OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Effect of temperature on agitation-induced aggregation of therapeutic proteins
Author(s)	Wang, Zekun
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105406
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name (WANG ZEKUN)	
Title	Effect of temperature on agitation-induced aggregation of therapeutic proteins (治療用タンパク質の振動による凝集に対する温度の影響)

Abstract of Thesis

Chapter 1: General introduction

Biopharmaceuticals, including therapeutic proteins, have developed rapidly. Their high specificity and low side effects offer remarkable advantages in treating various diseases. However, due to their structural complexity and intrinsic instability, therapeutic proteins are highly susceptible to various environmental factors during manufacturing, transportation, and administration. Such factors can trigger protein aggregates, which can threaten the effectiveness and safety of the biopharmaceuticals. Although previous studies have elucidated individual aggregation mechanisms induced by single factor such as heat, or agitation, real-world environments often involve multiple factors acting simultaneously. In this study, a Fc fusion protein, CTLA4-Ig, and a monoclonal antibody, Adalimumab, were employed as model proteins to investigate how temperature influences agitation-induced aggregation. This research provides mechanistic insight into aggregation behavior under multiple factor conditions and contributes to establishing a scientific basis for stability assessment and quality control of biopharmaceuticals.

Chapter 2: Evaluation of the effect of temperature on agitation-induced protein aggregation

In chapter 2, aggregates ranging from nanometers to micrometers were characterized using multiple analytical techniques, including size-exclusion chromatography, dynamic light scattering, and flow imaging microscopy. The aggregation behaviors differed significantly between elevated temperature and agitation. CTLA4-Ig aggregated through the bulk solution pathway under elevated temperature, while aggregates formed through interface-mediated pathway under agitation. When both factors were applied simultaneously, soluble aggregates showed both patterns, and insoluble aggregates increased by 2-3 order of magnitude compared with individual factor or control samples. Further synergistic effect analysis revealed that elevated temperature and agitation had a competitive effect on the amount of thermal induced aggregates while exhibiting a synergistic effect on the amount of agitation-induced aggregates.

Chapter 3: Mechanistic insights into the effect of temperature on agitation-induced protein aggregation

The mechanistic insight into how elevated temperature accelerates agitation-induced aggregation was investigated in this chapter. Samples containing different ratios of thermal-induced aggregates and monomers were exposed to the agitation. The amount of agitation-induced aggregates was not affected by the difference in thermal-induced aggregate ratio, while the size distribution of agitation induced aggregates was affected. Therefore, the acceleration effect of elevated temperature was likely due to accelerating the adsorption of proteins onto the interface and unfolding at the interface. Aggregation threshold study under combined elevated temperature and agitation was conducted on both CTLA4-Ig and Adalimumab. The aggregation threshold depended on temperature and protein type, indicating the complexity and protein specificity of protein aggregation.

Chapter 4: Conclusion

This study demonstrated temperature could accelerate agitation-induced aggregation when both factors were applied. It highlights the importance of temperature control during agitation stability test to reproduce real-world conditions. In addition, it also highlighted the value of using elevated temperature during agitation for accelerated stability tests, analytical method development, and evaluation of stability under accidental exposure to extreme conditions. Overall, this research provides mechanistic and practical insights into protein aggregation under multiple environment factors, offering a scientific foundation for improving stability testing, quality control, and risk management throughout the life cycle of biopharmaceuticals.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　WANG　ZEKUN　）	
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	内山　進
	副 査　教授	大政　健史
	副 査　教授	紀ノ岡 正博
	副 査　准教授	鳥巣　哲生

論文審査の結果の要旨

バイオ医薬品は高い治療効果と低副作用性により、近年急速に発展している。しかし、バイオ医薬品の有効成分であるタンパク質は安定性が低く、タンパク質医薬品は製造、輸送、保管、および投与に至る各段階において、様々な物理ファクターによる影響を避けることができず、これがタンパク質凝集の誘因となっている。タンパク質凝集体の生成は、薬効の低下や失活を招くだけでなく、重篤な場合には免疫原性反応を引き起こすリスクが指摘されている。したがって、凝集体の抑制は医薬品開発における重要な課題である。本博士論文は、タンパク質医薬品が製造後に直面する複合的な物理的要因下での安定性問題に着目し、特に温度と振動がタンパク質凝集体形成に及ぼす影響、およびそのメカニズムについて重点的な検討を行っていた。タンパク質医薬品の臨床応用が拡大するのに伴い、実際の流通過程における温度変動や振動の発生は不可避である。したがって、複合的な物理的要因がタンパク質凝集に及ぼす影響とそのメカニズムの解明を通じて、バイオ医薬品の品質管理、リスク評価、および製剤最適化設計に寄与する本研究は、高い学術的価値と実践的意義を有している。

本論文では、Fc 融合タンパク質およびモノクローナル抗体をモデルタンパク質とし、サイズ排除クロマトグラフィー（SE-HPLC）、フローイメージング顕微鏡（FIM）、および動的光散乱（DLS）などの分析手法を用いて、溶液中のタンパク質モノマー、可溶性凝集体、および不溶性凝集体の経時変化を定量的に評価した。その結果、温度と振動が異なる経路を介してタンパク質凝集体を形成することを明らかにした。これら二つの要因による影響は単なる相加効果ではなく相乗効果を示すものであり、この発見は複雑な環境ストレス下におけるタンパク質の不安定化挙動を理解するための重要な実験的根拠を提供している。

さらに、本論文では界面を介したタンパク質凝集メカニズムの解明を行っている。その結果、振動条件下において、界面がタンパク質分子の吸着、アンフォールディング、および凝集体の脱離プロセスにおいて重要な役割を果たしていることが示された。また、温度の上昇がタンパク質の吸着とアンフォールディングを加速させ、界面を介したタンパク質凝集を促進することを明らかにした。そして、振動条件下において、温度変動に対する安定性がタンパク質の種類によって異なるというタンパク質特異性を見出しており、この知見は凝集メカニズムの解明に向けた貴重な示唆を与えるものである。

また、本論文では加速試験条件下で実際の輸送および操作環境を評価することの実現可能性を検討し、温度と振動パラメータの合理的な組み合わせによる効率的なリスク評価手法を提案した。さらに、強制分解試験が分析手法の開

発および凝集メカニズムの解明において重要な役割についても議論しており、これらの成果はバイオ医薬品の安定性評価や製剤開発における重要な基盤となっている。

以上のように、本論文は複合的な物理的要因の条件下におけるタンパク質凝集の定量評価およびそのメカニズムの解明を行い、振動条件下における界面を介した凝集体の形成に関する理解を深化させた。この研究が、複合的な物理的要因を活用した実際の輸送・保管・投与プロセスための安定性評価の手法を提供し、タンパク質医薬品の品質確保に貢献すると期待される。よって，本論文は博士論文として価値あるものと認める。