(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0054329
(43) 공개일자 2022년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/19 (2014.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01) *C12N 5/078* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/19 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7008492
(22) 출원일자(국제) 2020년08월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/046525
(87) 국제공개번호 WO 2021/034719
국제공개일자 2021년02월25일
(30) 우선권주장
62/887,923 2019년08월16일 미국(US)
63/065,337 2020년08월13일 미국(US)

(71) 출원인
셀파이어, 인크.
미국 매릴랜드주 (우편번호 20850) 록빌 키 웨스트 애비뉴 9430
(72) 발명자
모스코위츠 키스 앤드류
미국, 인디애나 46074, 웨스트필드, 14974 던헤이븐 드라이브
이쉴러 브래든 칼
미국, 메릴랜드 20879, 게이더스버그, 아파트먼트 에이치, 410 블루 실크 레인
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

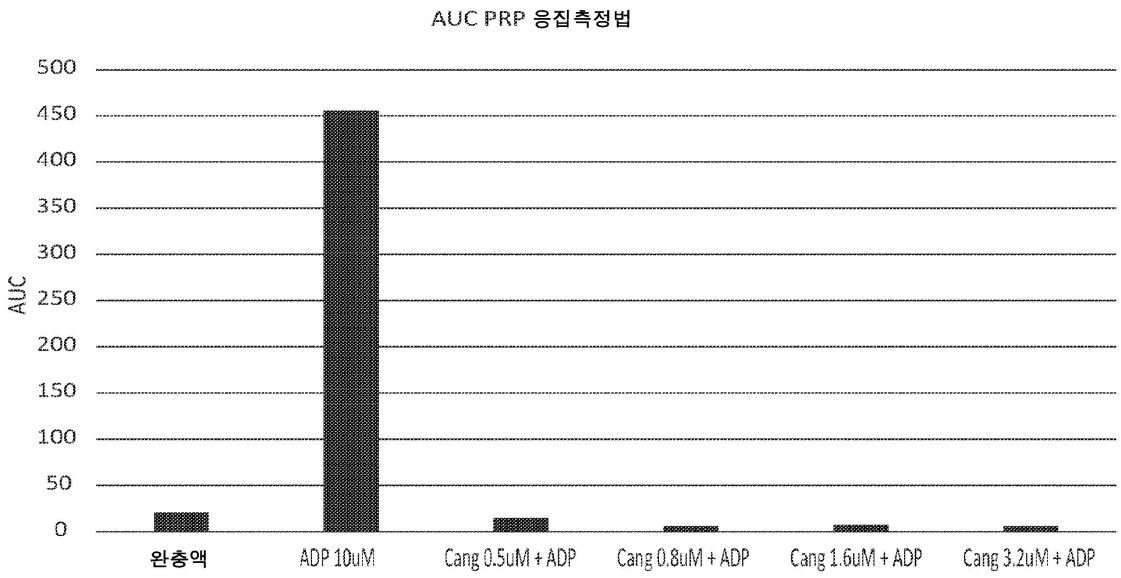
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 **항혈소판제 역전제로서 트롬보솜**

(57) 요 약

일부 실시형태에서 대상체에서 응고병증을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 7/04 (2018.01)
C12N 5/0644 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
(72) 발명자
디커슨 윌리엄 매튜
미국, 디스트릭트 오브 콜롬비아 20005, 워싱턴, 1401 처치 스트리트 엔더블유 넘버311
탠던 나렌드라 나스
미국, 메릴랜드 20189, 게이더스버그, 7102 스트레이터스 레인
리 앰버 니콜
미국, 메릴랜드 20850, 록빌, 1747 예일 플레이스

명 세 서

청구범위

청구항 1

대상체에서 정상 지혈작용을 회복시키는 방법으로서, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 정상 지혈작용 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있는, 방법.

청구항 2

대상체에서 정상 지혈작용을 회복시키는 방법으로서, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 정상 지혈작용 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있는, 방법.

청구항 3

대상체에서 응고병증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있는, 방법.

청구항 4

대상체에서 응고병증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있는, 방법.

청구항 5

수술을 위해 대상체를 준비하는 방법으로서, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있는, 방법.

청구항 6

수술을 위해 대상체를 준비하는 방법으로서, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있는, 방법.

청구항 7

제5항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 수술은 응급 수술인, 방법.

청구항 8

제5항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 수술은 예정된 수술인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 항혈소판제로 치료를 받고 있는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 항혈소판제를 이용한 치료가 중단된, 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 항혈소판제를 이용한 치료가 계속되는, 방법.

청구항 12

대상체에서 항혈소판제의 효과를 개선하는 방법으로서, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 항혈소판제의 효과 개선을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 13

대상체에서 항혈소판제의 효과를 개선하는 방법으로서, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 항혈소판제의 효과 개선을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 항혈소판제의 효과는 항혈소판제의 과다투여의 결과인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 항-섬유소용해제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 항-섬유소용해제는 ε-아미노카프로산(EACA), 트라넥삼산, 아프로티닌, 아미노메틸벤조산, 피브리노겐, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 혈소판 또는 혈소판 유도체에는 항-섬유소용해제가 장입되는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항혈소판제는 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙, 보충제, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항혈소판제는 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙, 테루트로반, 피코타미드, 엘리노그렐, 티클로피딘, 이부프로펜, 보라팍사, 아토팍사, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항혈소판제는 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙, 테루트로반, 피코타미드, 엘리노그렐, 티클로피딘, 이부프로펜, 보라팍사, 아토팍사, 실로스타졸, 프로스타글란딘 E1, 에포프로스테놀, 디피리다몰, 트레프로스티닐 소듐, 사르포그렐레이트, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 국소적으로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 비경구로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 정맥내로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 근육내로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 경막내로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 피하로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 복강내로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 투여 단계 이전에 건조되는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 조성물은 건조 단계에 이어서 재수화되는, 방법.

청구항 30

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 투여 단계 이전에 빙결-건조되는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 조성물은 빙결-건조 단계에 이어서 재수화되는, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인큐베이션제는 포스페이트 염, 나트륨 염, 칼륨 염, 칼슘 염, 마그네슘 염, 및 이의 둘 이상의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 염을 포함하는, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 인큐베이션제는 담체 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 완충액은 HEPES, 중탄산나트륨($NaHCO_3$), 또는 이의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 하나 이상의 당류를 포함하는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 하나 이상의 당류는 트레할로스를 포함하는, 방법.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 하나 이상의 당류는 폴리수크로스를 포함하는, 방법.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 당류는 덱스트로스를 포함하는, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 유기 용매를 포함하는, 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 혈소판 또는 혈소판 유도체는 트롬보솜을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호-참조**

[0002] 본 출원은 2019년 8월 16일에 출원된 미국 가출원 일련번호 62/887,923 및 2020년 8월 13일에 출원된 미국 가출원 일련번호 63/065,337에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각은 그 전체로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 개시내용은 약물-유발된 응고병증에 대한 치료로서 트롬보솜의 용도를 기술하는 역할을 한다. 아스피린이나 클로피도그렐과 같은 항혈소판 약물의 사용은 증가된 출혈 가능성을 초래할 수 있다. 본 명세서에서 본 발명자들은 트롬보솜이 이 억제를 우회하거나 극복하여 지혈작용을 회복할 수 있음을 입증한다.

배 경 기 술

[0005] 항혈소판 약물(또한 본 명세서에서 항혈소판제로 지칭됨)은 미국 성인 집단에서 일반적이고 혈소판 작용을 억제하는 다중 메커니즘을 이용한다. 항혈소판 약물은 다수의 뇌혈관 및 심혈관 질환을 치료 및/또는 예방하는 데 사용된다.

[0006] 그러나, 항혈소판 약물은 많은 약물-관련 부작용(ADE)의 원인이 된다. 이들 약물과 관련된 과다투여 및 부작용은 환자 집단에서 심각한 출혈 및 관련 합병증의 위험을 수반한다. 부가하여, 항혈소판 약물로 치료받은 대상체는, 비록 치료의 중단이 대상체에게 심장마비, 뇌졸중 또는 사망에 대한 위험을 증가시킬 수 있지만 수술 전에 대상체가 약물을 줄여야 필요가 있을 수 있기 때문에, 수술에 대한 추가적인 합병증에 직면한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 당업계에서는 항혈소판제-유발된 응고병증과 같은 응고병증의 치료에 대한 요구뿐만 아니라 수술을 위해 항-혈소판 약물을 복용하는 대상체를 준비하기 위한 해결책에 대한 요구가 존재한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일부 실시형태에서 대상체에서 응고병증을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0009] 일부 실시형태에서, 대상체에서 응고병증을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0010] 일부 실시형태에서, 대상체에서 정상 지혈작용을 회복시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 정상 지혈작용 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함

한다.

[0011] 일부 실시형태에서, 대상체에서 정상 지혈작용을 회복시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 정상 지혈작용 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0012] 일부 실시형태에서, 수술을 위해 대상체를 준비하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 구현에는 다음 특성 중 하나 이상이 포함될 수 있다. 수술은 응급 수술이 될 수 있다. 수술은 예정된 수술일 수 있다.

[0013] 일부 실시형태에서, 수술을 위해 대상체를 준비하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 구현에는 다음 특성 중 하나 이상이 포함될 수 있다. 수술은 응급 수술이 될 수 있다. 수술은 예정된 수술일 수 있다.

[0014] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있다. 일부 실시형태에서, 항혈소판제로의 치료는 중단될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항혈소판제로의 치료는 계속될 수 있다.

[0015] 일부 실시형태에서, 대상체에서 항혈소판제의 효과를 개선하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 항혈소판제 효과 개선을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0016] 일부 실시형태에서, 대상체에서 항혈소판제의 효과를 개선하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 항혈소판제 효과 개선을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0017] 일부 실시형태에서, 항혈소판제의 효과는 항혈소판제의 과다투여의 결과일 수 있다.

[0018] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙 및 보충제로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0019] 본 명세서에서의 임의의 방법 중 일부 실시형태는 다음 특성 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 투여는 국소적으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 투여는 비경구적으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 투여는 정맥내로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 투여는 근육내로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 투여는 경막내로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 투여는 피하로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 투여는 복강내로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 조성물은 투여 단계 이전에 건조될 수 있다. 조성물은 건조 단계에 이어서 재수화될 수 있다. 조성물은 투여 단계 이전에 동결-건조될 수 있다. 조성물은 동결-건조 단계에 이어서 재수화될 수 있다. 인큐베이션제는 포스페이트 염, 나트륨 염, 칼륨 염, 칼슘 염, 마그네슘 염, 및 이들의 둘 이상의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 염을 포함할 수 있다. 인큐베이션제는 담체 단백질을 포함할 수 있다. 완충액은 HEPES, 중탄산나트륨($NaHCO_3$) 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 조성물은 하나 이상의 당류를 포함할 수 있다. 하나 이상의 당류는 트레할로스를 포함할 수 있다. 하나 이상의 당류는 폴리수크로스를 포함할 수 있다. 하나 이상의 당류는 덱스트로스를 포함할 수 있다. 조성물은 유기 용매를 포함할 수 있다. 혈소판 또는 혈소판 유도체는 트롬보솜을 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] **도 1**은 칸그렐러의 증가하는 농도가 있는 및 없는 10 μM 아데노신 디포스페이트(ADP) 활성화에 의해 유도된, 통합 응집 곡선으로 표현된, 혈소판 풍부 혈장에서 칸그렐러("Cang")의 투과광 응집측정법을 도시한다.

도 2는 T-TAS® 기술을 사용한 혈소판 폐색에 대한 칸그렐러, ADP 또는 이의 조합의 효과를 도시한다.

도 3은 도 2로부터의 데이터 세트에 대한 곡선 아래 면적(AUC)의 막대 플롯이다. 도 2로부터의 복제 데이터 세

트는 평균으로 표시된다.

도 4는 도 2로부터의 데이터 세트에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다. 도 2로부터의 복제 데이터 세트는 평균으로서 표시된다.

도 5는 T-TAS® 기술을 사용하여 혈소판 폐색에 대해 재수화-후 60, 90, 또는 115분에서 ADP 및 칸그렐러의 존재 및 부재에서 혈소판 풍부 혈장에 보충된 트롬보솜("thromb"; 300,000/μL)의 효과를 도시한다.

도 6은 도 5로부터의 데이터 세트에 대한 AUC의 막대 플롯이다. 도 5로부터의 복제 데이터 세트는 평균으로서 도시된다.

도 7은 도 5로부터의 데이터 세트에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다. 도 5로부터의 복제 데이터 세트는 평균으로 도시된다.

도 8은 콜라겐(10μg/mL) 및 다양한 농도의 엡티피바타이드("Epti")로 처리된 혈소판(μL당 250,000개 혈소판의 농도)에 대한 응집 실험으로부터의 AUC의 막대 플롯이다.

도 9는 T-TAS® 기술을 사용하여 전혈에 대한 다양한 농도에서 엡티피바타이드의 효과를 도시한다.

도 10은 T-TAS® 기술을 사용하여 다양한 농도의 엡티피바타이드가 있는 및 없는 전혈에 대한 트롬보솜("Tsomes") 보충(대략 200,000/μL)의 효과를 도시한다.

도 11은 도 10으로부터의 데이터 세트에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다.

도 12는 도 10으로부터의 데이터 세트에 대한 AUC의 막대 플롯이다.

도 13은 혈소판-결핍 혈장(PPP)에서 엡티피바타이드의 존재에서 트롬보솜(다양한 로트)이 폐색됨을 도시한다.

도 14는 도 13으로부터의 데이터 세트에 대한 AUC의 막대 플롯이다. 도 13의 복제 데이터 세트는 평균으로 도시된다.

도 15는 도 13으로부터의 데이터 세트에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다. 도 13의 복제 데이터 세트는 평균으로 도시된다.

도 16은 다양한 농도의 아스피린("ASA")이 있는 및 없는 콜라겐(10μg/mL) 또는 아라키돈산("AA"; 500μg/L)으로 처리된 혈소판에 대한 응집 실험으로부터의 AUC의 막대 플롯이다.

도 17은 T-TAS® 기술을 사용하여 전단 하에서 콜라겐 코팅된 플라스틱에 대한 반응에 의해 측정된, 전혈, 다양한 농도의 아스피린(ASA)으로 처리된 전혈, 및 다양한 농도의 아스피린으로 처리되고 트롬보솜(대략 200,000-400,000/μL)이 보충된 전혈에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다.

도 18은 트롬보플라스틴과 콜라겐으로 코팅된 T-TAS AR 칩 상에서 폐색 시간에 의해 측정된, ASA(200 마이크로몰), 칸그렐러(1 마이크로몰), AP2 6F1(40 마이크로그램)의 존재에서 전혈에서 트롬보솜에 의해 촉진된 혈전 형성의 회복을 도시한다.

도 19는 시간 경과에 걸친 폐색(압력)에 의해 측정된, ASA(200 마이크로몰), 칸그렐러(1 마이크로몰) 및 6F1(40 마이크로그램/mL)의 존재에서 전혈에서 트롬보솜에 의해 촉진된 혈전 형성의 회복을 도시한다.

도 20은 AUC에 의해 측정된, 고전단 하에 플라스틱 고정화된 돼지 콜라겐과의 상호작용에 대한 아스피린-(ASA-)억제된 전혈(500 마이크로몰)에 대한 트롬보솜 보충의 효과를 도시한다.

도 21은 시간 경과에 걸친 폐색(압력)에 의해 측정된, 고전단 하에 플라스틱 고정화된 돼지 콜라주와의 상호작용에 대한 아스피린-(ASA-)억제된 전혈(500 마이크로몰)에 대한 트롬보솜 보충의 효과를 도시한다.

도 22는 AUC에 의해 측정된, 고전단 하에 플라스틱 고정화된 돼지 콜라주와의 상호작용에 대한 아스피린-(ASA-)억제된 전혈(100 마이크로몰)에 대한 트롬보솜 보충의 효과를 도시한다.

도 23은 시간 경과에 걸친 폐색(압력)에 의해 측정된, 고전단 하에 플라스틱 고정화된 돼지 콜라주와의 상호작용에 대한 아스피린-(ASA-)억제된 전혈(100 마이크로몰)에 대한 트롬보솜 보충의 효과를 도시한다.

도 24는 정상 및 아스피린-억제된 혈장에 대한 트롬보솜 보충의 피크 트롬빈에 대한 효과를 도시한다.

도 25a는 T-TAS® 기술을 사용한 혈소판 폐색에 대한 칸그렐러 단독 또는 칸그렐러 플러스 트롬보솜의 효과를

도시한다.

도 25b는 도 25a로부터의 데이터 세트에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다.

도 26a는 T-TAS® 기술을 사용한 혈소판 폐색에 대한 티로피반 단독 또는 무작위 공여자 혈소판(RDP) 또는 트롬보솜과의 효과를 도시한다.

도 26b는 도 26a로부터의 데이터 세트에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다.

도 27a는 T-TAS® 기술을 사용한 혈소판 폐색에 대한 엡티피바타이드 단독, 또는 RDP 또는 트롬보솜과의 효과를 도시한다.

도 27b는 도 27a로부터의 데이터 세트에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다.

도 28a는 T-TAS® 기술을 사용한 혈소판 폐색에 대한 AP2 단독, 또는 RDP 또는 트롬보솜과의 효과를 도시한다.

도 28b는 도 28a로부터의 데이터 세트에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다.

도 29a는 T-TAS® 기술을 사용한 아스피린 요법에 대한 대상체로부터 취한 PRP에 대한 트롬보솜의 효과를 도시한다.

도 29b는 도 29a로부터의 데이터 세트에 대한 폐색 시간의 막대 플롯이다.

도 30a는 트롬빈 생성에 대한 아스피린 요법에 대한 대상체로부터 취한 PRP에 대한 트롬보솜의 효과를 도시한다.

도 30b는 첨가된 트롬보솜이 있거나 없는, 아스피린 요법에 대한 대상체로부터 취한 PRP에 대한 트롬빈 생성 매개변수의 막대 플롯이다.

도 31a는 첨가된 완충액, 아라키돈산 또는 콜라겐이 있는, 이부프로펜 요법에 대한 대상체로부터 취한 PRP의 집합측정을 도시한다.

도 31b는 트롬보솜을 갖는 및 갖지 않는 이부프로펜 요법에 대한 대상체로부터 취한 PRP에 대한 ADP의 효과를 도시한다.

도 32는 초약학적 용량의 클로피도그렐로 처리된 마우스의 출혈 시간에 대한 트롬보솜 투여 효과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 실시형태를 상세히 기술하기 전에, 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정한 실시형태를 기술하기 위한 것이고, 한정하려는 의도가 아님을 이해해야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 해당 용어가 속한 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 이제 기술된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물은 그 간행물이 인용된 것과 관련한 방법 및/또는 물질을 개시하고 기술하기 위해 참조로 본 명세서에 통합된다. 본 개시내용은 임의의 통합된 간행물과 충돌하는 정도까지 제어한다.

[0022] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "당류"에 대한 언급은 하나 이상의 당류, 및 당업자에게 공지된 그의 등가물에 대한 언급을 포함한다. 더욱이, 동등한 용어를 사용하여 기술될 수 있는 용어의 사용은 그들 동등한 용어의 사용을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 용어 "대상체"의 사용은 용어 "환자", "사람", "동물", "인간" 및 의료적 처리 대상인 것을 나타내기 위해 당업계에서 사용되는 기타 용어를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 단일 개념을 포괄하기 위해 다중 용어의 사용은 사용된 그들 용어로만 개념을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0023] 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 기술하기 위한 것이고, 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다. 더욱이, 값의 범위가 개시되는 경우, 당업자는 개시된 범위 내의 다른 모든 특정 값이 본 명세서에서 각각의 특정 값 또는 범위를 개시할 필요 없이 이들 값 및 이들이 나타내는 범위에 의해 본질적으로 개시된다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 1-10의 개시된 범위는 1-9, 1-5, 2-10, 3.1-6, 1, 2, 3, 4, 5 등을 포함한다. 부가하여, 각각의 개시된 범위는 범위의 더 낮은 값에 대해 최대 5% 더 낮은 값 및 범위의 더 높은 값에 대해 최대 5% 더 높은 값을 포함한다. 예를 들어, 4 - 10의 개시된 범위는 3.8 - 10.5를 포함한다. 이 개념은 이 문

서에서 용어 "약"에 의해 캡처된다.

[0024] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 용어 "혈소판"은 전체 혈소판, 단편화된 혈소판, 혈소판 유도체, 또는 트롬보솜을 포함할 수 있다. 상기 정의 내의 "혈소판"은 예를 들어 전혈 중 혈소판, 혈장 중 혈소판, 선택적으로 선택된 혈장 단백질이 보충된 완충액 중 혈소판, 저온 저장된 혈소판, 건조된 혈소판, 저온보존된 혈소판, 해동된 저온보존 혈소판, 재수화된 건조 혈소판, 재수화된 저온보존 혈소판, 동결보존된 혈소판, 해동된 동결보존 혈소판 또는 재수화 동결보존 혈소판을 포함할 수 있다. "혈소판"은 포유동물, 예컨대 인간, 또는 비-인간 포유동물의 "혈소판"일 수 있다.

[0025] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "트롬보솜"(때로는, 특히 실시예 및 도면에서 본 명세서에서 "Tsomes" 또는 "Ts"로 또한 지칭됨)은 인큐베이션제(예를 들어, 본 명세서에서 기술된 임의의 인큐베이션제)로 처리되고 저온보존(예컨대 동결-건조)된 혈소판 유도체이다. 일부 경우에, 트롬보솜은 모아진 혈소판으로부터 제조될 수 있다. 트롬보솜은 주위 온도에서 건조 형태로 2-3년의 저장 수명을 가질 수 있으며 즉각적인 주입을 위해 몇 분 이내에 멸균수로 재수화될 수 있다. 트롬보솜의 일 예는 혈소판감소증 환자에서 급성 출혈의 치료를 위한 임상 시험 중에 있는 THROMBOSOMES®이다. 전형적으로, 인자 IIa, VIIa, IX, Xa, XI, 조직 인자 또는 응고 인자의 비타민 K-의존적 합성(예를 들어, 인자 II, VII, IX 또는 X)을 억제하거나 안티트롬빈(예를 들어, 안티트롬빈 III)을 활성화하는 제제는 항응고제인 것으로 간주된다. 항응고제의 다른 메커니즘이 알려져 있다. 항응고제는 다비가트란, 아르가트로반, 히루딘, 리바록사반, 아픽사반, 에독사반, 폰다파리눅스, 와파린, 헤파린 및 저분자량 헤파린을 포함한다.

[0026] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "항혈소판제"는 항혈전제이고 항응고제를 포함하지 않는다. 항혈소판제의 예는 아스피린(아세틸살리실산 또는 ASA로도 지칭됨), 칸그렐러(예를 들어, KENGREAL®), 티카그렐러(예를 들어, BRILINTA®), 클로피도그렐(예를 들어, PLAVIX®), 프라수그렐(예를 들어, 에피언트®), 엡티피바타이드(예를 들어, INTEGRILIN®), 티로피반(예를 들어, AGGRASTAT®) 및 압식시맙(예를 들어, REOPRO®)을 포함한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 항혈소판제는 P2Y 수용체(예를 들어, $P2Y_{12}$), 당단백질 IIb/IIIa를 억제하거나 트롬복산 합성효소 또는 트롬복산 수용체를 길항하는 제제를 포함한다. 트롬복산 A_2 길항제의 비-제한적인 예는 아스피린, 테루트로반 및 피코타미드이다. P2Y 수용체 길항제의 비-제한적인 예는 칸그렐러, 티카그렐러, 엘리노그렐, 클로피도그렐, 프라수그렐, 및 티클로피딘을 포함한다. 당단백질 IIb/IIIa의 비-제한적인 예는 압식시맙, 엡티피바타이드 및 티로피반을 포함한다. NSAIDS(예를 들어, 이부프로펜)는 또한 본 개시내용의 목적을 위한 항혈소판제로 간주된다. 항-혈소판제의 다른 기전이 알려져 있다. 항혈소판제는 또한 PARI 길항제, PAR4 길항제 GPVI 길항제 및 알파2베타1 콜라겐 수용체 길항제를 포함한다. PAR-1 길항제의 비-제한적인 예는 보라팍사 및 아토팍사를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 아스피린은 항혈소판제인 것으로 간주되지만 항응고제는 아니다. 항혈소판제의 추가의 비-제한적인 예는 실로스타졸, 프로스타글란딘 E1, 에포프로스테놀, 디피리다몰, 트레프로스티닐 소듐 및 사르포그렐레이트를 포함한다.

[0027] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙, 테루트로반, 피코타미드, 엘리노그렐, 티클로피딘, 이부프로펜, 보라팍사, 아토팍사 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙, 테루트로반, 피코타미드, 엘리노그렐, 티클로피딘, 이부프로펜, 보라팍사, 아토팍사, 실로스타졸, 프로스타란딘 E1, 에포프로스테놀, 디피리다몰, 트레프로스티닐 소듐, 사포그렐레이트 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 본 명세서에 기재된 임의의 항혈소판제 중 2종 (또는 그 초과)과 같은 다중 항혈소판제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 아스피린 및 클로피도그렐일 수 있다.

[0028] 클로피도그렐, 티카그렐러 및 프라수그렐 같은 칸그렐러는 혈소판 상의 $P2Y_{12}$(ADP) 수용체를 차단한다. 칸그렐러는 일부 경우에서 이 부류의 약물을 대표하는 데 사용될 수 있다. 칸그렐러는 클로피도그렐 및 프라수그렐과 달리 생물학적으로 활성화되기 위해 간 대사를 필요로 하지 않는다.

[0029] 엡티피바타이드는 혈소판에 대한 GPIIb-IIIa 수용체의 피브린 결합 역할을 차단하는 펩티드 치료제이다. 약물은 전형적으로 180 μg/kg 볼러스 후 2 μg/kg/분 연속 주입으로 IV를 통해 투여된다. 엡티피바타이드의 혈중 농도는 전형적으로 약 1-2 μM이다. 출혈 시간은 일반적으로 약물 중단의 약 1시간 이내에 정상으로 돌아온다.

[0030] 아스피린은 비가역적인 사일코옥시게나제(COX) 억제제이다. 혈소판에서 COX 효소는 트롬복산 A2, 프로스타글란딘 E2 및 프로스타사이클린(PGI2)의 합성을 담당한다. 아스피린은 혈소판 내 COX 효소를 영구적으로 비활성화시키고, 혈소판은 새로운 효소를 합성하기 위한 핵물질을 갖지 않기 때문에 아스피린 효과를 극복하기 위해서는 새로운 혈소판이 생성되어야 한다. 트롬복산 A2가 없으면 프로스타글란딘 E2 및 프로스타사이클린(PGI2) 혈소판은 그의 항-응집 활성이 제한된다. 많은 사람들이 원치 않는 응고 현상을 예방하기 위해 저용량의 아스피린을 유지한다. 아스피린 생체이용률은 500μM의 피크에서 단일 500mg 용량 IV 및 44μM에서 동일한 용량 경구로, 투여 경로에 따라 크게 달라진다.

[0031] 항혈소판 부류의 약물은 심부전, 뇌졸중 등을 유발하는 원치 않는 응고 에피소드를 예방하기 위해 널리 사용된다. 많은 경우에 항혈소판 약물은 되돌리거나 중단될 필요가 있을 수 있다. 사전 예고의 경우에, 사전-계획된 수술 상황과 같이 항혈소판 약물 투여를 수술 전에 중단하는 경우가 있어 수술 중에 원치 않는 출혈을 예방할 수 있다. 항혈소판제가 신속하게 역전되어야 하는 경우에, 역전제는 전형적으로 쉽게 구할 수 없거나 비싸거나, 또는 환자에게 심각한 위험을 수반한다. 신속한 항혈소판 역전이 필요한 경우에, 혈소판 수혈이 전형적으로 투여되지만 이에 대한 반응은 단지 부분적 역전인 경우가 자주 있다. 이 역전 과정의 경고는 새로이-주입된 혈소판 자체가 순환 약물 항혈소판 활성에 민감한 반면, 일부 실시형태에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물(예를 들어, 트롬보솜 포함)은 그렇지 않다는 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물(예를 들어, 트롬보솜 포함)은 활성 역전제이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물(예를 들어, 트롬보솜 포함)의 지혈 활성은 항혈소판 약물에 양보하지 않는다.

[0032] 일부 예시적인 항혈소판제 및 잠재적인 역전의 방법이 하기에 기재되어 있다.

[0033] 아세틸살리실산(ASA; 아스피린) - 아스피린은 혈소판에서 COX-1 차단제로서 작용하여, 혈소판-유래 트롬복산 형성을 비가역적으로 억제함에 의해 혈소판을 불활성화시킨다. 임상적으로, 아스피린은 응급 상황에서 혈소판 수혈을 하거나 미래에 수술이 예정된 치료를 중단함에 의해 종종 역전된다.

[0034] 클로피도그렐(예를 들어, PLAVIX®) - 클로피도그렐은 ADP가 혈소판 상의 그 수용체에 결합하는 것을 방지하는 작용을 한다. ADP 결합은 혈소판 모양 변화와 응집을 유발한다. 클로피도그렐은 비-가역적이다. 임상적으로, 클로피도그렐은 응급 상황에서 혈소판 수혈을 하거나 미래에 수술이 예정된 치료를 중단함에 의해 종종 역전된다.

[0035] 칸그렐러(예를 들어, KENGREAL®) - 칸그렐러는 ADP가 혈소판 상의 그 수용체에 결합하는 것을 방지하는 작용을 한다. ADP 결합은 혈소판 모양 변화와 응집을 유발한다. 클로피도그렐은 가역적이고 주입 중단 대략 1시간 후에 혈소판 기능이 회복된다. 임상적으로는 그것은 일반적으로 시술 후 역전이 필요할 때 선호된다.

[0036] 티카그렐러(예를 들어, BRILINTA®) - 티카그렐러는 ADP가 그 수용체에 결합하는 것을 방지하는 작용을 하고 역작용제로서 작용한다. 티카그렐러는 가역적이고 혈소판 기능은 마지막 투여의 대략 72시간 후에 복원될 수 있다. 티카그렐러의 작용의 역전은 마지막 용량 후 시간에 영향을 받을 수 있다. 마지막 용량이 이전 24시간보다 길면 혈소판 수혈이 종종 결과를 역전시키는 치료가 될 수 있다.

[0037] 에피언트(예를 들어, PRASUGREL®) - 에피언트는 ADP가 그 수용체에 결합하는 것을 방지하는 작용을 하고 비-가역적 길항제로서 작용한다. 그것은 비-가역적 길항제이기 때문에 그 효과를 극복하기 위해 새로운 혈소판이 형성되어야 한다. 임상적으로 에피언트는 응급 상황에서 혈소판 수혈을 하거나 미래 수술이 예정된 치료를 중단함에 의해 역전된다.

[0038] 엡티피바타이드(인테그릴린) - 엡티피바타이드는 GpIIb/IIIa를 차단하는 작용을 하고 가역적 길항제로서 작용한다. 임상적으로 인테그릴린은 응급 상황에서 혈소판 수혈을 하거나 미래 수술이 예정된 치료를 중단함에 의해 역전된다.

[0039] 현재 항혈소판 약물에 대한 치료 방법으로 혈소판 주입이 사용되고 있지만, 혈소판 수혈은 이들 약물의 효과를 희석시키는 작용을 할 뿐이다. 일부 실시형태에서, 트롬보솜은 이들 약물에 반응하지 않고 응고를 돕는 그 능력을 유지한다. 이것은 트롬보솜을 통한 치료를 완전히 독특하게 만들고 생성물에 대한 새로운 적용을 도입한다.

[0040] 혈소판-유래된 생성물은 현재 항응고/항혈소판 약물에 대한 치료 방법으로 사용되지 않고, 현재 항혈소판 약물에 대한 승인된 역전제는 없다. 따라서 응급 치료(수술-전, 외상 등)는 전형적으로 출혈을 피하거나 완화하기 위한 포괄적인 예방 조치이다. 비-제한적인 예는 혈장, 적혈구 및 항-섬유소용해제의 주입을 포함한다. 혈소판 유도체(예를 들어, 동결보존된 혈소판(예를 들어, 트롬보솜))는 이들 일반적인 치료에 대한 효과적인 대안 또는 보완이 될 수 있다.

[0041] 임의의 특정 이론에 얽매이지 않고, 트롬보솜은 항-응고제에 의해 억제되는 것 이상으로 트롬빈 생성을 증강시키기 위해 음으로 하전된 표면에 향응고제를 제공함에 의해 적어도 부분적으로 작용할 수 있다고 여겨진다. 유사하게, 임의의 특정 이론에 얽매이지 않고, 트롬보솜은 순환하는 혈소판에 결합하고 공동-응집함에 의해 적어도 부분적으로 작용할 수 있다고 여겨진다.

[0042] 출혈을 조절하고 치유를 개선하기 위한 생성물 및 방법이 본 명세서에 기술되어 있다. 본 명세서에 기술된 생성물 및 방법은 또한 항혈소판제(예를 들어, 아스피린(아세틸살리실산 또는 ASA로도 지칭됨), 칸그렐러(예를 들어, KENGREAL®), 티카그렐러(예를 들어, BRILINTA®), 클로피도그렐(예를 들어, PLAVIX®), 프라수그렐(예를 들어, EFFIENT®), 엡티피바타이드(예를 들어, INTEGRILIN®), 티로피반(예를 들어, AGGRASTAT®), 또는 압식시맙(예를 들어, REOPRO®))의 활성에 반대로 작용하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 기술된 생성물 및 방법은 상처의 봉합 및 치유를 도울 수 있는 실시형태에 대한 것이다.

[0043] 특정 실시형태에서, 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체와 같은 혈소판을 포함하는 조성물은 환자의 표면 또는 내부에서 상처에 전달될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체와 같은 혈소판을 포함하는 조성물은 접착 붕대, 압박 붕대, 액체 용액, 에어로졸, 매트릭스 조성물, 및 코팅된 봉합사 또는 기타 의료 봉합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 선택된 형태로 적용될 수 있다. 실시형태에서, 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체와 같은 혈소판을 포함하는 조성물은 환자의 표면 상의 환부의 전부 또는 일부에만 투여될 수 있다. 다른 실시형태에서, 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체와 같은 혈소판을 포함하는 조성물은 예를 들어 혈류를 통해 전신으로 투여될 수 있다. 실시형태에서, 혈소판 유도체의 적용은 2 또는 3일, 바람직하게는 5 내지 10일, 또는 가장 바람직하게는 최대 14일 동안 지혈 효과를 생성할 수 있다.

[0044] 일부 실시형태는 대상체에서 응고병증을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제(동결건조제로도 지칭됨), 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0045] 일부 실시형태는 대상체에서 응고병증을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0046] 본 명세서에 기재된 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 응고병증은 항혈소판제의 결과이다.

[0047] 일부 실시형태는 대상체에서 응고병증을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료되었거나 치료되고 있으며, 상기 방법은 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0048] 일부 실시형태는 대상체에서 응고병증을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있으며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0049] 일부 실시형태는 대상체에서 정상 지혈을 회복시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 정상 지혈 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0050] 일부 실시형태는 대상체에서 정상 지혈을 회복시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 정상 지혈 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0051] 일부 실시형태는 대상체에서 정상 지혈을 회복시키는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있으며, 상기 방법은 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량

의 조성물을 정상 지혈 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0052] 일부 실시형태는 대상체에서 정상 지혈을 회복시키는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있으며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 정상 지혈 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0053] 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 또한 일부 경우에 수술에 대해 대상체를 준비시키기 위해 투여될 수 있다. 항혈소판제를 복용하는 일부 환자의 경우 (예를 들어, 외상이나 기타 응급 수술의 경우) 수술 전에 항혈소판제의 투여량을 줄이는 것이 어렵거나 불가능할 수 있다. 항혈소판제를 복용하는 일부 환자의 경우, (예를 들어, 환자가 혈전성 사건(예를 들어, 심부정맥 혈전증, 폐색전증 또는 뇌졸중)의 위험이 있는 경우 항혈소판제의 투여량이 시간이 지남에 따라 감소된 경우 수술 전에 항혈소판제의 투여량을 줄이는 것이 바람직하지 않을 수 있다.

[0054] 따라서, 일부 실시형태는 수술에 대해 대상체를 준비시키기는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0055] 일부 실시형태는 수술에 대해 대상체를 준비시키기는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0056] 일부 실시형태는 수술에 대해 대상체를 준비시키기는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있으며, 상기 방법은 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0057] 일부 실시형태는 수술에 대해 대상체를 준비시키기는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있으며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0058] 일부 실시형태에서, 수술은 응급 수술(예를 들어, 외상의 경우) 또는 예정된 수술일 수 있다.

[0059] 일부 실시형태에서, 항응고제로의 치료가 (예를 들어, 수술을 위한 준비에서) 중단될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항응고제로의 치료가 계속될 수 있다.

[0060] 일부 실시형태는 대상체에서 항혈소판제의 효과를 개선하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 항혈소판제 효과 개선을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0061] 일부 실시형태는 대상체에서 항혈소판제의 효과를 개선하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 항혈소판제 효과 개선을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0062] 일부 경우에, 항혈소판제의 효과는 항혈소판제의 부정확한 투여량으로 인해 개선될 필요가 있을 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 항혈소판제의 효과는 항혈소판제의 과다투여에 이어서 개선될 수 있다. 일부 경우에는, 항혈소판제의 효과는 다른 약물(예를 들어, 제2 항혈소판제)과의 상호작용 가능성으로 인해 개선될 필요가 있을 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 항혈소판제의 효과는 둘 이상의 약물의 잘못된 투여에 이어서 개선될 수 있으며, 그 중 적어도 하나는 항혈소판제이다.

[0063] 본 명세서에 기재된 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 항-섬유소용해제와 같은 활성제를 추가로 포함할 수 있다. 항-섬유소용해제의 비-제한적 예는 ε-아미노카프로산(EACA), 트라넥삼산, 아프로티닌, 아미노메틸벤조산 및 피브리노겐을 포함한다. 일부 실시형태에서, 혈소판 또는 혈소판 유도체는 항-섬유소용해제와 같은

활성제로 장입될 수 있다.

[0064] 혈액(예를 들어, 대상체의 혈액)의 응고 매개변수는 본 명세서에 기술된 방법 동안 임의의 적절한 시간에 평가될 수 있다. 예를 들어, 혈액의 하나 이상의 응고 매개변수는 예를 들어, 본 명세서에 기술된 바와 같이 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물의 투여에 대한 필요성을 결정하기 위해, 본 명세서에 기술된 바와 같은 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물의 투여 전에 평가될 수 있다. 다른 예로서, 혈액의 하나 이상의 응고 매개변수는, 예를 들어, 투여된 조성물의 유효성을 결정하기 위해, 조성물의 추가 투여가 보장되는지 여부를 결정하기 위해, 또는 수술 절차를 수행하는 것이 안전한지 여부를 결정하기 위해, 본 명세서에 기재된 바와 같은 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물의 투여 후에 평가될 수 있다.

[0065] 따라서, 본 명세서에 기재된 임의의 방법은 본 명세서에 기재된 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물의 투여 전에 혈액의 하나 이상의 응고 매개변수를 평가하는 단계, 본 명세서에 기재된 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물의 투여 후에 혈액의 하나 이상의 응고 매개변수를 평가하는 단계, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다.

[0066] 임의의 적절한 방법을 사용하여 혈액의 응고 매개변수를 평가할 수 있다. 방법의 비-제한적 예는 프로트롬빈 시간 검정, 국제 정규화 비율(INR), 트롬빈 생성(TGA; 예를 들어 피크 트롬빈, 내인성 트롬빈 전위(ETP) 및 지연 시간과 같은 매개변수를 생성하는 데 사용될 수 있음), 혈소판탄성조영술(TEG), 활성화된 응고 시간(ACT) 및 부분적 트롬보플라스틴 시간(PTT 또는 aPTT)을 포함한다.

[0067] **트롬빈 생성**

[0068] 트롬빈 생성 검정은 형광 펩티드의 트롬빈 효소적 절단 및 형광 분자의 방출을 초래하는 항-응고제를 통한 샘플 활성화 후 트롬빈의 생산을 측정했다. 피크 트롬빈은 생성된 최대 트롬빈, 트롬빈 생성의 시작 시까지 지연 시간 및 잠재적으로 생성되는 총 트롬빈으로서 ETP의 척도이다.

[0069] 일부 실시형태에서, 환자는 본 명세서에 기재된 바와 같은 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물의 투여 전에 약 60nM 내지 약 170nM, 예컨대 약 65nM 내지 약 170nM, 예컨대 약 65nM 내지 약 120nM, 예컨대 약 80nM의 피크 트롬빈을 가질 수 있다.

[0070] TEG는 시간 경과에 따른 응고 강도의 플롯을 통해 고유 지혈을 평가한다. 염화칼슘($CaCl_2$)은 전형적으로 개시제로 사용된다. TEG 파형(예를 들어, 도 16 참고)에는 응고에 대한 정보를 제공할 수 있는 다중 매개변수가 있다.

[0071] **R-시간** = 반응 시간(초) - 테스트 시작부터 초기 섬유소 형성까지의 잠복 시간.

[0072] **K** = 역학(초) - 특정 수준의 응고 강도(예를 들어, 진폭 20mm)에 도달하는 데 걸리는 시간인, 초기 피브린 형성의 속도

[0073] **알파 각도** = R과 K 사이의 선 기울기 - 응고 형성 속도를 측정한다.

[0074] **MA** = 최대 진폭(mm) - 섬유소 응고의 극한 강도를 나타낸다.

[0075] A_{30} = 최대 진폭에 도달한 후 진폭 30분 - 용리 단계의 속도를 나타낸다.

[0076] 저응고성 혈액 상태에서, R-시간은 증가하고 MA는 감소한다. R-시간은 전형적으로 MA보다 더 넓은 반응 범위를 제공한다.

[0077] 총 혈전-형성 분석 시스템(T-TAS®, FUJIMORI KOGYO CO., LTD)에서, 샘플은 미네랄 오일을 사용하여 콜라겐-코팅된 마이크로채널을 통해 강제된다. 압력에서의 변화는 혈전 형성을 평가하는 데 사용된다. 폐색 시작 시간은 10kPa에 도달하는데 걸리는 시간이고 폐색 시간 = AR 칩(예를 들어, Zacros Item No, TC0101)을 사용하여 각 Δ80kPa까지 걸리는 시간임. 제조업체에 따르면 AR 칩은 주로 섬유소와 활성화된 혈소판으로 구성된 혼합된 백색 혈전의 형성을 분석하는 데 사용될 수 있다. 그것은 콜라겐 및 조직 인자로 코팅된 유로(폭 300㎛ 곱하기 높이 50㎛)를 가지고 응고 기능 및 혈소판 기능을 분석하는 데 사용될 수 있다. 이에 비해 PL 칩은 주로 활성화된 혈소판으로 구성된 혈소판 혈전의 형성을 분석하는 데 사용될 수 있다. PL 칩은 콜라겐으로만 코팅된 유로를 가지고 혈소판 기능을 분석하는 데 사용될 수 있다.

[0078] ACT 검정은 그 주변에 응고가 형성될 때 중력에 대한 자석의 저항에 의해 결정되는 응고 시간(t_{ACT})을 측정하는 가장 기본적이지만 아마도 가장 신뢰할 수 있는 방법이다. 전형적인 공여자 혈액은 $CaCl_2$만을 사용하는 t_{ACT} ~

200-300s를 갖는다.

[0079] 일부 실시형태는 대상체에서 트롬빈 생성을 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 트롬빈 생성 증가를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0080] 일부 실시형태는 대상체에서 트롬빈 생성을 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 트롬빈 생성 증가를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0081] 일부 실시형태는 대상체에서 피크 트롬빈을 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 피크 트롬빈 증가를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0082] 일부 실시형태는 대상체에서 피크 트롬빈을 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 피크 트롬빈 증가를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0083] 일부 실시형태에서, 투여 이전, 대상체의 피크 트롬빈은 66nM 미만(예를 들어, 64nM, 62nM, 60nM, 55nM, 50nM, 45nM, 40nM, 35nM, 30nM, 25nM, 20nM, 15nM, 10nM 또는 5nM 미만)이다. 일부 실시형태에서, 투여 후, 대상체의 피크 트롬빈은 66nM 초과(예를 들어, 68nM, 70nM, 75nM, 80nM, 85nM, 90nM, 95nM, 100nM, 110nM, 120nM, 130nM, 140nM 또는 150nM 초과)이다. 일부 실시형태에서, 투여 후, 대상체의 피크 트롬빈은 66 내지 166nM이다. 피크 트롬빈은 임의의 적절한 방법으로 측정될 수 있다.

[0084] 본 명세서에 사용된 바와 같이 "유효량"은 대상체를 치료하는데 유효한 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)의 양을 포함하는 조성물의 양이다. 이러한 양의 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)는 대상체에게 투여될 수 있는 본 명세서에 기재된 바와 같은 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물의 임의의 적절한 투여량을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 포함하는 조성물의 용량은 약 1.0×10^7 입자 내지 약 1.0×10^{10} 입자, 예컨대 약 1.6×10^7 입자 (예를 들어, 트롬보솜)/kg 내지 약 1.0×10^{10} 입자/kg (예를 들어, 약 1.6×10^7 내지 약 5.1×10^9 입자/kg, 약 1.6×10^7 내지 약 3.0×10^9 입자/kg, 약 1.6×10^7 내지 약 1.0×10^9 입자/kg, 약 1.6×10^7 내지 약 5.0×10^8 입자/kg, 약 1.6×10^7 내지 약 1.0×10^8 입자/kg, 약 1.6×10^7 내지 약 5.0×10^7 입자/kg, 약 5.0×10^7 내지 약 1.0×10^8 입자/kg, 약 1.0×10^8 내지 약 5.0×10^8 입자/kg, 약 5.0×10^8 내지 약 1.0×10^9 입자/kg, 약 1.0×10^9 내지 약 5.0×10^9 입자/kg, 또는 약 5.0×10^9 내지 약 1.0×10^{10} 입자/kg)을 포함할 수 있다.

[0085] 본 명세서에서 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 국소적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 국소 투여는 용액, 크림, 겔, 현탁액, 퍼티, 미립자 또는 분말을 통한 투여를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 국소 투여는 붕대(예를 들어, 접착 붕대 또는 압박 붕대) 또는 의료 봉합(예를 들어, 봉합사, 스테이플))을 통한 투여를 포함할 수 있고; 예를 들어, 혈소판 유도체(예를 들어, 동결보존된 혈소판(예를 들어, 트롬보솜))가 미국 특허 출원 일련 번호 15/776,255에 상응하는 PCT 공개 번호 WO2017/040238(예를 들어, 문단 [013]-[069])에 기술된 바와 같이, 그 안에 포매되거나 그 위에 코팅될 수 있으며), 그 전체는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0086] 본 명세서에서 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 비경구적으로 투여된다.

[0087] 본 명세서에서 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 정맥내로 투여된다.

[0088] 본 명세서에서 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 근육내로 투여된다.

[0089] 본 명세서에서 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 척수강내로 투여된다.

[0090] 본 명세서에서 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 피하로 투여된다.

[0091] 본 명세서에서 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 복강내로 투여된다.

[0092] 본 명세서에서 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 투여 단계 이전에 건조된다. 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 투여 단계 이전에 동결-건조된다. 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 건조 또는 동결-건조 단계에 이어서 재수화된다.

[0093] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 아스피린(아세틸살리실산 또는 ASA로도 지칭됨); P2Y12 억제제 예컨대 칸그렐러(예를 들어, KENGREAL®), 티카그렐러(예를 들어, BRILINTA®), 클로피도그렐(예를 들어, PLAVIX®) 또는 프라수그렐(예를 들어, EFFIENT®); 당단백질 IIb/IIIa 억제제 예컨대 엡티피바타이드(예를 들어, INTEGRILIN®), 티로피반(예를 들어, AGGRASTAT®) 또는 압식시맙(예를 들어, REOPRO®)); 보충제 예컨대 허브 보충제; 또는 임의의 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 보충제의 예는 생강, 인삼, 은행, 녹차, 카바, 톱야자, 볼도(*Peumus boldus*), 단삼(*Salvia miltiorrhiza*), 당귀(*Angelica sinensis*) 파파야(*Carica papaya*), 어유, 및 비타민 E를 포함한다. 허브 보충제의 예는 생강, 인삼, 은행을 포함한다.

[0094] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 아스피린이다.

[0095] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 칸그렐러(예를 들어, KENGREAL®)이다.

[0096] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 티카그렐러(예를 들어, BRILINTA®)이다.

[0097] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 클로피도그렐(예를 들어, PLAVIX®)이다.

[0098] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 프라수그렐(예를 들어, EFFIENT®)이다.

[0099] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 엡티피바타이드(예를 들어, INTEGRILIN®)이다.

[0100] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 티로피반(예를 들어, AGGRASTAT®)이다.

[0101] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 압식시맙(예를 들어, REOPRO®)이다.

[0102] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 테루트로반이다.

[0103] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 피코타미드이다.

[0104] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 엘리노그렐이다.

[0105] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 티클로피딘이다.

[0106] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 이부프로펜이다.

[0107] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 보라팍사이다.

[0108] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 아토팍사이다.

[0109] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 실로스타졸이다.

[0110] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 프로스타글란딘 E1이다.

[0111] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 에포프로스테놀이다.

[0112] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 디피리다몰이다.

[0113] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 트레프로스티닐 소듐이다.

[0114] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 사포그렐레이트이다.

[0115] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 보충제이다.

[0116] 일부 실시형태에서, 항혈소판제는 허브 보충제이다.

[0117] 일부 실시형태에서, 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물을 재수화시키는 것은 혈소판에 수성 액체를 첨가하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 수성 액체는 물이다. 일부 실시형태에서, 수성 액체는 수용액(예를 들어, 완충액)이다. 일부 실시형태에서, 수성 액체는 식염수 용액이다. 일부 실시형태에서, 수성 액체는 현탁액이다

[0118] 일부 실시형태에서, 재수화된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)는 40 국제 단위(IU) 이상에서 혈액 응고와 연관된 모든 개별 인자(예를 들어, 인자 VII, VIII 및 IX)를 나타내는 응고 인자 수준을 갖는다.

[0119] 일부 실시형태에서, 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)는 막 상에 존재하는 단백질 및/또는 지질을 통한 혈소판 막의 약 10% 미만, 예컨대 약 8% 미만, 예컨대 약 6% 미만, 예컨대 약 4% 미만, 예컨대 약 2% 미만, 예컨대 약 0.5% 미만 가교를 갖는다. 일부 실시형태에서, 재수화된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)는 막 상에 존재하는 단백질 및/또는 지질을 통한 혈소판 막의 약 10% 미만, 예컨대 약 8% 미만, 예컨대 약 6% 미만, 예컨대 약 4% 미만, 예컨대 약 2% 미만, 예컨대 약 0.5% 미만 가교를 갖는다.

[0120] 일부 실시형태에서, 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)는 적어도 약 0.2㎛(예를 들어, 적어도 약 0.3㎛, 적어도 약 0.4㎛, 적어도 약 0.5㎛, 적어도 약 0.6㎛, 적어도 약 0.7㎛, 적어도 약 0.8㎛, 적어도 약 0.9㎛, 적어도 약 0.㎛, 적어도 약 1.0㎛, 적어도 약 1.2㎛, 적어도 약 1.5㎛, 적어도 약 2.0㎛, 적어도 약 2.5㎛, 또는 적어도 약 5.0㎛)의 입자 크기(예를 들어, 직경, 최대 치수)를 갖는다. 일부 실시형태에서, 입자 크기는 약 5.0㎛ 미만(예를 들어, 약 2.5㎛ 미만, 약 2.0㎛ 미만, 약 1.5㎛ 미만, 약 1.0㎛ 미만, 약 0.9㎛ 미만, 약 0.8㎛ 미만, 약 0.7㎛ 미만, 약 0.6㎛ 미만, 약 0.5㎛ 미만, 약 0.4㎛ 미만, 또는 약 0.3㎛ 미만)이다. 일부 실시형태에서, 입자 크기는 약 0.3㎛ 내지 약 5.0㎛(예를 들어, 약 0.4㎛ 내지 약 4.0㎛, 약 0.5㎛ 내지 약 2.5㎛, 약 0.6㎛ 내지 약 2.0㎛, 약 0.7㎛ 내지 약 1.0㎛, 약 0.5㎛ 내지 약 0.9㎛, 또는 약 0.6㎛ 내지 약 0.8㎛)이다.

[0121] 일부 실시형태에서, 적어도 50%(예를 들어, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%)의 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)는 약 0.3㎛ 내지 약 5.0㎛(예를 들어, 약 0.4㎛ 내지 약 4.0㎛, 약 0.5㎛ 내지 약 2.5㎛, 약 0.6㎛ 내지 약 2.0㎛, 약 0.7㎛ 내지 약 1.0㎛, 약 0.5㎛ 내지 약 0.9㎛, 또는 약 0.6㎛ 내지 약 0.8㎛)의 범위인 입자 크기를 갖는다. 일부 실시형태에서, 최대 99%(예를 들어, 최대 약 95%, 최대 약 80%, 최대 약 75%, 최대 약 70%, 최대 약 65%, 최대 약 60%, 최대 약 55% 또는 최대 약 50%)의 혈소판 예컨대 동결건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)는 약 0.3㎛ 내지 약 5.0㎛(예를 들어, 약 0.4㎛ 내지 약 4.0㎛, 약 0.5㎛ 내지 약 2.5㎛, 약 0.6㎛ 내지 약 2.0㎛, 약 0.7㎛ 내지 약 1.0㎛, 약 0.5㎛ 내지 약 0.9㎛, 또는 약 0.6㎛ 내지 약 0.8㎛)의 범위에 있다. 일부 실시형태에서, 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)의 약 50% 내지 약 99%(예를 들어, 약 55% 내지 약 95%, 약 60% 내지 약 90%, 약 65% 내지 약 85, 약 70% 내지 약 80%)는 약 0.3㎛ 내지 약 5.0㎛(예를 들어, 약 0.4㎛ 내지 약 4.0㎛, 약 0.5㎛ 내지 약 2.5㎛, 약 0.6㎛ 내지 약 2.0㎛, 0.7㎛ 내지 약 1.0㎛, 약 0.5㎛ 내지 약 0.9㎛, 또는 약 0.6㎛ 내지 약 0.8㎛)의 범위에 있다.

[0122] 일부 실시형태에서, 혈소판은 대상체를 치료하기 이전에 예를 들어 액체 매질에서 단리된다.

[0123] 일부 실시형태에서, 혈소판은 공여자-유래 혈소판이다. 일부 실시형태에서, 혈소판은 혈장교환 단계를 포함하는 과정에 의해 수득된다. 일부 실시형태에서, 혈소판은 풀링된 혈소판이다.

[0124] 일부 실시형태에서, 혈소판은 복수의 공여자로부터 풀링된다. 복수의 공여자로부터 풀링된 이러한 혈소판은 또한 본 명세서에서 풀링된 혈소판으로 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, 공여자는 5 초과, 예컨대 10 초과, 예컨대 20 초과, 예컨대 50 초과, 예컨대 최대 약 100명 공여자이다. 일부 실시형태에서, 공여자는 약 5 내지 약 100, 예컨대 약 10 내지 약 50, 예컨대 약 20 내지 약 40, 예컨대 약 25 내지 약 35이다. 풀링된 혈소판은 본 명세서에 기재된 임의의 조성물을 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0125] 일부 실시형태에서, 혈소판은 *시험관내*에서 유래된다. 일부 실시형태에서, 혈소판은 배양물에서 유래되거나 제조된다. 일부 실시형태에서, 혈소판을 제조하는 것은 거핵구의 배양물로부터 혈소판을 유도하거나 성장시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 혈소판을 제조하는 것은 배아 줄기 세포(ESC) 및/또는 유도된 만능 줄기 세포(iPSC)를 포함하는 인간 만능 줄기 세포(PCS)의 배양물로부터 혈소판(또는 거핵구)을 유도하거나 성장시키는 것을 포함한다.

[0126] 따라서, 일부 실시형태에서, 혈소판은 본 명세서에 기재된 바와 같이 대상체를 치료하기 이전에 제조된다. 일부 실시형태에서, 혈소판은 동결건조된다. 일부 실시형태에서, 혈소판은 동결보존된다.

[0127] 일부 실시형태에서, 혈소판 또는 풀링된 혈소판은 인큐베이션제로 인큐베이션 이전에 약 6.0 내지 약 7.4의 pH로 산성화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 방법은 혈소판을 약 6.5 내지 약 6.9의 pH로 산성화하는 것을 포함한

다. 일부 실시형태에서, 방법은 혈소판을 약 6.6 내지 약 6.8의 pH로 산성화하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 산성화하는 것은 풀링된 혈소판에 산 시트레이트 덱스트로스(ACD)를 포함하는 용액을 첨가하는 것을 포함한다.

[0128] 일부 실시형태에서, 혈소판은 인큐베이션제로 인큐베이션 이전에 단리된다. 일부 실시형태에서, 방법은 원심분리를 사용하여 혈소판을 단리하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 원심분리는 약 1000 x*g* 내지 약 2000 x*g*의 상대 원심력(RCF)에서 발생한다. 일부 실시형태에서, 원심분리는 약 1300 x*g* 내지 약 1800 x*g*의 상대 원심력(RCF)에서 발생한다. 일부 실시형태에서, 원심분리는 약 1500 x*g*의 상대 원심력(RCF)에서 발생한다. 일부 실시형태에서, 원심분리는 약 1분 내지 약 60분 동안 발생한다. 일부 실시형태에서, 원심분리는 약 10분 내지 약 30분 동안 발생한다. 일부 실시형태에서, 원심분리는 약 30분 동안 발생한다.

[0129] 인큐베이션제는 임의의 적절한 성분을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 액체 배지를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 포스페이트 염, 나트륨 염, 칼륨 염, 칼슘 염, 마그네슘 염, 및 혈액 또는 혈액 생성물에서 발견될 수 있거나 혈소판을 건조하는데 유용한 것으로 알려진 임의의 다른 염으로부터 선택된 하나 이상의 염, 또는 이들 중 둘 이상의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0130] 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 포스페이트 염, 나트륨 염, 칼륨 염, 칼슘 염, 마그네슘 염, 및 혈액 또는 혈액 생성물에서 발견될 수 있는 임의의 다른 염과 같은 하나 이상의 염을 포함한다. 예시적인 염은 염화나트륨(NaCl), 염화칼륨(KCl), 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 약 0.5mM 내지 약 100mM의 하나 이상의 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 약 0.5mM 내지 약 100mM(예를 들어, 약 0.5 내지 약 2mM, 약 2mM 내지 약 90mM, 약 2mM 내지 약 6mM, 약 50mM 내지 약 100mM, 약 60mM 내지 약 90mM, 약 70 내지 약 85mM)의 하나 이상의 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 약 5mM, 약 60mM, 약 65mM, 약 70mM, 약 75mM, 또는 약 80mM의 하나 이상의 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 약 0.5mM 내지 약 2mM의 농도로 칼슘 염, 마그네슘 슬레이트, 및 둘의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 염을 포함한다.

[0131] 바람직하게는, 이들 염은 혈소판 또는 혈소판 유도체, 예컨대 동결-건조된 혈소판을 포함하는 조성물에 전혈에서 발견되는 것과 거의 동일한 양으로 존재한다.

[0132] 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 담체 단백질을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 담체 단백질은 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 담체 단백질은 약 0.05% 내지 약 1.0%(w/v)의 양으로 존재한다.

[0133] 인큐베이션제는 혈소판에 비-독성이고 본 명세서에 제공된 과정 동안 용액이 노출될 온도에서 용액에 적절한 완충 능력을 제공하는 임의의 완충액일 수 있다. 따라서, 완충액은 상업적으로 이용가능한 공지된 생물학적으로 적합한 완충액, 예컨대 인산염 완충액, 예컨대 인산염 완충 식염수(PBS), 중탄산염/탄산, 예컨대 중탄산-나트륨 완충액, N-2-하이드록시에틸피페라진-N'-2- 에탄설폰산(HEPES), 및 트리스-기반 완충액 예컨대 트리스-완충 식염수(TBS)를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 다음 완충액 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 프로판-1,2,3-트리카르복실산(트리카르발릴산); 벤젠펜타카르복실산; 말레산; 2,2-디메틸숙신산; EDTA; 3,3-디메틸글루타르산; 비스(2-하이드록시에틸)이미노-트리스(하이드록시메틸)-메탄(BIS-TRIS); 벤젠헥사카르복실산(멜리틱산); N-(2-아세트아미도)이미노-디아세트산(ADA), 부탄-1,2,3,4-테트라카르복실산; 피로인산; 1,1-사이클로펜탄디아세트산(3,3 테트라메틸렌-글루타르산); 피페라진-1,4-비스-(2-에탄설폰산)(PIPES); N-(2-아세트아미도)-2-암노에탄설폰산(ACES); 1,1-사이클로헥산디아세트산; 3,6-엔도메틸렌-1,2,3,6-테트라하이드로프탈산(EMTA; ENDCA); 이미다졸;; 2-(아미노에틸)트리메틸암모늄 클로라이드(CHOLAMINE); N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-아미노에탄설폰산(BES); 2-메틸프로판-1,2,3-트리스카르복실산(베타-메틸트리카르발릴산); 2-(N-모르폴리노)프로판-술폰산(MOPS); 인산; 및 N-트리스(하이드록시메틸)메틸-2-아미노에탄 술폰산(TES). 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 하나 이상의 완충액, 예를 들어 N-2-하이드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산(HEPES), 또는 중탄산-나트륨($NaHCO_3$)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 약 5 내지 약 100mM의 하나 이상의 완충액을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 약 5 내지 약 50mM(예를 들어, 약 5mM 내지 약 40mM, 약 8mM 내지 약 30mM, 약 10mM 내지 약 25mM)의 하나 이상의 완충액을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 약 10mM, 약 20mM, 약 25mM, 또는 약 30mM의 하나 이상의 완충액을 포함한다.

[0134] 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 수크로스, 말토스, 트레할로스, 글루코스, 만노스, 덱스트로스 및 자일로스를 포함하는 단당류 및 이당류와 같은 하나 이상의 당류를 포함한다. 일부 실시형태에서, 당류는 단당류이다. 일부 실시형태에서, 당류는 이당류이다. 일부 실시형태에서, 당류는 단당류, 이당류, 또는 이들의 조합을 포함

한다. 일부 실시형태에서, 당류는 비-환원성 이당류이다. 일부 실시형태에서, 당류는 수크로스, 말토스, 트레할로스, 글루코스(예를 들어, 덱스트로스), 만노스 또는 자일로스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 당류는 트레할로스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 전분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 수크로스와 에피클로로히드린의 중합체인, 폴리수크로스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 약 10mM 내지 약 1,000mM의 하나 이상의 당류를 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 약 50 내지 약 500mM의 하나 이상의 당류를 포함한다. 실시형태에서, 하나 이상의 당류는 10mM 내지 500mM의 양으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 당류는 50mM 내지 200mM의 양으로 존재한다. 실시형태에서, 하나 이상의 당류는 100mM 내지 150mM의 양으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 당류는 동결건조제이고; 예를 들어, 일부 실시형태에서, 동결건조제는 트레할로스, 폴리수크로스, 또는 이의 조합을 포함한다.

[0135] 일부 실시형태에서, 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 포함하는 조성물은 물 또는 식염수 용액 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 동결-건조된 혈소판과 같은 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물은 DMSO를 포함할 수 있다.

[0136] 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 알코올(예를 들어, 에탄올)과 같은 유기 용매를 포함한다. 이러한 인큐베이션제에서, 용매의 양은 0.1% 내지 5.0%(v/v) 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 유기 용매는 약 0.1%(v/v) 내지 약 5.0%(v/v), 예컨대 약 0.3%(v/v) 내지 약 3.0%(v/v), 또는 약 0.5%(v/v) 내지 약 2%(v/v) 범위일 수 있다.

[0137] 일부 실시형태에서, 적합한 유기 용매는 알코올, 에스테르, 케톤, 에테르, 할로겐화 용매, 탄화수소, 니트릴, 글리콜, 알킬 질산염, 물 또는 이의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 적합한 유기 용매는 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, 아세트산, 아세톤, 메틸 에틸 케톤, 메틸 이소부틸 케톤, 메틸 아세테이트, 에틸 아세테이트, 이소프로필 아세테이트, 테트라하이드로푸란, 이소프로필 에테르(IPE), tert-부틸 메틸 에테르, 디옥산(예를 들어, 1,4-디옥산), 아세토니트릴, 프로피오니트릴, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 톨루엔, 아니솔, 사이클로헥산, 헥산, 헵탄, 에틸렌 글리콜, 니트로메탄, 디메틸포름아미드, 디메틸 술폭시드, N-메틸 피롤리돈, 디메틸아세트아미드, 및 이의 조합을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 유기 용매는 에탄올, 아세트산, 아세톤, 아세토니트릴, 디메틸포름아미드, 디메틸 술폭시드(DMSO), 디옥산, 메탄올, n-프로판올, 이소프로판올, 테트라하이드로푸란(THF), N-메틸 피롤리돈, 디메틸아세트아미드(DMAC), 또는 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 유기 용매는 에탄올, DMSO, 또는 이의 조합을 포함한다. 에탄올과 같은 유기 용매의 존재는 혈소판, 혈소판 유도체 또는 트롬보솜(예를 들어, 동결-건조된 혈소판 유도체)의 처리에 유리할 수 있다.

[0138] 일부 실시형태에서, 인큐베이션제는 수성 배지의 존재에서 혈소판 내로 인큐베이션된다. 일부 실시형태에서 인큐베이션제는 DMSO를 포함하는 배지의 존재에서 인큐베이션된다.

[0139] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 다른 성분이 혈소판에서 인큐베이션될 수 있다. 예시적인 성분은 인큐베이션 과정 동안 혈소판 응집 및 활성화를 방지하기 위해 프로스타글란딘 E1 또는 프로스타사이클린 및 또는 EDTA/EGTA를 포함할 수 있다.

[0140] 사용될 수 있는 인큐베이션제 조성물의 비-제한적인 예는 표 1-5에 제시되어 있다.

[0141] 표 1

완충액	
성분	농도(달리 특정되지 않는 한 mM)
NaCl	75.0
KCl	4.8
HEPES	9.5
$NaHCO_3$	12.0
덱스트로스	3
트레할로스	100
에탄올(선택)	1% (v/v)

[0142]

[0143] 표 2

완충액 A	
성분	농도(달리 특정되지 않는 한 mM)
$CaCl_2$	1.8
$MgCl_2$	1.1
KCl	2.7
NaCl	137
NaH_2PO_4	0.4
HEPES	10
D-글루코스	5.6
pH	6.5

[0144]

[0145] 표 3

완충액 B	
성분	농도(달리 특정되지 않는 한 mM)
완충액 및 염	표 4(하기)
BSA	0.35%
덱스트로스	5
pH	7.4

[0146]

[0147] 표 3. 완충액 B는 예를 들어 유세포분석을 위해 혈소판을 인큐베이션할 때 사용될 수 있다. 이러한 인큐베이션은 어둠에서 실온에서 수행될 수 있다. 알부민은 완충액 B의 선택적 성분이다.

[0148] 표 4

완충액 B에서 HEPES 및 염의 농도	
성분	농도(달리 특정되지 않는 한 mM)
HEPES	25
NaCl	119
KCl	5
$CaCl_2$	2
$MgCl_2$	2
글루코스	6 g/l

[0149]

[0150] 표 4는 또 다른 예시적인 인큐베이션제이다. pH는 NaOH로 7.4로 조정될 수 있다. 알부민은 완충액 B의 선택적 성분이다.

[0151] 표 5

타이로드의 HEPES 완충액(플러스 PGE1)

성분	농도 (mM)
$CaCl_2$	1.8
$MgCl_2$	1.1
KCl	2.7
NaCl	137
NaH_2PO_4	0.4
HEPES	10
D-글루코스	5.6
pH	6.5
프로스타글란딘 E1 (PGE1)	1 μg/ml

[0152]

[0153] 표 5는 또 다른 예시적인 인큐베이션제이다.

[0154] 일부 실시형태에서, 혈소판(예를 들어, 혈장교환 혈소판, 전혈로부터 단리된 혈소판, 풀링된 혈소판, 또는 이의 조합)은 15-45℃ 또는 약 37℃의 상이한 온도에서 또는 상이한 기간 동안 인큐베이션제와 함께 인큐베이션된다.

[0155] 일부 실시형태에서, 혈소판(예를 들어, 혈장교환 혈소판, 전혈로부터 단리된 혈소판, 풀링된 혈소판, 또는 이의 조합)은 10,000 혈소판/μL 내지 10,000,000 혈소판/μL, 예컨대 50,000 혈소판/μL 내지 2,000,000 혈소판/μL, 예컨대 100,000 혈소판/μL 내지 500,000 혈소판/μL, 예컨대 150,000 혈소판/μL 내지 300,000 혈소판/μL, 예컨대 200,000 혈소판/μL의 농도에서 액체 배지를 포함하는 인큐베이션제에서 현탁액을 형성한다.

[0156] 혈소판(예를 들어, 혈장교환 혈소판, 전혈로부터 단리된 혈소판, 풀링된 혈소판, 또는 이의 조합)은 예를 들어 적어도 약 5분(min)(예를 들어, 적어도 약 20분, 약 30분, 약 1시간(hr), 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 12시간, 약 16시간, 약 20시간, 약 24시간, 약 30시간, 약 36시간, 약 42시간, 약 48시간, 또는 적어도 약 48시간 동안 상이한 기간 동안 인큐베이션제로 인큐베이션될 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈소판은 약 48시간 이하(예를 들어, 약 20분, 약 30분, 약 1시간(hr), 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 12시간, 약 16시간, 약 20시간, 약 24시간, 약 30시간, 약 36시간 이하 또는 약 42시간 이하) 동안 인큐베이션제로 인큐베이션될 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈소판은 약 10분 내지 약 48시간(예를 들어, 약 20분 내지 약 36시간, 약 30분 내지 약 24시간, 약 1시간 내지 약 20시간, 약 2시간 내지 약 16시간, 약 10분 내지 약 24시간, 약 20분 내지 약 12시간, 약 30분 내지 약 10시간, 또는 약 1시간 내지 약 6시간 동안 인큐베이션제로 인큐베이션될 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈소판, 혈소판 유도체, 또는 트롬보솜은 5분 내지 48시간, 예컨대 10분 내지 24시간, 예컨대 20분 내지 12시간, 예컨대 30분 내지 6시간, 예컨대 1시간 분 내지 3시간, 예컨대 약 2시간의 기간 동안 인큐베이션제로 인큐베이션된다.

[0157] 일부 실시형태에서, 혈소판(예를 들어, 혈장교환 혈소판, 전혈로부터 단리된 혈소판, 풀링된 혈소판, 또는 이의 조합)은 상이한 온도에서 인큐베이션제로 인큐베이션된다. 실시형태에서, 인큐베이션은 37℃에서 수행된다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 4℃ 내지 45℃, 예컨대 15℃ 내지 42℃에서 수행된다. 예를 들어, 실시형태에서, 인큐베이션은 35℃ 내지 40℃(예를 들어, 37℃)에서 110 내지 130(예를 들면, 120)분 동안 및 24-48시간 만큼 오랜 동안 수행된다. 일부 실시형태에서, 혈소판은 15-45℃ 또는 약 37℃의 온도에서 본 명세서에 개시된 바와 같은 상이한 기간 동안 인큐베이션제로 인큐베이션된다.

[0158] 일부 실시형태에서, 혈소판(예를 들어, 혈장교환 혈소판, 전혈로부터 단리된 혈소판, 풀링된 혈소판, 또는 이의 조합)에는 하나 이상의 활성제가 장입된다. 일부 실시형태에서, 혈소판에는 항-섬유소용해제가 장입될 수 있다. 항-섬유소용해제의 비-제한적인 예는 ε-아미노카프로산(EACA), 트라넥삼산, 아프로티닌, 아미노메틸벤조산 및 피브리노겐을 포함한다.

[0159] 혈소판(예를 들어, 혈장교환 혈소판, 전혈로부터 분리된 혈소판, 풀링된 혈소판, 또는 이의 조합)을 활성제(예를 들어, 항-섬유소용해제)로 장입하는 것은 임의의 적절한 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, PCT 공개

번호 WO2020113090 A1 , WO2020113101 A1, WO2020113035 A1 및 WO2020112963 A1을 참고한다. 일반적으로 장입하는 것은 혈소판을 항-섬유소용해제와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 장입하는 것은 활성제와 인큐베이션제를 조합함에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 장입하는 것은 인큐베이션 단계와 별개의 단계에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 장입하는 것은 인큐베이션 단계 이전의 단계에서 수행될 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 활성제는 인큐베이션 단계에서 사용되는 인큐베이션제와 동일하거나 동일하지 않을 수 있는 본 명세서에 기재된 임의의 인큐베이션제에서 용액 또는 현탁액으로서 혈소판에 공급될 수 있다. 일부 실시형태에서, 장입하는 단계는 인큐베이션 단계 동안 수행될 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 활성제는 인큐베이션 동안 (예를 들어, 고체로서 또는 용액 또는 현탁액으로) 인큐베이션제에 첨가될 수 있다). 일부 실시형태에서, 장입하는 단계는 인큐베이션 단계 이후의 단계에서 수행될 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 인큐베이션제에서 용액 또는 현탁액으로서 혈소판에 공급되며, 이는 인큐베이션 단계에서 사용된 인큐베이션제와 동일하거나 동일하지 않을 수 있다.

[0160] 활성제는 임의의 적절한 농도로 혈소판에 적용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성제는 약 1μM 내지 약 100mM(예를 들어, 약 1μM 내지 약 10μm, 약 1μM 내지 약 50μM, 약 1μM 내지 약 100μM, 약 1μM 내지 약 500μM, 약 1μM 내지 약 1mM, 약 1μM 내지 약 10mM, 약 1μM 내지 약 25mM, 약 1μM 내지 약 50mM, 약 1μM 내지 약 75mM, 약 10μM 내지 약 100mM, 약 50μM 내지 약 100mM, 약 100μM 내지 약 100mM, 약 500μM 내지 약 100mM, 약 1mM 내지 약 100mM, 약 10mM 내지 약 100mM, 약 25mM 내지 약 100mM, 약 50mM 내지 약 100mM, 약 75mM 내지 약 100mM, 약 10μM 내지 약 100mM, 약 200μM 내지 약 1mM, 약 800μM 내지 약 900μM, 약 400μM 내지 약 800μM, 약 500μM 내지 약 700μM, 약 600μM, 약 5mM 내지 약 85mM, 약 20mM 내지 약 90mM, 약 25mM 약 75mM 내지 약 30mM 내지 약 90mM, 약 35mM 내지 약 65mM mM, 약 40mM 내지 약 60mM, 약 50mM 내지 약 60mM, 약 40mM 내지 약 70mM, 약 45mM 내지 약 55mM, 또는 약 50mM)의 농도에서 (예를 들어, 인큐베이션제 또는 다른 용액이나 현탁액의 일부로서) 혈소판에 적용될 수 있다.

[0161] 일부 실시형태에서, 방법은 혈소판을 건조시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 건조 단계는 혈소판을 동결건조하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 건조 단계는 혈소판을 결빙-건조시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 건조 단계로부터 수득된 혈소판을 재수화시키는 것을 추가로 포함한다.

[0162] 일부 실시형태에서, 혈소판은 요법 또는 기능 검정에 사용하기 이전에 (예를 들어, 트롬보솜을 생성하도록) 냉장 저장, 저온보존 또는 동결건조된다.

[0163] 혈소판을 건조하기 위한 임의의 공지된 기술은, 그 기술이 5% 미만의 최종 잔류 수분 함량을 달성할 수 있는 한, 본 개시내용에 따라 사용될 수 있다. 바람직하게는, 기술은 1%, 0.5% 또는 0.1%와 같이 2% 미만의 최종 잔류 수분 함량을 달성한다. 적합한 기술의 비-제한적인 예는 결빙-건조(동결건조) 및 분무-건조이다. 적합한 동결건조 방법이 **표 A**에 제시되어 있다. 추가의 예시적인 동결건조 방법은 미국 특허 번호 7,811,558, 미국 특허 번호 8,486,617 및 미국 특허 번호 8,097,403에서 찾아볼 수 있다. 예시적인 분무-건조 방법은: 건조 기체로서 질소를 본 개시내용에 따른 인큐베이션제와 조합한 다음, 혼합물을 2-유체 노즐 구성을 가지는 GEA Processing Engineering, Inc.(Columbia MD, USA)로부터의 GEA Mobile Minor 분무 건조기 안으로 도입하는 단계, 혼합물을 150℃ 내지 190℃ 범위의 유입구 온도, 65℃ 내지 100℃ 범위의 유출구 온도, 0.5 내지 2.0바 범위의 원자 속도, 5 내지 13kg/hr 범위의 원자 속도, 60 내지 100kg/hr 범위의 질소 사용, 및 10 내지 35분의 실행 시간에서 분무 건조하는 단계를 포함한다. 분무 건조에서 마지막 단계는 우선적으로 건조된 혼합물을 수집하는 것이다. 일부 실시형태에서 건조된 조성물은 -20℃ 이하 내지 90℃ 이상의 범위인 온도에서 적어도 6개월 동안 안정하다.

[0164] **표 A: 예시적인 동결건조 프로토콜**

	단계	온도 설정	유형	지속시간	압력 설정
냉동 단계	F1	-50°C	램프	Var	N/A
	F2	-50°C	유지	3 Hrs	N/A
진공 풀다운	F3	-50°	유지	Var	N/A
일차 건조	P1	-40°	유지	1.5Hrs	0 mT
	P2	-35°	램프	2 Hrs	0 mT
	P3	-25°	램프	2 Hrs	0 mT
	P4	-17°C	램프	2 Hrs	0 mT
	P5	0°C	램프	1.5Hrs	0 mT
	P6	27°C	램프	1.5Hrs	0 mT
	P7	27°C	유지	1Hrs	0 mT
이차 건조	S1	27°C	유지	>8Hrs	0 mT

[0165]

[0166] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같이 수득된 혈소판을 건조시키는 단계, 예컨대 본 명세서에 기재된 바와 같이 수득된 혈소판을 결빙-건조시키는 단계는 혈소판을 동결건조제(예를 들어, 비-환원성 이당류)로 인큐베이션하는 것을 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 혈소판을 제조하는 방법은 혈소판을 동결건조제로 인큐베이션하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서 동결건조제는 당류이다. 일부 실시형태에서 당류는 비-환원성 이당류와 같은 이당류이다.

[0167] 일부 실시형태에서, 혈소판은 동결건조제로 혈소판을 인큐베이션하기에 충분한 시간 동안 및 적절한 온도에서 동결건조제로 인큐베이션된다. 적절한 동결건조제의 비-제한적인 예는 수크로스, 말토스, 트레할로스, 글루코스(예를 들어, 덱스트로스), 만노스 및 자일로스를 포함하는 당류, 예컨대 단당류 및 이당류이다. 일부 실시형태에서, 동결건조제의 비-제한적인 예는 혈청 알부민, 덱스트란, 폴리비닐 피롤리돈(PVP), 전분, 및 하이드록시에틸 스타치(HES)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 예시적인 동결건조제는 고분자량 중합체를 포함할 수 있다. "고분자량"이란 평균 분자량이 약 70kDa 이상 및 최대 1,000,000kDa인 중합체를 의미한다. 비-제한적인 예는 수크로스 및 에피클로로히드린의 중합체(예를 들어, 폴리수크로스)이다. 일부 실시형태에서, 동결건조제는 폴리수크로스이다. 임의의 양의 고분자량 중합체가 동결건조제로서 사용될 수 있지만, 약 3% 내지 10%(w/v), 예컨대 3% 내지 7%, 예를 들어 6%의 최종 농도를 달성하는 양이 사용되는 것이 바람직하다.

[0168] 본 명세서에 개시된 조성물에 사용하기 위한 예시적인 당류는 트레할로스이다. 당류의 동일성에 관계없이, 그것은 조성물에 임의의 적합한 양으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 그것은 1mM 내지 1M의 양으로 존재할 수 있다. 실시형태에서, 그것은 10mM 내지 500mM의 양으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 그것은 20mM 내지 200mM의 양으로 존재한다. 실시형태에서, 그것은 40mM 내지 100mM의 양으로 존재한다. 다양한 실시형태에서, 당류는 상기에 언급된 범위 내에서 상이한 특정 농도로 존재하고, 당업자는 본 명세서에서 각각을 구체적으로 언급할 필요 없이 다양한 농도를 즉시 이해할 수 있다. 하나 초과의 당류가 조성물에 존재하는 경우, 각 당류는 상기에 언급된 범위 및 특정 농도에 따른 양으로 존재할 수 있다.

[0169] 본 명세서에 제공된 조성물을 제조하기 위한 본 명세서에 제공된 공정 내에서, 동결건조제의 첨가는 건조 이전 마지막 단계일 수 있다. 그러나, 일부 실시형태에서, 동결건조제는 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 또는 기타 성분과 같은 조성물의 다른 성분과 동시에 또는 그 전에 첨가된다. 일부 실시형태에서, 동결건조제는 인큐베이션제에 첨가되고, 건조 용액을 형성하도록 완전히 혼합되고, 건조 용기(예를 들어, 유리 또는 플라스틱 혈청 바이알, 동결건조 백) 안으로 분배되고, 용액을 건조시키기 위해 허용되는 조건에 적용되어 건조된 조성물을 형성한다.

[0170] 혈소판을 동결방지제로 인큐베이션하는 단계는 온도와 연계하여 소요되는 시간이 동결방지제가 혈소판과 접촉하기에 충분히 길게되는 한, 장입에 적합한 시간 동안 혈소판을 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있고, 바람직하게

는, 적어도 어느 정도 혈소판 안으로 통합될 수 있다. 실시형태에서, 인큐베이션은 약 1분 내지 약 180분 또는 그 이상 동안 수행된다.

[0171] 혈소판을 동결방지제로 인큐베이션하는 단계는 할당된 시간의 양과 연계하여 선택될 때 인큐베이션에 적합한 온도에서 혈소판 및 동결방지제를 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 일반적으로, 조성물은 동결보호제가 혈소판과 접촉하기에 적어도 충분한 시간 동안 동결 이상의 온도에서 인큐베이션된다. 실시형태에서, 인큐베이션은 37℃에서 수행된다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 20℃ 내지 42℃에서 수행된다. 예를 들어, 실시형태에서, 인큐베이션은 110 내지 130(예를 들어, 120)분 동안 35℃ 내지 40℃(예를 들어, 37℃)에서 수행된다.

[0172] 다양한 실시형태에서, 동결건조 백은 가스가 처리 동안 백의 적어도 일부 또는 전체 부분을 통과하도록 구성된 가스-투과성 백이다. 가스-투과성 백은 주변 환경에 존재하는 대기 가스와 백 내부 내의 가스의 교환을 허용할 수 있다. 가스-투과성 백은 산소, 질소, 물, 공기, 수소 및 이산화탄소와 같은 가스에 대해 투과성일 수 있어, 가스 교환이 본 명세서에 제공된 조성물에서 발생하도록 한다. 일부 실시형태에서, 가스-투과성 백은 이산화탄소가 그 벽을 통해 투과되도록 허용함에 의해 백의 내부 내에 존재하는 이산화탄소의 일부를 제거할 수 있게 한다. 일부 실시형태에서, 백으로부터 이산화탄소의 방출은 백 내에 함유된 조성물의 원하는 pH 수준을 유지하는 데 유리할 수 있다.

[0173] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 과정의 용기는 폐쇄되거나 밀봉된 가스-투과성 용기이다. 일부 실시형태에서, 용기는 폐쇄되거나 밀봉되고 그 일부가 가스-투과성인 용기이다. 일부 실시형태에서, 용기에 함유되는 생성물의 부피에 대한 밀폐 또는 밀봉된 용기(예를 들어, 백)의 가스-투과성 부분의 표면적(이하 "SA/V 비율"로 지칭됨)은 본 명세서에 제공된 조성물의 pH 유지를 개선하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 용기의 SA/V 비율은 적어도 약 2.0㎠/mL(예를 들어, 적어도 약 2.1㎠/mL, 적어도 약 2.2㎠/mL, 적어도 약 2.3㎠/mL, 적어도 약 2.4㎠/mL, 적어도 약 2.5㎠/mL, 적어도 약 2.6㎠/mL, 적어도 약 2.7㎠/mL, 적어도 약 2.8㎠/mL, 적어도 약 2.9㎠/mL, 적어도 약 3.0㎠/mL, 적어도 약 3.1㎠/mL, 적어도 약 3.2㎠/mL, 적어도 약 3.3㎠/mL, 적어도 약 3.4㎠/mL, 적어도 약 3.5㎠/mL, 적어도 약 3.6㎠/mL, 적어도 약 3.7㎠/mL, 적어도 약 3.8㎠/mL, 적어도 약 3.9㎠/mL, 적어도 약 4.0㎠/mL, 적어도 약 4.1㎠/mL, 적어도 약 4.2㎠/mL, 적어도 약 4.3㎠/mL, 적어도 약 4.4㎠/mL, 적어도 약 4.5㎠/mL, 적어도 약 4.6㎠/mL, 적어도 약 4.7㎠/mL, 적어도 약 4.8㎠/mL, 적어도 약 4.9㎠/mL, 또는 적어도 약 5.0㎠/mL 일 수 있다. 일부 실시형태에서, 용기의 SA/V 비율은 최대 약 10.0㎠/mL(예를 들어, 최대 약 9.9㎠/mL, 최대 약 9.8㎠/mL, 최대 약 9.7㎠/mL, 최대 약 9.6㎠/mL, 최대 약 9.5㎠/mL, 최대 약 9.4㎠/mL, 최대 약 9.3㎠/mL, 최대 약 9.2㎠/mL, 최대 약 9.1㎠/mL, 최대 약 9.0㎠/mL, 최대 약 8.9㎠/mL, 최대 약 8.8㎠/mL, 최대 약 8.7㎠/mL, 최대 약 8.6,㎠/mL 최대 약 8.5㎠/mL, 최대 약 8.4㎠/mL, 최대 약 8.3㎠/mL, 최대 약 8.2㎠/mL, 최대 약 8.1㎠/mL, 최대 약 8.0㎠/mL, 최대 약 7.9㎠/mL, 최대 약 7.8㎠/mL, 최대 약 7.7㎠/mL, 최대 약 7.6㎠/mL, 최대 약 7.5㎠/mL, 최대 약 7.4㎠/mL, 최대 약 7.3㎠/mL, 최대 약 7.2㎠/mL, 최대 약 7.1㎠/mL, 최대 약 6.9㎠/mL, 최대 약 6.8㎠/mL, 최대 약 6.7㎠/mL, 최대 약 6.6㎠/mL, 최대 약 6.5㎠/mL, 최대 약 6.4㎠/mL, 최대 약 6.3㎠/mL, 최대 약 6.2㎠/mL, 최대 약 6.1㎠/mL, 최대 약 6.0㎠/mL, 최대 약 5.9㎠/mL, 최대 약 5.8㎠/mL, 최대 약 5.7㎠/mL, 최대 약 5.6㎠/mL, 최대 약 5.5㎠/mL, 최대 약 5.4㎠/mL, 최대 약 5.3㎠/mL, 최대 약 5.2㎠/mL, 최대 약 5.1㎠/mL, 최대 약 5.0㎠/mL, 최대 약 4.9㎠/mL, 최대 약 4.8㎠/mL, 최대 약 4.7㎠/mL, 최대 약 4.6㎠/mL, 최대 약 4.5㎠/mL, 최대 약 4.4㎠/mL, 최대 약 4.3㎠/mL, 최대 약 4.2㎠/mL, 최대 약 4.1㎠/mL, 또는 최대 약 4.0㎠/mL일 수 있다. 일부 실시형태에서, 용기의 SA/V 비율은 약 2.0 내지 약 10.0㎠/mL(예를 들어, 약 2.1㎠/mL 내지 약 9.9㎠/mL, 약 2.2㎠/mL 내지 약 9.8㎠/mL, 약 2.3㎠/mL 내지 약 9.7㎠/mL, 약 2.4㎠/mL 내지 약 9.6㎠/mL, 약 2.5㎠/mL 내지 약 9.5㎠/mL, 약 2.6㎠/mL 내지 약 9.4㎠/mL, 약 2.7㎠/mL 내지 약 9.3㎠/mL, 약 2.8㎠/mL 내지 약 9.2㎠/mL, 약 2.9㎠/mL 내지 약 9.1㎠/mL, 약 3.0㎠/mL 내지 약 9.0㎠/mL, 약 3.1㎠/mL 내지 약 8.9㎠/mL, 약 3.2㎠/mL 내지 약 8.8㎠/mL, 약 3.3㎠/mL 내지 약 8.7㎠/mL, 약 3.4㎠/mL 내지 약 8.6㎠/mL, 약 3.5㎠/mL 내지 약 8.5㎠/mL, 약 3.6㎠/mL 내지 약 8.4㎠/mL, 약 3.7㎠/mL 내지 약 8.3㎠/mL, 약 3.8㎠/mL 내지 약 8.2㎠/mL, 약 3.9㎠/mL 내지 약 8.1㎠/mL, 약 4.0㎠/mL 내지 약 8.0㎠/mL, 약 4.1㎠/mL 내지 약 7.9㎠/mL, 약 4.2㎠/mL 내지 약 7.8㎠/mL, 약 4.3㎠/mL 내지 약 7.7㎠/mL, 약 4.4㎠/mL 내지 약 7.6㎠/mL, 약 4.5㎠/mL 내지 약 7.5㎠/mL, 약 4.6㎠/mL 내지 약 7.4㎠/mL, 약 4.7㎠/mL 내지 약 7.3㎠/mL, 약 4.8㎠/mL 내지 약 7.2㎠/mL, 약 4.9㎠/mL 내지 약 7.1㎠/mL, 약 5.0㎠/mL 내지 약 6.9㎠/mL, 약 5.1㎠/mL 내지 약 6.8㎠/mL, 약 5.2㎠/mL 내지 약 6.7㎠/mL, 약 5.3㎠/mL 내지 약 6.6㎠/mL, 약 5.4㎠/mL 내지 약 6.5㎠/mL, 약 5.5㎠/mL 내지 약 6.4㎠/mL, 약 5.6㎠/mL 내지 약 6.3㎠/mL, 약 5.7㎠/mL 내지 약 6.2㎠/mL, 또는 약 5.8㎠/mL 내지 약 6.1㎠/mL의 범위일 수 있다.

[0174] 가스-투과성 밀폐된 용기(예를 들어, 백) 또는 그 일부는 하나 이상의 다양한 가스-투과성 물질로 만들어질 수

있다. 일부 실시형태에서, 가스-투과성 백은 플루오로중합체(예컨대, 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE) 및 퍼플루오로알콕시(PFA) 중합체), 폴리올레핀(예컨대, 저-밀도 폴리에틸렌(LDPE), 고-밀도 폴리에틸렌(HDPE)), 플루오르화 에틸렌 프로필렌(FEP), 폴리스티렌, 폴리염화비닐(PVC), 실리콘, 및 이의 임의의 조합을 포함하는 하나 이상의 중합체로 제조될 수 있다.

[0175] 일부 실시형태에서, 건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)는 열처리를 거칠 수 있다. 가열은 약 25℃ 초과의 온도(예를 들어, 약 40℃ 초과, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃ 이상)에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 가열은 약 70℃ 내지 약 85℃(예를 들어, 약 75℃ 내지 약 85℃, 또는 약 75℃ 또는 80℃)에서 수행된다. 가열을 위한 온도는 가열이 수행되는 시간의 길이와 연계하여 선택될 수 있다. 임의의 적절한 시간이 사용될 수 있지만, 전형적으로 동결건조된 혈소판은 적어도 1시간이지만 36시간 이하 동안 가열된다. 따라서, 실시형태에서, 가열은 적어도 2시간, 적어도 6시간, 적어도 12시간, 적어도 18시간, 적어도 20시간, 적어도 24시간, 또는 적어도 30시간 동안 수행된다. 예를 들어, 동결건조된 혈소판은 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간, 25시간, 26시간, 27시간, 28시간, 29시간, 또는 30시간 동안 가열될 수 있다. 비-제한적인 예시적인 조합은 건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 30℃보다 높은 온도에서 적어도 30분 동안 가열하는 것; 건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 50℃보다 높은 온도에서 적어도 10시간 가열하는 것; 건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 75℃보다 높은 온도에서 적어도 18시간 가열하는 것; 및 건조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 80℃에서 24시간 동안 가열하는 것 포함한다. 일부 실시형태에서, 가열하는 것은 캡핑된 바이알과 같은 밀봉된 용기에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 밀봉된 용기는 가열 이전에 진공을 받게 된다. 특히 알부민이나 폴리수크로스와 같은 동결방지제의 존재에서 열처리 단계는 결빙-건조된 혈소판의 안정성과 저장 수명을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 실제로, 열처리 단계가 없는 동결방지제와 비교하여 혈청 알부민 또는 폴리수크로스와 동결건조-후 열처리 단계의 특정 조합으로 유리한 결과가 얻어졌다. 동결방지제(예를 들어, 수크로스)는 임의의 적절한 양(예를 들어, 혈소판 또는 혈소판 유도체(예: 트롬보솜)의 질량 또는 부피 기준으로 약 3% 내지 약 10%)으로 존재할 수 있다.

[0176] 일부 실시형태에서, 인큐베이션제와의 인큐베이션을 포함하는 과정에 의해 본 명세서에 개시된 바와 같이 제조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)은 인큐베이션 이전의 혈소판의 저장 안정성과 적어도 대략 동일한 저장 안정성을 갖는다.

[0177] 일부 실시형태에서, 방법은 (예를 들어, 인큐베이션제, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 인큐베이션제와 함께) 혈소판 또는 혈소판 유도체를 투여하기 이전에 혈소판 또는 혈소판 유도체를 동결보존하는 것을 추가로 포함한다.

[0178] 일부 실시형태에서, 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 투여하기 이전에 (예를 들어, 인큐베이션제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 인큐베이션제와 함께) 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물을 건조시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 건조 단계에 이어서 조성물을 가열하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 방법은 결빙-건조 단계 또는 가열 단계에 이어서 조성물을 재수화시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0179] 일부 실시형태에서, 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 투여하기 이전에 (예를 들어, 인큐베이션제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 인큐베이션제와 함께) 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물을 결빙-건조시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 결빙-건조 단계에 이어서 조성물을 가열하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 방법은 결빙-건조 단계 또는 가열 단계에 이어서 조성물을 재수화시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0180] 일부 실시형태에서, 방법은 (예를 들어, 인큐베이션제, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 인큐베이션제와 함께) 혈소판, 혈소판 유도체 또는 트롬보솜을 투여하기 이전에 혈소판, 혈소판 유도체 또는 트롬보솜을 저온 저장하는 것을 추가로 포함한다.

[0181] 저장 조건은 예를 들어 표준 실온 저정(예를 들어, 약 20 내지 약 30℃ 범위인 온도에서 저장) 또는 저온 저장(예를 들어, 약 1 내지 약 10℃ 범위인 온도에서 저장)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 투여하기 이전에 (예를 들어, 인큐베이션제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 인큐베이션제와 함께) 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 포함하는 조성물을 동결보존, 결빙-건조, 해동, 재수화시키는 것 및 이의 조합을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜)를 투여하기 이전에 (예를 들어, 트롬보솜을 형성하기 위해) (예를

들어, 인큐베이션제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 인큐베이션제와 함께) 혈소판 또는 혈소판 유도체를 포함하는 조성물을 건조(예를 들어, 결빙-건조)시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 건조 단계로부터 수득된 조성물을 재수화시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0182] 일부 실시형태에서, 신선한 혈소판을 수득하고, 선택적으로 DMSO에서 혈소판을 인큐베이션하고, 원심분리에 의해 혈소판을 단리하고, 혈소판을 트레할로스 및 에탄올을 포함하는 인큐베이션제에 재현탁시켜 제1 혼합물을 형성하고, 제1 혼합물을 인큐베이션하고, 제1 혼합물과 폴리수크로스를 혼합하고, 이에 의해 제2 혼합물을 형성하고, 제2 혼합물을 동결건조시켜 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜), 폴리수크로스 및 트레할로스를 포함하는 냉동 건조된 조성물을 형성하는 과정에 의해 제조된 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜), 폴리수크로스 및 트레할로스를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0183] 일부 실시형태에서, 신선한 혈소판을 수득하고, 선택적으로 DMSO에서 혈소판을 인큐베이션하고, 원심분리에 의해 혈소판을 단리하고, 혈소판을 트레할로스 및 에탄올을 포함하는 인큐베이션제에 재현탁시켜 제1 혼합물을 형성하고, 제1 혼합물을 인큐베이션하고, 제1 혼합물과 폴리수크로스를 혼합하고, 이에 의해 제2 혼합물을 형성하고, 제2 혼합물을 동결건조시켜 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜), 폴리수크로스 및 트레할로스를 포함하는 냉동 건조된 조성물을 형성하는 것을 포함하는 혈소판 또는 혈소판 유도체(예를 들어, 트롬보솜), 폴리수크로스 및 트레할로스를 포함하는 결빙-건조된 혈소판 조성물을 제조하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0184] 일부 실시형태에서, 결빙-건조된 혈소판을 제조하는 과정이 본 명세서에 제공되며, 상기 과정은 다음 조건: 약 10분 내지 약 180분 동안 20℃ 내지 42℃의 온도 하에서 적어도 하나의 당류의 존재에서 단리된 혈소판을 인큐베이션하는 것, 혈소판에 적어도 하나의 동결방지제를 첨가하는 것, 및 혈소판을 동결건조시키는 것을 포함하며, 여기서 과정은 선택적으로 인큐베이션 단계와 첨가 단계 사이에 혈소판을 단리하는 것을 포함하지 않고, 선택적으로 여기서 과정은 혈소판을 혈소판 활성화 억제제에 노출시키는 것을 포함하지 않는다. 동결방지제는 다당(예를 들어, 폴리수크로스)일 수 있다. 과정은 동결건조된 혈소판을 70℃ 내지 80℃의 온도에서 8 내지 24시간 동안 가열하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 혈소판에 적어도 하나의 동결방지제를 첨가하는 단계는 혈소판을 에탄올에 노출시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 적어도 하나의 당류의 존재에서 단리된 혈소판을 인큐베이션하는 단계는 적어도 하나의 당류의 존재에서 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 당류의 존재에서 단리된 혈소판을 인큐베이션하는 단계는 적어도 하나의 당류의 존재에서 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 인큐베이션을 위한 조건은 약 100분 내지 약 150분 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 인큐베이션을 위한 조건은 약 110분 내지 약 130분 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 인큐베이션을 위한 조건은 약 120분 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 인큐베이션을 위한 조건은 35℃ 내지 40℃에서 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 인큐베이션을 위한 조건은 37℃에서 인큐베이팅하는 것을 포함할 수 있다. 인큐베이션을 위한 조건은 35℃ 내지 40℃에서 110분 내지 130분 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 인큐베이션을 위한 조건은 37℃에서 120분 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 당류는 트레할로스, 수크로스, 또는 트레할로스와 수크로스 둘 모두일 수 있다. 적어도 하나의 당류는 트레할로스일 수 있다. 적어도 하나의 당류는 수크로스일 수 있다.

[0185] 일부 실시형태에서, 결빙-건조된 혈소판을 제조하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 혈소판을 제공하고, 혈소판을 약 100mM 트레할로스 및 약 1%(v/v) 에탄올을 포함하는 염 완충액에 현탁시켜 제1 조성물을 만들고, 제1 조성물을 약 37℃에서 약 2시간 동안 인큐베이션하고, 폴리수크로스(예를 들어, 폴리수크로스 400)를 약 6%(w/v)의 최종 농도로 첨가하여 제2 조성물을 제조하고, 제2 조성물을 동결건조하여 결빙-건조된 혈소판을 제조하고, 결빙-건조된 혈소판을 80℃에서 24시간 동안 가열하는 것을 포함한다.

[0186] 본 명세서에 개시된 특정 실시형태는 "구성되는" 또는 "본질적으로 구성되는" 언어를 사용하는 청구범위에서 추가로 제한될 수 있다.

[0187] **예시적인 실시형태**

[0188] 실시형태 1은 대상체에서 응고병증을 치료하는 방법이며, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0189] 실시형태 2는 대상체에서 응고병증을 치료하는 방법이며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 응고병증 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포

함한다.

[0190] 실시형태 3은 대상체에서 정상 지혈작용을 회복시키는 방법이며, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 정상 지혈작용 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0191] 실시형태 4는 대상체에서 정상 지혈작용을 회복시키는 방법이며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 정상 지혈작용 회복을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0192] 실시형태 5는 수술을 위해 대상체를 준비하는 방법이며, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0193] 실시형태 6은 수술을 위해 대상체를 준비하는 방법이며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 수술 준비를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0194] 실시형태 7은 수술이 응급 수술인 실시형태 5-6 중 어느 하나의 방법이다.

[0195] 실시형태 8은 수술이 예정된 수술인 실시형태 5-6 중 어느 하나의 방법이다.

[0196] 실시형태 9는 대상체가 항혈소판제로 치료를 받았거나 치료를 받고 있는 실시형태 1-8 중 어느 하나의 방법이다.

[0197] 실시형태 10은 항혈소판제로의 치료가 중단된 실시형태 9의 방법이다.

[0198] 실시형태 11은 항혈소판제로의 치료가 계속되는 실시형태 9의 방법이다.

[0199] 실시형태 12는 대상체에서 항혈소판제의 효과를 개선하는 방법이며, 상기 방법은 혈소판 또는 혈소판 유도체 및 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제를 포함하는 유효량의 조성물을 항혈소판제의 효과 개선을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0200] 실시형태 13은 대상체에서 항혈소판제의 효과를 개선하는 방법이며, 상기 방법은 혈소판을 하나 이상의 염, 완충액, 선택적으로 동결방지제, 및 선택적으로 유기 용매를 포함하는 인큐베이션제로 인큐베이션하여 조성물을 형성하는 것을 포함하는 과정에 의해 제조된 유효량의 조성물을 항혈소판제의 효과 개선을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0201] 실시형태 14는 항혈소판제의 효과가 항혈소판제의 과다투여의 결과인 실시형태 12 또는 실시형태 13의 방법이다.

[0202] 실시형태 15는 조성물이 항-섬유소용해제를 추가로 포함하는 실시형태 1-14 중 어느 하나의 방법이다.

[0203] 실시형태 16은 항-섬유소용해제가 ε-아미노카프로산(EACA), 트라넥삼산, 아프로티닌, 아미노메틸벤조산, 피브리노겐, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 실시형태 15의 방법이다.

[0204] 실시형태 17은 혈소판 또는 혈소판 유도체에는 항-섬유소용해제가 장입되는 실시형태 15 또는 실시형태 16의 방법이다.

[0205] 실시형태 18은 항혈소판제가 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙, 보충제, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 실시형태 9-16 중 어느 하나의 방법이다.

[0206] 실시형태 19는 항혈소판제가 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙, 테루트로반, 피코타미드, 엘리노그렐, 티클로피딘, 이부프로펜, 보라팍사, 아토팍사, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 실시형태 9-16 중 어느 하나의 방법이다.

[0207] 실시형태 20은 항혈소판제가 아스피린, 칸그렐러, 티카그렐러, 클로피도그렐, 프라수그렐, 엡티피바타이드, 티로피반, 압식시맙, 테루트로반, 피코타미드, 엘리노그렐, 티클로피딘, 이부프로펜, 보라팍사, 아토팍사, 실로스타졸, 프로스타글란딘 E1, 에포프로스테놀, 디피리다몰, 트레프로스티닐 소듐, 사르포그렐레이트, 및 이의 조합

으로 구성된 군으로부터 선택되는 실시형태 9-16 중 어느 하나의 방법이다.

[0208] 실시형태 21은 투여가 국소적으로 투여하는 것을 포함하는 실시형태 1-20 중 어느 하나의 방법이다.

[0209] 실시형태 22는 투여가 비경구적으로 투여하는 것을 포함하는 실시형태 1-20 중 어느 하나의 방법이다.

[0210] 실시형태 23은 투여가 정맥내로 투여하는 것을 포함하는 실시형태 1-20 중 어느 하나의 방법이다.

[0211] 실시형태 24는 투여가 근육내로 투여하는 것을 포함하는 실시형태 1-20 중 어느 하나의 방법이다.

[0212] 실시형태 25는 투여가 경막내로 투여하는 것을 포함하는 실시형태 1-20 중 어느 하나의 방법이다.

[0213] 실시형태 26은 투여가 피하로 투여하는 것을 포함하는 실시형태 1-20 중 어느 하나의 방법이다.

[0214] 실시형태 27은 투여가 복강내로 투여하는 것을 포함하는 실시형태 1-20 중 어느 하나의 방법이다.

[0215] 실시형태 28은 조성물이 투여 단계 이전에 건조되는 실시형태 1-27 중 어느 하나의 방법이다.

[0216] 실시형태 29는 조성물이 건조 단계에 이어서 재수화되는 실시형태 28의 방법이다.

[0217] 실시형태 30은 조성물이 투여 단계 이전에 빙결-건조되는 실시형태 1-28 중 어느 하나의 방법이다.

[0218] 실시형태 31은 조성물이 빙결-건조 단계에 이어서 재수화되는 실시형태 30의 방법이다.

[0219] 실시형태 32는 인큐베이션제가 포스페이트 염, 나트륨 염, 칼륨 염, 칼슘 염, 마그네슘 염, 및 이의 둘 이상의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 염을 포함하는 실시형태 1-31 중 어느 하나의 방법이다.

[0220] 실시형태 33은 인큐베이션제가 담체 단백질을 포함하는 실시형태 1-32 중 어느 하나의 방법이다.

[0221] 실시형태 34는 완충액이 HEPES, 중탄산나트륨($NaHCO_3$), 또는 이의 조합을 포함하는 실시형태 1-33 중 어느 하나의 방법이다.

[0222] 실시형태 35는 조성물이 하나 이상의 당류를 포함하는 실시형태 1-34 중 어느 하나의 방법이다.

[0223] 실시형태 36은 하나 이상의 당류가 트레할로스를 포함하는 실시형태 35의 방법이다.

[0224] 실시형태 37은 하나 이상의 당류가 폴리수크로스를 포함하는 실시형태 35 또는 실시형태 36의 방법이다.

[0225] 실시형태 38은 하나 이상의 당류가 덱스트로스를 포함하는 실시형태 35-37 중 어느 하나의 방법이다.

[0226] 실시형태 39는 조성물이 유기 용매를 포함하는 실시형태 1-38 중 어느 하나의 방법이다.

[0227] 실시형태 40은 혈소판 또는 혈소판 유도체가 트롬보솜을 포함하는 실시형태 1-39 중 어느 하나의 방법이다.

[0228] **실시예**

[0229] 이어지는 결과는 항혈소판 약물을 복용하는 환자의 *시험관내* 모델에서 트롬보솜 생성물의 영향을 입증한다. 트롬보솜 및 기타 동결건조된 혈소판 생성물은 외상 또는 지혈 부전의 진단에 이어 환자의 혈류 안으로 주입하도록 설계되었다. 이들 약물은 다중 형태의 혈소판 억제 기전을 활용하여 몇 가지 예를 들면 아데노신 디포스페이트(ADP), 아라키돈산, 피브리노겐 및 폰 빌레브란트 인자 결합에 대한 혈소판 반응을 억제한다. 이들은 아스피린, 클로피도그렐, 티카그렐러, 에피언트, 칸그렐러 및 엡티피바타이드 같은 약물을 포함한다.

[0230] **실시예 1 - $P2Y_{12}$ 억제제**

[0231] 클로피도그렐, 티카그렐러 및 프라수구렐 같은 칸그렐러는 혈소판 상의 $P2Y_{12}$(ADP) 수용체를 차단한다. 칸그렐러는 이 부류의 약물을 대표하는 것으로 여기서 사용된다.

[0232] 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. 투과광 응집측정법 및 T-TAS® 실험은 실시예 4에 따라 수행되었다.

[0233] 전혈로서 인간으로부터 취해지고 백혈구(WBC) 또는 적혈구(rbc)가 없는 혈장에서 혈소판을 단리하기 위해 처리된 혈소판-풍부 혈장(PRP)에서 혈소판의 응집에 대한 칸그렐러의 효과가 투과광 응집측정법에 의해 평가되었다. 작용제-유도된 활성화에 대한 반응으로 혈소판(혈소판 풍부 혈장)의 응집은 0.5μM-3.5μM의 치료 농도에서 칸그렐러에 의한 10μM 아데노신 디포스페이트(ADP)-유도된 응집의 완전한 억제를 나타냈다(도 1). 조사된 칸그렐러의 모든 용량은 PRP에서 ADP-유도된 혈소판 응집을 완전히 제거했다.

[0234] 전단 하에 혈소판 폐색에 대한 칸그렐러의 효과는 T-TAS®에 의해 평가되었다. 10μM ADP로 *시험관내* 자극된 신선한 혈소판 풍부 혈장(혈소판 농도 278,000/μL; PRP는 일반적으로 약 200,000/μL 내지 약 300,000/μL의 혈소판 농도를 가짐)은 T-TAS® 기술을 사용한 AR 칩(콜라겐 및 조직 트롬보플라스틴)에 의해 결정된 바와 같이 비자극된 혈소판(PRP)보다 높은 전단 하에서 더 일찍 폐색되었다(도 2). 칸그렐러 단독(1μM)은 폐색에 대한 억제를 나타내지 않았지만, ADP(10μM)와 조합되면 혈소판 부착 및 폐색이 본질적으로 제거되었다. 이들 결과는 도 3 및 4에 추가로 예시되어 있다. 특정 이론에 얽매이지 않고, 혈소판은 ADP에 반응하고 형상 변화 및 응집을 일으키는 칸그렐러에 의해 차단되지 않은 다른 ADP 수용체를 갖기 때문에 이 패턴이 관찰되는 것으로 여겨지며 여기서 ADP 수용체 P2Y12 차단은 콜라겐 결합을 억제하고, 따라서 혈소판은 ADP 자극에 기인하여 서로 결합할 수 있지만 코팅된 칩 상에 콜라겐이 결합하는 것이 방지될 수 있다.

[0235] 도 3에서, 곡선 아래 면적(AUC) 값(도 2의 데이터에서 유래됨; 반복은 평균화되고 한 번 플롯팅됨)은 시간 내에 혈전이 얼마나 빨리 발생했는지 및 혈전이 발생했을 때 혈전이 얼마나 실질적인지의 조합된 값을 나타낸다. PRP AUC는 ADP 자극으로 증가되었다. 칸그렐러는 AUC 값에 거의 영향을 미치지 않았지만 ADP 자극과 조합되었을 때 AUC는 제로에 가깝게 떨어졌다.

[0236] 도 4에서, 약물 치료로 AR T-TAS® 칩의 폐색까지의 시간이 평가되었다. PRP는 대략 20분에 칩 채널을 폐색하였고 ADP로 혈소판의 자극은 그 시간을 감소시켰다. 칸그렐러는 폐색 시간에 거의 영향을 미치지 않았지만 PRP 샘플에 ADP 자극의 추가는 폐색을 본질적으로 완전히 억제하였다.

[0237] 혈소판을 억제하는 것으로 나타난 농도에서 ADP 자극이 있는 칸그렐러의 존재에서, 트롬보솜(도 5-7에서 "thromb")은 억제되지 않았으며, 이는 트롬보솜이 치료 수준에서의 칸그렐러의 존재에서도 혈전 형성을 도울 수 있다는 것을 나타낸다.

[0238] 전단 하에 트롬보솜에 대한 칸그렐러의 효과는 T-TAS®에 의해 평가되었다. 도 5는 트롬보솜(표시된 바와 같이 60, 90 또는 115분의 재수화 후)이 ADP(10uM)가 존재하는 칸그렐러(1uM)의 부재 또는 존재에서 지혈 기능을 유지함을 나타낸다. T-TAS® AR 칩의 트롬보솜 폐색은 혈소판과 달리 칸그렐러 + ADP의 항혈소판 효과에 의해 영향을 받지 않는다. 이것은 트롬보솜이 칸그렐러 및 유사 제제를 투여받는 환자에게 주입될 때 예상되는 기능을 유지할 것임을 시사한다. 이들 결과는 도 6 및 7에 추가로 예시되어 있다.

[0239] 도 6에서, AUC 값(도 5의 데이터로부터 유래됨)은 혈전 형성을 나타낸다. 혈장에서 트롬보솜 접합 및 T-TAS® AR 칩의 폐색에 대한 칸그렐러 + ADP의 영향은 없었고; 트롬보솜은 칸그렐러와 ADP에 관계없이 혈전 형성을 일으켰다. 동일한 용량의 칸그렐러와 ADP는 신선하게 수확된 혈소판을 완전히 억제했다.

[0240] 도 7에서, 약물 치료를 받은 AR T-TAS® 칩 상의 트롬보솜의 폐색까지 시간(도 5의 데이터로부터 유래됨)이 평가되었다. 혈장에서 T-TAS® AR 칩을 사용한 폐색까지 트롬보솜 시간에 대한 칸그렐러 + ADP로부터의 영향은 없었다. 동일한 용량의 칸그렐러와 ADP는 신선하게 수확된 혈소판을 완전히 억제했다.

[0241] **실시예 2. GPIIb-IIIa 억제제.**

[0242] 이어지는 결과는 GPIIb-IIIa 억제제를 복용하는 환자의 시험관내 모델에서 트롬보솜의 영향을 입증한다. 일반적인 항혈소판 약물인 엡티피바타이드는 피브리노겐 및 폰 빌레브란트 인자와 상호작용하는 혈소판 상의 GPIIb-IIIa 수용체를 경쟁적으로 억제한다.

[0243] 엡티피바타이드는 혈소판에 대한 GPIIb-IIIa 수용체의 피브린 결합 역할을 차단하는 펩티드 치료제이다. 약물은 전형적으로 180μg/kg 볼러스 후 2μg/kg/분 연속 주입으로 IV를 통해 투여된다. 엡티피바타이드의 혈중 농도는 전형적으로 약 1-2μM이다. 출혈 시간은 일반적으로 약물 중단의 약 1시간 이내에 정상으로 돌아온다.

[0244] 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. 투과광 응집측정법 및 T-TAS® 실험은 실시예 4에 따라 수행되었다.

[0245] (혈소판 풍부 혈장에서) 혈소판의 응집은 투과광 응집측정법을 사용하여 평가되었다. 엡티피바타이드는 PRP에서 광 투과 응집측정법에 의해 검출된 바와 같이 시험된 모든 농도에서 PRP에서 콜라겐-유도된(10μg/mL) 혈소판 응집을 완전히 억제했다. (도 8).

[0246] 엡티피바타이드의 존재에 있는 동안 응고 시간을 단축하는 것에 대한 트롬보솜의 효과가 또한 연구되었다. 폐색 시간을 회복하는 트롬보솜의 능력은 T-TAS® 시스템에서 연구되었다. T-TAS® 시스템은 콜라겐 및 트롬보플라스틴 자극으로 전단력 하에서 폐색 시간을 측정한다. AR T-TAS® 칩 상의 폐색 및 AUC의 전혈 프로파일은 엡티피바타이드로 각각 연장 및 감소했다. 엡티피바타이드는 용량-의존적 방식으로 T-TAS® AR 칩 상에서 전혈의 폐색

시간을 연장했다. 이 실험에서, 전혈은 8분에 폐색되었고 폐색 시간은 6μM 엡티피바타이드로 16분으로 연장되었다(도 9). 트롬보솜은 혈전 형성에 대한 엡티티바타이드의 억제 효과를 역전시켰다. T-TAS® AR 칩 상에서 전혈 폐색의 엡티피바타이드 억제는 대략 200,000/μL(N=3)에서 트롬보솜의 추가에 의해 역전되었다. 엡티피바타이드로 억제된 전혈의 샘플에 트롬보솜(대략 200k/μL)이 추가될 때, 폐색까지의 시간이 9분에서 '정상'으로 감소했다(도 10).

[0247] 트롬보솜 처리로 곡선 아래 면적 값은 또한 정상 전혈 샘플의 값과 비교하여 트롬보솜으로 증가했다. 도 11은 약물 치료로 AR T-TAS® 칩 상의 트롬보솜의 폐색까지의 시간을 입증하며; T-TAS® AR 칩 폐색의 엡티피바타이드 억제는 트롬보솜의 추가(200,000/μL; N=3)에 의해 거의 완전히 역전되었다. 도 12에서 곡선 아래 면적 값은 혈전 형성을 나타내며, 여기서 트롬보솜은 엡티피바타이드에 의한 억제를 정상 수준으로 되돌렸고; T-TAS® AR Chip에 대한 혈소판 부착 및 폐색의 엡티피바타이드 억제는 트롬보솜(200,000/μL, N=3)의 추가로 극복된다.

[0248] 혈소판과 달리 트롬보솜은 엡티피바타이드의 존재에서 전단 하에 폐색하는 그 능력이 억제되지 않는다(도 13). 도 13은 AR T-TAS® 시스템 상에 다양한 로트의 트롬브솜의 혈전 형성의 프로파일이 엡티피바타이드 처리로 변하지 않았음을 나타낸다. 혈소판 결핍 혈장(PPP)에서 트롬보솜은 6uM 엡티피바타이드가 있는 및 없는 T-TAS® AR 칩을 통해 유동되었다. 트롬보솜 접합 및 폐색에 대한 엡티피바타이드의 영향은 없었다. 모든 트롬보솜 농도는 대략 300,000/μL였다.

[0249] 혈장에서 트롬보솜(대략 300,000/μL)에 대한 T-TAS에 의한 AUC 및 폐색 값은 엡티피바타이드가 있고 없고 간에 동일했다(도 14-15). 도 14는 곡선 아래 면적 값이 혈전 형성을 나타내고 혈소판-결핍 혈장에서 엡티피바타이드로 변화가 관찰되지 않았음을 나타낸다. 트롬보솜 T-TAS® AR 칩 폐색의 AUC에 대한 6μM 엡티피바타이드의 효과는 없었다. 도 15는 AR T-TAS® 칩 상의 트롬보솜의 폐쇄까지 시간이 엡티피바타이드로 변하지 않았음을 나타낸다. 혈소판-결핍 혈장에서 T-TAS® AR 칩의 트롬보솜 폐색 시간에 대해 6μM 엡티피바타이드로부터 유의한 영향은 없었다.

[0250] **실시예 3. COX 억제제.**

[0251] 이어지는 결과는 COX 억제제를 복용하는 환자의 *시험관내* 모델에서 트롬보솜의 영향을 입증한다. 일반적인 항혈소판 약물인 아스피린은 혈소판에서 COX1 효소를 차단한다. COX1은 아라키돈산을 프로스타글란딘으로 전환시키는 역할을 한다.

[0252] 아스피린은 비가역적 사이클로옥시게나제(COX) 억제제이다. 혈소판에서 COX 효소는 트롬복산 A2, 프로스타글란딘 E2 및 프로스타사이클린(PGI2)의 합성을 담당한다. 아스피린은 혈소판 내의 COX 효소를 영구적으로 불활성화시키고, 혈소판에는 새로운 효소를 합성할 핵물질이 없기 때문에 아스피린 효과를 극복하기 위해서는 새로운 혈소판이 생성되어야 한다. 트롬복산 A2가 없으면, 프로스타글란딘 E2와 프로스타사이클린(PGI2) 혈소판은 그의 향-응집 활성에서 제한을 받는다. 많은 사람들이 원치 않는 응고 현상을 예방하기 위해 저용량의 아스피린을 유지한다. 아스피린 생체이용률은 500μM의 피크에서 단일 500mg 용량 IV 및 44μM에서 경구로 동일한 용량으로, 투여 경로에 따라 크게 달라진다.

[0253] 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. 투과광 응집측정법 및 T-TAS® 실험은 실시예 4에 따라 수행되었다.

[0254] 혈소판은 콜라겐 및 아라키돈산 자극으로 응집된다. 아라키돈산에 의한 자극은 완전히 억제될 수 있는 반면 콜라겐 자극 응집은 100-400μM 아스피린의 농도에서 단지 부분적으로 억제될 수 있다(도 16). 도 16은 혈소판 응집을 유도한 콜라겐(10ug/mL)과 아라키돈산(AA; 500ug/mL)을 사용한 PRP에서 광 투과 응집측정법, 및 응집은 시험된 모든 용량의 아스피린(ASA)에 의해 억제되었다는 것을 나타낸다. 아스피린은 아라키돈산 유도된 혈소판 응집을 완전하게 제거했다. T-TAS® 상의 PL 칩 시스템은 전단 조건 하에서 혈관계에서 콜라겐의 노출로 인한 *시험관내* 혈소판 결합 및 응집을 모방하는 데 사용되었다. 혈소판의 이 작용은 100 및 500μM의 아스피린의 존재에서 크게 제한되었지만 트롬보솜의 존재에서 적어도 부분적으로 회복될 수 있다(대략 200,000 내지 400,000/μL, 도 17). 도 17은 PL T-TAS® 칩 상의 혈전 형성이 트롬보솜으로 혈전 형성의 부분적 복원을 갖는 아스피린에 의해 억제되었다는 것을 전혈의 곡선 아래 면적 측정을 통해 보여준다.

[0255] **실시예 4. 프로토콜**

[0256] **트롬보솜의 생성.** 트롬보솜은 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된, 미국 특허 번호 8,486,617(예컨대, 예를 들어, 실시예 1-5) 및 8,097,403(예컨대, 예를 들어, 실시예 1-3)에 기술된 절차와 일치하여 제조되었다.

[0257] **투과 광 응집측정법**

[0258] 혈소판 또는 트롬보솜 또는 이 둘의 조합이 있는 혈장 샘플을 큐벳 안으로 장입하고 응집측정법 챔버 안으로 배치하였다. 챔버는 샘플을 따뜻하게 하고 지속적인 교반을 제공한다. 응집의 개시는 트롬빈, ADP, 콜라겐 및 혈소판 응집을 자극하는 것으로 알려진 임의의 제제에 제한되지 않는 복수 유형의 억제제 제제에 의해 수행될 수 있다. 샘플은 또한 억제제가 보충된 시험관-내 또는 생체-외로 채취될 수 있다. 기기는 먼저 2분 동안 자극에 앞서 광 투과를 기록함에 의해 검정을 시작한다. 그런 다음 기술자에 의해 관심 있는 자극제가 도입되고 광 투과율에서의 변화가 시간 경과에 따라 기록된다. 광 투과율에서 증가는 혈소판 응집에서의 증가에 해당한다.

[0259] **AR 칩을 사용한 T-TAS®에 의한 평가**. AR 칩은 콜라겐 및 조직 인자를 함유하는 단일 채널에 의해 특징되어 지며; 그것은 응고 및 혈소판 기능을 분석하는 데 사용될 수 있다.

[0260] T-TAS® 기기는 제조사의 지침에 따라 사용하기 위해 준비되었다. AR 칩(Diapharma Cat. # TC0101) 및 AR 칩 칼슘 콘 트립신 억제제(CaCTI; Diapharma Cat. # TR0101)는 실온으로 가온되었다. 300 μL의 재수화된 트롬보솜이 1.7mL 미세원심분리 튜브로 이동되고 3900 *g* x 10분에서 펠렛으로 원심분리되었다. 트롬보솜 펠렛은 AcT 카운트(Beckman Coulter AcT Diff 2 Cell Counter)에 의해 결정되는 바와 같이 대략 100,000-450,000/μL의 농도로 자가 혈소판이 있거나 없는 자가 혈장 또는 George King(GK) 풀링된 정상 인간 혈장에 재현탁되었다. GK 혈장 내 480 μL의 트롬보솜 샘플을 갖는 20 μL의 CaCTI는 부드러운 피펫팅으로 혼합되었다. 샘플은 제조업체의 지침에 따라 T-TAS® 상에 장입되고 실행되었다.

[0261] **PL 칩을 사용한 T-TAS®에 의한 평가**

[0262] PL 칩은 AR 칩과 유사하게 실행되지만 이 칩은 단지 콜라겐으로 코팅된다.

[0263] **트롬빈 생성**

[0264] *시약 준비*. 트롬빈 생성을 위해, 다음과 같은 제조업체로부터의 다음 물질이 사용되었다: FluCa 키트(Diagnostica Stago, 카탈로그 번호 86197), 트롬빈 측정기(Diagnostica Stago, 카탈로그 번호 86197), PRP 시약(Diagnostica Stago, 카탈로그 번호 86196), OCTOPLAS®, 용매 세제 처리된 인간 풀링된 혈장(Octapharma, 카탈로그 번호 8-68209-952-04). 모든 동결된 시약은 사용 전에 37℃ 수조에서 해동되었다. 모든 시약은 시약 라벨 상에 인쇄된 부피를 사용하여 멸균수로 재수화되었다. 재수화 후 대략 2분에 바이알을 5회 뒤집어 시약을 혼합하여 덩어리나 분말이 남지 않았으며; 볼텍싱은 사용되지 않았다. 이 절차는 재수화 후 대략 10분 반복되었다. 모든 시약을 실온에서 추가로 대략 10분 동안 인큐베이션했다(재수화 후 총 대략 20분). OCTOPLAS®의 30% 용액은 4.66ml의 트롬보솜 조절 완충액(표 B)과 2ml의 OCTOPLAS®를 혼합함에 의해 제조되었다.

[0265] 표 B. 트롬보솜 조절 완충액

성분	농도 (달리 표시된 경우를 제외하고 mg/mL)
NaCl	6.08
KCl	0.28
HEPES	2.47
$NaHCO_3$	0.77
덱스트로스	0.41
트레할로스	28.83
에탄올	0.76% (v/v)

[0266]

[0267] *샘플 분석 - 플레이트 준비 및 시험*. 트롬보솜을 함유하는 실험의 경우, 각각의 실험 트롬보솜 및 기준 트롬보솜에 대해 트롬보솜 희석 시리즈가 생성되었다(μL당 194.4K, 64.8K, 21.6K 및 7.2K의 희석이 전형적으로 사용되었음; 세포 계수는 유세포분석에 의해 결정됨). 달리 표시되지 않는 한 트롬보솜은 재수화되었다. 최고-농도 희석액(예를 들어, 194.4k 트롬보솜)은 트롬보솜, OCTAPLAS® 및 트롬보솜 조절 완충액을 조합함에 의해 제조되었다. 나머지 희석 시리즈는 OCTAPLAS®에서 일련의 1:3 희석에 의해 제조되었다. 각 시험 샘플에 대해, 20 μL의 PRP 시약이 각 샘플 웰(Immulon 2HB Clear, 둥근 바닥 96-웰 플레이트(VWR, 카탈로그 번호 62402-954)의 것)에 추가되고 20 μL의 트롬빈 측정기가 각 측정기 웰에 추가되었다. 각 샘플 웰과 측정기 웰에, 80 μL의 각

트롬보솜 희석 시리즈가 추가되었다. 마지막 희석까지 계속한다. 그런 다음 플레이트는 Fluoroskan Ascent 96 웰 형광 플레이트 판독기(Thrombinoscope)(ThermoFisher Scientific)에서 10분 동안 인큐베이션되었다. 이 인큐베이션 단계 동안, FluCa 용액은 40㎕의 FluCa 기질을 해동된 Fluo-완충액 1.6ml에 첨가하고, 볼텍싱하고, 용액을 수조에 복원시킴에 의해 제조되었다. 인큐베이션이 완료되면 FluCa 용액을 제조업체의 지침에 따라 Fluroskan 기기에 추가했다. 플레이트 형광은 20초의 간격 및 40-41℃의 온도에서 75분 동안 모니터링되었다.

[0268] **실시예 5.**

[0269] 추가의 실험은 칸그렐러 및 아스피린으로 수행되었다. 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. 투과광 응집측정법, T-TAS® 및 트롬빈 생성 실험은 실시예 4에 따라 수행되었다.

[0270] 혈전 형성의 회복에 대한 트롬보솜의 효과는 T-TAS® 기술 및 AR 칩을 사용하여 평가되었다. 도 18은 다양한 조합의 트롬보솜(㎕당 250,000 트롬보솜의 농도), 아스피린(200㎛M), 칸그렐러(1㎛M), 항-인테그린 알파-2(CD49B) 항체 6F1(40㎍; 생성물/제조업체 정보에 대해서는 dshb.biology.uiowa.edu/integrin-alpha-2-alpha2beta1?sc=7&category=-107 참고) 및 항-GPIIb/IIIa 수용체 항체 AP2(20ug/mL; 생성물/제조업체 정보에 대해서는 kerafast.com/product/2010/anti-glycoprotein-gpiiiagpiib-complex-ap-2-antibody 참고)로 처리된 전혈의 폐색 시간을 나타낸다. 도 19는 트롬보솜(㎕당 250,000 트롬보솜의 농도), 6F1를 함유하는 혼합물(40ug/mL; 항-CD49b), ASA(아스피린; 200uM), 및 칸그렐러(1uM); 또는 이의 조합으로 처리된 전혈 및 처리되지 않은 전혈의 시간 경과에 따른 폐색을 나타낸다.

[0271] 혈전 형성의 회복에 대한 트롬보솜의 효과가 또한 T-TAS® 기술 및 PL 칩을 사용하여 평가되었다. 도 20은 완충액, 아스피린(500㎛M) 또는 아스피린(500㎛M)과 트롬보솜(㎕당 250,000트롬보솜의 농도)으로만 처리된 전혈의 폐색 시간을 나타낸다. 도 21은 아스피린(500㎛M) 또는 아스피린(500㎛M)과 트롬보솜(250,000/㎕)으로 처리된 전혈인, 전혈의 시간 경과에 따른 폐색을 나타낸다. 도 22 및 23은 500㎛M 아스피린 대신 100㎛M 아스피린을 사용한 유사한 실험 데이터를 나타낸다.

[0272] 트롬빈 생성에 대한 아스피린 처리(농도)의 효과가 측정되었다. 트롬보솜은 베이비 아스피린을 매일 복용하는 환자로부터의 PPP 및 표준 혈장(INR = 1)에서 농도 1450, 1150, 850, 650, 450, 150, 50 및 0k/uL에서 평가되었다. 도 24는 트롬보솜의 부재에서 아스피린 혈장의 피크 트롬빈 값이 정상 범위 미만이었으나(약 45nM; 정상 범위는 약 66-166nM임) 트롬보솜 추가로 사용된 가장 낮은 트롬보솜 농도(50k/㎕)에서도 정상 범위 내로 되돌아옴을 나타낸다. 값은 다시 약 800k 트롬보솜에서 포화되었고, 트롬보솜의 부재에서 이 혈장 값의 5배인 - 최대 220nM로 되었다(45에서 220nM로 증가).

[0273] **실시예 6. 트롬보솜은 칸그렐러에 의해 유도된 연장된 PRP 폐색 시간을 역전시켰다**

[0274] 추가의 실험이 칸그렐러로 수행되었다. 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. T-TAS®는 실시예 4에 따라 수행되었다.

[0275] 도 25a 및 25b는 100ng/mL 칸그렐러 및 ADP로 처리된 혈소판 풍부 혈장이 T-TAS® 흐름 시스템(콜라겐 및 조직 인자 코팅된 채널) 상에서 폐색 시간을 19분에서 26분으로 연장했음을 나타낸다. 150k/㎕ 트롬보솜의 추가는 시간을 다시 15.3분으로 감소시켰다.

[0276] **실시예 7. 무작위 공여자 혈소판(RDP)이 아닌 트롬보솜이 PRP에서 티로피반에 의해 유도된 연장된 폐색 시간을 역전시켰다**

[0277] 추가의 실험이 티로피반으로 수행되었다. 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. T-TAS®는 실시예 4에 따라 수행되었다. 무작위 공여자 혈소판은 전혈로부터 제조되었다.

[0278] 도 26a 및 26b는 100ng/mL 티로피반으로 처리된 혈소판 풍부 혈장이 T-TAS® 흐름 시스템(콜라겐 및 조직 인자 코팅된 채널) 상에서 폐색 시간을 18.43에서 폐색 없음으로 연장했음을 나타낸다. 150k/㎕의 트롬보솜의 추가는 시간을 다시 12.94분으로 감소시켰지만 RDP는 동일한 계수에서 부분적으로만 회복되었다.

[0279] **실시예 8. 무작위 공여자 혈소판이 아닌 트롬보솜이 PRP에서 엡티피바타이드에 의해 유도된 연장된 폐색 시간을 역전시켰다**

[0280] 추가의 실험이 엡티피바타이드로 수행되었다. 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. T-TAS®는 실시예 4에 따라 수행되었다. 무작위 공여자 혈소판은 전혈로부터 제조되었다.

[0281] 도 27a 및 27b는 9㎛M 엡티피바타이드로 처리된 혈소판 풍부 혈장이 T-TAS® 흐름 시스템(콜라겐 및 조직 인자

코팅된 채널) 상에서 폐쇄 시간을 18.43분에서 30분 이상으로 연장했음을 나타낸다. 150k/μL의 트롬보솜의 추가는 시간을 다시 11.56분으로 감소시켰지만 동일한 수의 RDP에서는 폐색이 보이지 않았다.

[0282] **실시예 9. 트롬보솜은 PRP에서 AP2(항-GpIIb/IIIa)에 의해 유도된 연장된 폐색 시간을 역전시켰다**

[0283] 추가의 실험이 AP2로 수행되었다. 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. T-TAS®는 실시예 4에 따라 수행되었다. 무작위 공여자 혈소판은 전혈로부터 제조되었다.

[0284] 도 28a 및 28b는 10μg/mL AP-2로 처리된 혈소판 풍부 혈장이 T-TAS® 흐름 시스템(콜라겐 및 조직 인자 코팅된 채널) 상에서 폐쇄 시간을 18.43분에서 30분 이상으로 연장했음을 나타낸다. 150k/μL의 트롬보솜의 추가는 시간을 다시 13.14분으로 감소시켰고 17.43분에 동일한 수의 RDP에서 폐색이 보였다.

[0285] **실시예 10. 트롬보솜은 아스피린 요법을 받은 대상체로부터 PRP에서 연장된 폐색을 역전시켰다**

[0286] 추가의 실험이 아스피린으로 수행되었다. 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. T-TAS®는 실시예 4에 따라 수행되었다. 무작위 공여자 혈소판은 전혈로부터 제조되었다. 대상체는 81mg/일의 아스피린의 표준 용량을 받았다.

[0287] 도 29a 및 29b는 아스피린 환자로부터 채취한 혈소판 풍부 혈장이 T-TAS® 흐름 시스템(콜라겐 및 조직 인자 코팅된 채널) 상에서 폐색되지 못했음을 나타낸다. 200k/μL의 트롬보솜의 추가는 정상 폐색 시간을 16분으로 되돌렸다.

[0288] **실시예 11. 트롬보솜은 생체-외 아스피린 혈소판 풍부 혈장에서 트롬빈 생성을 회복시킨다**

[0289] 추가의 실험이 아스피린으로 수행되었다. 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. 트롬빈 생성은 실시예 4에 따라 수행되었다.

[0290] 도 30a는 PRP 시약으로 자극된 정상에 대한 아스피린 환자로부터의 혈소판 풍부 혈장의 트롬빈 생성이 50k/μL의 트롬보솜으로 역전되었음을 나타낸다. 도 30b는 트롬보솜(50k/μL)으로 3회 반복 아스피린 생체-외 샘플링에서 정상 트롬빈 생산으로부터 변화 및 정상 트롬빈 생산으로의 복귀, 최고 생산까지 시간 및 지연 시간을 나타낸다.(n=3 트롬보솜 로트, n=2 개체).

[0291] **실시예 12. 트롬보솜은 NSAID 이부프로펜 요법을 받은 대상체로부터 PRP에서 지혈을 회복시킨다.**

[0292] 추가의 실험이 NSAID인 이부프로펜으로 수행되었다. 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다. 응집측정법 및 T-TAS®는 실시예 4에 따라 수행되었다.

[0293] 혈소판 풍부 혈장이 800mg 이부프로펜을 받은 대상체로부터 채취되었다. 도 31a는 아라키돈산에 대한 반응에서 응집의 결여가 PRP에서 NSAID 존재를 확인시켜준다는 것을 나타낸다. 도 31b는 T-TAS® 흐름 시스템(콜라겐 및 조직 인자 코팅된 채널) 상의 폐색을 나타내며; 이부프로펜 환자로부터 PRP는 폐색을 입증하였지만 ADP의 추가로 폐색이 사라졌다. 150k/μL 트롬보솜의 추가로 폐색이 회복되었다.

[0294] **실시예 13. 트롬보솜®은 초-약리학적 클로피도그렐로 처리된 NOD-SCID 마우스에서 출혈 시간을 회복한다**

[0295] 추가의 실험이 클로피도그렐로 수행되었다. 트롬보솜은 실시예 4에서의 절차와 일치하여 제조되었다.

[0296] 마우스는 5일 동안 클로피도그렐로 처리되었다. 마우스는 마취되고 꼬리 말단이 잘려진 다음 즉시 트롬보솜이 투여되었다. 꼬리 자르기에서 꼬리 출혈 정지까지의 시간이 육안 검사에 의해 기록되었다.

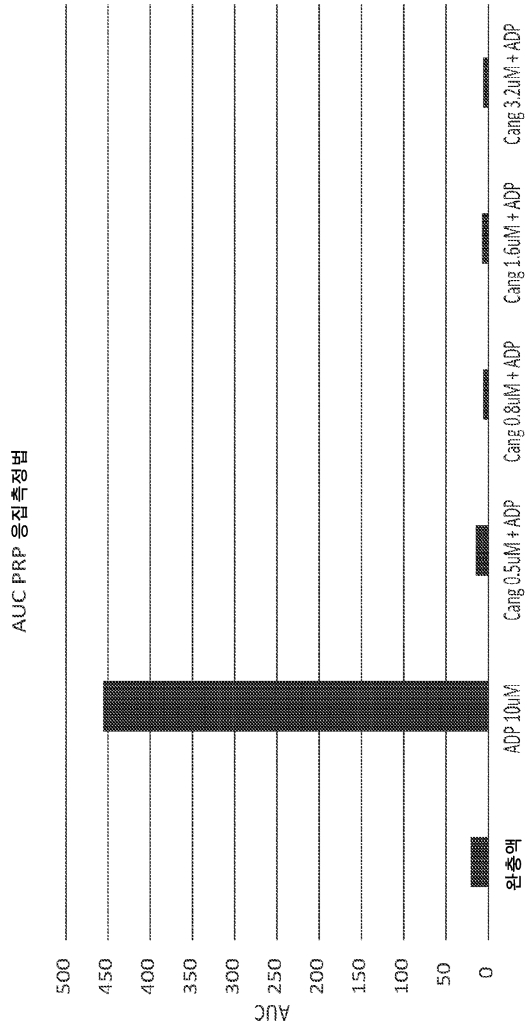
[0297] NOD/SCID 마우스는 5일 동안 ~3배 임상 용량의 클로피도그렐로 처리된 다음 꼬리-자르기 출혈 모델에서 평가되었다. 출혈 시간(분)은 9분에서 처리되지 않은 것에 대비해 클로피도그렐 처리로 17.8분으로 연장되었다(데이터는 도시되지 않음). 8μL/그램의 트롬보솜(200μL에서 1.8 x 10^9 입자/mL)으로 처리는 출혈을 12.31분으로 감소시켰다(도 32).

[0298] 전술한 설명은 발명의 바람직한 실시형태에 대한 것이지만, 다른 변경 및 변형이 당업자에게 명백할 것이고 발명의 사상 또는 범주를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다는 점에 유의한다. 더욱이, 발명의 일 실시형태와 관련하여 기술된 특징은 위에서 명시적으로 언급되지 않더라도 다른 실시형태와 연계하여 사용될 수 있다. 추가로, 당업자는 위에서 논의된 바와 같은 발명이 상이한 순서인 단계 및/또는 개시된 것과 상이한 구성인 하드웨어 요소로 실시될 수 있다는 것을 쉽게 이해할 것이다. 따라서, 발명이 이들 바람직한 실시형태에 기초하여 기술되었지만, 발명의 사상 및 범주 내에 남아 있으면서 특정 변형, 변경 및 대안적인 구성이 명백할 것이라는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 그렇게 청구된 발명의 실시형태는 본 명세서에서 본질적으로 또는 명시적으로 기술되

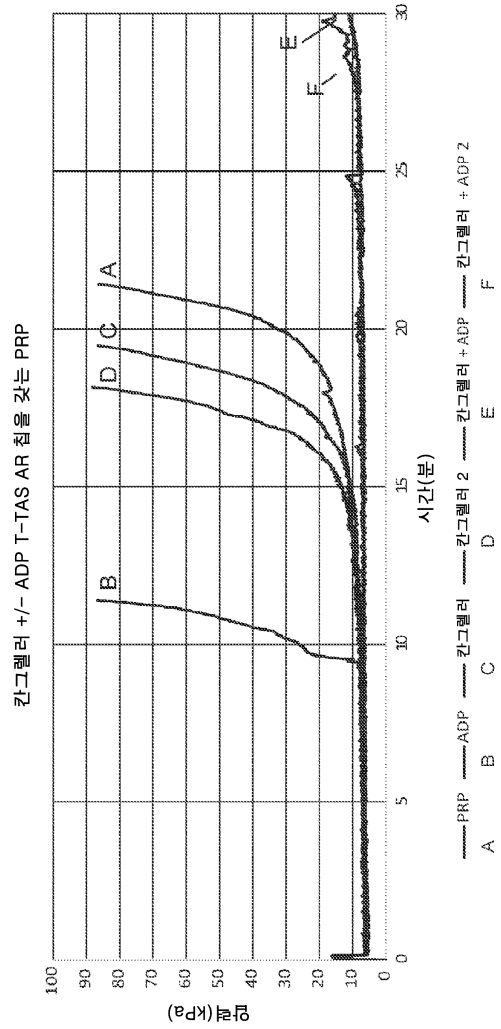
고 가능하게 된다. 따라서 발명의 범위와 경계를 결정하기 위해 첨부된 청구범위를 참조해야 한다.

도면

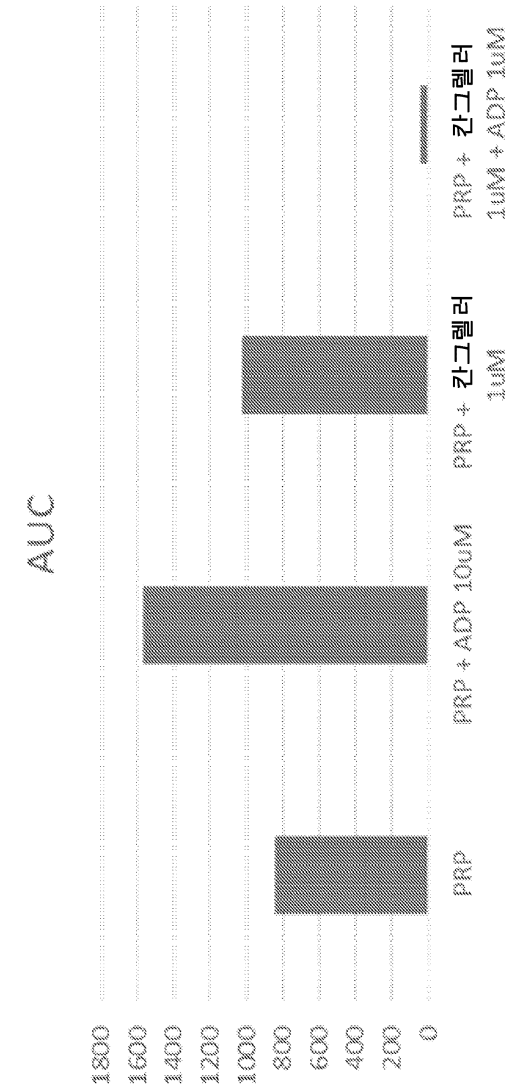
도면1



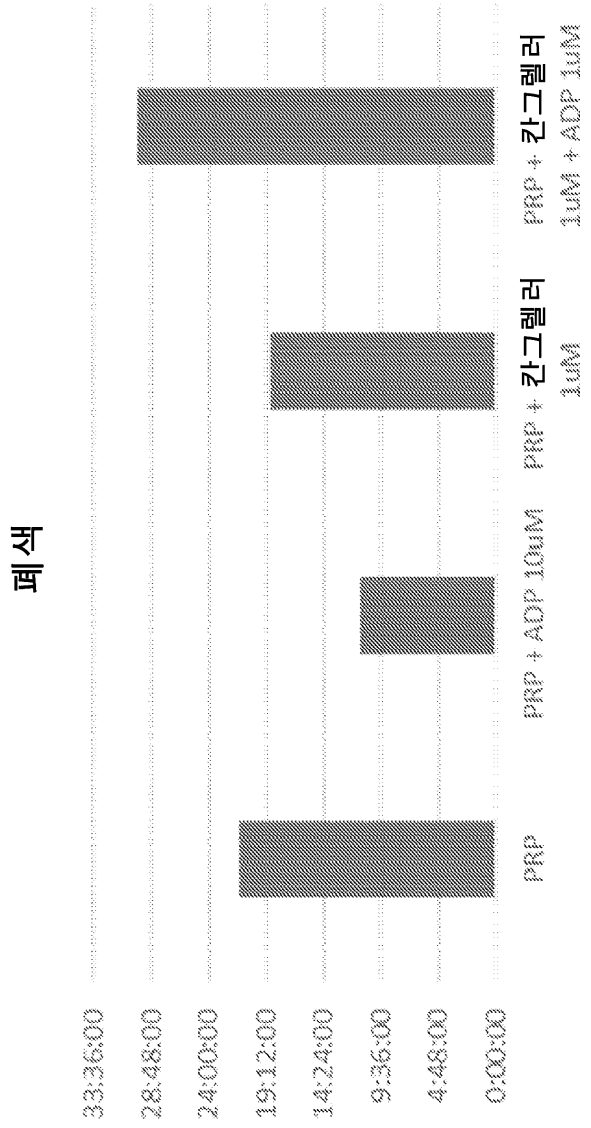
도면2


칸그렐러 +/- ADP T-TAS AR 칩을 갖는 PRP
압력(kPa)
시간(분)
A
B
C
D
E
F
PRP
ADP
칸그렐러
칸그렐러 2
칸그렐러 + ADP
칸그렐러 + ADP 2

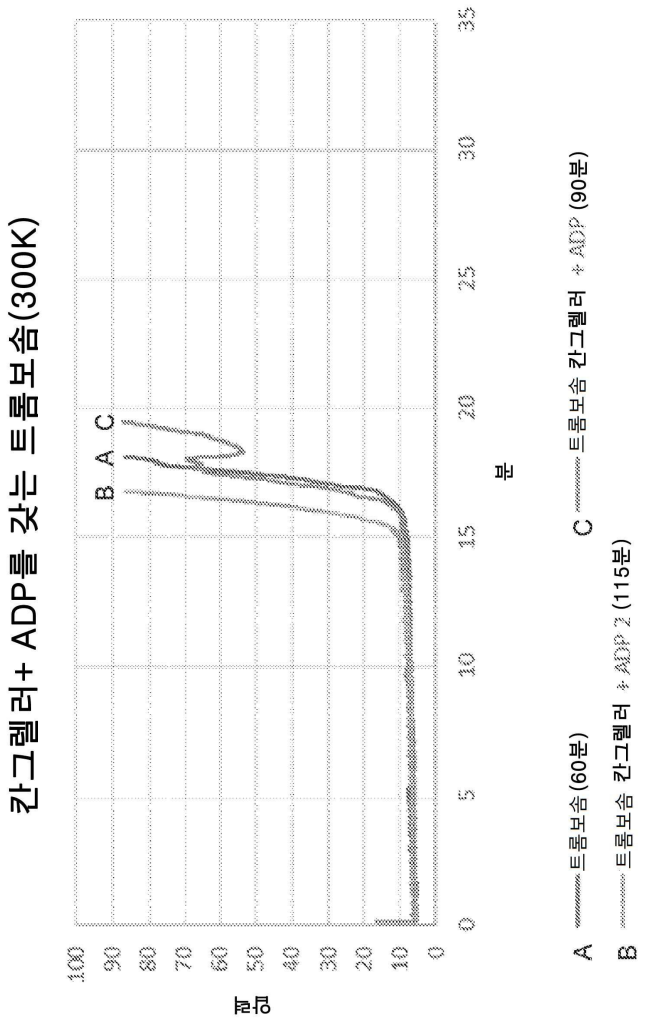
도면3


AUC
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
PRP
PRP + ADP 10uM
PRP + 칼그란 러 1uM
PRP + 칼그란 러 1uM + ADP 1uM

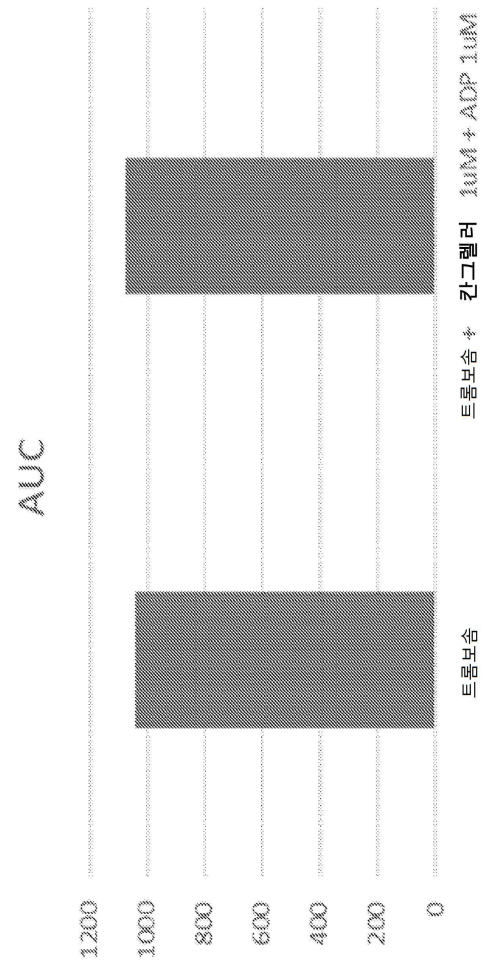
도면4


폐색
33:36:00
28:48:00
24:00:00
19:12:00
14:24:00
9:36:00
4:48:00
0:00:00
PRP
PRP + ADP 10uM
PRP + 라그렐러 1uM
PRP + 라그렐러 1uM + ADP 1uM

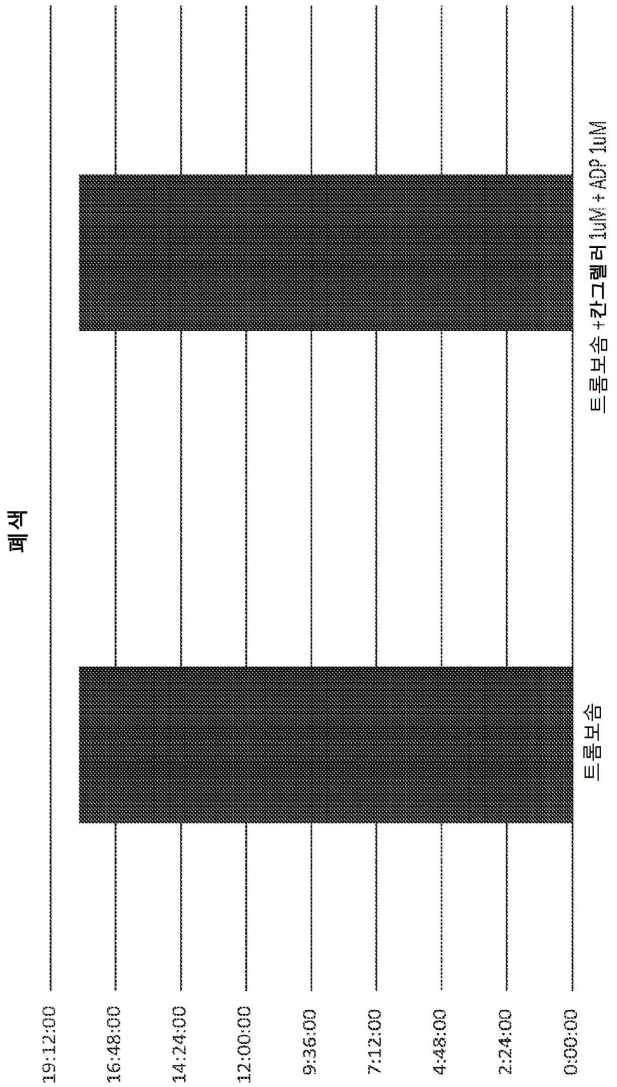
도면5


칸그렐러+ ADP를 갖는 트롬보솜(300K)
B A C
분
A 트롬보솜(60분)
B 트롬보솜 칸그렐러 + ADP 2 (115분)
C 트롬보솜 칸그렐러 + ADP (90분)

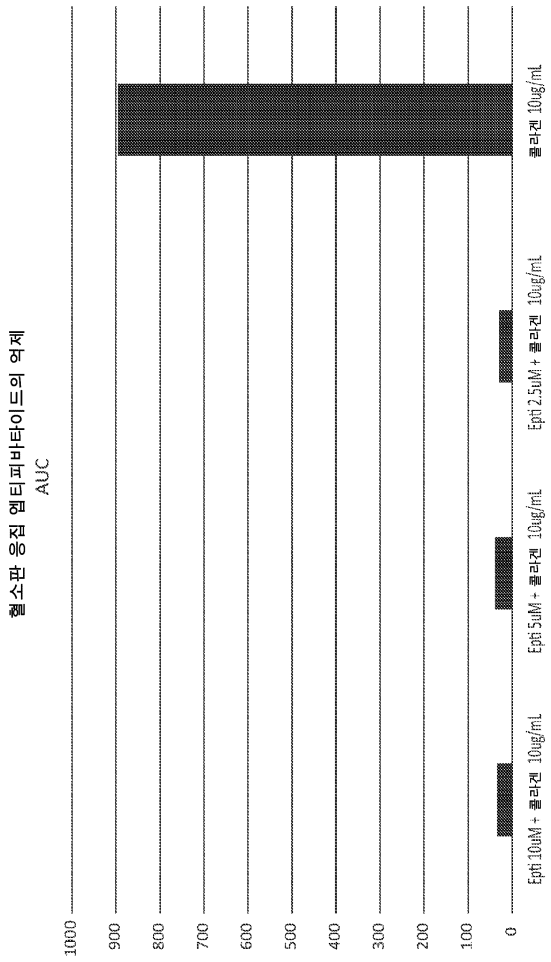
도면6



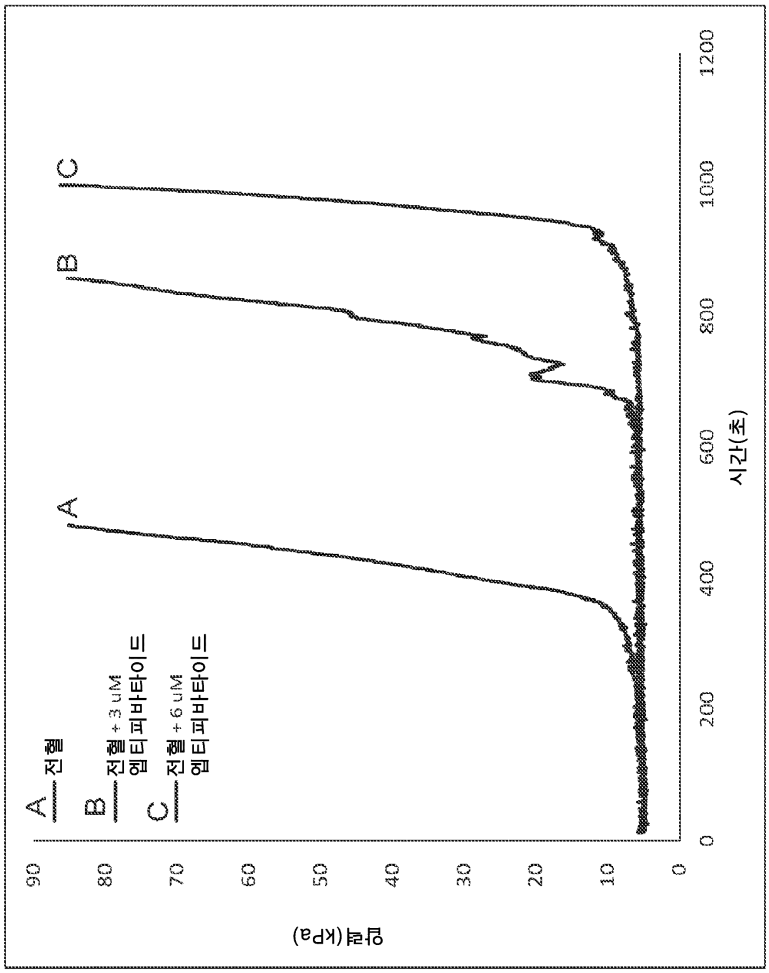
도면7


폐색
19:12:00
16:48:00
14:24:00
12:00:00
9:36:00
7:12:00
4:48:00
2:24:00
0:00:00
트롬보송
트롬보송 +칸그렐러 1uM + ADP 1uM

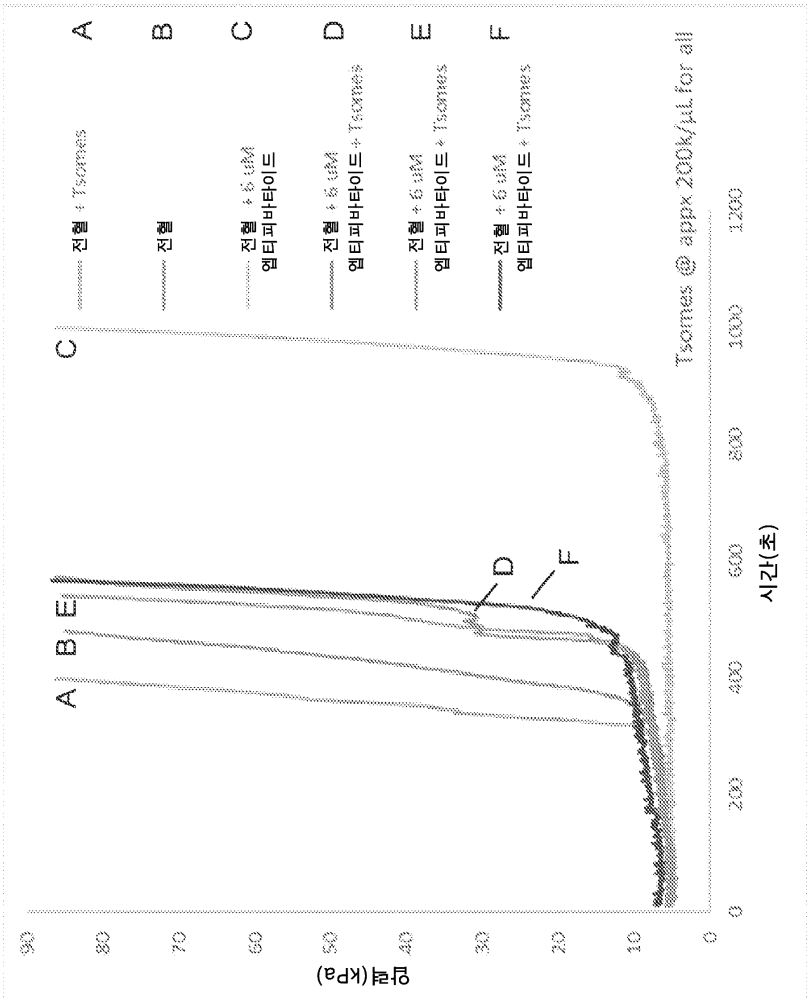
도면8


혈소판 응집 엡티피바타이드의 억제
AUC
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Epti 10uM + 콜라겐 10ug/mL
Epti 5uM + 콜라겐 10ug/mL
Epti 2.5uM + 콜라겐 10ug/mL
콜라겐 10ug/mL

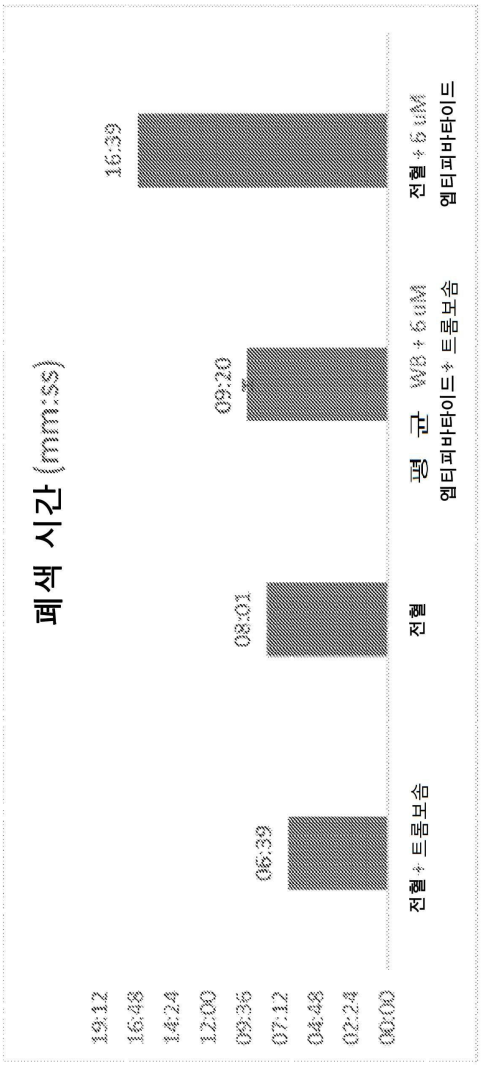
도면9


A 진행
B 진행 + 3 uM 엠티피바타이드
C 진행 + 6 uM 엠티피바타이드
압력(kPa)
시간(초)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
200
400
600
800
1000
1200
A
B
C

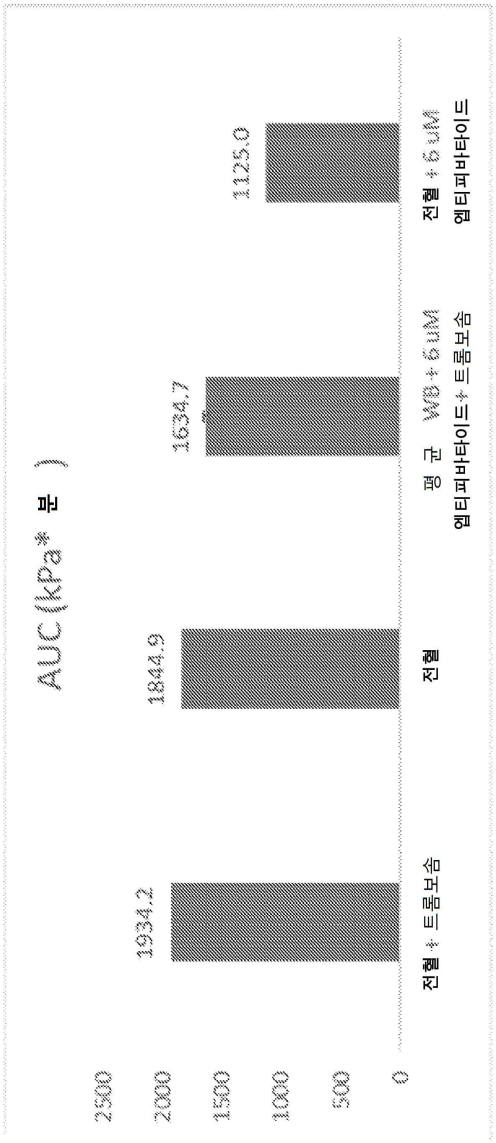
도면10


A
B
C
D
E
F
전혈 + Tsomes
전혈
전혈 + 6 uM 엠티피바타이드
전혈 + 6 uM 엠티피바타이드 + Tsomes
전혈 + 6 uM 엠티피바타이드 + Tsomes
전혈 + 6 uM 엠티피바타이드 + Tsomes
Tsomes @ appx 200k/uL for all
압력(kPa)
시간(초)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
200
400
600
800
1000
1200

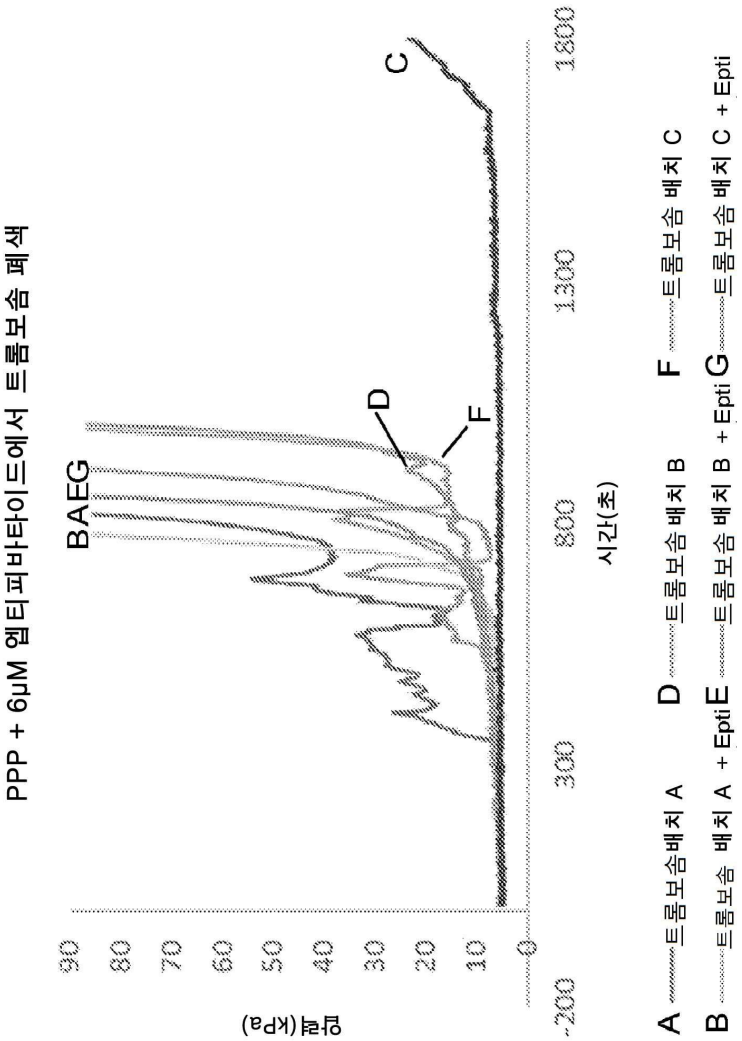
도면11


폐색 시간 (mm:ss)
19:12
16:48
14:24
12:00
09:36
07:12
04:48
02:24
00:00
06:39
08:01
09:20
16:39
전혈 + 트롬보솜
전혈
평 균
WB + 6 uM
엠티피바타이드 + 트롬보솜
전혈 + 6 uM
엠티피바타이드

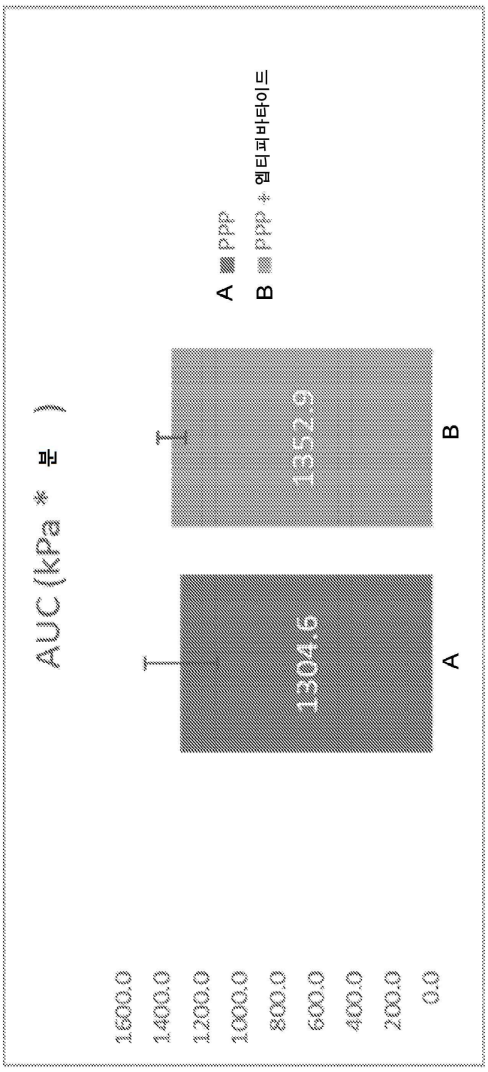
도면12


AUC (kPa* 분)
2500
2000
1500
1000
500
0
1934.2
1844.9
1634.7
1125.0
전혈 + 트롬보숨
전혈
평 균 WB + 6 uM 엠티피바타이드 + 트롬보숨
전혈 + 6 uM 엠티피바타이드

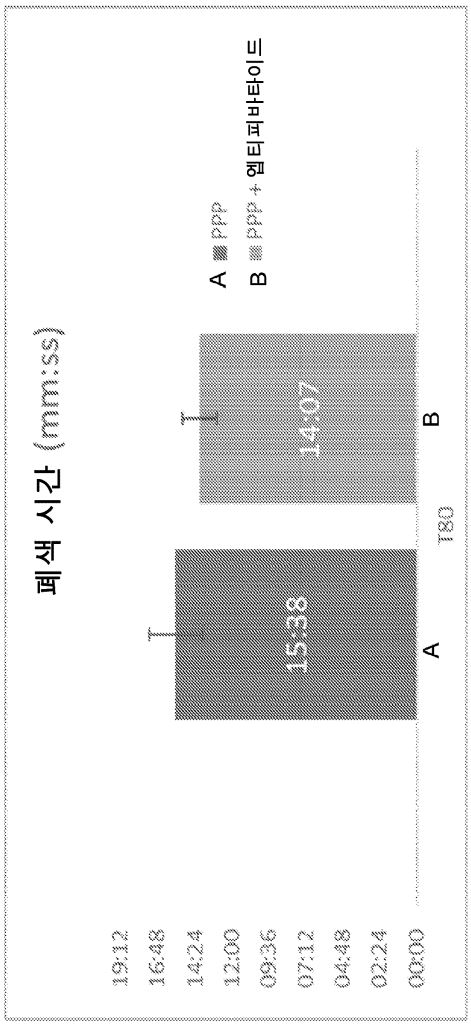
도면13


PPP + 6μM 엘티피바타이드에서 트롬보솜 폐색
BAEG
C
D
F
압력(kPa)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-200
300
800
1300
1800
시간(초)
A 트롬보솜배치 A
B 트롬보솜 배치 A + Epti
C PPP 단독
D 트롬보솜배치 B
E 트롬보솜 배치 B + Epti
F 트롬보솜 배치 C
G 트롬보솜 배치 C + Epti

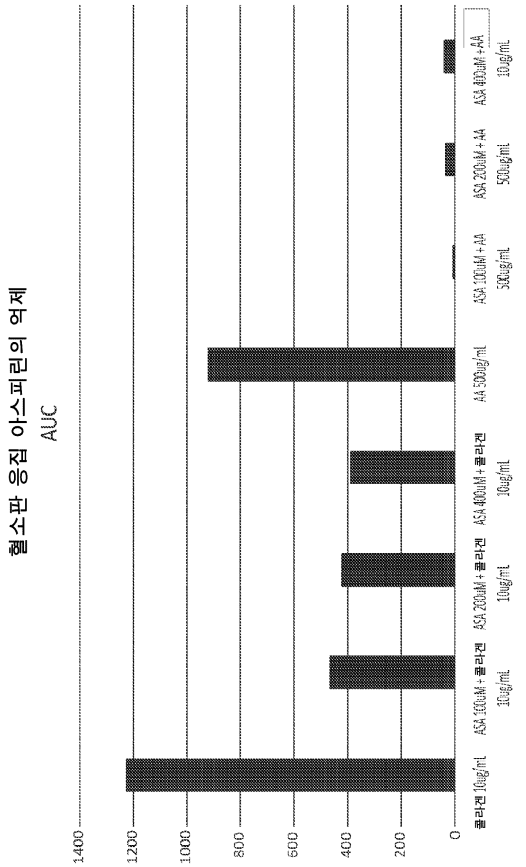
도면14


AUC (kPa * 분)
1600.0
1400.0
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
1304.6
1357.9
A
B
A PPP
B PPP + 엘티피바타이드

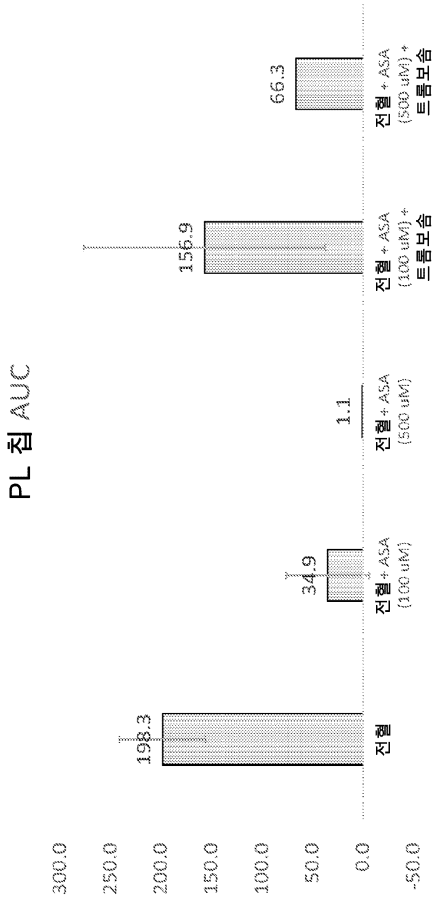
도면15


폐색 시간 (mm:ss)
19:12
16:48
14:24
12:00
09:36
07:12
04:48
02:24
00:00
15:38
14:07
A
B
T80
A PPP
B PPP + 엡티피바타이드

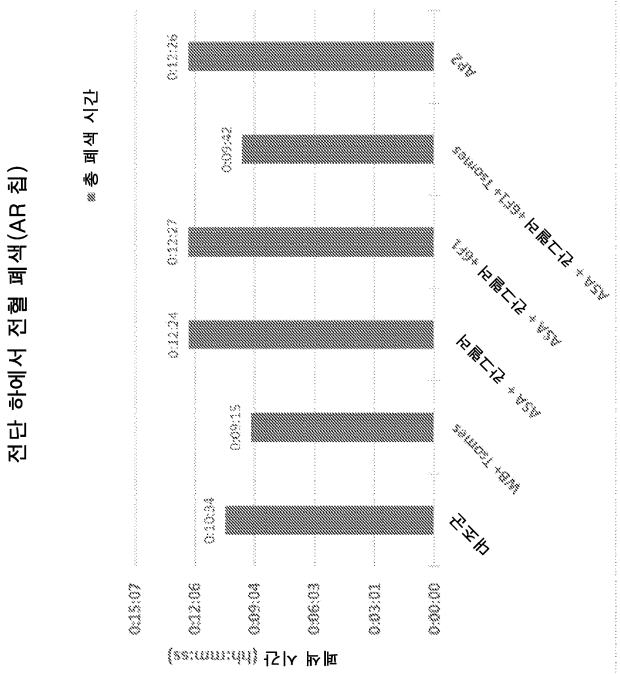
도면16


혈소판 응집 아스피린의 억제
AUC
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
콜라겐 10ug/ml
ASA 100uM + 콜라겐 10ug/ml
ASA 200uM + 콜라겐 10ug/ml
ASA 400uM + 콜라겐 10ug/ml
AA 500ug/ml
ASA 100uM + AA 500ug/ml
ASA 200uM + AA 500ug/ml
ASA 400uM + AA 500ug/ml

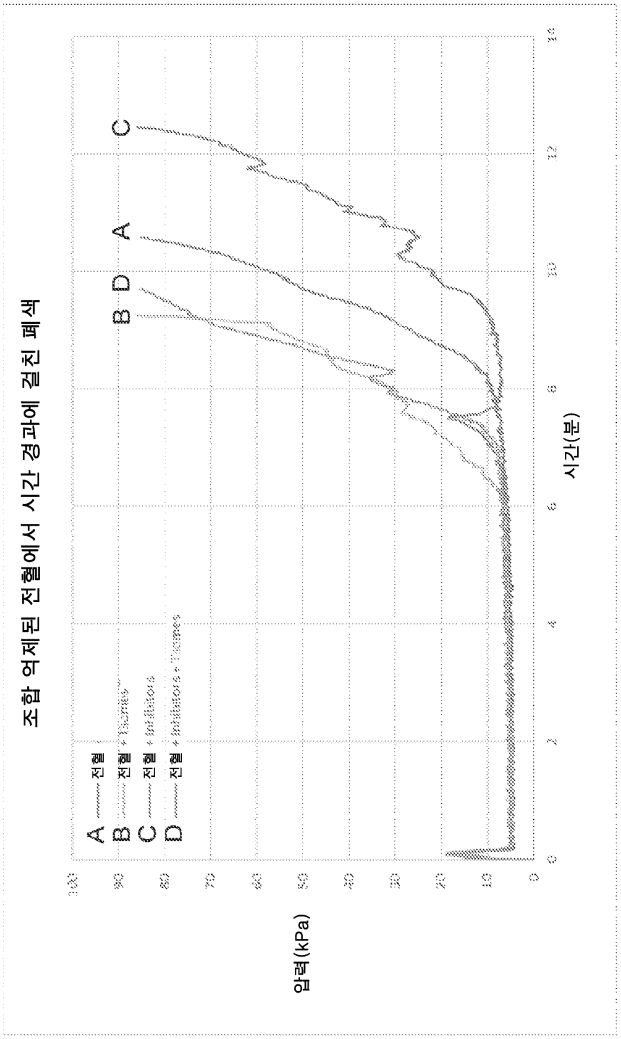
도면17


PL 칩 AUC
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
-50.0
198.3
34.9
1.1
156.9
66.3
전혈
전혈 + ASA (100 uM)
전혈 + ASA (500 uM)
전혈 + ASA (100 uM) + 트롬보숨
전혈 + ASA (500 uM) + 트롬보숨

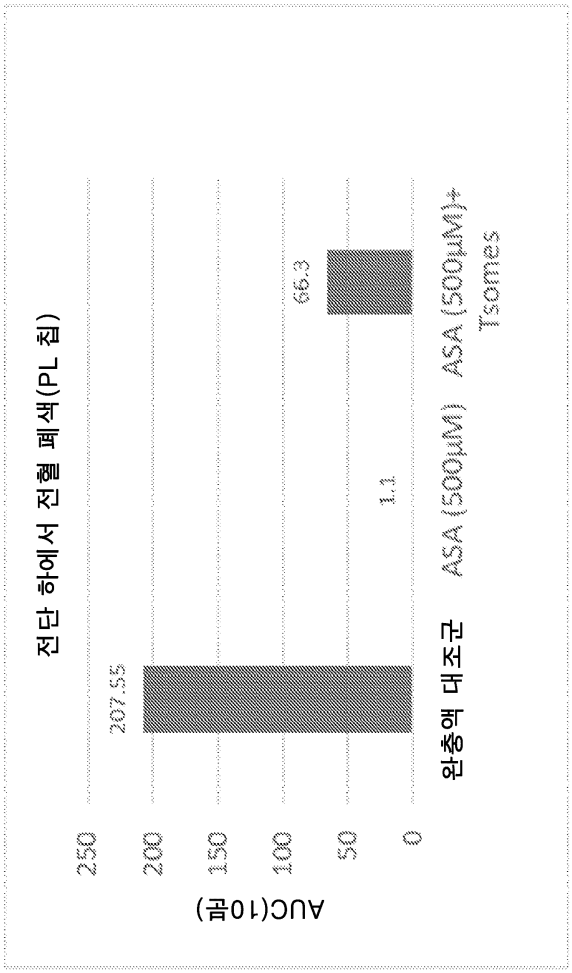
도면18


전단 하에서 전혈 폐색(AR 칩)
총 폐색 시간
폐색 시간 (hh:mm:ss)
0:15:07
0:12:06
0:09:04
0:06:03
0:03:01
0:00:00
0:10:34
0:09:15
0:12:24
0:12:27
0:09:42
0:12:26
대조군
WB+ Tsomes
ASA + 간그렇리
ASA + 간그렇리 +6F1
ASA + 간그렇리 +6F1+ Tsomes
AP2

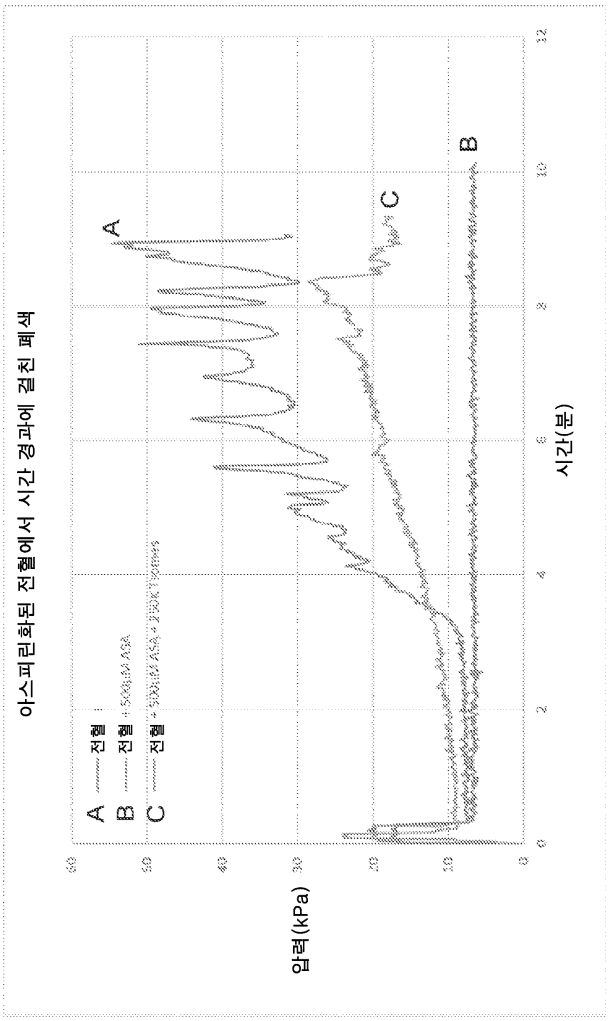
도면19


조합 억제된 전혈에서 시간 경과에 걸친 폐색
A —— 전혈
B —— 전혈 + Tacrines
C —— 전혈 + Inhibitors
D —— 전혈 + Inhibitors + Tacrines
A
B
C
D
압력(kPa)
시간(분)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
2
4
6
8
10
12
14

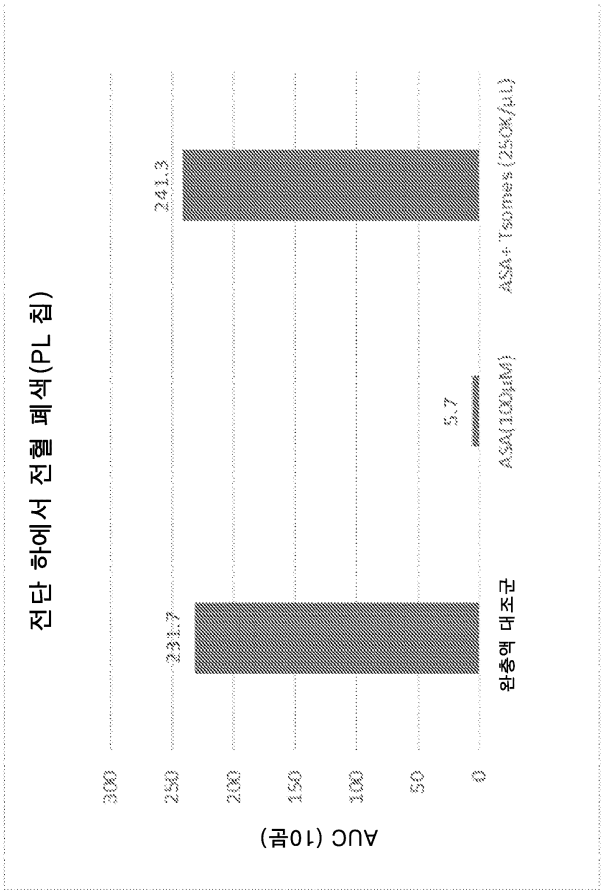
도면20


전단 하에서 전혈 폐색(PL 칩)
AUC(10분)
250
200
150
100
50
0
207.55
1.1
66.3
완충액 대조군
ASA (500μM)
ASA (500μM)+ Tsomes

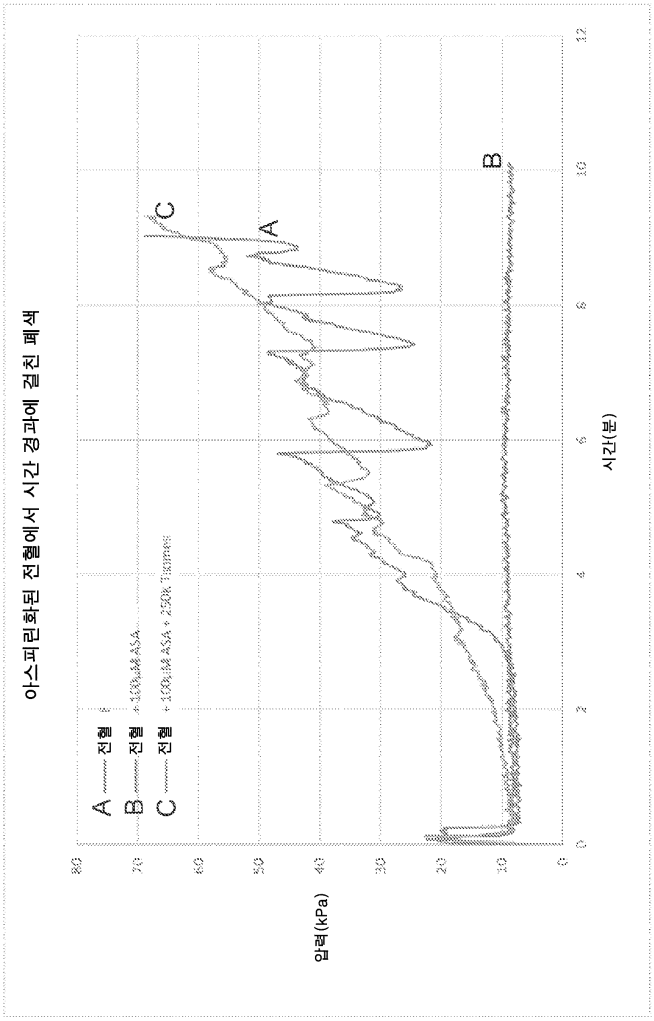
도면21



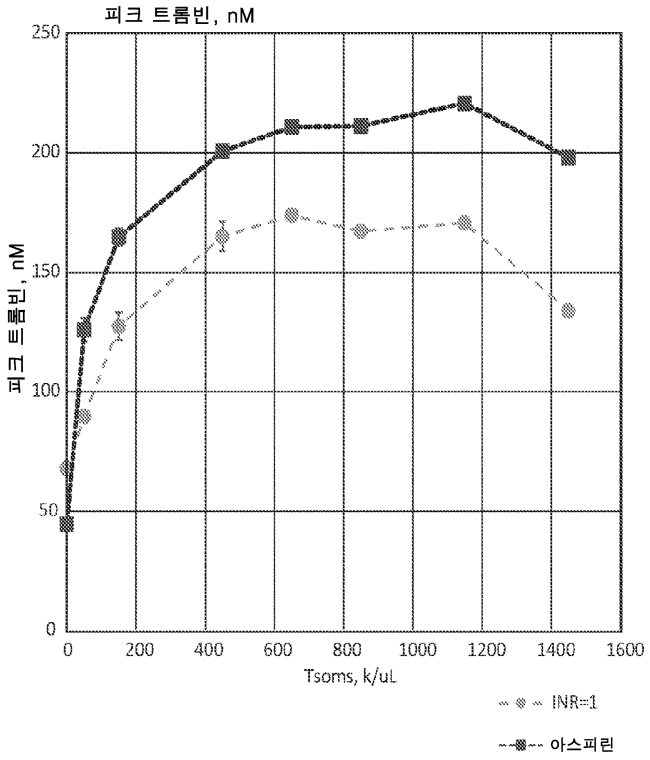
도면22


전단 하에서 전혈 폐색(PL 칩)
AUC (10분)
300
250
200
150
100
50
0
231.7
5.7
241.3
완충액 대조군
ASA(100μM)
ASA+Tsomes(250K/μL)

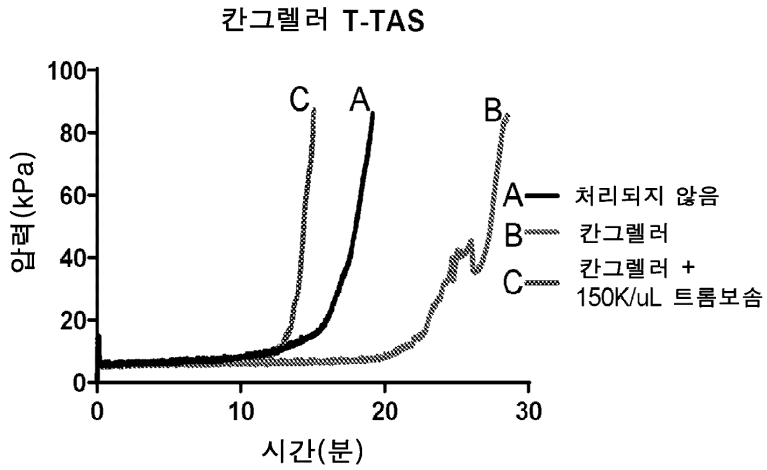
도면23


아스피린화된 전혈에서 시간 경과에 걸친 폐색
A ——— 전혈
B ——— 전혈 + 100μM ASA
C ——— 전혈 + 100μM ASA + 250k Tissues
A
B
C
압력(kPa)
시간(분)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
2
4
6
8
10
12

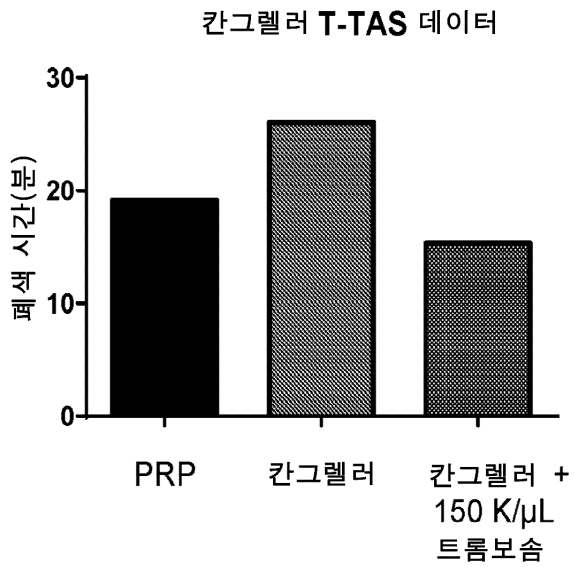
도면24


피크 트롬빈, nM
250
200
150
100
50
0
피크 트롬빈, nM
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
Tsoms, k/uL
INR=1
아스피린

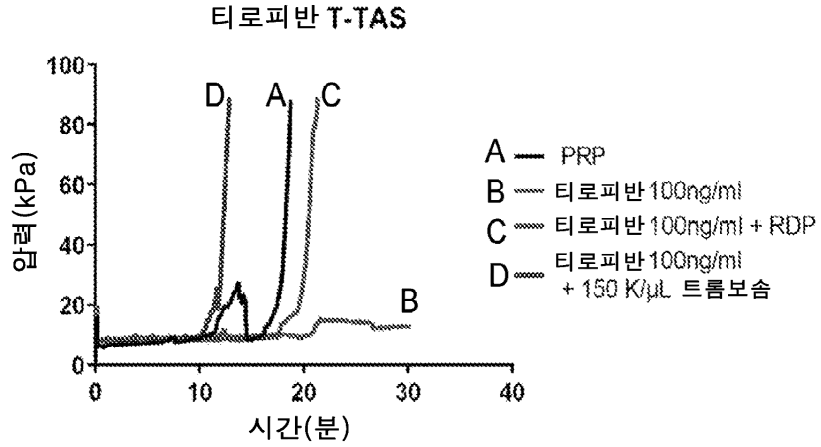
도면25a


칸그렐러 T-TAS
100
80
60
40
20
0
압력(kPa)
C
A
B
0
10
20
30
시간(분)
A 처리되지 않음
B 칸그렐러
C 칸그렐러 +
150K/uL 트롬보솜

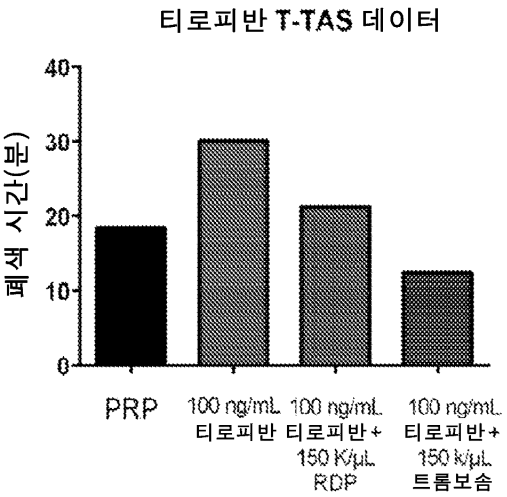
도면25b



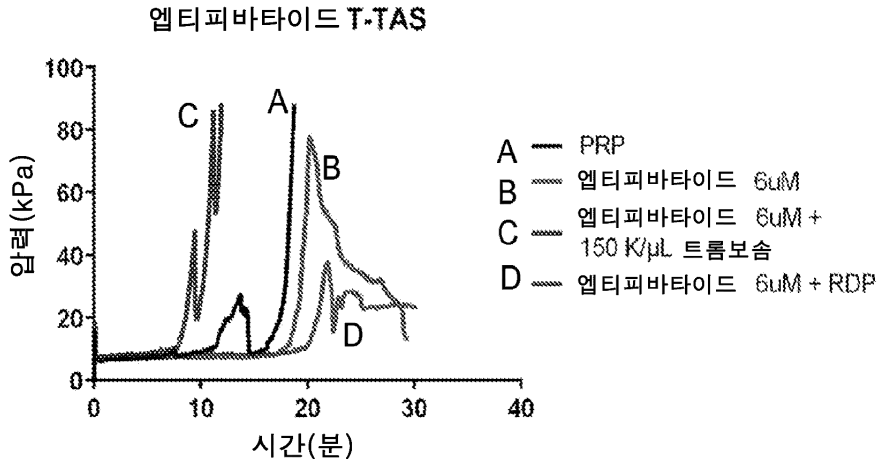
도면26a



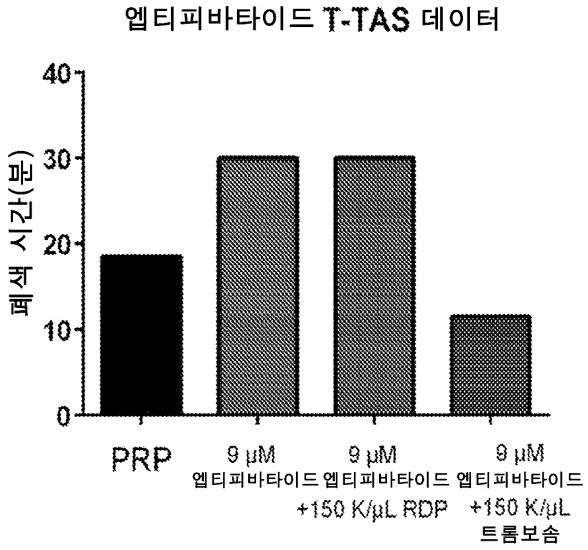
도면26b



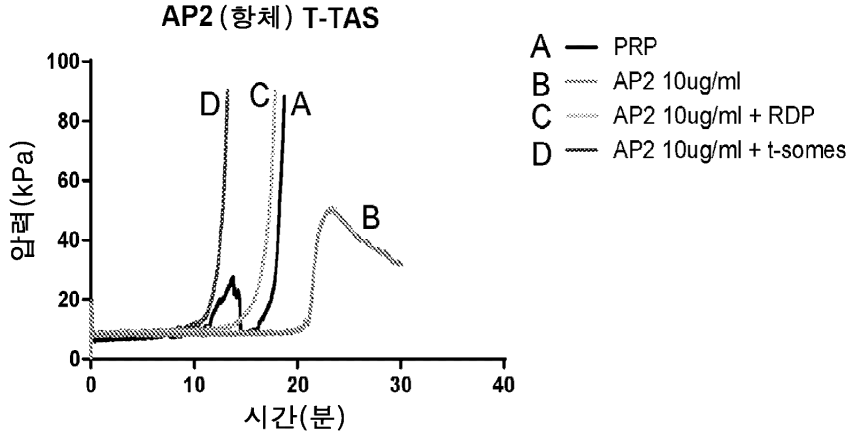
도면27a



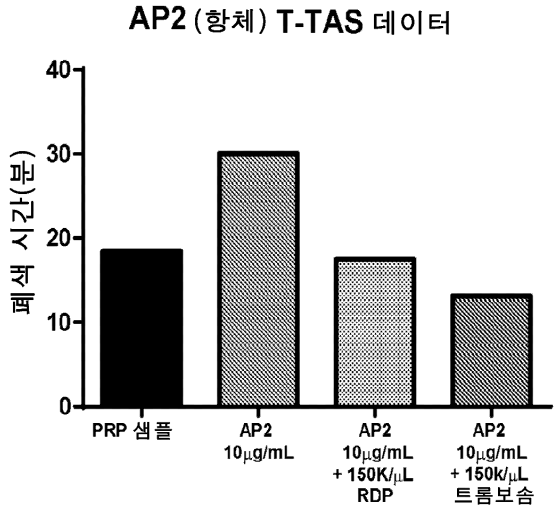
도면27b



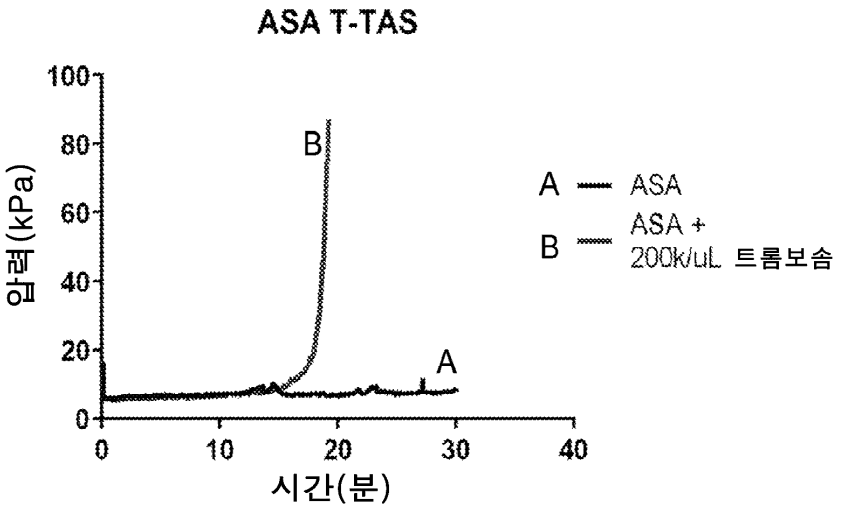
도면28a



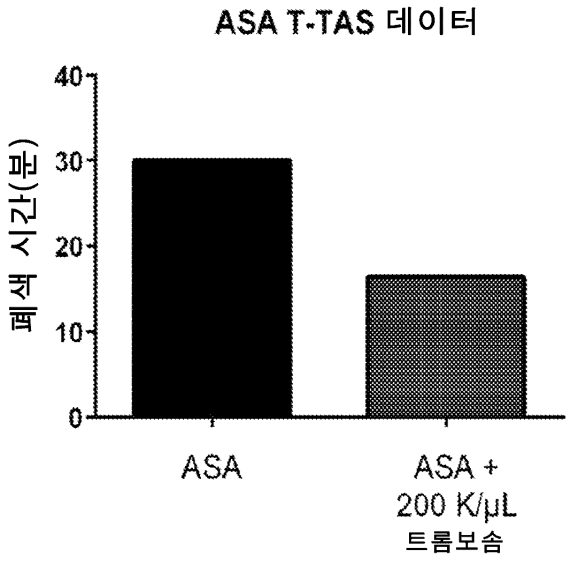
도면28b


AP2 (항체) T-TAS 데이터
폐색 시간(분)
40
30
20
10
0
PRP 샘플
AP2 10μg/mL
AP2 10μg/mL + 150K/μL RDP
AP2 10μg/mL + 150k/μL 트롬보솜

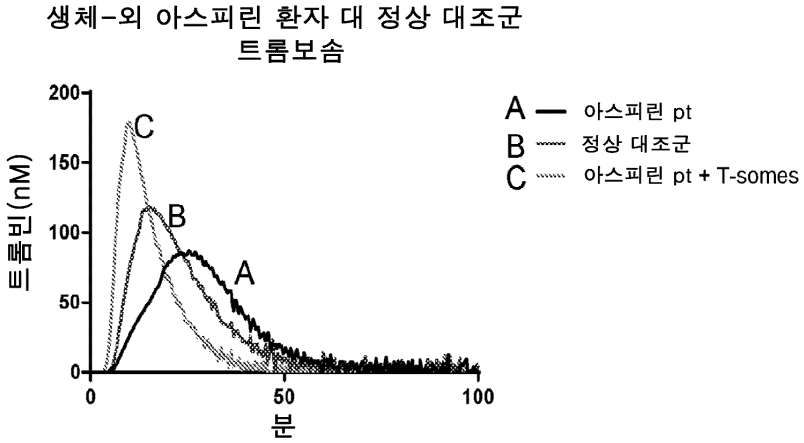
도면29a


ASA T-TAS
압력(kPa)
100
80
60
40
20
0
B
A
0
10
20
30
40
시간(분)
A ASA
B ASA + 200k/uL 트롬보솜

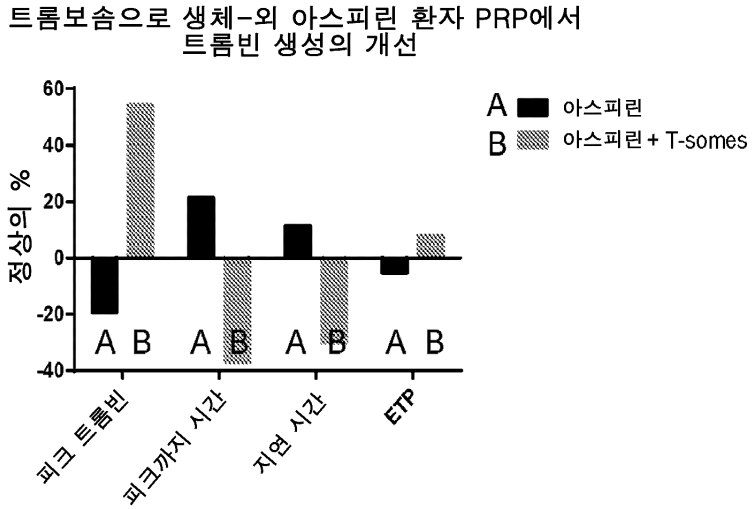
도면29b



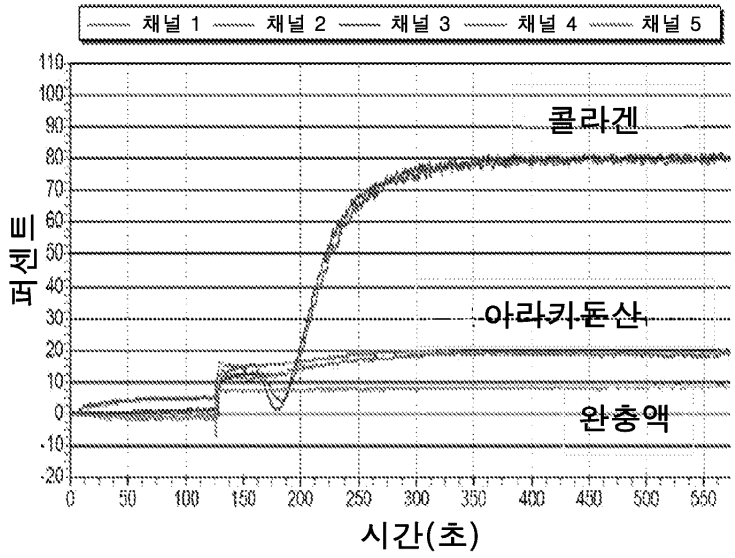
도면30a



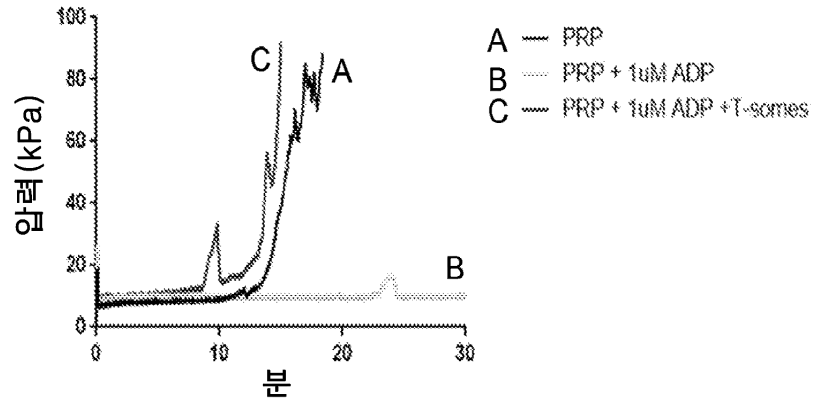
도면30b



도면31a



도면31b



도면32

