

Interaksi Antibodi Monoklonal Nimotuzumab dengan Reseptor HER-1 yang Diekspresikan Glioma Serebri

Mashuri,¹ Rista D Soetikno,² A. Mutalib³

¹Bagian Radiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat-RSUD Ulin Banjarmasin, ²Departemen Radiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, ³Pusat Radioisotop dan Radiofarmasi, Badan Tenaga Atom Nasional

Abstrak

Human epidermal receptor (HER-1) merupakan anggota famili *epidermal growth factor receptor* (EGFR) yang banyak diekspresikan glioma. Interaksi HER-1 dengan antibodi monoklonal (Mab) merupakan salah satu pendekatan untuk diagnosis dikaitkan dengan spesifitas interaksinya yang lebih terarah dalam mencapai target molekul. Penelitian ini bertujuan menganalisis interaksi antara antibodi monoklonal nimotuzumab dan reseptor HER-1 yang diekspresikan glioma serebri. Penelitian menggunakan metode studi analitik korelasional dengan rancangan eksperimental untuk menilai interaksi antibodi monoklonal nimotuzumab (Mab) dengan reseptor HER-1 yang diekspresikan *cell-line* glioma. Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR) Badan Tenaga Atom Nasional, Serpong Tangerang periode Januari–Juli 2012. Subjek penelitian *cell-line* glioma yang didapat dari *American Type Culture Collection* (ATCC), diinkubasi dengan sejumlah nimotuzumab dengan konsentrasi yang berbeda-beda secara berturut-turut 0,22; 0,11; 0,055; 0,0275; 0,01375 pM, selanjutnya dilakukan penentuan interaksi nimotuzumab dengan HER-1 secara *in vitro* menggunakan Formula Scatchard. Nilai interaksi ditunjukkan dengan nilai tetapan disosiasi dan kerapatan reseptor dengan nilai Bmax. Hasil penelitian menunjukkan korelasi kuat antara konsentrasi nimotuzumab dan HER-1 yang diekspresikan glioma serebri ($r=0,922$; $p<0,001$). Nilai Kd nimotuzumab didapatkan 6×10^{-7} M dan nilai Bmax sebesar $1,64 \times 10^{-3}$ mol/mg protein. Simpulan, terdapat interaksi antara antibodi monoklonal nimotuzumab dan reseptor HER-1 yang diekspresikan *cell-line* glioma serebri. [MKB. 2013;45(2):86–90]

Kata kunci: Afinitas pengikatan, antibodi monoklonal, glioma, HER-1, nimotuzumab

Interaction of Nimotuzumab Monoclonal Antibody with Human Epidermal Receptor-1 Expressed by Cerebral Glioma

Abstract

Human epidermal receptor (HER-1) is a family member of the epidermal growth factor receptor (EGFR) which is widely expressed in glioma. Interaction of the monoclonal antibody with the HER-1 is a diagnosis approach which is associated with the specificities of a more targeted interactions in reaching the target molecule. This study aims to analyze the interaction between nimotuzumab monoclonal antibody and HER-1 receptor expressed by cerebral gliomas. This study is using correlational analytic studies with an experimental design to assess the interaction of nimotuzumab monoclonal antibody to HER-1 expressed by glioma cell line. This research was conducted in Center for Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Laboratory, National Nuclear Energy Agency, Serpong, Tangerang in January–July 2012. Subjects were glioma cell lines obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) which were incubated with nimotuzumab in different concentrations, i.e. 0.22, 0.11, 0.055, 0.0275, 0.01375 pM, respectively. Furthermore, the determination of the *in vitro* interaction of nimotuzumab with HER-1 was conducted using Scatchard formula. The value of the interaction is shown by the value of the dissociation constant and receptor density indicated by the Bmax value. The results showed a strong correlation between the concentration of nimotuzumab with HER-1 expressed by cerebral gliomas ($r=0.922$, $p<0.001$). The nimotuzumab Kd value obtained was 6×10^{-7} M while the Bmax value was 1.64×10^{-3} mol/mg proteins. In conclusion, there is an interaction between monoclonal antibody nimotuzumab with HER-1 expressed by the cerebral glioma cell line. [MKB. 2013;45(2):86–90]

Key words: Binding affinity, glioma, HER-1, monoclonal antibodies, nimotuzumab

Korespondensi: Mashuri, dr., Sp.Rad, M.Kes, Bagian Radiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat-RSUD Ulin Banjarmasin, *mobile* 08125005490 *e-mail* dr.mashuri@gmail.com

Pendahuluan

Glioma merupakan neoplasma primer susunan saraf pusat yang berasal dari sel glia dan paling sering ditemukan yaitu sekitar 55% dari seluruh tumor intrakranial.¹ Menurut klasifikasi *World Health Organization* (WHO) tahun 2007, glioma dibagi menjadi 3 kelompok utama yaitu astrositik, oligodendrogial, dan tumor ependimal. Setiap tahun di Amerika Serikat, 13.000 orang meninggal serta diperkirakan terdapat 20.500 kasus baru penderita tumor otak.² Di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung (RSHS) ditemukan sekitar 62 kasus glioma dalam kurun waktu 3 tahun terakhir (2009–2011).³

Untuk diagnosis definitif glioma memerlukan prosedur biopsi yang sifatnya invasif, tidak jarang menimbulkan kesulitan pada jenis dan lokasi tumor tertentu, seperti pada tumor yang terletak di bagian dalam atau tempat vital (*eloquent region*). Oleh karena itu, pemeriksaan penunjang menjadi modalitas penting untuk membantu penegakan diagnosis. *Magnetic resonance imaging* (MRI) atau pencitra resonansi magnetik merupakan modalitas saat ini dipergunakan untuk diagnosis glioma. Keterbatasan pemeriksaan MRI yaitu kontras yang digunakan bersifat tidak menuju sasaran sehingga tidak terjadi interaksi spesifik dengan sel sasaran. Akibatnya, sulit mendeteksi tumor yang masih kecil dan sulit dibedakan dengan jelas apabila suatu tumor atau inflamasi.^{1,4}

Epidermal growth factor receptor (EGFR) atau *human epidermal receptor-1* (HER-1) merupakan protoonkogen yang termasuk dalam kelompok reseptor tirosin kinase yang berperan penting dalam proses pertumbuhan sel. *Human epidermal receptor-1* terdiri atas 2 (dua) bagian penting, yaitu *hormone binding domain* yang terletak di bagian ekstrasel dan *tyrosine kinase domain* yang terletak di bagian intrasel. Domain ekstrasel berfungsi menerima sinyal dari ligan tertentu dalam tubuh seperti *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor- α* (TGF- α), amfregulin, epiregulin, betaselulin, dan juga *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF). Domain intrasel berfungsi meneruskan sinyal dari bagian ekstrasel melalui autofosforilasi pada residu tirosilnya. Ekspresi HER-1 yang tidak terkendali akibat mutasi akan menyebabkan perubahan sel normal menjadi sel keganasan. Overekspresi HER-1 pada glioma diperkirakan sekitar 40–63%. Interaksi HER-1 dengan antibodi monoklonal pada domain ekstrasel merupakan salah satu pendekatan untuk diagnosis keganasan.^{5–7}

Interaksi nimotuzumab dengan HER-1 dapat dilakukan dengan menilai afinitas pengikatan yang timbul. Penelitian secara *in vitro* mengenai

interaksi melalui pengukuran afinitas pengikatan (*binding affinity*) nimotuzumab serta HER-1 merupakan konsekuensi pengenalan molekuler untuk pengembangan desain senyawa pengontras berbasis makromolekul sebelum uji laboratorium secara *in vivo* dilakukan. Ikatan spesifik antara nimotuzumab dan HER-1 yang diekspresikan glioma, diharapkan dapat dipergunakan untuk meningkatkan akurasi diagnosis glioma melalui penggunaan senyawa pengontras bertarget pada MRI.

Metode

Subjek penelitian adalah *cell-line glioma* tipe CRL-2397 dari *American Type Culture Collection* (ATCC) University Boulevard Manassas, Virginia, USA. *Cell-line* glioma dibiakkan atau dipasase dalam suatu media tumbuh di laboratorium sel kultur yang bebas jamur atau bakteri.

Bahan penelitian adalah antibodi anti-EGFR (nimotuzumab) dari Innogene Kalbiotech-Kalbe, *bovine serum albumin* (BSA) dari Sigma, NaI125 (PRR- Batan).

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR) Badan Tenaga Atom Nasional, Serpong Tangerang dalam periode Januari–Juli 2012. Analisis data interaksi antara konsentrasi nimotuzumab serta reseptor HER-1 pada *cell-line* glioma menggunakan uji korelasi karena kedua variabel berupa jenis data numerik dengan derajat kepercayaan 95% dengan nilai $r=0,54$. Penentuan nilai K_d dilakukan dengan menggunakan Formula Scatchard. Analisis data menggunakan uji korelasi karena kedua variabel dengan jenis data numerik menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS).

Hasil

Uji stabilitas dilakukan dengan cara menyimpan nimotuzumab pada suhu 4 °C serta dianalisis menggunakan metode kromatografi kertas setiap minggu selama 4 minggu, sehingga didapatkan hasil sebagai berikut:

Uji afinitas pengikatan dilakukan dengan cara menginkubasi I125-nimotuzumab menggunakan *cell-line* glioma. Setelah diperlakukan inkubasi selama 1 jam, kemudian ditambahkan larutan PEG 6% untuk membantu mengendapkan sel yang berikatan dengan I125-nimotuzumab sehingga mudah dipisahkan I125-nimotuzumab yang tidak berikatan dengan *cell-line* glioma setelah proses sentrifugasi pada 2.500 G selama 30 menit. *Cell-line* yang berikatan dengan I125-nimotuzumab kemudian dicacah dengan pencacah gama. Hasil

Tabel Hasil Uji Stabilitas I¹²⁵-Nimotuzumab pada Suhu 4 °C

Lama Penyimpanan (minggu)	Kemurnian (%)
0	98,7
1	97,0
2	95,3
3	92,2
4	86,7

uji afinitas pengikatan dihasilkan berupa ikatan total, *specific binding* (SB), dan *non specific binding* (NSB).

Didapatkan korelasi yang kuat ($r^2=0,960$) antara konsentrasi nimotuzumab dan SB yang bermakna secara statistik ($p<0,05$), menunjukkan ikatan nimotuzumab dan HER-1 pada permukaan sel dengan ikatan spesifik=20013,01 pM untuk 0,22 ng nimotuzumab. Nilai Kd dihitung dengan Formula Scatchard didapatkan $6 \times 10^{-7} M$.

Terdapat hubungan ikatan spesifik dengan konsentrasi nimotuzumab yang memperlihatkan ikatan yang kuat ($r=0,922$).

Pembahasan

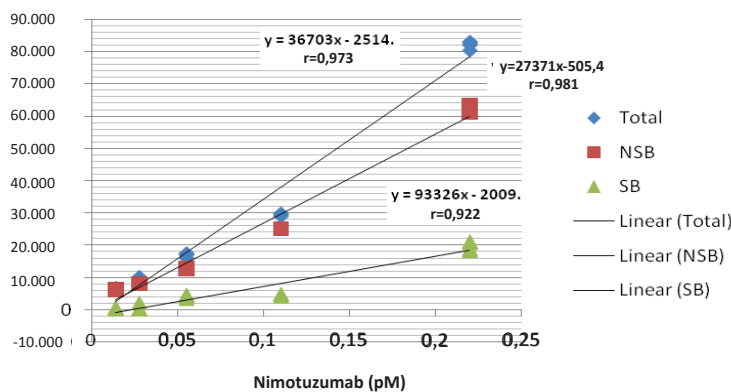
Uji stabilitas menunjukkan bahwa nimotuzumab pada pengamatan minggu kedua penyimpanan masih memberikan kemurnian radiokimia >95%, hal ini menunjukkan bahwa nimotuzumab masih cukup stabil dalam rentang waktu penyimpanan 2 (dua) minggu setelah preparasi. Kestabilan nimotuzumab yang dipergunakan sebagai model dalam penelitian ini perlu diperhatikan karena nimotuzumab bertanda yang tidak stabil akan

melepaskan I¹²⁵ sehingga tidak dapat memberikan data biokarakter yang sebenarnya.^{8,9}

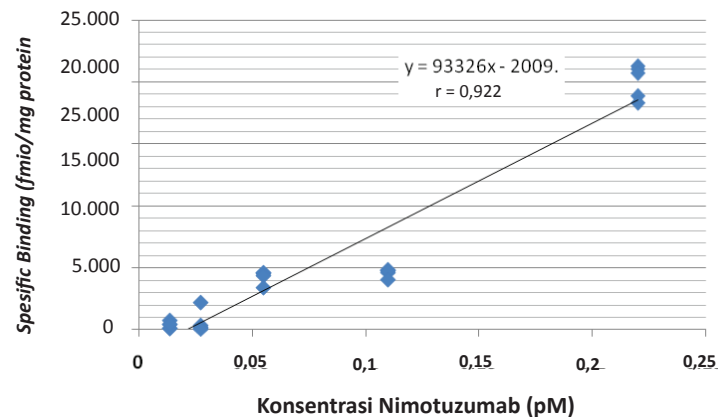
Hasil uji afinitas pengikatan antara antibodi monoklonal nimotuzumab dan reseptor HER-1 menghasilkan kurva Scatchard. Dari kurva tersebut didapatkan nilai Kd $6 \times 10^{-7} M$. Kd merupakan tetapan disosiasi dan suatu ukuran dari kekuatan interaksi ligan terhadap reseptornya yang memperlihatkan konsentrasi ligan yang akan mengisi 50% reseptor. Dengan demikian, pada konsentrasi $6 \times 10^{-7} M$, nimotuzumab akan mengisi *site binding* reseptor HER-1 pada *cell-line* glioma. Ikatan ligan dengan nilai Kd 1nM (10^{-6}) atau kurang memiliki afinitas yang rendah untuk reseptornya dan nilai Kd 1 uM (10^{-9}) memiliki afinitas yang tinggi.^{10,11}

Nilai Kd berhubungan dengan efek klinis dari antibodi monoklonal. Antibodi monoklonal nimotuzumab merupakan antibodi spesifik untuk domain pada ekstraselular reseptor HER-1 yang ditujukan terhadap domain ekstraselular reseptor dan bereaksi dengan HER-1 melalui mekanisme ikatan secara ekstraselular, internalisasi kompleks reseptor antibodi, inhibisi sinyal reseptor, dan juga meningkatkan stimulasi respons imunologis. Nimotuzumab secara tunggal di dalam tubuh memiliki efek menghambat enzim tirosin kinase yang akan mengaktifasi jalur sinyal intraselular dan mengakibatkan aspek sel biologi seperti proliferasi, diferensiasi, angiogenesis, dan juga migrasi.^{11,12}

Penelitian pengaruh afinitas dan kepadatan antigen terhadap lokalisasi antibodi dinyatakan bahwa hanya fragmen Fab yang memiliki afinitas tinggi yang terikat secara efektif dan independen dari densitas antigen. Sebaliknya, antibodi yang mempunyai afinitas rendah memerlukan aviditas ikatan bivalen untuk pengikatan yang efektif, yang dapat terjadi hanya jika antigen memiliki kepadatan yang tinggi.¹²



Gambar 1 Kurva untuk Penentuan Ikatan Total (T), *Specific Binding* (SB), dan *Non Specific Binding* (NSB)



Gambar 2 Kurva Hubungan antara Ikatan Spesifik dan Konsentrasi Nimotuzumab

Pada penelitian ini telah didapatkan kurva saturasi pada kesetimbangan ikatan yang tidak spesifik (NSB), konsentrasi ikatan total (T), dan juga pengurangan konsentrasi total dengan NSB menghasilkan konsentrasi ikatan spesifik (SB). Pada Gambar 2 dapat dilihat korelasi yang kuat ($r=0,922$) antara konsentrasi nimotuzumab dan konsentrasi SB yang bermakna secara statistik ($p<0,05$). Nilai K_d dihitung dengan menggunakan Rumus Scatchard dan didapatkan sebesar $6 \times 10^{-7} M$, nilai ini lebih tinggi daripada nilai K_d standar EGF yang diketahui sebesar $8 \times 10^{-8} M$. Nimotuzumab mempunyai nilai K_d yang bersifat intermediet yaitu memiliki afinitas pengikatan yang bergantung pada derajat konsentrasi reseptor. Selain itu, nimotuzumab hanya dapat terdeteksi dan juga hambatan terhadap fosforilasi reseptor hanya terdeteksi pada tumor yang konsentrasinya tinggi (104 reseptor/sel atau lebih tinggi).¹²⁻¹⁴

Nilai kapasitas pengikatan maksimal (B_{max}) pada penelitian didapatkan nilai sebesar $1,64 \times 10^{-5}$ mol/mg protein yang menunjukkan densitas maksimal reseptor HER-1. Penentuan nilai KD dan B_{max} ini menjelaskan bahwa nimotuzumab memiliki kemungkinan untuk dapat dipergunakan dalam proses konjugasi secara tidak langsung dengan senyawa pengontras untuk keperluan diagnosis pada MRI karena memiliki nilai afinitas yang tinggi, mampu mendeteksi densitas reseptor secara *in vitro*, dan memiliki spesifisitas reseptor. Meskipun begitu, faktor permeabilitas BBB, metabolisme dalam tubuh, dan toksisitas masih perlu penelitian *in vivo* sebagai prasyarat untuk dapat dipergunakan sebagai senyawa pengontras untuk pencitraan molekuler.¹³⁻¹⁵

Simpulan, terdapat interaksi positif antara nimotuzumab dan reseptor HER-1 yang terdapat pada permukaan *cell-line* glioma dan memiliki korelasi yang kuat. Nilai tetapan disosiasi (K_d)

nimotuzumab yang didapatkan sebesar $6 \times 10^{-8} M$ menunjukkan nilai kekokohan ikatan dengan reseptor HER-1 secara *in vitro* dan nilai kapasitas pengikatan maksimal (B_{max}) adalah $1,64 \times 10^{-5}$ mol/mg protein.

Daftar Pustaka

1. Soetikno RD. Penyangatan citra tumor otak glioma tikus menggunakan senyawa pengontras Gd-DTPA-dendrimer-antibodi anti-EGFR. Maj Kedokt Indon. 2010; 60(10):455-61.
2. Thurnher MM. New WHO classification of brain tumors. NRJ. 2008;21(Suppl1):14-6.
3. Singh A, Adam A. Pola kasus glioma di RSHS tahun 2009-2001. Bandung: Departemen Bedah Saraf RSHS/FK Unpad; 2011.
4. Neeman M, Gilad AA, Dafni H, Cohen B. Molecular imaging of angiogenesis. Magn Reson Imaging. 2007;25(1):1-12.
5. Perez R, Moreno E, Garrido G, Crombet T. EGFR-targeting as a biological therapy: understanding nimotuzumab's clinical effects. Cancers. 2011;3(2):2014-31.
6. Brockstein B, Lacouture M, Agulnik M. The role of inhibitors of the epidermal growth factor in management of head and neck cancer. J Nat C Can Netw. 2008;6(7):696-706.
7. Reichert JM. Monoclonal antibodies as innovative therapeutics. Curr Pharm Biotechnol. 2008;9(6):423-30.
8. Gunawan AH, Muthalib A, Aguswarini S, Lubis H. Akumulasi dan clearance dari contrast agents MRI Gd-DTPA yang disimulasikan dengan ^{153}Gd -DTPA dalam hewan mencit. JKI. 2006;1(2):78-81.

9. Humani TS, Ramli M, Rustendi CT, Subur M. Preparasi dan uji stabilitas ¹⁷⁷Lu-DOTA-nimotuzumab sebagai radiofarmaka terapi. *JKI*. 2008;1(2):663–70.
10. Sharkey RM, Goldenberg DM. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*. 2011; 3(3):349–70.
11. Schmitz KR, Ferguson KM. Interaction of antibodies with ErbB receptor extracellular regions. *Exp Cell Res*. 2009;315(4):659–70.
12. Garrido G, Tikhomirov IA, Rabasa A, Yang E, Gracia E, Iznaga N, dkk. Bivalent binding by intermediate affinity of nimotuzumab: a contribution to explain antibody clinical profile. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(4):373–82.
13. Vera DRB, Eigner S, Henke KE, Lebeda O, Melichar F, Beran M. Preparation and preclinical evaluation of ¹⁷⁷Lu-nimotuzumab targeting epidermal growth factor receptor overexpressing tumors. *Nucl Med Biol*. 2012;39(1):3–13.
14. Gunawan AH, Soetikno RD, Mutalib A. Preparasi, biodistribusi dan clearance senyawa pengontras MRI Gd-DTPA-PAMAM G4-nimotuzumab melalui simulasi menggunakan ¹⁵³Gd-DTPA-PAMAM G4-nimotuzumab. Makalah Seminar Nasional SDM Teknologi Nuklir. Yogyakarta, 18 November 2010.
15. Schwenk JM, Poetz O, Zeillinger R, Joos TO. A miniaturized ligand binding assay for EGFR. *Int J Proteomics*. 2012;4:1–5.