependent. If this is not the case and autofluorescence is observed, then depletion from autofluorescence is assumed to occur. Fluorescence quenching can also lead to 'pseudo-depletion', but this would happen immediately and resulting depletion would not increase with time. If both conditions are met, it is assumed that depletion from quenching occurs. These cases are rare. If this is not clear from the results a run may be repeated, but if the effect is clear-cut no repetition is needed. In such a case, the test chemical cannot be assessed in the kDPRA (technical limitation)

OECD/OCDE

442C

unless the reaction can be measured with an alternative fluorescent probe not leading to autofluorescence or quenching (see Section II of the Annex 1 to DB-ALM protocol (11)).

- (iv) All above cases are detailed in the DB-ALM protocol and automatic alerts appear in the Excel template provided with the DB-ALM protocol when evaluating the data.

Prediction model

28. The kDPRA uses kinetic rates of cysteine peptide depletion for discrimination of UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as subcategory 1A (non-subcategory 1A) according to UN GHS (3). Results obtained with the test method that do not lead to subcategory 1A categorisation should be interpreted in the context of the limitations stated in paragraph 3 and Annex 1 of this appendix.

Table 1: kDPRA prediction model

Reaction rate	kDPRA Prediction
$\log k_{\max} \geq -2.0$	UN GHS subcategory 1A
Non-reactive or $\log k_{\max} < -2.0$	Not categorised as UN GHS subcategory 1A* (non-subcategory 1A)

* Further information is needed to discriminate UN GHS subcategory 1B from UN GHS No Category. Depending on the context (e.g. IATA, DA) this information can be generated prior to or after performing the kDPRA.

29. In cases of a $\log k_{\max}$ result close to the -2.0 threshold falling in the borderline range calculated for kDPRA (i.e., between -1.93 and -2.06 (12)), no conclusive prediction can be made. In this case, re-testing and/or additional data/information is needed before a conclusive prediction can be made.
30. The kinetic rate constant may be further used in integrated approaches such as IATA or DA to assess the skin sensitisation potency of a test chemical in a continuous scale as needed for risk assessment (3) (10).

OECD/OCDE

442C

Test report

31. The test report should include the following information

Test chemical and Controls (positive control and solvent/vehicle)

For all mono-constituent substance (test and control chemicals)

Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;

Physicochemical properties such as physical state, appearance, water solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;

Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;

Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);

Concentration(s) tested;

Storage conditions and stability to the extent available.

Additional information for positive control

Reference to historical positive control results demonstrating suitable run acceptance criteria, if applicable.

Additional information for solvent/vehicle control

Solvent/vehicle used and ratio of its constituents, if applicable;

Justification for choice of other solvent than acetonitrile and experimental assessment of the solvent effect on peptide stability.

Peptide

Supplier, lot, purity

Fluorescence analysis

Fluorimeter used (e.g., model and type), including wavelengths settings

Proficiency testing

Statement that the testing facility has demonstrated proficiency in the use of the test method before routine use by testing of the proficiency chemicals.

Discussion of the results

Description of any unintended modifications to the test procedure.

Discussion of the results obtained with the kDPRA test method and if it is within the ranges described in paragraph 29.

Description of any relevant observations made, such as appearance of precipitate in the reaction mixture at the end of the incubation time, if precipitate was resolubilised or centrifuged.

Conclusion

OECD/OCDE

442C

LITERATURE FOR APPENDIX III

- (1) Wareing, B., Urbisch, D., Kolle, S. N., Honarvar, N., Sauer, U. G., Mehling, A. and Landsiedel, R., (2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data. *Toxicol In Vitro* 45, 134-145.
- (2) Roberts, D. W. and Natsch, A., (2009) High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 592-603.
- (3) Natsch, A., Haupt, T., Wareing, B., Landsiedel, R., and Kolle, S.N., (2020) Predictivity of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for sensitizer potency as-sessment and subclassification. *ALTEX*, 37(4), 652-664
- (4) Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaart, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A., (2020) The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial. *ALTEX*, 37(4), 639-651, DOI: 10.14573/altex.2004291.
- (5) Hoffmann S., Kleinstreuer N., Alépée N., Allen D., Api A. M., Ashikaga T., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Goebel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Lalko J. F., Martinozzi-Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Parakhia R., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D., Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol*, 2018. 48(5): p. 344-358.
- (6) Basketter, D. A., Alepee, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinozzi-Teissier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M. and Templier, M., (2014) Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.
- (7) International ad hoc Expert Panel, (2020) Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA) as a modified version of the DPRA assay according to OECD TG 442C, to extend its regulatory applicability to identify UN GHS Subcategory 1A.
- (8) S. Casati, K. A., B.D. Asturiol, D. Basketter, S. Dimitrov, C. Dumont, A.T. Karlberg, J. P. Lepoittevin, G. Patlewicz, D. Roberts, A. Worth, (2016) Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479> <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479>, last accessed 27.05.206.
- (9) Urbisch, D., Becker, M., Honarvar, N., Kolle, S. N., Mehling, A., Teubner, W., Wareing, B. and Landsiedel, R., (2016) Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.
- (10) Natsch, A., Emter, R., Gfeller, H., Haupt, T. and Ellis, G., (2015) Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. *Toxicol. Sci.* 143, 319-32.
- (11) DB-ALM Protocol 217: The kinetic Direct Peptide Reactivity assay (kDPRA). Accessible at http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/217_P_kDPRA_final_27Oct20.pdf.
- (12) Kolle, S., Mathea, M., Natsch, A., Landsiedel, R., (2021) Borderline ranges for in chemico and in vitro skin sensitization methods determined from ring trial data - acknowledging experimental

OECD/OCDE

442C

uncertainty in defined approaches, Toxicology Letters, 350.

- (13)ICCVAM, ICCVAM Test Method Evaluation Report: Usefulness and Limitations of the Murine Local Lymph Node Assay for Potency Categorization of Chemicals Causing Allergic Contact Dermatitis in Humans. 2011. NIH Publication 11-7709.
- (14)ECETOC, ECETOC Document No. 46: Potency Values from the Local Lymph Node Assay: Application to Classification, Labelling and Risk Assessment. 2008.
- (15)OECD (2021), Validation report: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 337 Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16)OECD (2021), Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 338. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OECD/OCDE

442C

APPENDIX III, ANNEX 1

KNOWN LIMITATIONS OF THE KINETIC DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY

The table below provides a summary of the known limitations of the kDPRA.

Substance class / interference	Reason for potential underprediction or interference	Data interpretation	Example substance
Metals and inorganic compounds	Known to react with proteins via mechanisms other than covalent binding	Should not be tested	Nickel sulphate; 7786-81-4
Hydroquinones, catechols and aromatic amines	Lag time of oxidation may reduce apparent reaction rate	Results with $\log k_{\max} < -2.0$ can only be accepted if low reactivity can be confirmed after oxidation	Para-phenylenediamine; 106-50-3; Human and LLNA 1A
Thiols or thiol-releasers	Test chemicals with primary SH-groups and those decomposing under the conditions of the assay can react with the detection probe	Test chemical cannot be tested in the kDPRA with derivatisation by thiol reactive probes: other kinetic data with the test peptide e.g. by HPLC may need to be generated (not part of this guideline)	Thioglycerol; 96-27-5; LLNA UN GHS category 1B; Human n/a
Test chemicals having an exclusive lysine-reactivity as observed in DPRA or ADRA	kDPRA only measures reactivity with the cysteine peptide	Results with $\log k_{\max} < -2.0$ for chemicals which specifically deplete NH_2 -groups, but not SH-groups in DPRA or ADRA are not conclusive	Some acyl-halides, phenol-esters or aldehydes, Dihydrocoumarin, 119-84-6; LLNA UN GHS category 1B; Human n/a, Glutaric aldehyde; 111-30-8; Human and LLNA UN GHS category 1A
Pro-haptens	Test chemicals for which there is evidence that they strictly require enzymatic bioactivation to exert their skin sensitizing potential	Strict pro-haptens may be underestimated. However chemicals which are i) strict pro-haptens (i.e. test chemicals not also acting as direct haptens or pre-haptens, too) and ii) strong allergens were found to be rare	Diethylenetriamine; 111-40-0 (human 1A, LLNA UN GHS category 1)
Fluorescent chemicals with excitation in the range of the fluorescent probe	If fluorescence of test chemicals and of the mBrB-peptide adduct is not additive, pseudo-depletion is observed	Follow the considerations in the DB-ALM Protocol n° 217 to evaluate assay interference	Tetrachlorosalicylanilide; 1154-59-; Human and LLNA UN GHS category 1A
Test chemicals absorbing in the emission range of the probe	If test chemical quenches fluorescence emission of the mBrB-peptide adduct, pseudo-depletion is observed	Follow the considerations in the DB-ALM Protocol n° 217 to evaluate assay interference	Vanillin, 121-33-5; LLNA NC; Human n/a
Mixtures of unknown composition, substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials	no information on applicability of kDPRA is available in the published literature	n/a	UVCBs, chemical emissions, products or formulations with variable or not fully known composition
Test chemicals which cannot be dissolved in water or	Not sure if sufficient exposure can be achieved	In such cases, a $\log k_{\max} > -2.0$ could still be used to support the identification of the test chemical as a UN GHS subcategory	n/a

OECD/OCDE

442C

acetonitrile or a compatible water-miscible solvent		1A skin sensitiser but no firm conclusion should be drawn in case $\log K_{max}$ is < -2.0 . Alternative vehicle may be used according to the prescriptions given in paragraph 12.	
Test chemicals which precipitate in reaction solution	Not sure if sufficient exposure can be achieved: If a precipitate is observed immediately upon addition of the test chemical solution to the peptide solution, due to low aqueous solubility of the test chemical, one cannot be sure how much test chemical remained in the solution to react with the peptide.	In such a case, a positive result (i.e. $\log k_{max} \geq -2.0$) could still be used, but a negative result (i.e., non-reactive or $\log k_{max} < -2.0$ outcome) should be interpreted with due care (see also provisions in paragraph 4 for the testing of chemicals not soluble up to a concentration of 20 mM in the kDPRA).	Methyl-2-nonynoate ⁶ , 111-80-8; LLNA NC
Test chemicals promoting cysteine-peptide oxidation		May lead to a potential over estimation of peptide reactivity.	DMSO

⁶ Roberts, D.W. and A. Natsch, *High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles*. Chem. Res. Toxicol., 2009. **22**(3): p. 592-603

OECD/OCDE

APPENDIX III, ANNEX 2

442C

PROFICIENCY SUBSTANCES

In Chemico Skin Sensitisation: kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA)

Prior to routine use of the test method described in this appendix, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly obtaining the expected kDPRA prediction for at least 8 of the 9 proficiency substances recommended in Table 1 and by obtaining cysteine rate constants $\log k_{\max}$ that fall within the respective reference range for 7 out of the 9 proficiency substances. These proficiency substances were selected to represent the range of responses for skin sensitisation hazard and potency. Other selection criteria were that they are commercially available, that high quality *in vivo* reference data and high quality *in vitro* data generated with the kDPRA are available, and that they were used in the industry-coordinated validation study to demonstrate successful implementation of the test method in the laboratories participating in the study.

Table 1: Recommended proficiency substances for demonstrating technical proficiency with the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay

Proficiency substances	CASRN	Physical state	<i>In vivo</i> prediction ¹	UN GHS Category LLNA	UN GHS Category human	kDPRA prediction ²	Range of $\log k_{\max}$ ²
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	Sensitiser (extreme)	1A	1A	1A	(-0.8) – (-0.4)
Methylisothiazolinone	2682-20-4	Solid	Sensitiser (extreme)	1A	1A	1A	(-0.5) – (-0.1)
Oxazolone	15646-46-5	Solid	Sensitiser (extreme)	1A	No data	1A	(-0.3) – (0.0)
Methyl-2-octynoate	111-12-6	Liquid	Sensitiser (strong)	1A	1A	1A	(-1.6) – (-1.2)
Isoeugenol	97-54-1	Liquid	Sensitiser (moderate)	1A	1A	1A	(-1.4) – (-1.1)
2,3-Butanedione	431-03-8	Liquid	Sensitiser (weak)	1B	No data	non-1A (1B or NC)	(-3.2) – (-2.1)
Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	97-90-5	Liquid	Sensitiser (weak)	1B	1B	non-1A (1B or NC)	(-2.8) – (-2.1)
4-Methoxyacetophenone	100-06-1	Solid	Non-sensitiser	No Cat. ³	No Cat. ³	non-1A (1B or NC)	Not reactive
Chlorobenzene	108-90-7	Liquid	Non-sensitiser	No Cat. ³	No Cat. ³	non-1A (1B or NC)	Not reactive

¹The *in vivo* hazard and (potency) predictions are based on LLNA data (13). The *in vivo* potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (14).

² Rounded ranges determined on the basis of at least 14 $\log k_{\max}$ determinations generated by 7 independent laboratories.

³ Non sensitisers according to the UN GHS.

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(In Chemico 피부감작성 시험법, kDPRA)
가이드라인(민원인 안내서)

발 행 일 2022년 10월
발 행 인 식품의약품안전평가원장
편 집 위 원 장 독성평가연구부장 오재호
편 집 위 원 이윤숙, 윤소영, 김주환, 강남희, 이정선, 방서영, 길가애, 차민희
도 움 주 신 분 정태천(영남대학교), 배옥남(한양대학교), 손동원(바이오톡스텍)
문 의 처 식품의약품안전평가원, 특수독성과
Tel : 043-719-5153, 5155 Fax : 043-719-5150
주 소 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187,
오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

공익신고자 보호제도란?

- 공익신고자(친족 또는 동거인 포함)등이 공익신고 등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장, 불이익보호조치, 신분보호조치** 등을 통하여 보호하는 제도

[공직자 부조리 및 공직신고안내]

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 “국민신문고 >공직자 부조리 신고” 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 “국민소통 >신고 센터 >부패·공익신고 상담” 코너

♣ 보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공익보호지원과.
전화 044-200-7773