



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0614981-2 A2**

(22) Data de Depósito: 01/08/2006
(43) Data da Publicação: 26/04/2011
(RPI 2103)



(51) Int.Cl.:
A61K 31/14
A23L 1/30
A61P 3/02
A61P 7/02

(54) Título: **USO DE COLINA PARA PREVENÇÃO DE TROMBOSE ASSOCIADA COM A NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL**

(30) Prioridade Unionista: 16/08/2005 US 60/708.395

(73) Titular(es): ALAN L. BUCHMAN

(72) Inventor(es): ALAN L. BUCHMAN

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2006029869 de 01/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/021529 de 22/02/2007

(57) Resumo: USO DE COLINA PARA PREVENÇÃO DE TROMBOSE ASSOCIADA COM A NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL. A deficiência de colina é um fator de risco para o desenvolvimento de trombose em pacientes com falência intestinal que requer nutrição parenteral total. É fornecido um método de prevenção de trombose, preferivelmente trombose venosa, compreendendo a administração a um paciente que recebe TPN uma solução nutriente que compreende colina. É fornecido também um método de diagnosticar um risco para trombose que compreende coletar uma amostra de um paciente e detectar o nível de colina livre no plasma.

USO DE COLINA PARA PREVENÇÃO DE TROMBOSE ASSOCIADA COM A NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL

PEDIDO RELACIONADO

Este pedido reivindica prioridade ao Pedido US n°. de
5 série 60/708.395, depositado em 16 de agosto de 2005, que é
incorporado em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se aos métodos para prevenir a
trombose, preferivelmente trombose venosa. Mais
10 particularmente a invenção relaciona-se ao uso de colina
para diminuir os níveis de homocisteína e prevenir a
trombose em pacientes que recebem a nutrição parenteral
total (TPN).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

15 A TPN originada como um procedimento de emergência que
foi primeiramente usada depois da cirurgia para trauma
severo e maciço do trato gastrointestinal. A TPN tornou-se
um meio relativamente comum de fornecer o descanso e a
nutrição do intestino em uma variedade de condições. Embora
20 A TPN fosse empregada inicialmente como um procedimento de
nutrição temporária a curto prazo, tornou-se também
amplamente usada como um protocolo de nutrição a longo
prazo.

A nutrição parenteral, seja total ou suplementar, foi
25 empregada em uma ampla variedade de condições crônicas. Por
exemplo, os pacientes que sofrem de má nutrição de doenças
de intestino inflamatórias agudas e crônicas muitas vezes
requerem a nutrição parenteral total. Além disso, os
pacientes que sofrem de obstrução parcial ou total do trato
30 gastrointestinal que não pode ser aliviado imediatamente

pela cirurgia são também candidatos para a TPN. Outros pacientes que recebem a TPN incluem aqueles que sofrem de queimaduras maciças que produzem a perda de proteína crítica e aqueles os pacientes que sofrem de outros
5 distúrbios em que a má nutrição é uma ameaça a sua vida e eles não podem receber ou absorver nutrientes através do trato digestivo.

A solução nutriente ou a mistura que é administrada intravenosamente ao paciente durante a TPN é geralmente
10 ajustada às necessidades e à tolerância individuais do paciente. No general, a solução nutriente é uma solução aquosa que contém a dextrose, os aminoácidos, os eletrólitos, os elementos traço e as vitaminas. Dois a três litros de solução nutriente são administrados
15 intravenosamente ao paciente durante a nutrição parenteral total. A administração da solução nutriente é realizada geralmente por um cateter venoso central que seja introduzido na veia cava superior ou inferior.

Embora a nutrição parenteral total seja um programa de
20 alimentação que salva vidas para muitos pacientes, há um número de complicações que podem desenvolver. O paciente pode sofrer as reações adversas devido à sensibilidade a alguns dos elementos na mistura nutriente e a possibilidade de infecções existe sempre. Outras complicações que podem
25 se desenvolver incluem a deficiência de colina, o desequilíbrio de eletrólito, a hiperglicemia, a sobrecarga cardíaca, a desidratação, a acidose metabólica, o trauma mecânico ao coração, a doença metabólica de osso e doenças renais.

30 Além das complicações possíveis acima notadas, notou-

se que os pacientes com falha intestinal que requerem TPN a longo prazo tendem a desenvolver a trombose de flebite e de cateter como uma complicação. A trombose de cateter venoso central é uma complicação freqüente nos pacientes que
5 requerem a nutrição parenteral total a longo prazo (TPN). Buchman AL, Goodson B, Herzog F, Ament ME. A trombose de cateter e a síndrome da veia cava superior/inferior são complicações raras de nutrição parenteral a longo prazo. (1994) *Clinical Nutrition*. 13:356-360. A trombose e a perda
10 recorrente pelo menos de dois vasos principais é uma indicação de cuidado médico aprovado para o transplante intestinal pequeno. Buchman AL, Scolopio J, Fryer J. Revisão técnica do tratamento de síndrome do intestino delgado e transplante intestinal(2003) *Gastroenterology*
15 124:1111-1134. Hiperhomocisteïnemia é um fator de risco para o desenvolvimento de trombose venosa. Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, et al. Hiperhomocisteïnemia como um fator de risco para a trombose de veia profunda. (1996) *New Engl J Med* 334:759-762; Eichinger S. Homocisteína, vitamina
20 B6 e o risco de tromboembolismo venoso recorrente. (2003) *Pathophysiol Haemost Thromb* 33:342-4; Unlu Y, Keles S, Becit N, et al. Hiperhomocisteïnemia como um fator de risco para a trombose de veia profunda. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005 (em impressão). A deficiência de colina tem sido
25 descrita previamente nos pacientes que requerem a nutrição parenteral a longo prazo e manifesta-se em hepático (Buchman AL, Dubin M, Jenden D, et al. Lecitina suplementação causa uma diminuição na esteatose hepática nos pacientes que recebem a nutrição parenteral a longo
30 prazo. (1992) *Gastroenterology* 102:1363-70; Buchman AL,

Dubin M, Moukarzel A, et al. Deficiência de colina: uma causa de esteatose hepática associada com a nutrição parenteral que pode ser invertida com a suplementação intravenosa de cloreto de colina. (1995) *Hepatology* 22:1399-1403; Buchman AL, Sohel M, Dubin M, Jenden DJ, Roch M.. Deficiência de colina causa anormalidades hepáticas reversíveis nos pacientes durante a nutrição parenteral: prova de uma exigência humana de colina; uma experimentação placebo-controlada. (2001) *JPEN* 25:260-268; Buchman AL, Sohel M, Brown M, et al. A memória verbal e visual melhorada após o suplemento de colina na nutrição parenteral total a longo prazo: um estudo piloto. (2001) *JPEN* 25:30-35) e anormalidades neuropsicóticas. Buchman AL, et al. (2001) *JPEN* 25:30-35. Em roedores, a deficiência de colina é associada com a hiperhomocisteïnemia. Da Costa KA, Gaffney CE, Fischer LM, Zeisel SH. A deficiência de colina nos ratos e humanos é associada com a concentração aumentada de homocisteína de plasma após uma carga de metionina. (2005) *Am J Clin Nutr* 81:440-444; Chen AH, Innis SM, Davidson AG, James SJ. Excreção de Fosfatidicolina e de lisofosfatidilcolina é aumentada em crianças com fibrose cística é associada com o homocisteína de plasma aumentada, adenosilhomocisteína, S-adenosilmetionina. (2005) *Am J Clin Nutr* 81:686-691; Monserrat AJ, Musso AM, Tartas N, et al. Coagulopatia de consumo na falha renal aguda induzida por dietas hipolipotrópicas. (1981) *Nephron* 28:276-284; e Varela-Moreiras G, Ragel C, Perez de Miguelanz J. Deficiência de colina e tratamento de metotrexato induz mudanças marcadas mas reversíveis em concentrações folato hepáticas, taxas de homocisteína de soro e metilação de DNA

nos ratos. (1995) J Am Coll Nutr 14:480-485. A
suplementação de colina oral, concentração de homocisteína
de plasma diminuída em um grupo de pacientes com doença
vascular arterial prematura (Dudman NP, Wilcken DE, Wang J,
5 et al). A trombose arterial e a trombose venosa são eventos
diferentes entretanto, trombose arterial que é
completamente rara e isolada, visto que a trombose venosa é
relativamente comum nos pacientes que recebem TPN.
Distúrbio no metabolismo de metionina/homocisteína na
10 doença vascular prematura. Suas ocorrência, terapia de
cofatores, e enzimologia. (1993) Arterioscler Thromb
13:1253-1260) em um grupo de homens saudáveis (Olthof MR,
Brisk EJ, Katan MB, Verhoef P. Colina suplementada como
fosfatidilcolina diminui concentrações de homocisteína no
15 plasma carregado de postmetionina e jejum em homens
saudáveis. (2005) Am J CHn Nutr 82:111-117.).
Conseqüentemente, a deficiência de colina é um fator de
risco significativo suspeitado para o desenvolvimento da
trombose de cateter nos pacientes com fator de risco de
20 falha intestinal no desenvolvimento de trombose de cateter.

É, conseqüentemente, desejável fornecer um tratamento
simples e eficaz que seja capaz de aumentar níveis de
colina livre no plasma nos pacientes que recebem a nutrição
parenteral total para diminuir os níveis de homocisteína no
25 sangue. Adicionalmente, é desejável fornecer um tratamento
que seja eficaz em reduzir a hiperhomocisteïnemia,
impedindo desse modo trombozes de cateter que são
associados com a deficiência de colina resultando de
nutrição parenteral total a longo prazo.

De acordo com a presente invenção, descobriu-se que há uma associação com níveis de colina livres no plasma nos pacientes que recebem TPN e (1) hiperhomocisteïnemia, e (2) na incidência de trombose de cateter. Mostrou-se que o nível reduzido ou abaixo do normal de níveis de colina livres no plasma nos pacientes que recebem a nutrição parenteral total correlaciona com um risco ou um risco aumentado para trombose de cateter, trombose primária e recorrente. Outros mostraram risco de trombose venosa com níveis elevados de homocisteína. É portanto percebido que níveis reduzidos ou baixos de colina livre no plasma está associado com a hiperhomocisteïnemia. Níveis de colina livres no plasma aumentados ou níveis quase normais e/ou mantidos em ou níveis próximos do normal, por exemplo, incluindo colina na solução nutriente que é administrada parenteralmente ao paciente conseqüentemente, não apenas manter os níveis de colina livre no plasma em uma faixa normal, mas seriam também eficazes em reduzir os níveis de homocisteína no sangue, e desse modo previnem e/ou inibem a trombose de cateter.

Em um aspecto da presente invenção, colina, preferivelmente na forma de cloreto de colina ou de outro sal de colina, é administrado ao paciente que recebe a nutrição parenteral total. A colina pode ser adicionada à solução nutriente ou separadamente parenteralmente infundida. A dosagem normal de solução nutriente administrada ao paciente em uma base diária está na ordem de dois a três litros de solução. Como uma característica da presente invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz de cloreto de colina ou outro sal de colina

infundida parenteralmente ou adicionada a uma solução nutriente em uma quantidade suficiente para fornecer de 0,25 a aproximadamente 8 gramas de colina por litro de solução.

5 As concentrações acima de colina na solução nutriente são bem toleradas por pacientes e fornecem uma dosagem diária de colina que é eficaz em manter os níveis de colina livres no plasma dentro das faixas normais durante a terapia de nutrição de proteína total crônica. Patente US
10 N°. 5.567.736. Descobriu-se que a adição de colina à solução nutriente nos níveis precedentes de dosagem é eficaz em reduzir níveis de homocisteína e prevenir ou inibir a trombose de cateter naqueles pacientes que sofrem de deficiência de colina crônica.

15 Como uma característica da presente invenção, uma solução nutriente melhorada é fornecida pela adição de cloreto de colina suficiente ou outro sal de colina à solução nutriente normal de paciente de TPN. Nenhum procedimento de formulação complicado ou etapas de mistura
20 difíceis são necessários para realizar a presente invenção. A dosagem desejada de cloreto de colina ou de outro sal de colina é adicionada à solução nutriente aquosa com a solução enriquecida de colina que está sendo administrada ao paciente de TPN de acordo com a prática normal.

25 O cloreto de colina não reage com ou afeta adversamente a dextrose, aminoácidos, eletrólitos, elementos traço, vitaminas e os outros compostos encontrados tipicamente em soluções nutrientes parenterais totais. Além disso, a colina é relativamente estável dentro
30 da solução nutriente quando armazenada sob condições

normais. A colina não se deteriora nem perde sua potência sobre períodos relativamente longos de tempo. Como resultado, a colina pode ser adicionada à solução nutriente de TPN por um farmacêutico ou por um médico, ou pode ser
5 adicionado pelo paciente imediatamente antes da administração da solução. O uso de colina como um suplemento às soluções nutrientes de TPN é incorporado facilmente nas situações que requerem a nutrição parenteral total a longo prazo e a curto prazo.

10 Em um outro aspecto da invenção é fornecido kits para reduzir níveis de homocisteína e/ou para prevenir a trombose, preferivelmente trombose venosa, em um paciente que recebe TPN que compreende uma solução nutriente e uma quantidade terapeuticamente eficaz de colina compreendidas
15 geralmente em um recipiente.

Em um outro aspecto da invenção há um método de monitorar níveis de colina em um paciente que recebe TPN para diagnosticar um risco de trombose, preferivelmente trombose venosa. Em uma modalidade preferida o método
20 compreende a obtenção de uma amostra de sangue ou de plasma de um paciente que recebe TPN e detecção do nível de colina, em que um nível baixo ou diminuído de colina livre no plasma em comparação aos níveis normais é indicativo de um risco aumentado de trombose. Os níveis de colina podem
25 ser monitorados durante um tempo para detectar uma tendência em níveis de colina como um fator determinativo no risco de trombose, ou de monitorar a eficácia da infusão de colina como uma profilaxia para diminuir o risco de trombose.

30 O discutido acima e muitas outras características e

vantagens assistentes da presente invenção serão melhor compreendidas por referência à descrição detalhada quando feitas conjuntamente com os desenhos acompanhantes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 A presente invenção mostra pela primeira vez que a deficiência de colina está associada com o desenvolvimento de trombose de cateter em pacientes com falha intestinal. Além disso, a tendência em direção a concentração inferior de colina livre no plasma em pacientes com trombose
10 recorrente foi também observada. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados aqui, seja supra ou infra, são pelo presente incorporados por referência em sua totalidade.

 Para as finalidades deste relatório descritivo e
15 reivindicações apenas, o termo "colina" inclui colina, sais de colina, precursores de colina e metabólitos de colina, em que os precursores de colina ou os metabólitos de colina são capazes de ser convertido em colina quando misturados com uma solução de TPN ou introduzidos *in vivo*.

20 Como usado aqui e nas reivindicações apenas, o termo "nível normal" significa colina dentro da faixa de aproximadamente 10 nmol/ml a aproximadamente 15 nmol/ml.

 Como usado aqui e nas reivindicações apenas, o termo "parenteral" e "parenteralmente" significa de outras formas
25 que por outros meios que através do trato gastrointestinal; referindo particularmente à introdução de substâncias em um paciente por injeção intravenosa, subcutânea, intramuscular, ou intramedular.

 Como usados aqui e nas reivindicações apenas, o termo
30 "paciente" inclui membros do reino animal que inclui mas

não limita os seres humanos.

Como usada aqui e nas reivindicações apenas, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade suficiente para aumentar a colina livre no plasma a um nível normal ou próximo.

Como usadas aqui e nas reivindicações apenas "trombose" significa a formação ou a presença de entupimento dentro de um vaso sanguíneo que possa causar infarto dos tecidos fornecidos pelo vaso. Preferivelmente, a trombose refere-se à trombose venosa da veia cava superior e/ou inferior. Mais preferivelmente, a trombose refere-se à trombose venosa de cateter, primária e/ou recorrente.

Em um aspecto da presente invenção, é fornecido um método de diminuir níveis de homocisteína em um paciente que recebe a nutrição parenteral total (TPN) que compreende administração parenteral ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de colina. Em um outro aspecto da invenção é fornecido um método de para prevenir a trombose, preferivelmente trombose venosa, em um paciente que recebe a nutrição parenteral total (TPN) que compreende administração parenteral ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de colina. Preferivelmente, a quantidade terapeuticamente eficaz de colina diminui níveis de homocisteína de plasma no paciente. Em uma outra modalidade preferida, a quantidade terapeuticamente eficaz de colina previne a trombose.

A colina pode ser administrada junto com ou separada de uma solução nutriente. Em uma modalidade, a colina pode ser infundida em um paciente separadamente de uma solução

nutriente. Preferivelmente, a colina é administrada em uma dosagem diária total de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 8 gramas. Em uma outra modalidade, uma solução nutriente pode ser suplementada com colina, e a
5 solução nutriente suplementada de colina pode ser infundida em um paciente.

As soluções nutrientes que são usadas na alimentação de pacientes por nutrição parenteral total (TPN) são bem conhecidas. Os ingredientes particulares que são incluídos
10 na solução nutriente variam amplamente dependendo das necessidades nutricionais do paciente e da condição médica do paciente. Geralmente, o ingrediente prevalente nas soluções nutrientes é a dextrose em menores quantidades de aminoácidos, eletrólitos, elementos traço e vitaminas sendo
15 incluídos. No general, a solução nutriente incluirá de 10-35 por cento do volume de uma solução de dextrose. As soluções de dextrose são soluções de base aquosa que contêm entre 10 e 35 gramas de dextrose por litro de solução. Tais soluções de dextrose estão comercialmente disponíveis por
20 Abbott Laboratories, Baxter Healthcare Corp., McGaw Laboratories e outros.

As soluções nutrientes também incluem tipicamente de aproximadamente 2-5 por cento de peso de aminoácidos. Os aminoácidos usados na solução nutriente podem ser qualquer
25 dos aminoácidos essenciais e pode ser incluído em uma variedade de concentrações e misturas. Os aminoácidos preferidos para o uso em soluções nutrientes incluem a treonina, serina, prolina, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina,
30 triptofano, lisina, histidina e arginina. Em adição a

dextrose e aos aminoácidos, a maioria das soluções
nutrientes incluem eletrólitos tais como, potássio, sódio,
cloro, magnésio, acetato, cálcio, e fósforo e outros. Estes
eletrólitos são incluídos geralmente em quantidades
5 relativamente pequenas na ordem de 1 por cento ou menos.

Os elementos traço e as vitaminas são incluídos também
na maioria das soluções nutrientes. Os elementos traço
típicos incluem selênio, cromo, manganês, zinco e outros.
As vitaminas que são usualmente inclusas nas soluções
10 nutrientes incluem A, B1, B2, B6, B12, C, D, E, biotina,
ácido pantotênico, etc.. Os elementos traço estão
geralmente presentes em concentrações na ordem de menos de
um décimo de um por cento. As vitaminas estão geralmente
presentes em quantidades suficientes requeridas suprir as
15 exigências diárias de vitamina que foram estabelecidas e
são amplamente conhecidas.

De acordo com a presente invenção, a colina,
preferivelmente o cloreto de colina ou um outro sal de
colina, são adicionados à solução nutriente para fornecer a
20 introdução intravenosa direta de colina no paciente. Embora
o cloreto de colina seja a forma preferida de colina que é
adicionada à solução nutriente, outros sais de colina como
o bitartrato de colina, citrato dihidrogenado de colina,
fosfato de colina e o bicarbonato de colina, bem como,
25 outros sais farmacêuticos conhecidos por aqueles de
habilidade na técnica, podem ser usados. Além disso, os
precursores de colina e os metabólitos de colina, tais como
fosfatidil de colina, CDP-colina, lecitina de soja, etc.,
podem ser usados.

30 A quantidade de colina que é adicionada à solução

nutriente pode variar dependendo do nível de colina livre no plasma do paciente, grau de hiperhomocisteïnemia e severidade de outros problemas médicos associados com a deficiência de colina.

5 Em geral, prefere-se que a quantidade de colina que é adicionada à solução nutriente seja suficiente para fornecer uma concentração de colina na solução de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 8 gramas de colina por litro de solução. Esta concentração de colina fornece
10 um nível diário aceitável de dosagem de colina quando o paciente recebe de 2 a 3 litros de solução nutriente por dia. A dosagem diária de colina total desejada deve estar na ordem de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 8 gramas de colina.

15 A administração da solução nutriente no paciente é realizada parenteralmente por técnicas bem estabelecidas para a administração de soluções nutrientes para a nutrição parenteral total. A quantidade total da solução nutriente pode ser administrada como alíquotas separadas em
20 diferentes horas durante o dia. Entretanto, prefere-se que dois a três litros da dose da solução nutriente sejam administrados toda noite durante um período de seis a dez horas, ou em uma base contínua de 24 horas.

 A colina que é adicionada à solução nutriente é
25 adicionada preferivelmente como uma solução. A quantidade apropriada de colina é pesada e dissolvida na água estéril para a injeção Farmacopéia dos Estados Unidos (USP) para formar aproximadamente 50% por peso de solução de colina. A solução resultante de colina então é passada através de um
30 filtro esterilizante de tamanho de poro de 0,2 μm e

embalada em ampolas estéreis. Os filtros apropriados para filtrar a solução de colina incluem cartuchos de filtro esterilizante de náilon 66 0,2 μ m, tais como aqueles manufaturado por Pall Ultrafine Corp. (Glen Cove, N.Y.).

5 Outros filtros de náilon podem ser usados bem como os filtros feitos de outros materiais, tais como acetato de celulose e polisulfona.

Antes do uso, a quantidade apropriada de solução de colina é transferida da ampola estéril e adicionada à
10 solução nutriente que é tipicamente contida em uma bolsa de TPN. O cloreto de colina foi descoberto como sendo estável em várias soluções nutrientes de TPN por pelo menos 30 dias e não havendo nenhum efeito adverso na turvação, no pH, ou nas concentrações de aminoácido da solução de TPN.

15 Prefere-se que a solução aquosa de colina seja armazenada separadamente da solução de TPN e adicionada à solução nutriente no dia que a solução seja preparada. A concentração de colina dentro da solução nutriente pode variar dependendo da quantidade total de solução a ser
20 administrada. Preferivelmente, a quantidade da solução de colina adicionada à solução nutriente administrada ao paciente deve fornecer uma dosagem diária total de colina de aproximadamente 0,5 a 8 gramas de colina. As dosagens diárias totais na ordem de 1-6 gramas de colina serão
25 adequadas para a maioria dos regimes de tratamento.

A presente invenção abrange também outros métodos de adicionar colina a uma solução nutriente que são usados ou desenvolvidos por um habilidade na técnica. A solução nutriente para TPN pode também ser produzida para incluir a
30 colina como um elemento de seu conteúdo.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece kits para prevenção de trombose em um paciente que recebe TPN. Em uma modalidade, uma solução nutriente e uma quantidade terapeuticamente eficaz de colina são fornecidas no kit, compreendido geralmente dentro de um recipiente apropriado. Os componentes dos kits podem ser embalados em um meio aquoso. Os meios de armazenamento dos kits incluirão geralmente pelo menos um meio de armazenamento, tais como uma ampola, tubo de teste, frasco, bolsa, garrafa, seringa ou outros meios de armazenamento, em que a solução nutriente e a colina podem ser colocadas. Preferivelmente a solução nutriente é mantida separada da colina.

Em ainda um outro aspecto da presente invenção, é fornecido métodos de diagnose de um risco de trombose, preferivelmente trombose venosa. Em uma modalidade preferida, o método compreende pegar uma amostra biológica de um paciente que recebe a TPN, detectando o nível de colina na amostra e correlacionando o nível de colina na amostra à presença ou ausência de risco para a trombose. Níveis abaixo do normal de colina se correlacionam com um risco de trombose, e quanto mais baixo os níveis de colina, maior o risco. Inversamente, níveis normais ou acima do normal de colina correlacionam com ausência de um risco e/ou risco baixo de trombose. A amostra biológica pode incluir qualquer amostra fluida biológica, tal como sangue, plasma, soro e urina.

Preferivelmente, a colina detectada é colina livre no plasma, entretanto, colina ligada a fosfolipídeo e fosforocolina pode também ser detectada. A colina livre no

plasma é detectada preferivelmente usando cromatografia gasosa/espectroscopia de massa (GC/MS) de acordo com os métodos descritos em Jenden DJ, Roch M, Booth RA. Simultaneous measurement of endogenous and deuterium-labeled tracer variants of choline and acetylcholine in subpicomole quantities by gás chromatography-mass spectrometry. (1973) Anal Biochem 55:438-448, 1973 e Freeman JJ, Choi RL, Jenden DJ. (1975) Plasma choline, its turnover and exchange with brain choline. J Neurochem 24:729-734. Radioimunoensaio (RIA) e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) podem ser usados para detectar colina.

Em ainda outro aspecto da invenção é fornecido um método de monitoração de risco de trombose utilizando métodos de detecção de colina. Assim, por exemplo, pela medição dos níveis de colina em amostras biológicas de um paciente que recebe TPN durante um tempo, é possível monitorar uma mudança no risco de trombose e/ou determinar se um regime terapêutico particular, tal como infusão de colina direcionada na prevenção de trombose é eficaz. Níveis abaixo do normal de colina se correlacionam com um risco de trombose, e quanto mais baixo o nível de colina, maior o risco. Inversamente, níveis normais ou abaixo do normal correlaciona com ausência de risco e/ou baixo risco de trombose.

Os seguintes exemplos são apresentados para as finalidades ilustrativas e é compreendido que a presente invenção não é limitada a estas precisas modalidades. Deve ser apreciado por aqueles de habilidade na técnica que as técnicas divulgadas nos exemplos que seguem representam

técnicas para o bom funcionamento na prática da invenção, e assim podem ser considerado para constituir modos preferidos para sua prática. Entretanto, aqueles de habilidade na técnica devem, da presente divulgação, apreciar que muitas mudanças podem ser feitas nas modalidades específicas que são divulgadas e ainda obtém um resultado similar sem se afastar do conceito inventivo e do escopo da invenção. Os exemplos de prática são como se segue:

Exemplo 1: Correlação entre a hiperhomocisteínemia e deficiência de colina.

Dados obtidos durante um estudo em projetado prospectivamente de concentrações de colina livres no plasma em um grupo aleatório de pacientes de TPN em casa a longo prazo (Buchman AL, Moukarzel A, Jenden DJ, et al. Low plasma free choline is prevalent in patients receiving long term parenteral nutrition and is associated with hepatic aminotransaminase abnormalities (1993) *Clin Nutr.* 12:33-37.) e um estudo retrospectivo da incidência de trombose de cateter em um grupo de 527 pacientes de TPN em casa (Buchman AL, et de al., (1994) *Clinical Nutrition.* 13:356-360.) mostra uma correlação entre a hiperhomocisteínemia e deficiência de colina. Os pacientes estudados representam um subconjunto daqueles indivíduos, a saber aqueles que tiveram suas concentrações de colina livres no plasma determinadas em 1991. A diagnose dos pacientes são listados abaixo na tabela 1.

TABELA 1: Indicações de TPN

Síndrome do intestino curto	22
Doença de Crohn	9

Enterite por radiação	8
Pseudobstrução intestinal crônica	5
Gastrosquise	3
Deficiência de absorção de colágeno	3
Não classificado	3
Ressecções múltiplas	2
Enterocolite necrosante	2
Sarcoma retroperitoneal	1
Trombose venosa mesentérica	1
Trombose arterial mesentérica	1
Exonfalos	1
Vólvulo intestinal médio	1
Síndrome de Dumping	1
Ascite quilosa/trauma abdominal	1
Interposição colônica para carcinoma esofagial	1

Todos os cateteres usados nos pacientes submetidos foram Hickman® ou Broviac®-tipo; não havia nenhum cateter central percutâneo-introduzido (PICCs). A maioria, mas não todos eram de lúmen único, embora o número exato de únicos

5 cateteres de lúmen único usados fosse indeterminável por causa da documentação inadequada. A ponta de cateter foi verificada na veia cava superior ou inferior por fluoroscopia no momento de inserção, e subseqüentemente na maioria, mas não em todos os pacientes por radiografia de

10 tórax. A TPN consistiu de uma única bolsa de 1-3L que contém uma mistura de dextrose (concentração final de 15-25%), aminoácidos livres (concentração final de 3,5-5%), eletrólitos, minerais, metais traço, e multivitaminas. A emulsão de lipídeo (20%) foi fornecida em um estilo

15 "segunda infusão"; nenhuma emulsão 3:1 foi usada. Todos os

pacientes exceto um que recebeu a infusão durante à noite cíclica recebida por 8-12 horas 3-7 dias por semana dependendo das exigências individuais de nutrientes e/ou fluidos. A heparina foi usada rotineiramente como um fluido de cateter em todos os pacientes. Nenhum paciente estava recebendo heparina ou varfarina antes de sua trombose de cateter. A hidrocortisona não foi adicionada à solução de TPN.

A trombose de cateter que foi clinicamente suspeitada com base na dificuldade de fluidez ou infusão do cateter, ou extremidade, pescoço, ou edema facial, foram confirmados com venografia de contraste ambos através de cateter e proximidade ao cateter. Os pacientes com nenhuma evidência de trombose com venografia de contraste não foram incluídos neste estudo. Os pacientes com a trombose relacionada a mal posicionamento de cateter foram excluídos como forma aqueles somente na base da trombose localizada que decidiram seguir a instilação seguindo de uroquinase 5.000 por lúmen de cateter não foram incluídos no estudo.

41 indivíduos com 231 anos de cateter (um paciente com um cateter por um ano = um ano de cateter) foram incluídos no estudo. Isto incluiu 21 homens (de idade de 34 + ou - 26 anos) que receberam TPN em casa por 5,8 + ou - 5,0 anos e 20 mulheres (de idade de 55,1 + ou - 18,1 anos) que receberam TPN em casa por 5,6 + ou - 4,1 anos foram estudados. 16 (39%) dos pacientes desenvolveram trombose de cateter e 5 tiveram trombose de cateter recorrente. Isto comparado com 11% de 527 pacientes (1154 anos de cateter) no estudo de trombose original. (Buchman AL, et al, (1994) Clinical Nutrition. 13:356-360.) Idade, sexo, duração de

TPN, e indicação de TPN foram similares entre os pacientes que desenvolveram trombose de cateter e aqueles que não desenvolveram.

Uma avaliação de trombofilia foi iniciada com medição de contagem de plaqueta, proteína C, proteína S, plasminogênio, concentrações de antitrombina III, e anticorpos de anticardiolipina e antifosfolipideo usando técnicas padrões. Trombocitose foi definido como uma contagem de plaqueta > 450.000/mL.

Sangue heparinizado foi obtido por determinação de colina livre no plasma e ligada a fosfolipídeo seguindo um jejum de 8 a 10 durante a noite. Os espécimes foram colocados imediatamente no gelo e centrifugados a 3000 x g em 4°C dentro de 20 minutos de coleção; o plasma foi decantado. A colina livre no plasma foi determinada usando cromatografia gasosa/espectroscopia de massa (GC/MS) (Jenden DJ, Roch M, Booth RA). Simultaneous measurement of endogenous and deuterium-labeled tracer variants of choline and acetylcholine in subpicomole quantities by gás chromatography-mass spectrometry. (1973) Anal Biochem 55:438-448, 1973 e Freeman JJ, Choi RL, Jenden DJ. (1975) Plasma choline, its turnover and exchange with brain choline. J Neurochem 24:729-734, e colina ligada a fosfolipídeo foi determinado seguido de extração como descrita por Folch et al. (A simple method for the isolation and purification the lipids from animal tissue. (1957) J Biol Chem 226:497-509, e hidrólise por Jope e Jenden (Jope RS, Jenden DJ. Choline e phospholipid metabolism and the synthesis of acetylcholine in rat brain .a síntese de acetylcolina no cérebro de rato. (1979) J

Neurosci Res 4:69-82).

Todos os resultados são apresentados como desvio padrão médio $\pm$. Um valor de $p < 0,05$ foi definido como uma indicação de significância estatística.

5 A colina livre no plasma foi abaixo do normal ($11,4 \pm 3,7$ nmol/ml) em 33 dos 41 indivíduos, e foi de $7,7 \pm 2,7$ nmol/ml em pacientes sem histórico de trombose de cateter e $6,2 \pm 1,7$ nmol/ml em pacientes com trombose de cateter anterior ($p=0,076$ pelo teste soma-rank de Wilcoxin). A
10 concentração de colina livre no plasma tendeu a ser inferior em pacientes com trombose >1 e do que naqueles com apenas um único evento ($6,0 \pm 1,8$ nmol/ml vs $7,7 \pm 2,7$ nmol/ml), embora a diferença não fosse estatisticamente significativa. A correlação parcial entre a concentração de
15 colina livre no plasma e a frequência de entupimentos após controle para duração de cateter foi $r=-0,33$, $p=0,038$.

A concentração de colina ligada a fosfolípídeo no plasma foi normal em 34 dos 41 indivíduos e foi de $2191,7 \pm 679,0$ nmol/ml em pacientes com trombose de cateter
20 precedente e $2103,3 \pm 531,2$ nmol/ml nos pacientes sem histórico de trombose de cateter ($p=NS$).

Nenhum paciente teve trombocitose, proteína C, proteína S, deficiência de antitrombina III ou plasminogênio, trombocitose, anticorpos de anticardiolipina
25 ou antifosfolípídeo, doenças inflamatórias ativas de intestino ou maligna ativa. O fator V Leiden e os ensaios de mutação de gene de protrombina não estavam disponíveis no momento do levantamento dos dados. As concentrações de homocisteína não foram medidas pois era desconhecido nessa
30 época que concentração de homocisteína no plasma elevada

representava um fator de risco para a trombose venosa ou arterial na época que o estudo foi iniciado e muitos dos pacientes agora estão falecidos.

Todos os pacientes com trombose de cateter eram inicialmente anticoagulados com heparina, e subsequêntemente com varfarina seguindo de remoção e substituição de cateter. Nem todos os pacientes com trombose de cateter recorrente entretanto tiveram protrombina terapêutica na época de recorrência. Dado que uma tentativa foi feita na anticoagulação seguindo a trombose inicial, é provável que esta terapia de anticoagulação conduz a um risco diminuído de formação subsequente de trombo, e portanto diminuiu a correlação entre a colina e a trombose porque o status de colina permaneceria inalterado na possibilidade de anticoagulação. Suspeita-se que a razão para a incidência muito maior de trombose de cateter neste subconjunto de pacientes do nosso relatório original (Buchman AL, et al. Clinical Nutrition (1994) 13:356-360.), é relacionado primeiramente ao fato que os pacientes em nosso estudo tiveram uma duração muito maior de TPN (5,7 anos vs 0,6 anos).

Embora a concentração de homocisteína de plasma não foi medida em nossos pacientes, dado a correlação entre a homocisteína de plasma elevada e a incidência de trombose de cateter em pacientes de intestino curto TPN-dependentes descrito por Compher et al. (Hyperhomocysteinemia is associated with venous thrombosis in patients with short bowel syndrome. (2001) JPEN 25:1-7.), é provável a elevação em homocisteína de plasma estes investigadores observados foi de fato, causado pela deficiência de colina. A

deficiência de colina era provavelmente a causa final para muitos dos eventos trombóticos observados dado que nossos pacientes já receberam suplementação suficiente de folato, pyridoxina (B6), e B12 intravenosos.

5 Devido ao metabolismo de homocisteína requerer um doador de metil para a remetilação, uma deficiência em doadores de metil tais como a colina pode resultar em hiperhomocisteïnemia. O aumento na concentração de homocisteína observado por Compher et al. é consistente com
10 um defeito na via de transulfuração hepática. Isso ocorre quando os nutrientes que requerem desvio de metabolismo na circulação portal e são fornecidos intravenosamente. Stegink LD, Den Besten L. Synthesis of cysteine from methionine in normal adult subjects: effect of route of
15 administration. (1972) *Science* 178:514-515; e Chawla RK, Berry CJ, Kutner MH, Rudman D. Plasma concentration of transsulfuration pathway products during nasoenteral and intravenous hyperalimentation of malnourished patients. (1985) *Am J Clin Nutr* 42:577-584. Embora, o mecanismo pelo
20 qual a concentração de homocisteína de plasma elevada aumenta o risco para a trombose venosa ser incerto, ele pode envolver a inibição de ativação de proteína C trombomodulina-dependente (Rodgers GM, Conn TA. Homocysteine, na atherogenic stimulus, reduces protein C
25 activation by arterial and venous endothelial cells. (1990) *Blood* 75:895-901.) ou inibição da produção de óxido nítrico endotelial. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of
30 nitrogen. (1993) *J Clin Invest* 91:308-318; e Upchurch GR,

Walch GN, Fabian AJ, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. (1997) *J Biol Chem* 272:17012-17017.

Historicamente, sugeriu-se que as deficiências de folato, vitamina B₁₂, ou vitamina B₆ sozinhas resultaram na concentração elevada de homocisteína de plasma. Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing amino acids. (1986) *Anu Rev Nutr* 6:179-209; e Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, et al. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in the elderly population. (1993) *JAMA* 270:2693-2698. Embora as concentrações de folate ou vitamina B₁₂ de soro não fossem medidas, todos nossos pacientes receberam estes em TPN (ácido fólico 0,6 mg/dia, piridoxina 6mg, e B₁₂ 5mg por bolsa). Dado que estas doses administradas são 100% biodisponíveis por causa da natureza de sua liberação em comparação a disponibilidades muito mais baixas de doses orais similares, é deficiências improváveis de uma ou outra vitamina existiu nos pacientes.

Exemplo 2: Método de prevenção de trombose de cateter

A um paciente conhecido por ter níveis de colina livre no plasma baixos e recebendo TPN em casa por um tempo prolongado é administrado uma solução de TPN suplementada de colina. Uma solução nutriente suplementada de sal de colina, tendo aproximadamente 0,25 a aproximadamente 8 gramas de sal de colina por litro de solução, é administrada ao paciente intravenosamente. A quantidade de colina que é adicionada à solução nutriente pode variar dependendo do nível de colina livre no plasma do paciente, o grau de hiperhomocisteïnemia e a severidade de outros problemas médicos associados com a deficiência de colina. A

solução nutriente suplementada de colina é administrada como uma dose sobre um período de 10-24 horas.

Exemplo 3: Método de prevenção de trombose de cateter

A um paciente conhecido por ter níveis de colina livre no plasma baixos e recebendo TPN em casa por um tempo prolongado é administrado uma quantidade terapeuticamente eficaz de colina. Uma solução de sal de colina, tendo aproximadamente 0,25 a aproximadamente 8 gramas de sal de colina por litro de solução, é administrada ao paciente intravenosamente. A quantidade de colina na solução pode variar dependendo do nível de colina livre no plasma do paciente, grau de hiperhomocisteïnemia e severidade de outros problemas médicos associados com a deficiência de colina. A solução de colina é administrada como uma dose sobre um período de 10-24 horas.

Exemplo 4: Método de diagnosticar um risco de trombose de cateter

As amostras de sangue ou de soro são obtidas de um paciente que recebe TPN e o nível de colina livre no plasma na amostra é detectado usando a cromatografia gasosa/espectroscopia de massa (GC/MS) de acordo com os métodos descritos em Jenden DJ, Roch M, Booth RA. Medida Simultaneous measurement of endogenous and deuterium-labeled tracer variants of choline and acetylcholine in subpicomole quantities by gás chromatography-mass spectrometry. (1973) *Anal Biochem* 55:438-448, 1973 e Freeman JJ, Choi RL, Jenden DJ. (1975) Plasma choline, its turnover and Exchange with brain choline. *J Neurochem* 24:729-734. Nível baixo ou diminuído de colina livre no plasma em comparação aos níveis normais é indicativo de um

risco aumentado de trombose de cateter. A mudança em níveis de colina com o tempo também pode ser monitorada para rastrear a eficácia de tratamento profilático pela infusão de colina e/ou para detectar uma tendência em níveis de colina como um fator determinante no risco de trombose de cateter.

Exemplo 5: Método de reduzir ou prevenir a hiperhomocisteïnemia

Duas voluntárias normais mulheres foram infundidas com níveis de colina e plasma C-13-marcado de homocisteína foram determinados antes e depois da infusão. As concentrações de plasma de homocisteína diminuíram de 6,62 $\mu\text{mol/L}$ e 7,47 $\mu\text{mol/L}$ a 5,14 $\mu\text{mol/L}$ e 6,64 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, demonstrando que a administração de colina pode reduzir o risco de ou prevenir hiperhomocistenemia.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de diminuição do risco de trombose venosa em um paciente que recebe nutrição parenteral total (TPN) caracterizado por compreender a administração parenteral ao
5 paciente que recebe TPN de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma solução nutriente que compreende colina.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da quantidade terapeuticamente eficaz de colina diminuir os níveis de homocisteína do
10 plasma no paciente.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da solução nutriente compreender aproximadamente 0,25 a aproximadamente 8 gramas do sal de colina por litro da solução.

15 4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da colina na solução nutriente ser um sal de colina, precursor de colina, metabólito de colina ou uma combinação dos mesmos farmacologicamente aceitável.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da colina na solução nutriente ser
20 um sal de colina.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato do sal de colina ser cloreto de colina, bitartrato de colina, citrato dihidrogenado de
25 colina, fosfato de colina ou bicarbonato de colina.

7. Método para prevenir a trombose do cateter associado com a nutrição parenteral total (TPN) caracterizado pelo fato de compreender a administração parenteral a um paciente que recebe TPN uma quantidade
30 terapeuticamente eficaz de uma solução nutriente que

compreende colina.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato da quantidade terapeuticamente eficaz de colina diminuir os níveis de homocisteína do plasma no paciente.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato da solução nutriente compreender aproximadamente 0,25 a aproximadamente 8 gramas do sal de colina por litro de solução.

10. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato da colina na solução nutriente ser um sal farmacologicamente aceitável de colina, precursor de colina, metabólito de colina ou uma combinação dos mesmos.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato da colina na solução nutriente ser um sal de colina.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato do sal de colina ser cloreto de colina, bitartrato de colina, citrato dihidrogenado de colina, fosfato de colina ou bicarbonato de colina.

13. Método de determinação se um paciente que recebe TPN está em risco para trombose de cateter caracterizado pelo fato de compreender a coleta de uma amostra de sangue ou plasma do paciente, detecção do nível de colina livre no plasma na amostra, e a correlação do nível de colina livre no plasma na amostra com a presença ou ausência de risco para trombose.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato do nível de colina livre no plasma ser detectado usando cromatografia gasosa e espectroscopia

de massa, RIA ou HPLC.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de um nível reduzido de colina em comparação com níveis normais ser indicativo de risco para
5 trombose de cateter.

16. Kit para prevenção de trombose de cateter em um paciente que recebe TPN caracterizado pelo fato de compreender uma solução nutriente e uma quantidade terapeuticamente eficaz de colina.

10 17. Solução nutriente aquosa caracterizada pelo fato de compreender dextrose, eletrólito, aminoácidos, elementos traço, vitaminas e uma quantidade terapeuticamente eficaz de colina.

15 18. Solução nutriente, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato da colina ser um sal de colina.

19. Solução nutriente, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato do sal de colina ser cloreto de colina, bitartrato de colina, citrato dihidrogenado de colina, fosfato de colina ou bicarbonato de colina.

20 20. Solução nutriente, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato da colina estar presente em uma quantidade a partir de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 8 gramas por litro da solução nutriente.

**USO DE COLINA PARA PREVENÇÃO DE TROMBOSE ASSOCIADA COM A
NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL**

A deficiência de colina é um fator de risco para o desenvolvimento de trombose em pacientes com falência
5 intestinal que requer nutrição parenteral total. É fornecido um método de prevenção de trombose, preferivelmente trombose venosa, compreendendo a administração a um paciente que recebe TPN uma solução nutriente que compreende colina. É fornecido também um
10 método de diagnosticar um risco para trombose que compreende coletar uma amostra de um paciente e detectar o nível de colina livre no plasma.