

## **AFINITAS PENGIKATAN ANTIBODI MONOKLONAL TRASTUZUMAB TERHADAP HUMAN EPIDERMAL RECEPTOR-2 YANG DIEKSPRESIKAN TUMOR GANAS OVARIUM**

**Ilma Fiddiyanti<sup>1</sup>, Martalena Ramli<sup>2</sup>, Ristaniah D. Soetikno<sup>1</sup> dan Abdul Mutalib<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departemen/UPF Radiologi Fakultas Kedokteran - UNPAD  
RS Hasan Sadikin, Jl. Pasir Kaliki Bandung

<sup>2</sup>Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR) - BATAN  
Kawasan Puspiptek, Serpong 15314, Tangerang Selatan  
e-mail: ilmafiddiyanti@yahoo.com

Diterima: 13 Juli 2012

Diperbaiki: 6 September 2012

Disetujui: 11 Oktober 2012

### **ABSTRAK**

**AFINITAS PENGIKATAN ANTIBODI MONOKLONAL TRASTUZUMAB TERHADAP HUMAN EPIDERMAL RECEPTOR-2 YANG DIEKSPRESIKAN TUMOR GANAS OVARIUM.** Tumor ganas ovarium merupakan tumor ganas keempat tersering pada wanita dan tumor ganas ginekologi kedua tersering setelah tumor ganas endometrium. Angka kematian dan angka kesakitan yang tinggi pada tumor ganas ovarium sebagian besar diakibatkan belum adanya cara untuk mengenal stadium awal dari tumor ganas ini, dimana hampir 65% hingga 70% kasus tumor ganas ovarium ditemukan pada stadium lanjut, dengan harapan hidup sekitar 5% hingga 50%. *Human Epidermal Receptor-2 (HER-2)* merupakan *epidermal growth faktor receptor* yang terdapat pada permukaan sel ovarium. Interaksi *HER-2* dengan antibodi monoklonal (mAb) adalah salah satu pendekatan untuk diagnosis dikaitkan dengan kespesifikan interaksinya yang lebih terarah mencapai target molekul. *Trastuzumab* merupakan *humanized* antibodi monoklonal yang rangkaian asam aminonya mirip dengan rangkaian asam amino antibodi manusia. Penelitian ini bertujuan menganalisis interaksi afinitas pengikatan antara mAb (*trastuzumab*) dan reseptor *HER-2* yang diekspresikan tumor ganas ovarium. Hasil penelitian ini akan menjadi dasar untuk penggunaan *trastuzumab* sebagai molekul pembawa senyawa pengontras pada prosedur *Magnetic Resonance Imaging (MRI)* untuk tumor ganas ovarium yang target spesifik. Penelitian ini merupakan studi deskriptif untuk penandaan *trastuzumab* dan studi analitik korelasional dengan rancangan eksperimental untuk menilai interaksi *trastuzumab* dengan reseptor *HER-2* yang diekspresikan *cell-line* tumor ganas ovarium. *Cell-line* tumor ganas ovarium *SKOV-3* yang didapat dari LAPTIAB-BBPT, diberikan sejumlah *trastuzumab* yang telah ditandai dengan <sup>125</sup>I. Selanjutnya, dilakukan penentuan interaksi *trastuzumab* dengan *HER-2* secara *in vitro* menggunakan formula *Scatchard*. Hasil analisis interaksi memberikan nilai maksimum *binding capacity*,  $B_{max}$  dan konstanta disosiasi,  $K_d$  berturut-turut adalah  $4 \times 10^{-7}$  M dan  $9,17 \times 10^{-9}$  M yang menunjukkan adanya afinitas pengikatan yang kuat antara *trastuzumab* dengan *HER-2* yang diekspresikan tumor ganas ovarium.

**Kata kunci:** *HER-2*, *Trastuzumab*, <sup>125</sup>I, Antibodi monoklonal, *Cell-line*, Tumor ganas ovarium

### **ABSTRACT**

**BINDING AFFINITY OF ANTIBODY MONOCLONAL TRASTUZUMAB AND HUMAN EPIDERMAL RECEPTOR TYPE-2 OVEREXPRESSED BY MALIGNANT OVARIUM TUMOR.** Malignant ovarian tumor is the fourth most common malignancy in woman and the second most gynecological malignancy next to the endometrial carcinoma. High morbidity and mortality rates of the malignant ovarian tumor are mostly caused by the inability to detect an early stage of this malignancy. Almost 65-70% cases of ovarian tumor are found on later stage, with survival rate of about 5-50%. Human Epidermal Receptor (HER-2) is an epidermal growth factor receptor found on the surface of ovarium cells. Interaction between HER-2 with monoclonal antibody (mAb) has been an approach for diagnosis associated with specific interaction which is more targeted on molecule target. Trastuzumab is a humanized mAb which has amino acid structure similar to that of human mAb amino acid. The aim of this study was to analyse binding affinity of interaction between *trastuzumab* and *HER-2* receptor overexpressed by malignant ovarian tumor. The experiment results would be used as a basic consideration for the use of *trastuzumab* as molecular carrier for specific targeted contrast agent in *Magnetic Resonance Imaging (MRI)* procedure for malignant ovarium tumor. This research

covered descriptive study of trastuzumab radiolabeling and experimental design of corollary study to evaluate interaction between trastuzumab and HER-2 overexpressed by malignant ovarian tumor cell-lines. The malignant ovarian tumor cell-lines, SKOV-3 provided from LAPTIAB-BBPT, were treated with <sup>125</sup>I-radiolabeled trastuzumab. The in vitro interaction between trastuzumab and HER-2 was analysed by using Scatchard formula. Analysis result gave the value of maximum binding capacity, B<sub>max</sub> and dissociation constant, K<sub>d</sub> 4x10<sup>-7</sup>M and 9,17x10<sup>-9</sup>M respectively. It can be concluded that there was a strong interaction between trastuzumab with HER-2 which was expressed by malignant ovarian tumor.

**Keywords:** Malignant ovarian tumor, HER-2, Monoclonal antibody, Trastuzumab, <sup>125</sup>I, Binding affinity

## PENDAHULUAN

Tumor ganas atau kanker merupakan salah satu masalah utama kesehatan masyarakat kita. Diperkirakan kematian akibat kanker mencapai 4,3 juta per tahun dan 2,3 juta di antaranya ditemukan di negara berkembang. Penderita baru diperkirakan 5,9 juta per tahun dan 3 juta ditemukan di negara berkembang. Laporan lain menyatakan bahwa saat ini di Indonesia tumor ganas merupakan penyebab kematian nomor tiga. Tumor ganas ovarium di Indonesia menempati urutan ke enam, setelah tumor ganas serviks (19,18%), tumor ganas payudara (12,10%), tumor ganas kulit (7,69%), tumor ganas kelenjar getah bening (5,26%) dan tumor ganas nasofaring (5,64%). Di RS Hasan Sadikin pada tahun 2008 tercatat terdapat 1.228 kasus tumor ganas ovarium atau sekitar 17,97% dari tumor ganas ginekologi, sedangkan di RS Cipto Mangunkusumo Jakarta menempati urutan kedua dari tumor ganas ginekologis [1,2].

Angka kematian dan angka kesakitan yang tinggi pada tumor ganas ovarium sebagian besar disebabkan belum ada cara untuk deteksi dini tumor ganas ini. Oleh sebab itu hampir 65% hingga 70% kasus tumor ganas ovarium ditemukan pada stadium lanjut, yaitu datang pada stadium III-IV (42,5%) dengan harapan hidup pada stadium I-II, 80% hingga 90% dan stadium III-IV, 5% hingga 50%. Statistik ini memperlihatkan betapa tumor ganas telah menjadi beban yang cukup berat secara fisik, emosional maupun kesejahteraan masyarakat [2,3].

Ada tiga tipe tumor ganas ovarium, yaitu tipe epitelial merupakan yang terbanyak sekitar 90%, diikuti sel germinal (*germ cell*), dan tipe stromal seks (*sex cord stromal*). Tumor ganas ovarium mengekspresikan *human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2)* atau *neu* atau *c-erbB-2* yang merupakan proto-onkogen yang mengkode *receptor Epidermal Growth Factor (EGF)* [2,4].

Reseptor *epidermal growth factor* merupakan salah satu contoh proto-onkogen yang termasuk ke dalam kelompok reseptor tirosin kinase yang berperan penting dalam proses pertumbuhan sel. Ekspresi *EGFR* yang tidak terkendali akibat mutasi akan menyebabkan terjadinya perubahan dari sel normal menjadi sel kanker. Sel kanker ini tidak mengalami apoptosis, dan karena ekspresi *EGFR* yang berlebihan, maka pertumbuhan sel kanker akan berjalan jauh lebih cepat dibandingkan sel normal. Famili *EGFR* terdiri dari *HER-1* (sering

disebut sebagai *EGFR/ErbB-1*), *HER-2 (ErbB-2)*, *HER-3 (ErbB-3)*, dan *HER-4 (ErbB-4)*. *HER2* diekspresikan oleh sel payudara, ovarium, dan kanker gaster. *HER-2* terdiri dari dua bagian penting, *hormone binding domain* (di bagian ekstrasel) dan *tyrosine kinase domain* (di bagian intrasel), dimana *HER-2* yang berbentuk monomer akan membentuk dimer reseptor aktif yang distabilkan oleh terikatnya ligan. Ligan yang terikat pada monomer *HER-2* akan mengubah konformasi, menginduksi homodimerisasi atau heterodimerisasi, dan memicu autofosforilasi. Dimerisasi menentukan pada proses sel selanjutnya sel akan mengalami pembelahan, progresi atau apoptosis [3-6].

Salah satu anti *HER-2* antibodi monoklonal yang dilaporkan cukup berhasil dalam penanggulangan tumor ganas ovarium yang positif *HER-2* dewasa ini adalah *trastuzumab*. *Trastuzumab* atau *Herceptin*<sup>TM</sup> pada saat ini merupakan satu-satunya terapi yang direkomendasikan oleh *The Food and Drug Administration (FDA)*, yang langsung ditujukan kepada *HER-2* [4-5]. *Trastuzumab* merupakan hasil rekayasa genetik melalui bioteknologi yang targetnya adalah sel ovarium yang mempunyai peningkatan protein *HER-2* (overekspresi). Setelah sel yang mengalami overekspresi *HER-2* teridentifikasi, maka *trastuzumab* akan menempel pada protein reseptor *HER-2* pada permukaan sel, lalu menghambat pertumbuhan dan penyebaran tumor.

*Magnetic Resonance Imaging (MRI)* merupakan modalitas yang membantu menegakkan diagnosis tumor ganas ovarium. *MRI* memiliki resolusi yang lebih baik dalam menghasilkan imej dibandingkan pemeriksaan *Computed Tomography scan (CT scan)* pada pemeriksaan tumor ganas ovarium. Tetapi pemeriksaan *MRI* beberapa tahun terakhir yang masih menggunakan senyawa pengkontras *Gadolinium-Diethylene Triamine Penta Acetic Acid (Gd-DTPA)* yang tidak bersifat selektif karena senyawa pengkontras gadolinium ini tidak bertarget [7-8]. Oleh sebab itu senyawa pengkontras *MRI* yang mempunyai afinitas pengikatan kuat pada sasaran sangat diinginkan. Semakin tinggi nilai afinitas pengikatan antara senyawa pengkontras dengan organ target maka akan semakin tinggi *uptake ratio* senyawa pengkontras antara tumor dan jaringan normal sehingga semakin selektif senyawa pengkontras tersebut yang pada gilirannya dapat memberikan penyngatan citra yang

lebih tinggi pada organ target/tumor dibandingkan pada jaringan normal.

Penggunaan makromolekul adalah salah satu cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan afinitas pengikatan senyawa pengontras. Beberapa penelitian tentang penggunaan senyawa pengontras makromolekuler telah dilakukan. Salah satunya adalah penelitian terhadap tumor otak glioma tikus dengan menggunakan senyawa pengontras *Gd-DTPA-Dendrimer-Antibodi Anti-EGFR*. Senyawa pengontras ini memberikan penyngatan citra yang lebih tinggi karena mempunyai relaksivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa pengontras *Gd-DTPA*. Pencitraan yang lebih spesifik terhadap glioma otak tikus ini disebabkan oleh adanya afinitas *Gd-DTPA-Dendrimer-Antibodi Anti-EGFR* yang lebih tinggi dibandingkan dengan *Gd-DTPA* sehingga dapat lebih spesifik mendeteksi glioma otak [7-9].

Pada ini penelitian dilakukan kajian secara in vitro afinitas pengikatan antara *trastuzumab* dengan reseptor *HER-2* yang diekspresi oleh *cell line* tumor ganas ovarium *SKOV-3*. Kajian afinitas pengikatan ini dilakukan dengan metode *radioligand binding assay* dengan menggunakan *trastuzumab* yang ditandai dengan iodium-125 (<sup>125</sup>I) untuk memudahkan proses deteksi. Hasil kajian ini diharapkan dapat menjadi landasan penelitian lanjutan untuk pembuatan senyawa pengkontras bertarget berbasis *trastuzumab* yang spesifik untuk tumor ganas ovarium yang nantinya dapat memberikan kontribusi bagi perbaikan prosedur penanganan tumor ganas ovarium.

## METODE PERCOBAAN

### Bahan dan Alat

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah *trastuzumab* didapat dari PT Roche, Indonesia, larutan salin dari PT. IPHA,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , NaOH, EDTA dan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) dari PT. E. Merck, *bovine serum albumin* (BSA) dari Sigma, *fetal bovine serum* (FBS) dari JRS, *penicillin streptomycin*, *trypsin-EDTA* 0,25%, *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dan RPMI 1640 dari Gibco, *Mc-Coy 5A* media dari ATCC. Air bebas ion ( $\Omega$  18 M Ohm) didapatkan dari sistem Sartonet. Bahan lain yang digunakan adalah kaset dialisis (20.000 MWCO) dari Pierce dan kolom PD 10 yang berisikan *Sephadex G-25 Medium* dari Pharmacia.  $Na^{125}I$  diperoleh dengan mengiradiasi  $^{124}Xe(n,\gamma)^{125}Xe$  di Reaktor Serba Guna Siwabessy, Peluruhan  $^{125}Xe$  ( $\gamma$ ) memberikan  $^{125}I$  yang kemudian diproses di laboratorium PRR. Sel SKOV-3 (sel keganasan ovarium positif *HER-2*) adalah pemberian LAPTIAB-BBPT. Semua bahan kimia digunakan sebagaimana adanya kecuali jika ada pemurnian akan dijelaskan dalam prosedur kerja.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah: *magenetic stirer* (*Labcompanion*),

*thermomixer* (Bio Rad), *laminar air flow* (*Labconco Corporation*), *Plate Reader* (BioTek), kromatografi lapisan tipis (KLT) *scanner* (*Bioscan*), Allegra 64R *refrigerated centrifuge* (*Beckman Coulter*), *Topincu 150* inkubator (*Medline*), *inverted microscope* (*Ceti*), *haemocytometer* (*Assistant*), *micropipette* (*Thermo Scientific* dan *Eppendorf*), *sterifil aseptic system vacuum pump* (*Waters*), *bunzen* (*Fuego basic*), *matrix pipette pump aid* (*Thermo Scientific*), *multicooker/ waterbath* (*Maspion*) dan *Hiclave HVE-50 autoclave* (*Hiramaya*).

### Cara Kerja

Preparasi  $^{125}I$ -*trastuzumab* dilakukan dengan menggunakan Iodogen sebagai oksidator  $^{125}I$ .

#### Pemurnian *Trastuzumab*

*Trastuzumab* yang didapatkan dari pasar komersial terlebih dahulu harus dimurnikan dari bahan lain yang ada dalam sediaan. Pemurnian dilakukan dengan cara mendialisasi *trastuzumab* menggunakan dialisis kaset (MWCO 20.000 Dalton). Pada proses ini *trastuzumab* dimurnikan dari senyawa lain dengan berat molekul < 20.000 Dalton. Proses dialisis diawali dengan proses pelarutan *trastuzumab* dengan larutan salin untuk mendapat *trastuzumab* dengan konsentrasi 5 mg/mL. Larutan *trastuzumab* kemudian diinjeksikan kedalam kaset dialisis yang telah direndam dalam larutan dapat fosfat 0,1 M pH 7,2 selama tiga menit. *Trastuzumab* didialisis selama empat hari dengan tiga kali pengantian larutan dapat fosfat 0,1 M pH 7,2.

#### Penandaan *Trastuzumab* dengan $^{125}I$

Kedalam sebuah tabung gelas (8 mL) dimasukan 500  $\mu$ L (0,5 mg) larutan Iodogen dalam kloroform (1 mg/ mL). Larutan Iodogen kemudian dikeringkan dengan tiupan gas nitrogen. Ke dalam tabung kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L *trastuzumab* (1 mg) dalam dapat fosfat 0,1 M pH 7,2 yang diikuti dengan penambahan  $Na^{125}I$  (5 mCi).

Campuran kemudian diaduk dengan *Vortex* dan dibiarkan bereaksi selama dua menit yang diikuti dengan penambahan 2,5  $\mu$ L larutan KI (1 ng/ $\mu$ L). Campuran reaksi kembali dibiarkan untuk bereaksi selama dua menit sebelum dilakukan proses pemurnian dengan kolom PD 10 yang telah dijenuhkan dengan larutan BSA 10% dan dikondisikan dengan PBS 0,01 M pH 7,4.

#### Uji Kemurnian Radiokimia $^{125}I$ -*Trastuzumab*

Fraksi-fraksi hasil elusi kolom PD 10 dengan dengan radioaktifitas dan kandungan protein yang relatif tinggi ( $^{125}I$ -*trastuzumab*) kemudian diuji kemurnian radiokimianya dengan kromatografi lapisan tipis (KLT).

Sejumlah ( $2 \mu\text{L}$   $^{125}\text{I}$ -trastuzumab) ditotolkan satu cm dari bagian ujung bawah kertas kromatografi Whatman No. 1 (ukuran  $1,5 \times 20$  cm). Totolan dikeringkan, diikuti dengan pengelusan dengan *eluent* berupa campuran metanol : etanol :  $\text{NH}_4\text{OH}$  dengan perbandingan 1 : 2 : 3 sampai *eluent* mencapai satu cm dari ujung bagian atas kertas kromatografi. Kertas kromatografi dikeringkan dan dicacah dengan KLT scanner.

#### Pengukuran Kadar Protein $^{125}\text{I}$ -Trastuzumab

Fraaksi-fraaksi dengan kemurnian radiokimia  $> 95\%$  dikumpulkan kedalam satu tabung. Kadar proteinnya kemudian ditentukan dengan metode spektrometri menggunakan pewarna *Bio Rad Protein Assay Reagent* dengan *BSA* berbagai konsentrasi (antara  $0,1 \text{ mg/mL}$  hingga  $0,5 \text{ mg/mL}$ ) sebagai standar. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang  $595 \text{ nm}$  dengan menggunakan *Plate Reader*.

#### Stabilisasi Kompleks ( $^{125}\text{I}$ -Trastuzumab)

Uji kestabilan  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab dilakukan dengan cara menyimpan pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 4 minggu dan dimonitor dengan KLT dengan menggunakan kertas Whatman No. 1 dan campuran metanol : etanol :  $\text{NH}_4\text{OH}$  dengan perbandingan 1 : 2 : 3 berturut-turut sebagai fasa diam dan fasa gerak.

#### Kultur Sel

*SKOV-3* sel (*ovarium carcinoma, positive HER-2 cell lines*) dikultur dengan media *RPMI* yang mengandung  $10\%$  *FBS* dan  $1\%$  penicillin-streptomycin dalam inkubator dengan  $5\%$   $\text{CO}_2$  pada  $37^\circ\text{C}$ . Sel kultur dilakukan setiap dua atau tiga kali hari sekali sampai jumlah sel yang dibutuhkan memenuhi kebutuhan untuk uji afinitas pengikatan.

#### Penentuan Afinitas Pengikatan

Penentuan afinitas pengikatan dilakukan dengan menginkubasi sejumlah tertentu *trastuzumab* bertanda ( $^{125}\text{I}$ -trastuzumab) dengan populasi tertentu *cell line* tumor ganas ovarium. Satu set tabung yang telah diberi nomor atau tanda, *Non Specific Binding (NSB)* untuk No. 1 dan 2, kemudian *Total Binding (TB)* untuk tabung No. 3, 4, 5, 6, dan seterusnya sesuai dengan kebutuhan dan ditambah dengan tiga tabung untuk standar (*TRA*). Ke dalam semua tabung kemudian ditambahkan  $400.000$  sel *SKOV-3*. Sejumlah *trastuzumab* tidak bertanda kemudian ditambahkan ke dalam tabung *NSB* (No. 1 dan 2) dan biarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Pipet sejumlah  $\text{PBS } 0,01\text{M pH } 7,4$  kedalam tabung *TB* (No. 3, 4, 5, 6, dan seterusnya). Selanjutnya sejumlah tertentu (dengan volume  $50 \mu\text{L}$ )  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab ditambahkan kedalam seluruh tabung ditambah dengan tiga tabung standar (*TRA*). Semua tabung-tabung

(kecuali *TRA*) kemudian diaduk dengan *vortex* yang diikuti dengan masa inkubasi selama satu jam pada  $37^\circ\text{C}$ . Ke dalam semua tabung (kecuali *TRA*) kemudian ditambahkan  $1 \text{ mL PEG } 6\%$  yang diikuti dengan pengadukan dengan *vortex* dan inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Semua tabung (kecuali *TRA*) kemudian disentrifus selama 30 menit pada  $2500\text{G}$ . Dekantasi semua larutan dari setiap tabung (kecuali *TRA*) yang dilanjutkan dengan pencacahan tabung dengan pencacah gamma. Penelitian afinitas dilakukan secara duplo. Dari hasil pencacahan akan didapatkan nilai *Total Binding (TB)*, *Non-Specific Binding (NSB)* dan *Spesific Binding (SB)* yang dihitung secara matematis dengan mengurangkan *TB* dengan *NSB*.

Analisis data interaksi antara *trastuzumab* dengan reseptor *HER-2* pada sel *SKOV-3* dilakukan dengan membuat kurva antara jumlah ikatan sebagai fungsi konsentrasi *trastuzumab*. Penentuan nilai konstanta disosiasi ( $K_d$ ) dilakukan dengan memplotkan antara konsentrasi  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab yang ditambahkan atau  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab free (bebas) terhadap *SB* dengan metoda regresi. Untuk memperjelas nilai  $B_{\text{max}}$  dan  $K_d$  dibuat *plot Scatchard*, *plot* antara rasio *bound* (jumlah ikatan) terhadap *free*, (*bound/free*) dengan *bound*. Titik potong kurva di atas dengan sumbu Y akan memberikan  $Y = B_{\text{max}}/K_d$  dan titik potongnya dengan sumbu X akan memberikan  $X = B_{\text{max}}$ , dan kemiringan kurva (*slope*) =  $1/K_d$ . Analisis data menggunakan uji korelasi karena kedua variabel dengan jenis data numerik menggunakan program *SPSS* pada derajat kepercayaan  $95\%$  atau  $p < 0,05$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mempelajari afinitas pengikatan antara antibodi monoklonal *trastuzumab* dengan reseptor *HER2*, *trastuzumab* terlebih dahulu ditandai dengan  $^{125}\text{I}$ . Hal ini dilakukan untuk memudahkan proses deteksi pengikatan antara antibodi monoklonal *trastuzumab* dengan reseptor *HER-2*. Penandaan *trastuzumab* terlebih dahulu ditandai dengan  $^{125}\text{I}$  dengan menggunakan Iodogen sebagai oksidator berhasil memberikan  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab dengan kemurnian radiokimia mencapai  $98,84\%$  setelah pemurnian dengan kolom PD 10.

Kestabilan  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab yang akan digunakan sebagai model dalam penelitian ini perlu menjadi perhatian karena  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab yang tidak stabil akan dapat melepaskan  $^{125}\text{I}$  yang pada gilirannya tidak memberikan data hasil uji afinitas pengikatan  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab-*HER-2* yang sebenarnya. Hasil uji stabilitas  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab yang disimpan pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 120 jam dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil uji stabilitas menunjukkan bahwa *trastuzumab* sampai dengan pada minggu kedua pengamatan memberikan kemurnian radiokimia di atas  $95\%$ . Hal ini menunjukkan bahwa *trastuzumab* masih

cukup stabil dalam rentang waktu penyimpanan 120 jam setelah preparasi.

Uji afinitas pengikatan dilakukan dengan menginkubasi sejumlah tertentu  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab dengan populasi tertentu sel SKOV-3. Gambar 1 menunjukkan kurva saturasi pada kesetimbangan NSB dan TB serta pengurangan nilai TB dengan NSB yang menghasilkan SB. Pada grafik tersebut dapat dilihat bahwa ada korelasi yang sangat kuat ( $R^2 = 0,858$ ) antara konsentrasi trastuzumab dengan SB dan bermakna secara statistik dengan nilai  $p < 0,05$  ( $p < 0,001$ ). Kurva juga menunjukkan adanya ikatan trastuzumab dengan HER-2 pada permukaan sel dengan SB (ikatan spesifik) sebesar 3,9412 pM untuk 0,22 ng trastuzumab. Secara statistik dapat diartikan bahwa trastuzumab bisa memprediksi SB sebesar 85,8 %, sedangkan 14,2 % dari faktor yang tidak terdeteksi.

Hasil uji afinitas pengikatan antara antibodi monoklonal trastuzumab dengan reseptor HER-2 menghasilkan plot Scatchard kurvilinier (Gambar 2). Hasil analisis pada kurva ini memberikan nilai  $B_{\text{max}} = 4 \times 10^{-7}\text{M}$  dan  $K_d = 9,17 \times 10^{-9}\text{M}$ .

$B_{\text{max}}$  menunjukkan banyaknya reseptor pada sel tersebut, nilai  $B_{\text{max}}$  ini tergantung dari jumlah reseptor. Pada penelitian ini dihasilkan nilai  $B_{\text{max}}$  sebesar  $4 \times 10^{-7}\text{M}$ , yang artinya terdapat  $4 \times 10^{-7}\text{M}$  jumlah reseptor/sel. Nilai  $B_{\text{max}}$  dapat digunakan sebagai dasar untuk pemberian suatu mAb yang maksimal yang langsung ke reseptor dan menghindari dari terjadinya efek samping.

Nilai  $K_d$  merupakan tetapan disosiasi dan suatu ukuran dari kekuatan interaksi dari ligan terhadap reseptornya yang menunjukkan konsentrasi ligan yang akan mengisi 50 % dari reseptor. Dengan demikian, pada

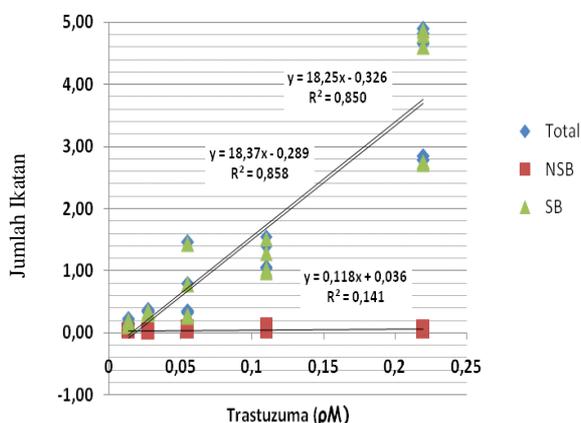
konsentrasi  $9,17 \times 10^{-9}\text{M}$ , trastuzumab akan mengisi 50 % site binding reseptor HER-2 pada SKOV-3 sel. Nilai  $K_d$  yang didapat dari hasil penelitian ini relatif lebih tinggi dari nilai  $K_d$  standar EGF - standar trastuzumab ( $8 \times 10^{-8}\text{M}$ ). Dimana nilai  $K_d = 10^{-6}\text{M}$  disebut memiliki afinitas yang rendah, nilai  $K_d$  antara  $10^{-7}\text{M}$  hingga  $10^{-8}\text{M}$  disebut memiliki afinitas intermediat dan nilai  $K_d \sim 10^{-9}\text{M}$  disebut memiliki afinitas yang tinggi untuk reseptornya [10].

Dalam penyiapan suatu senyawa pengkontras bertarget berbasis mAb ada beberapa langkah yang harus dilakukan. Langkah-langkah yang paling signifikan adalah proses konjugasi Bifunctional Chelating Agent (BCA), suatu senyawa yang mempunyai dua gugus reaktif, satu gugus berfungsi untuk berikatan dengan mAb sementara gugus yang lain berikatan dengan unsur yang bersifat paramagnetik, pada mAb. Kemudian dilanjutkan dengan mereaksikan konjugat mAb-BCA dengan unsur yang bersifat paramagnetik seperti Gd.11 Proses konjugasi antara mAb-BCA pada umumnya melibatkan gugus-gugus aktif  $-\text{NH}_2$  atau  $-\text{COOH}$  yang ada pada rangkaian asam amino mAb. Oleh sebab itu proses konjugasi ini sangat berpotensi mengubah karakter biologis mAb seperti nilai  $K_d$  atau afinitas pengikatan mAb yang termodifikasi pada reseptornya. Sama seperti penyiapan senyawa pengkontras bertarget berbasis mAb, penyiapan radioimmunokonjugat (mAb bertanda radionuklida) juga memerlukan BCA. Peneliti sebelumnya melaporkan pada radioimmunokonjugat (mAb bertanda radionuklida) yang termodifikasi dengan 5,5 mol BCA/mol mAb memberikan immunoreactivity (kemampuan suatu mAb berikatan dengan antigen/ reseptornya) dan uptake yang rendah pada organ target dibandingkan radioimmunokonjugat yang termodifikasi dengan 2,4 mol BCA/mol mAb.12 Oleh sebab itu penentuan afinitas pengikatan atau  $K_d$  suatu mAb terhadap reseptornya sebelum dan sesudah modifikasi untuk penyiapan senyawa pengkontras bertarget berbasis mAb perlu dilakukan.

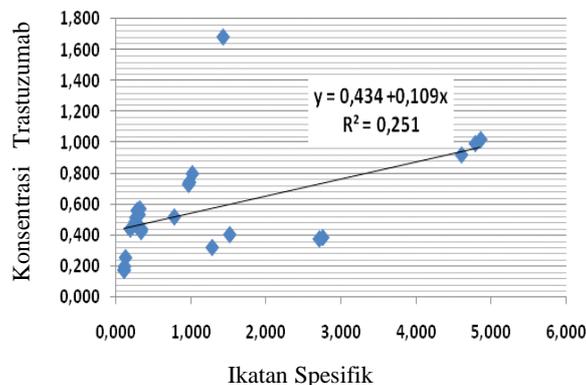
Hasil penentuan nilai  $K_d$  trastuzumab terhadap HER-2 sel SKOV-3 dalam penelitian ini memperlihatkan bahwa trastuzumab mempunyai afinitas pengikatan yang

Tabel 1. Hasil uji kestabilan/kemurnian radiokimia  $^{125}\text{I}$ -trastuzumab.

Lama penyimpanan (jam)	Kemurnian radiokimia (%)
0	98.5
72	97.5
120	95.1



Gambar 1. Kurva untuk penentuan Ikatan Total (TB), Ikatan Spesifik (SB) dan Ikatan Tidak Spesifik (NSB).



Gambar 2. Kurva hubungan antara ikatan spesifik dengan konsentrasi trastuzumab.

relatif tinggi terhadap *HER-2* sel *SKOV-3*. Hasil ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penyiapan senyawa pengkontras berbasis *trastuzumab* untuk diagnosis tumor ganas ovarium. Senyawa pengkontras berbasis *trastuzumab* yang nantinya disiapkan dalam penelitian lanjutan diharapkan masih mempunyai  $K_d$  yang tidak jauh berbeda dari  $K_d$  *trastuzumab* yang belum dimodifikasi sehingga afinitas pengikatannya masih terjaga baik. Dengan demikian akan didapatkan senyawa pengkontras berbasis *trastuzumab* yang bersifat bertarget dan selektif yang dapat digunakan dalam prosedur *MRI*.

## KESIMPULAN

Penentuan afinitas pengikatan *trastuzumab* terhadap reseptor *HER-2* yang diekspresikan oleh sel *SKOV-3* telah berhasil dilakukan. Hasil penelitian memperlihatkan adanya afinitas pengikatan yang baik antara *trastuzumab* dengan reseptor *HER-2* yang diekspresikan sel *SKOV-3*. Afinitas pengikatan yang baik antara *trastuzumab* dengan reseptor *HER-2* yang diekspresikan sel *SKOV-3* ini dapat menjadi dasar penyiapan senyawa pengkontras bertarget berbasis *trastuzumab* bertarget untuk diagnosis tumor ganas ovarium dengan prosedur *MRI*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada KEMENRISTEK yang telah mendukung sebagian dana penelitian ini melalui Program Insentif Peningkatan Kemampuan Peneliti dan Perekayasa 2011. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada Drs. Agus Ariyanto dan staf Kelompok Bioassay, Drs. Adang HG, Apt. dan staf Kelompok Biodinamika, serta staf Kelompok Sintesa dan Preparasi, Bidang Radiofarmaka - Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka, BATAN yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

## DAFTAR ACUAN

- [1]. SIHOMBING M, SIRAIT AM, *Majalah Kedokteran Indonesia*, **57** (10) (2007) 346-352
- [2]. Laporan tahunan 2008. Bagian/SMF Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung.
- [3]. ROSS., J.A. FLETCHER., K.J. BLOOM., G.P. LINNETTE., J. STEC., W.F. SYMMON., L. PUSZTAI., G. N. HORTOBAGY. *Molecular and Cellular*, **3** (4) (2004) 379- 398
- [4]. YURIANDA R., Hubungan Ekspresi Protein Human Epidermal Growth Factor Receptor (*HER2*) dengan Karakteristik Klinik dan Patologi pada Tumor Ganas Ovarium di Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung, *Tesis Universitas Padjadjaran*, Bandung (2006)
- [5]. ESTEVA FJ, CHELI CD, dkk. *Breast Cancer Res.*, **7** (2005) 436-43
- [6]. CHANG E, LEE A., dkk., *J. Korean Med Sei.*, **19** (2004) 390-6
- [7]. EDSON A, GARETH J. BARKER, *Study Design in fMRI: Basic Principles. Neuroimaging Research Group*, Institute of Psychiatry, King's College, University College, London, UK. Institute of Radiology, Universidade de São Paulo, Brazil, (2005) Elsevier Inc. doi:10. (2005)
- [8]. SOETIKNO, RD. Penyangatan Citra Resonansi Magnetik Tumor Otak Glioma Tikus dengan Menggunakan Senyawa Pengontras GD-DTPA-Dendrimer-Antibodi Anti-*EGFR*, *Disertasi Universitas Padjadjaran*, Bandung (2010)
- [9]. STAVROULA K, DAVID JC, VERONICA AM. *Radiographics*, **30**(5) (2010) 1269-1285
- [10]. YU CAO, JAMES D. MARKS, JOHN W. MARKS. *Cancer Res.*, **69** (2009) 8987-8995, Published Online First November 24, 2009
- [11]. GUNAWAN, H.G., SUTIKNO, R., MUTALIB, A., SUGIHARTO, Y., HAYUNI, R.D., KARYADI, AGUSWARINI. Preparasi, Biodistribusi dan Clearance Senyawa Pengkontras MRI Gd-DTPA-PAMAM G4-Nimotuzumab Melalui Simulasi Menggunakan <sup>153</sup>Gd-DTPA-PAMAM G4-Nimotuzumab, *Prosiding Seminar Nasional VI SDM Teknologi Nuklir*, Yogyakarta, (2010) 711 - 717
- [12]. SHIN, I. S., LEE, S.-M., KIM, H. S., YAO, Z., REGINO, C., SATO, N., CHENG, K. T., HASSAN, R., CAMPO, M. F., ALBONE, E. F., CHOYKE, P. L., PASTAN, I., PAIK, C. H. *Anti-mesothelin Antibody Nuclear Medicine and Biology*, **38** (2011) 1119-1127