

ANTIBODI REKOMBINAN : PERKEMBANGAN TERBARU DALAM TEKNOLOGI ANTIBODI

Sulistyo Emantoko

**Departemen Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Surabaya**

Abstrak

Ketidakspesifikan reaksi poliklonal antibodi, dapat diatasi setelah ditemukannya monoklonal antibodi. Namun demikian pembuatan monoklonal antibodi sangat sulit. Antibodi rekombinan bersifat sangat spesifik dan mudah dibuat menggunakan teknik-teknik bioteknologi umum. Perkembangan pembuatan antibodi rekombinan ini bertambah setelah keseluruhan gen antibodi telah berhasil di sekuensing dan dengan ditemukannya teknik PCR. Saat ini antibodi rekombinan mulai dikembangkan untuk tujuan pengobatan, seperti pada pengobatan kanker.

Kata kunci : Recombinant antibody, PCR, IgG, Frame work, CDR

Antibodi adalah bagian pertahanan tubuh yang digunakan untuk menghilangkan atau mengurangi zat asing yang masuk ke dalam tubuh. Mekanisme kerja antibodi dalam tubuh dimulai dengan diikatnya epitope (bagian antigen) oleh antibodi. Ikatan ini akan membentuk kompleks antigen-antibodi yang berukuran besar dan akhirnya mengendap. Kompleks antigen-antibodi ini juga dapat dikenali oleh sel makrofag, yang akan mendegradasi kompleks ini.

Pada perkembangannya antibodi banyak digunakan sebagai alat deteksi di bidang klinis dan biomedisinal. Deteksi ini dapat berupa deteksi protein atau

deteksi mikroorganisme. Sebagai contoh penentuan golongan darah, penentuan jumlah mikroorganisme menggunakan ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) atau penentuan ukuran protein menggunakan teknik *western blot*.

Secara umum tahap pertama deteksi menggunakan antibodi adalah dengan mengikatkan epitope yang akan di deteksi dengan antibodi. Hal ini mengharuskan antibodi yang digunakan mampu mengenali epitope secara spesifik. Antibodi yang dapat mengenali lebih dari satu macam epitope dari dua antigen yang berbeda dapat menimbulkan kesalahan deteksi positif.

Selama ini antibodi yang sering digunakan dalam deteksi adalah poliklonal antibodi. Pada larutan antibodi ini terdapat bermacam-macam molekul antibodi. Satu molekul antibodi, biasanya mengenali satu macam epitope, sehingga larutan poliklonal antibodi mengenali lebih dari satu macam epitope (Hanly, *et.al*, 1995). Hal ini mneyebabkan larutan poliklonal antibodi kurang spesifik jika digunakan sebagai alat deteksi.

Masalah ketidakspefikan pada poliklonal antibodi diatasi menggunakan monoklonal antibodi, jenis antibodi yang merupakan pengembangan poliklonal antibodi. Larutan monoklonal antibodi, hanya mengandung satu macam molekul antibodi, sehingga larutan ini hanya mengenali satu macam antigen (Grimaldi dan French, 1995). Berdasarkan sifat ini, maka larutan monoklonal antibodi sangat spesifik ketika digunakan sebagai alat deteksi.

Namun terdapat beberapa kendala teknis dalam penyiapan monoklonal antibodi ini. Laboratorium kultur sel mamalia untuk pembuatan hibridoma penghasil monoklonal antibodi, memerlukan peralatan yang rumit dan keterampilan tinggi. Namun masalah utama pada penyiapan monoklonal antibodi adalah pada saat seleksi sel hibridoma. Sel hibridoma disiapkan dengan melakukan fusi sel B dari bagian limpa hewan yang diimunisasi dengan sel kanker (Karu

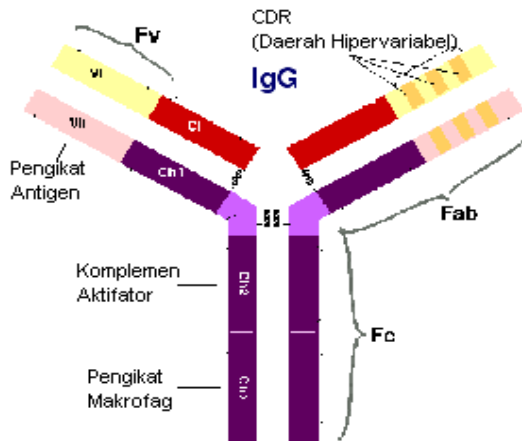
et.al, 1995). Sementara itu hewan yang diimunisasi dengan satu macam antigen mampu menghasilkan 6×10^6 sel B yang berbeda. Satu macam sel B akan menghasilkan satu macam antinodi. Pada saat dilakukan fusi sel B, akan didapatkan 6×10^6 sel hibridoma yang berbeda (Harlow dan Lane, 1988). Pada pembuatan monoklonal antibodi, harus diseleksi satu macam hibridoma dari sejumlah hibridoma tersebut. Hal ini merupakan pekerjaan yang sulit dan memakan waktu lama.

Kesulitan pembuatan monoklonal antibodi di atas, menimbulkan usaha-usaha kembali untuk mendapatkan jenis antibodi baru yang spesifik dengan cara yang lebih mudah. Harapan didapatkannya antibodi seperti ini muncul ketika keseluruhan struktur antibodi (khususnya IgG) telah selesai dipelajari dan ditemukannya teknik PCR. Antibodi baru yang didapat seringkali disebut antibodi rekombinan.

Struktur Molekul Antibodi

Pada dasarnya banyak dikenal molekul antibodi, sebagai contoh pada respon pertama masuknya antigen ke dalam tubuh dikeluarkan antibodi yang disebut IgM. Peristiwa inflamasi atau alergi terjadi karena reaksi antara antibodi IgE dan antigen. Sementara antibodi yang efektif dan digunakan tubuh dalam jangka waktu lama dikenal sebagai IgG.

Semua antibodi di atas mempunyai struktur hampir sama yang berbentuk huruf Y dan disebut sebagai Ig. Ig terdiri dari dua rantai polipeptida berukuran besar disebut sebagai rantai berat) dan dua rantai polipeptida berukuran kecil (disebut sebagai rantai ringan). Dua rantai berat pada Ig saling dihubungkan oleh ikatan disulfida dan antara satu rantai berat dan rantai ringan juga saling dihubungkan dengan ikatan disulfida (gambar 1).



Gambar 1. Struktur Molekul Antibodi

Terdapat dua jenis rantai ringan yang telah diketahui yang disebut dengan gamma dan kappa, sementara terdapat banyak macam rantai berat yang telah diketahui. Rantai berat ini yang menentukan apakah antibodi tersebut termasuk golonganna IgG, IgM, IgA, IgD atau IgE.

Secara lebih detail, rantai ringan terdiri dari dua bagian yaitu bagian lestari (*conserved*/Fc) dan bagian variabel (Fab). Bagian lestari adalah bagian yang mempunyai urutan asam amino yang hampir sama antar antibodi yang dikeluarkan akibat respon antigen yang berbeda, bahkan bagian lestari ini hampir sama antar spesies. Bagian variabel merupakan bagian yang mempunyai urutan asam amino yang berbeda. Meskipun jenis antibodinya sama, tetapi urutan asam amino bagian variabel akan berbeda jika antigen yang direspon oleh antibodi tersebut berbeda. Lebih detail lagi, bagian variabel dapat dibagi menjadi enam bagian yang berupa bagian *frame work* (FR) dan *complementarity determining*

region (CDR) yang terletak berselingan. sebagai contoh satu Fab akan mempunyai urutan sebagai berikut FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3. CDR merupakan daerah yang lebih variatif antar antibodi dibandingkan FR.

Hampir sama dengan rantai ringan, rantai berat juga terdiri dari Fc dan Fab. Terdapat satu bagian variabel yang terdiri dari CDR dan FR serta terdapat tiga bagian lestari yang disebut CH1 (*constant high*), CH2 dan CH3 (Gambar 1). CH1 merupakan bagian lestari yang langsung berhubungan dengan bagian variabel, CH2 merupakan bagian lestari yang berfungsi sebagai efektor (penyedia signal transduksi) untuk pembentukan antibodi dan CH3 merupakan bagian yang dikenali oleh makrofag sebelum terjadinya fagositosis.

Struktur tersier antibodi menunjukkan bahwa fragmen Fv (*fragment variable*) yang terdiri dari bagian variabel rantai berat dan rantai ringan melakukan *folding* sehingga membentuk struktur *loop* (Harlow dan Lane, 1988). Bagian ini adalah bagian yang berfungsi mengikat antigen. Sementara itu, bagian konstan rantai berat melakukan *folding* untuk membantu menstabilkan struktur *loop* di atas.

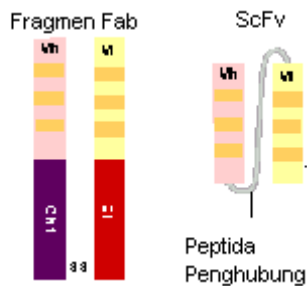
Antibodi Rekombinan

Struktur *loop* bagian Fv merupakan bagian yang paling bertanggung jawab terhadap spesifisitas dan aktifitas antibodi dalam mengeliminir antigen, karena bagian inilah yang mengikat antigen dan selanjutnya mengendapkan antigen tersebut. Bagian lestari pada molekul antibodi, sama sekali tidak bertanggung jawab terhadap pengikatan antibodi oleh antigen. Jika bagian lestari ini dihilangkan, maka kemampuan antibodi untuk mengikat antigen masih tetap ada. Antibodi rekombinan dibuat berdasarkan pemikiran ini.

Sampai saat ini dikenal dua jenis antibodi rekombinan yaitu Fab dan ScFv. Fab merupakan fragmen antibodi yang terdiri dari rantai ringan dan CH1

serta bagain variabel rantai berat. Anand *et.al* (1991) menunjukkan bahwa Fab ini mempunyai sifat stabilitas yang sama besar terhadap panas dibandingkan dengan antibodi utuh (struktur Y). Disamping itu Fab juga mempunyai fungsi dan efektifitas yang sama dalam menghilangkan antigen dari dalam tubuh.

ScFv (*single chain variable fragment*) hanya terdiri dari bagian variabel antibodi yang berasal dari rantai berat dan rantai ringan, sehingga ScFv merupakan molekul terkecil yang masih mempunyai aktifitas antibodi untuk mengikat antigen. Meskipun demikian afinitas dan aviditas ScFv terhadap antigen masih menyerupai antibodi utuh padananya.



Gambar 2. Dua Macam Antibodi Rekombinan yang Sering Digunakan

Berbeda dengan Fab yang secara alami mempunyai penghubung ikatan disulfida (pada bagian rantai beratnya), bagian variabel pada ScFv tidak saling terhubung. Oleh karena itu, pada ScFv diperlukan penghubung berupa asam amino hidrofobik berjumlah 14-16 asam amino. Panjang dan komposisi asam amino penghubung ini berpengaruh terhadap afinitas dan stabilitas ScFv.

Produksi Fab dan ScFv dalam jumlah besar biasanya dilakukan melalui over ekspresi menggunakan *E. coli* sebagai sel *host*. Meskipun demikian karena ukuran molekul ScFv lebih kecil dibandingkan Fab, maka molekul ini dapat

diekspresikan lebih efektif dan lebih banyak dibanding Fab.

Guna lebih memperbesar efektifitas antibodi dalam menghilangkan antigen, teknologi antibodi rekombinan terbaru berusaha menggabungkan beberapa Fab atau ScFv membentuk sebuah dimer atau multimer. Dimer atau multimer ini biasanya sampai berukuran 60-120 kDa dan merupakan reagen fungsional yang sangat efektif untuk mengenali sel kanker atau sel tumor. Beberapa molekul semacam ini telah dikenal masih mempunyai orientasi yang fleksibel dalam mengikat antigen, sehingga dapat mengikat antigen ini dengan afinitas tinggi (Adams, *et.al*, 1998). Sebagai contoh diabodi merupakan gabungan dua molekul ScFv menggunakan lima penghubung dan mempunyai dua tempat pengikatan antigen, sementara triabodi merupakan gabungan tiga molekul antigen. Molekul antibodi rekombinan lain yang telah berhasil dibuat adalah miniabodi, yang merupakan gabungan antara ScFv dengan CH3. Molekul minibodi ini mempunyai kemampuan melokalisasi tumor xenografts pada tikus dan mempunyai retensi tinggi pada sel tumor.

Teknologi Pembuatan Antibodi Rekombinan

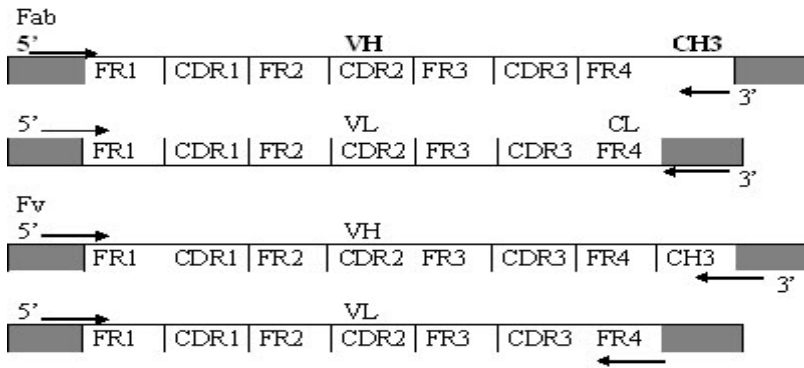
Antibodi rekombinan dibuat melalui rangkaian proses PCR, seleksi dan ekspresi antibodi. Ada dua bagian besar pembuatan antibodi rekombinan yaitu produksi plasmid yang mengandung gen antibodi yang diinginkan (Gambar 4) dan produksi antibodi rekombinan yang terlarut (Gambar 6).

Tahap awal pembuatan antibodi rekombinan adalah dengan mendapatkan gen pengkode antibodi yang diinginkan. Gen ini dapat diperoleh dari sel penghasil antibodi (sel B) yang terdapat pada jaringan limpa hewan yang sebelumnya telah diimunisasi dengan antigen tertentu (antigen yang akan dibentuk antibodinya). Jaringan limpa ini diambil dan mRNA-nya diisolasi

menggunakan kromatografi afinitas. mRNA mempunyai ekor nukleotida yang hanya terdiri dari adenin (ekor poli-A), sehingga dengan memberikan rangkaian nukleotida timin (poli-T) pada kolom kromatografi, mRNA dapat diisolasi dari suatu larutan ekstrak sel limpa atau sel hibridoma. Namun mRNA yang diperoleh pada tahap ini masih merupakan campuran mRNA. Selanjutnya mRNA ini diubah menjadi cDNA menggunakan enzim *reverse transcriptase* dengan teknik RT-PCR.

cDNA yang diperoleh dari langkah di atas masih merupakan campuran. Untuk memperoleh DNA pengkode antibodi, diperlukan PCR lanjutan menggunakan primer yang khusus mengamplifikasi gen pengkode antibodi. Seperti dijelaskan bahwa agar antibodi mengenali antigen secara aktif diperlukan bagian variabel rantai berat dan rantai ringan, karena itu dalam proses PCR, amplifikasi DNA juga dilakukan untuk menghasilkan fragmen rantai berat dan fragmen rantai ringan.

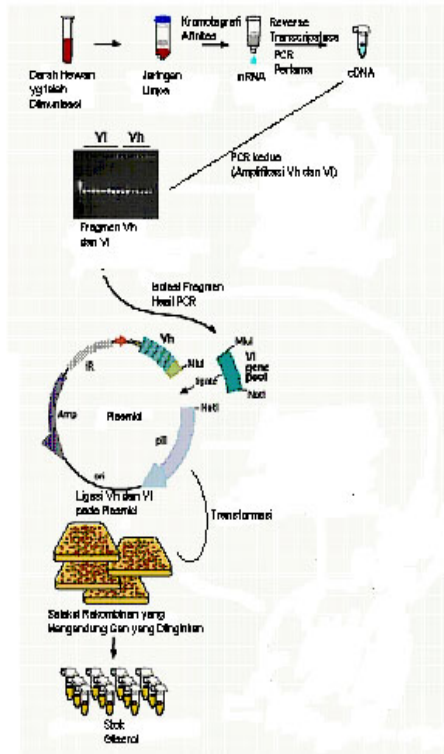
Untuk pembuatan Fab, amplifikasi fragmen rantai berat dilakukan menggunakan primer *reverse* yang merupakan daerah *conserved* pada bagian ujung CH1, sedangkan primer *forward*-nya adalah daerah *conserved* pada FR1 (Orlandi *et.al*, 1989). Primer dirancang secara tersendiri untuk bagian FR1 rantai berat dan rantai ringan. Sedangkan primer *reverse* rantai ringan, haruslah komplemen dengan urutan nukleotida *conserved* pada bagian CL. Bagian CH1 biasanya menentukan sub klas antibodi tertentu (misalkan IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, dll) maka primer yang digunakan harus ditentukan untuk mendapatkan sub klas IgG yang diinginkan. Sementara itu daerah FR1 juga bervariasi, sehingga agar amplifikasi berjalan dengan baik diperlukan beberapa pasang primer (*degenerate primer*) pada saat melakukan PCR, bukan satu pasang primer saja seperti pada saat PCR secara konvensional.



Gambar 3. Perancangan Primer untuk Amplifikasi Gen Ig

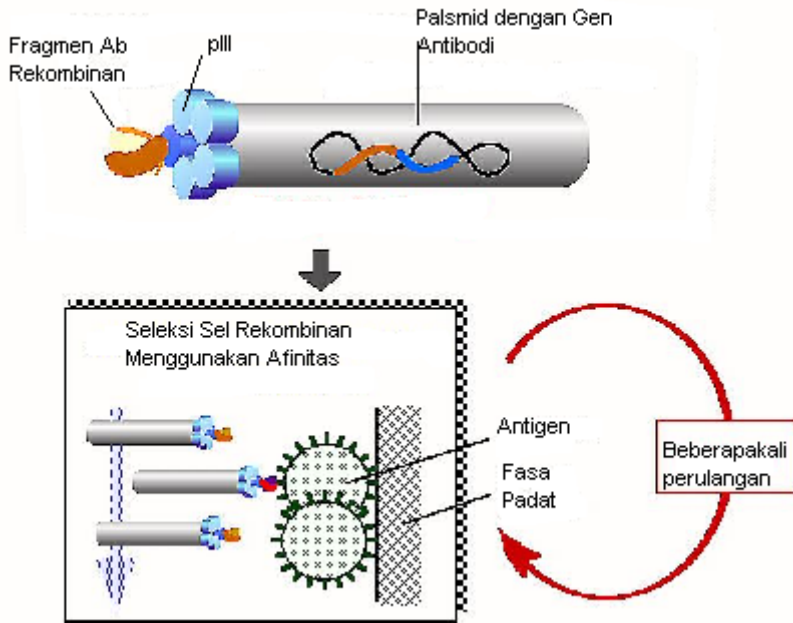
Hampir sama dengan pembuatan Fab, untuk mengamplifikasi gen pengkode antibodi untuk membuat ScFv, diperlukan primer *forward* yang komplemen dengan daerah FR1, sehingga untuk PCR daerah ini juga diperlukan *degenerate primer*. Sementara itu urutan primer *reverse* dirancang agar *kompatible* dengan daerah FR4, baik untuk rantai ringan maupun untuk rantai berat. Untuk keperluan ini juga diperlukan *degenerate primer*.

Teknologi antibodi rekombinan meliputi isolasi gen pengkode antibodi dari sel sumber (biasanya sel limpha), amplifikasi dan kloning gen ke dalam vektor yang sesuai, transformasi sel host menggunakan vektor rekombinan dan ekspresi antibodi fungsional dari sel *host*. Teknik lain yang mungkin ada adalah pemilihan antibodi fungsional yang sesuai jika gen antibodi yang berhasil diklon lebih dari satu. Sumber sel dapat berasal dari berbagai spesies selama primer yang dipergunakan untuk mengamplifikasi DNA tersedia



Gambar 4. Tahapan Pembuatan sel Rekombinan yang Membawa Gen Pengkode Antibodi

Fragmen hasil PCR selanjutnya diotong dengan enzim restriksi untuk mendapatkan ujung fragmen yang *kompatibel* dengan plasmid yang akan digunakan. Pada pembuatan antibodi rekombinan terdapat dua plasmid yang digunakan. Plasmid pertama harus mengandung gen yang mengkode protein permukaan luar sel. Gen yang sering digunakan adalah gIII (gene III) yang mengkode pIII (protein III, suatu protein yang berada di bagian luar membran sel).



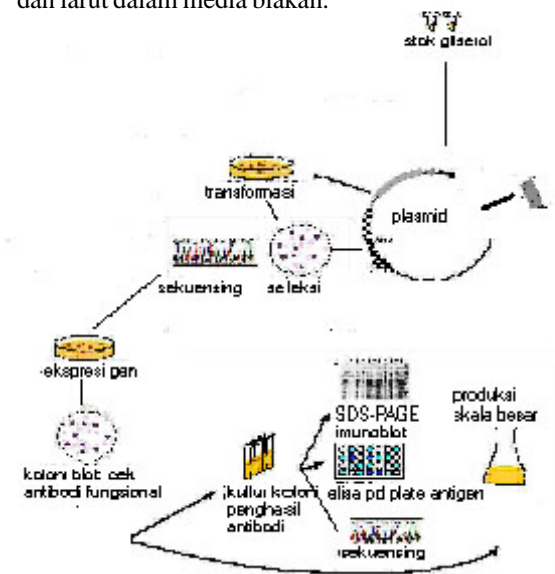
Gambar 5. Seleksi Sel Rekombinan

Setelah dilakukan fragmen hasil PCR (baik *Vh/variable heigth* maupun *VI/variable ligt*) dimasukkan ke dalam plasmid, plasmid rekombinan yang di dapat digunakan untuk mentransformasi sel host. Metode transformasi biasanyamenggunakan electric shock karena ukuran palsmid cukup besar, dan sel host yang digunakan adalah *E. coli*.

Antibodi rekombinan hasil ekspresi sel rekombinan, akan berada pada permukaan luar sel berbentuk protein fusi dengan pIII. Dibandingkan dengan pembuatan antibodi monoklonal, proses seleksi pada antibodi rekombianna akan

lebih mudah dengan adanya protein fusi ini. Seleksi dilakukan dengan menempelkan antigen yang dikenali antibodi pada permukaan suatu fasa padat (Dubel, 2002). Selanjutnya fasa padat tersebut dikontakan dengan sel yang akan diseleksi. Jika antibodi yang terdapat pada permukaan sel sesuai dengan antigen yang menempel pada fasa padat, maka sel tersebut akan tertinggal pada fasa padat. Setelah ieludisasi, maka akan didapatkan sel yang mengandung gen pengkode antibodi yang diinginkan (gambar 5).

Sel rekombinan yang didapat pada proses di atas digunakan untuk memproduksi plasmid yang megandung gen antibodi dalam jumlah besar. Plasmid ini digunakan dalam proses sekuensing untuk memastikan bahwa gen yang terinsersi diadalanya adalah gen antibodi yang diinginkan. Selanjutnya gIII yang ada pada plasmid rekombinan dikeluarkan. Tidak adanya gIII, menyebabkan protein antibodi yang diekspresikan oleh sel rekombinan akan terlepas dari sel dan larut dalam media biakan.



Gambar 6. Tahapan Pembuatan Antibodi Rekombinan Terlarut

Antibodi yang telah terlarut ini selanjutnya diuji fungsionalitas dan kespesifikanya menggunakan SDS-PAGE maupun ELISA. Jika ELISA maupun SDS-PAGE menunjukkan hasil positif, antibodi dikatakan telah berfungsi. SDS-PAGE akan menunjukkan kespesifikan antibodi yang digunakan dengan menunjukkan ukuran molekul antigen, sedangkan ELISA menunjukkan batas minimum antigen yang masih dapat terdeteksi oleh antibodi.

Pemanfaatan Antibodi Rekombinan

Antibodi rekombinan sangat spesifik, karena antibodi ini hanya mengenali epitope tertentu dari suatu antigen. Antigen yang berbeda, kadangkala memiliki epitope yang sama. Hal ini seringkali menimbulkan kesalahan pada saat dilakukan deteksi menggunakan antibodi rekombinan. Teknologi antibodi rekombinan memungkinkan kita memilih epitope tertentu yang spesifik dimiliki oleh suatu antigen. Menggunakan antibodi yang sangat spesifik tersebut, kesalahan deteksi positif dapat dikurangi.

Antibodi rekombinan juga memungkinkan pembuatan antibodi terhadap zat yang sangat toksik (Dubel 2002). Antibodi terhadap zat yang sangat toksik tidak dapat dibuat menggunakan teknik poliklonal maupun monoklonal antibodi. Hewan percobaan yang terlalu banyak disuntik zat toksik ini, akan mengalami kematian, sementara jika jumlah zat toksik yang disuntikan terlalu sedikit, jumlah antibodi yang dihasilkan tidak mencukupi jika digunakan secara komersial.

Teknik antibodi rekombinan memungkinkan penyuntikan zat toksik yang kecil, tetapi gen pengkode antibodi terhadap zat tersebut telah tersimpan pada sel B di jaringan limpa hewan percobaan. Selanjutnya gen ini dapat diisolasi dan produksi antibodi untuk tujuan komersial (masal) dapat dilakukan secara *in vitro*.

Saat ini yang banyak dikembangkan adalah pemakaian antibodi rekombinan dalam protein fusi untuk membantu immunotargeting (Little, 1995).

Sebagai contoh dalam imunotoksin. Antibodi rekombinan yang difusikan dalam protein toksin, dapat membantu kerja protein tersebut karena akan membantu mengenali molekul toksik target, karena ada bagian molekul toksik tersebut yang juga dikenali antibodi. Menggunakan cara yang sama antibodi rekombinan juga sering digunakan dalam pengobatan kanker (Ryu dan Nam, 2000). Antibodi yang ditempelkan pada obat kanker akan membantu mengenali sel kanker, sehingga pengobatan dapat berlangsung lebih efektif .

Daftar Pustaka

Adams,G.P.,Schier,R.,McCall,A.M.,Crawford,R.S.,Wolf,E.J.,Weiner,L.M., Prolonged in Vivo Tumor Retention Diabody Targeting the Extracellular Domain of Human HER2/neu., *Brit.J.Cancer*, 1998.

Anand, N.N., Mandal, S., MacKanzie, C.R.,Sadowska, J., Sigurskjold, B., Young, N.M., Bundle, D.R., dan Narang, S.A., Bacterial Expression and Scretion of Various Single-Chain Fv Genes Encoding Proteins Specific for a salmonella serotype B O-antigen, *J. Biol. Chem*, 1991.

Dubel, S.,The Recombinant Antibody Pages, www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/SDFvSite.html, diakses Januari 2002

Grimaldi, C.M. dan French, D.L., Monoclonal Antibodies by Somatic Cell Fusion,), *ILAR Journal*, Institute of Laboratory Animal Resources, Washington, D.C., 1995.

Hanly, W.C., Arthwol, J.E., dan Bennet, B.T., Review of Polyclonal Antibody Production in Mammals and Poultry *ILAR Journal*, Institute of Laboratory Animal Resources, Washington, D.C., 1995.

Harlow, E.D., dan Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour, U.S.A., 1998.

Karu, E.A., Bell, C.W., Chin, T.E., *Recombinant Antibody Technology*, ILAR Journal, Institute of Laboratory Animal Resources, Washington, D.C., 1995.

Little, M., Dubel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A., *Bifunctional and Multimeric Complexes of Streptavidin Fused to Single Chain Antibodies (scFv)*, *Journal of Immunological Methods*, Elsevier., 1995.

Orlandi, R., Gussow D.H., Jones P.T., dan Winter, G., *Cloning Immunoglobulin Variable Domains for Expression by Polymerase Chain Reaction*, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.*, 1989.

Ryu, D.D., dan Nam, D.H., *Recent Progress in Biomolecular Engineering*, *Biotechnol. Prog.*, ACS Publications., 2000.