

I32727WO

### **Reivindicaciones**

1. Método para la cuantificación absoluta de al menos un ligando peptídico del MHC radicado sobre una célula, en que dicho método comprende

a) la preparación de las células que presentan, como mínimo, dicho ligando peptídico del MHC a partir de una muestra biológica que contenga células

b) la determinación del número de células en la citada preparación resultante de la etapa a)

c) la adición de una cantidad conocida de al menos dicho ligando peptídico-MHC y/o complejo de ligando peptídico-MHC que se pretende cuantificar resultante de la citada preparación de la etapa a) ("1.º enriquecimiento")

d) el aislamiento de al menos un ligando peptídico del MHC resultante de la citada preparación de la etapa c) con el fin de obtener un eluato del péptido

e) la adición de una cantidad conocida de al menos un ligando peptídico del MHC que se pretende cuantificar al citado eluato de péptido ("2.º enriquecimiento")

f) la ejecución de un análisis por espectrometría de masas con al menos dicho ligando peptídico del MHC con el fin de generar al menos una

aa) señal para determinar la eficiencia del aislamiento efectuado en la etapa d)

bb) señal acerca de la cantidad conocida del citado ligando peptídico del MHC que, como mínimo, se ha añadido en la etapa e), y

cc) señal correspondiente a, como mínimo, el ligando peptídico del MHC procedente de las citadas células preparadas en la etapa a),

y

g) la cuantificación de, al menos, el citado ligando peptídico del MHC basada en la comparación de las señales obtenidas en la etapa f) con:

aa) el recuento de células obtenido

bb) la cantidad conocida de, al menos, el ligando peptídico-MHC y/o el complejo de ligando peptídico-MHC que se pretende cuantificar y que ha sido añadida en la etapa c), y

cc) la cantidad conocida de, al menos, el ligando peptídico del MHC que se pretende cuantificar y que ha sido añadida en la etapa e),

mediante el cual se consigue, al menos en parte, la cuantificación absoluta de al menos un ligando peptídico del MHC mostrado por la célula.

2. El método acorde con la reivindicación 1, en que se selecciona al menos un ligando peptídico del MHC procedente de un péptido asociado a tumor (TAA) o de un péptido asociado a enfermedad (DAA).
3. El método acorde con la reivindicación 1 o 2, en que la citada muestra biológica que comprende células se selecciona entre una muestra de tejido, una muestra de sangre, una muestra de tumor o una muestra de tejido infectado.
4. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que la preparación de las células comprende la digestión enzimática de tejidos, y/o la lisis celular.
5. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que el citado recuento celular se determina con un método seleccionado entre el recuento de los núcleos celulares, fotometría del ADN, fluorometría del ADN, o PCR cuantitativa.
6. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende la determinación de la cantidad de al menos un tipo de molécula HLA en la citada preparación de la etapa a).
7. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se añade al menos un complejo de péptido-MHC y/o al menos un ligando peptídico del MHC que están marcados, preferentemente marcados de forma diferencial con isótopos.
8. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que el aislamiento comprende la cromatografía, como la cromatografía por afinidad.
9. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende la selección de ligandos peptídicos del MHC sobrepresentados, sobreexpresados y/o específicos de tumor para el análisis.
10. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en que dicho método se puede efectuar o se efectúa con técnicas analíticas de alta capacidad

*(high-throughput).*

11. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en que dicho método consiste en las etapas indicadas.

12. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en que dicha o dichas muestras biológicas proceden de un individuo o de un grupo de individuos aquejados de la misma enfermedad.

13. El método según la reivindicación 12, que además comprende la etapa de generar un perfil de ligandos del MHC personalizado, preferentemente un perfil de ligandos del MHC específicos de la enfermedad, basado en dichos ligandos peptídicos del MHC sometidos a la cuantificación.