

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 356**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2012 PCT/US2012/057399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13049258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2012 E 12836762 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2761017**

54 Título: **Sistemas y procedimientos para predecir la respuesta al minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética**

30 Prioridad:
26.09.2011 US 201113245783

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2020

73 Titular/es:
**FOLLEA INTERNATIONAL LTD. (100.0%)
3950 Two Exchange Square, Suite 8465, 8
Connaught Place, Central Hong Kong
Hong Kong, CN**

72 Inventor/es:
**TAM, PHILLIP Y. y
GOREN, ANDY OFER**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 740 356 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistemas y procedimientos para predecir la respuesta al minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética

Campo técnico

5 Las invenciones descritas en la presente memoria se refieren a sistemas y a procedimientos para predecir la respuesta al minoxidil en el tratamiento de la alopecia androgenética.

Antecedentes

10 La pérdida de cabello está asociada con una diversidad de implicaciones psicológicas y sociales. Antes de comenzar cualquier tratamiento, es ventajoso predecir el curso, la gravedad y las opciones de tratamiento de la enfermedad. En el campo de la pérdida de cabello, en la actualidad hay muy pocos ensayos diagnósticos científicos disponibles, y hay pocos procedimientos para predecir la respuesta al tratamiento.

Además, la industria de la pérdida de cabello está plagada de docenas de productos que afirman que hacen crecer, que mejoran y que reemplazan el cabello. Desafortunadamente, pocos tratamientos han demostrado científicamente que funcionan, y los pocos tratamientos que han sido sometidos a ensayos clínicos frecuentemente no funcionan igual para todos los pacientes.

15 La alopecia androgenética ha sido tratada con éxito en hombres con minoxidil (comercializado como Rogaine™ o Regaine™) medicamentos aprobados por la U.S. Food & Drug Administration ("FDA"). Minoxidil ha sido aprobado también por la FDA para el tratamiento de la pérdida de cabello en mujeres; sin embargo, para la mayoría de las mujeres, el minoxidil solo tiene un éxito marginal en la retención del cabello existente. Algunos hombres para los que el minoxidil es menos efectivo, han sido tratados con éxito con finasterida; sin embargo, no puede decirse lo mismo de las mujeres para
20 las que el minoxidil es inefectivo. Hasta el momento, los estudios no han demostrado la eficacia de la finasterida en el tratamiento de la alopecia androgenética femenina.

25 Hay diferencias significativas entre la alopecia androgenética masculina y la alopecia androgenética femenina. Además de los diferentes patrones de calvicie, las alopecias masculina y femenina siguen un mecanismo diferente. En los hombres, la alopecia está relacionada con los niveles altos normales de andrógenos en los hombres, combinada con una sensibilidad subyacente de las raíces del cabello a los andrógenos. Sin embargo, las mujeres tienen niveles de andrógenos aproximadamente 10 veces más bajos que los de los hombres, y la cantidad absoluta de andrógenos es un factor menos significativo que el aumento de la sensibilidad de las raíces del cabello a los andrógenos.

30 Entre diversas personas, independientemente de si son hombres o mujeres, existe una amplia variabilidad en la respuesta de diferentes personas a diversos tratamientos para la pérdida del cabello. Se supone que esta variabilidad es el resultado de factores genéticos que contribuyen a una actividad enzimática variable en los folículos, dificultando la consecución de un enfoque único para todo el mundo. Por lo tanto, sería ventajoso poder disponer de un procedimiento de diagnóstico y de tratamiento eficaz en el que los pacientes pudieran seleccionarse y tratarse en base a criterios tales como la actividad enzimática, que identificaría a algunas personas como con posibilidades de beneficiarse del tratamiento con minoxidil y otros fármacos, mientras identificaría otros individuos en los que es poco probable que el tratamiento sea efectivo.

Breve resumen

35 Las invenciones descritas en la presente memoria se refieren a sistemas y a procedimientos para predecir la respuesta al minoxidil en el tratamiento de la alopecia androgenética que, en una realización, pueden basarse en un ensayo colorimétrico. Son posibles diversas realizaciones, varias de las cuales se ejemplifican en la presente memoria. En particular, las variaciones en la actividad de la minoxidil sulfotransferasa del folículo piloso pueden usarse para predecir la eficacia del minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética.

40 El documento WO 2011/109459 A2 divulga un procedimiento para predecir o evaluar la eficacia de un agente terapéutico para una enfermedad capilar, tal como la alopecia androgenética, en una muestra de biopsia de cuero cabelludo, cabellos arrancados o raíz del cabello de un sujeto a analizar. No menciona la fenol sulfotransferasa (SULT1A1) y enseña la detección de varios niveles de biomarcadores para determinar la respuesta de un paciente que padece alopecia androgenética a la finasterida como el único agente terapéutico contemplado.

45 En una realización de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para seleccionar un tratamiento para un sujeto que padece alopecia androgenética, que comprende obtener una muestra de uno o más folículos pilosos, o una biopsia del cuero cabelludo, del sujeto; realizar un ensayo para medir la actividad de la minoxidil sulfotransferasa en la muestra, generando de esta manera un valor de actividad indicativo del nivel de actividad de la minoxidil sulfotransferasa
50 en la muestra; comparar el valor de actividad con uno o más valores de actividad estandarizados, en el que cada valor de actividad estandarizado representa una respuesta alta o baja al minoxidil esperada para el recrecimiento o la retención del

cabello para una clase de pacientes que incluyen al sujeto, produciendo de esta manera una indicación de respuesta alta o baja esperada al minoxidil para el recrecimiento o la retención del cabello para el sujeto a una dosis particular de minoxidil; y presentar la indicación al sujeto.

5 En otra realización, se proporciona una composición de materia para realizar un ensayo que comprende tampón fosfato de potasio de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 mM (pH 6,5); cloruro de magnesio de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mM; adenosina 3',5'-difosfato (PAP) o adenosina 3'-fosfato,5'-fosfosulfato (PAPS) de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 μ M; sulfato de p-nitrofenilo de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mM; y minoxidil de aproximadamente 0,07 a aproximadamente 0,13 mM.

10 En otra realización, se proporciona un kit que comprende un recipiente transparente con una tapa, que comprende la composición anterior para realizar un ensayo; un recipiente de tampón que comprende de aproximadamente 0,20 M a aproximadamente 0,30 M Tris-HCl, pH 8,7; y medios para mezclar el contenido del recipiente de tampón con el contenido del aparato.

Breve descripción de los dibujos

15 Los dibujos adjuntos, que se incorporan en la presente memoria descriptiva, ilustran una o más realizaciones ejemplares de las invenciones divulgadas en la presente memoria y, junto con la descripción detallada, sirven para explicar los principios y las implementaciones ejemplares de estas invenciones. Una persona con conocimientos en la materia entenderá que los dibujos son solo ilustrativos, y que la representación en los mismos puede adaptarse en base al texto de la memoria descriptiva o el conocimiento común dentro de este campo.

En los dibujos, donde los números de referencia iguales se refieren a una referencia similar en la memoria descriptiva:

20 La Fig. 1 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento para analizar uno o más folículos pilosos y proporcionar un resultado.

La Fig. 2 muestra un ejemplo de un sistema informatizado para llevar a cabo o analizar un ensayo para comprobar los folículos pilosos y proporcionar un resultado.

Descripción detallada

25 Varias realizaciones ejemplares de la presente invención se describen en la presente memoria en el contexto de una terapia para la alopecia androgenética.

30 La descripción en la presente memoria se proporciona en el contexto de una terapia para la alopecia androgenética. Las personas con conocimientos ordinarios en la técnica observarán que la siguiente descripción detallada es solo ilustrativa y no pretende ser, en modo alguno, limitativa. Dichos expertos en la materia podrán idear fácilmente, por sí mismos, otras formas de realización tomando provecho de la presente divulgación. A continuación, se hará referencia en detalle a las implementaciones, tal como se ilustran en los dibujos adjuntos. Se usarán los mismos indicadores de referencia en todos los dibujos y en la siguiente descripción detallada para hacer referencia a las mismas partes o a partes similares.

35 En aras de la claridad, no se muestran ni se describen todas las características rutinarias de las implementaciones descritas en la presente memoria. Por supuesto, se apreciará que, en el desarrollo de cualquier implementación real, deben tomarse numerosas decisiones específicas de la implementación con el fin de conseguir los objetivos específicos del desarrollador, tales como el cumplimiento de la aplicación y restricciones relacionadas con el negocio, y que estos objetivos específicos variarán de una implementación a otra y de un desarrollador a otro. Además, se apreciará que dicho esfuerzo de desarrollo podría ser complejo y podría requerir mucho tiempo, pero, sin embargo, sería una tarea de ingeniería rutinaria para las personas con conocimientos ordinarios en la materia que tienen el beneficio de la presente divulgación.

40 La alopecia androgenética es extremadamente común y afecta a aproximadamente el 60% de los hombres y a más del 50% de las mujeres antes de los 60 años. En la actualidad, existen dos medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la alopecia androgenética, la finasterida y el minoxidil. Sin embargo, las terapias con finasterida que son exitosas en el crecimiento y mantenimiento del cabello en hombres no han mostrado una mejoría significativa en mujeres.

45 Por lo tanto, en la actualidad, el minoxidil es el único medicamento aprobado por la FDA para la pérdida de cabello femenina. Además, para que la terapia con minoxidil sea efectiva, frecuentemente debe usarse durante un período de tiempo prolongado sin saber si es efectiva. Un objetivo de la presente invención es cribar los pacientes que responderán mejor a la terapia con minoxidil y, de esta manera, proporcionar una terapia efectiva personalizada para la pérdida del cabello.

50 La invención se basa en parte en el descubrimiento de que el minoxidil requiere la activación bioquímica por la minoxidil sulfotransferasa para formar el metabolito activo del sulfato de minoxidil. El mecanismo de acción exacto para el

tratamiento basado en minoxidil de la alopecia androgenética no se conoce completamente. Sin embargo, los estudios in vitro han demostrado que el sulfato de minoxidil es el metabolito activo de minoxidil. La respuesta al minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética ha sido asociada con diferencias en la actividad de la sulfotransferasa del cuero cabelludo. Por lo tanto, un sujeto con un alto nivel de actividad de la minoxidil sulfotransferasa generará más sulfato de minoxidil y, por lo tanto, probablemente tendrá una buena respuesta al minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética. Por otra parte, un sujeto con un bajo nivel de actividad de la minoxidil sulfotransferasa no generará mucho sulfato de minoxidil, y probablemente tendrá una mala respuesta al minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética.

Los ensayos clínicos con minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética han mostrado resultados estadísticamente significativos para el mantenimiento y el crecimiento del cabello. Varios estudios han demostrado que el nivel de actividad de la minoxidil sulfotransferasa es significativamente mayor en pacientes que responden al minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética. Tal como se describe en la presente memoria, la evaluación del recrecimiento del cabello se basa en uno o más de los siguientes parámetros: autoevaluación del paciente, evaluación del médico usando una escala estandarizada, evaluación de fotografía global, medición del diámetro del cabello, medición de la longitud promedio del cabello, medición del diámetro promedio del cabello y medidas de peso del cabello. Las presentes invenciones proporcionan un procedimiento de uso de las variaciones bioquímicas en la actividad de la minoxidil sulfotransferasa como un marcador de respuesta al fármaco para el tratamiento con minoxidil de la alopecia androgenética. En base al nivel de actividad de la minoxidil sulfotransferasa, el procedimiento divulgado en la presente memoria permite al médico o al paciente seleccionar el tratamiento apropiado y la dosis del mismo para el tratamiento de la alopecia androgenética.

Según un enfoque descrito en la presente memoria, puede obtenerse una muestra de folículo piloso de un paciente. Preferentemente, pueden obtenerse al menos dos folículos pilosos, de manera que, si solo se analiza uno, habrá al menos uno de reserva si es necesario.

La muestra del folículo piloso del paciente puede ser sometida a un ensayo colorimétrico para determinar el nivel de actividad de la minoxidil sulfotransferasa. La muestra de folículos pilosos de un paciente (de 1 a n folículos pilosos) puede ser colocada en una mezcla de reacción que contiene tampón fosfato de potasio aproximadamente 50 mM (pH aproximadamente 6,5), cloruro de magnesio aproximadamente 5 mM, adenosina 3',5'-difosfato (PAP) o adenosina 3'-fosfato,5'-fosfosulfato (PAPS) aproximadamente 20 μ M, sulfato de p-nitrofenilo aproximadamente 5 mM y minoxidil aproximadamente 0,1 mM.

En una realización, esta reacción puede tener lugar en un recipiente transparente con una tapa u otra abertura en la que pueden insertarse las muestras de folículo piloso. En un ejemplo no limitativo, la cantidad total de líquido en el recipiente del ensayo puede ser de aproximadamente 0,2 ml.

Como parte de la reacción anterior, se entiende que, en presencia de actividad de la minoxidil sulfotransferasa, el sulfato de p-nitrofenilo es convertido al p-nitrofenolato colorimétrico.

La reacción puede mezclarse y a continuación puede incubarse durante aproximadamente 4 a 16 horas a 37°C dependiendo del número de folículos pilosos usados en el ensayo. El mezclado puede ser mediante cualquier medio de mezclado conocido en la técnica, incluyendo agitando el recipiente. Donde se requiere un tiempo de incubación más corto para un mayor número de folículos pilosos. En una realización, un ensayo que usa un folículo piloso puede incubarse durante aproximadamente 16 horas. En otra realización, un ensayo que usa dos folículos pilosos puede incubarse durante aproximadamente cuatro horas.

Después de la incubación de la muestra, la reacción puede detenerse mediante la adición de aproximadamente 1/10 de volumen de aproximadamente 0,25 M de tampón Tris-HCl, pH 8,7, y mezclado. El pH puede variar, en una realización, entre 8,5 y 9,0. Especialmente si el ensayo se realiza o se comercializa como parte de un kit, el tampón básico puede proporcionarse como un recipiente separado para verter en el recipiente de reacción del ensayo. En otra realización, el tampón básico puede proporcionarse en una jeringa precargada, para ser inyectado en el recipiente de reacción principal en el momento apropiado, bien empujando manualmente un émbolo o bien mediante algún control automático o computarizado.

A continuación, puede realizarse una lectura de la absorbancia a aproximadamente 405 nm con un espectrofotómetro o puede compararse con una tarjeta de color de referencia con un intervalo de intensidades correspondientes a la actividad de la minoxidil sulfotransferasa. Los pacientes con un nivel relativamente alto de actividad de sulfotransferasa tendrán una lectura colorimétrica relativamente fuerte, resultando en un cambio de color relativamente significativo. En comparación, los pacientes con un nivel relativamente bajo de actividad de sulfotransferasa tendrán una lectura colorimétrica relativamente débil y, por consiguiente, un cambio de color relativamente mínimo. Se esperaría que los pacientes con una respuesta fuerte en el ensayo colorimétrico respondan al minoxidil para el recrecimiento o la retención del cabello. Mientras que se espera que los pacientes con una respuesta débil en el ensayo colorimétrico tengan una mala respuesta

al minoxidil.

En todavía otra realización, el resultado de un ensayo colorimétrico de folículo piloso de un paciente se usa para determinar un régimen de tratamiento óptimo. Incluyendo, modificar la concentración y/o la frecuencia de la terapia con minoxidil para adaptarse a la actividad de la minoxidil sulfotransferasa del paciente. Además, si es poco probable que un

5

Con referencia a la Fig. 1, un procedimiento 100 según se describe en la presente memoria incluye, en 102, la recogida de una muestra de folículo piloso desde un sujeto. A continuación, en 104, la muestra de folículo piloso puede codificarse con un identificador único, por ejemplo, para proteger la privacidad y para facilitar la manipulación. En 106, la muestra de folículo piloso puede analizarse tal como se ha descrito anteriormente. El análisis puede realizarse usando el ensayo colorimétrico descrito en la presente memoria. A continuación, los resultados del análisis pueden proporcionarse al sujeto o al cuidador del sujeto, en 108. Los resultados del análisis, cada uno asociado con su identificador único, pueden transmitirse a un sistema informático que puede incluir un servidor basado en la Web que es accesible, con la autenticación apropiada, por ejemplo, usando el identificador único, por el sujeto o el cuidador. El resultado, además de proporcionar una indicación de la probabilidad de que el paciente responda a un 2%, 5% o más de minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética, puede incluir también una predicción de la dosis requerida y la frecuencia de tratamiento diaria al comparar un nivel de actividad de la minoxidil sulfotransferasa del paciente con una base de datos de referencia.

10

15

La Fig. 2 muestra, de manera esquemática, un sistema 200 para implementar el procedimiento anterior. Una muestra 202 de folículo piloso de un sujeto es enviada a un laboratorio 204. A continuación, se realiza un análisis de la muestra según uno o más de los procedimientos indicados anteriormente. Los resultados del análisis se comparan, por ejemplo, con una base de datos para generar una indicación de la probabilidad de que el paciente responda al minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética. La base de datos puede ser de naturaleza dinámica, actualizada continuamente para la adaptación estadística en base a tratamientos anteriores con minoxidil y la respuesta a los mismos, de manera que la base de datos pueda adaptarse o aprender del conjunto de pacientes y de los tratamientos con el tiempo y, de esta manera, convertirse en un mejor predictor de la probabilidad de capacidad de respuesta al tratamiento farmacológico. La base de datos, u otra entidad o circuito o módulo capaz de implementar el esquema adaptativo descrito en la presente memoria, puede residir en el sistema 206 informático o de manera separada del mismo. El resultado de la comparación y del análisis puede enviarse al sistema 208 informático del sujeto o del cuidador, por ejemplo, electrónicamente a través de una red, tal como Internet, 210. De manera alternativa o adicional, el resultado de la comparación y del análisis puede almacenarse en un servidor 212 para ser accedido de manera remota por el sujeto o el cuidador después de la autenticación apropiada que puede requerir una referencia al identificador único para asegurar la privacidad.

20

25

30

Puede ser posible también usar una red neuronal para implementar el sistema y el procedimiento, para predecir la probabilidad de que el paciente responda al minoxidil para el tratamiento de la alopecia androgenética en base al perfil de actividad de la minoxidil sulfotransferasa del paciente. Según este enfoque, la predicción de la probabilidad de respuesta al tratamiento farmacológico puede incluir (a) construir una red neuronal de N capas, y (b) entrenar la red neuronal con un conjunto de datos de los resultados de los pacientes al tratamiento con minoxidil para la alopecia androgenética junto con los perfiles de actividad de la minoxidil sulfotransferasa de los pacientes, (c) obtener una muestra de folículo piloso del sujeto (d) generar un perfil de actividad de la minoxidil sulfotransferasa a partir de la muestra, en el que el perfil es una función de los valores asociados con un conjunto prescrito de niveles de actividad de la minoxidil sulfotransferasa; (e) introducir el perfil de actividad de la minoxidil sulfotransferasa de los sujetos en la red neuronal; (f) obtener un valor o un conjunto de valores desde la red neuronal indicativos del resultado esperado del paciente (que responde) al tratamiento con el fármaco en una dosis única o múltiple; y (g) proporcionar al paciente el tratamiento farmacológico a la dosis recomendada.

35

40

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de selección de un tratamiento para un sujeto que padece alopecia androgenética, que comprende:

(i) realizar un ensayo para medir la actividad de la minoxidil sulfotransferasa en una muestra de uno o más folículos pilosos o de una biopsia del cuero cabelludo del sujeto, generando de esta manera un valor de actividad indicativo del nivel de actividad de la minoxidil sulfotransferasa en la muestra;

en el que el ensayo comprende las etapas de:

(a) colocar los uno o más folículos pilosos o la biopsia del cuero cabelludo en una mezcla de reacción que contiene tampón fosfato de potasio aproximadamente 50 mM con un pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,0, cloruro de magnesio aproximadamente 5 mM, adenosina 3',5'- difosfato (PAP) o adenosina 3'-fosfato,5'-fosfosulfato (PAPS) aproximadamente 20 µM, sulfato de p-nitrofenilo aproximadamente 5 mM y minoxidil aproximadamente 0,1 mM;

(b) mezclar la mezcla de reacción;

(c) incubar la mezcla de reacción durante una duración predeterminada; y

(d) detener la reacción

(ii) comparar el valor de la actividad con uno o más valores de actividad estandarizados, en el que cada valor de actividad estandarizado representa una respuesta esperada al minoxidil alta o baja para el recrecimiento o la retención del cabello para una clase de pacientes que incluye al sujeto, produciendo de esta manera una indicación de respuesta esperada al minoxidil alta o baja para el recrecimiento o la retención del cabello para el sujeto a una dosis particular de minoxidil, en el que los uno o más valores estandarizados son uno o más niveles de actividad de la minoxidil sulfotransferasa en los que una muestra estadística de otros sujetos muestra una respuesta alta o baja al minoxidil para el recrecimiento o la retención del cabello a la dosis particular de minoxidil; y

(iii) presentar la indicación al sujeto.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la indicación es de alta respuesta esperada al minoxidil para el recrecimiento o la retención del cabello, y la dosis particular de minoxidil se selecciona de entre el grupo que consiste en aproximadamente el 2% de solución tópica, aproximadamente el 5% de solución tópica, aproximadamente el 2% de espuma tópica, aproximadamente el 5% de espuma tópica, aproximadamente un comprimido de 2,5 mg y aproximadamente un comprimido de 5 mg.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el tampón de fosfato de potasio tiene un pH de aproximadamente 8,0.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se añade un tampón básico Tris-HCl aproximadamente 0,25 M, pH aproximadamente 8,7 a la mezcla de reacción para detener el ensayo colorimétrico y mejorar la sensibilidad del ensayo.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción se incuba durante aproximadamente 4 a aproximadamente 16 horas a aproximadamente 37°C.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción se incuba a temperatura ambiente.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción se incuba por encima de la temperatura ambiente.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ensayo es un ensayo colorimétrico que usa un colorante indicador.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el ensayo colorimétrico usa 2-naftol como sustrato.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se usa un folículo piloso en el ensayo.

11. Composición de materia, que comprende:

tampón fosfato de potasio de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 mM (pH 6,5);

cloruro de magnesio de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mM;

adenosina 3',5'-difosfato (PAP) o adenosina 3'-fosfato,5'-fosfosulfato (PAPS) de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 µM;

sulfato de p-nitrofenilo de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mM; y

minoxidil de aproximadamente 0,07 a aproximadamente 0,13 mM.

12. Kit que comprende:

un recipiente transparente con una tapa, que comprende la composición según la reivindicación 11;

5 un recipiente de tampón que comprende Tris-HCl de aproximadamente 0,20 M a aproximadamente 0,30 M con pH aproximadamente 8,7; y

medios para mezclar el contenido del recipiente de tampón con el contenido del aparato.

13. Kit según la reivindicación 12, en el que la concentración de Tris-HCl, con un pH de aproximadamente 8,7, es de aproximadamente 0,25 M.

10

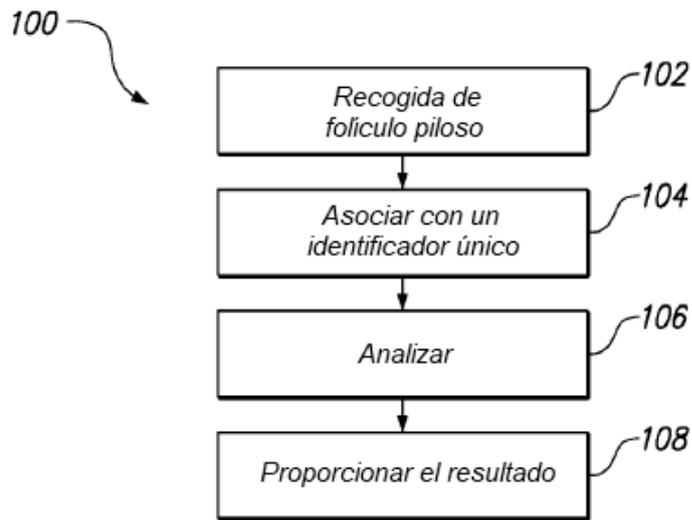


FIG. 1

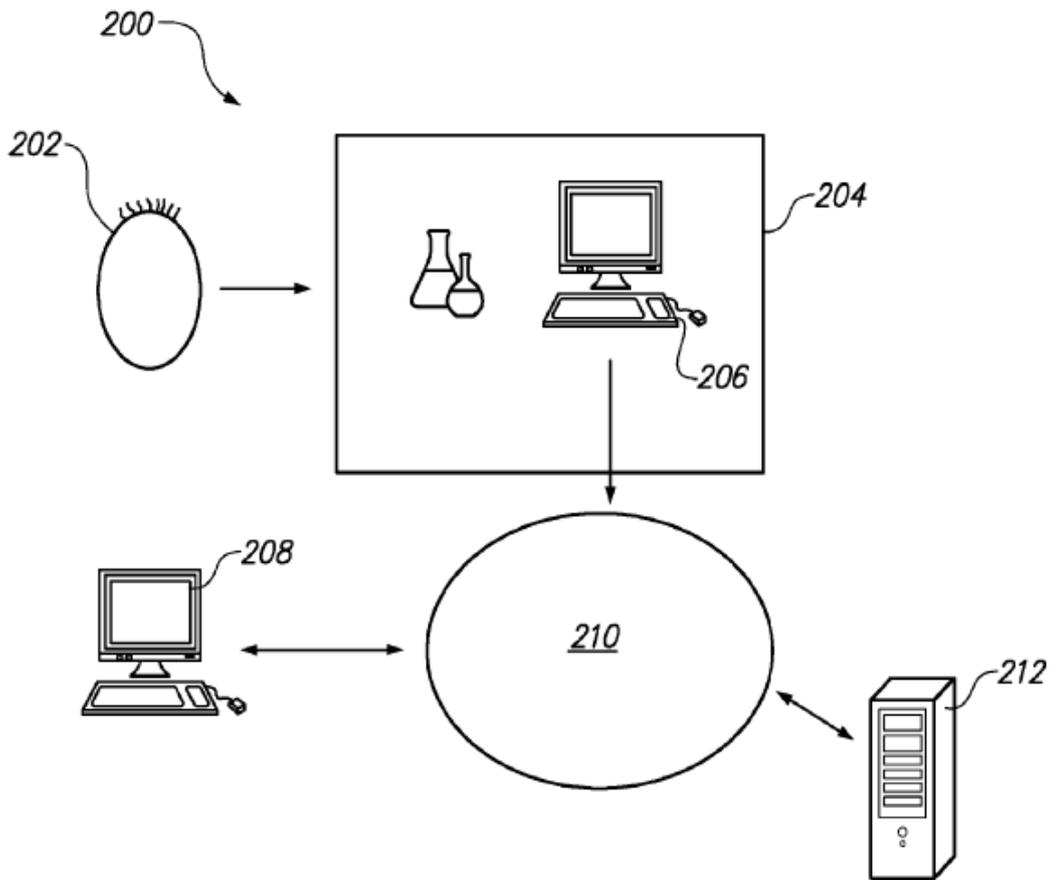


FIG. 2