

PREPARASI DAN UJI STABILITAS ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂- NIMOTUZUMAB SEBAGAI KANDIDAT RADIOFARMAKA TERAPI KANKER

Martalena Ramli¹, Citra R.A.P. Palangka², Lina Elfita², Ratna Dini Haryuni¹,
Titis Sekar Humani¹

¹) Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka
Gedung 11, Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang Selatan – Banten 15310

²) Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Program Studi Farmasi,
Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah,
Jalan Ir. Haji Juanda No.95, Ciputat, Tangerang Selatan, Banten 15412
marta_r@batan.go.id

ABSTRAK

PREPARASI DAN UJI STABILITAS ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂- NIMOTUZUMAB SEBAGAI KANDIDAT RADIOFARMAKA TERAPI KANKER. Radioimunoterapi adalah salah satu modalitas pada terapi kanker yang berkembang dengan cukup pesat pada dekade terakhir ini. Radioimunoterapi memanfaatkan kemampuan antibodi monoklonal untuk berikatan secara spesifik dengan reseptor tertentu yang *over expressed* pada suatu jenis kanker. Nimotuzumab merupakan *humanised* antibodi monoklonal yang termasuk ke dalam kelompok inhibitor *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dengan spektrum cukup luas. Peningkatan efek terapi yang signifikan dilaporkan jika penggunaan nimotuzumab dikombinasikan dengan radioterapi. Pada penelitian yang dilaporkan ini telah dilakukan penyiapan dan uji stabilitas F(ab')₂ fragmen nimotuzumab bertanda ^{177}Lu yang diharapkan potensial untuk terapi kanker *over expressed* EGFR. Penggunaan F(ab')₂ fragmen pada penelitian ini diharapkan dapat mengatasi penetrasi antibodi monoklonal utuh yang lambat (~24 jam) untuk dapat terakumulasi pada targetnya. ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab disiapkan dalam beberapa tahap proses yaitu: a) fragmentasi nimotuzumab dengan pepsin; b) konjugasi *bifunctional chelating agent* (BFCA) p-SCN-Bz-DOTA pada F(ab')₂-nimotuzumab dan c) penandaan DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab dengan ^{177}Lu . Fragmentasi nimotuzumab dengan pepsin menghasilkan F(ab')₂-nimotuzumab dengan kemurnian sebesar 89,1% setelah pemurnian dengan kolom PD-10. Efisiensi penandaan p-SCN-Bz-DOTA F(ab')₂-nimotuzumab dengan ^{177}Lu berturut 2,2 dan 7,8 % untuk mol ratio p-SCN-Bz-DOTA terhadap F(ab')₂-nimotuzumab 20 : 1 dan 50 : 1. ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab dengan kemurnian radiokimia > 99% berhasil didapatkan setelah proses pemurnian dengan kolom yang berisi resin Sephadex G 25M. Uji stabilitas ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab selama 96 jam pada suhu kamar dan 4°C memperlihatkan tidak adanya pelepasan ^{177}Lu dari ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab.

Kata kunci: radioimunoterapi, nimotuzumab, fragmentasi, ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab

ABSTRACT

Radioimmunotherapy is one of many modalities used for cancer treatment which has been developing significantly in the last decade. Radioimmunotherapy takes the advantage of the ability of monoclonal antibody to bind specifically to over expressed receptor on particular cancer. Nimotuzumab is a humanised monoclonal antibody which included in epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor group. It was reported that the use nimotuzumab combined with radiotherapy significantly increased the effect of therapy. In this reported project it has been prepared F(ab')₂ fragmen nimotuzumab labeled ^{177}Lu which is expected to be potential for radioimmunotherapy of cancer which have over expressed of EGFR. The use of F(ab')₂ fragment is expected to overcome the slow (~ 24 hours) penetration of whole monoclonal antibody to its target. ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab was prepared in three-step reaction: a) fragmentation nimotuzumab with pepsin; b) conjugation bifunctional chelating agent (BFCA) p-SCN-Bz-DOTA towards F(ab')₂-nimotuzumab and c) labeling of DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab with ^{177}Lu . Fragmentation of nimotuzumab with pepsin resulted in F(ab')₂-nimotuzumab with purity of 89,1% after purification with a PD-10 column. Radiolabeling efficiencies of p-SCN-Bz-DOTA F(ab')₂-nimotuzumab with ^{177}Lu were 2,2 and 7,8 % for mol ratio of p-SCN-Bz-DOTA : F(ab')₂-nimotuzumab in conjugation reaction 20 : 1 and 50 : 1 respectively. ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab with radiochemical purity > 99% was successfully obtained after purification process with a Sephadex G 25M column. Stability tests showed that ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab was still intact at room temperature and 4°C for up to 96 hours.

Key words: radioimmunotherapy, nimotuzumab, fragmentation, ^{177}Lu -DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab

PENDAHULUAN

Radioimmunoterapi (RIT) merupakan salah satu modalitas untuk terapi kanker yang berkembang dengan cukup pesat pada dekade terakhir ini. RIT dalam prosedurnya menggunakan radiofarmaka berbasis antibodi monoklonal (radioimmunokonjugat) yaitu antibodi monoklonal (mAb) yang telah dikonjugasikan dengan radionuklida pemancar partikel α , β atau Auger dan Coster Kronig (AC-K) elektron yang juga mungkin sekaligus pemancar sinar γ atau β^+ [1,2,3]. Pada prosedur ini mAb berfungsi sebagai pembawa radionuklida pada target/kanker tertentu yang pada permukaan target/kanker tersebut terdapat *over expressed* antigen atau reseptor yang kompatibel dengan mAb tersebut, sedangkan radionuklida berfungsi sebagai penghancur sel kanker dengan cara mentransfer energinya (α , β atau Auger electron) pada jaringan kanker dimana radionuklida tersebut terikat dan juga pada jaringan kanker disekitarnya. Radionuklida pemancar partikel α , β atau Auger elektron yang juga mungkin sekaligus pemancar sinar γ atau β^+ akan memberikan manfaat lebih karena dapat digunakan untuk mengevaluasi deposisi atau dosis yang ditangkap oleh target ataupun non-target.

Nimotuzumab merupakan *humanised* antibodi monoklonal yang termasuk ke dalam kelompok inhibitor *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dengan spektrum cukup luas [4,5]. Nimotuzumab telah disetujui oleh setidaknya 27 negara di dunia untuk immunoterapi berbagai jenis kanker diantaranya yaitu kanker kolon, otak, pankreas, prostat, non-small cell lung, oesophagus, leher rahim dan payudara [6]. Nimotuzumab dalam prosedur penanganan kanker bisa digunakan sebagai anti kanker tunggal tetapi juga sering digunakan dalam bentuk kombinasi dengan anti kanker yang lain ataupun dengan radioterapi eksternal. Penggunaan nimotuzumab yang dikombinasikan dengan radioterapi eksternal sementara itu dilaporkan mampu meningkat efek terapi secara

signifikan [7]. Mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker oleh nimotuzumab diawali dengan pengikatan nimotuzumab dengan bagian ekstraselular dari EGFR. Pengikatan ini mencegah interaksi dua ligan utama EGFR yaitu *epidermal growth factor* (EGF) dan *tumor growth factor alpha* (TGF- α) yang mengakibatkan terhambatnya aktivitas *tyrosine kinase* dari EGFR dan yang pada gilirannya akan mencegah sel kanker untuk menerima pesan untuk tumbuh, membelah dan bermetastases [5].

Radioimmunokonjugat yang pertama kali disetujui oleh *Federation Drug Administration of USA* (FDA – USA) pada tahun 2002 adalah ^{90}Y -ibritumomab dan ^{131}I -tositumomab [2]. Sekitar 18 radioimmunokonjugat baru yang masih dalam tahap uji klinis dan siap untuk digunakan pada prosedur RIT dalam beberapa tahun kedepan juga telah dilaporkan [2,8]. Perkembangan yang cukup pesat dan menjanjikan ini dalam pelaksanaannya mengalami beberapa kendala yang salah satunya adalah lambatnya penetrasi/terakumulasinya radioimmunokonjugat pada target yang diinginkan dan juga lambatnya proses kliren dari organ non-target. Hal ini akan menyebabkan terpaparnya organ-organ bukan target pada radiasi yang tidak diperlukan. Lambatnya penetrasi/akumulasi radioimmunokonjugat pada target dan juga lamanya eliminasinya dari tubuh lebih disebabkan oleh berat molekul (BM) mAb utuh (prekursor radioimmunokonjat) yang relatif cukup besar yaitu ~ 150 kDa [5]. Sebagai perbandingan, IgG yaitu protein yang strukturnya sangat mirip dg mAb utuh selama proses metabolismenya akan bersirkulasi selama 4 – 5 minggu setelah diinjeksikan, sedangkan molekul yang lebih kecil monovalen fragmen IgG dengan BM 25-kDa (scFv) akan dieksresikan keluar tubuh < 10 jam sejak dari diinjeksikan. Pengikatan/penetrasi molekul kecil memang relatif cepat, tetapi kelemahannya adalah molekul ini juga dengan cepat dieliminasi dari tubuh, sebagai

konsekuensinya tidak punya waktu cukup untuk terakumulasi pada target sehingga jumlah yang terikat menjadi terbatas dengan waktu residen yang juga relatif pendek.

Penelitian ini bertujuan untuk menyiapkan radioimmunokonjugat fragmen $F(ab)_2$ dari nimotuzumab yang ditandai dengan ^{177}Lu yang diharapkan potensial sebagai anti kanker *over expressed* EGFR pada prosedur RIT. Penggunaan fragmen $F(ab)_2$ dengan BM yang lebih kecil dari mAb utuh tetapi lebih besar dari scFv (mAb > $F(ab)_2$ > scFv) diharapkan akan meningkat kemampuan penetrasi/ penangkapan radioimmunokonjugat pada target yang diinginkan. BM fragmen $F(ab)_2$ yang hanya ~ 100 kDa ini diharapkan akan dapat dieliminasi dari tubuh lebih cepat dibandingkan dengan mAb utuh tetapi lebih lambat dari molekul kecil (scFv), sehingga konsentrasi radioimmunokonjugat yang terakumulasi pada target akan lebih optimal. Pemilihan ^{177}Lu sebagai radionuklida yang akan dikonjugasikan pada nimotuzumab karena ^{177}Lu merupakan radionuklida pemancar partikel β lunak dengan E_{\max} 497 (78,6%) dan 176 keV (12,2) yang sesuai untuk terapi kanker berukuran kecil (kemampuan penetrasi ~1,5). ^{177}Lu selain itu juga pemancar sinar γ dengan E_{\max} 113 (6,4%) dan 208 KeV (11%), energi yang terakhir sangat sesuai untuk pencitraan deposisi radioimmunokonjugat secara *in vivo* dengan *Single-photon emission computed tomography* (SPECT) [2.9].

Penelitian yang dilaporkan ini, merupakan penelitian tahap awal dalam penyediaan ^{177}Lu -DOTA- $F(ab)_2$ -nimotuzumab untuk RIT, meliputi beberapa tahap proses yaitu: a) fragmentasi nimotuzumab dengan pepsin; b) konjugasi *bifunctional chelating agent* (BFCA) p-SCN-Bz-DOTA pada $F(ab)_2$ -nimotuzumab; c) penandaan DOTA- $F(ab)_2$ -nimotuzumab dengan ^{177}Lu ; d) pemurnian ^{177}Lu -DOTA- $F(ab)_2$ -nimotuzumab hasil proses penandaan dan c) uji stabilitas ^{177}Lu -DOTA- $F(ab)_2$ -nimotuzumab pada penyimpanan (4 °C dan suhu kamar).

METODOLOGI

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah nimotuzumab (Innogene, Kalbe Tech), Lu-177 ($^{177}\text{LuCl}_3$) diperoleh dengan cara irradiasi ^{176}Lu ($^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$, pengkayaan 39,60%, Isoflex,) di Reaktor Serba Guna-G.A. Siwabessy (RSG – GAS) yang kemudian diproses di laboratorium Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka – Badan Tenaga Nuklir Nasional (PTRR – BATAN), *bovine serum albumin* (BSA) dan pepsin serbuk, (Sigma), resin penukar ion Chelex 100, *sodium dodecyl sulfat* (SDS), larutan pewarna *Coomasie blue* G-250, pewarna protein, Mini-PROTEAN TGX 4-20% dan *N,N'-bis-methylene-acrylamide* (Bio-Rad), *p-benzyl isothiocyanate-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid* (p-SCN-Bz-DOTA, Macrocylic), Sephadex G-25 Medium (Pharmacia), *trizma base*, asam asetat glasial, natrium asetat, dipotasium hidrogen fosfat, potasium dihidrogen fosfat, EDTA HCl, NaOH, *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine* (TEMED), *ammonium peroxide disulfate* (APS), *bromophenol blue*, β -merkaptotanol, akrilamid dan glisin dan gliserol (E.Merck), kaset dialysis 20 KDa *molecular weight cut off* (MWCO, Thermo Scientific), protein filter (10 KDa MWCO, Viva Science), air bebas ion (hambatan 18 MegaOhm).

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah kromatografi Cair kinerja tinggi (KCKT, Shimadzu) yang dilengkapi dengan *system controller* (SCL-10A vp), *pump* (LC-10AD vp), *solvent selector* (FCV 10AL vp), *UV Vis detector* (SPD-10A-vp) dan *size exclusion column* (SEC, Agilent dan Bio SEC-3, 7,8 x 300 mm), *thermomixer* (Eppendorf), *termometer*, *penangas air*, Mini-Protein II Slab Cell Electrophoresis (Bio Rad), *pencacah sinar gama* (Scanner, BioScan), *orbital shaker* (Fisher Scientific), *plate reader* (Biotek),

magnetic stirrer (Labcompanion) pipet mikro dan lain sebagainya.

Prosedur kerja

Penyiapan F(ab')₂ nimotuzumab

F(ab')₂ nimotuzumab disiapkan dengan memfragmentasi nimotuzumab utuh dengan enzim pepsin. Sejumlah pepsin (2,5 mg dengan konsentrasi 3200 U/mg) ditambahkan ke dalam 10 mL larutan nimotuzumab (5mg/mL) dalam 0,02 M dapar asetat pH 4.5. Campuran kemudian diinkubasi dengan pengadukan (300 rpm) menggunakan thermomixer pada suhu 37 °C selama 14 - 18 jam. Proses fragmentasi kemudian dihentikan dengan penambahan 2 mL tris-HCl pH 8,0.

Pemurnian F(ab')₂ nimotuzumab

F(ab')₂ nimotuzumab dimurnikan dari molekul kecil hasil samping proses fragmentasi dengan melewati pada kolom berisi resin PD 10 (Sephadex G-25 M) yang sudah dijenuhkan dengan 2 mL BSA 10% dan kemudian dikondisikan dengan dapar fosfat 0,1 M pH 7,4. Kolom dikemudian dielus dengan dapar fosfat 0,1 M pH 7,4 dan sebanyak 60 fraksi eluat kemudian ditampung (0,25 mL/ tabung). Fraksi yang mengandung protein selanjutnya dianalisis dengan HPLC dan SDS-PAGE (non-pereduksi dan pereduksi).

Penyiapan immunokonjugat p-SCN-Bz-DOTA Pada F(ab')₂ nimotuzumab

Kedalam sejumlah F(ab')₂ nimotuzumab (dalam dapar 0,01 M fosfat pH 7,2) ditambahkan larutan p-SCN-Bz-DOTA dengan perbandingan mol 20 : 1 dan 50 : 1. Campuran kemudian diatur pHnya menjadi 8,5 dengan penambahan 1 M NaOH yang diikuti dengan inkubasi pada 4 °C selama 24 jam. Immunokonjugat p-SCN-Bz-DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab yang terbentuk kemudian dimurnikan dengan cara dialisis menggunakan kaset dialisa (20 KD MWCO).

Penandaan immunokonjugat p-SCN-Bz-DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab dengan ¹⁷⁷Lu

Kedalam sejumlah p-SCN-Bz-DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab ditambahkan sejumlah ¹⁷⁷LuCl₃ dalam ammonium asetat 0,25 M pH

7,0 (¹/₃, ¹/₄). Campuran kemudian diatur pH nya sampai menjadi 5,5 dengan penambahan larutan HCl 0.1 M atau 0.1 M NaOH yang dilanjutkan dengan proses inkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Pada akhir reaksi sejumlah larutan EDTA 0,001 M pH 6.0 ditambahkan secara berlebihan (perbandingan mol EDTA : ¹⁷⁷Lu = 20 : 1) yang dilanjutkan dengan proses inkubasi pada 37 °C selama 5 menit. Sejumlah cuplikan (5µL) kemudian diambil dan dianalisis untuk menentukan persentase penandaan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam strip ITLC-SG (1 x 10 cm) dan fase gerak berupa larutan salin (NaCl 0,9%). Persentase penandaan dihitung berdasarkan total cacah yang berada dibawah puncak radioimmunokonjugat dibandingkan terhadap cacah total yang diaplikasikan pada strip KLT.

Pemurnian ¹⁷⁷Lu- p-SCN-Bz-DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab

Pemurnian ¹⁷⁷Lu- p-SCN-Bz-DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab dilakukan dengan menggunakan kolom Sephadex G-25 Medium (1, 2 x 10 cm) yang sudah dijenuhkan dengan 2 mL larutan BSA 10% dan dikondisikan dengan PBS 0,1 M, pH 7,2. Campuran hasil penandaan dimasukkan pada bagian atas kolom yang kemudian dielus dengan PBS 0,1 M, pH 7,2 dengan kecepatan alir 1 mL/ menit. Eluat kemudian ditampung dalam tabung mikro (60 tabung, 0,25 mL tabung). Setiap fraksi eluat kemudian diukur radioaktifitasnya dengan *dose calibrator*. Fraksi yang menunjukkan adanya radioaktifitas kemudian dianalisis dengan sistim KLT [fase diam strip ITLC-SG (1 x 10 cm) dan fase gerak berupa fase gerak berupa larutan salin (NaCl 0,9%)]. Fraksi-fraksi yang mengandung ¹⁷⁷Lu- p-SCN-Bz-DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab dengan kemurnian ~ 99,9% dikumpulkan dan siap digunakan untuk uji lebih lanjut.

Uji stabilitas $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab')_2}$ nimotuzumab pada suhu kamar dan pada 4°C .

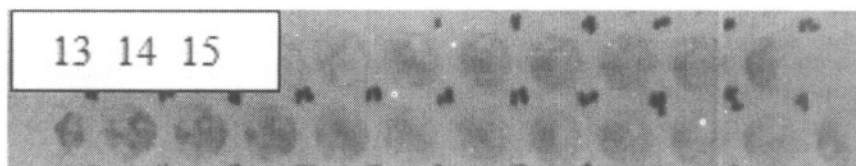
Sejumlah $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab')_2}$ -nimotuzumab (100 μL) disimpan pada suhu kamar dan pada suhu 4°C . Secara berkala sejumlah cuplikan diambil dan kemudian dianalisis kemurnian radiokimianya dengan sistim KLT [fase diam strip ITLC-SG (1 x 10 cm) dan fase gerak berupa fase gerak berupa larutan salin (NaCl 0,9%)].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses fragmentasi seperti yang telah dilaporkan sebelumnya dilakukan dalam dapar asetat 0,02 M pH 4.5 [10]. Sediaan nimotuzumab yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan berbentuk larutan injeksi yang mengandung senyawa aktif nimotuzumab dalam dapar fosfat dan juga polisorbitat 80, oleh karena itu perlu dilakukan pengantian media nimotuzumab. Pengantian media dilakukan dengan cara dialisis menggunakan kaset dialisis (20 KD MWCO) dengan dapar asetat

0,02 M pH 4.5 pada suhu 4°C selama 72 jam (3 kali pengantian dapar).

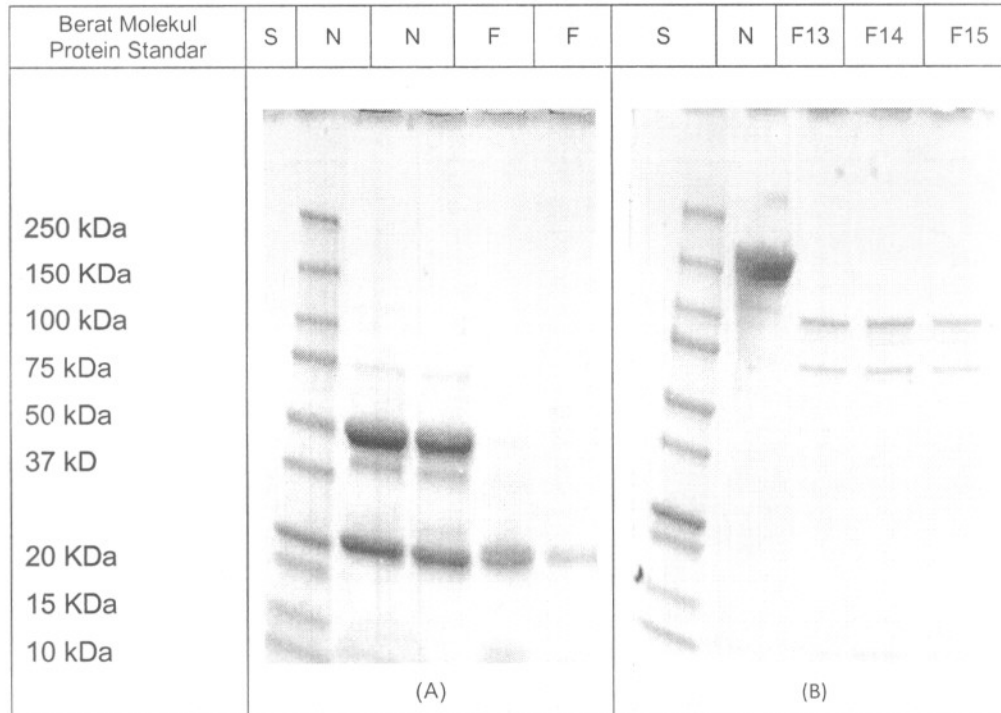
Fragmentasi dilakukan dengan menginkubasi nimotuzumab dengan pepsin selama 14 jam pada suhu 37°C . Fragmentasi nimotuzumab dengan pepsin memotong molekul imunoglobulin pada sisi terminal-C *hinge region* menghasilkan fragmen F(ab')_2 dan degradasi fragmen Fc [11]. Fragmen F(ab')_2 -nimotuzumab dimurnikan dari fragmen Fc dengan kolom PD-10 (berisi resin Sephadex G-25M) yang merupakan kromatografi eksklusi ukuran. Molekul dengan BM kecil akan terjebak masuk kedalam pori-pori resin sedangkan berat molekul yang besar akan terbawa eluen melewati rongga antara molekul-molekul resin sehingga akan dielusi terlebih dahulu [12]. Berdasarkan prinsip tersebut F(ab')_2 nimotuzumab akan dielusi terlebih dahulu dibanding Fc. Keberadaan protein dalam fraksi-fraksi hasil elusi diidentifikasi dengan menambahkan pewarna protein pada setiap fraksi-fraksi elusi. Gambar 1 memperlihatkan fraksi-fraksi hasil pemurnian nimotuzumab yang telah diberi pewarna protein.



Gambar 1. Fraksi-fraksi hasil pemurnian F(ab')_2 nimotuzumab setelah diberi pewarna protein.

Fraksi 13, 14, dan 15 seperti terlihat pada Gambar 1. memberikan intensitas warna yang cukup tajam mengindikasikan keberadaan protein pada fraksi-fraksi tersebut. Fraksi-fraksi ini beserta nimotuzumab sebelum dan sesudah fragmentasi dan protein standar kemudian dianalisis dengan SDS-PAGE. Gambar 2. memperlihatkan SDS-PAGE yang telah diwarnai dengan *Coomassie Blue* hasil analisis nimotuzumab sebelum dan setelah fragmentasi, serta fraksi hasil pemurnian

(F13, F14 dan F15) pada kondisi reduksi dan non-reduksi.



Gambar 2. SDS-PAGE yang telah diwarnai dengan *Coomassie Blue* hasil analisis nimotuzumab sebelum dan setelah fragmentasi, serta fraksi hasil pemurnian

Keterangan:

(A) Kondisi reduksi dengan β -merkaptotanol;

(B) Kondisis non-reduksi

(S): protein standar; (N): nimotuzumab; (F): nimotuzumab setelah fragmentasi;

(F): Fraksi hasil pemurnian No. 13; 14 dan 14;

Penentuan berat molekul (BM) nimotuzumab sebelum/ sesudah fragmentasi serta fraksi hasil pemurnian dilakukan dengan membanding Rf masing-masing cuplikan dengan Rf protein standard yang dianalisis dengan SDS-PAGE (nilai Rf

sebanding dengan nilai BM). Kurva standar antara log BM dan Rf kemudian dibuat. Nilai Rf dari pita-pita protein standar kondisi reduksi serta BM dan log BM dan persamaan regresi linier antara log BM terhadap Rf sementara itu ditabulasi pada Tabel 1.

Tabel 1. Tabulasi nilai Rf dari pita-pita protein standar kondisi reduksi serta BM dan log BM Nilai Rf,

No	Protein	BM (KDa)	Log BM	Rf
1	Myosin	250	2,398	0,19
2	B-Galaktosidae	150	2,176	0,30
3	Phosphorilase b	100	2	0,39
4	BSA	75	1,875	0,46
5	Ovalbumin	50	1,699	0,58
6	Carbonic anhydrase	37	1,568	0,66
7	Soybean trypsin inhibitor	25	1,398	0,78
8	Lysozyme	20	1,301	0,84
9	Aprotinine	15	1,176	0,92
10	Insulin	10	1	1
Persamaan		$Y = -1,659X + 2,682$		

Rf dari pita nimotuzumab sebelum proses fragmentasi dan 2 pita dari cuplikan

hasil fragmentasi pada kondisi reduksi (Gambar 2A) masing masing adalah 0,597;

0,805; 0,799; dan 0,812 cm. BM cuplikan diatas kemudian dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear standar protein untuk kondisi reduksi ($y = -1.659x + 2.682$) berturut-turut adalah 49,08 ; 22,19; 21,65 dan 22,75 kDa. BM ini sebanding atau tidak jauh berbeda dengan BM *heavy chain* Fab dan campuran dari *light chain* Fab dan fragmen Fc dan $F(ab)_2$ -trastuzumab seperti yang dilaporkan oleh Hermanto *et al.*, yaitu 23 dan 22 kDa [13]. Pada kondisi non-reduksi, persamaan regresi linear antara Log BM dan Rf protein standar yang dihitung berdasarkan Rf pita-pita protein standar pada kondisi reduksi (Gambar 2B) adalah $y = -1,664x + 2,686$. Berdasarkan nilai Rf dari nimotuzumab dan 2 pita dari cuplikan pada kondisi non-reduksi yang didapat yaitu 0,306; 0,395; dan 0,5 cm

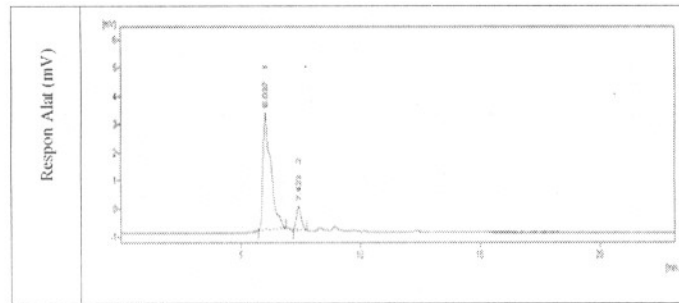
didapat nilai BM berturut-turut 149,99 ; 106,77 ; dan 71,45 kDa pada saat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear standar protein non-reduksi. Hasil ini sebanding dengan atau tidak jauh berbeda dengan BM nimotuzumab dan $F(ab')_2$ pada kondisi non-reduksi yang dilaporkan oleh Xiques *et.al* yaitu sebesar 153,44 dan 110,49 kDa [14]. Sedangkan molekul dengan BM 71,45 kDa belum bisa diidentifikasi. Berdasarkan hasil diatas dapat dikatakan bahwa nimotuzumab yang diinkubasi dengan pepsin selama 14 jam pada 37 °C telah terfragmentasi dengan baik. Ringkasan hasil analisis BM nimotuzumab sebelum dan sesudah fragmentasi serta fraksi hasil pemurnian dengan SDS-PAGE dipresentasikan pada Tabel 2.

Table 2. Hasil analisis nimotuzumab sebelum dan sesudah fragmentasi dengan SDS-PAGE

No	Protein	Reduksi		Non-reduksi	
		Rf (cm)	BM (kDa)	Rf (cm)	BM (kDa)
1	mAb nimotuzumab	0,59	49,08	0,306	149,99
		0,80	22,19		
2	<i>Heavy chain</i> Fab	0,79	21,65	-	-
3	<i>Light chain</i> Fab dan Fc	0,81	22,75	0,39	106,77
4.	Tidak Teridentifikasi	-	-	0,5	71.20

$F(ab')_2$ -nimotuzumab hasil pemurnian selain dianalisis dengan SDS-PAGE juga dianalisis dengan KCKT yang dilengkapi dengan kolom SEC. Kromatogram hasil analisis $F(ab')_2$ -nimotuzumab dipresentasikan pada Gambar 3 yang memperlihatkan adanya dua puncak dengan waktu retensi (r_t) 6,037 dan 7,423 menit. Puncak pertama dapat dipastikan adalah $F(ab)_2$ -nimotuzumab dengan r_t (6,037 menit, hasil analisis dengan SDS-PAGE non-reduksi memberikan nilai BM = 106,34 kDa) ada diantara r_t γ -globulin (5,637 menit, BM 11,58 kDa) = 6,037 menit) dan r_t ovalbumin (6,497, BM 44 kDa) protein standar yang

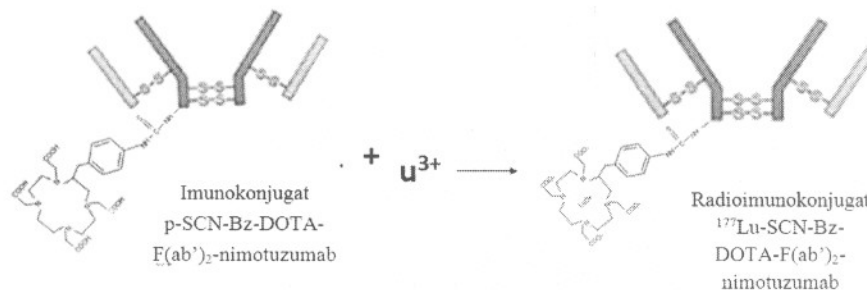
dianalisis pada kondisi yang sama dengan cuplikan $F(ab')_2$ -nimotuzumab. Puncak kedua mempunyai r_t (7,423 menit) yang lebih kecil dibandingkan dengan r_t myoglobin (7,563, BM 17 kDa) protein standar yang dianalisis pada kondisi yang sama dengan cuplikan $F(ab')_2$ -nimotuzumab (data lengkap r_t protein standar dipresentasi oleh Palangka.C.P.P.P (2014) [15]. Puncak kedua ini dipastikan merupakan pengotor atau produk samping proses fragmentasi. Berdasarkan luas puncak $F(ab')_2$ -nimotuzumab (r_t 6,037 menit) hasil analisis dengan KCKT diatas didapatkan $F(ab')_2$ -nimotuzumab dengan kemurnian 89,1%.



Gambar 3. Kromatogram fraksi F(ab')₂-nimotuzumab setelah dimurnikan.

Immunokonjugat p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)₂-nimotuzumab terbentuk akibat terjadinya ikatan tiourea antara -NH₂ dari mAb dengan gugus tiosianat dari p-SCN-Bz-DOTA [16]. Dalam penelitian ini dilakukan variasi perbandingan F(ab')₂ nimotuzumab dengan p-SCN-Bz-DOTA yaitu 1: 20 mol dan 1: 50 mol. Konjugat yang terbentuk kemudian dimurnikan dari hasil samping reaksi atau dari p-SCN-Bz-DOTA yang tidak terikat pada protein dengan cara dialisis menggunakan kaset dialisa dengan MWCO 20 kDa di dalam dapar amonium asetat.

Penandaan Immunokonjugat p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)₂-nimotuzumab dengan ¹⁷⁷Lu dilakukan dengan menambahkan aliquot of ¹⁷⁷Lu dalam ammonium asetat 0,25 M (Gambar 4). Campuran kemudian dinkubasi pada 37 °C selama 60 menit dan setiap 15 menit sejumlah cuplikan diambil untuk dianalisis untuk menentukan efisiensi penandaan. Pada akhir reaksi aliquot EDTA 0.01 M ditambahkan untuk mengikat ¹⁷⁷Lu yang tidak berikatan dengan p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)₂-nimotuzumab.



Gambar 4. Skema reaksi pembentukan radioimmunokonjugat ¹⁷⁷Lu-SCN-Bz-DOTA- F(ab')₂-nimotuzumab.

Penandaan p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)₂-nimotuzumab (disiapkan dari konjugasi p-SCN-Bz-DOTA dengan F(ab)₂-nimotuzumab, 50 :1) dengan ¹⁷⁷Lu (rasio mol p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)₂-nimotuzumab : ¹⁷⁷Lu/ Lu, 1 :1) memberikan efisiensi penandaan sebesar 14,3% pada 37 °C dengan waktu inkubasi selama 45 menit. Efisiensi penandaan ini merupakan efisiensi penandaan optimum karena penandaan yang diinkubasi kurang dari 45 menit pada 37

°C memberikan efisiensi penandaan < 14,3% dan penandaan yang diinkubasi pada 37 °C selama 60 menit memberikan efisiensi penandaan yang hampir sama dengan efisiensi penandaan pada 37 °C selama 45 menit. Penandaan p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)₂-nimotuzumab (disiapkan dari konjugasi p-SCN-Bz-DOTA dengan F(ab)₂-nimotuzumab, 20 :1) dengan ¹⁷⁷Lu (rasio mol p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)₂-nimotuzumab : ¹⁷⁷Lu/ Lu, 1 :1) pada 37 °C dengan waktu

inkubasi selama 45 menit hanya memberikan efisiensi sebesar 4.9%.

Radioimmunokonjugat $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ seperti radiofarmaka lainnya harus memenuhi beberapa persyaratan sebagai radiofarmaka yang baik yaitu diantaranya mempunyai kemurnian radiokimia yang tinggi (95 -100%) dan relatif stabil [17]. Persyaratan ini dimaksudkan untuk mencegah atau memperkecil kemungkinan terjadinya tangkapan pada organ yang tidak diinginkan. $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ dengan immunoreaktivitas yang terjaga jika diinjeksikan kedalam tubuh diharapkan akan ditangkap oleh *over expressed* EFGR yang ada dipermukaan permukaan jaringan kanker tertentu. Lu-177 dalam keadaan bebas seperti logam lantanida lainnya sementara itu akan ditangkap oleh organ hati, limpa dan tulang seperti yang dilaporkan oleh Palasz dan Czekaj (2000) [18]. Berdasarkan alasan diatas $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ dengan kemurnian radiokimia < 95% harus melalui proses pemurnian sebelum dapat digunakan untuk uji-uji yang akan dilakukan pada penelitian ini.

Proses pemurnian $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ pada penelitian ini dilakukan dengan melewati campuran hasil penandaan pada kolom Sephadex G 25M (1,1 X 10 cm, dia x panjang) yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan 2 mL BSA 10% dan dikondisikan dengan dapar fosfat 0.01 M pH 7.4. Fraksi-fraksi pemurnian kemudian dianalisis dengan sistim kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fasa diam ITLC-SG dan fasa gerak larutan salin seperti yang dilaporkan oleh Humani *et al* (2010) [19]. Pada sistim KLT ini $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ setelah proses elusi akan tetap pada titik 0 ($R_f = 0$) sedangkan ^{177}Lu bebas yang tidak terikat p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)₂-nimotuzumab dan telah dikonversi menjadi $^{177}\text{Lu-EDTA}$ akan ikut bersama eluen dan memberikan $R_f = 1$. $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ dengan kemurnian ~99% berhasil

didapatkan dengan proses pemurnian menggunakan kolom Sephadex G 25M.

Uji stabilitas $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ pada penyimpanan (suhu kamar dan 4 °C) dengan memonitor kemurnian radiokimia $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ dalam jangka waktu tertentu. Cuplikan pada waktu yang ditentukan diambil dan dianalisis dengan sistim KLT dengan menggunakan ITLC-SG sebagai fasa diam dan larutan salin sebagai fasa gerak. Hasil uji stabilitas $^{177}\text{Lu-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ dipresentasikan pada Tabel 3. Hasil uji stabilitas yang diindikasikan sebagai kemurnian radiokimia menunjukkan bahwa $^{177}\text{Lu-SCN-Bz-DOTA-F(ab)}_2\text{-nimotuzumab}$ sangat stabil (kemurnian radiokimia > 95%) pada penyimpanan pada suhu kamar dan 4° C selama 96 jam.

Tabel 3. Stabilitas/ kemurnian radiokimia $^{177}\text{Lu-SCN-Bz-DOTA-F(ab')}_2$ -nimotuzumab penyimpanan (suhu kamar dan 4 °C)

Jam	Suhu kamar	4°C
0	99,9% ± 0,0	
24	99,9%± 0,2	99,5%± 0,2
48	99,6%± 0,2	99,9%± 0,2
72	99,8%± 0,0	98,5%± 1,3
96	99,6%± 2,0	98,9%± 2,4

KESIMPULAN

Preparasi $^{177}\text{Lu-SCN-Bz-DOTA-F(ab')}_2$ -nimotuzumab sebagai kandidat radiofarmaka untuk terapi kanker over expressed EGFR telah berhasil dilakukan. Preparasi $^{177}\text{Lu-SCN-Bz-DOTA-F(ab')}_2$ nimotuzumab diawali dengan penyiapan fragmen F(ab')_2 -nimotuzumab dengan cara menginkubasi nimotuzumab dengan pepsin pada 37 °C selama 14 jam yang diikuti dengan proses pemurnian dengan kolom PD-10. F(ab')_2 nimotuzumab hasil pemurnian yang dianalisis dengan SDS-PAGE dan KCKT mempunyai berat molekul (BM) sebesar 106,77 kDa dan kemurnian 89.1%. Penandaan immonokonjugat p-SCN-Bz-DOTA- F(ab')_2 nimotuzumab (rasio mol p-SCN-Bz-DOTA terhadap F(ab')_2 nimotuzumab 50 : 1) dengan ^{177}Lu berhasil memberikan $^{177}\text{Lu-SCN-Bz-DOTA-F(ab')}_2$ dengan kemurnian radiokimia > 99.9% setelah proses pemurnian dengan kolom Sephadex G25 M. Hasil uji stabilitas yang diindikasikan dengan kemurnian radiokimia menunjukkan bahwa $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bz-DOTA-F(ab')}_2$ -nimotuzumab sangat stabil dalam penyimpanan (kemurnian radiokimia ~ 99,99%) pada penyimpanan pada suhu 4°C dan suhu kamar selama 96 jam.

DAFTAR PUSTAKA

1. NG, D.C.E. (2006). Radioimmunotherapy : a brief overview. Biomed Imaging Interv J; 2 (3): 1- 7.

2. GOLDENBERG, D.M., SHARKEY, R.M., BARBET, J. and CHATAL, JF. (2007). Radioactive Antibodies. *Appl. Radiol.* 36(4) (diakses melalui Medscape.com/viewarticle /556155_print, 29 Desember 2014).
3. ALLAN, D.G.P. (2005). *Nimotuzumab: Evidence of Clinical Benefit without Rash. The Oncologist October;10 (9): 760-761.*
4. RIVERA, F., VEGA-VILLEGAS, M.E., LOPEZ-BREA, M.F. and MARQUEZ, R. (2008) *Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab Acta Oncologica; 47: 9-19*
5. Saurez-Martinez, G. and BENCOMO-YANES, A. (2014). *Nimotuzumab, effective immunotherapy for treatment of maglinant epithelial tumours. Biotechnologia Aplicada: 31; 159 – 167.*
6. RAMAKRISHNAN, M.S., ESWARAI AH, A., CROMBET, T., PIEDRA, P., SAUREZ, G., IYER, H. and ARVIND, A.S. (2009). *Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal for treatment of tumors of epithelial origin. mAbs; 1(1): 41-48.*
7. ANONYMOUS, *Nimotuzumab*, <http://www.ymbiosciences.com/products/nimotuzumab/index.php>. (Diakses 3 September 2009).
8. BURN, M. (2006) *New Promise for Therapeutic Radiopharmaceuticals. Bio-Tech System. March 19 (Diakses melalui www.biotechsystem.com/breakingmarketnews/new-promise. 12 April 2013).*
9. BOWELL, C.A. and BRECHBEIL, M.W. (2007). *Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies. Nuclear Medicine and Biology; 34: 757 -778.*
10. HARYUNI, R.D., BAHTIAR, A., SOENARJO, S. HARAHAP, Y., MUTALIB, A., RAMLI, M., HERMANTO, S., SUSILO, V.Y. dan HAFFID, D. (2014). *Fragmentation of Nimotuzumab for preparation of $^{125}\text{I-F(ab')}_2$ -Nimotuzumab as a Precursor for Preparing $^{125}\text{I-F(ab')}_2$ -Nimotuzumab-NLS Radiopharmaceuticals for Cancer Therapy. Atom Indonesia; 40 (1): 13 - 21.*

11. HERMANSON, G.T. (1996), *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 885.
12. ANONYMOUS. *Guide to Gel Filtration or Size Exclusion Chromatography* (www.harvardapparatus.com, diakses 4 January 2010).
13. HERMANTO, S., HARYUNI, R.D., RAMLI, M., MUTALIB, A. and HUDIYUONO, S (2012). *Preparation of F(ab)2 trastuzumab fragment for Radioimmunoconjugate synthesis of ¹⁷⁷Lu-DOTA-F(ab)2-trastuzumab*. *IOSR Journal of Pharmacy*, 12-18.
14. XIQUES, A., HERNÁNDEZ, I., LEYVA, R., PÉREZ, M., ALONSO, L.M. and ZAMORA, M. (2010). *Local Production of ⁹⁰Y and ¹⁸⁸Re Radionuclides and Development of Radiopharmaceuticals for Therapy*, "REPORT on the 2nd Research Coordination Meeting on 'The Development of Therapeutic'", Vienna, Austria (22 - 26 Maret 2010) 41-54.
15. PALANGKA, C.R.A.P. (2014). *Preparasi dan Uji Stabilitas ¹⁷⁷Lu-SCN-Bz-DOTA-F(ab')₂-nimotuzumab*. Sebagai Kandidat Radiofarmaka Terapi. Skripsi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Program Studi Farmasi, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
16. PATTERSON, Cam., FREDERICK, C.B., YUAN, H., DYER, L.A., LOCKYER, P., LALUSH, D.S. and VELEVA, A.N. (2013). *Development of a New Positron Emission Tomography Tracer for Targeting Tumor Angiogenesis: Synthesis, Small Animal Imaging, and Radiation Dosimetry*; *Molecules*; 18: 5594-5610.
17. NURLAILA, Z. (2007). *Radiofarmaka Peptida untuk Diagnosis dan Terapi*, *Majalah Kedokteran Indonesai*; 57 (8): 265-273.
18. PALASZ, A and. Czekaj (2000). *Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action*. *Acta Biochimica Polonica*; 47: 1107 – 1114.
19. HUMANI, T.S., RAMLI, M., RUSTENDI, C.T., dan Subur, M. (2010). *Peparasi dan Uji Stabilitas ¹⁷⁷Lu-Dota-nimotuzumab sebagai Radiofarmaka Terapi Kanker*, *Seminar Nasional VI SDM Teknologi Nuklir*, Yogyakarta, 663 – 669.