

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG GÂY ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA CỘNG HỢP GLOBO H – KLH TRÊN CHUỘT THUẦN CHỦNG DÒNG BALB/c

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

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

TÓM TẮT

Các phân tử glycan như glycoprotein (GP), glycosphingolipid (GSL) và proteoglycan của hệ glycome đóng một vai trò rất quan trọng đối với các cơ chế sinh học nội và ngoại bào. Một vài ví dụ về vai trò của các glycan có thể thấy rõ như trong sự tương tác giữa tế bào-tế bào, truyền và điều chỉnh tín hiệu v.v. Trong các nghiên cứu về glycan liên quan đến ung thư, kháng nguyên Globo H (Fuca1 → 2 Galβ1 → 3 GalNAcβ1 → 3 Galα1 → 4 Galβ1 → 4 GLC) được xem như là một mục tiêu khá thú vị để phát triển vắc xin ung thư. Tuy nhiên, do cấu trúc hóa học của mình, Globo H được xem là có tính kháng nguyên thấp. Vì vậy, xu hướng phổ biến hiện nay là cộng hợp kháng nguyên này với các protein mang khác nhau để làm tăng khả năng kích thích miễn dịch của Globo H. Trong nghiên cứu này, Globo H đã được cộng hợp thành công với Keyhole limpet hemocyanin (KLH) ở nồng độ 2000 ng/μl nhờ bộ kit Inject Mariculture KLH của Thermo Scientific. Tiếp theo, cộng hợp Globo H – KLH đã được kiểm chứng khả năng kích thích miễn dịch trên chuột ở các nồng độ khác nhau là 0,25; 0,50; 1; 2 và 4 μg/con/lần. Việc kiểm chứng hiệu quả gây đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên cộng hợp Globo H – KLH đã được thực hiện nhờ phương pháp ELISA và dot-blot. Kết quả cho thấy cộng hợp kháng nguyên Globo H – KLH có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt trên chuột thí nghiệm ở các mức liều khác nhau. Theo đó, liều 4 μg/con/lần cho đáp ứng miễn dịch tốt nhất khi thử nghiệm trên chuột thuần chủng BALB/c.

Từ khóa: BALB/c, ELISA, GloboH, Keyhole limpet hemocyanin – KLH, dot-blot.

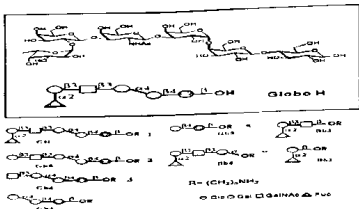
MỞ ĐẦU

Ung thư là căn bệnh gây tử vong cao gây ra bởi đặc tính di căn mạnh dẫn đến rất nhiều khó khăn trong việc chữa trị. Trong các hướng nghiên cứu tìm kiếm biện pháp phòng chống ung thư, tạo vaccine được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm. Nhiều nghiên cứu đã tập trung vào các phân tử trên màng của các tế bào gốc ung thư hoặc tế bào ung thư nhưng không xuất hiện ở các tế bào bình thường. Các phân tử glycan của tế bào như glycoprotein (GP), glycosphingolipid (GSL) và proteoglycan được gọi chung là glycome đóng vai trò rất quan trọng đối với các hoạt động sinh học nội và ngoại bào. Một số ví dụ như quá trình tự định danh tế bào, quá trình gắn kết tế bào, tương tác giữa các tế bào với nhau và truyền tín hiệu (Haltiwanger và Lowe, 2004) v.v...

Sự hình thành mối liên kết giữa phân tử đường với các amino acid là một bước quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp phân tử glycoprotein từ các đơn vị carbohydrate. Đây cũng là một khâu quan trọng trong một loạt các bước phức tạp của quá trình hợp dịch mã dẫn tới sự hình thành các phân tử protein gắn kết chuỗi oligosaccharide với chức năng sinh học cực kì đa dạng. Phản ứng sinh học này xảy ra trong toàn bộ sinh giới từ sinh vật cổ sinh cho tới các vi sinh vật và giới sinh vật nhân chuẩn. Các phản ứng gắn kết này còn được gọi chung là phản ứng glycosyl hóa (Kanoelani và Mahal, 2007; Lowe, 2002). Bên cạnh đó, đa phần các protein trên bề mặt tế bào đều được glycosyl hóa nên những thay đổi dù nhỏ cũng sẽ khiến cho hoạt động của tế bào bị biến đổi theo. Sự chuyển dạng từ tế bào thường thành tế bào ung thư kèm theo sự thay đổi trong quá trình glycosyl hóa ở các liên kết N- và O- với phân tử protein. Ví dụ như ở tế bào ung thư thì nhánh 1,6GlcNAc thuộc chuỗi N-glycans gắn với Asn-X-Ser/Thr thường xuất hiện nhiều hơn bình thường; trong khi dạng mucin-O- nối với các phân tử glycan gắn kết với Ser hoặc Thr thường bị giảm (Cazat A *et al.*, 2010; Kanoelani và Mahal, 2007). Đặc biệt, người ta cũng nhận thấy rằng các glycoprotein, glycolipid, proteoglycan bề mặt có liên quan rất chặt chẽ tới đặc tính di căn của tế bào ung thư. Hơn nữa, các glycoprotein còn tác động rất mạnh và liên quan chặt chẽ tới hoạt động của hệ miễn dịch. Ví dụ như kháng nguyên Sialyl-Tn antigen (Neu5Ac₂-6GalNAc-O-Ser/Thr) là một kháng nguyên carbohydrate dạng mucin đơn giản nhưng lại khiến cho các nhà nghiên cứu phải bỏ nhiều công sức để nghiên cứu.

Gần đây, một số phân tử liên quan đến khối u ở dạng glycolipid hay glycoprotein đã được xác định như: Tn-MUC, Globo H, GM2, GD2, GD3, fucosyl GM1, STN, Lewis Y, Tn, STN, TF. Mặc dù, vai trò của các phân tử này đối với hoạt động của các tế bào ung thư ác tính còn chưa được hiểu hết nhưng ý nghĩa của việc sử dụng chúng như các kháng nguyên kích thích đáp ứng miễn dịch cũng như sử dụng kháng thể để chống lại chính những phân tử này đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu. Trong các Glycophingolipids thì các nhà nghiên cứu đặc biệt quan tâm đến kháng nguyên Globo H. Globo H là một kháng nguyên liên quan đến khối u và là một trong những mục tiêu tiềm năng để sử dụng làm vaccine, kháng thể cũng như tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch (Chang *et al.*, 2008). Globo H (Fuca1 → 2 Galβ1 → 3 GalNAcβ1 → 3 Galα1 → 4 Galβ1 → 4 GLC) lần đầu tiên được phân lập và xác định vào năm 1984 bởi Bremer EG và cộng sự ở dòng tế bào ung thư vú MCF-7. Kháng nguyên Globo H có cấu trúc như trong Hình 1.

Bằng cách nhuộm với kháng thể đơn dòng MBr1 và VK -9 các nhà khoa học đã chứng minh được Globo H có biểu hiện cao trên một số các biểu mô ung thư ruột kết, buồng trứng, da dày, nội mạc tử cung, phổi, tuyến tiền liệt và ung thư vú. Globo H ít hoặc hầu như không biểu hiện ở tế bào mô thường, chỉ giới hạn một số tế bào mô thuộc vùng lumen, là vị trí mà hệ miễn dịch không thể tiếp cận được. Mặt khác, các nhà khoa học của Đài Loan cũng đã thấy rằng nồng độ kháng thể kháng Globo H ở các bệnh nhân ung thư cao hơn bình thường (Gilewski *et al.*, 2001). Vì vậy Globo H đã được sử dụng làm vaccine dựa trên các glycan đặc hiệu khối u. Vaccine dựa trên Globo H đã tạo ra phản ứng đáp ứng miễn dịch trên chuột và gây ra phản ứng miễn dịch tập trung ở các bệnh nhân ung thư (Wang *et al.*, 2000). Việc sử dụng kháng thể đơn dòng kháng Globo H đã được thử nghiệm trên nhiều bệnh ung thư khác nhau như ung thư tuyến tiền liệt, dạ dày, tụy, phổi, buồng trứng và ung thư ruột kết. Những phát hiện này làm cho Globo H trở thành một mục tiêu khá thú vị để phát triển vaccine ung thư (Wang *et al.*, 2000).



Hình 1. Cấu trúc kháng nguyên Globo H (<http://www.pnas.org/content/105/33/11661/figures-only>)

Trong báo cáo này, chúng tôi nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên Globo H-KLH trên chuột thuần chủng dòng BALB/c trước khi gây u thực nghiệm bằng dòng tế bào di căn mạnh Lewis Lung Carcinoma (LLC) (Đỗ Thị Thảo & cs. 2008). Dưới đây là những kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Globo H được mua từ hãng Carbosynth (Cat # OG10892) (Berkshire, RG20 6NE, UK); bộ kit Imject Mariculture KLH bao gồm KLH tinh sạch và được hoạt hóa trong đệm MES đi kèm với bộ kit cộng hợp EDC của hãng Thermo Scientific (Rockford, IL 60611, USA) và các hóa chất chuẩn khác được mua từ Promega, Sigma, Fisher v.v.

Chuột thuần chủng dòng BALB/c do phòng Thử nghiệm sinh học, viện Công nghệ sinh học, viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp. Chuột được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn và nước uống tự do.

Cộng hợp Globo H gắn keyhole limpet hemocyanin (KLH) bằng bộ kit Imject Mariculture KLH

Việc cộng hợp phân tử Globo-H với KLH được thực hiện nhờ bộ kit Imject Mariculture KLH của Thermo Scientific theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Quá trình thu nhận và tinh sạch cộng hợp Globo H-KLH cũng sử dụng thành phần có sẵn trong bộ kit Imject Mariculture KLH nói trên. Theo đó, Globo H được thực hiện cộng hợp với KLH ở một dãy nồng độ gồm 500, 1000, 1500, 2000 và 2500 µg/ml.

Gây miễn dịch cho chuột bằng kháng nguyên cộng hợp Globo H-KLH thử nghiệm các nồng độ khác nhau

Phương pháp gây miễn dịch được thực hiện theo Liddell và Cryer (1991) có bổ sung. Cụ thể là: chuột cái dòng BALB/c khỏe mạnh từ 6-8 tuần tuổi, khối lượng từ 18-20 gram được sử dụng để gây miễn dịch với kháng nguyên Globo H-KLH. Kháng nguyên các ở 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 với tá chất IFA (Incomplete Freund's adjuvant) theo tỉ lệ 1:1 cho lần tiêm nhắc lại. Kháng nguyên sau khi được trộn với tá chất sẽ được tiêm dưới da của chuột theo các mức liều như sau: 0,25; 0,50; 1; 2 và 4 µg/con/ lần. Lần tiêm nhắc lại được thực hiện vào 3-4 tuần sau lần tiêm đầu. Lần tiêm cuối cùng cho chuột được thực hiện 3 ngày trước khi thí nghiệm lấy tế bào lympho B. Việc lấy máu chuột thí nghiệm để kiểm tra khả năng đáp ứng miễn dịch được thực hiện ở tuần thứ 4 sau lần tiêm đầu tiên.

Đánh giá hiệu quả gây miễn dịch bằng phương pháp ELISA và Dot-blot

Phương pháp ELISA được thực hiện theo Liddell và Cryer (1991). Kháng nguyên Globo H được pha trong Carbonate coating buffer (100 µl/giếng) và ủ ban 1 giờ ở 37°C. Rửa bằng Washing buffer. Tiếp tục bổ sung 100 µl huyết thanh chuột đã gây miễn dịch ở các mức liều khác nhau vào từng giếng, ủ 1 giờ ở 37°C. Goat-Antimouse IgG conjugate HRP được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng Globo H. Thêm 100 µl/giếng cơ chất TMB và ủ 1 giờ ở 37°C. Đọc kết quả ELISA ở bước sóng 450 nm.

Phương pháp Dot-blot được thực hiện như sau: Ngâm màng nitrocellulose trong cồn 80% trong 10 phút và để khô ngoài không khí. Tiến hành vẽ một vòng tròn nhỏ đường kính ≤ 1 cm tại khu vực sẽ làm Dot-blot bằng bút chì và sử dụng pipet tích chuẩn nhỏ nhất để nhỏ 10 µl kháng nguyên Globo H ở nồng độ 100 µg/ml vào trung tâm của vòng tròn rồi ủ ở 37°C trong 5 phút. Tiếp theo, block màng đã phủ kháng nguyên ở trên bằng dung dịch 0,01M PBS pH 7,4 có 5% BSA trong 1 giờ ở 37°C. Rửa màng bằng dung dịch 0,01M PBS pH 7,4 ba lần, mỗi lần 10 phút. Ủ màng bằng kháng huyết thanh (10 µl) của chuột đã được gây miễn dịch bằng Globo H-KLH của các lô thí nghiệm khác nhau (các lô chuột được tiêm Globo H-KLH 0,25; 0,50; 1; 2 và 4 µg/con/lần) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa màng bằng dung dịch 0,01M PBS pH 7,4 ba lần, mỗi lần 10 phút. Quan sát kết quả thu được và chụp ảnh.

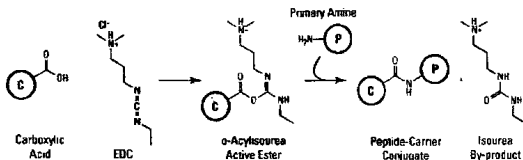
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cộng hợp Globo H với keyhole limpet hemocyanin (KLH) bằng bộ kit Scientific Imject Mariculture KLH

Bộ kit Thermo Scientific Imject Mariculture KLH đi kèm với bộ cộng hợp EDC bao gồm protein mang KLH đã tinh sạch và được hoạt hóa để có được hiệu quả cộng hợp cao với các kháng nguyên peptide khác nhau. KLH là phân tử protein mang kháng nguyên rất phổ biến, được sử dụng cho các nghiên cứu gây miễn dịch và sản xuất kháng thể. KLH được pha trong đệm phosphate và hoạt hóa để cộng hợp với các bản kháng nguyên hapten thông qua liên kết amine-NHS ester hoặc liên kết chéo glutaraldehyde. Trong trường hợp KLH được pha trong đệm MES thì sự cộng hợp kháng nguyên sẽ được thực hiện bằng liên kết thông qua phản ứng chéo carboxyl-carbodiimide hay gọi tắt là EDC. Bộ kit

Inject Mariculture KLH của Thermo Scientific sẽ cộng hợp KLH và kháng nguyên Globo H của chúng tôi thông qua liên kết EDC.

Sau khi thực hiện đầy đủ các bước cộng hợp, tinh sạch theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Scientific) để loại bỏ các phần tử Globo H và KLH tự do (không cộng hợp), chúng tôi đã thu được các sản phẩm cộng hợp Globo H – KLH tinh sạch. Bên cạnh đó, lượng Globo H tự do, không cộng hợp được thu lại nhờ muối hóa cột tinh sạch (thành phần nằm trong bộ kit nói trên). Nhờ vậy, chúng tôi xác định được lượng Globo H đã cộng hợp thành công nhằm tính toán hiệu suất cộng hợp. Lượng Globo H – KLH tự do thu lại sau tinh sạch được chúng tôi sử dụng bộ Pierce BCA Protein Assay Kit của Thermo Scientific để định lượng.



Hình 2. Phản ứng EDC để cộng hợp KLH với kháng nguyên mong muốn (<http://www.piercenet.com/browse.cfm?productId=01010102>)

Sau khi có đường chuẩn (dựa vào giá trị mật độ quang học và hàm lượng của BSA chuẩn), một phương trình chuẩn đã được lập ra bằng phần mềm EXCEL là $(y = 0,9835x - 0,1543)$ với $r^2 = 0,9993$ cho thấy độ tin cậy của số liệu. Từ giá trị OD thu được từ các mẫu và sử dụng phương trình chuẩn ở trên, hàm lượng cộng hợp Globo H – KLH được tính toán. Dựa vào lượng Globo H đưa vào ban đầu và lượng Globo H – KLH tự do thu được sau tinh sạch, chúng tôi đã tính toán hiệu suất cộng hợp cho từng nồng độ thí nghiệm. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

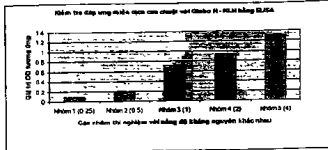
Bảng 1. Kết quả định lượng Globo H – KLH sau quá trình cộng hợp và tinh sạch

Mẫu Globo H cộng hợp ở các nồng độ	Giá trị OD	Hàm lượng Globo H tự do/cộng hợp (mg/ml)	Hiệu suất cộng hợp (%)	Mẫu chuẩn BSA	Giá trị OD	Hàm lượng BSA (mg/ml)
Globo H (500 ng/μl)	0.391	0.234/0.266	53.1	BSA 0.125	0.272	0.125
Globo H (1000 ng/μl)	0.625	0.468/0.532	53.2	BSA 0.25	0.419	0.250
Globo H (1500 ng/μl)	0.947	0.790/0.710	58.6	BSA 0.5	0.675	0.500
Globo H (2000 ng/μl)	0.909	0.752/1.248	62.4	BSA 1	1.168	1.000
Globo H (2500 ng/μl)	1.155	0.998/1.502	60.1			

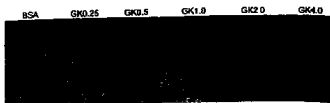
Kết quả trên cho thấy việc cộng hợp đã thành công và lượng Globo H-KLH thu được sau tinh sạch là khá lớn. Đồng thời việc cộng hợp đạt hiệu suất cao nhất ở nồng độ Globo H là 2000 ng/μl (đã cộng hợp 1.248 mg/ml tương ứng 62,4%), tiếp theo là ở nồng độ 2500 ng/μl (đã cộng hợp 1.502 mg/ml tương ứng 60,1%). Hiệu suất cộng hợp thấp nhất ở nồng độ 500 ng/μl (đã cộng hợp 0.266 mg/ml tương ứng 53,1%). Kết quả này phù hợp với khuyến cáo của nhà sản xuất kit cộng hợp (Thermo Scientific). Theo đó, nồng độ tối ưu của kháng nguyên sử dụng cho cộng hợp là 2 mg kháng nguyên trong 450 μl đệm cộng hợp tương ứng với 2222 ng/μl. Như vậy, với kết quả từ thực nghiệm, chúng tôi nhận thấy Globo H sẽ được cộng hợp thành công với KLH và đạt hiệu suất tối ưu ở nồng độ Globo H 2000 ng/μl khi sử dụng bộ kit Inject Mariculture KLH của Thermo Scientific.

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

Sau quá trình gây miễn dịch bằng kháng nguyên Globo H – KLH như đã trình bày ở phần phương pháp, các chuột thí nghiệm được lấy máu ở mắt để thu nhận kháng huyết thanh nhằm kiểm tra khả năng đáp ứng miễn dịch của chúng với kháng nguyên này. Kết quả kiểm tra bằng phương pháp ELISA (Hình 3) cho thấy các chuột đều có đáp ứng miễn dịch rất tốt với Globo H. Kết quả đo mật độ quang OD cho thấy chuột ở lô tiêm kháng nguyên nồng độ 4 μg/con/lần cho đáp ứng miễn dịch tốt nhất tương ứng với giá trị OD cao nhất (OD = 1,323). Liều 0,25 và 0,5 μg/con/lần cho giá trị OD thấp nhất và gần như không cho thấy có đáp ứng miễn dịch. Các mức liều còn lại 1 và 2 μg/con/lần cho thấy đáp ứng miễn dịch trung bình. Kết quả này giúp chúng tôi xác định được liều hiệu quả để tạo ra đáp ứng miễn dịch trên chuột của cộng hợp kháng nguyên Globo H – KLH. Đồng thời, kết quả của chúng tôi cũng cho thấy sự phù hợp với công bố của một số tác giả khác trên thế giới. Vì dụ như Chang và đồng tác giả (2008) đã nghiên cứu và nhận thấy liều kháng nguyên bắt đầu cho thấy khả năng gây đáp ứng miễn dịch của Globo H-KLH là 0,6 μg/con/lần.



Hình 3. Kết quả kiểm tra khả năng gây đáp ứng miễn dịch của Globo H- KLH bằng phản ứng ELISA



Hình 4. Kết quả kiểm tra khả năng gây đáp ứng miễn dịch của Globo H- KLH bằng kĩ thuật Dot-blot

Ngoài ra, chúng tôi cũng tiến hành phản ứng dot-blot để kiểm chứng khả năng bắt cặp của kháng thể trong kháng huyết thanh chuột với kháng nguyên Globo H - KLH (Hình 4). Với sự xuất hiện rõ ràng của chấm dot trên màng nitrocellulose ở tất cả các giếng thí nghiệm tương ứng với các mẫu huyết thanh (của các nồng độ kháng nguyên tiêm vào chuột khác nhau), chúng tôi khẳng định khả năng gây đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên Globo H - KLH trên chuột thuần chủng đồng BALB/c. Sự đậm nhạt của các dot cũng cho thấy đáp ứng miễn dịch khác nhau của các chuột với các liều tiêm kháng nguyên tương ứng. Hình ảnh cho thấy dot số 5 là đậm nhất tương ứng với liều tiêm kháng nguyên nồng độ 4 µg/con/lần. Tương tự, dot số 1 và số 2 mờ cho thấy đáp ứng miễn dịch thấp hơn của chuột tiêm kháng nguyên liều 0,25 và 0,5 µg/con/lần. Và dot số 3, 4 có độ đậm trung bình tương ứng với liều kháng nguyên 1 và 2 µg/con/lần. Như vậy, kết quả thu được từ thí nghiệm dot-blot đã cho thấy sự phù hợp với những kết quả chúng tôi thu được từ thí nghiệm ELISA.

Hiện nay, kháng nguyên Globo H - KLH đang được Viện Nghiên cứu Ung thư quốc gia của Mỹ thử nghiệm lâm sàng pha 2 dưới dạng vaccine chống ung thư vú di căn và cho những kết quả khả quan. Globo H có khả năng kích thích các tế bào lympho T độc nhận dạng và chống lại các tế bào khối u biểu hiện Globo H. Tuy nhiên, để tăng cường khả năng gây đáp ứng miễn dịch của cộng hợp này, một số kháng nguyên như Lewis (Y) và Tn được sử dụng cùng lúc để tăng hiệu quả đáp ứng miễn dịch (Ingale *et al.*, 2007), hay GD2L, GD3L, Globo H, Fucosyl GM1, và N-Propionylated Polysialic Acid (Viện nghiên cứu ung thư quốc gia Mỹ). Như vậy, tuy chỉ sử dụng Globo H - KLH nhưng những kết quả ban đầu của chúng tôi cho thấy cộng hợp Globo H - KLH này có khả năng gây đáp ứng miễn dịch khá tốt trên chuột thuần chủng BALB/c. Với kết quả này, chúng tôi sẽ có cơ sở để tiến hành những thử nghiệm tiếp theo là gây u thực nghiệm trên những chuột đã được tiêm Globo H - KLH để kiểm chứng khả năng chống lại sự hình thành khối u hay nói cách khác là hiệu ứng vaccine của Globo H.

KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy Globo H sẽ được cộng hợp thành công với KLH và đạt hiệu suất tốt nhất ở nồng độ Globo H 2000 ng/µl khi sử dụng bộ kit Inject Mariculture KLH của Thermo Scientific. Đồng thời khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên chuột thuần chủng BALB/c của cộng hợp Globo H - KLH rất tốt với mức liều tiêm tương ứng là 4 µg/con/lần. Kết quả này cho phép chúng tôi tiến hành những thử nghiệm tiếp theo là gây u thực nghiệm trên những chuột đã được gây miễn dịch với Globo H - KLH để kiểm chứng khả năng chống lại sự hình thành khối u hay nói cách khác là kiểm chứng hiệu ứng vaccine của Globo H.

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 C13-03

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bremer EG, Lavery SB, Sonnino S, Ghidoni R, Canevari S, Kannagi R, Hakomori S (1984). Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the monoclonal antibody MBR1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. *J Biol Chem*: 259 14773 - 14777.
- Cazet A, Julien S, Mane Bobowski M, Krzawinski-Recchi MA, Harduin-Lepers A, Groux-Degroote S, Delannoy P (2010). Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydr Res* 345: 1377-1383.
- Chang WW, Lee CH, Lee P, Lin J, Hsu CW, Hung JT, Lin JJ, Yu JC, Shao LE, Yu J, Wong CH, Yu AL (2008). Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (44):17206-72.
- Đỗ Thị Thảo, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Trang, Nguyễn Thị Cúc, Đỗ Thị Phương (2008). Gây u thực nghiệm trên chuột bằng dòng tế bào ung thư Lewis Lung Carcinoma. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4A): 619-624.
- Glewski T, Ragupathi G, Bhatta S, Williams LJ, Musselli C, Zhang G, Bencsath KP, Panageas KS, Chin J, Hudis CA, Norton L, Houghton A L, 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(6): 3270-3275
- Hallwanger RS, Lowe JB (2004) Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 73:491-537
- Ingale S, Woffert MA, Gaekwad J, Buskas T, Boons GJ (2007) Robust immune responses elicited by a fully synthetic three-component vaccine. *Nat Chem Biol* 3(10): 663-667.
- Jeon I, Iyer K, Danishefsky SJ (2009) A Practical Total Synthesis of Globo-H for Use in anticancer Vaccines. *J Org Chem* 74(21): 8452-

8455.

Kanoelani TP, Mahal LK (2007). Deciphering the glyco-code, the complexity and analytical challenges of glycomics. *Curr Opin Chem Biol* 11: 300-305.

Liddell EJ, Cryer A (1991). A practical guide to monoclonal antibodies. *John Wiley & Sons*.

Lowie JB (2002). Glycosylation in the control of selectin counterreceptor structure and function. *Immunol Rev* 186: 19-36.

Wang ZG, Williams LJ, Zhang XF, Zatorski A, Kudryashov V, Ragupathi G, Spassova M, Bormmann W, Slovini SF, Scheri HI, Livingston PO, Lloyd KO, Danishefsky SJ (2000). Polyclonal antibodies from patients immunized with a globo H-keyhole limpet hemocyanin vaccine: Isolation, quantification, and characterization of immune responses by using totally synthetic immobilized tumor antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(6): 2719-2724

GLOBO H-KLH CONJUGATE EXHIBITED HIGHLY EFFECTIVE IMMUNOGENIC ACTIVITY IN BALB/C MICE

Thao Thi Do, Phuong Thi Do, Trang Thi Nguyen, Cuc Thi Nguyen, Nga Thi Nguyen, Thang Trung Nguyen

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The glycans such as glycoprotein (GP), glycosphingolipid (GSL) and proteoglycan are termed as glycome which play an important role toward internal and external cellular mechanisms. Several examples are cell-cell interaction, signal transduction and regulation, etc. Based on the recently glycomics studies which are related to cancer, Globo H (Fucose1 → 2 Galβ1 → 3 GalNAcβ1 → 3 Galα1 → 4 Galβ1 → 4 GLC) showed as a promising target for anticancerous vaccine development. However, Globo H is considered as very low antigenic capacity due to its chemical structure. Thus, Globo H is now trended to be conjugated with other carrier proteins in order to improve its highly effective immunogen. In our study, Globo H is successfully conjugated with Keyhole limpet hemocyanin (KLH) at 2000 ng/μl by employing Inject Mariculture KLH kit of Thermo Scientific. Also, Globo H - KLH conjugated antigen was tested the immunogenic activity at the different dosages which were 0,25; 0,50; 1; 2 and 4 μg/mouse at one time. The immune response of mice caused of Globo H - KLH induction was studied by ELISA and dot-blot methods. The obtained results exhibited a highly effective immunogenic activities of this conjugated antigen at different injection doses. Accordingly, the dosage of 4 μg per mouse per time showed to be the highest effect through intraperitoneal injection experimented on BALB/c mice.

Keywords. BALB/c, ELISA, GloboH, Keyhole limpet hemocyanin - KLH, dot-blot

* Author for correspondence: Thao Thi Do, Tel: 84-4-38361774; Email: thaodo@ibt.ac.vn