

## Metoda Penyiapan Konjugat $(\text{DOTA})_n$ -[Dendrimer PAMAM]-(Trastuzumab) $_m$ Sebagai Bahan Radiofarmaka Radioimunoterapi $(^{177}\text{Lu-DOTA})_n$ -[Dendrimer PAMAM]-(Trastuzumab) $_m$

### (Preparation Method of $(\text{DOTA})_n$ -[Dendrimer PAMAM]-(Trastuzumab) $_m$ Conjugate as Radiopharmaceutical Compound for Radioimmunotherapy of $(^{177}\text{Lu-DOTA})_n$ -[Dendrimer PAMAM]-(Trastuzumab) $_m$ )

RIEN RITAWIDYA<sup>1\*</sup>, SRI SETYOWATI<sup>1</sup>, CECEP TAUFIK RUSTENDI<sup>1</sup>, MASKUR<sup>1</sup>,  
MARTALENA RAMLI<sup>1</sup>, BASUKI HIDAYAT<sup>2</sup>, MUHAMMAD SUBUR<sup>1</sup>, ABDUL  
MUTALIB<sup>3</sup>, JOHAN MASHYUR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka, Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang- Indonesia.

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Nuklir, Universitas Padjajaran, Bandung, Jawa Barat-Indonesia.

<sup>3</sup>Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Padjajaran, Jawa Barat-Indonesia.

Diterima 29 Agustus 2013, Disetujui 19 April 2014

**Abstrak:** Radioimunoterapi adalah terapi kanker yang memanfaatkan sifat spesifitas antibodi monoklonal dan efektivitas radionuklida pemancar radiasi alfa atau beta dalam menghancurkan sel kanker. Antibodi monoklonal *humanized IgG1*, trastuzumab, berinteraksi terarah secara selektif ke domain ekstraselular *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER-2). HER-2 merupakan reseptor target untuk terapi kanker payudara karena jenis kanker ini mengekspresikan berlebih HER-2. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metoda penyiapan konjugat  $(\text{DOTA})_n$ -[Dendrimer PAMAM]-(trastuzumab) $_m$  sebagai prekursor untuk pembuatan radioimukonjugat,  $(^{177}\text{Lu-DOTA})_n$ -PAMAM-(trastuzumab) $_m$  yang berpotensi untuk terapi kanker payudara. Sintesis konjugat  $(\text{DOTA})_n$ -[Dendrimer PAMAM]-(trastuzumab) $_m$  dilakukan dengan beberapa tahapan reaksi konjugasi. Karakterisasi hasil sintesis konjugat yang dilakukan dengan sistem HPLC menggunakan kolom *size exclusion* (SE) dan detektor UV-Visible menunjukkan adanya serapan konjugat pada  $t_R$  (waktu retensi) 10,53 menit, sehingga dapat dibedakan dari trastuzumab yang pada sistem tersebut menghasilkan serapan pada  $t_R$  10,70 menit. Kemurnian konjugat diuji dengan penandaan konjugat tersebut menggunakan  $^{177}\text{Lu}$  dan kromatogram HPLC-nya diverifikasi dengan kromatogram  $^{177}\text{Lu-EDTA}$ ,  $^{177}\text{Lu-DOTA}$ , dan  $^{177}\text{Lu-DOTA-dendrimer-PAMAM}$  sebagai uji non *specific binding* (NSB). Hasil menunjukkan bahwa kompleks  $^{177}\text{Lu}$ -konjugat pada  $R_f < 0,3$  sedangkan uji NSB menghasilkan kompleks  $^{177}\text{Lu-EDTA}$ ,  $^{177}\text{Lu-DOTA}$ , dan  $^{177}\text{Lu-EDTA}$  pada  $R_f > 0,6$ .

**Kata kunci:** radioimunoterapi, trastuzumab, HER-2, dendrimer PAMAM.

**Abstract:** Radioimmunotherapy is one of modalities means of treatment for cancer that exploits the antibody monoclonal specificity to bind to its receptor and the ability of alfa or beta radiation in destroying cancer cells. Trastuzumab is humanized IgG1 monoclonal antibodies which selectively bind to extracellular domain of Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2). HER-2 has now became a target receptor for treatment of human breast cancer due to their overexpression in the human breast cancer cell surface. This study was aimed in developing a method for preparation of  $(\text{DOTA})_n$ -[Dendrimer PAMAM]-(trastuzumab) $_m$  conjugate, a precursor of  $(^{177}\text{Lu-DOTA})_n$ -PAMAM-(trastuzumab) $_m$

\* Penulis korespondensi, Hp. 0813.1149.3724  
e-mail: rienrita@batan.go.id

$m$  radioimmunoconjugate, which is expected to be potential for breast cancer radioimmunotherapy. The conjugate was prepared through several conjugation steps. Characterization of  $(\text{DOTA})_n\text{-[Dendrimer PAMAM]-(trastuzumab)}_m$  which was carried out by using a HPLC equipped size exclusion column (SEC) gave a clean peak with retention time ( $t_R$ ) of 10.53 mins which was slower compared to  $t_R$  of its precursor unconjugated trastuzumab (10.70 mins). This result indicated that molecular weight of  $(\text{DOTA})_n\text{-[Dendrimer PAMAM]-(trastuzumab)}_m$  was bigger than its precursor (unconjugated trastuzumab) and pure. The purity of  $(\text{DOTA})_n\text{-[Dendrimer PAMAM]-(trastuzumab)}_m$  was verified by measuring the Rf of  $^{177}\text{Lu}$ -radiolabeled- $(\text{DOTA})_n\text{-[Dendrimer PAMAM]-(trastuzumab)}_m$  using instance thin layer chromatography-silica gel (ITLC-SG). The ITLC-SG of  $(\text{DOTA})_n\text{-[Dendrimer PAMAM]-(trastuzumab)}_m$  which was radiolabeled with  $^{177}\text{Lu}$  gave a clean peak with Rf of  $<0.3$ , while the precursors which were regards as impurities, (free  $^{177}\text{Lu}$  in form  $^{177}\text{Lu-EDTA}$ ,  $^{177}\text{Lu-DOTA}$ , and  $^{177}\text{Lu}$ - dendrimer PAMAM which was incubated as non specific binding), all of them gave Rf of  $>0.6$ . These ITLC results indicated that  $(\text{DOTA})_n\text{-[Dendrimer PAMAM]-(trastuzumab)}_m$  radiolabeled with  $^{177}\text{Lu}$  was pure.

**Keywords:** radioimmunotherapy, trastuzumab, HER-2, dendrimer PAMAM.

## PENDAHULUAN

KANKER merupakan salah satu penyakit dengan jumlah penderita cukup besar di Indonesia. CureResearch™ pada tahun 2008 menyatakan bahwa di Amerika diperkirakan ada sekitar 1,3 juta kasus kanker dari sekitar 293 juta penduduk, sedangkan di Indonesia diperkirakan ada sekitar 1,1 juta kasus kanker dari sekitar 238 juta penduduk<sup>(1)</sup>. Data statistik tahun 2003-2007 menunjukkan bahwa kanker yang paling banyak diderita perempuan adalah kanker payudara sebesar 40,58% dengan angka kematian sebesar 36,31%<sup>(2)</sup>. Data ini memperlihatkan bahwa kanker telah menjadi beban cukup berat bagi kesehatan masyarakat Indonesia.

Kemajuan pengobatan menggunakan radiasi atau yang disebut terapi radiasi telah banyak dilakukan untuk pengobatan penyakit kanker, dan salah satunya adalah pemanfaatan radiofarmaka untuk radioimunoterapi. Radioimunoterapi adalah metode terapi terarah yang potensial dengan menggunakan antibodi monoklonal bertanda radionuklida<sup>(3,4)</sup>. Prinsip pengobatan terarah atau targeted therapy ini adalah melalui interaksi spesifik antara antibodi monoklonal bertanda radionuklida dengan reseptor atau antigen yang diekspresikan sel kanker, disertai radiasi  $\beta^-$  yang dipancarkan radionuklida berperan untuk secara selektif menghancurkan atau menghambat pertumbuhan sel kanker<sup>(3)</sup>.

Reseptor HER-2 adalah salah satu anggota dari keluarga besar reseptor *Epidermal Growth Factor* (EGFR), disamping HER-1, HER-3, dan HER-4. HER-2 merupakan reseptor target untuk terapi kanker payudara karena reseptor tersebut diekspresikan berlebihan pada sel kanker payudara<sup>(5)</sup>. Berbagai penelitian telah melaporkan bahwa penggunaan antibodi monoklonal trastuzumab sebagai anti HER-2 cukup efektif untuk menghambat transduksi

sinyal dari HER-2 dengan cara menghentikan proses dimerisasi dan autofosforilasi<sup>(6)</sup>. Trastuzumab (nama dagang Herceptin) adalah antibodi monoklonal *humanized IgG1* yang secara selektif akan terarahkan pada domain ekstraselular *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER-2) dan penggunaannya untuk terapi kanker payudara telah disahkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika (US FDA)<sup>(4,7)</sup>.

Penggunaan trastuzumab bertanda radionuklida pemancar partikel bermuatan (partikel alfa, beta atau elektron *Auger*) untuk radioimunoterapi kanker payudara diharapkan efektif sebagai terapi atau pengobatan terarah (*targeted therapy*). Interaksi spesifik trastuzumab bertanda radionuklida tersebut dengan reseptor HER-2 yang diekspresikan permukaan sel kanker payudara akan mengantarkan dosis radiasi merusak yang dipancarkan radionuklida sehingga mampu mematikan tidak hanya pada sel kanker dimana interaksi dengan antibodi monoklonal terjadi, juga terhadap sel kanker lain di sekitarnya melalui efek *cross-fire* dan efek *by-stander*<sup>(3,8)</sup>.

Salah satu radionuklida terapi (melepaskan radiasi partikel  $\beta^-$ ) yang dipilih untuk penandaan trastuzumab adalah radionuklida  $^{177}\text{Lu}$ . Radionuklida ini memiliki kelebihan, yaitu selain memancarkan partikel  $\beta^-$  [Emaks 497 keV (78,6 %) dan 176 keV (12,2 %)] yang cocok untuk terapi kanker berukuran kecil dengan penetrasi  $\sim 1,5$  mm<sup>(9)</sup>, juga memancarkan sinar gamma [ $E_\gamma$  113 keV (6,4%) dan 208 keV (11%)] yang ideal sekali untuk kamera gamma atau SPECT bagi keperluan imaging atau pencitraan sel kanker tersebut secara *in vivo*<sup>(10)</sup>.

Antibodi monoklonal bertanda radionuklida yang memiliki radioaktivitas spesifik yang tinggi (bebas pengemban) diperlukan dalam radioimunoterapi<sup>(9)</sup>. Penyiapan radioimmuno-konjugat menggunakan radionuklida  $^{177}\text{Lu}$  yang tidak bebas pengemban yang ditandakan ke antibodi monoklonal melalui

penggunaan ligan fungsi ganda (BFC, *bifunctional chelating agent*) akan menyebabkan imunoreaktivitas radioimmunokonjugat akan menurun, karena reseptor HER-2 akan terjenuhkan oleh immunokonjugat isotop Lu yang tidak radioaktif. Kendala ini dapat diatasi dengan penggunaan dendrimer yang berperan selain sebagai *drug delivery agent* juga mampu mengkonsentrasikan obat dalam jumlah yang banyak<sup>(11)</sup>. Dendrimer adalah makromolekul globular, bercabang banyak yang memiliki ukuran nano (2,5-10 nm) yang terdiri dari inti, percabangan, dan gugus fungsional dipermukaannya<sup>(11)</sup> yang dapat dikonjugasikan dengan berbagai molekul obat, DNA, gen, dll.<sup>(12)</sup>, misalnya gugus fungsional amina di permukaan dendrimer PAMAM G3.0 selain memungkinkan untuk mengikat agen pengkelat dalam jumlah yang banyak, juga bisa dikonjugasikan dengan molekul antibodi<sup>(9)</sup>.

Dendrimer PAMAM merupakan dendrimer yang telah banyak digunakan dalam bidang biomedik karena biokompatibel dan nonimunogenik<sup>(13)</sup> disamping memiliki karakteristik yang tepat untuk penggunaan secara *in vivo*<sup>(14)</sup>. Karena itu dendrimer secara stoikiometri dapat diatur untuk mampu dibebani banyak molekul Lu-DOTA dan jumlah antibodi monoklonal yang terbatas, sehingga kejenuhan reseptor bisa dihindarkan, dan pada gilirannya imunogenisitas bisa diminimalkan juga<sup>(9)</sup>.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metoda penyiapan imunokonjugat pSCN-DOTA-PAMAM-trastuzumab yang kemudian dapat ditandai dengan radionuklida<sup>177</sup>Lu. Dalam penelitian selanjutnya di masa mendatang, metoda pengembangan ini akan dimodifikasi dan diarahkan untuk pengembangan metoda produksi imunokonjugat pSCN-DOTA-PAMAM-trastuzumab dalam bentuk kit radiofarmaka yang bisa disimpan lama. Diharapkan dalam penggunaan klinis rutin di rumah sakit, petugas medik cukup dengan hanya mencampurkan larutan <sup>177</sup>Lu<sup>3+</sup> ke dalam vial kit radiofarmaka yang berisi imunokonjugat pSCN-DOTA-PAMAM-trastuzumab dalam menyiapkan larutan (<sup>177</sup>Lu-DOTA)<sub>n</sub>-PAMAM-(trastuzumab)<sub>m</sub> yang siap diinjeksikan ke pasien penderita kanker payudara.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Herceptin (Roche), dendrimer *poly*(amidoamin) atau PAMAM G3.0 dengan inti etilen diamin dan gugus permukaan amina (Sigma-Aldrich), *S*-2-(4-*isothiocyanobenzyl*)-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane tetraacetic acid (Macrocyclics), *ethylendiamin tetraacetic acid* (Merck), *sulfo-succinimidyl-4-(N-*

*maleimidomethyl) cyclo-hexane 1-carboxylate* atau sulfo-SMCC (Thermo Scientific), *Traut's Reagent* atau 2-iminothiolane. HCl (Thermo Scientific), Sephadex G25 Medium, kolom PD-10 (GE HealthCare), *dipotassium hydrogen phosphate* (Merck), *potassium dihydrogen phosphate* (Merck), protein standar (Bio Rad), protein *dye* (Bio Rad), *bovine serum albumine*, kaset dialisis 20000 MWCO (Pierce), dimetil-formamida atau DMF (Sigma-Aldrich).

**Alat.** *Thermomixer* (Eppendorf), spektrofotometer *UV-Visible* (Shimadzu), *Fourier Transform Infra Red* atau FTIR (Bruker Tensor 27), *Microplate reader* (Biotech), *water purifier equipment* (Sartorius), HPLC (Shimadzu) dengan sistem terdiri dari pompa, *controller*, dan detektor UV Vis.

**METODE. Pemurnian Trastuzumab.** Trastuzumab dimurnikan dengan metoda dialisis menggunakan kaset dialisis 20000 MWCO sebanyak dua kali pergantian larutan dapar PBS 0,1 M pH 7,4 dengan 1,2 mg Chelex.

**pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM.** pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM disiapkan dengan melarutkan sejumlah larutan pSCN-DOTA dalam dapar fosfat pH 9 ke dalam sejumlah dendrimer PAMAM G3.0 dengan perbandingan molar 24:1, kemudian pH larutan campuran reaksi diatur menjadi pH 9 dan larutan tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 40°C. Hasil pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM G3.0 kemudian dipisahkan dari sisa pSCN-DOTA menggunakan kolom sephadex G25 Medium atau kolom PD-10 yang dikondisikan terlebih dahulu dengan *bovin serum albumin* (BSA), suatu protein netral sebagai *blocking agent* untuk mengatasi ikatan elektrostatis di dalam kolom. Larutan campuran reaksi dimasukkan ke dalam kolom PD-10, kemudian dielusi dengan dapar fosfat 0,05 M pH 7,4 yang mengandung 5 mM EDTA sebagai pengompleks terhadap logam pengotor yang mungkin berada di dalam kolom. Keberadaan logam pengotor yang berperan sebagai katalis dalam proses oksidasi terhadap gugus *sulphydryl* dapat menyebabkan protein mengendap<sup>(7)</sup>. Sebanyak 30 fraksi, masing-masing dengan volume fraksi 250 µL, dikumpulkan, kemudian dilakukan uji kolorimetri menggunakan *dye* protein (1:4 dalam H<sub>2</sub>O). Fraksi yang positif terhadap uji kolorimetri menunjukkan perubahan dari warna coklat menjadi biru kemudian digabungkan menjadi satu. Gabungan fraksi ini kemudian akan diaktivasi.

**Aktivasi pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM.** Ke dalam larutan pSCN-DOTA-PAMAM G3.0 ditambahkan sejumlah volum tertentu larutan 2-iminothiolan HCl (1 mg/mL) (pereaksi Traut's) di dalam dapar fosfat 0,05 M pH 7,4 yang mengandung EDTA 5 mM, kemudian diinkubasi pada suhu

kamar dibawah aliran gas  $N_2$  selama 30 menit. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam kolom (15 cm) yang berisi Sephadex G25 Medium yang sebelumnya dikondisikan dengan BSA. Selanjutnya kolom dielusi dengan dapar fosfat 0,1 M pH 7,4 dan sebanyak 40 fraksi, masing-masing dengan volume 250  $\mu$ L, dikumpulkan dan masing-masing fraksi diuji kolorimetri dengan *dye* protein. Fraksi yang positif terhadap uji kolorimetri menunjukkan perubahan warna dari coklat menjadi biru digabungkan menjadi satu. Fraksi gabungan ini nantinya dikonjugasikan dengan trastuzumab yang sudah diaktivasi.

**Aktivasi Trastuzumab.** Aktivasi trastuzumab dilakukan dengan menggunakan sulfo-SMCC yang dilarutkan dalam sedikit pelarut organik DMF kemudian ditambahkan dapar PBS 0,1 M pH 7,4 sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL, lalu dimasukkan ke dalam larutan trastuzumab (5 mg/mL). Campuran larutan kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Larutan hasil reaksi trastuzumab-SMCC kemudian dipisahkan dari hasil reaksi samping menggunakan kolom PD-10 yang sebelumnya dikondisikan dengan BSA. Setelah larutan campuran reaksi dimasukkan ke dalam kolom, selanjutnya dielusi dengan larutan dapar PBS 0,1 M pH 7,4 mengandung 5 mM EDTA. Sebanyak 20 fraksi, masing-masing dengan volum fraksi 250  $\mu$ L, dikumpulkan dan setelah itu dilakukan uji kolorimetri dengan menggunakan *dye* protein (1: 4 dalam  $H_2O$ ). Fraksi-fraksi yang positif terhadap uji kolorimetri digabung menjadi satu.

**Konjugat pSCN-DOTA-Dendrimer PAMAM-Trastuzumab.** Trastuzumab-SMCC ditambahkan ke dalam pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM G3.0, kemudian campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C. Pemurnian konjugat dilakukan dengan proses dialisis di dalam kaset dialisis menggunakan 1 L dapar ammonium asetat 0,25 M dengan 1,2 gram resin penukar ion Chelex-100. Proses dialisis dilakukan sebanyak empat kali pergantian larutan dapar, masing-masing penggantian dilakukan setiap 12 jam. Konjugat hasil dialisis dimasukkan dalam vial dan disimpan dalam kulkas sampai siap untuk ditandai dengan  $^{177}Lu$ .

Karakterisasi konjugat pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM G3.0-trastuzumab dilakukan dengan menggunakan sistem HPLC yang dilengkapi kolom *size exclusion* (SE) dan larutan pengelusi dapar PBS 0,01 N pH 7,4.

**Penyiapan  $^{177}LuCl_3$ .**  $^{177}LuCl_3$  disiapkan dengan cara mengiradiasi 0,5-1,0 mg  $^{176}Lu$  ( $^{176}Lu_2O_3$ , pengayaan 60,60%) di reaktor nuklir RSG-GAS (fluks neutron:  $1,26 \times 10^{14}$  n  $cm^{-2}$   $det^{-1}$ ) selama 4 atau 10 hari. Target yang telah diiradiasi kemudian dipindahkan

ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan 2 mL HCl 6 M. Campuran kemudian didiamkan selama 30 menit sebelum ditambahkan 2 mL  $H_2O_2$ . Selanjutnya campuran dipanaskan sampai kistat atau kering, kemudian direkonstitusi dan dilarutkan dengan 3 mL HCl 0,5 M. Larutan radioaktif  $^{177}Lu^{3+}$  yang diperoleh tidak bebas pengembun, masih mengandung isotop  $^{176}Lu^{3+}$  yang tidak radioaktif dalam jumlah lebih besar mendekati jumlah target yang diiradiasi.

**Penandaan pSCN-DOTA-PAMAM G3.0-Trastuzumab Dengan  $^{177}Lu$ .** Ke dalam aliquot konjugat pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM G3.0 ditambahkan aliquot  $^{177}LuCl_3$  yang telah dikondisikan dengan ammonium asetat 1 M pH 7,0 (1:1). Campuran reaksi tersebut kemudian diatur sampai pH nya 5,5 dengan penambahan larutan HCl 1 M, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Pada akhir reaksi ditambahkan larutan EDTA 0,05 M secara berlebih dengan perbandingan mol EDTA:  $^{177}Lu$  (20:1) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Persentase penandaan dianalisa dengan metode KLT dengan menotolkan 1  $\mu$ L larutan sampel pada kertas ITLC-SG sebagai fasa diam, kemudian kertas ITLC-SG tersebut dielusi dengan larutan salin sebagai fasa gerak. Persentase penandaan diperoleh dengan menggunakan TLC *scanner* Bioscan.

Untuk mengetahui apakah hasil penandaan adalah benar kompleks ( $^{177}Lu-DOTA$ )<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM]-(Trastuzumab)<sub>m</sub> dan bukan sebagai kompleks  $^{177}Lu-EDTA$ ,  $^{177}Lu-DOTA$ , ataupun  $^{177}Lu$ -dendrimer PAMAM maka harus dilakukan uji *non specific binding* terhadap EDTA, pSCN-DOTA, dan dendrimer PAMAM.

**Uji Non Specific Binding EDTA.** Seratus  $\mu$ L 0,05 M EDTA (~5 mmol) direaksikan dengan  $^{177}LuCl_3$ , kemudian pH campuran diatur sampai pH 5,5, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Persentase penandaan ditentukan dengan metode KLT menggunakan fasa diam dan fasa gerak ITLC-SG dan larutan salin. Persentase penandaan diperoleh dengan menggunakan TLC *scanner* Bioscan.

**Uji Non Specific Binding pSCN-DOTA.** Sebanyak 2,39 mg pSCN-DOTA dilarutkan dalam 1 mL  $H_2O$ , lalu dilakukan penandaan dengan  $^{177}LuCl_3$ , kemudian pH diatur sampai pH 5,5, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Persentase penandaan dilakukan dengan metode KLT menggunakan fasa diam dan fasa gerak yaitu ITLC-SG dan larutan salin. Persentase penandaan diperoleh dengan menggunakan TLC *scanner* Bioscan.

**Uji Non Specific Binding Dendrimer PAMAM G3.0.** Sebanyak 2,5 mg dendrimer PAMAM G3.0 dilarutkan dalam 1 mL amonium asetat 0,25 M pH 7,5, lalu dilakukan penandaan dengan  $^{177}LuCl_3$ ,

dan pH diatur sampai pH 5,5, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Pada akhir reaksi ditambahkan larutan EDTA 0,05 M secara berlebih dengan perbandingan mol EDTA -<sup>177</sup>Lu (20 : 1) dan diinkubasi pada 37°C selama 5 menit.

Persentase penandaan dilakukan dengan metode KLT menggunakan fasa diam dan fasa gerak ITLC-SG dan larutan salin. Persentase penandaan diperoleh dengan menggunakan TLC *scanner* Bioscan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Konjugat DOTA-dendrimer PAMAM G3.0-trastuzumab berperan sebagai prekursor dalam penyiapan radiofarmaka terapi (<sup>177</sup>Lu-DOTA)<sub>n</sub>-[dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab)<sub>m</sub> yang kemudian diharapkan dapat digunakan untuk radioimunoterapi kanker payudara, seperti halnya <sup>177</sup>Lu-DOTA-Trastuzumab yang sudah banyak dikembangkan oleh beberapa peneliti di beberapa negara<sup>(4, 15)</sup>. Ligan DOTA disamping berperan sebagai ligan pembentuk senyawa kompleks dengan radionuklida <sup>177</sup>Lu, juga mampu berikatan melalui reaksi konjugasi dengan trastuzumab di dalam senyawa <sup>177</sup>Lu-DOTA-Trastuzumab maupun senyawa <sup>176</sup>Lu-DOTA-Trastuzumab dan dengan dendrimer PAMAMG3.0 di dalam senyawa kompleks (<sup>177/176</sup>Lu-DOTA)<sub>n</sub>-[dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab)<sub>m</sub>. Dendrimer PAMAM G3.0 suatu polimer globular pengantar obat (*drug delivery agent*) memiliki 32 gugus amin primer dipermukaan molekulnya yang dapat dimanfaatkan untuk mengikat senyawa kompleks <sup>177</sup>Lu-DOTA dan juga dapat mengikat beberapa molekul trastuzumab sesuai kebutuhan. Penggunaan dendrimer dapat mengurangi penggunaan jumlah antibodi monoklonal trastuzumab bila dibandingkan apabila antibodi tersebut langsung dikonjugasikan terhadap kedua jenis senyawa kompleks <sup>177</sup>Lu-DOTA dan <sup>176</sup>Lu-DOTA yang tidak radioaktif.

Penyiapan pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM dilakukan melalui reaksi yang ditunjukkan di Gambar 1A dan pH larutan dipertahankan pada pH 9 selain agar kelarutan pSCN-DOTA tetap tinggi juga agar atom hydrogen di gugus amin primer mengalami deprotonasi. Resonansi di gugus tiosinat pSCN-DOTA akan menyebabkan kerapatan elektron atom karbon berkurang sehingga menjadi target untuk “*nucleophilic attack*” oleh gugus amin primer dari dendrimer yang telah mengalami deprotonasi. Atom hidrogen yang lepas dari proses deprotonasi akan masuk ke atom nitrogen gugus tiosinat membentuk ikatan N-H. Dalam reaksi ini dibuat perbandingan jumlah mol pSCN-DOTA terhadap dendrimer PAMAM adalah 24:1, agar amin primer yang tersisa dari total 32

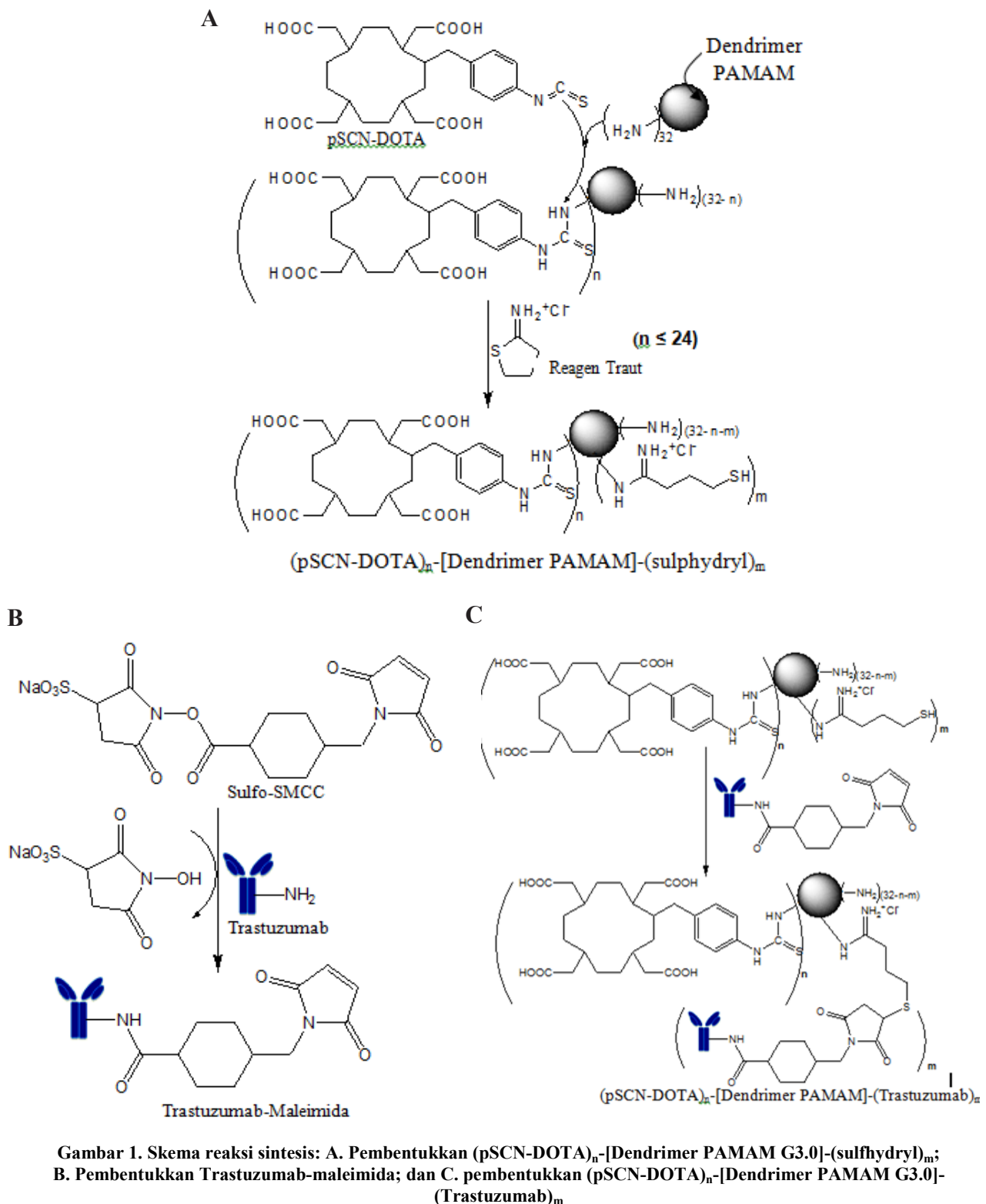
gugus amin primer dipermukaan dendrimer dapat ditiolasi dengan reagen *Trauts*, sementara sifat-sifat muatan gugus amino semula tetap dipertahankan (lihat Gambar 1A), sehingga gugus *sulphydryl* yang terbentuk selanjutnya dapat diarahkan untuk reaksi konjugasi dengan trastuzumab.

Fraksi senyawa (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM] dipisahkan dari campuran reaksi, yang masih mengandung pSCN-DOTA bebas dan Dendrimer PAMAM bebas serta pereaksi lainnya, dengan menggunakan kolom kromatografi *size-exclusion* PD-10 komersial (berisi Shepadex G-25) dan kemudian diuji dengan *dye* protein yang mengandung *Coomassie Blue* G-250 ditunjukkan di Gambar 3A sebagai fraksi 9-17. Perubahan dari warna coklat menjadi warna biru yang timbul dari hasil uji diperoleh dari hasil interaksi elektrostatik antara gugus amin primer dendrimer yang tersisa dan terprotonasi dengan salah satu gugus sulfo dari *Coomassie Blue* G-250 (lihat Gambar 2)<sup>(14)</sup>.

Kromatogram *size exclusion* fraksi (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM]-R'-tiol hasil thiolasi gugus amin dendrimer yang tersisa dari (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM] dengan menggunakan pereaksi *Traut* ditunjukkan di Gambar 3B dalam bentuk fraksi 17-40. Senyawa ini masih membawa amin bermuatan positif yang berasal dari pereaksi *Traut*, sehingga akan memberikan warna biru bila diuji dengan *dye* protein.

Sebelum trastuzumab dikonjugasikan dengan (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM] yang sudah ditiolasi, trastuzumab teraktifkan maleimida yang dapat dikonjugasikan dengan gugus *sulphydryl* untuk membentuk ikatan tioeter disiapkan melalui reaksi antara trastuzumab dengan pereaksi sulfo-SMCC (*succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl] cyclo-hexane-1-carboxylate*) (lihat Gambar 1B). Ester NHS dari pereaksi ini akan bereaksi dengan gugus amin primer trastuzumab membentuk ikatan amida dan peranan cincin sikloheksana yang berada diantaranya adalah untuk mengurangi laju hidrolisis terhadap gugus maleimida sehingga memungkinkan dapat diliofilisasi untuk tujuan penyimpanan dalam waktu yang lama<sup>(18)</sup>. Pemurnian Trastuzumab-maleimida dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi *size exclusion* dan fraksi trastuzumab-maleimida dari profil elusi setelah uji *dye* protein terdapat di fraksi 8-14 (lihat Gambar 3C).

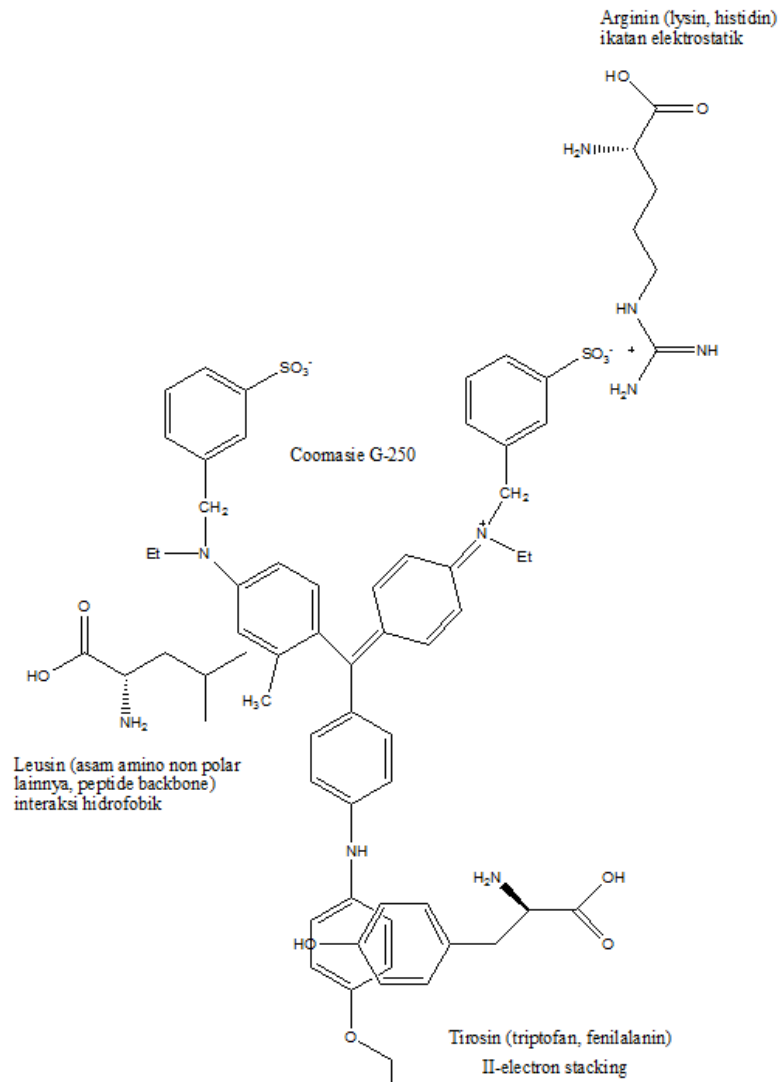
Gambar 1C memperlihatkan reaksi antara (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM]-R'-tiol dengan Trastuzumab-maleimida untuk penyiapan (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM]-(Trastuzumab)<sub>m</sub>. Reaksi adisi gugus tiol dari *sulphydryl* pada pH 6,5 -7,5 akan membuka ikatan rangkap ganda gugus



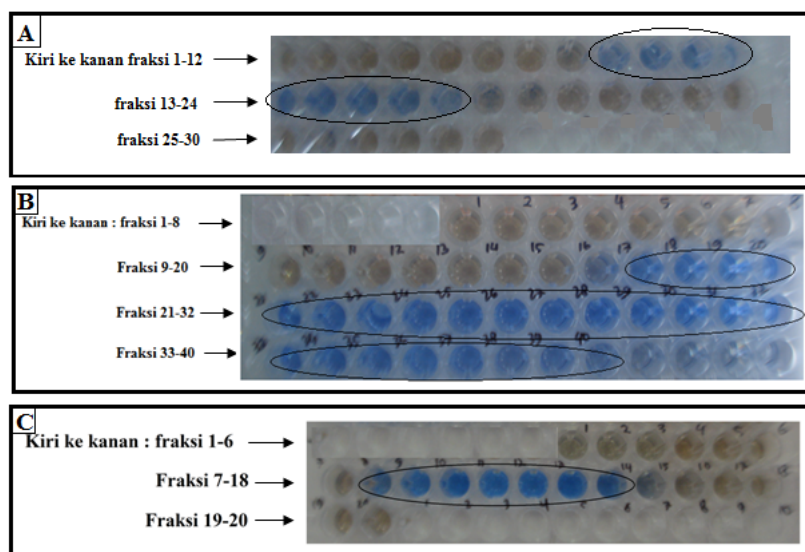
maleimida menjadi ikatan tunggal dimana atom sulfur akan terikat di salah satu atom C dari ikatan tersebut dan atom hidrogen di atom C lainnya sehingga trastuzumab dengan dendrimer dihubungkan oleh ikatan tioeter yang stabil.

Konjugat  $(pSCN-DOTA)_n$ -[Dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab) $_m$  dimurnikan melalui proses

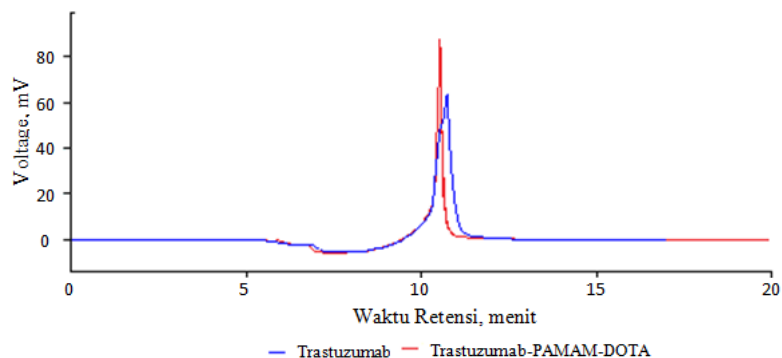
dialisis menggunakan dapar ammonium asetat 0,25 M. Gambar 4 memperlihatkan hasil karakterisasi menggunakan HPLC terhadap konjugat  $(pSCN-DOTA)_n$ -[Dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab) $_m$ . Hasil pemurnian kemudian dibandingkan dengan kromatogram trastuzumab sebagai *starting material*. Waktu retensi kedua senyawa sangat berdekatan



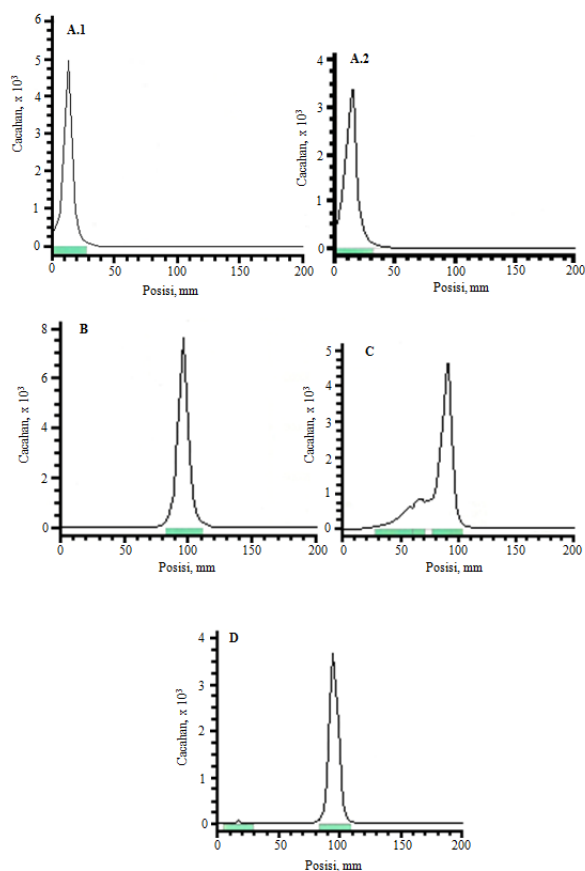
Gambar 2. Interaksi indikator Biorad dye dengan protein<sup>(16)</sup>.



Gambar 3. Hasil uji kolorimetri dengan indikator Biorad dye fraksi-fraksi hasil pemurnian. (A). reaksi konjugasi pSCN-DOTA dengan dendrimer PAMAM, (B) reaksi aktivasi konjugat pSCN-DOTA-PAMAM G3.0 dengan reagen Traut's, (C) reaksi aktivasi antibodi trastuzumab dengan sulfo-SMCC.



Gambar 4. Kromatogram SE-HPLC trastuzumab hasil pemurnian dan pSCN-DOTA-PAMAM-trastuzumab; Kolom: SEC250 Biosute 7.5 x 350 mm; detector 280 nm; Eluent: PBS 0.01N; Kecepatan alir: 1 mL/menit.



Gambar 5. Radiokromatogram hasil penandaan, A. konjugat pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM-trastuzumab dengan rasio konjugat:  $^{177}\text{Lu}$ , A. 1:1; A. 2. 1 : 5, hasil uji NSB: B. EDTA, C. DOTA, dan D. dendrimer PAMAM G3.0, masing-masing dengan  $\text{Lu}^{177}$ .

yang dapat diartikan bahwa berat molekul senyawa didominasi oleh berat molekul trastuzumab, ~145,5 kD. Meskipun demikian, berat molekul konjugat (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM]-(Trastuzumab)<sub>m</sub> sedikit lebih besar dengan adanya penambahan Dendrimer PAMAM G3.0, sekitar 6,9 kD serta beberapa pSCN-DOTA (0,541 kD), bila dibandingkan dengan berat molekul trastuzumab yang ditunjukkan oleh waktu retensi  $t_R=10,53$  menit dan 10,70 menit masing-masing untuk konjugat dan trastuzumab. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa konjugat

(pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab)<sub>m</sub> melalui pengembangan metoda penyiapan ini dapat dibuat dengan kemurnian cukup tinggi tanpa ada senyawa lain sampai waktu retensi 20 menit. Tingkat kemurnian konjugat (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab)<sub>m</sub> yang tinggi ini ditunjukkan pula dari hasil analisis ITLC dengan menggunakan eluen larutan salin melalui pengukuran (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab)<sub>m</sub> yang ditandai  $^{177}\text{Lu}$ .

Dalam penandaan ini  $^{177}\text{Lu}$  diinginkan hanya



membentuk senyawa kompleks langsung dengan DOTA saja sebagai ligan. Kemungkinan terjadinya penandaan terhadap dendrimer PAMAM di dalam konjugat oleh  $^{177}\text{Lu}$  sebagai *non-specific binding* selama proses penandaan (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab)<sub>m</sub> dapat dikatakan sangat kecil sekali untuk terjadi.

Hal ini tidak saja disebabkan oleh efek "*steric hindrance*" dari gugus amin dendrimer yang sudah berkonjugasi masing-masing dengan pSCN-DOTA dan trastuzumab, juga sudah sangat terbatasnya gugus amin yang tersedia sebagai atom donor untuk membentuk kompleks dengan  $^{177}\text{Lu}$ . Meskipun demikian, kemungkinan terjadinya penandaan terhadap dendrimer PAMAM G3.0 oleh  $^{177}\text{Lu}$  ditunjukkan di dalam eksperimen terpisah melalui analisis ITLC yang sama. Hal yang sama dilakukan juga terhadap senyawa pSCN-DOTA, selain untuk membuktikan apakah ligan tersebut dapat membentuk senyawa kompleks dengan  $^{177}\text{Lu}$ . Karena itu dalam eksperimen tersendiri dilakukan juga analisis ITLC yang sama terhadap  $^{177}\text{Lu}$ -EDTA. Gambar 5 memperlihatkan kromatogram ITLC, masing-masing untuk hasil penandaan dengan  $^{177}\text{Lu}$  terhadap konjugat (pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab)<sub>m</sub>, maupun uji NSB nya dengan EDTA, DOTA, dan Dendrimer PAMAM G3.0. Gambar 5A1 dan 5A2 menunjukkan bahwa ( $^{177}\text{Lu}$ -pSCN-DOTA)<sub>n</sub>-[Dendrimer PAMAM G3.0]-(Trastuzumab)<sub>m</sub> hasil penyiapan dengan metoda yang dikembangkan ini berada di posisi Rf <0,3 dengan kemurnian yang sangat tinggi mendekati 100%, tanpa ada  $^{177}\text{Lu}$  bebas (dalam bentuk  $^{177}\text{Lu}$ -EDTA, Rf >0,6, Gambar 5B), pSCN-DOTA bebas (Rf >0,6, Gambar 5C) dan Dendrimer PAMAM G3.0 bebas (Rf >0,6, Gambar 5D) serta trastuzumab bebas (lihat Gambar 4). Dapat ditunjukkan pula bahwa penambahan  $^{177}\text{Lu}$  dengan perbandingan sampai 5 kali lebih besar dari konjugat masih belum optimal, dengan tidak munculnya puncak  $^{177}\text{Lu}$ -EDTA di Gambar 5A1 dan 5A2.

### SIMPULAN

Konjugat anti HER-2 yang potensial sebagai radiofarmaka radioimunoterapi, pSCN-DOTA-dendrimer PAMAM-trastuzumab telah berhasil disiapkan dengan melalui beberapa tahapan reaksi konjugasi. Karakterisasi dengan menggunakan sistem HPLC menggunakan kolom SE menunjukkan telah terbentuk konjugat yang ditandai dengan adanya pergeseran puncak pada waktu retensi 10,53 menit jika dibandingkan dengan starting material-nya yaitu trastuzumab pada waktu retensi 10,70 menit. Penandaan konjugat dengan  $^{177}\text{Lu}$  menghasilkan

persentase penandaan yang memenuhi persyaratan radiofarmaka yang baik yaitu >95%.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Hambali atas bantuannya dalam proses penyediaan radioisotop  $^{177}\text{Lu}$  dan kepada semua pihak yang telah memberikan saran, motivasi dan dukungan baik material maupun moril, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan karya tulis ilmiah ini.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. Medical Statistical Center. 2013; [1 tayangan]. diambil dari: URL:<http://www.CureResearchTM.com>, diakses 27 Februari, 2013.
2. Suzanna E, Sirait T, Rahayu PS, Shalmon G, Anwar E, Andalusia R, Harjati, *et al.* Registrasi kanker berbasis rumah sakit kanker "Dharmais"-Pusat Kanker Nasional, 1993-2007. *Ind J of Cancer*. 2012.6(4):181-205.
3. DCE Ng, MBBS, MRCP, FAMS. Radioimmunotherapy: A brief review. *Biomed Imaging Interv J*. 2005.2(3):e23.
4. Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Doha FJ.  $^{177}\text{Lu}$  labeling of herceptin and preclinical validation as a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl Med and Biol*. 2010.37:949-55.
5. Schroh A, Pedersen HC, Jensen SS, Nielsen SL, Br nner N. Human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) immunoreactivity: Specificity of three pharmacodiagnostic antibodies. *Histopathology*. 2011.59(5):975-83.
6. Hermanto S, Haryuni RD, Ramli M, Mutalib A, & Hudiyono S. Preparation of F(ab')<sub>2</sub> trastuzumab fragment for radioimmunoconjugate synthesis of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-F(ab')<sub>2</sub>-trastuzumab. *IOSR J Pharm*. 2012.2(6):12-8.
7. Hermanson GT. *Bioconjugate technique*. 2<sup>nd</sup> Ed. London: Elsevier; 2008. 67-9, 283-4.
8. Humani T, Ramli M, Rustendi CT Subur M. Preparasi dan uji stabilitas  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Nimotuzumab sebagai radiofarmaka terapi kanker. 2010. *Prosiding Seminar Nasional VI SDM Teknologi Nuklir, Yogyakarta* 29 November, 2010: 663-70.
9. Kobayashi H, Sato N, Saga T, Nakamoto Y, Ishimori T, Toyama S, *et al.* Monoclonal antibody-dendrimer conjugates enable radiolabelling of antibody with markedly high specific activity with minimal loss of immunoreactivity. *Eur J Nucl Med*. 2000.27(9):1334-9
10. Anonim. Lutetium-177. diambil dari. [http://shop.perkinelmer.com/content/manuals/gde\\_lutetium177features.pdf](http://shop.perkinelmer.com/content/manuals/gde_lutetium177features.pdf). diakses 14 Februari, 2013
11. Wang AZ, Gu F, Zhang L, Chan JM, Radovic-Moreno A, Shaikh MR, *et al.* Biofunctionalized targeted nanoparticles for therapeutic applications. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2008.8(8):1063-70.
12. Menjoge AR, Kannan RM, Tomalia DA. Dendrimer-

- based drug and imaging conjugates: Design considerations for nanomedical applications. *Drug Discovery Today*. 2010.15:171-84.
13. Zhang Z, Rong F, Niu S, Xie Y, Wang Y, Yang H, et al. Investigation the effects of nano golds on the fluorescence properties of the sectorial poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers. *Appl Surf Sci J*. 2010.256:7194-9.
  14. Bhalgat MK and Roberts JC. Molecular modelling of PAMAM Starburst<sup>TM</sup> dendrimer. *Eur Polym J*. 2000.36:647-51.
  15. Ramli M, Hidayat B, Ardiyatno CN, Aguswarini S, Karyadi, et al. Preclinical study of <sup>177</sup>Lu-DOTA-trastuzumab, a potential radiopharmaceutical for therapy of breast cancer positive HER-2. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Seminar on Chemistry 2011, Jatinangor 24-25 November, 2011*: 71-8.
  16. Anonim. Got Protein?<sup>TM</sup> kit catalog number 166-2900EDU testing protein content of common foods using the Quick Start<sup>TM</sup> Bradford. 2013; [1 tayangan]. diambil dari: URL:<http://explorer.bio-rad.com>. diakses 5 Februari, 2013.