Fc 变体 Fc3 的大肠埃希菌高效制备工艺

林舒祺[1]，王亚鹏[2]，化浩举[1,2]，路建光[1,2]，冯　军[1,2*]

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：抗体可结晶片段（Fc）的制备常依赖于成本高昂的哺乳动物细胞表达系统，且其补体依赖的细胞毒性（CDC）及抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（ADCC）带来了潜在的安全性风险。为克服上述瓶颈，该研究采用大肠埃希菌高效制备 Fc 变体 Fc3（**1**）。该变体的 CDC 和 ADCC 作用较弱，且通过氨基酸突变，减少其铰链区二硫键，有利于工业化制备。通过系统优化工艺参数，实现了 **1** 的高效复性和分离纯化，产量达到 407.4 mg/L，纯度达到 91.2%。随后采用生物层干涉技术测得 **1** 与新生儿 Fc 受体（FcRn）在 pH 6.0 条件下的平衡解离常数（K_D）为 10.8 nmol/L，而在 pH 7.4 条件下结合很弱，证明其可在大肠埃希菌中成功表达，且具有典型的 pH 依赖性 FcRn 结合特性。该研究为 Fc 类蛋白的低成本、高产量制备提供了可行的技术路径，也为 **1** 的后续应用奠定了基础。

关键词：抗体可结晶片段（Fc）；包涵体；重折叠；发酵；表达；纯化；离子交换色谱

中图分类号：Q78　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)05-0537-09

引用：林舒祺, 王亚鹏, 化浩举, 等. Fc变体Fc3的大肠埃希菌高效制备工艺[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(5): 537-545.

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.05.006

An Efficient *Escherichia coli* Production Process for the Fc Variant Fc3

LIN Shuqi[1], WANG Yapeng[2], HUA Haoju[1,2], LU Jianguang[1,2], FENG Jun[1,2*]

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai Duomirui Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: The preparation of antibody crystallizable fragment (Fc) often relies on costly mammalian cell expression systems, and its complement dependent cytotoxicity (CDC) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) pose potential safety risks. To address these bottlenecks, this study efficiently produced the Fc variant Fc3 (**1**) in *Escherichia coli*. This variant exhibits weaker CDC and ADCC effects and reduced hinge region disulfide bonds through amino acid mutations, which is conducive to industrial production. This study systematically optimized process parameters, achieving efficient refolding and separation and purification of **1**, with a yield of 407.4 mg/L and a purity of 91.2% . Subsequently, the equilibrium dissociation constant (K_D) of **1** binding to neonatal Fc receptor (FcRn) at pH 6.0 was measured to be 10.8 nmol/L using bio-layer interferometry, while the binding was very weak at pH 7.4, demonstrating successful expression of **1** in *E. coli* and its typical pH-dependent FcRn binding characteristics. This study provides a feasible technical pathway for the low-cost, high-yield production of Fc-like proteins and lays the foundation for the subsequent application of **1**.

Key Words: antibody crystallizable fragment (Fc); inclusion body; refolding; fermentation; expression; purification; ion exchange chromatography

抗体可结晶片段（antibody crystallizable fragment，Fc）是免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）的重要组成部分，不仅可介导多种免疫效应功能，还可通过与新生儿 Fc 受体（neonatal Fc receptor，FcRn）结合而显著延长多肽、蛋白的体内半衰期，因而被广泛用于生物药物的开发[1-2]。然而，Fc 的制备依赖哺乳动物细胞表达系统，成本较高[3]；且其补体依赖的

收稿日期：2025-09-30

作者简介：林舒祺，硕士研究生，专业方向：微生物及生化药学。

通信作者：冯　军，研究员，从事蛋白质及多肽药物的开发与研究

细胞毒性（complement dependent cytotoxicity，CDC）及抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，ADCC）也可能带来临床用药安全性风险[4]。IgG4 的 Fc 片段与 Fcγ 受体（FcγR）和补体成分 1q 亚基（C1q）的亲和力较低，不易引发 ADCC 和 CDC，同时仍保留与 FcRn 的结合能力，因此被视为一种具有良好应用前景的药学平台组件[5]。尽管如此，实现其高效、经济的制备仍是一个突出挑战。

大肠埃希菌（*Escherichia coli*, *E coli*）表达系统因成本低、周期短、易于工艺放大等优势，已被广泛用于重组蛋白的生产[6]。但制备用该表达系统制备易形成包涵体，且其复杂的二硫键配对和空间折叠要求增加了变性、复性过程的难度，从而导致回收率低、工艺重复性差，难以实现产业化[7-8]。近年来，已有研究通过理性设计获得 Fc 变体 Fc3（**1**），在消除 ADCC 和 CDC 作用的同时改善了 Fc 的理化特性[9]，但目前尚无相关制备工艺的报道。而其他的 Fc 及变体受限于回收率较低的复性工艺，普遍存在产量较低的问题[10]。因此，如何实现该类变体在 *E. coli* 表达系统中的高效复性与纯化，仍是目前面临的关键技术瓶颈。

本研究以 **1** 为对象，重点突破其在 *E. coli* 表达系统中的包涵体变性、复性及高效纯化工艺难题。通过系统性优化复性条件与分离纯化策略，建立稳定、可放大的制备路线，以获得高纯度、高产量的目标产物，从而为 **1** 的后续应用提供坚实基础，也为其他复杂二硫键蛋白的高效制备提供工艺借鉴与参考。

1　仪器与试药

ZHWY-2112B 型振荡培养箱（上海知楚仪器有限公司）；5BG-900 型 5 L 机械搅拌发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；AH-1500 型高压匀质机［安拓思纳米技术（苏州）有限公司］；Avanti J-25 型离心机、Microfuge 20R 型离心机（美国 Beckman Coulter 公司）；SCG-100 型蛋白纯化系统（苏州赛普仪器有限公司）；PowerPac Basic 型垂直电泳仪（美国 Bio-Rad 有限公司）；ACP-1010D 型 13K 中空纤维管（日本旭化成株式会社）；Alliance e2695-2489 型高效液相色谱仪、Xevo G2-XS QTof 型高分辨质谱仪、Acquity QDa 型质谱检测器（美国 Waters 公司）；0.22 μm 水系微孔滤膜（天津市津腾实验设备有限公司）；CHDC-1020 型低温恒温槽冷却水循环机（上海川昱实验仪器有限公司）；GatorPrime 型生物膜干涉技术（bio-layer interferometry，BLI）分析仪（美国 Gator Bio 公司）。

硫酸卡那霉素（武汉艾美捷科技有限公司，含量 98.0%，批号 A715BA0002）；酵母提取物（安琪酵母股份有限公司，批号 2019022301B9）；三氟乙酸（上海泰坦科技股份有限公司，纯度 99.5%，批号 C12228043）；IPTG［生工生物工程（上海）股份有限公司，含量 99.0%，批号 H425BA0014］；PAGE 凝胶快速制备试剂盒、双色预染标准蛋白（相对分子质量 10 000 ～ 250 000）均购自上海雅酶生物医药科技有限公司；生物素化的重组人 FCGRT 和 B2M 异二聚体蛋白（Bio-FcRn，北京义翘神州科技股份有限公司，纯度≥ 90%，批号 CT071-H27H-B）；其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

Nco Ⅰ与 *Bam*HⅠ酶均购自北京全式金生物技术股份有限公司；宿主菌 *E. coli* BL21（DE3）、质粒 pET28a 均由本实验室保存。

2　方法与结果

2.1　培养基及主要溶液配制

LB 培养基 /（g·L^{-1}）：氯化钠 10、大豆蛋白胨 10、酵母提取物 5；用 4 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.0；高压蒸汽 121 ℃灭菌 30 min。

发酵培养基 /（g·L^{-1}）：葡萄糖 30、酵母浸粉 7.5、磷酸二氢钾 8、枸橼酸三钠 7、氯化钠 5、硫酸铵 5、硫酸镁 1、氯化钙 0.01；121 ℃灭菌 30 min。

补料培养基 /（g·L^{-1}）：葡萄糖 800，硫酸镁 2；121 ℃灭菌 30 min。

微量元素溶液 /（g·L^{-1}）：七水合硫酸亚铁 10、一水合硫酸锰 0.5、七水合硫酸锌 2.25、五水合硫酸铜 1、硼酸 0.2、钼酸铵 0.1；含浓盐酸 2.5 ml/L，于 2 ～ 8 ℃保存备用。

三羟甲基氨基甲烷（trihydroxymethyl aminomethane，Tris）缓冲液：25 mmol/L Tris，用 6 mol/L 盐酸调至 pH 8.0。

硫酸卡那霉素溶液：称取硫酸卡那霉素 50 g，

溶于无菌水 1 L 中，配制成 50 g/L 的母液。

2.2 重组菌株 DMR1125 的构建与表达验证

利用 *Nco* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切位点将目标基因（其氨基酸序列见表 1）克隆到 pET28a 载体中，构建表达载体 pET28a-Fc3。采用电穿孔法将 pET28a-Fc3 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中，然后将菌液涂布到含 25 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 培养基平板上，静置培养。

挑取单菌落接种到含有 25 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 培养基中。在 37 ℃、220 r/min 条件下培养 5 h，加入 IPTG 孵育 16 ～ 20 h 以诱导目标蛋白表达，于 4 ℃离心 (5 000×*g*) 15 min，收集菌体，以每 1 g 加入 Tris 缓冲液 10 mL 的比例重悬。使用超声波细胞破碎仪在冰浴中破碎细胞，设置超声功率为 300 W，脉冲模式为超声 3 s、间歇 5 s，总时长 5 min；然后于 4 ℃离心 (5 000×g) 10 min，收集上清液和沉淀。沉淀用 Tris 缓冲液洗涤后再次离心，即得洗涤后包涵体。取发酵液上清、洗涤液上清、洗涤前后包涵体及含二硫苏糖醇 (dithiothreitol，DTT，10 μmol/L) 的洗涤前后包涵体，采用 12.5% SDS-PAGE 分析，点样量为 10 μL。结果如图 1 所示，泳道 5 中在相对分子质量约为 25 000 处有明显条带，与 **1** 单体的理论相对分子质量一致，说明重组菌株 DMR1125 经 IPTG 诱导后可表达目的蛋白，其主要为包涵体形式。

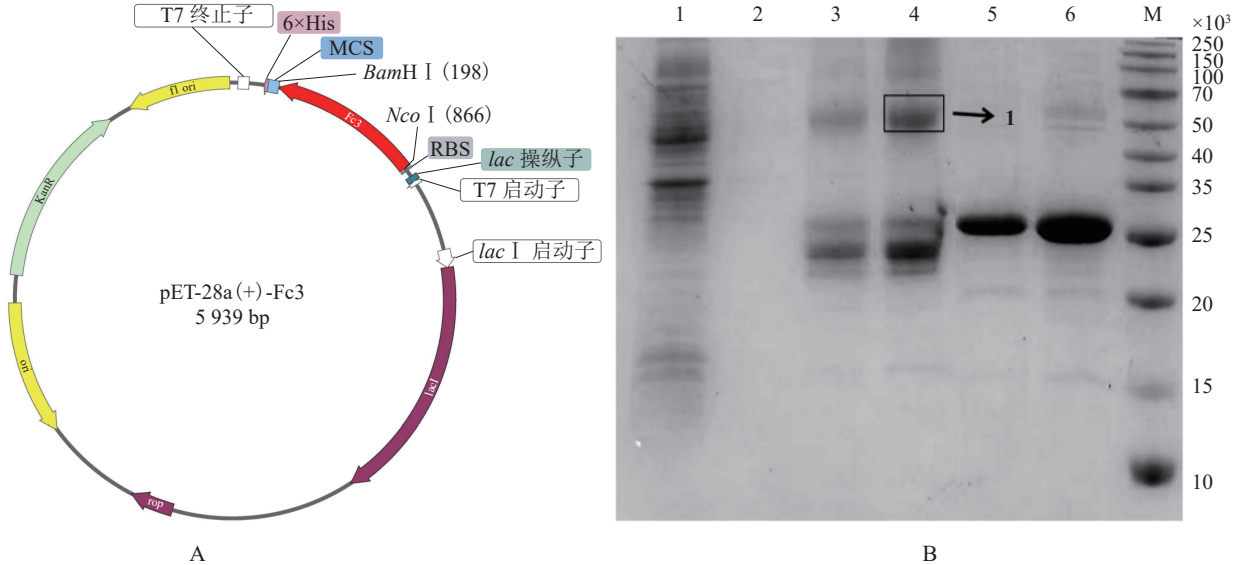
2.3 高密度发酵

取 - 80 ℃冻存的 DMR1125 种子液 10 μL，接种于 LB 培养基 30 mL 中，并加入终质量浓度为 25 μg/mL 的硫酸卡那霉素，于 37 ℃摇床 (220 r/min) 培养 8 h，制成种子液，测得其光密度 ($OD_{600\ nm}$) 值为 1.2 ～ 3.0。种子液经显微镜检测无污染后，转移至 5 L 发酵罐中，

表 1 Fc3 氨基酸序列

Tab.1 Amino Acid Sequence of Fc3

蛋白名称	序列组成
Fc3	MASCPAPEAKGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFESTYRVVSVLTVLH-QDWLQGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESQGQPENNYKTTP-PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG



A B

A—表达载体 pET28a-Fc3 示意图；B—重组菌株摇瓶发酵验证的 SDS-PAGE 分析（1—发酵液上清；2—洗涤液上清；3—洗涤前包涵体；4—洗涤后包涵体；5—洗涤前包涵体 +DTT；6—洗涤后包涵体 +DTT；M—标准蛋白质）。

图 1 重组表达载体的构建与验证

Fig.1 Construction and Validation of Recombinant Expression Vectors

设置发酵罐温度为 37 ℃，初始转速为 400 r/min，罐中通气量为 3 L/min，采用体积分数为 50%的氨水溶液调至 pH 7.0±0.1。

在发酵过程中，依次通过提高转速、增加通气量、提高罐压等方法保持溶氧量（dissolved oxygen，DO）>20%。发酵培养 12 ～ 13 h 时，观测到 DO 和 pH 值都迅速上升，开始缓慢滴加补料，调控补料速度为 30 mL/h。当培养至发酵液 $OD_{600\ nm}$ 值为 60 ～ 70 时，加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白表达，调整补料速度为 17 mL/h，于 37 ℃继续培养 12 h 后结束发酵，获得发酵液 3.1 L，于 4 ℃离心（5 000×*g*）20 min，收集菌体 537 g，最终菌体湿重为 173.22 g/L。

2.4　高压匀浆及包涵体洗涤处理

取收集到的菌体，以每 1 g 加入 Tris 缓冲液 10 mL 的比例重悬，使用高压匀质机破胞，释放胞内产物。设置匀浆压力为 85 MPa，冷却循环水温度为 4 ℃，重复破胞 3 次。破胞液于 4 ℃离心（5 000×*g*）20 min，收集沉淀；沉淀以每 1 g 加入 Tris 缓冲液 10 mL 的比例重悬，搅拌洗涤 30 min，于 4 ℃离心（5 000×*g*）20 min，收集沉淀。重复上述操作洗涤 2 次，收集得包涵体 123 g，即包涵体含量为 40 g/L 发酵液。

2.5　包涵体的变性和复性

2.5.1　包涵体变复性条件

采用稀释复性法从包涵体中获取有活性的 **1**。选择 3 种常用的包涵体变复性条件进行尝试（表 2）。

按每 1 g 包涵体中加入变性液 10 mL 的比例，使变性液中包涵体的质量浓度为 100 mg/mL，室温搅拌（220 r/min）变性 1 h。配制复性液并预冷至 5 ℃，取上述变性后溶液，以 1 mL/min 的速度滴至复性液中，稀释 20 倍，使包涵体质量浓度为 5 mg/mL。在 5 ℃搅拌（110 r/min）反应 24 h，离心（5 000×*g*）15 min 取上清，观察溶液澄清度，并用 12.5% SDS-PAGE 检测复性过程中的聚集体含量，点样量为 10 μL。结果（图 2）显示，在变复性条件 3 下，Fc3 二聚体的含量较高，复性效果较好。

2.5.2　反相高效液相色谱分析

取“**2.5.1**”项下复性溶液，经 0.22 μm 水相滤膜滤过，采用反相高效液相色谱（RP-HPLC）法进行分析。

色谱条件：色谱柱 MAbPac™ RP 柱（3.0 mm×100 mm，4 μm）；流动相 A 为体积分数 0.1%的三氟乙酸水溶液，B 为含 0.1%三氟乙酸和 20%乙腈的 70%异丙醇水溶液，梯度洗脱，洗脱程序如表 3 所示；流速 0.5 mL/min；检测波长 215 nm；柱温 58 ℃；进样量 10 μL。

按式①计算各条件下的复性率。

复性率 = 目的蛋白峰面积 / 总蛋白峰面积 ×100%　　①

表 3　梯度洗脱程序

Tab.3　Gradient Elution Program

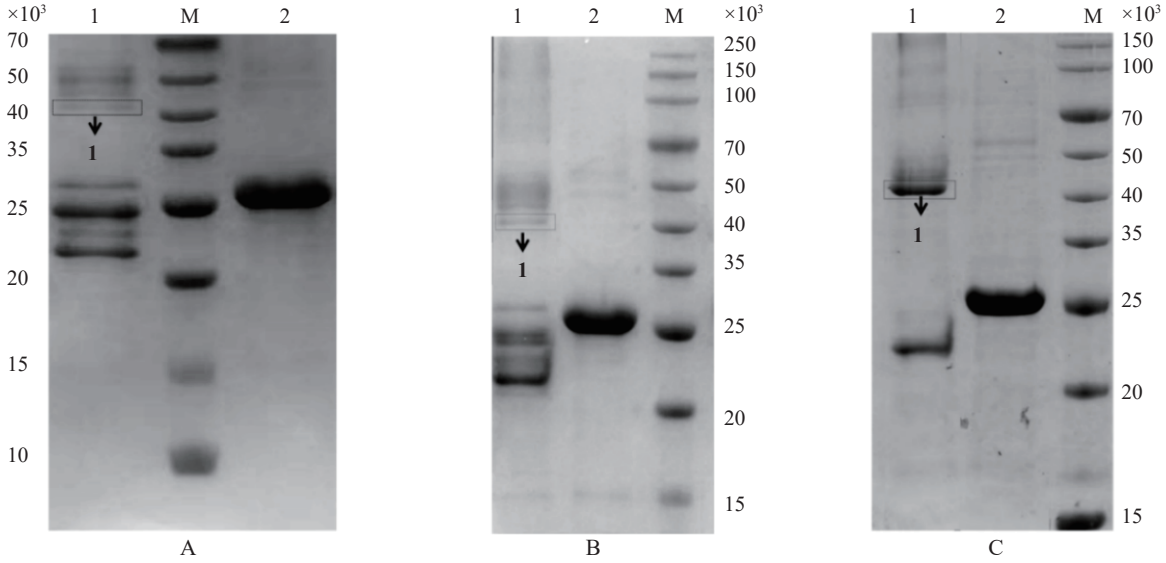
t/min	A/%	B/%
0	80	20
3.6	80	20
39.6	50	50
40.8	80	20
48.0	80	20

表 2　包涵体 3 种变复性条件的溶液组成 [1)]

Tab.2　Solution Compositions for Three Refolding and Renaturation Conditions for Inclusion Bodies

条件	变性液组成					复性液组成					
	缓冲体系	变性剂	还原剂	盐	pH 值	缓冲体系	变性剂	氧化还原对	添加剂	盐	pH 值
1	50 mmol/L Tris-HCl	8 mol/L GuHCl	20 mmol/L DTT	无	8.5	无	2 mol/L 尿素	4 mmol/L 半胱氨酸，4 mmol/L 胱氨酸	0.2 mol/L L-Arg	无	9.5
2	50 mmol/L Tris-HCl	6 mol/L GuHCl	50 mmol/L DTT	5 mmol/L EDTA-2Na	8.7	50 mmol/L Tris-HCl	2 mol/L 尿素	1 mmol/L 半胱氨酸，3 mmol/L 胱氨酸	0.2 mol/L L-Arg，5% 蔗糖	5 mmol/L EDTA-2Na	8.5
3	50 mmol/L Tris-HCl	6 mol/L GuHCl	8 mmol/L DTT	无	8.5	50 mmol/L Tris-HCl	2 mol/L 尿素	3 mmol/L 半胱氨酸	0.16 mol/L L-Arg	无	8.5

注：[1)]GuHCl 为盐酸胍；L-Arg 为 L- 精氨酸。



A—条件 1 复性结果；B—条件 2 复性结果；C—条件 3 复性结果。

1—复性液上清；2—复性液上清 +10 μmol/L DTT；M—标准蛋白质。

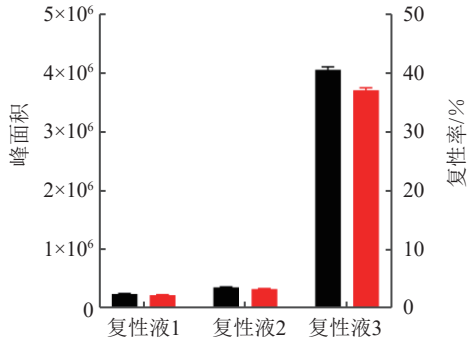
图 2　不同复性条件下复性结果的 SDS-PAGE 分析

Fig.2　SDS-PAGE Analysis of Renaturation Outcomes under Different Reproductive Conditions

结果（图 3）显示，复性液 3 的复性效果好，复性率达到了 37.3%。

2.5.3　不同复性时间对复性效果影响

为探究复性时间对复性效果的影响，在条件 3 下，于复性反应 0、2、4、6、8、10、24、48、60、72 h 时分别取样，离心（5000×*g*）15 min，取上清进行 12.5% SDS-PAGE 检测，并用 ImageJ 1.54p 软件进行定量分析。结果（图 4）显示，反应时间为 24 h



■—峰面积；■—复性率。

图 3　不同复性条件下目的蛋白的峰面积与复性率（*n*=3）

Fig.3　Renaturation Peak Areas and Renaturation Rates under Different Renaturation Conditions (*n*=3)

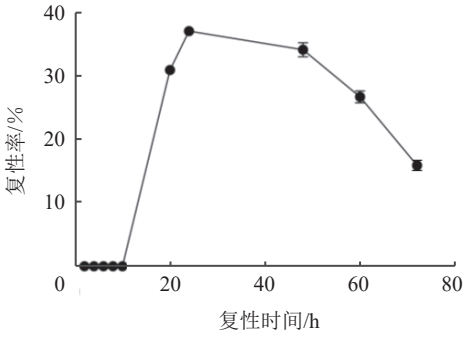


图 4　不同复性时间的复性效果（*n*=3）

Fig.4　Renaturation Effects at Different Incubation Time Points (*n*=3)

时复性效果较佳。

2.6　分离和纯化工艺

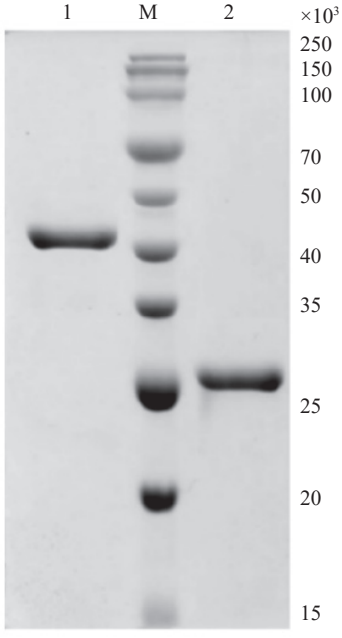
使用中空纤维管（截留分子量 13 000）对复性液进行脱盐浓缩。在超滤过程中，以顶洗液（含 1.5 mol/L 尿素的 10 mmol/L Tris 缓冲液，pH 9.0）对初始溶液进行置换，直至电导率 <5.0 mS/cm。浓缩液用乙酸调至 pH 5.0，离心（5 650×*g*）15 min 去除沉淀物，取上清进行分离和纯化。

用流动相 A（含 20 mmol/L 乙酸钠和 0.1 mol/L 氯化钠的水溶液，pH 5.0）平衡阳离子交换色谱柱（SP

Sepharose FF，5 mL）；取上述所得的上清液，经 0.2 μm 水系微孔滤膜过滤后上样，用流动相 B（含 20 mmol/L 乙酸钠和 1 mol/L 氯化钠的水溶液，pH 5.0）梯度洗脱［B 15%—100%，10 柱体积（column volume，CV）；B 100%，6 CV］，收集、合并含有 **1** 的洗脱液，即为阳离子交换色谱纯化样品。用“**2.5.2**”项下色谱条件检测 **1** 含量，计算得收率为 45%，纯度为 52.4%。

采用疏水色谱进一步纯化。取阳离子交换色谱纯化样品，加入 1.2 mol/L 硫酸钠溶液（pH 7.4）至电导率 >80 mS/cm，后用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.2，待用。用流动相 A（含 50 mmol/L Tris-HCl 和 0.75 mol/L 硫酸钠的水溶液，pH 7.2）平衡苯基疏水色谱柱（Phenyl Sepharose Fast Flow，5 mL），取上述样液，经 0.2 μm 水系微孔滤膜过滤后上样，用流动相 B（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5）梯度洗脱（B 0—100 %，20 CV）。合并含有 **1** 的洗脱液，即得最终纯化样品，收率为 21%。得 **1** 含量为 407.4 mg/L 发酵液。

取纯化后的 **1** 和加入 10 mmol/L 的 DTT 的 **1** 进行 12.5% SDS-PAGE 分析，点样量为 10 μL。结果（图 5）显示，纯化后的 **1** 在 40 000 附近呈现单一的蛋白条带，并在加入还原剂后在 25 000 附近形成单一条带，说明二硫键被打开，形成了单体。



1—纯化后 **1**；2—纯化后 **1**+DTT；M—标准蛋白质。

图 5　纯化后 1 的 SDS-PAGE 分析

Fig.5　SDS-PAGE Analysis of Purified **1**

2.7　纯度分析和质谱验证

取最终纯化样品，进行 RP-HPLC 检测。

色谱条件：色谱柱 MAbPac™ RP 柱（3.0 mm×100 mm，4 μm）；流动相 A 为体积分数为 0.1%三氟乙酸水溶液，B 为含有 0.1%三氟乙酸和 20%乙腈的 70%异丙醇水溶液，梯度洗脱，洗脱程序如表 4 所示；流速 0.6 mL/min；检测波长 215 nm；柱温 60 ℃；进样量 10 μL。

结果如图 6A 所示，主峰纯度为 91.2%。

表 4　梯度洗脱程序

Tab.4　Gradient Elution Program

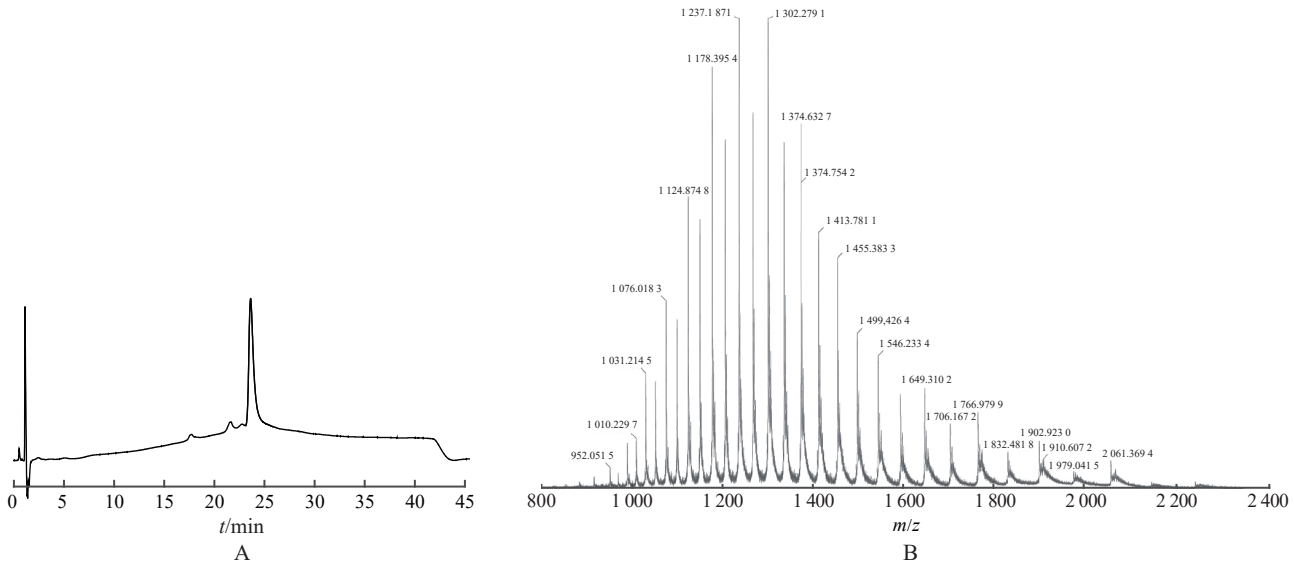
t/min	A/%	B/%
0	80	20
3	80	20
33	50	50
34	80	20
40	80	20

采用 LC-MS 法对 **1** 进行验证分析。

色谱条件：色谱柱 YMC-Triart Bio C_4 柱（2.1 mm×150 mm，1.9 μm，孔径 30 nm）；流动相 A 为体积分数 0.1 % 的甲酸水溶液，B 为体积分数 0.1 % 的甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—5 min，B 20%；5—25 min，B 20 % —50 %；25—25.1 min，B 50 % —20%；25.1—30 min，B 20%）；流速 0.35 mL/min；进样量 10 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源；检测模式 正离子模式；质量扫描范围 *m*/*z* 50 ～ *m*/*z* 3 000；离子源温度 120 ℃；锥孔电压 40 V；毛细管电压 正极 3.0 kV；碰撞气 Ar；脱溶剂气 N_2；脱溶剂流速 600 L/h；脱溶剂温度 250 ℃；锥孔气 N_2；锥孔气流速 100 L/h；碰撞电压 30 eV；数据采集模式 MS 模式。

结果如图 6 所示。利用 UniDec v.4.2.0 软件对质谱原始数据进行去卷积处理，计算得 **1** 相对分子质量为 49 450.0，与该蛋白 N 端甲硫氨酸脱落后的理论相对分子质量（49 450.2）相符。在 **1** 的表达设计时，为了启动翻译，在目标蛋白的 N 端



A—RP-HPLC 谱图；B—**1** 质谱图。

图 6 纯化后 1 的色谱和质谱图

Fig.6 Chromatogram and Mass Spectrum of Purified **1**

通过基因工程引入了甲硫氨酸。该甲硫氨酸能在蛋白合成后自发水解、去除，从而使最终获得的蛋白序列与原始设计完全一致。这一翻译后处理过程与多种原核表达系统中已报道的 N 端甲硫氨酸脱落现象相符。

2.8 1 的结合活性测定

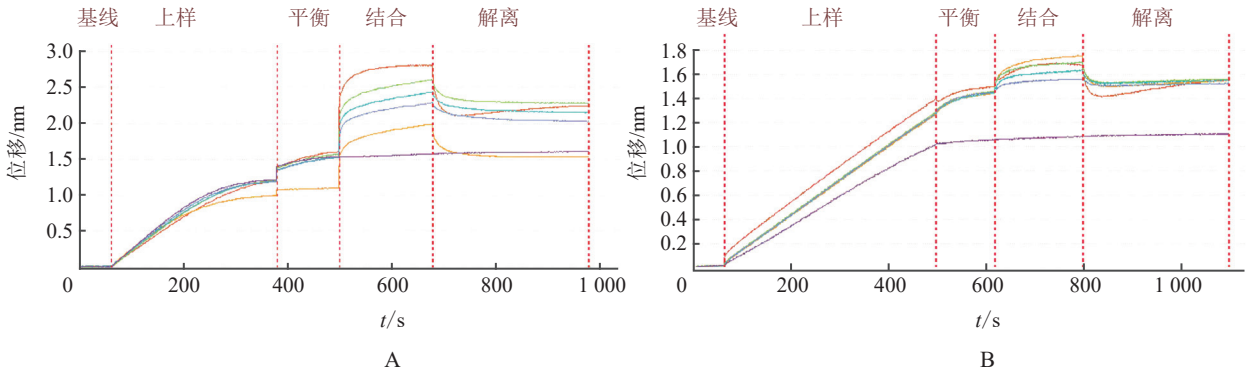
Fc 与 FcRn 的结合呈现 pH 依赖性[11]。在溶酶体内的低 pH 条件下（pH 6.0），Fc 与 FcRn 结合形成聚合体，使 Fc 免于降解；待 Fc-FcRn 聚合体循环至细胞表面，在中性体液条件下，结合力降低，Fc 被释放回体液中。根据这一原理，采用 BLI 法检测 **1** 与 FcRn 的亲和力。

链霉亲和素（streptavidin，SA）传感器板制备：在 96 孔传感器板的第 1 列与第 2 列的 A ～ F 行中，分别加入 1×PBS（pH 7.4），随后加载 SA 偶联的探针，以进行传感器表面的活化预处理。

样品制备：检测板第 1 列 A ～ F 行各孔加入 PBST（含 0.05% Tween-20 的 PBS，pH 7.4）溶液作为基线溶液；第 2 列加入用 PBS（pH 7.4）稀释至质量浓度为 10 μg/mL 的 Bio-FcRn 溶液，作为上样溶液；第 3 列加入 PBST（pH 6.0）作为 pH 6.0 条件下样品测定的平衡溶液；第 4 列加入 PBST（pH 7.4）作为 pH 7.4 条件下样品测定的平衡溶液；分别以 PBST（pH 6.0 和 7.4）为稀释液，将 **1** 稀释至浓度为 14 600 nmol/L（质量浓度 0.73 mg/mL），然后以 1 ∶ 2 梯度稀释 4 个梯度（共 5 个梯度），最低浓度为 912 nmol/L。将 **1** 的系列稀释样品分别加至 96 孔检测板第 5 列及第 6 列的 A ～ E 行，同时在 F 行加入 PBST（pH 6.0），作为空白对照。第 7、8 列加入 PBST（pH 7.4）作为解离溶液。上述各样品与溶液的加样量均为每孔 200 μL。

检测：取传感器板与检测板置传感器支架上，在 Data Acquisition 7.0 软件中将检测条件设置如下。第 1 列：基线，60s；第 2 列：上样，持续 600 s，加载至传感器信号位移达到约 1 nm 结束；第 3 ～ 4 列：平衡，120 s；样品 5 ～ 6 列：结合，180 s；第 7 ～ 8 列：解离，300 s。共计检测 2 个循环。pH 6.0 和 7.4 条件下，**1** 与 FcRn 亲和力测定的信号图如图 7 所示。从原始结合响应幅度及其随浓度变化的趋势明确可见，在 pH 6.0 下结合作用显著，而 pH 7.4 下结合作用非常弱。

数据分析与结果：以对应的未结合样品的 FcRn



A—pH 6.0；B—pH 7.4。

—14 600 nmol/L；—7 300 nmol/L；—3 650 nmol/L；—1 825 nmol/L；—912 nmol/L；—0。

图 7　1 与 FcRn 的结合与解离曲线图

Fig.7　Binding and Dissociation Curves of **1** with FcRn

传感器作为对照扣减背景，使用 Data Analysis 8.1 软件按 1 ∶ 1 结合模型进行全局拟合，计算结合速率常数（K_{on}）、解离速率常数（K_{off}）及平衡解离常数（K_D）。结果（表 5）显示，在 pH 6.0 条件下，**1** 与 FcRn 表现出可检测的结合响应，且随浓度升高，整体呈增强趋势，全局拟合得表观 K_D 为 10.8 nmol/L；在 pH 7.4 条件下，计算得表观 K_D 为 961×10^5 nmol/L，证明 **1** 与 FcRn 相互作用具有明显的 pH 依赖性。

表 5　1 与 FcRn 在 pH 6.0 与 7.4 下的结合动力学参数

Tab.5　Binding Kinetic Parameters of **1** with FcRn at pH 6.0 and 7.4

pH 值	K_{on}/(mol^{-1}·L·s^{-1})	K_{off}/(s^{-1})	K_D/(nmol·L^{-1})
6.0	5.42×10^4	5.86×10^{-4}	10.8
7.4	73.00	7.01×10^{-2}	9.61×10^5

3　讨论

IgG4 Fc 是构建长效化抗体药物的重要部分；其能通过 FcRn 介导的长半衰期显著延长药物作用时间，且大幅减弱了 ADCC/CDC 作用。而 **1** 在保留 IgG4 Fc 长效特性的同时，通过去除糖基化位点改造彻底消除 ADCC/CDC 作用，从而大幅规避了免疫风险[9]，为非细胞杀伤的治疗场景提供了更安全的解决方案；同时，对铰链区的改造，也使得 **1** 的 Fc 片段更稳定，可减少异源二聚体的产生，从而减轻后续复性与纯化负担。

E. coli 表达系统因成本低、周期短和产量高等优势，被广泛用于外源蛋白的制备。然而，该系统表达外源蛋白——尤其是 Fc 等二硫键较多的蛋白时易形成包涵体。而包涵体的变性与复性过程复杂，已成为制约外源蛋白制备效率的关键因素。许多治疗性蛋白从包涵体复性，获得正确折叠产物的得率往往仅 15%～25%[12]。本研究通过表达减少铰链区二硫键的 Fc 变体 **1** 以降低错配风险，并在后续变复性步骤中采用温和变性、低温滴加与稀释复性的方法，减少蛋白瞬间聚集与错误折叠，使 **1** 的复性率可达到约 37%，高于文献报道水平。由于错误折叠体电荷分布不同，复性后经过一步阳离子交换色谱可实现目标蛋白初步富集；后续的疏水色谱分离，可将疏水暴露较少的正确折叠体优先洗脱，得到高纯度（91.2%）的 **1**，产量达到 407.4 mg/L，高于现有报道[13]水平。此前的研究[14]常采用亲和色谱（Protein A/G）纯化 Fc，成本较高；而本研究设计的纯化工艺使 Fc 片段的大规模生产更加经济、可行。鉴于目前工艺中纯化收率仍有较大提升空间，后续研究将优化包括洗脱梯度在内的工艺参数，以期进一步提升纯化收率。

本研究建立了一条稳定、低成本、高复性率的 Fc3 片段制备工艺路线，并表征了产物的结合活性，证明了有效性，为后续 Fc 及其变体类蛋白的进一步开发与大规模化生产提供了方法学借鉴。

参考文献：

[1] ABDELDAIM D T, SCHINDOWSKI K. Fc-engineered therapeutic antibodies: recent advances and future directions [J]. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(10): 2402.

[2] LAMAMY J, BOULARD P, BRACHET G, *et al*. Ways in which the neonatal Fc-receptor is involved in autoimmunity [J]. *J Transl Autoimmun*, 2021, **4**: 100122.

[3] DUMONT J, EUWART D, MEI B S, *et al*. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, **36**(6): 1110-1122.

[4] BRENNAN F R, POLLI J R, SATHISH J, *et al*. Impact of antibody Fc engineering on translational pharmacology, and safety: insights from industry case studies [J]. *MAbs*, 2025, **17**(1): 2505092.

[5] LABRIJN A F, JANMAAT M L, REICHERT J M, *et al*. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, **18**(8): 585-608.

[6] 苗朝悦, 杜 乐, 王佳琦, 等. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略[J]. 中国生物工程杂志, 2023, **43**(9): 33-45.

[7] ISHIKAWA S, ISHIKAWA H, SATO A. Improved refolding of a human IgG1 Fc (CH_2-CH_3) scaffold from its inclusion body in *E. coli* by alkaline solubilization [J]. *Biol Pharm Bull*, 2022, **45**(3): 284-291.

[8] BHATWA A, WANG W J, HASSAN Y I, *et al*. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, **9**: 630551.

[9] TAGMOSE T M, PEDERSEN K M, PRIDAL L, *et al*. Molecular engineering of efficacious mono-valent ultra-long acting two-chain insulin-Fc conjugates [J]. *J Med Chem*, 2022, **65**(3): 2633-2645.

[10] POURI S, TORKASHVAND F, AGHAMIRZA MOGHIM ALIABADI H, *et al*. Quality by design in downstream process development of romiplostim [J]. *Iran Biomed J*, 2022, **26**(6): 414-425.

[11] DAMELANG T, BRINKHAUS M, van OSCH T L J, *et al*. Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions [J]. *Front Immunol*, 2024, **14**: 1304365.

[12] EBNER J, HUMER D, KLAUSSER R, *et al*. At-line reversed phase liquid chromatography for in-process monitoring of inclusion body solubilization [J]. *Bioengineering* (Basel), 2021, **8**(6): 78.

[13] TUNGEKAR A A, RUDDOCK L W. Efficient production of Fc fusion proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*: dissecting and mitigating redox heterogeneity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(23): 14740.

[14] CHEHRAGHI E J, AKBARZADEHLALEH P, SHAMSASENJAN K. Purification of monoclonal antibodies using chromatographic methods: increasing purity and recovery [J]. *Adv Pharm Bull*, 2025, **15**(1): 27-45.