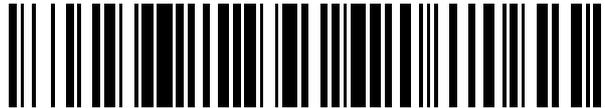


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 322**

21 Número de solicitud: 201230889

51 Int. Cl.:

A61K 36/66 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

29.07.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.01.2013

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 201131321 29.07.2011

71 Solicitantes:

**DIATER LABORATORIOS (100.0%)
Avda. Gregorio Peces Barba, 2, Parque Leganés
Tecnológico
28918 Leganés (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**PALACIOS PELÁEZ, Ricardo ;
ALDANA SÁNCHEZ, Dulce ;
PINEDA DE LA LOSA, Fernando ;
ARMENTIA MEDINA, Alicia ;
MARTÍN ARMENTIA, Blanca ;
DE LECEA FLORES DE LEMUS, Carlos y
PUENTE CRESPO, Yolanda**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE ALERGIA O HIPERSENSIBILIDAD A OPIÁCEOS Y
COMPUESTOS ESTRUCTURALMENTE RELACIONADOS**

57 Resumen:

Métodos de diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados.

Se describe un método para el diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados, en particular, opiáceos utilizados en anestesia, y agentes bloqueantes neuromusculares (NMBAs), basado en el uso de extractos hidrosolubles de semillas de *Papaver somniferum*.

ES 2 394 322 A2

DESCRIPCIÓN

Métodos de diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se encuadra, en general, dentro del área del diagnóstico de alergias; en particular, en un método para el diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados, en particular, opiáceos utilizados en anestesia, y agentes bloqueantes neuromusculares (NMBAs), basado en el uso de extractos hidrosolubles de semillas de *Papaver somniferum*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La anestesia es un acto médico controlado en el que se usan fármacos para bloquear la sensibilidad táctil y dolorosa de un paciente, sea en todo o parte de su cuerpo y sea con o sin compromiso de conciencia. La anestesia general se caracteriza por brindar hipnosis, amnesia, analgesia, relajación muscular y abolición de reflejos. Para ello, los anestesiólogos administran diversos fármacos a los pacientes. En anestesia general se suelen administrar hipnóticos, analgésicos potentes, relajantes musculares y otras sustancias, por ejemplo, anticolinérgicos, benzodiazepinas y anticolinesterásicos que revierten el efecto de los relajantes musculares.

Entre dichos analgésicos se encuentran los opiáceos naturales (morfina) o sintéticos (fentanilo, meperidina, alfentanilo y remifentanilo), y compuestos relacionados con la morfina, por ejemplo, codeína, heroína, metadona y pholcodina. Entre los relajantes musculares se encuentran los denominados NMBAs (agentes bloqueantes neuromusculares – del inglés “neuromuscular blocking agents”), que disponen de una estructura iónica de amonio cuaternario y contienen un anillo esquelético hidrófobo y una amina terciaria hidrófila [Fischer MM. et al., Immunoassays for the diagnosis of anaphylaxis to neuromuscular blocking drugs: the value of morphine for the detection of IgE antibodies in allergic subjects. *Anaesth Intensive Care* 2000; 28:167-70], estructura similar a la de la morfina.

Las reacciones anafilácticas durante la anestesia involucran principalmente a dichos opiáceos y NMBAs (compuestos estructuralmente relacionados con opiáceos), siendo la causa más frecuente (50 - 70%) de las mismas [Moneret-Vautrin DA. et al., Anaphylaxis to general anesthesia. *Chem Immunol Allergy* 2010; 95:180-9] por lo que el diagnóstico previo de una presunta hipersensibilidad a los mismos puede salvar la vida a un paciente.

No obstante, realizar un diagnóstico etiológico alergológico de un paciente anestesiado resulta muy difícil ya que las reacciones cutáneas están ocultas bajo las sábanas quirúrgicas, el paciente no se puede quejar de picor o disnea al estar anestesiado, y, además, son múltiples los fármacos que se utilizan. Asimismo, cualquier método de prevención de eventos adversos por fármacos tan utilizados como los opiáceos constituiría una ventaja muy importante en la prevención de reacciones adversas frente a dichos fármacos y tendría una gran repercusión sanitaria y social.

Las pruebas cutáneas (e.g., “Prick Test” e intradermorreacción), son pruebas *in vivo* que constituyen uno de los métodos diagnósticos empleados para confirmar las sospechas clínicas de reacciones alérgicas a NMBAs. Sin embargo, las pruebas cutáneas mediante “Prick Test” no han mostrado utilidad diagnóstica cuando se emplean como reactivos opiáceos, tales como morfina (10 mg/mL), meperidina o petidina (50 mg/mL) y papaveretum [una mezcla de clorhidratos de alcaloides del opio compuesta por 253 partes de clorhidrato de morfina, 23 partes de clorhidrato de papaverina y 20 partes de clorhidrato de codeína (Farmacopea británica – 1993)] (15,4 mg/mL) y se ensayan a 4 diluciones a razón de 1:10 [Nasser SM. et al., Opiate-sensitivity: clinical characteristics and the role of skin prick testing. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(7):1014-20].

Los métodos *in vitro*, basados principalmente en la cuantificación de inmunoglobulina E (IgE) específica en suero frente a NMBAs, constituyen otra de las alternativas diagnósticas habitualmente empleadas para evaluar la alergia o hipersensibilidad a NMBAs. Estas pruebas *in vitro* han puesto de manifiesto la presencia de IgE específica en suero frente a alcuronium, d-tubocurarine, pancuronium y análogos, vecuronium, succinilcolina, decamethonium y galamina en pacientes alérgicos a estos NMBAs [Baldo BA. et al., *In vitro* diagnosis and studies on the mechanism(s) of anaphylactoid reactions to muscle relaxant drugs. *Ann Fr Anesth Reanim* 1985; 4(2):139-45].

Aunque se han descrito diversos métodos para diagnosticar si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a opiáceos y NMBAs utilizados en anestesia, sigue existiendo la necesidad de desarrollar métodos alternativos que permitan diagnosticar, de una manera objetiva, segura para los pacientes, sencilla y de bajo coste, si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a opiáceos y/o a compuestos estructuralmente relacionados utilizados en anestesia. Ventajosamente, dicho método de diagnóstico debería, además, poseer una elevada sensibilidad y especificidad así como un alto valor predictivo negativo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La Figura 1 muestra el perfil electroforético de los extractos hidrosoluble y liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenidos según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, determinados mediante SDS-PAGE 15% y tinción con azul de Coomassie. [MWM: Patrón de pesos moleculares. Calle 1: Extracto hidrosoluble obtenido mediante el procedimiento de obtención [1] de un extracto hidrosoluble de la invención. Calle 2: Extracto liposoluble obtenido mediante el procedimiento de obtención [A] de un extracto liposoluble].

10 La Figura 2 muestra el perfil electroforético del extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 (mediante el procedimiento de obtención [A] de un extracto liposoluble), determinado mediante SDS-PAGE 15% monodimensional (panel derecho - 1D Electroforesis) y bidimensional [2D-SDS-PAGE 15%] (panel izquierdo - 2D Electroforesis) y tinción, en ambos casos, con azul de Coomassie. [MWM: Patrón de pesos moleculares].

15 La Figura 3 muestra el perfil alergénico de los extractos hidrosoluble y liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenidos según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, determinados mediante SDS-PAGE 15% y tinción con azul de Coomassie e IgE inmunoblotting. [MWM: Patrón de pesos moleculares. Calle 1: Extracto hidrosoluble. Calle 2: Extracto liposoluble. IgE: Inmunoblotting con pool de sueros de pacientes sensibilizados].

20 La Figura 4 muestra el perfil alergénico del extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, determinado mediante SDS-PAGE 15% bidimensional [2D-SDS-PAGE 15%] (panel izquierdo - 2D Electroforesis) y tinción con azul de Coomassie, e IgE inmunoblotting. Se incluye, además, en el panel derecho (1D Electroforesis), el perfil electroforético de dicho extracto liposoluble, determinado mediante SDS-PAGE 15% monodimensional y tinción con azul de Coomassie. [MWM: Patrón de pesos moleculares. pl: Punto isoelectrónico. Calle 1 (1D Electroforesis): Extracto liposoluble].

30 La Figura 5 muestra los resultados de un Dot Blot para detectar IgE específica de opiáceos en (i) sueros de 6 pacientes alérgicos a derivados morfínicos (opiáceos positivos), (ii) sueros procedentes de pacientes no alérgicos a derivados morfínicos (opiáceos negativos); y sueros de niños prematuros, sueros de recién nacidos y tampón PBS (controles), utilizando los extractos hidrosolubles y liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenidos según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

35 La Figura 6 muestra los resultados de un Dot Blot para detectar IgE específica de opiáceos en (i) suero de un paciente con reacción alérgica severa por aplicación de Atracurio (diluido a 1:4 en el tampón de bloqueo (PBS Tween 0,5%)); y (ii) mezcla de sueros de 4 pacientes con reacción clínica grave por aplicación de anestésicos: fentanilo, alfentanilo, morfina, propofol, droperidol, timental y/o ketamina, utilizando los extractos hidrosolubles y liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenidos según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Como control se utilizó PBS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 Ahora se ha encontrado que un extracto de semillas de *P. somniferum* puede ser utilizado para diagnosticar si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a opiáceos o a compuestos estructuralmente relacionados con opiáceos, en particular, opiáceos y NMBAs utilizados en anestesia. En una realización particular, dicho extracto de semillas de *P. somniferum*, es un extracto hidrosoluble; asimismo, en otra realización particular, dicho extracto de semillas de *P. somniferum*, es una mezcla de un extracto hidrosoluble y un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*. En el Ejemplo 1 se describen unos procedimientos para la obtención de dichos extractos de semillas de *P. somniferum*, mientras que el Ejemplo 2 pone de manifiesto que el suero de pacientes alérgicos a opiáceos contenía anticuerpos (IgE específica) frente a dichos extractos (es decir, frente a componentes presentes en dichos extractos) por lo que dichos extractos de semillas de *P. somniferum*, tanto los extractos hidrosolubles como los extractos liposolubles, aislados o combinados entre sí, pueden ser utilizados en el diagnóstico de la alergia o hipersensibilidad a opiáceos, en particular, opiáceos utilizados en anestesia.

55 Además, se ha observado que dichos extractos de semillas de *P. somniferum*, tanto los extractos hidrosolubles como los extractos liposolubles, aislados o combinados entre sí, pueden ser utilizados para medir, indirectamente, la alergia o hipersensibilidad a NMBAs, por lo que, además, pueden ser utilizados en el diagnóstico de la alergia o hipersensibilidad a dichos NMBAs (Ejemplo 3).

Extracto de la invención

60 En un aspecto, la invención se relaciona con un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*, en adelante extracto de la invención, obtenible mediante procedimientos como los que se describen más adelante.

65 En el Ejemplo 1 se describe una realización particular de un extracto hidrosoluble y de un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*. La adormidera (*Papaver somniferum* L.) es una de las plantas cultivadas más importantes para la industria farmacéutica, ya que constituye la única fuente de alcaloides como la morfina, codeína

y tebaína, que son ampliamente utilizados en medicina como analgésicos, anestésicos, antitusivos y antiespasmódicos. La adormidera es una planta herbácea anual, cuyos frutos son cápsulas globosas y deprimidas, rematadas por una corona estigmática lobulada que contienen las semillas, las cuales son muy numerosas y pequeñas, reniformes y de superficie reticulada y color blanco a pardo oscuro. La maduración de las cápsulas coincide con una elevada concentración de alcaloides.

El extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* puede obtenerse mediante cualquiera de los procedimientos [1] y [2] que se describen a continuación.

En una realización particular, la invención proporciona un procedimiento para la obtención de un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*, en adelante "procedimiento de obtención [1] de un extracto hidrosoluble de la invención", que comprende las etapas de:

- a) suspender semillas de *P. somniferum* en un medio que comprende un tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, y glicerol;
- b) someter las semillas de *P. somniferum* contenidas en la suspensión obtenida en la etapa a) a un tratamiento de homogeneización, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, para obtener un homogeneizado de semillas de *P. somniferum* que comprende (i) una fase sólida que comprende restos celulares de semillas de *P. somniferum* y (ii) una fase líquida que comprende las sustancias contenidas en dichas semillas;
- c) someter el homogeneizado obtenido en la etapa b) a agitación a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C;
- d) separar las fases sólida y líquida del homogeneizado resultante de la etapa c);
- e) centrifugar la fase líquida obtenida en la etapa d) entre 7.000 y 13.000 g durante un periodo de tiempo suficiente como para separar una fase acuosa líquida que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* y una fase oleosa sólida o semisólida que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* formado por las sustancias contenidas en las semillas de *P. somniferum* que no son solubles en medio acuoso;
- f) separar la fase acuosa que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenida en la etapa e);
- g) filtrar dicha fase acuosa que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* separada en la etapa f) a través de un filtro con un tamaño de poro comprendido entre aproximadamente 0,8 micrómetros (μm) y aproximadamente 8 μm para obtener un filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*; y
- h) someter dicho filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* a diálisis frente a agua desionizada con membranas de corte molecular comprendido entre aproximadamente 3.500 Da y aproximadamente 7.000 Da, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, para obtener un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*.

Brevemente, el procedimiento de obtención [1] de un extracto hidrosoluble de la invención permite obtener un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* a partir de una suspensión de semillas de *P. somniferum* en un medio que comprende un tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, y glicerol obtenida mezclando dichas semillas con dicho tampón y glicerol [etapa a)]. Prácticamente cualquier tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9 puede ser utilizado; no obstante, en una realización particular, dicho tampón se selecciona entre tampón maleato (pH 6,2-6,8), tampón fosfato (pH 6,9-8,0) en sus diferentes formas (e.g., Sörensen, Maunsbach, Milloning) y tampón Tris-HCl (pH 7,2-7,7); en una realización concreta, dicho tampón es tampón fosfato salino (PBS). La relación tampón:glicerol (v/v) puede variar dentro de un intervalo; no obstante, en una realización particular dicho medio comprende entre 20% y 80% (v/v) de glicerol; en una realización concreta dicho medio comprende aproximadamente 25% (v/v) de glicerol. Las semillas de *P. somniferum*, en una realización particular, se utilizan intactas, es decir, sin romper, triturar o moler; no obstante, en otra realización particular y preferida, las semillas se someten a un proceso de ruptura, trituración y/o molienda previo, por métodos convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de un mortero y un mazo, etc., con el fin de facilitar la extracción de los distintos componentes hidrosolubles o liposolubles de las semillas de *P. somniferum*.

La suspensión de semillas de *P. somniferum* obtenida en la etapa a) se mantiene a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, típicamente alrededor de 5°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 30 minutos y 2 horas [etapa b)] con el fin de homogeneizar la suspensión de semillas de *P. somniferum* y solubilizar la mayor cantidad posible de sustancias hidrosolubles o liposolubles contenidas en dichas semillas de *P. somniferum*. Mediante la homogeneización, las semillas de *P. somniferum* contenidas en la suspensión obtenida en la etapa a) se someten a un proceso de ruptura celular para liberar el contenido de las mismas al medio en el que fueron suspendidas. Dicho proceso se realiza por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, por la acción mecánica de un mortero y un pistilo, por la acción de un homogeneizador eléctrico, etc. Tras la homogeneización se obtiene un homogeneizado de semillas de *P. somniferum* que comprende (i) una fase sólida que comprende restos celulares de semillas de *P. somniferum* y (ii)

una fase líquida que comprende el contenido de dichas semillas, por ejemplo, las sustancias hidrosolubles o liposolubles presentes en dichas semillas.

5 A continuación, el homogeneizado obtenido en la etapa b), que comprende dichas fases sólida y líquida, se somete a agitación [etapa c)], preferentemente continuada y constante (agitación controlada), por ejemplo, mediante agitación magnética, para facilitar la solubilización de los componentes de dicha fase líquida (hidrosolubles y liposolubles) en la mezcla formada por el tampón y el glicerol. La agitación se lleva a cabo a temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, típicamente alrededor de 5°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas, preferentemente alrededor de 30 minutos. Tras la agitación se obtiene un homogeneizado "agitado" que comprende (i) una fase sólida, que comprende restos insolubles de dichas semillas y otros componentes sólidos, y (ii) una fase líquida, que comprende las sustancias hidrosolubles y liposolubles de las semillas de *P. somniferum*. A continuación, dicha fase líquida se separa de dicha fase sólida [etapa d)] por métodos convencionales de separación de sólidos y líquidos, por ejemplo, mediante 15 decantación, tamización, filtración, etc., con el fin de obtener un homogeneizado lo más limpio posible al retirar la fase sólida que comprende los restos insolubles de las semillas de *P. somniferum*. En una realización particular, dicha fase líquida se separa de dicha fase sólida por tamización utilizando un tamiz con una luz de malla apropiada para retirar los restos celulares y fracciones de semillas rotas durante la homogeneización; en una realización concreta, dicho tamiz tiene una luz de malla de aproximadamente 400 µm; no obstante, pueden utilizarse tamices con luz de malla inferior.

Posteriormente, la fase líquida separada se centrifuga [etapa e)] entre aproximadamente 7.000 g y aproximadamente 13.000 g, preferentemente alrededor de 10.000 g, durante un periodo de tiempo suficiente como 25 para separar una fase acuosa líquida que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* y una fase oleosa sólida o semisólida que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*, generalmente comprendido entre 5 y 30 minutos aproximadamente, preferentemente durante alrededor de 15 minutos. En general, esta centrifugación se lleva a cabo a temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, típicamente alrededor de 5°C. Tras la centrifugación en las condiciones indicadas se separa el contenido no graso (hidrosoluble) del graso (liposoluble); el 30 contenido graso (fase oleosa), en general, se encuentra en estado sólido o semisólido y comprende las sustancias contenidas en las semillas de *P. somniferum* que no son solubles en medio acuoso mientras que el contenido no graso (fase acuosa) se encuentra en estado líquido y comprende las sustancias contenidas en las semillas de *P. somniferum* que son solubles en medio acuoso.

35 La fase acuosa (líquida) obtenida en la etapa e) se separa [etapa f)] de la fase oleosa (sólida o semisólida) por métodos convencionales de separación de fases líquidas de fases sólidas o semisólidas conocidos por los técnicos en la materia; en una realización particular, dicha separación se realiza mediante decantación, para lo cual se retira la fase oleosa presente en estado sólido o semisólido (siempre en la parte superior de la muestra) mediante el uso de una espátula o herramienta similar, procurando recoger la mayor cantidad posible de fase oleosa.

40 La fase acuosa que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* se filtra [etapa g)] a través de un filtro con un tamaño de poro comprendido entre aproximadamente 0,8 µm y aproximadamente 8 µm, preferentemente alrededor de 2 µm, con el fin de eliminar impurezas y obtener un filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*. Prácticamente cualquier filtro con dicho tamaño de poro puede ser 45 utilizado para la puesta en práctica de esta invención; no obstante, en una realización particular, dicho filtro comprende una membrana con un prefiltro de fibra de vidrio para proteger a la membrana, tal como un filtro de la serie AP (Millipore®), por ejemplo, de la serie AP 15 (filtro de fibra de vidrio con una membrana con un tamaño de poro comprendido entre 0,2 y 0,6 µm), AP 20 (filtro de fibra de vidrio con una membrana con un tamaño de poro comprendido entre 0,8 y 8 µm) o AP 25 (filtro de fibra de vidrio con una membrana con un tamaño de poro 50 comprendido entre 0,9 y 8 µm).

A continuación, el filtrado que comprende el extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido en la etapa g) se somete a diálisis [etapa h)] frente a agua desionizada con membranas de corte molecular comprendido entre 55 aproximadamente 3.500 Da y aproximadamente 7.000 Da, preferentemente de alrededor de 3.500 Da, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, habitualmente alrededor de 5°C, para obtener un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*. La duración de este tratamiento de diálisis depende, en cierta medida, del aparato dializador utilizado y, en general, está comprendido entre aproximadamente 1 hora (cuando el flujo de intercambio es alto y se trata de un cassette con un corte en el intervalo indicado) y aproximadamente 16 horas 60 (cuando la membrana utilizada es una membrana tipo "tripa").

El extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenible según el procedimiento de obtención [1] de un extracto hidrosoluble de la invención previamente descrito constituye un aspecto adicional de la invención. El término "hidrosoluble" se aplica a las sustancias solubles [muy soluble, fácilmente soluble, soluble, bastante soluble o poco 65 soluble (Farmacopea Española)] en agua o en un medio acuoso. Un "extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*", tal como aquí se utiliza, se refiere a una composición de materia que comprende una sustancia o

conjunto de sustancias obtenidas por extracción de las semillas de *P. somniferum* utilizando agua o un medio acuoso. En el Ejemplo 1 se describe la obtención de un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* proporcionado por esta invención y su perfil electroforético, en donde puede apreciarse la existencia de una banda de alrededor de 52 kDa que podría corresponder a una proteína mayoritaria, así como de unas bandas de alrededor de 20 kDa y 32 kDa que aparecen como importantes fijadoras de IgE específica en los sueros de los pacientes analizados (Figura 3).

Alternativamente, el extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* de la invención puede ser obtenido mediante un procedimiento para la obtención de un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*, en adelante “procedimiento de obtención [2] de un extracto hidrosoluble de la invención previamente”, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto semillas de *P. somniferum* con un disolvente orgánico polar aprótico, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, para obtener un homogeneizado de semillas de *P. somniferum* que comprende una fase sólida que comprende restos insolubles de semillas de *P. somniferum* y una fase líquida que comprende dicho disolvente orgánico polar aprótico y sustancias procedentes de dichas semillas solubles en dicho disolvente orgánico polar aprótico;
- b) separar dicha fase líquida generada en la etapa a) bajo condiciones que permiten dejar la fase sólida de la etapa a) sustancialmente libre de dicha fase líquida;
- c) poner en contacto dicha fase sólida de la etapa b) sustancialmente libre de fase líquida con un medio que comprende (i) un tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9 y (ii) un agente quelante, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, para extraer la fracción hidrosoluble de las semillas de *P. somniferum* y generar una suspensión que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*;
- d) centrifugar la suspensión obtenida en la etapa c) entre aproximadamente 6.000 g y aproximadamente 12.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 2 horas, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, y separar el sobrenadante que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*;
- e) filtrar el sobrenadante de la etapa d) que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* a través de un filtro con un tamaño de poro comprendido entre aproximadamente 0,8 µm y aproximadamente 8 µm para obtener un filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*; y
- f) someter dicho filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido en la etapa e) a diálisis frente a agua desionizada con membranas de corte molecular comprendido entre aproximadamente 3.500 Da y aproximadamente 7.000 Da, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, para obtener un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*.

El procedimiento de obtención [2] de un extracto hidrosoluble de la invención es un procedimiento alternativo al procedimiento de obtención [1] de un extracto hidrosoluble de la invención para extraer las proteínas (y otras sustancias) hidrosolubles contenidas en las semillas de *P. somniferum*, que permite obtener un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* a partir de dichas semillas. Brevemente, dichas semillas (intactas o trituradas/molidas) se ponen en contacto con un disolvente orgánico polar aprótico [etapa a)]; ejemplos ilustrativos de disolventes orgánicos polares apróticos incluyen tanto disolventes orgánicos polares apróticos con constantes dieléctricas altas, por ejemplo, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), hexametilfosforamida (HMPA), nitrilos (e.g., acetonitrilo, butanonitrilo, etc.), cetonas (e.g., metiletilcetona, butanona, etc.), como disolventes orgánicos polares apróticos con constantes dieléctricas bajas, por ejemplo, tetrahidrofurano (THF), 1,4-dioxano, diclorometano, acetato de etilo, 1,2-dimetoxietano (mono-glima), etc.; en una realización particular y preferida, dicho disolvente orgánico polar aprótico es acetona. Mediante este tratamiento, se produce, la homogeneización, es decir, la ruptura de las células de las semillas de *P. somniferum* y liberación de su contenido al medio en el que fueron suspendidas (disolvente orgánico polar aprótico); este tratamiento se puede realizar por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, por la acción mecánica de un mortero y un pistilo, por la acción de un homogeneizador eléctrico, etc. En general, dicho tratamiento se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, habitualmente alrededor de 5°C. Tras este tratamiento se obtiene un homogeneizado de semillas de *P. somniferum* que comprende (i) una fase sólida que comprende restos celulares insolubles de semillas de *P. somniferum* y (ii) una fase líquida que comprende el disolvente orgánico polar aprótico y las sustancias procedentes de dichas solubles en dicho disolvente orgánico polar aprótico. Como se ha indicado previamente, las semillas de *P. somniferum* pueden utilizarse intactas, es decir, sin romper, triturar o moler, o bien, preferentemente, fragmentadas, trituradas o molidas para lo cual dichas semillas se someten a un proceso de ruptura, trituración y/o molienda previo, por métodos convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de un mortero y un mazo, etc., con el fin de facilitar la extracción de las distintas sustancias de las semillas de *P. somniferum* solubles en el disolvente orgánico polar aprótico utilizado.

A continuación, se separa la fase líquida (orgánica) obtenida en la etapa a) bajo condiciones que permiten dejar la fase sólida de la etapa a) sustancialmente libre de dicha fase líquida [etapa b)]. La retirada o separación de dicha

fase líquida puede llevarse a cabo por métodos convencionales de separación de fases conocidos por los técnicos en la materia; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha separación puede realizarse mediante filtración a través de membranas con un tamaño de poro comprendido entre aproximadamente 0,8 µm y aproximadamente 8 µm, por ejemplo, de alrededor de 2 µm, o bien mediante evaporación, utilizando, por ejemplo, un sistema de rotavapor (como es conocido, el punto de ebullición de la acetona a 1 atm es de 56°C), etc.

Posteriormente, la fase sólida procedente de la etapa b) se pone en contacto con un medio que comprende un tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, y glicerol obtenida mezclando dichas semillas con dicho tampón y un agente quelante, para extraer la fracción hidrosoluble de las semillas de *P. somniferum* y generar una suspensión que comprende un extracto hidrosoluble de dichas semillas [etapa c)]. Prácticamente cualquier tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9 puede ser utilizado; no obstante, en una realización particular, dicho tampón se selecciona entre tampón maleato (pH 6,2-6,8), tampón fosfato (pH 6,9-8,0) en sus diferentes formas (e.g., Sörensen, Maunsbach, Milloning) y tampón Tris-HCl (pH 7,2-7,7); en una realización concreta, dicho tampón es Tris-HCl (pH 7,5). El agente quelante o secuestrante, en general, evita la formación de compuestos insolubles, y, por consiguiente, la acción de efectos indeseables al formar complejos estables con los iones metálicos. Prácticamente cualquier agente quelante puede ser utilizado en la puesta en práctica de esta invención; no obstante, en una realización particular, dicho agente quelante se selecciona del grupo formado por ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA), triamida del ácido tripirrolidinfosfórico (TPPA), ácido glucónico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido acético y sus mezclas, preferentemente EDTA, un agente quelante que contiene grupos aminocarboxílicos con una fuerza quelante alta. La relación (fase sólida procedente de la etapa b)):(tampón-agente quelante) puede variar dentro de un intervalo; no obstante, en una realización particular dicha relación está comprendida entre aproximadamente 1:0,1 y aproximadamente 1:25 (p/v), típicamente, en una relación comprendida entre 1:1 y 1:10 (p/v); en una relación particular, dicha relación (fase sólida procedente de la etapa b)):(tampón-agente quelante) es de 1:5 (p/v). Esta etapa se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, habitualmente alrededor de 5°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 2 horas, generalmente entre 30 minutos y 1 hora. Tras este tratamiento se obtiene una suspensión que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*.

La suspensión resultante tras la extracción de las sustancias hidrosolubles de dichas semillas se centrifuga [etapa d)] entre aproximadamente 6.000 g y aproximadamente 12.000 g, preferentemente a aproximadamente 9.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 2 horas, generalmente entre 30 minutos y 1 hora, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, habitualmente alrededor de 5°C, con el fin de separar el sobrenadante que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*, el cual se filtra [etapa e)] a través de un filtro con un tamaño de poro comprendido entre aproximadamente 0,8 µm y aproximadamente 8 µm, preferentemente alrededor de 2 µm, con el fin de eliminar impurezas y obtener un filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*. Prácticamente cualquier filtro con dicho tamaño de poro puede ser utilizado; no obstante, en una realización particular, dicho filtro es un filtro de fibra de vidrio de la serie AP (Millipore®) que comprende una membrana con un tamaño de poro comprendido entre 0,2 y 0,6 µm (serie AP 15), o una membrana con un tamaño de poro comprendido entre 0,8 y 8 µm (AP 20) o una membrana con un tamaño de poro comprendido entre 0,9 y 8 µm (AP 25).

A continuación, el filtrado que comprende el extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido en la etapa e) se somete a diálisis [etapa f)] frente a agua desionizada con membranas de corte molecular comprendido entre aproximadamente 3.500 Da y aproximadamente 7.000 Da, preferentemente de alrededor de 3.500 Da, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, habitualmente alrededor de 5°C, para obtener un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*. La duración de este tratamiento de diálisis depende, en cierta medida, del aparato dializador utilizado y, en general, está comprendido entre aproximadamente 1 hora (cuando el flujo de intercambio es alto y se trata de un cassette con un corte en el intervalo indicado) y aproximadamente 16 horas (cuando la membrana utilizada es una membrana tipo "tripa").

El extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenible según el procedimiento de obtención [2] de un extracto hidrosoluble de la invención previamente descrito constituye un aspecto adicional de la invención.

Un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* puede obtenerse mediante un procedimiento como el que se describe a continuación.

Un procedimiento para la obtención de un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*, en adelante "procedimiento de obtención [A] de un extracto liposoluble", comprende las etapas de:

- a) suspender semillas de *P. somniferum* en un medio que comprende un tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, y glicerol;

- 5 b) someter las semillas de *P. somniferum* contenidas en la suspensión obtenida en la etapa a) a un tratamiento de homogeneización, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, para obtener un homogeneizado de semillas de *P. somniferum* que comprende (i) una fase sólida que comprende restos celulares de semillas de *P. somniferum* y (ii) una fase líquida que comprende las sustancias contenidas en dichas semillas;
- 10 c) someter el homogeneizado obtenido en la etapa b) a agitación a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C;
- d) separar las fases sólida y líquida del homogeneizado resultante de la etapa c);
- 15 e) centrifugar la fase líquida obtenida en la etapa d) entre 7.000 y 13.000 g durante un periodo de tiempo suficiente como para separar una fase acuosa líquida que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* y una fase oleosa sólida o semisólida que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* formado por las sustancias contenidas en las semillas de *P. somniferum* que no son solubles en medio acuoso;
- f) separar la fase oleosa que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenida en la etapa e);
- g) resuspender la fase oleosa procedente de la etapa f) en un medio que comprende (i) un tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, y (ii) glicerol;
- 20 h) centrifugar la suspensión obtenida en la etapa g) entre aproximadamente 7.000 g y aproximadamente 13.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 15 minutos, para obtener una fase oleosa que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*;
- i) resuspender la fase oleosa procedente de la etapa h) en un medio que comprende (i) un tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, y (ii) glicerol;
- 25 j) centrifugar la suspensión obtenida en la etapa i) entre aproximadamente 7.000 g y aproximadamente 13.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 15 minutos, para obtener una fase oleosa que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*;
- k) separar la fase oleosa procedente de la etapa j);
- 30 l) resuspender la fase oleosa procedente de la etapa k) con un medio que comprende al menos un disolvente orgánico;
- m) centrifugar la suspensión obtenida en la etapa l) entre aproximadamente 2.000 g y aproximadamente 5.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 15 minutos, para obtener una fase oleosa que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*;
- 35 n) separar la fase oleosa procedente de la etapa m);
- o) añadir a la fase oleosa procedente de la etapa n) un disolvente orgánico, a una temperatura comprendida entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 10°C, y mantener a una temperatura comprendida entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 10°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 25 minutos; y
- 40 p) centrifugar la suspensión resultante de la etapa o) entre aproximadamente 7.000 g y aproximadamente 10.000 g, preferentemente a alrededor de 10.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos, para obtener un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*.

45 Las etapas a) – e) del procedimiento de obtención [A] de un extracto liposoluble son iguales a las etapas a) – e) del procedimiento de obtención [1] de un extracto hidrosoluble de la invención, cuyas características ya han sido mencionadas previamente.

50 En la etapa f) del procedimiento de obtención [A] de un extracto liposoluble, se separa la fase oleosa que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* y se resuspende en un medio que comprende un tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, y glicerol obtenida mezclando dichas semillas con dicho tampón y glicerol. Prácticamente cualquier tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9 puede ser utilizado; no obstante, en una realización particular, dicho tampón se selecciona entre tampón maleato (pH 6,2-6,8), tampón fosfato (pH 6,9-8,0) en sus diferentes formas (e.g., Sørensen, Maunsbach, Milloning) y tampón Tris-HCl (pH 7,2-7,7); en una realización concreta, dicho tampón es tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4. La relación tampón:glicerol (v/v) puede variar dentro de un intervalo; no obstante, en una realización particular dicho medio comprende entre 20% y 80% (v/v) de glicerol; en una realización concreta dicho medio comprende aproximadamente 50% (v/v) de glicerol.

60 La suspensión previamente obtenida se centrifuga [etapa h)] entre aproximadamente 7.000 g y aproximadamente 13.000 g, preferentemente a aproximadamente 10.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 15 minutos, generalmente entre 2,5 minutos y 10 minutos, típicamente alrededor de 5 minutos. La centrifugación puede realizarse a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, habitualmente alrededor de 5°C. Mediante este tratamiento se produce un lavado de la fase oleosa que ha sido resuspendida en el medio que comprende el tampón y el glicerol, con el fin de eliminar eventuales restos de

5 proteínas u otras sustancias hidrosolubles que hubieran podido quedar en la etapa anterior, con lo que se obtiene una nueva fase oleosa en estado sólido o semisólido que incluiría las sustancias y proteínas que forman parte de los cuerpos lipídicos presentes en las semillas de *P. somniferum*. Dicha fase oleosa (sólida o semisólida) se separa por métodos convencionales de separación de fases líquidas de fases sólidas o semisólidas conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, mediante decantación utilizando una espátula o herramienta similar, tal como se ha mencionado previamente.

10 La fase oleosa procedente de la etapa h) se resuspende [etapa i)] en un medio que comprende (i) un tampón con un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, y (ii) glicerol, tal como se ha mencionado previamente en relación con la etapa g) anterior, y, la suspensión resultante se centrifuga [etapa j)] en condiciones similares a las descritas en relación con la etapa h); es decir, entre aproximadamente 7.000 g y aproximadamente 13.000 g, preferentemente a aproximadamente 10.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 15 minutos, generalmente entre 2,5 minutos y 10 minutos, típicamente alrededor de 5 minutos. La centrifugación puede realizarse a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, preferentemente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, habitualmente alrededor de 5°C. Mediante este tratamiento se produce un nuevo lavado de la fase oleosa que ha sido resuspendida en el medio que comprende el tampón y el glicerol, con el fin de eliminar eventuales restos de proteínas u otras sustancias hidrosolubles que hubieran podido quedar en la etapa anterior, con lo que se obtiene una nueva fase oleosa en estado sólido o semisólido que incluiría las sustancias y proteínas que forman parte de los cuerpos lipídicos presentes en las semillas de *P. somniferum*. En una realización particular, si se desea, tras los lavados con tampón y glicerol se puede realizar un lavado adicional de la fase oleosa con un tampón con un pH próximo a 10, por ejemplo, con un pH comprendido entre 9 y 11, preferentemente entre aproximadamente 9,5 y aproximadamente 10,5 por ejemplo, con un tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6. Dicha fase oleosa (sólida o semisólida) se separa [etapa k)] por métodos convencionales de separación de fases líquidas de fases sólidas o semisólidas conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, mediante decantación utilizando una espátula o herramienta similar, tal como se ha mencionado previamente y resuspende en un medio que comprende uno o más disolventes orgánicos [etapa l)], por ejemplo, un disolvente orgánico polar, prótico o aprótico, por ejemplo, metanol, etanol, acetona, ácido acético, THF, etc., o un disolvente orgánico apolar, por ejemplo, dietiléter, cloroformo, benceno, tolueno, xileno, cetonas (distinta de acetona), hexano, ciclohexano, tetracloruro de carbono, etc. En una realización particular, dicho medio comprende una mezcla de cloroformo:metanol; la relación entre el cloroformo y el metanol presente en dicha mezcla puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, dicha mezcla puede contener entre 20% y 60%, en volumen, de metanol; en una realización particular, dicho medio comprende una mezcla de cloroformo:metanol en una relación 2:1 (v/v). Mediante este tratamiento, se favorece la separación de las proteínas liposolubles contenidas en los cuerpos lipídicos (probablemente las de mayor interés para los fines de diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a opiáceos utilizados en anestesia).

40 La suspensión así obtenida en la etapa l) se centrifuga entre aproximadamente 2.000 g y aproximadamente 5.000 g, preferentemente a alrededor de 3.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 15 minutos, preferentemente 10 minutos [etapa m)] para retirar eventuales sustancias y proteínas hidrosolubles que hubieran podido quedar retenidas y obtener una fase oleosa que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* cada vez más libre de sustancias y proteínas hidrosolubles, que se separa [etapa n)] por métodos convencionales tal como se ha mencionado previamente en relación con la etapa k) y a la que se le añade un disolvente orgánico a una temperatura comprendida entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 10°C [etapa o)]. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho disolvente orgánico incluyen acetona, acetato de etilo, THF, etc. En una realización particular, esta etapa o) se lleva a cabo utilizando acetona "fría", es decir, a una temperatura comprendida entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 10°C, típicamente entre aproximadamente -10°C y aproximadamente 5°C. La relación fase oleosa:acetona puede variar dentro de un amplio intervalo, no obstante, en una realización particular dicha relación está comprendida entre aproximadamente 1:2 (v/v) y aproximadamente 1:4 (v/v), típicamente alrededor de 1:2 (v/v). La suspensión resultante se deja a una temperatura comprendida entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 10°C, típicamente entre aproximadamente -10°C y aproximadamente 5°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 25 minutos, típicamente alrededor de 15 minutos aproximadamente.

55 Finalmente, la suspensión resultante de la etapa o) se centrifuga [etapa p)] entre aproximadamente 7.000 g y aproximadamente 10.000 g, preferentemente a alrededor de 10.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos, preferentemente entre 10 y 20 minutos aproximadamente, generalmente alrededor de 15 minutos, para obtener un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*.

60 Un "extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*", tal como aquí se utiliza, se refiere a una composición de materia que comprende una sustancia o conjunto de sustancias obtenidas a partir de las semillas de *P. somniferum*, sustancialmente libre de sustancias y proteínas hidrosolubles (las cuales han sido/pueden ser extraídas mediante el empleo de medios acuosos, e.g., tampones, etc.), y concentrada(s) mediante el empleo de disolventes orgánicos; en una realización particular, dicho extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* comprende la fracción grasa rica en proteínas derivadas de los cuerpos lipídicos presentes en las semillas de *P. somniferum*, sustancialmente libre de

sustancias y proteínas hidrosolubles obtenidas mediante el empleo de medios acuosos, y concentrada mediante el empleo de disolventes orgánicos. Como es conocido, los cuerpos lipídicos u oleicos constituyen los compartimientos intracelulares de reserva lipídica de los organismos y, aunque sus funciones dentro del organismo son múltiples y variadas, los cuerpos lipídicos u oleicos maduros comparten una estructura simple que comprende un centro hidrofóbico constituido por una estructura de lípidos de reserva (e.g., triacilglicéridos, ésteres de colesterol, etc.), y un revestimiento en forma de monocapa fosfolipídica con múltiples proteínas asociadas, ancladas a la superficie. Algunas plantas utilizan los cuerpos lipídicos contenidos en las células de las semillas como fuente de energía para la germinación. En el Ejemplo 1 se describe la obtención de un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* y su perfil electroforético, en donde puede apreciarse una banda en el entorno de 16kDa de peso molecular relativo que se corresponde con la proteína ArgJ (implicada en la biosíntesis de arginina), una(s) banda(s) en el entorno de los 18-20 kDa de peso molecular que podrían corresponder, por peso molecular relativo, a las denominadas oleosinas, una banda en el entorno de 23 kDa de peso molecular relativo que se corresponde con una acuaporina, una banda en el entorno de 28 kDa de peso molecular relativo que se corresponde con un fitocromo, una banda en el entorno de 34 kDa de peso molecular relativo que se corresponde con una caleosina y unas bandas que rondan los 40 kDa de peso molecular relativo que se corresponderían con unas isoformas de la proteína 11S globulina.

Alternativamente, un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* puede ser obtenido mediante un procedimiento para la obtención de un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*, en adelante “procedimiento de obtención [B] de un extracto liposoluble”, que comprende las etapas de:

- q) resuspender la fase oleosa procedente de la etapa f) del procedimiento de obtención [A] de un extracto liposoluble en acetona fría, a una temperatura comprendida entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 10°C, y mantener a una temperatura comprendida entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 10°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 25 minutos; y
- r) centrifugar la suspensión resultante de la etapa q) entre aproximadamente 7.000 g y aproximadamente 10.000 g, preferentemente a alrededor de 10.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos, para obtener un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*.

El procedimiento de obtención [B] de un extracto liposoluble se basa en la precipitación de proteínas mediante la acción de la acetona. Según el procedimiento de obtención [B] de un extracto liposoluble, la fase oleosa procedente de la etapa f) del procedimiento de obtención [A] de un extracto liposoluble se suspende en acetona “fría” [etapa q)], es decir, a una temperatura comprendida entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 10°C, típicamente entre aproximadamente -10°C y aproximadamente 5°C. La relación fase oleosa:acetona puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular dicha relación está comprendida entre aproximadamente 1:2 (v/v) y aproximadamente 1:4 (v/v), típicamente alrededor de 1:2 (v/v). La suspensión resultante se deja a una temperatura comprendida entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 10°C, típicamente entre aproximadamente -10°C y aproximadamente 5°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 25 minutos, típicamente alrededor de 15 minutos aproximadamente.

Finalmente, la suspensión resultante de la etapa q) se centrifuga [etapa r)] entre aproximadamente 7.000 g y aproximadamente 10.000 g, preferentemente a alrededor de 10.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos, preferentemente entre 10 y 20 minutos aproximadamente, generalmente alrededor de 15 minutos, para obtener un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*.

Tanto el extracto hidrosoluble como el extracto liposoluble de semilla de *P. somniferum*, pueden encontrarse en forma líquida o sólida antes de su empleo. En una realización particular dichos extractos se encuentran en forma líquida, disueltos o suspendidos, en un medio adecuado tal como, por ejemplo, solución salina fisiológica, solución glicerosalina al 50%, tampón PBS, etc., preparada para su aplicación o administración al sujeto. En el caso del extracto liposoluble resulta ventajoso añadir un tensioactivo, preferentemente un polisorbato tal como por ejemplo el Tween® 20 al 1% (v/v) sobre el diluyente (e.g., solución salina fisiológica, etc.) para solubilizarlo. En otra realización particular dichos reactivos se encuentran en forma sólida, por ejemplo, en forma de un liofilizado; en este último caso, dichos extractos pueden ser liofilizados por métodos convencionales de liofilización, conocidos por los técnicos en la materia, en presencia de un agente crioprotector, tal como, por ejemplo, un sacárido, (e.g., manitol, etc.), y, antes de su aplicación o administración a un sujeto se disuelven o suspenden en un medio adecuado, tal como, por ejemplo, suero salino fisiológico, solución glicerosalina al 50%, PBS, etc., y, en caso del extracto liposoluble habría que añadirle un tensioactivo apropiado, por ejemplo, un polisorbato tal como el Tween® 20 que lo solubilice. En ambas realizaciones particulares, el pH final de los extractos es cercano al pH fisiológico, alrededor de 7,4 aproximadamente. Los extractos hidrosolubles de la invención, en forma liofilizada, constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

Aplicaciones de los extractos de la invención

De acuerdo con la presente invención, los extractos hidrosolubles proporcionados por esta invención, pueden ser utilizados en el diagnóstico de la alergia o hipersensibilidad a opiáceos o compuestos estructuralmente relacionados con dichos opiáceos.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un extracto hidrosoluble de la invención en la elaboración de un reactivo para el diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo. En una realización particular, el extracto de la invención se selecciona del grupo formado por uno de los extractos hidrosolubles de semillas de *P. somniferum* proporcionados por esta invención y combinaciones de dichos extractos.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo”, se refiere a la provocación de síntomas alérgicos de tipo inmediato, debido a la administración por cualquier vía, de uno o más opiáceos, o compuestos estructuralmente relacionados, en particular, a un sujeto sensibilizado, es decir un sujeto cuyo suero contiene anticuerpos específicos de IgE frente a un opiáceo o frente a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo. En general, la primera fase en el diagnóstico de la alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o frente a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo comprende el registro de una historia clínica de síntomas alérgicos al opiáceo, y, en una segunda fase, proceder a la realización de los ensayos confirmatorios precisos para determinar la presunta sensibilización.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “opiáceo”, se refiere a un alcaloide extraído de la vaina de la adormidera y sus homólogos sintéticos o semisintéticos que se unen a los receptores opioides, los cuales están situados principalmente en el sistema nervioso central (SNC) y en el tracto gastrointestinal. Aunque el término opiáceo es frecuentemente utilizado para referirse a todas las drogas similares al opio, resulta más apropiado limitar su alcance a los alcaloides naturales del opio, por ejemplo, morfina (opiáceo prototípico), codeína, etc., y a sus derivados semi-sintéticos, por ejemplo, heroína, oxicodona, etc., y sintéticos, por ejemplo, petidina, metadona, etc., que tienen una estructura no relacionada con los alcaloides del opio. Los opiáceos utilizan por su efecto anestésico, así como por sus efectos analgésicos y antitusivos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de opiáceos incluyen alfentanilo, buprenorfina, carfentanilo, codeína, dihidrocódigo, etorfina, fentanilo, heroína (diamorfina), hidrocodona, hidromorfona, loperamida, meperidina, metadona, morfina, oxicodona, oximorfona, petidina, pholcodina, remifentanilo, sufentanilo, tapentadol, tramadol, etc.

En una realización particular, dicho opiáceo es un opiáceo utilizado en anestesia; ejemplos ilustrativos, no limitativos de opiáceos utilizados en anestesia incluyen fentanilo, meperidina, morfina, remifentanilo, etc. En otra realización particular, dicho opiáceo es un analgésico opiáceo, por ejemplo, morfina, codeína, heroína, metadona, meperidina, fentanilo, buprenorfina, pentazocina, naloxona, naltrexona, etc. En otra realización particular, dicho opiáceo es un opiáceo utilizado como antitusivo, por ejemplo, codeína, dihidrocodeína, noscapina, dextrometorfano, dimemorfano, etc. En otra realización particular, dicho opiáceo es heroína.

Un “compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un compuesto que tiene una estructura química similar a la de un opiáceo; en una realización particular, dicho compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo es un compuesto que tiene una estructura iónica de amonio cuaternario y contiene un anillo esquelético hidrófobo y una amina terciaria hidrófila (es decir, una estructura química similar a la de la morfina); ejemplos ilustrativos de compuestos que tienen esa estructura química similar a la de la morfina incluyen los NMBAs. El término “agente bloqueante neuromuscular” o (“NMBA” o “NMBD” - del inglés “Neuromuscular Blocking Agent/Drug”), según se emplea en la presente descripción, se refiere a fármacos que bloquean la transmisión neuromuscular a nivel de la sinapsis neuromuscular, causando parálisis del músculo esquelético afectado; el bloqueo neuromuscular se usa junto con la anestesia general para inducir parálisis, con el fin de que la cirugía, especialmente la cirugía abdominal e intratorácica, transcurra con menos complicaciones. Estos NMBAs disponen, en general, de una estructura química similar a la de la morfina, a base de una estructura iónica de amonio cuaternario y contienen un anillo esquelético hidrófobo y una amina terciaria hidrófila [Fischer MM. et al., Immunoassays for the diagnosis of anaphylaxis to neuromuscular blocking drugs: the value of morphine for the detection of IgE antibodies in allergic subjects. Anaesth Intensive Care 2000; 28:167-70]. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de NMBAs incluyen atracurium, cisatracurium, doxacurium, gallamine, glicopirrolato, mivacurium, pancuronium, pipecuronium, rapacurium, rocuronium, tubocurarine, vecuronium, etc. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree que la capacidad de los extractos proporcionados por esta invención, tanto los extractos hidrosolubles como los extractos liposolubles de semillas de *P. somniferum*, para evaluar, indirectamente, la alergia o hipersensibilidad a NMBAs puede ser debida, precisamente, a que dichos NMBAs comparten estructuras químicas similares a las de algunos opiáceos.

En una realización particular, dicho compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo es un NMBA tal como ha sido definido previamente, por ejemplo, atracurium, cisatracurium, doxacurium, gallamine, glicopirrolato, mivacurium, pancuronium, pipecuronium, rapacurium, rocuronium, tubocurarine, vecuronium, etc.

Dicho reactivo para el diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo comprende un extracto de la invención. En una realización particular, debido a que las pruebas diagnósticas pueden realizarse *in vivo* en el propio sujeto, dicho reactivo comprende, además del extracto de la invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, un compuesto o combinación de compuestos compatible con el extracto de la invención y no perjudicial para el sujeto; en general, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables se elegirán en función de la forma de administración del reactivo que comprende el extracto de la invención al sujeto, por ejemplo, por vía tópica o intradérmica en las pruebas cutáneas o por otras vías, por ejemplo, en las pruebas de provocación bronquial, etc. Una revisión de las distintas formas de administración de un compuesto a un sujeto y de los distintos vehículos farmacéuticamente aceptables para su obtención puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid; y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

El extracto de la invención es especialmente útil para conocer si un sujeto padece de alergia o hipersensibilidad a opiáceos o a compuestos estructuralmente relacionados con opiáceos.

El término "sujeto" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier mamífero, incluido el ser humano. Prácticamente cualquier sujeto puede ser analizado según la presente invención para conocer si tiene alergia o hipersensibilidad a un opiáceo. No obstante, en una realización particular, dicho sujeto es un sujeto sobre el que se desea conocer si sufre de alergia o hipersensibilidad a opiáceos o a compuestos estructuralmente relacionados con opiáceos, por ejemplo, si sufre de alergia o hipersensibilidad a un opiáceo utilizado en anestesia (esta situación puede darse, por ejemplo, en caso de que dicho sujeto fuera a recibir anestesia con motivo de una intervención quirúrgica, etc.). En otra realización particular, dicho sujeto es un sujeto sospechoso de sufrir alergia o hipersensibilidad a opiáceos, en particular, a opiáceos utilizados en anestesia. En otra realización particular, dicho sujeto es un sujeto sobre el que se desea conocer si sufre de alergia o hipersensibilidad a opiáceos utilizados como analgésicos o antitusivos (esta situación puede darse, por ejemplo, en caso de que dicho sujeto fuera a recibir un medicamento analgésico o antitusivo cuya formulación incluyera un opiáceo con efectos analgésicos o antitusivos, etc.). En otra realización particular, dicho sujeto es un sujeto que ha sufrido una reacción alérgica inmediata inducida por la administración de uno o más opiáceos, por ejemplo, uno o más opiáceos utilizados como anestésico, analgésico o antitusivo, cuyas pruebas cutáneas frente a un extracto (hidrosoluble y/o liposoluble) hubieran sido positivas. En otra realización particular, dicho sujeto es un sujeto sobre el que se desea conocer si sufre de alergia o hipersensibilidad a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo, tal como un NMBA, por ejemplo, si sufre de alergia o hipersensibilidad a un NMBA utilizado en anestesia (esta situación puede darse, por ejemplo, en caso de que dicho sujeto fuera a recibir anestesia con motivo de una intervención quirúrgica, etc.). En otra realización particular, dicho sujeto es un sujeto que ha sufrido una reacción alérgica inmediata inducida por la administración de uno o más NMBAs, por ejemplo, uno o más NMBAs utilizados en anestesia, cuyas pruebas cutáneas frente a un extracto (hidrosoluble y/o liposoluble) hubieran sido positivas. En una realización particular, dicha reacción alérgica puede incluir una reacción de anafilaxis caracterizada por la presencia de varios de los siguientes síntomas: prurito sistémico, urticaria maculopapular en distintos lugares del cuerpo y asociada o no con la presencia de angioedema, disfonía, dificultad respiratoria, calambres abdominales asociados o no con un cuadro de hipotensión, etc. En cualquier caso, el especialista puede valorar las distintas reacciones observadas y, de acuerdo con su criterio, encargar la realización de un ensayo alergológico para confirmar (o descartar) la sospecha de una posible alergia o hipersensibilidad a dichos opiáceos o compuestos estructuralmente relacionados con los mismos (por ejemplo, NMBAs).

En una realización particular, el diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a opiáceos o a compuestos estructuralmente relacionados con opiáceos se lleva a cabo mediante un estudio alergológico que comprende la realización de pruebas diagnósticas *in vivo*, en un sujeto. Ejemplos ilustrativos de dichas pruebas diagnósticas *in vivo* incluyen las pruebas cutáneas, tales como las pruebas intraepidérmicas o "SPT" (del inglés "skin prick tests"), también conocidas como "Prick test", y las pruebas intradérmicas (ID), que constituyen los principales métodos de diagnóstico utilizados para confirmar las sospechas clínicas de reacciones alérgicas, así como las pruebas de provocación, por ejemplo, las pruebas de provocación bronquial, nasal u oftálmica.

Las pruebas cutáneas (SPT e ID) se realizan mediante protocolos convencionales. Brevemente, un reactivo que comprende el extracto de la invención, normalmente en forma de solución o suspensión, se aplica o administra al sujeto en estudio. La concentración del extracto de la invención en el reactivo puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo, entre otros factores, de la sensibilidad del sujeto a dichos opiáceos, en una realización particular, la concentración del extracto de la invención, expresada en unidad de masa (proteína), en mg, por unidad de volumen, en ml, a usar en las pruebas cutáneas está comprendida entre 0,01 y 10 mg/ml aproximadamente, generalmente entre 0,05 y 5 mg/ml; en una realización particular, se preparó una batería de extractos con concentraciones de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,05 mg/ml de proteína para cada fracción. En una realización particular, se considera que una prueba SPT o "Prick Test" es positiva cuando el diámetro mayor de la pápula obtenida al aplicar el reactivo que comprende el extracto de la invención al sujeto y una vez transcurrido el tiempo de lectura (por ejemplo, 20 minutos), es igual o superior a 3 mm y la respuesta al control negativo (por ejemplo, diluyente o solución glicerosalina al 50%) es negativa; asimismo, en otra realización particular, una prueba ID se considera positiva cuando la diferencia entre el tamaño de la pápula a los 20 minutos de la aplicación del reactivo

que comprende el extracto de la invención y el tamaño de la pábula nada más aplicarle dicho extracto es igual o superior a 3 mm.

5 En otra realización particular, el diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a opiáceos o a compuestos estructuralmente relacionados con opiáceos se lleva a cabo mediante un estudio alergológico que comprende la realización de pruebas diagnósticas *in vitro*. Ejemplos ilustrativos de dichas pruebas diagnósticas *in vitro* incluyen métodos para determinar y cuantificar IgE específica en suero.

10 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo, que comprende:

- a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto susceptible de contener anticuerpos con un extracto de la invención; y
- 15 b) analizar si se ha producido una interacción entre una IgE específica frente a dicho opiáceo eventualmente presente en dicha muestra biológica susceptible de contener anticuerpos y el extracto de la invención y; en donde una interacción entre dicha IgE específica frente a dicho opiáceo o compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo y el extracto de la invención es indicativa de que dicho sujeto padece alergia o hipersensibilidad a dicho opiáceo o compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo.

20 En general, este tipo de métodos permite determinar la capacidad de fijación de una IgE específica frente a un opiáceo o frente a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo a un extracto de la invención, en concreto a uno o más componentes alergénicos (e.g., proteínas) del extracto de la invención.

25 Por “muestra biológica susceptible de contener anticuerpos” se entiende cualquier muestra biológica susceptible de contener anticuerpos que puede ser obtenida de un sujeto; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicha muestra biológica incluyen muestras de biopsia, tejidos, células o fluidos, por ejemplo, sangre, leche, plasma, saliva, suero, etc. En una realización particular, dicha muestra biológica se selecciona entre sangre, plasma o suero, preferentemente, suero.

30 “IgE”, según se emplea en la presente descripción, se refiere a la inmunoglobulina E, un anticuerpo implicado en alergia especialmente en la hipersensibilidad de tipo I, de manera que el reconocimiento de este anticuerpo por los mastocitos produce su desgranulación.

35 En una realización particular, dicho método *in vitro* para diagnosticar si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo, en particular, un opiáceo utilizado en anestesia, o un NMBA, se lleva a cabo mediante un inmunoensayo.

40 Por “inmunoensayo”, tal como aquí se utiliza, se incluyen diversas técnicas inmunológicas tales como ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, Western-blot o dot-blot, RIA (radioinmunoensayo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, etc.

45 En una realización particular, dicho inmunoensayo es un inmunoblot o “Western blot”. Esta técnica se basa en la detección de proteínas previamente separadas por electroforesis en un gel, en condiciones desnaturalizantes e inmovilizadas en una membrana que posteriormente se incuba con uno o más anticuerpos específicos para la proteína y se detecta mediante un sistema, por ejemplo, quimioluminiscente o fluorescente. El análisis por inmunofluorescencia requiere el uso de un anticuerpo específico marcado con un compuesto fluorescente.

50 En otra realización particular, dicho inmunoensayo es un “Dot Blot”, que comienza con la aplicación directa de la muestra (a través de un dispositivo que configura dicho depósito en un pocillo) en una membrana. Los pasos posteriores son iguales: incubación de la membrana con un suero y posterior marcaje y revelado.

55 En otra realización particular adicional, el inmunoensayo es un inmunoensayo enzimático (EIA), también conocido como ELISA. Esta técnica se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con enzimas, de manera que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado resulte en la formación de complejos enzimáticamente activos. Debido a que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo marcado) están inmovilizados en un soporte, los complejos anticuerpo-antígeno están inmovilizados en el soporte y por tanto, pueden ser detectados por la adición de un sustrato que es convertido por la enzima en un producto que es detectable, por ejemplo, por espectrofotometría o fluorometría.

60 Existen comercialmente disponibles kits y sistemas para la determinación de IgE específica [ImmunoCAP®], un ensayo de inmunocaptura enzimática fluorimétrico (FEIA) en el que el soporte es un disco de celulosa sobre el que se acoplan los antígenos a ensayar.

65 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante kit de la invención, que comprende un extracto de la invención. En una realización particular, dicho extracto de la invención está en forma de una composición que comprende, además de dicho extracto de la invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización

concreta, dicha composición está en forma de una solución o suspensión en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina, etc. En otra realización particular, el extracto de la invención se encuentra en forma de un liofilizado y el kit proporcionado por esta invención contiene, si se desea, un medio para reconstituir el liofilizado. En otra realización particular, dicho extracto de la invención está fijado a un soporte. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos soportes, incluyen columnas, filtros, plásticos, portaobjetos de vidrio, silicona, micropocillos, membranas de nitrocelulosa o PVDF, microbolas magnéticas, tiras de reconocimiento antígeno-anticuerpo, etc.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit de la invención para diagnosticar si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo, en particular, un opiáceo utilizado en anestesia, o un agente bloqueante neuromuscular.

La invención se ilustra a continuación en base a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Obtención de extractos hidrosolubles y liposolubles de semillas de *P. somniferum*

Para la obtención de los extractos hidrosolubles y liposolubles de semillas de *P. somniferum*, semillas de *P. somniferum* fueron adecuadamente clasificadas y certificadas, así como estandarizadas en lo relativo a su pureza (superior al 99%), y, posteriormente, fueron sometidas a procesos de extracción.

Las semillas de *P. somniferum* se pesaron, trituraron y suspendieron a razón de 0,25 g/ml en tampón fosfato salino (PBS) [NaCl 1,37 mM, KH₂PO₄ 14,7 mM, Na₂HPO₄ 78,1 mM, KCl 26,8 mM] pH 7,4 y glicerol al 25% (v/v). A continuación, se homogenizaron mediante el empleo de un mortero y un pistilo, en frío (5 ± 3°C) y se mantuvo la homogeneización de las semillas hasta que se liberó la mayor cantidad posible de su contenido. El homogenizado se mantuvo en agitación magnética durante 30 minutos en frío (5 ± 3°C). A continuación, se tamizó la muestra para separar los restos de semillas y se centrifugó el extracto a 10.000 g durante 15 minutos, en frío (5 ± 3°C), tras los cuales se separó el contenido graso (fracción liposoluble) del contenido no graso (fracción hidrosoluble). Dichas fracciones fueron tratadas independientemente para obtener el extracto hidrosoluble y el extracto liposoluble de *P. somniferum*.

Obtención del extracto hidrosoluble

Procedimiento [1]

Para la obtención del extracto hidrosoluble, la fracción hidrosoluble procedente de la centrifugación anterior se filtró a través de filtro de fibra de vidrio (Millipore®) de la serie AP, tipo AP 20, que comprende un prefiltro de fibra de vidrio y una membrana de 0,8 a 8 µm [membrana AP 2009000 (Millipore®)], y se dializó frente a agua desionizada con membranas de corte molecular de 3.500 Da [Visking (Iberlabo)] durante 16 horas en frío (5 ± 3°C). Finalmente, el extracto hidrosoluble dializado se liofilizó.

Procedimiento [2]

Alternativamente, el extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* puede obtenerse homogeneizando las semillas de *P. somniferum*, trituradas previamente, y desengrasándolas con acetona en una relación semillas:acetona de 2:1 (p/v) durante 1 hora en frío (5 ± 3°C). Después de secar la muestra mediante la retirada de la fracción orgánica, compuesta por acetona y sustancias solubles en acetona, por filtración de la mezcla, se extrajo la fracción proteica suspendiendo la muestra (que contenía los restos de semillas y sustancias insolubles en acetona) en 0,1 mol/l de Tris-HCl pH 7,5, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM, en una relación muestra:(Tris-HCl + EDTA) de 1:5 (p/v), durante 1 hora a 5 ± 3°C. A continuación, se centrifugó a 9.000 g durante 30 minutos a 5 ± 3°C. El sobrenadante se filtró a través de membranas AP 2009000 (Millipore®), y se dializó frente a agua desionizada con membranas de corte molecular de 3.500 Da [Visking (Iberlabo)] durante 16 horas en frío (5 ± 3°C). El extracto hidrosoluble dializado se liofilizó.

Obtención del extracto liposoluble

Procedimiento [A]

Para la obtención del extracto liposoluble (contenido graso), la fracción liposoluble procedente de la primera centrifugación se resuspendió en PBS pH 7,4 y glicerol al 50%, en frío (5±3°C), y, a continuación, se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos. Este proceso se realizó dos veces. Tras los lavados con tampón y glicerol se realizó un lavado adicional de la fase oleosa con tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6. El precipitado, que contenía el extracto liposoluble, se resuspendió en una mezcla cloroformo:metanol, en una relación 2:1 (v/v), y, a continuación, se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos. Se recogió la fracción orgánica a la que se le añadió acetona fría (5±3°C) en una relación fracción orgánica:acetona de 1:2 (v/v) y se dejó durante 15 minutos a -20°C para, a continuación,

centrifugar la muestra a 10.000 g durante 15 minutos. Las proteínas precipitadas procedentes de los cuerpos lipídicos (fracción liposoluble) se estabilizan en frío (-20°C).

Procedimiento [B]

5 Alternativamente, dicho contenido graso se puede resuspender directamente en acetona fría sin pasar por cloroformo/metanol y someter la suspensión a la misma acción de reposo a -20°C y centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos. Las proteínas precipitadas procedentes de los cuerpos lipídicos (fracción liposoluble) se estabilizan en frío (-20°C).

10 Los extractos hidrosoluble y liposoluble de semillas de *P. somniferum* previamente obtenidos fueron estandarizados a una concentración de 10 y 0,1 mg/ml (expresada en masa seca liofilizada).

Perfil electroforético de los extractos hidrosoluble y liposoluble de semillas de *P. somniferum*

15 Con el fin de separar las proteínas presentes en los extractos hidrosoluble y liposoluble de semillas de *P. somniferum* previamente obtenidos, dichos extractos se sometieron a una electroforesis en gel de poli(acrilamida) (15%) con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie [Proc Natl Acad Sci USA. 1974; 76:4350-4]. Adicionalmente, los extractos liposolubles de semillas de *P. somniferum* previamente obtenidos fueron sometidos a una electroforesis bidimensional, en concreto a una electroforesis en gel de poli(acrilamida) (15%) con dodecilsulfato sódico bidimensional (2D-SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie. Brevemente, las proteínas que forman parte del extracto liposoluble se cargaron sobre unas tiras de gradiente de pH de 3 a 10 (IPG) (ReadyStrips, BioRad, California, USA) para la primera dimensión (isoelectroenfoque) y se fueron situando en función de su punto isoelectroenfoque (pI) por isoelectroenfoque de acuerdo a las instrucciones del fabricante del aparato. A continuación, las tiras se incubaron, en primer lugar, con tampón de equilibrado, y, en segundo lugar, con el mismo tampón al que se le añadió iodacetamida. Las tiras, una vez equilibradas, se introdujeron en un gel de poli(acrilamida) al 15% para su separación en la segunda dimensión (SDS-PAGE). Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250). Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 1 y 2.

25 La Figura 1 muestra los perfiles electroforéticos de los extractos (i) hidrosoluble - obtenido según el procedimiento [1] (calle 1), y (ii) liposoluble - obtenido según el procedimiento [A] (calle 2), de semillas de *P. somniferum* obtenidos, determinados mediante SDS-PAGE 15% y tinción con azul de Coomassie. En el extracto hidrosoluble merece la pena destacar la existencia de una banda de alrededor de 52 kDa que podría ser similar a la identificada por Moneo y col. [Moneo I. et al., Occupational asthma caused by Papaver somniferum. Allergol Immunopathol 1993; 21(4):145-8] y que podría corresponder a una proteína mayoritaria, así como las bandas de alrededor de 20 kDa y 32 kDa [estas bandas aparecen como importantes fijadoras de IgE específica en los sueros de los 6 pacientes analizados (Figura 3)]. Respecto al extracto liposoluble, merece la pena destacar una banda en el entorno de 16kDa de peso molecular relativo que se corresponde con la proteína ArgJ (implicada en la biosíntesis de arginina), una(s) banda(s) en el entorno de los 18-20 kDa de peso molecular relativo que podrían corresponder (por peso molecular relativo) con las denominadas oleosinas, una banda en el entorno de 23 kDa de peso molecular relativo que se corresponde con una acuaporina, una banda en el entorno de 28 kDa de peso molecular relativo que se corresponde con un fitocromo, una banda en el entorno de 34 kDa de peso molecular relativo que se corresponde con una caleosina y unas bandas que rondan los 40 kDa de peso molecular relativo que se corresponderían con unas isoformas de la proteína 11S globulina.

45 La Figura 2 muestra el perfil electroforético del extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido según el procedimiento [A], determinado mediante SDS-PAGE 15% monodimensional (1D – Electroforesis) [Figura 2, panel derecho, calle 1) y mediante electroforesis bidimensional [2D-SDS-PAGE 15%] (Figura 2, panel izquierdo – 2D Electroforesis) y tinción, en ambos casos, con azul de Coomassie. La Figura 4 muestra el perfil alergénico del extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido según el procedimiento [A], determinado mediante SDS-PAGE 15% bidimensional [2D-SDS-PAGE 15%] (Figura 4, panel izquierdo – 2D Electroforesis - Blotting) y tinción con azul de Coomassie e IgE inmunoblotting.

EJEMPLO 2

55 Pruebas diagnósticas de alergia a opiáceos mediante el empleo de los extractos hidrosolubles y liposolubles de semillas de *P. somniferum*

1. Materiales y Métodos

1.1 Sujetos

60 Se evaluó la hipersensibilidad alérgica mediada por Inmunoglobulina E (IgE) en 6 sujetos que habían sufrido una anafilaxis durante la anestesia. En general, la anestesia administrada a dichos pacientes incluía besilato de atracurio o bromuro de rocuronio, fentanilo o morfina, tiopental y midazolam, y, para la reversión, atropina y naloxona. Los pacientes fueron reclutados en base a un historial médico y, en ocasiones, a una serie de pruebas diagnósticas con derivados morfínicos.

65

Los sujetos participantes fueron seleccionados y evaluados por la Unidad de Alergia del Hospital Universitario Río Hortega (Valladolid, España). Todos los sujetos participantes en este estudio dieron sus consentimientos informados, a excepción de uno de ellos que falleció durante la anestesia en una intervención quirúrgica y que precisamente era consumidor de opiáceos, analgésicos y heroína. El paciente falleció tras la administración de atracurio a los 10 minutos del inicio de la intervención por un cuadro de shock anafiláctico. Se objetivó eritema, habones e hipotensión que no se pudo controlar. Este paciente no había dado consentimiento para pruebas, de hecho la IgE se analizó en suero del paciente ya cadáver. Tenía una triptasa sérica elevada. El estudio contó con la aprobación del CEIC [Comité de Ensayos e Investigaciones Clínicas] del Hospital.

1.2 Extractos y controles

Se utilizaron los siguientes extractos de semillas de *P. somniferum*:

- a) extracto hidrosoluble obtenido según el procedimiento [1] del Ejemplo 1 y extracto hidrosoluble obtenido según el procedimiento [2] del Ejemplo 1;
- b) extracto liposoluble obtenido según el procedimiento [A] del Ejemplo 1; y
- c) mezcla de extractos hidrosoluble [a)] y liposoluble [b)].

Dichos extractos fueron estandarizados a una concentración de 10 y 0,1 mg/ml (expresada en cantidad de proteína).

Como controles se emplearon morfina (cloruro mórfico) y pholcodine.

1.3 Pruebas diagnósticas *in vivo*

Los extractos hidrosoluble y liposoluble de semillas de *P. somniferum* previamente mencionados fueron empleados en:

- pruebas cutáneas ("Prick Test"), a una concentración de 5 mg/ml; las concentraciones aplicadas fueron de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,05 mg/ml (expresada en cantidad de proteína); y
- pruebas de provocación bronquial conforme a protocolos convencionales [Agius R. Opiate inhalation and occupational asthma. BMJ 1988;297(6662):1511-2] a una concentración de 5 mg/ml; las concentraciones aplicadas fueron de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,05 mg/ml (expresada en cantidad de proteína).

Como controles se utilizaron soluciones de morfina (cloruro mórfico) y pholcodine a una concentración de 1 mg/ml en pruebas cutáneas ("Prick Test").

1.4 Pruebas diagnósticas *in vitro*

1.4.1 Determinación de IgE total en suero

Muestras de suero de cada paciente fueron sometidas a determinación de IgE total mediante un ELISA. Para ello, brevemente, se recubrieron los micropocillos ELISA con anticuerpos monoclonales frente a IgE humana y, a continuación, se añadió el suero de los pacientes, con lo que, en caso de que dicho suero contenga IgE, se forma un complejo entre el anticuerpo monoclonal anti-IgE humana inmovilizado y la IgE eventualmente presente en el suero de los pacientes, que es reconocido por un anticuerpo anti-IgE humana de un animal (e.g., cabra) marcado con una enzima (e.g., peroxidasa); tras la adición del sustrato (e.g., 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) cuando la enzima es peroxidasa) se genera una reacción coloreada. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de IgE presente en la muestra (suero) analizada.

Alternativamente, la cuantificación total de la IgE puede realizarse utilizando el kit ImmunoCAP Total IgE (Phadia) en el que para la determinación de la IgE total se une anticuerpo anti-IgE monoclonal, en lugar del alérgeno, al sistema. El ensayo comienza haciendo un lavado del sistema, que contiene el anticuerpo contra IgE. A continuación, el aparato dispensa cada uno de los sueros problema, los estándares y los controles. Esta fase de reacción antígeno/anticuerpo se incuba durante 30 minutos. El anticuerpo anti-IgE unido covalentemente al sistema ImmunoCAP reacciona con la IgE total del suero del paciente. Tras lavar, se añade un anticuerpo anti-IgE marcado con una enzima (beta-galactosidasa) y se incuba el complejo anti-IgE [muestra problema] + IgE + anticuerpo anti-IgE marcado con enzima. Finalmente se lava y se añade una solución de revelado (4-metil-umbeliferil beta-D galactosidasa). Tras parar la reacción, se añade una sustancia reductora que libera la enzima y reacciona con un sustrato cromógeno para formar un compuesto coloreado. La fluorescencia es medida por un fluorímetro, que sitúa los valores obtenidos en cada suero problema sobre la curva de calibración expresando los resultados en kU/l. El cambio de coloración de la muestra problema es directamente proporcional a la cantidad de IgE presente en el suero del paciente. El rango de medida del sistema es de 2 a 5.000 kU/l.

1.4.2 Determinación de IgE específica en suero

Muestras de suero de cada paciente fueron sometidas a determinación de IgE específica, frente al extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido según el procedimiento [1] del Ejemplo 1, así como frente a las soluciones control de morfina (cloruro mórfico) y pholcodine, utilizando el sistema ImmunoCAP® specific IgE (Phadia, Suecia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, dicho extracto se puso en contacto con la fase sólida del sistema ImmunoCAP® con el fin de fijar los alérgenos presentes en dichos extractos (e.g., proteínas)

y, a continuación, se añadieron los sueros de los pacientes, con lo que se forma un complejo entre el alérgeno inmovilizado y la IgE humana específica presente en los sueros de los pacientes, que es reconocido por un anticuerpo anti-IgE humana marcado con una enzima (beta-galactosidasa), contenido en el kit ImmunoCAP® utilizado; tras la incubación, el anticuerpo anti-IgE humana marcado no unido se elimina y la mezcla de unión se incubaba con un agente de revelado (4-metil-umbeliferil beta-D galactosidasa), y, tras detener la reacción se mide la fluorescencia del eluido de manera que, cuanto más elevada sea, más IgE específica habrá en la muestra analizada.

1.4.3 SDS-PAGE e inmunoblotting IgE

Asimismo, muestras de suero de los pacientes fueron sometidas a técnicas electroforéticas y de fijación de IgE específica sobre los componentes separados por tamaño molecular de los extractos hidrosoluble y liposoluble de semillas de *P. somniferum* (SDS-PAGE e inmunoblotting IgE). La separación de las proteínas de dichos extractos se realizó mediante SDS-PAGE tal como se describe en el Ejemplo 1.

Brevemente, una vez separadas las proteínas y transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), el ensayo se realiza como se describe en el apartado 1.4.4, es decir, añadiendo los sueros a ensayar, con lo que se forma un complejo entre el alérgeno (e.g., proteína) inmovilizado y la IgE humana específica presente en los sueros de los pacientes, que es reconocido por un anticuerpo anti-IgE humana marcado con una enzima, en concreto, anticuerpos de ratón anti-IgE humana marcados con peroxidasa de rábano picante (Mouse Anti-Human IgE (Fc)-HRP (Clon B3102E8) - Southern Biotech), diluidos en una proporción 1:1000 con tampón de bloqueo. Tras la incubación, el anticuerpo anti-IgE humana marcado no unido se elimina y la mezcla de unión se incubaba con un agente de revelado, en concreto, Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer), un producto quimioluminiscente que contiene Luminol y un reactivo oxidante.

1.4.4 Dot blot

Esta técnica se basa en la detección de proteínas previamente acopladas en una membrana, a través de un dispositivo que configura dicho depósito en un pocillo que posteriormente se incubaba, con uno o más anticuerpos específicos para la proteína y se detecta mediante un sistema, por ejemplo, quimioluminiscente o fluorescente. El análisis por inmunofluorescencia o quimioluminiscencia requiere el uso de un anticuerpo específico marcado con un compuesto fluorescente o quimioluminiscente (Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets; procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1974; 76:4350-4).

Ensayo 1

En este ensayo se analizaron: (i) sueros de los 6 pacientes alérgicos a derivados morfínicos (opiáceos positivos), y (ii) sueros procedentes de pacientes no alérgicos a derivados morfínicos (opiáceos negativos) [sueros de pacientes con alergia a pólenes, cuya clínica respondía a una sintomatología originada por dichos pólenes; sin sospecha por tanto de alergia a derivados opiáceos (se hizo un pool con 12 sueros)]. Asimismo, como controles negativos, se pusieron sueros de niños prematuros, sueros de recién nacidos y tampón PBS. Todo a diluciones 1:1 en tampón de bloqueo [PBS-Tween® 20 al 0,5% (Panreac)].

Brevemente, las muestras utilizadas fueron proteínas procedentes del extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido según el procedimiento [1] del Ejemplo 1 y proteínas procedentes del extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido según el procedimiento [A] del Ejemplo 1. Dichas muestras se depositaron sobre el pocillo del dispositivo a razón de 100 ng y 10 ng (cantidad de proteína). A continuación se añadieron los sueros a ensayar, con lo que se forma un complejo entre el alérgeno (e.g., proteína) inmovilizado y la IgE humana específica presente en los sueros de los pacientes, que es reconocido por un anticuerpo anti-IgE humana marcado con una enzima, en concreto, anticuerpos de ratón anti-IgE humana marcados con peroxidasa de rábano picante (Mouse Anti-Human IgE (Fc)-HRP (Clon B3102E8) - Southern Biotech), diluidos en una proporción 1:1000 con tampón de bloqueo. Tras la incubación, el anticuerpo anti-IgE humana marcado no unido se elimina y la mezcla de unión se incubaba con un agente de revelado, en concreto, Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer), un producto quimioluminiscente que contiene Luminol y un reactivo oxidante. Tras detener la reacción se mide la quimioluminiscencia del eluido de manera que, cuanto más elevada sea, más IgE específica habrá en la muestra analizada.

Ensayo 2

Se realizó otro ensayo mediante la misma técnica (dot blot) y utilizando las mismas muestras que en el Ensayo 1, a excepción de que, en este Ensayo 2:

- las muestras se depositaron sobre el pocillo del dispositivo a una concentración de 1000 ng, 100 ng, 10 ng, y 1 ng de cantidad de proteína por pocillo; y
- los sueros a ensayar fueron: (i) suero de un paciente con reacción alérgica severa por aplicación de Atracurio (diluido a 1:4 en el tampón de bloqueo (PBS Tween 0,5%)); y (ii) mezcla de sueros de 4 pacientes con reacción clínica grave por aplicación de anestésicos: fentanilo, alfentanilo, morfina, propofol, droperidol, timental y/o ketamina (diluidos a 1:4 en el tampón de bloqueo (PBS Tween 0,5%)). Como control se utilizó PBS.

2. Resultados

2.1 Pruebas diagnósticas *in vivo*

5 Cinco de los pacientes presentaron pruebas cutáneas positivas y de provocación bronquial positivas a uno o ambos extractos (hidrosoluble y liposoluble) de semillas de *P. somniferum*. El sexto paciente seleccionado falleció durante la anestesia en una intervención quirúrgica y no pudo ser analizado.

2.2 Pruebas diagnósticas *in vitro*

10 Determinación de IgE total en suero (ELISA)

Los resultados obtenidos mediante el ensayo ELISA para la determinación de IgE total en suero pusieron de manifiesto que las muestras de los 6 pacientes analizados tenían altos títulos de IgE total.

15 Determinación de IgE específica en suero (ImmunoCAP®)

Los resultados obtenidos mediante el ensayo para la determinación de IgE específica en suero (ImmunoCAP® specific IgE) pusieron de manifiesto que las muestras de suero de los 6 pacientes ensayados fueron claramente positivas (IgE específica) frente al extracto hidrosoluble de las semillas de *P. somniferum*, y, sin embargo, en ninguno de los sueros analizados se detectó la presencia de IgE específica frente a morfina o pholcodine.

SDS-PAGE e inmunoblotting IgE

25 Adicionalmente, las muestras de suero de los 6 pacientes fueron enfrentadas, mediante técnicas de inmunoblotting, a las fracciones proteicas de los extractos hidrosoluble y liposoluble de semillas de *P. somniferum*, previamente separadas por su tamaño molecular mediante SDS-PAGE (Ejemplo 1). Los sueros de los seis sujetos seleccionados reconocieron varias de las proteínas de los extractos hidrosoluble y liposoluble (Figuras 3 y 4).

30 Reconocimiento de los extractos por IgE específica (Dot blot)

Los resultados obtenidos mediante el Ensayo 1 (Dot Blot), pusieron de manifiesto que tanto el extracto hidrosoluble como el liposoluble de semillas de *P. somniferum*, a las concentraciones ensayadas, es decir, las proteínas alérgicas presentes en dichos extractos, son reconocidos por IgE específica en el grupo de pacientes opiáceos positivos [Figura 5].

35 Asimismo, los resultados obtenidos mediante el Ensayo 2 (Dot Blot), pusieron de manifiesto que el extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum*, a igualdad de cantidad de proteína, está siendo más reconocido (con mayor intensidad) que el extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* [Figura 6].

40

EJEMPLO 3

45 Pruebas diagnósticas de alergia frente a NMBA mediante el empleo de los extractos hidrosolubles y liposolubles de semillas de *P. somniferum*

1. Materiales y Métodos

1.1 Sujetos

50 Se evaluó la hipersensibilidad a fármacos utilizados en anestesia de un joven sano que desarrolló un cuadro de anafilaxia casi mortal durante una operación de apendicitis. El paciente sufrió una parada cardiorrespiratoria tras administración del NMBA rocuronio (relajante muscular). El paciente presentaba anticuerpos específicos frente a semilla de adormidera y frente a carne de pollo, aunque el paciente negó ingesta de pollo, y, además, estaba en ayunas.

55

1.2 Extractos y controles

Se utilizaron los siguientes extractos de semillas de *P. somniferum*:

60 a) extracto hidrosoluble obtenido según el procedimiento [1] del Ejemplo 1 y extracto hidrosoluble obtenido según el procedimiento [2] del Ejemplo 1; y

b) extracto liposoluble obtenido según el procedimiento [A] del Ejemplo 1.

Dichos extractos fueron estandarizados a una concentración de 10 y 0,1 mg/ml (expresada en cantidad de proteína). Como controles se emplearon morfina (cloruro mórfico) y pholcodine.

65

1.3 Pruebas diagnósticas *in vivo*

Los extractos hidrosoluble y liposoluble de semillas de *P. somniferum* previamente mencionados fueron empleados en pruebas cutáneas ("Prick Test"), a una concentración de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,05 mg/ml (expresada en cantidad de proteína).

5 Como controles se utilizaron soluciones de morfina (cloruro mórfico) y pholcodine a una concentración de 1 mg/ml en pruebas cutáneas ("Prick Test").

2. Resultados

10 El paciente presentó pruebas cutáneas positivas tanto frente al extracto hidrosoluble (24 mm²) como frente al extracto liposoluble (52 mm²) de semillas de *P. somniferum*.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la obtención de un extracto hidrosoluble de semillas de *Papaver somniferum*, que comprende las etapas de:
 - 5 a) suspender semillas de *P. somniferum* en un medio que comprende un tampón con un pH comprendido entre 6 y 9, y glicerol;
 - b) someter las semillas de *P. somniferum* contenidas en la suspensión obtenida en la etapa a) a un tratamiento de homogeneización, a una temperatura comprendida entre 0°C y 10°C, para obtener un homogeneizado de semillas de *P. somniferum* que comprende (i) una fase sólida que comprende
10 restos celulares de semillas de *P. somniferum* y (ii) una fase líquida que comprende las sustancias contenidas en dichas semillas;
 - c) someter el homogeneizado obtenido en la etapa b) a agitación a una temperatura comprendida entre 0°C y 10°C;
 - d) separar las fases sólida y líquida del homogeneizado resultante de la etapa c);
 - 15 e) centrifugar la fase líquida obtenida en la etapa d) entre 7.000 y 13.000 g durante un periodo de tiempo suficiente como para separar una fase acuosa líquida que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* y una fase oleosa sólida o semisólida que comprende un extracto liposoluble de semillas de *P. somniferum* formado por las sustancias contenidas en las semillas de *P. somniferum* que no son solubles en medio acuoso;
 - 20 f) separar la fase acuosa que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenida en la etapa e);
 - g) filtrar dicha fase acuosa que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* separada en la etapa f) a través de un filtro con un tamaño de poro comprendido entre 0,8 micrómetros (μm) y 8 μm para obtener un filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*; y
 - 25 h) someter dicho filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* a diálisis frente a agua desionizada con membranas de corte molecular comprendido entre 3.500 Da y 7.000 Da, a una temperatura comprendida entre 0°C y 10°C, para obtener un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*.
- 30 2. Un procedimiento para la obtención de un extracto hidrosoluble de semillas de *Papaver somniferum*, que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto semillas de *P. somniferum* con un disolvente orgánico polar aprótico, a una
35 temperatura comprendida entre 0°C y 10°C, para obtener un homogeneizado de semillas de *P. somniferum* que comprende una fase sólida que comprende restos insolubles de semillas de *P. somniferum* y una fase líquida que comprende dicho disolvente orgánico polar aprótico y sustancias procedentes de dichas semillas solubles en dicho disolvente orgánico polar aprótico;
 - b) separar dicha fase líquida generada en la etapa a) bajo condiciones que permiten dejar la fase sólida de la etapa a) sustancialmente libre de dicha fase líquida;
 - 40 c) poner en contacto dicha fase sólida de la etapa b) sustancialmente libre de fase líquida con un medio que comprende (i) un tampón con un pH comprendido entre 6 y 9 y (ii) un agente quelante, a una temperatura comprendida entre 0°C y 10°C, para extraer la fracción hidrosoluble de las semillas de *P. somniferum* y generar una suspensión que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*;
 - 45 d) centrifugar la suspensión obtenida en la etapa c) entre 6.000 g y 12.000 g, durante un periodo de tiempo comprendido entre 15 minutos y 2 horas, a una temperatura comprendida entre 0°C y 10°C, y separar el sobrenadante que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*;
 - e) filtrar el sobrenadante de la etapa d) que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* a través de un filtro con un tamaño de poro comprendido entre 0,8 μm y 8 μm para
50 obtener un filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*; y
 - f) someter dicho filtrado que comprende un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenido en la etapa e) a diálisis frente a agua desionizada con membranas de corte molecular comprendido entre 3.500 Da y 7.000 Da, a una temperatura comprendida entre 0°C y 10°C, para obtener un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum*.
- 55 3. Un extracto hidrosoluble de semillas de *Papaver somniferum* obtenible según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Empleo de un extracto según la reivindicación 3 en la elaboración de un reactivo para el diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo.
- 60 5. Empleo según la reivindicación 4, en el que dicho opiáceo es un opiáceo utilizado en anestesia.
6. Empleo según la reivindicación 4, en el que dicho opiáceo es heroína.

7. Empleo según la reivindicación 4, en el que dicho compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo es un agente bloqueante neuromuscular (NMBA).
- 5 8. Empleo según la reivindicación 4, en el que dicho extracto se selecciona del grupo formado por un extracto hidrosoluble de semillas de *P. somniferum* obtenible según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y combinaciones de dichos extractos.
9. Un método *in vitro* para diagnosticar si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo, que comprende:
- 10 a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto susceptible de contener anticuerpos con un extracto según la reivindicación 3; y
- b) analizar si se ha producido una interacción entre una IgE específica frente a dicho opiáceo o compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo eventualmente presente en dicha muestra biológica susceptible de contener anticuerpos y dicho extracto;
- 15 en donde una interacción entre dicha IgE específica frente a dicho opiáceo y dicho extracto es indicativa de que dicho sujeto padece alergia o hipersensibilidad a dicho opiáceo.
10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha muestra biológica susceptible de contener anticuerpos es una muestra de sangre o una muestra de suero.
- 20 11. Un kit que comprende un extracto según la reivindicación 3.
12. Uso de un kit según la reivindicación 11, para diagnosticar si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a un opiáceo o a un compuesto estructuralmente relacionado con un opiáceo.
- 25 13. Uso de un kit según la reivindicación 12, para diagnosticar si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a un opiáceo utilizado en anestesia, o a un agente bloqueante neuromuscular (NMBA).

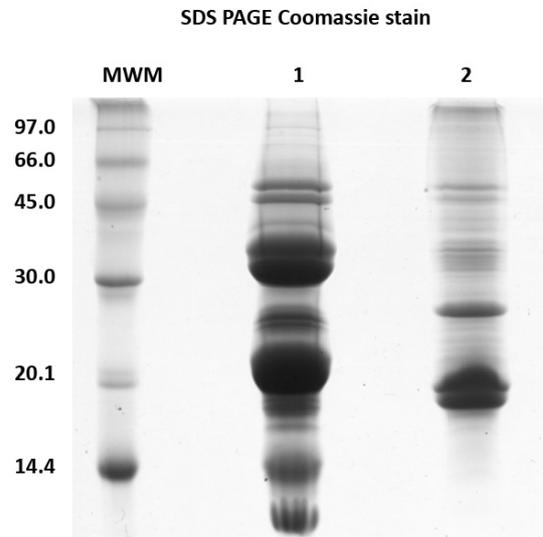


Fig. 1

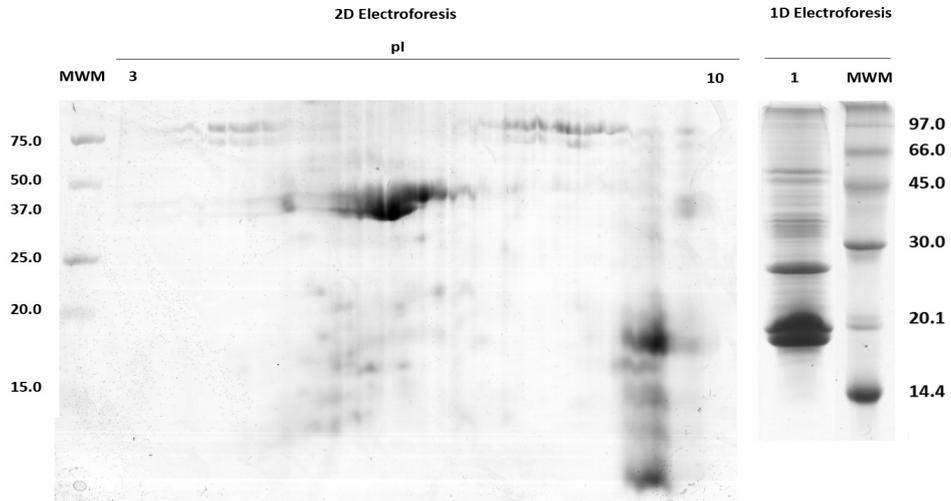


Fig. 2

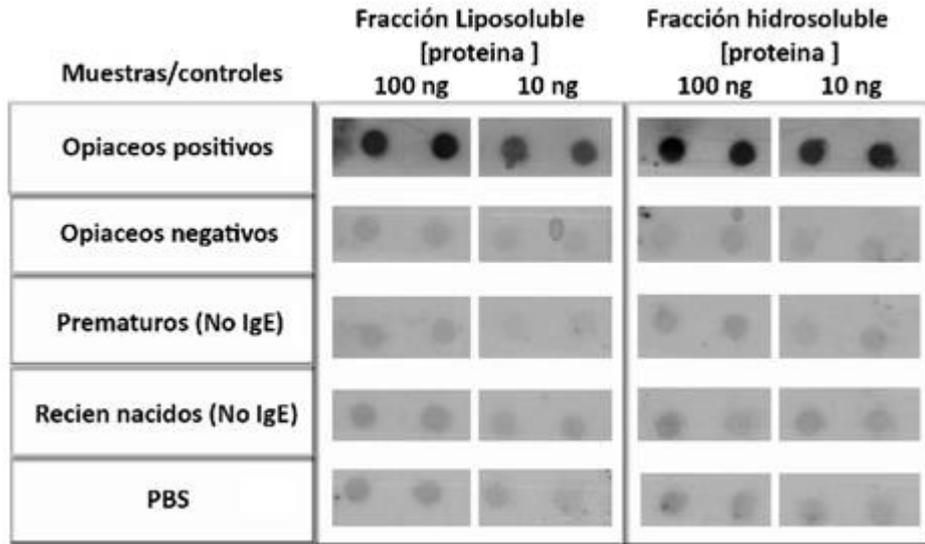


Fig. 5

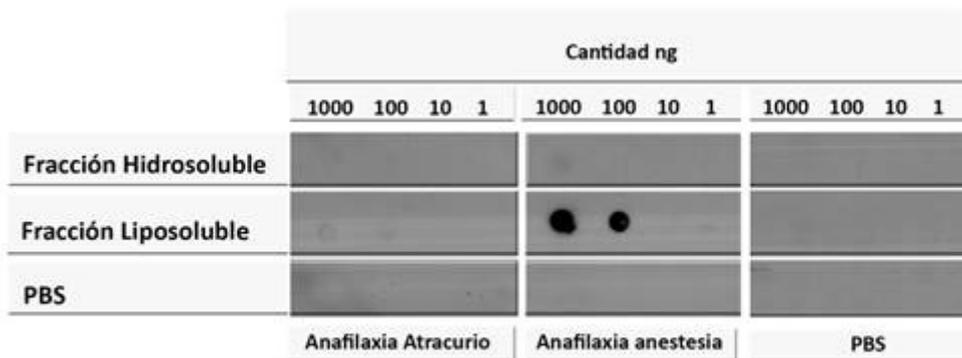


Fig. 6