

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-29-35>

# Получение и характеристика моноклональных антител к ферропортину человека

М.Г. Хотулева<sup>1</sup>, Я.О. Садовская<sup>1</sup>, А.О. Каримова<sup>1,2</sup>, Н.Е. Варламов<sup>1</sup>, Д.А. Хоченков<sup>1</sup>, М.В. Миронова<sup>1</sup>, Д.В. Гусев<sup>1</sup>, О.Н. Солопова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»; Россия, 101000 Москва, ул. Мясницкая, 20

**Контакты:** Маргарита Геннадьевна Хотулева [khotulevamargarita@gmail.com](mailto:khotulevamargarita@gmail.com)

**Введение.** Ферроптоз – это тип неапоптотической железозависимой формы регулируемой гибели клеток. Единственным экспортером железа из клеток является ферропортин, однако его вовлечение в ферроптоз клеток малоизученно. Активация или блокировка путей ферроптоза может обеспечить терапевтическую стратегию при лечении ряда заболеваний. Контроль экспрессии ферропортина позволит подобрать более эффективную терапию опухоли. Получение моноклональных антител (МкАт) к ферропортину человека поможет при дальнейшем изучении его роли в ферроптозе опухолевых клеток.

**Цель исследования** – получение и характеристика МкАт к ферропортину человека.

**Материалы и методы.** Методом гибридной технологии получены мышиные МкАт против синтетического пептида, соответствующего участку белка ферропортина. Пептид синтезировали методом твердофазного автоматического синтеза.

**Результаты.** Выбран и синтезирован 15-членный пептид с последовательностью ELKQLNLHKDTEPKP (ELK). Получены конъюгаты синтетического пептида с белками-носителями. Получено 4 стабильных гибридных клон, наработаны образцы МкАт. Образцы успешно протестированы с использованием методов проточной цитометрии, иммуноферментного анализа, электрофореза в полиакриламидном геле.

**Заключение.** Получены и охарактеризованы 4 антитела против ферропортина, связывающие пептид ELK. Антитела могут быть использованы в дальнейших исследованиях транспорта железа в опухолевых клетках.

**Ключевые слова:** ферропортин, моноклональное антитело, ферроптоз, транспорт железа, иммуноферментный анализ

**Для цитирования:** Хотулева М.Г., Садовская Я.О., Каримова А.О. и др. Получение и характеристика моноклональных антител к ферропортину человека. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):29–35.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-29-35>

## Production and characterization of monoclonal antibodies to synthetic human ferroportin peptide

Margarita G. Khotuleva<sup>1</sup>, Yana O. Sadovskaya<sup>1</sup>, Anastasia O. Karimova<sup>1,2</sup>, Nikolay E. Varlamov<sup>1</sup>, Dmitry A. Khochenkov<sup>1</sup>, Maria V. Mironova<sup>1</sup>, Dmitriy V. Gusev<sup>1</sup>, Olga N. Solopova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

<sup>2</sup>National Research University Higher School of Economics; 20 Myasnitskaya St., Moscow 101000, Russia

**Contacts:** Margarita Gennadiyevna Khotuleva [khotulevamargarita@gmail.com](mailto:khotulevamargarita@gmail.com)

**Background.** Ferroptosis is a type of non-apoptotic iron-dependent form of regulated cell death. Ferroportin is the only exporter of iron from cells, however, the involvement of ferroportin in cell ferroptosis is poorly understood. Activation or blocking of ferroptosis pathways may provide a therapeutic strategy for the treatment of a number of diseases. Control of ferroportin expression will make it possible to select a more effective tumor therapy. Obtaining monoclonal antibodies to human ferroportin will help to further study its role in ferroptosis of tumor cells.

**Aim.** Obtaining and characterization of monoclonal antibodies to human ferroportin.

**Materials and methods.** Mouse monoclonal antibodies against a synthetic peptide corresponding to the ferroportin protein region were obtained using hybridomic technology. The peptide was synthesized by the method of solid-phase automatic synthesis.

**Results.** A 15-membered peptide with the sequence ELKQLNLHKDTEPKP (ELK) was selected and synthesized. Conjugates of the synthetic peptide with carrier proteins were obtained. 4 stable hybridomic clones were obtained, and samples of monoclonal antibodies were obtained. The samples were successfully tested using methods of flow cytometry, enzyme immunoassay, and polyacrylamide gel electrophoresis.

**Conclusion.** Four antibodies against ferroportin binding the ELK peptide were obtained and characterized. The antibodies can be used in further studies of iron transport in tumor cells.

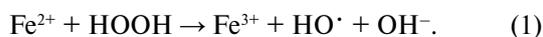
**Keywords:** ferroportin, monoclonal antibody, ferroptosis, iron transport, enzyme immunoassay

**For citation:** Khotuleva M. G., Sadovskaya Ya. O., Karimova A. O. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to synthetic human ferroportin peptide. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(3):29–35. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-29-35>

## Введение

Одним из основных подходов к уничтожению опухолевых клеток является воздействие на них индукторами апоптоза, но их эффективность ограничена ввиду появления у опухоли резистентности к препаратам, что является серьезным препятствием в лечении рака [1, 2]. Исследования форм неапоптотической гибели клеток, напротив, открывают новые терапевтические пути для уничтожения раковых клеток и ограничения выживаемости клонов, устойчивых к лекарствам. Одной из таких форм является ферроптоз – неапоптотическая железозависимая регулируемая гибель клеток [3]. Ферроптоз как отдельный тип клеточной гибели утвержден в 2018 г. Номенклатурным комитетом клеточной гибели (Nomenclature Committee on Cell Death) [4]. При избытке железа в клетках происходит их гибель из-за накопления свободных радикалов, приводящего к окислению липидов митохондриальных мембран с их последующим разрывом. Небольшие пулы гемового железа могут напрямую катализировать образование свободных радикалов в ходе реакции Фентона (формула 1) и могут далее распространять перекисное окисление липидов [5]:



Высокий индекс пролиферации опухолевых клеток требует значительно большего расхода железа, так как оно входит в каталитический домен ДНК-полимеразы и необходимо для связывания этого фермента с ДНК [6].

Один из типов ферроптоза инициируется увеличением пулов железа, например из-за снижения экспрессии гена *SLC40A1*, кодирующего ферропортин, который является единственным известным транспортером железа из клетки [7, 8]. Ферропортин служит контрольной точкой для регулирования потоков железа из клетки. Как и другие белки метаболизма

железа, ферропортин также участвует в доступности железа для клетки и ферроптоза [9, 10]. Одно из направлений исследования биологической роли ферропортина – иммунохимические реакции с использованием моноклональных антител (МкАт). МкАт к ферропортину человека могут быть использованы для исследования роли ферропортина в метаболизме железа.

**Цель исследования** – получение и характеристика МкАт к ферропортину человека.

## Материалы и методы

### Синтез пептида

Аминокислотную последовательность человеческого ферропортина выбрали при помощи базы данных UniProt (Universal Protein Resource) [11]. Для получения пептида ELKQLNLHKDTEPKP (ELK) использовали твердофазный метод синтеза в автоматическом режиме. Синтез проводили с использованием автоматизированного пептидного синтезатора ResPep Sli (Intavis, Германия) согласно инструкции производителя.

Молекулярную массу и чистоту полученных пептидов подтверждали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС). Спектр ВЭЖХ-МС регистрировали на приборе Agilent Series 1100 LC/MSD Trap-SL (Agilent Technologies, США); колонка: ReproSil-Pur Basic-C18 4,6 × 250 мм, 5 мкм. Разделение осуществляли в градиентном режиме. Градиент: 0 мин – 95 % А, 20 мин – 100 % Б, где А – вода, Б – ацетонитрил. К смеси А и Б добавляли по 0,01 % трифторуксусной кислоты по объему. Детектирование осуществляли при длине волны 220 нм.

### Получение конъюгатов синтетического пептида с белками-носителями

Белки – носители HSA (human serum albumin) и AFP (alpha-fetoprotein) и пептид ELK растворяли

в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), к смеси добавляли глутаровый альдегид до конечной концентрации 2 %. Инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Затем для нейтрализации глутарового альдегида добавляли раствор глицина до конечной концентрации 0,2 М и инкубировали 15 мин. Реакционную смесь диализовали против ФСБ. Таким образом получено 2 конъюгата с пептидом: ELK-HSA и ELK-AFP.

#### Получение моноклональных антител

Первичную иммунизацию мышей линии *Balb/c* проводили путем введения 100 мкг антигена (раствор конъюгатов ELK-HSA и ELK-AFP) с полным адьювантом Фрейнда (1:1) [10] в лапы. Бустирование антигеном неполным адьювантом Фрейнда проводили с интервалом 13 дней после первичной иммунизации. Гибридизацию иммунных лимфоцитов с клеточной линией Sp 2/0 делали на 4-й день после бустирования с помощью полиэтиленгликоля. На 4–6-е сутки после гибридизации наблюдали рост НАТ-устойчивых клонов. Проведено не менее 2 клонирований, в результате получено 4 стабильных клон. Скрининг специфичных клонов, способных к продуцированию антител, проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) [12].

#### Определение субизотипов антител в асцитных жидкостях

Субизотипирование проводили методом непрямого ИФА с помощью набора Mouse Typing Panel (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя [13]. Антитела (в асците) тестировали на способность связываться с пептидом ELK методом непрямого ИФА.

Пептид ELK сорбировали на микротитрационный планшет высокой сорбции в концентрации 5 мкг/мл в ФСБ по 50 мкл в лунку в течение 1 ч при температуре 37 °С. На каждый клон 1 дорожка (8 лунок) планшета плюс 1 дополнительная дорожка на каждый антиген для отрицательного контроля ФСБ с добавлением альбумина и Твин-20. Разведенные асциты добавляли по 50 мкл в 6 лунок одного ряда на планшете. В 1-ю (А) и последнюю (Н) лунки добавляли ФСБ с альбумином и Твин-20 без антител для отрицательного контроля конъюгата. Антитела кролика, специфичные к каждому изотипу мышинных антител, разводили 1:3 в ФСБ с добавлением Твин-20 и в каждую добавляли по 50 мкл в 1 лунку дорожки с каждым клоном плюс 1 контрольная лунка для каждого антигена. Конъюгированный с пероксидазой хрена козий антикроличий иммуноглобулин (Ig) разводили 1/3000 в промывочном буфере ФСБ с добавлением Твин-20 и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре

FlexA-200HT (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай), установив длину волны 450 нм.

Методом аффинной хроматографии выделяли антитела на сорбенте белок-G сефарозе и определяли их чистоту методом электрофореза в полиакриламидном геле [14].

#### Определение специфичности антител методом иммуноферментного анализа

Конъюгаты с пептидом ELK адсорбировали на поверхности лунок 96-луночного планшета в концентрации 5 мкг/мл в течение ночи при температуре 4 °С. Далее планшеты инкубировали со МкАт. В последнюю (Н) лунку добавляли ФСБ с добавлением альбумина и Твин-20 без антител для отрицательного контроля конъюгата. После проводили инкубацию со вторичными антителами 1:60 000 в течение 1 ч при температуре 37 °С. Далее в каждую лунку добавляли 100 мкл ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) и инкубировали до развития окраски в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 10 % раствора серной кислоты. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре FlexA-200HT, установив длину волны 450 нм.

#### Проточная цитометрия

Определение связывания образцов выделенных антител к ферропортину (SLC40A1) проводили с использованием клеточной линии HT-29 (рака толстой кишки) с высокой экспрессией гена ферропортина и линии NCI-H1395 (рака легкого) с низкой экспрессией гена ферропортина. Клетки снимали с поверхности культуральных флаконов, отмывали центрифугированием и распределяли по  $5 \times 10^4$  клеток в пробирки для проточной цитометрии. К клеточной суспензии добавляли исследуемые образцы в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки промывали буфером флуоресцентной активации сортировки клеток (fluorescence-activated cell sorting – FACS: PBS, 0,2 % (w/v) BSA, 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) и вносили по 5 мкл вторичных козьих антител к Ig мыши, конъюгированных с Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США), инкубировали на льду 30 мин. Клетки промывали FACS-буфером и определяли количество окрашенных клеток на проточном цитометре NovoCyte 2000R (Agilent Technologies, США) с программным обеспечением ACEA NovoFlow 1.3 (ACEA Bioscience, Бельгия).

#### Результаты

##### Синтез пептида

С использованием автоматизированного пептидного синтезатора ResPep Sli было получено 9,8 мг пептида с последовательностью ELKQLNLHKDTEPKP. По данным ВЭЖХ-МС для ELKQLNLHKDTEPKP:

время удерживания 6,8 мин, М 1789, содержание пептида составляет 92,3 %. Основной пик спектра приходится на расчетную молекулярную массу 1790 Да. Брутто-формула:  $C_{79}H_{132}N_{22}O_{25}$ .

#### Определение субизотипа антител против пептида ELK

Результаты определения субизотипов антител IgG против пептида ELK представлены следующим образом.

ELK A12 – IgG1;

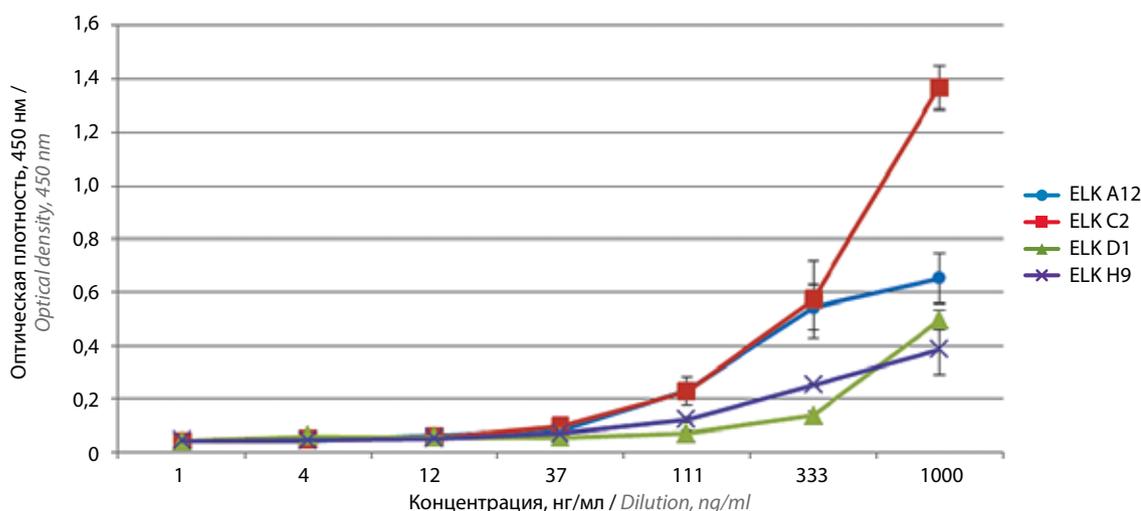
ELK D1 – IgG1;

ELK C2 – IgG2a;

ELK H9 – IgG3.

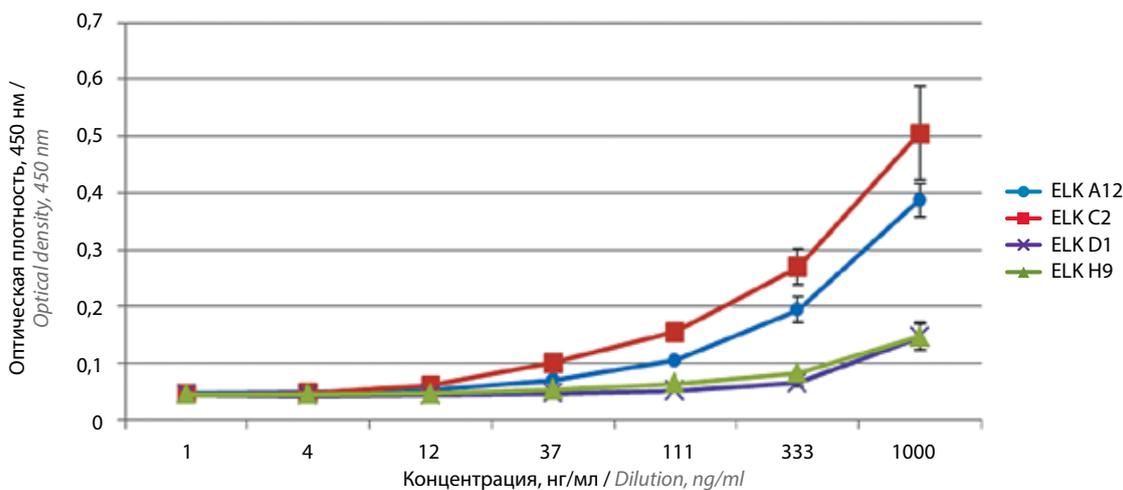
#### Определение специфичности антител методом иммуноферментного анализа

Связывание МкАт с пептидом определяли по характеру кривой зависимости оптической плотности от концентрации антител в сравнении с контрольными образцами. Все полученные антитела способны аффинно связываться с неконъюгированным пептидом. Оба конъюгата не реагируют с белками HSA и AFP. С конъюгатом ELK-AFP аффинное связывание антител происходит лучше, чем с конъюгатом ELK-HSA, несмотря на то что все образцы, кроме антитела ELK C2, получены в результате иммунизации конъюгатом ELK-HSA (рис. 1, 2).



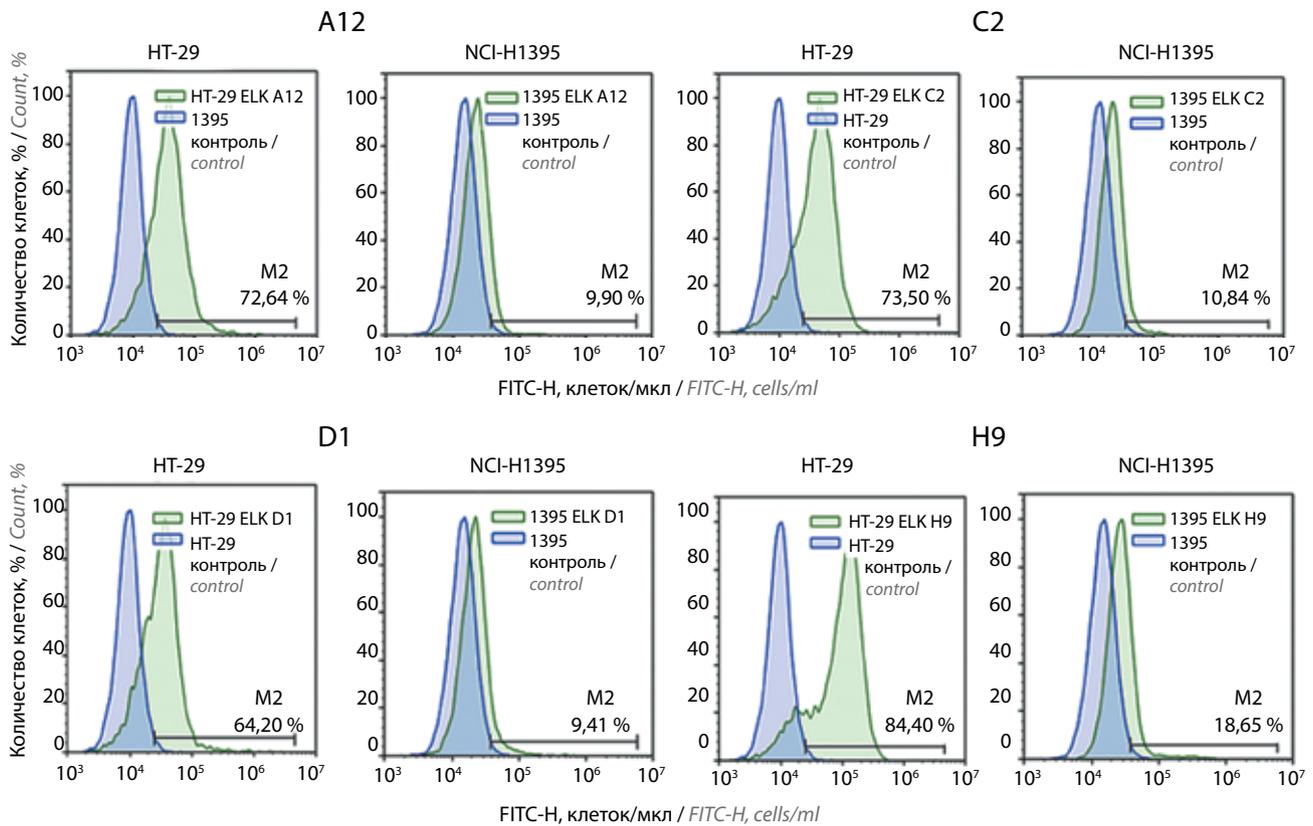
**Рис. 1.** Зависимость оптической плотности от концентрации полученных антител на конъюгате ELK-AFP ( $N = 3$ ). Здесь и далее на рис. 2: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего

**Fig. 1.** The optical density of the obtained antibodies on the ELK-AFP conjugate ( $N = 3$ ). Here and below in Fig. 2: the data are presented as mean value and standard error of the mean



**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности от концентрации полученных антител на конъюгате ELK-HSA,  $N = 3$

**Fig. 2.** The optical density of the obtained antibodies on the ELK-HAS conjugate,  $N = 3$



**Рис. 3.** Оценка связывания антител против пептида ELK со специфическим антигеном методом проточной цитометрии на клетках линии HT-29 и NCI-H1395 (контроль). FITC-H – флуоресцеин изотиоцианат; M2 – выделенная область, соответствующая FITC-позитивным клеткам, %

**Fig. 3.** Binding of antibodies to ELK peptide to a specific antigen by flow cytometry on the HT-29 cell line and NCI-H1395 (control). FITC-H – fluorescein isothiocyanate; M2 – the gated region corresponding to FITC-positive cells, %

**Таблица 1.** Связывание антител (%) против пептида ELK с клеточным ферропортином на линиях HT-29 и NCI-H1395 методом проточной цитометрии

**Table 1.** Binding of antibodies (%) to ELK-peptide to cellular ferroportin on the HT-29 and NCI-H1395 cell line by flow cytometry

Клеточная линия Cell line	Моноклональное антитело ELK ELK monoclonal antibody			
	A12	D1	C2	H9
HT-29	72,64	64,2	73,5	84,4
NCI-H1395	9,9	9,41	10,84	18,65

#### Определение связывания антител с ферропортином методом проточной цитометрии

Наибольшую активность на клеточной линии HT-29 показали антитела к ферропортину клона ELK H9 – количество окрашенных клеток составило

84,4 %, однако все полученные антитела показали сравнимую активность. При этом у антител отсутствует неспецифическое связывание в аналогичном эксперименте на клеточной линии NCI-H1395 с низкой экспрессией гена ферропортина (табл. 1). Результаты представлены на рис. 3.

#### Заключение

В ходе исследования получены МкАт против 15-членного пептида ELK, соответствующего участку белка ферропортина. Продемонстрирована способность антител к аффинному связыванию с рекомбинантным ферропортином и поверхностным белком клеток, экспрессирующих ферропортин. Изучение механизма ферроптоза с использованием МкАт к ферропортину человека имеет большое значение для изучения механизмов ферроптоза. Настоящее исследование может инициировать дополнительные исследования по экспрессии ферропортина и его роли в ферроптозе опухолевых клеток.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D., Johnston P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;13(10):714–26. DOI: 10.1038/nrc3599
- Okada H., Mak T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4(8):592–603. DOI: 10.1038/nrc1412
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25(3):486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
- Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 2009;46(5):531–42. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008
- Lisova A.E., Baranovskiy A.G., Morstadt L.M. et al. The iron-sulfur cluster is essential for DNA binding by human DNA polymerase  $\epsilon$ . *Sci Rep* 2022;12(1):17436. DOI: 10.1038/s41598-022-21550-4
- Hassannia B., Wiernicki B., Ingold I. et al. Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma. *J Clin Invest* 2018;128(8):3341–55. DOI: 10.1172/JCI99032
- Li J., Cao F., Yin H.L. et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020;11(2):88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2
- Hassannia B., Vandenabeele P., Vanden Berghe T. Targeting ferroptosis to iron out cancer. *Cancer Cell* 2019;35(6):830–49. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.04.002
- Вартанян А.А. Метаболизм железа, ферроптоз, рак. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):14–20. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20
- Vartanian A.A. Iron metabolism, ferroptosis and cancer. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(3):14–20. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20
- Uniprot. URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9NP59/entry>.
- Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495–7. DOI: 10.1038/256495a0
- Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8(9):871–4. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-x
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0

**Вклад авторов**

М.Г. Хотулева: предоставление материалов исследования, получение, обработка, анализ, интерпретация данных, написание текста рукописи;

Я.О. Садовская, А.О. Каримова: предоставление материалов исследования, обработка, анализ, интерпретация данных, редактирование текста рукописи;

Н.Е. Варламов, Д.А. Хоченков, Д.В. Гусев: предоставление материалов исследования, обработка, анализ, интерпретация данных;

М.В. Миронова: предоставление материалов исследования;

О.Н. Солопова: разработка концепции и дизайна исследования, проведение исследования, редактирование текста рукописи.

**Author's contributions**

M.G. Khotuleva: research materials provision, acquisition, processing, analysis and interpretation of data, original draft preparation;

Ya.O. Sadovskaya, A.O. Karimova: research materials provision, acquisition, processing, analysis and interpretation of data, review and editing;

N.E. Varlamov, D.A. Khochenkov, D.V. Gusev: research materials provision, acquisition, processing, analysis and interpretation of data;

M.V. Mironova: research materials provision;

O.N. Solopova: study concept and design development, conducting research, review and editing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

М.Г. Хотулева / M.G. Khotuleva: <https://orcid.org/0009-0008-6104-5233>

Я.О. Садовская / Ya.O. Sadovskaya: <https://orcid.org/0009-0009-7115-7797>

А.О. Каримова / A.O. Karimova: <https://orcid.org/0009-0000-0317-9948>

Н.Е. Варламов / N.E. Varlamov: <https://orcid.org/0000-0002-8602-6599>

Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

М.В. Миронова / M.V. Mironova: <https://orcid.org/0000-0002-6598-873X>

Д.В. Гусев / D.V. Gusev: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8265>

О.Н. Солопова / O.N. Solopova: <https://orcid.org/0000-0002-5465-6094>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of interest. The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 гг., соглашение № 075-15-2025-493 от 30.05.2025).

**Funding.** This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (the Federal Scientific-Technical Programme for Genetic Technologies Development for 2019–2030, Agreement No. 075-15-2025-493 dated 30.05.2025).

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протоколы опытов были утверждены на заседании локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина».

**Statement of the welfare of animals.** The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes. The protocols of the experiments were approved at a meeting of the local Ethical Committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.

Статья поступила: 09.06.2025. Принята к публикации: 02.07.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 09.06.2025. Accepted for publication: 02.07.2025. Published online: 25.09.2025.