ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH KHÁNG U CỦA KHÁNG NGUYÊN KHỐI U GLOBO H-KLH TRÊN CHUỘT

Nguyễn Thị Cúc, Đỗ Thị Thảo, Nguyễn Thị Nga, Đỗ Thị Phương, Nguyễn Thị Trang

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 08.10.2014
Ngày nhận đăng: 04.12.2014

TÓM TẮT

Globo H là một kháng nguyên khối u dạng hexasaccharide, được phân lập lần đầu tiên từ dòng tế bào ung thư vú MCF-7. Phân tử này đã được báo cáo về khả năng gây đáp ứng miễn dịch cho cơ thể và vì vậy Globo H là một mục tiêu quan trọng cho các nghiên cứu chế tạo vắc xin chống ung thư. Nhằm xác định khả năng gây đáp ứng miễn dịch kháng u của Globo H, trong nghiên cứu của chúng tôi, phân tử Globo H được cộng hợp với Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) và tiêm cho chuột thuần chủng dòng BALB/c trước khi gây u thực nghiệm bằng dòng tế bào Lewis Lung Carcinoma (LLC). Chuột được gây miễn dịch bằng tổ hợp Globo H-KLH ở các nồng độ khác nhau từ 1,2 và 4 µg/con/lần theo thường qui gây miễn dịch của các tác giả Liddell & Cryer (1991) có điều chỉnh. Kết quả cho thấy kháng nguyên Globo H-KLH có khả năng gây đáp ứng miễn dịch chống lại sự phát triển của khối u rất tốt trên chuột thí nghiệm. Cụ thể là khi chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H-KLH ở mức liều 4 µg/con/lần đã cho thấy rõ khả năng gây đáp ứng miễn dịch chống lại sự phát triển của khối u với hiệu quả đạt tới 66,67% chuột thí nghiệm hết u, tỉ lệ chuột sống sót là 100%, chỉ số huyết học đã thay đổi theo chiều hướng phục hồi tốt. Tuy mới chỉ là những kết quả ban đầu nhưng nghiên cứu này cho thấy tính khả quan và đầy triển vọng của việc sử dụng Globo H trong phương pháp miễn dịch phòng chống ung thư trong tương lai.

Từ khóa: chuột BALB/c, đáp ứng miễn dịch, kháng nguyên GloboH-KLH, tế bào LLC, vắc xin chống ung thư

MỞ ĐẦU

Trong các nghiên cứu về ung thư thì nghiên cứu tạo vắc xin phòng chống ung thư là hướng được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Sự quan tâm này hướng về các phân tử glycan nằm trên màng tế bào ung thư, nhờ khả năng gây đáp ứng miễn dịch phòng chống ung thư. Các phân tử glycan của tế bào gồm có glycoprotein (GP), glycosphingolipid (GSL) và proteoglycan. Các phân tử glycan dưới sự xúc tác của một hệ enzyme phức tạp sẽ trải qua chuỗi phản ứng glycosyl hóa để hình thành các phân tử glycoprotein và thực hiện chức năng của mình trong cơ thể và đối với tế bào. Sự sai sót từ chuỗi các phản ứng nói trên là một nhân tố quan trọng dẫn tới căn bệnh ung thư và có liên quan tới đặc tính di căn của bệnh này (Haltiwanger, Lowe, 2004).

Globo H là một phân tử thuộc các glycan dạng hexasaccharide và là kháng nguyên khối u, có khả năng gây đáp ứng miễn dịch (Livingston, 1995). Globo H lần đầu tiên được phân lập và xác định vào năm 1984 bởi Bremer *et al.*, từ dòng tế bào ung thư vú MCF-7. Do đặc tính có khả năng gây đáp ứng miễn dịch của phân tử Globo H, nhiều nghiên cứu đã hướng vào việc tạo vắc xin ung thư từ phân tử này. Slovin *et al.*, (1999) đã sử dụng Globo H cộng hợp với Keyhole limpet hemocyanin (KLH) làm kháng nguyên tiêm cho bệnh nhân ung thư vú và kết quả cho thấy kháng nguyên này có khả năng kích thích sinh kháng thể IgM cao hơn IgG. Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng khi tiêm kháng nguyên Globo H- KLH cho các bệnh nhân ung thư tiền liệt tuyến thì nồng độ PSA trong máu bệnh nhân giảm đáng kể so với nhóm đối chứng và không thấy có sự di căn vào xương. Gilewski *et al.*, đã dùng tổ hợp Globo H-KLH để làm vắc xin ung thư. Vắc xin này gồm có Globo H-KLH và chất hỗ trợ miễn dịch QS-21. Kết quả thử nghiệm lâm sàng trên 27 bệnh nhân ung thư vú di căn được tiêm 5 liều vắc xin cho thấy vắc xin dung nạp tốt và 16 bệnh nhân có kháng thể IgM, trong khi kháng thể IgG chỉ có ở một số ít bệnh nhân (Gilewski*et al.*, 2001). Một loại vắc xin khác có chứa 5 loại kháng nguyên Globo H, GM2, STN, TF và Tn cộng hợp với KLH khi kiểm tra bằng ELISA thì thấy kháng thể IgG trong huyết thanh chống lại Globo H cao hơn IgM (Zhu*et al.*, 2009). Đến thời điểm này,

kháng nguyên Globo H-KLH đang được viện Nghiên cứu Ung thư quốc gia Mỹ thử nghiệm lâm sàng pha 2 dưới dạng vắc xin chống ung thư vú di căn và cho những kết quả khả quan.

KLH là một protein có khối lượng phân tử lớn, bao gồm nhiều tiểu đơn vị. Với kích thước lớn và cấu trúc bao gồm nhiều epitope làm tăng cường phản ứng miễn dịch của cơ thể, đồng thời lượng lysine phong phú cho nhiều haptens bắt cặp nên KLH được sử dụng rộng rãi với vai trò là một protein tổ hợp nhằm tăng cường tính kháng nguyên của các kháng nguyên mong muốn. Theo báo cáo trước đây của chúng tôi, Globo H đã được cộng hợp thành công với KLH ở nồng độ 2000 ng/µl nhờ bộ kit Imject Mariculture KLH của Thermo Scientific (Massachusetts, MA,USA) và kháng nguyên Globo H-KLH có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt nhất trên chuột ở liều 4 µg/con/lần (Thảo *et al.*, 2013). .

Ngoài ra, để nghiên cứu thuốc có tác dụng chữa trị cũng như nghiên cứu hiệu ứng vắc xin phòng chống bệnh ung thư thì việc tạo mô hình động vật gây u là cần thiết. Trong các thử nghiệm *in vivo*, việc gây u trên chuột là rất phổ biến và có tính khả thi cao so với các loài động vật khác. Vì vậy, trong nghiên cứu này, kháng nguyên Globo H sau khi tổ hợp với phân tử KLH được sử dụng để nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch kháng u trên mô hình chuột thuần chủng BALB/c bị gây u ung thư bằng tế bào Lewis Lung Carcinoma (LLC).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Kháng nguyên đã cộng hợp Globo H-KLH (Thảo *et al.*, 2013), môi trường DMEM, huyết thanh bào thai bê (Fetal Bovine Serum – FBS) và các hóa chất khác được cung cấp bởi các hãng Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Invitrogen Carlsbad, CA, USA). v.v.

Chuột thuần chủng dòng BALB/c, 6-8 tuần tuổi, do phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Gây miễn dịch cho chuột bằng kháng nguyên cộng hợp Globo H-KLH

Phương pháp gây miễn dịch được thực hiện theo Liddell & Cryer (1991) có điều chỉnh.Theo đó, 24 chuột BALB/c, có khối lượng 20 ± 2g, được chia làm 4 lô (6 con/lô) được sử dụng để gây miễn dịch với kháng nguyên Globo H-KLH ở các mức liều 1µg, 2 µg, 4 µg/con/lần và lô đối chứng không gây miễn dịch (tiêm BSA). Kháng nguyên Globo H-KLH (nồng độ 1 mg/ml) được trộn đều với tá chất CFA (Completed Freund's adjuvant) theo tỉ lệ 1:1 cho lần tiêm đầu và ,trộn với tá chất IFA (Incompleted Freund's adjuvant) theo tỉ lệ 1:1 cho các lần tiêm nhắc lại. Đường tiêm dưới da, tiêm 4 lần, tiêm nhắc lại 10 ngày/lần. Tiêm kháng nguyên lần cuối không sử dụng tá chất. Máu chuột thí nghiệm được lấy, thu huyết thanh để kiểm tra khả năng đáp ứng miễn dịch sau 3 ngày tiêm miễn dịch lần cuối.

Phương pháp gây u cho chuột bằng dòng tế bào LLC và đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch kháng u của kháng nguyên Globo H-KLH

Phương pháp gây u cho chuột bằng dòng tế bào LLC được tiến hành theo phương pháp của Thảo *et al.*, (2008), cụ thể như sau: Tế bào LLC được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBSvà 1% kháng sinh ở 37°C và 5% CO_2. Khi tế bào phát triển tốt thì tiến hành thu tế bào và tiêm vào bắp đùi chuột nồng độ $2x10^6$ tế bào/con cho 24 con chuột BALB/c (tương ứng với 4 lô thí nghiệm) đã được gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H-KLH hoặc không được gây miễn dịch (tiêm BSA). Tế bào LLC được tiêm vào bắp đùi chuột tại thời điểm sau 7 ngày tiêm miễn dịch lần cuối cùng.

Phương pháp đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch chống khối u phát triển của kháng nguyên Globo H-KLH

Sau khi gây miễn dịch và tiêm tế bào LLC, chuột được theo dõi hàng ngày, xác định số chuột chết và cân khối lượng, đo kích thước khối u sơ cấp tại vị trí tiêm 5 ngày/lần theo phương pháp của Ilgo *et al.*, (1991), Lee *et al.*, (2006) để xác định khả năng đáp ứng miễn dịch kháng u của kháng nguyên Globo H-KLH. Thể tích khối u được tính theo công thức của Ilgo (1991): $V = a \times b^2/2$; Trong đó: V là thể tích khối u; a là chiều dài khối u; b là đường kính khối u.

Sau 35 ngày, toàn bộ chuột còn sống sẽ được thu nhận máu toàn phần để xác định một số chỉ số huyết học, giải phẫu và quan sát trực quan các cơ quan nội tạng. Trong trường hợp có khối u di căn vào cơ quan nội tạng thì sẽ cố định mẫu trong dung dịch formaldehyde 10% để làm tiêu bản bệnh học tế bào.

Phương pháp phân tích số liệu

Các số liệu được xử lí trên Excel, thuật toán thống kê Student's t-test và phần mềm thống kê GraphPad Prism 4.0.

KẾT QUẢ

Sự thay đổi khối lượng của chuột qua các thời điểm

Các chuột thí nghiệm sau khi gây miễn dịch và phân lô được xác định về mặt khối lượng. Tiếp theo, từng lô thí nghiệm sẽ được giám sát chặt chẽ về mặt khối lượng qua các thời điểm ngày 0 (ngày tiêm tế bào ung thư LLC) và theo chu kì 5 ngày/lần cho đến ngày thứ 35. Kết quả về sự thay đổi này được trình bày ở bảng 1.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy chuột có khối lượng nhỏ nhất ở thời điểm bắt đầu gây miễn dịch. Sau thời gian gây miễn dịch và tiêm tế bào LLC, chuột đã có sự tăng khối lượng đáng kể so với thời điểm bắt đầu thí nghiệm. Sau khi tiêm tế bào LLC, chuột thí nghiệm ở các lô đều có sự tăng khối lượng giữa các lần cân. Tuy nhiên, không có sự sai khác thống kê giữa các lô tại cùng thời điểm cân. Như vậy, chỉ số về khối lượng đã không cho thấy sự sai khác đáng kể giữa các lô nghiên cứu.Tuy nhiên, chỉ số này chỉ mang tính tham khảo vì trong thực tế, chuột bị gây u và thể tích cũng như khối lượng khối u tăng nhanh nên đã ảnh hưởng tới khối lượng chuột được nghiên cứu.

Khả năng bảo vệ và kéo dài tuổi thọ cho chuột bị u của Globo H-KLH

Kết quả ở bảng 2 cho thấy chuột được gây miễn dịch bằng Globo H-KLH ở các mức liều đều bảo toàn số lượng, đạt tỉ lệ sống sót là 100% tại thời điểm kết thúc thí nghiệm là ngày thứ 35. Trong khi đó, ở lô không được gây miễn dịch, chuột đã bị chết 2 con, chiếm tỉ lệ 33,33%. Điều này phần nào cho thấy các nhóm tiêm chủng với Globo H-KLH có khả năng sống sót cao hơn so với nhóm đối chứng.

Bảng 1. Khối lượng chuột thí nghiệm tại thời điểm tiêm và sau khi tiêm tế bào LLC (g/con).

Lô	Bắt đầu gây miễn dịch	Ngày tiêm LLC (ngày 0)	Ngày thứ 5	Ngày thứ 10	Ngày thứ 15	Ngày thứ 20	Ngày thứ 25	Ngày thứ 30	Ngày thứ 35
Đối chứng	20,25 ± 0,91	28,12 ± 1,26	28,50 ± 1,68	29,50 ± 1,15	30,03 ± 1,03	29,04 ± 1,86	30,01 ± 1,91	30,52 ± 1,74	31,06 ± 2,15
Globo H-KLH: 1 µg/ml	20,60 ±1,10	28,00 ± 0,97	28,50 ± 1,58	29,00 ± 1,76	29,35 ± 1,37	29,78 ± 1,12	30,12 ± 1,84	30,45 ± 2,12	31,15 ± 2,07
Globo H-KLH: 2 µg/ml	20,50 ± 0,95	28,06 ± 1,38	28,52 ± 0,90	28,90 ± 1,08	29,40 ± 1,18	29,88 ± 1,12	30,28 ± 1,23	30,51 ± 1,26	30,90 ± 1,04
Globo H-KLH: 4 µg/ml	20,37 ± 1,06	28,24 ± 1,05	28,75 ± 1,19	29,35 ± 1,08	29,25 ± 1,18	29,65 ± 1,12	29,92 ± 1,23	30,06 ± 1,26	30,12 ± 1,04

Bảng 2 Số chuột bị chết (con) của các lô thí nghiệm.

Lô	Bắt đầu gây miễn dịch	Ngày tiêm LLC	20 ngày tiêm LLC	30 ngày tiêm LLC	35 ngày tiêm LLC
Đối chứng	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6
Globo H-KLH: 1 µg/ml	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Globo H-KLH: 2 µg/ml	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Globo H-KLH: 4 µg/ml	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Đáp ứng miễn dịch chống lại sự hình thành, phát triển khối u của Globo H

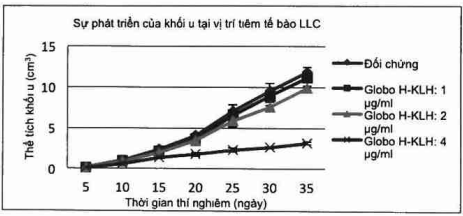
Nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã chứng minh rằng Globo H đã cộng hợp thành công với KLH và đạt hiệu suất cộng hợp khá cao. Đồng thời, báo cáo này cũng đã trình bày về khả năng gây đáp ứng miễn dịch của tổ hợp Globo H-KLH. Do đó, chúng tôi có thể nhận định rằng tổ hợp Globo H-KLH đã kích thích hệ miễn dịch của cơ thể tạo ra kháng thể. Trong nghiên cứu này, chúng tôi gây miễn dịch cho 3 lô chuột bằng kháng nguyên Globo H-KLH và một lô đối chứng không gây miễn dịch (chỉ tiêm BSA). Sau quá trình gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H-KLH, chuột thí nghiệm được tiêm tế bào LLC, sau đó theo dõi sự phát triển của

khối u và đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch chống lại sự hình thành và phát triển của khối u. Kết quả được trình bày ở hình 1.

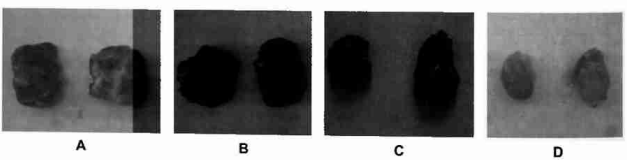
Như vậy, sau 35 ngày nghiên cứu, về mặt thể tích khối u, những con chuột đã được gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H-KLH ở các liều 1µg, 2 µg/con/lần có thể tích khối u khá cao (11,125 và 9,856 cm^3, một cách tương ứng) và chưa cho thấy rõ khả chống lại sự hình thành và phát triển khối u so với nhóm đối chứng không được gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H-KLH.

Tuy nhiên, nhóm gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H-KLH liều 4 µg/con/lần lại cho kết quả rất khả quan và thấy rõ hiệu quả của đáp ứng miễn dịch chống lại sự phát triển của khối u cũng như khả năng diệt tế bào ung thư với thể tích khối u chỉ còn là 3,172 cm^3. Ở giai đoạn 20 ngày, một số chuột có thể tích khối u bắt đầu giảm dần và đến ngày thứ 35 thì 4 trên tổng số 6 chuột không còn u (chiếm tỷ lệ 66,67%). Các chuột còn lại (2 con) còn lại thì khối u vẫn tồn tại nhưng tốc độ phát triển chậm hơn hẳn so với nhóm đối chứng ($p<0,05$).

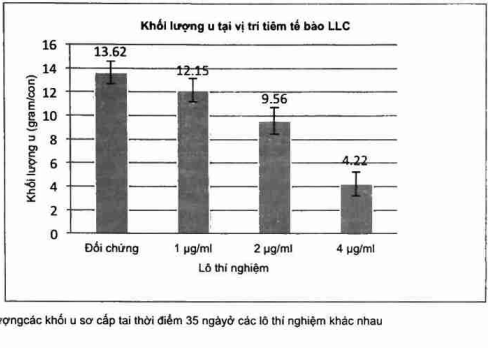
Vào ngày thứ 35, toàn bộ chuột còn sống ở các lô thí nghiệm được lấy máu, thu huyết thanh để phân tích các chỉ tiêu huyết học; phân lập khối u sơ cấp ở đùi nhằm xác định khối lượng (Hình 2); giải phẫu để kiểm tra trực quan nội tạng và các hiện tượng di căn (trong trường hợp có khối u ở các nội quan thì sẽ tiến hành cố định mẫu và làm tiêu bản tế bào). Kết quả về khối lượng khối u sơ cấp phân lập tại vị trí tiêm tế bào LLC (Hình 3) cho thấy chỉ số này ở lô được gây miễn dịch bằng GloboH-KLH liều 1µg/con/lần không có sự sai khác so với đối chứng. Lô được gây miễn dịch bằng GloboH-KLH liều 2 µg/con/lần có sự sai khác so với đối chứng. Đặc biệt, lô được gây miễn dịch bằng GloboH-KLH liều 4 µg/con/lần có khối lượng nhỏ nhất, có sự sai khác rõ rệt so với lô đối chứng và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).



Hình 1 Sự phát triển của khối u tại vị trí tiêm LLC.



Hình 2. Hình ảnh khối u tách ra tại vị trí tiêm tế bào LLC ở các lô thí nghiệm (A) Chuột ở lô đối chứng không được gây miễn dịch; (B) Chuột ở lô gây miễn dịch bằng Globo H-KLH liều 1µg/ml ; (C) Chuột ở lô đối chứng không được gây miễn dịch; (B) Chuột ở lô gây miễn dịch bằng Globo H-KLH liều 2µg/ml; (D) Chuột ở lô đối chứng không được gây miễn dịch; (B) Chuột ở lô gây miễn dịch bằng Globo H-KLH liều 4µg/ml.



Hình 3. Khối lượngcác khối u sơ cấp tại thời điểm 35 ngàyở các lô thí nghiệm khác nhau

Bên cạnh đó, các chỉ số về huyết học đã cho thấy sự sai khác rõ rệt và có ý nghĩa thống kê giữa lô được gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H-KLH liều 4 µg/ml với lô đối chứng. Cụ thể là các chỉ số huyết học của chuột ở lô này đã được phục hồi đáng kể và gần bằng so với lô chuột đối chứng sinh lí là chuột khỏe mạnh (Bảng 3) ($p>0,05$). Ở các lô khác được gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H-KLH liều thấp hơn, các chỉ số huyết học có sự sai khác so với lô đối chứng ($p<0,05$). Điều này cho thấy, khi chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H-KLH liều 4 µg/ml đã khiến các chỉ số huyết học được điều hòa theo hướng tích cực và ổn định

Theo một số báo cáo của các tác giả khác thì đa phần là các nghiên cứu sử dụng Globo H cộng hợp KLH nhưng bổ sung chất hỗ trợ miễn dịch QS-21 (Gilewski *et al*, 2001) hay là tổ hợp của Globo H và một số glycan khác như GM2, STN, TF và Tn cộng hợp với KLH (Zhu *et al*., 2009). Các nghiên cứu này được thực hiện trên người và cho những kết quả rất tích cực. Trong nghiên cứu của chúng tôi, cộng hợp Globo H-KLH được tiêm và gây miễn dịch cho chuột như là một kháng nguyên duy nhất và cũng cho thấy kết quả khả quan đem đến triển vọng trong việc tạo ra vắc xin phòng ung thư trong tương lai.

Bảng 3. Tác dụng của Globo H-KLH đến một số chỉ tiêu huyết học.

Lô Thí nghiệm	Hồng cầu ($x10^{12}$/L)	Bạch cầu ($x10^{9}$/L)	Tiểu cầu ($x10^{12}$/L)	Hemoglobin (g/L)
Đối chứng bệnh lí	3,92 ± 1,13	35,02 ± 1,23	542,00± 5,81	6,42 ± 0,68
Globo H-KLH: 1 µg/ml	4,15 ± 1,02	31,13 ± 1,63	539,00 ± 6,50	6,95 ± 0,98
Globo H-KLH: 2 µg/ml	6,26 ± 1,13	26,74 ± 1,25	541,00 ± 7,78	8,80 ± 1,40
Globo H-KLH: 4 µg/ml	7,39 ± 1,10	19,63 ± 1,14	538,00 ± 6,56	11,52 ± 1,27
Đối chứng sinh lí	9,24 ± 0,68	9,57 ± 1,13	548,38 ± 6,85	15,01 ± 0,81

THẢO LUẬN

Tổ hợp Globo H-KLH được sử dụng như một liệu pháp vắc xin trong điều trị ung thư vú và ung thư tuyến tiền liệt (Gilewski *et al*, 2001; Slovin SF *et al*., 1999) và kích thích cơ thể sản sinh kháng thể chống lại Globo H. Trong nghiên cứu này, chúng tôi muốn đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch chống lại sự hình thành khối u trên chuột, từ đó tạo cơ sở quan trọng cho việc tạo vắc xin phòng ung thư

trong tương lai ở Việt Nam. Đây là một hướng nghiên cứu mới và kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc sử dụng Globo H-KLH làm vắc xin ung thư là có cơ sở khoa học. Nghiên cứu này lần đầu tiên được thực hiện tại Việt Nam và khác so với các nghiên cứu khác trên thế giới là dùng đơn thuần tổ hợp này hoặc kết hợp với các chất bổ trợ khác để chữa cho bệnh nhân ung thư (Gilewski *et al.*, 2001; Slovin SF *et al*., 1999).

KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy Globo H – KLH gây đáp ứng miễn dịch tốt trên chuột thuần chủng dòng BALB/c. Với mức liều gây miễn dịch thử nghiệm là 4 µg/con/lần, 4 lần, 10 ngày/lần, việc gây miễn dịch cho chuột đã cho thấy khả năng: (i) kéo dài tuổi thọ cho chuột bị u; (ii) chống lại sự phát triển, tăng sinh của khối u ung thư với hiệu quả đạt 66,67%, (iii) điều hòa một số chỉ số huyết học quan trọng theo chiều hướng tích cực và ổn định.

Lời cảm ơn: *Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số: C13-08.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Gilewski T, Ragupathi G, Bhuta S, Williams LJ, Musselli C, Zhang G, Bencsath KP, Panageas KS, Chin J, Hudis CA, Norton L, Houghton AL, Livingston PO, Danishefsky SJ (2001) Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: A phase I trial. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3270-3275.

Haltiwanger RS, Lowe JB (2004) Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 73: 491-537.

Igo M, Hoshi A, Kadosawa H, Fujigaki M (1991) Antitumor Activity and Metabolism of a New Anthracycline-containing Fluorine (ME2303) in Lewis Lung Carcinoma-bearing Mice. *Jpn J Cancer Res* 82: 1317-1321

Lee EO, Lee HJ, Hwang HS, Ahn KS, Chae C, Kang KS, Lu J, Kim SH (2006) Potent inhibition of Lewis lung cancer growth by heyneanol A from the roots of *Vitis amurensis* through apoptotic and anti-angiogenic activities. *Carcinogenesis* 27: 2059-2069

Livingston PO (1995) Augmenting the immunogenicity of carbohydrate tumor antigens. *Semin Cancer Biol* 6: 357-366.

Slovin SF, Ragupathi G, Adluri S, Ungers G, Terry K, Kim S, Spassova M, Bornmann WG, Fazzari M, Dantis L, Olkiewicz K, Lloyd KO, Livingston PO, Danishefsky SJ, Scher HI (1999) Carbohydrate vaccines in cancer: Immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5710-5715.

Thảo DT, Nga NT, Trang NT, Cúc NT, Phương DT (2008) Gây u thực nghiệm trên chuột bằng dòng tế bào ung thư Lewis Lung Carcinoma. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6: 619-624.

Thảo DT, Phương DT, Trang NT, Cúc NT, Nga NT, Thắng NT (2013) Nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch của cộng hợp GLOBO H-KLH trên chuột thuần chủng dòng BALB/c. *Proceedings của Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc* 2013, Tập 1: 719-723.

Zhu J, Wan Q, Lee D, Yang G, Spassova MK, Querfelli O, Ragupathi G, Damani P, Livingston PO, Danishefsky SJ (2009) From synthesis to biologics: Preclinical data on a chemistry derived anticancer vaccine. *J Am Chem Soc* 131: 9298-9303.

IMMUNOLOGICAL RESPONSE AGAINST TUMORS BY USING GLOBO H-KLH ANTIGEN VACCINATED ON MICE

Nguyen Thi Cuc, Do Thi Thao*, Nguyen Thi Nga, Do Thi Phuong, Nguyen Thi Trang

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Globo H molecules, which was first isolated from breast cancer MCF-7 cells, are glycan with chemical structure as hexasaccharide. Globo H apprears as an important cancer antigen. Based on its ability to cause immune response, Globo H becomes a promissing target for anti-cancer vaccine researches and development. In order to identify the potential immunological response against tumors of Globo H, in our study, those

* *Author for corresspondence:* Tel: *+84-4-38361774*; E-mail: *thaodo@ibt.ac.vn*

molecules were firstly conjugated with Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). As the next step, the conjugated Globo H-KLH complex were then vaccinated to albino BALB/c mice at different concentrations which were 1, 2 and 4 µg/mouse/times by exactly following the immunized protocol of Liddell & Cryer (1991) with minor modification. As soon as the immunized process had been completed, the vaccinated mice were promptly tumorized with Lewis Lung Carcinoma (LLC) cells for cancer developed model. By the time of ending experiment at the day 35, all immunized mice with Globo H-KLH at different concentrations survived while the negative control group had resulted with 2 dead mice (account for 33.33%). The results also exhibited that mice which were immunized with 4 µg/mouse/times of Globo H-KLH antigen could prevent tumor growth up to 66.67%, together with 100% of mice survival. The results again indicated the stabilization of haematological parameters of immunized mice in comparision with those of the controls. Although showing as the initial results, the study proves the positive and promising vaccinated activities of Globo H in terms of immunotherapy for cancer prevention in the future.

Keywords: *anti-cancer vaccine, BALB/c mice, GloboH-KLH antigen, immune response, LLC cells*