

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 13853

(54) Détection d'anticorps auto-bloquant.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). G 01 N 33/50.

(22) Date de dépôt..... 9 août 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : US, 10 août 1981, n° 291.354.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 6 du 11-2-1983.

(71) Déposant : Société dite : CORNING GLASS WORKS. — US.

(72) Invention de : James Eugene Ellis, Graham Peter Lidgard, Gerald Odstrchel et Louis Jay Riceberg.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet L. A. de Boisse,
37, av. Franklin-Roosevelt, 75008 Paris.

Lors de nombreuses interactions biologiques normales, diverses substances d'un organisme vivant doivent se fixer les unes aux autres par leurs sites récepteurs.

Parfois, un système immunitaire d'un sujet peut créer une auto-immunité à l'une de ces substances (qui est fréquemment une protéine fixatrice ou réceptrice) par production d'anticorps bloquants (dits "anticorps auto-bloquants"). Les anticorps bloquants sont attirés compétitivement par les sites de fixation complémentaires existant sur le récepteur.

Evidemment, ceci réduit la quantité de sites de fixation disponibles pour admettre la fixation de la substance complémentaire avec laquelle le récepteur (dit "coordonat") devrait normalement interagir, celui-ci étant fréquemment lui aussi une protéine.

Un exemple bien connu de système à anticorps auto-bloquant potentiel est la relation mutuelle existant entre le facteur intrinsèque et la cobalamine (vitamine B12). Le facteur intrinsèque est une glycoprotéine responsable de l'absorption de la vitamine B12 par le tractus gastro-intestinal. Après ingestion, la vitamine B12 se fixe au facteur intrinsèque par des sites récepteurs spécifiques et le complexe est absorbé par la médiation de récepteurs du complexe dans le tractus gastro-intestinal.

Dans l'anémie pernicieuse, il se produit un déclin graduel aboutissant à une disparition complète de l'aptitude à produire et à sécréter le facteur intrinsèque. Il existe une très étroite corrélation entre l'anémie pernicieuse et la présence d'anticorps auto-immunitaires et notamment de l'anticorps de blocage du facteur intrinsèque.

Dans les situations du type ci-dessus considéré, il serait très utile de pouvoir au moins établir qualitativement la présence d'anticorps bloquants, tels que ceux qui sont produits pour le facteur intrinsèque (et qu'on dénommera ci-après "anticorps de sites de blocage de facteur intrinsèque" - à l'heure actuelle, on pense que le facteur intrinsèque contient au moins deux types de sites de fixation,

mais dont un seul intervient dans la formation du complexe avec la vitamine B12).

Pour ce qui est de la situation spécifique facteur intrinsèque-vitamine B12, la Demanderesse a connaissance de techniques de radio-analyse utilisées et suggérées dans l'art antérieur pour détecter la présence d'anticorps de sites de blocage de facteur intrinsèque. Il est patent que toutes ces techniques de l'art antérieur font intervenir des mises en solution, ce qui veut dire que tous les réactifs agissants se trouvent en solution ou au moins à l'état de suspension libre au sein d'un milieu liquide. Tout naturellement, les façons d'aborder le problème sont choisies de façon à tirer avantage de l'aptitude des anticorps de sites de blocage de facteur intrinsèque à inhiber la fixation de vitamine B12 marquée (c'est-à-dire radioactive) au facteur intrinsèque. En général, du facteur intrinsèque (ou du suc gastrique contenant du facteur intrinsèque) est mélangé à l'échantillon de fluide biologique du patient (exemple: sérum), et l'on y ajoute ensuite la vitamine B12 marquée (en excès).

Il est ensuite nécessaire de séparer la vitamine B12 marquée se trouvant à l'état fixé, de la vitamine B12 marquée se trouvant à l'état libre. Ont été décrites comme techniques de séparation : la dialyse, la filtration sur gel, l'absorption sur charbon et l'absorption sur gel de phosphate de zirconyle. Mis à part ces processus de séparation incommodes et prenant fréquemment beaucoup de temps, les radio-analyses sur solutions de l'art antérieur présentent des difficultés tenant à la présence de fixateur endogène de vitamine B12 dans de nombreux échantillons biologiques. Il est nécessaire de faire agir un témoin additionnel pour prendre en compte le fixateur endogène de vitamine B12 ou d'intégrer au mode opératoire l'élimination du fixateur endogène de l'échantillon.

La présente invention, sous l'un de ses modes d'exécution, surmonte les problèmes inhérents aux techniques opérant sur des solutions de l'art antérieur pour établir la présence d'anticorps de sites de blocage de facteur

intrinsèque, et elle procure en outre un procédé général utilisable pour déceler d'autres anticorps auto-bloquants.

En conséquence, l'un des buts de la présente invention est de fournir un procédé de détection qualitative ou quantitative de la présence d'un anticorps auto-bloquant.

Un autre but de l'invention est de fournir un procédé de détection de la présence d'anticorps de sites de blocage de facteur intrinsèque.

Un autre but encore de l'invention est de fournir un procédé de détection d'anticorps de sites de blocage de facteur intrinsèque qui ne soit pas sujet aux problèmes intervenant dans l'emploi des systèmes à solutions de l'art antérieur.

L'invention a en outre pour objet un jeu de réactifs de diagnostic utilisable pour détecter quantitativement ou qualitativement la présence d'un anticorps auto-bloquant chez un patient.

L'invention a aussi pour objet un jeu de réactifs de diagnostic utilisable pour détecter la présence d'anticorps de sites de blocage de facteur intrinsèque chez un patient.

Un but spécifique de l'invention est de fournir un jeu de réactifs de diagnostic, avec étalonneurs adéquats, pour la détermination de la présence d'anticorps de sites de blocage de facteur intrinsèque chez un patient.

D'autres buts de la présente invention ressortiront de la description détaillée de l'invention qui sera donnée plus loin.

Selon la présente invention, un anticorps auto-bloquant est détecté par la mise en oeuvre d'un récepteur immobilisé unique en son genre dans un processus de radio-analyse.

Plus particulièrement, la présente invention fournit un procédé de détection de la présence d'un anticorps auto-bloquant qui comprend les opérations consistant: (a) à mélanger un échantillon de fluide biologique suspecté de contenir l'anticorps auto-bloquant avec un récepteur comportant des sites de fixation sélective pour ledit

anticorps, ledit récepteur étant immobilisé sur un support inanimé; (b) à faire incuber le mélange obtenu par l'opération (a) sous des conditions suffisantes pour permettre à la quasi-totalité de l'anticorps bloquant présent de se fixer au récepteur, ce qui fournit une phase solide comprenant ledit support inanimé et l'anticorps bloquant à l'état fixé sur celui-ci et une phase liquide comprenant ledit échantillon de fluide biologique sans ledit anticorps bloquant ; (c) à séparer la phase solide de la phase liquide ; (d) à mélanger à la phase solide séparée un liquide comprenant un coordinat marqué propre à se fixer sur lesdits sites de fixation sélective ; (e) à faire incuber le mélange obtenu par l'opération (d) sous des conditions suffisantes pour permettre au coordinat marqué de se fixer aux sites de fixation sélective dudit récepteur qui n'ont pas contracté de liaison avec ledit anticorps bloquant, ce qui fournit une deuxième phase solide comprenant ledit support inanimé et l'anticorps bloquant et/ou le coordinat marqué fixé(s) à celui-ci et une deuxième phase liquide comprenant du coordinat marqué à l'état non fixé ; (f) à séparer la deuxième phase solide de la deuxième phase liquide ; et (g) à déterminer la quantité de coordinat marqué présent dans la deuxième phase solide et/ou la deuxième phase liquide.

25 Dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, le récepteur est une protéine.

Dans un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, le récepteur est du facteur intrinsèque et le coordinat marqué est de la vitamine B12 marquée.

30 Dans un troisième mode de réalisation préféré de la présente invention, il est fait appel à une référence d'étalonnage négative et à une référence d'étalonnage à réponse positive minimale au cours du processus d'analyse.

D'autres modes de réalisation préférés de la présente invention font appel à des perles ou granules de verre en tant que support inanimé, le récepteur étant fixé à ceux-ci par covalence.

Comme on l'a vu plus haut, la présente invention s'applique utilement à la détermination de la présence d'anticorps auto-bloquants de façon qualitative ou quantitative. On va décrire à titre d'exemple l'application de

5 l'invention à une analyse de détection d'anticorps de sites de blocage de facteur intrinsèque, mais l'invention est cependant à considérer comme également applicable à une analyse visant à rechercher d'autres anticorps auto-bloquants, tels que ceux intervenant dans le goître exophtalmique

10 (détermination de la présence d'anticorps auto-bloquants pour l'hormone de stimulation de la thyroïde), dans la maladie d'Addison, et autres, pour autant que le récepteur se prête à être fixé physiquement et/ou chimiquement à un support inanimé et que le coordinat marqué se prête à être

15 soumis à une incubation avec celui-ci. La présente invention fournit non seulement un procédé de mise en oeuvre du type d'analyse ci-dessus décrit, mais aussi des jeux de réactifs pour l'exécution de ce procédé, lesquels comprennent dans des modes de réalisation préférés deux étalonneurs et,

20 lorsque désiré, un témoin positif.

L'idée de base de la présente invention repose sur l'utilisation d'un récepteur immobilisé constitué le plus fréquemment par une protéine réceptrice immobilisée. Le récepteur est la substance comportant des sites de

25 fixation par lesquels un anticorps auto-bloquant quelconque présent dans l'échantillon de fluide biologique d'un patient tend à être attiré, et ce peut être aussi la substance qui se fixerait normalement au coordinat dans une interaction biologique in vivo. L'anticorps auto-bloquant, qui est

30 produit par le patient, interfère avec la formation de complexe in vivo entre le coordinat et le récepteur en se fixant au récepteur en certains au moins des sites de fixation qui seraient normalement disponibles pour servir à la fixation récepteur-coordinat.

35 Les techniques de fixation de substances réceptrices protéiniques ou autres à des supports inanimés ont progressé à un point tel qu'il n'est pas besoin de les exposer ici de façon très détaillée. Bien qu'il puisse être

fait appel à divers types de particules, perles ou surfaces inanimées, telles que polymères synthétiques, c'est-à-dire organiques, que céramiques, poudres inorganiques, polymères naturels, celluloses, agaroses et similaires, le substrat
5 préféré est du verre, et il est par exemple formé par des particules de verre du type utilisé dans un grand nombre des systèmes d'analyse désignés sous la marque "IMMOPHASE" commercialisés par la Société Corning Medical and Scientific de Medfield, Massachusetts, E.U.A. Ces perles de verre sont
10 le plus fréquemment traitées à l'aminosilane et peuvent être de porosité bien déterminée. Le récepteur sera en général fixé au substrat par une liaison covalente, avec ou sans utilisation d'un radical chimique de séparation, comme bien connu en soi, selon les groupes réactifs présents. Par exemple,
15 on peut faire réagir du facteur intrinsèque avec des particules de verre à porosité bien déterminée par intervention d'aminosilane de couplage et de glutaraldéhyde, comme il est bien connu (voir par exemple le brevet des Etats-Unis n° 3 669 841). Dans l'immobilisation du récepteur sur le
20 support inanimé, on peut aussi faire appel à des liaisons ioniques, à des interactions hydrophobes, à des forces de Van der Waals et similaires, comme celles intervenant dans l'adsorption simple.

Le récepteur doit essentiellement être le même
25 que celui qui se trouve dans l'organisme vivant, ou bien être choisi en sorte qu'il imite le comportement du récepteur naturel. Parfois, des modifications se produiront lors de l'extraction, de la stabilisation, etc. Elles sont tolérables pour autant que les sites de fixation du récepteur qu'exige l'analyse ne se trouvent pas altérés. Bien
30 entendu, le récepteur sera très fréquemment la substance homologue obtenue à partir d'un animal inférieur plutôt que celle provenant d'une origine humaine. D'ailleurs, il devrait être possible de faire appel à une autre substance-existant
35 dans la nature ou même synthétique- que le récepteur, pour autant que les sites de fixation de celle-ci reproduisent sélectivement ceux du récepteur se trouvant dans la nature.

Par conséquent, le récepteur pourrait être une substance non protéinique, telle qu'une résine d'échange ionique, une matière hydrophobe ou similaire, à laquelle l'anticorps auto-bloquant suspecté est à même de se fixer. Parfois, bien
5 que le récepteur soit une protéine, la fixation s'effectue par la médiation d'une portion non protéinique de la protéine, telle qu'une portion de molécule glucidique, lipidique et/ou peptidique de celle-ci. En outre, des expériences in vitro ont montré que certaines particules de verre sont capables
10 d'imiter le comportement de surfaces de protéines réceptrices.

Le second réactif essentiel de la présente invention est le coordinat marqué. De même que, pour ce qui concerne le récepteur, le coordinat est de préférence celui
15 qu'on trouve dans l'organisme vivant, mais il pourrait être modifié ou même être une substance synthétique susceptible de ne pas être à même de remplir la fonction qui lui est dévolue dans l'organisme vivant, pour autant que les sites de fixation de celui-ci soient ceux que nécessite la
20 fixation sélective au récepteur.

L'échantillon en provenance du patient, qui est utilisé dans l'analyse, sera un fluide biologique où peuvent se trouver normalement les anticorps. On emploiera généralement du sérum ou plasma sanguin, mais on pourrait cependant
25 utiliser d'autres fluides, tels que du liquide céphalo-rachidien, de l'urine, du suc gastrique, du sang entier, ou autres, selon les réactifs et l'anticorps particuliers qui interviennent.

Selon l'un de ses aspects les plus généraux,
30 l'invention vise un jeu de réactifs contenant un récepteur immobilisé et un coordinat marqué qui sont utilisés dans un procédé comprenant le mélange de récepteur immobilisé à un fluide biologique provenant d'un patient, puis l'addition de coordinat marqué. On détermine la proportion relative
35 de fixation de coordinat marqué au récepteur immobilisé afin d'évaluer qualitativement ou quantitativement la présence des anticorps auto-bloquants particuliers en question.

Le coordinat peut être marqué de n'importe quelle manière connue, par exemple au moyen d'une "marque" radioactive, enzymatique, fluorescente, ou autre.

- De préférence, le jeu de réactifs comporte au moins un étalonneur négatif qui est connu pour ne pas contenir trace de l'anticorps auto-bloquant particulier concerné. Plus avantageusement encore, il comporte à la fois un étalonneur négatif et un étalonneur positif qui sont traités en même temps que l'échantillon provenant du patient.
- 10 L'étalonneur positif est un réactif contenant une quantité de l'anticorps auto-bloquant qui est prédéterminée de façon à donner un tout début de réponse positive en considération de la sensibilité de l'épreuve. Ceci signifie que tout échantillon se situant du côté "positif" de l'étalonneur
- 15 positif est "positif" quant à la présence de l'anticorps auto-bloquant et que tout échantillon se situant entre les étalonneurs "négatif" et "positif" appartiendra à une "zone grise" (c'est-à-dire indéterminée) - et sera éventuellement positif ou négatif selon la sensibilité de l'épreuve. Lorsque
- 20 désiré, on peut aussi faire agir un témoin fortement positif à titre d'illustration d'un résultat fortement positif et de double contrôle des autres réactifs. De plus, selon le type du marquage utilisé sur le coordinat, il peut être nécessaire d'effectuer un essai témoin de bruit de fond, en particulier
- 25 avec un coordinat radioactif.

EXEMPLE

- Dans une radio-analyse de recherche d'anticorps de sites de blocage de facteur intrinsèque, on utilise un jeu de réactifs comportant les six (6) constituants suivants:
- 30 A. Facteur intrinsèque (protéine réceptrice immobilisée)
- C'est du facteur intrinsèque (facteur intrinsèque de porc purifié) lié par covalence à des particules de verre qui sont placées en suspension dans 60 ml de sérum physiologique (0,15M) tamponné au phosphate 0,03M à pH 7,4 et contenant 0,2% d'azoture de sodium comme stabilisant.
- 35 B. γ - ^{57}Co -vitamine B12 (radio-coordinat)
- On dissout de la γ - ^{57}Co -vitamine B12 dans 120 ml de tampon borate 0,1M de pH 9,3 contenant 0,001% de cyanure de

potassium, 2 µg/ml de rouge amarante servant de colorant de pipetage, et 0,2% d'azoture de sodium servant de stabilisant.

C. Dithiothréitol (ingrédient facultatif destiné à améliorer la fixation non spécifique)

5 Un flacon contenant 1,0 ml de dithiothréitol sous une concentration choisie à l'optimum pour l'analyse.

D. Étalonneur négatif

Est formé par du plasma humain défibriné purifié. Ce produit peut être lyophilisé et reconstitué avant usage.

10 E. Étalonneur positif

C'est un plasma humain dilué qui contient de l'anticorps bloquant pour le facteur intrinsèque sous une concentration déterminée comme correspondant au point de coupure entre les produits à réponse négative et les produits à réponse positive à la recherche des anticorps. Le diluant plasmatique est du plasma humain défibriné purifié qui ne contient pas d'anticorps bloquants pour le facteur intrinsèque. Ce produit peut être lyophilisé et reconstitué avant emploi. Le point de coupure a été déterminé en évaluant environ 800 échantil-

15 lons normaux sans anticorps et environ 100 échantillons avec anticorps bloquant. Le point de coupure est défini comme étant la réponse à 3 écarts-types de la moyenne des échantillons normaux. Les échantillons positifs ne devront pas se situer entre ces limites.

25 F. Témoin positif

Le témoin positif est formé des mêmes produits que l'étalonneur positif, à ceci près qu'une plus forte quantité d'anticorps bloquant lui est ajoutée afin de lui faire fournir une réponse fortement positive à l'analyse.

30 Les diverses techniques utilisées pour la conservation, la reconstitution et la manipulation des réactifs ci-dessus sont connues du technicien expérimenté. Les réactifs se trouveront à la température ambiante lorsqu'ils seront utilisés.

35 Mode opératoire de l'analyse

Il est recommandé de faire agir le témoin de bruit de fond de l'appareillage, 100 µl d'étalonneur négatif et 100 µl d'étalonneur positif en quadruple exemplaire, en

faisant agir 100 µl des autres échantillons en double exemplaire. La valeur moyenne obtenue pour chaque type d'échantillon est utilisée dans un calcul effectué comme exposé ci-après.

- 5 En gardant à l'esprit les recommandations ci-dessus, le technicien organisera l'épreuve comme suit :

<u>Numéro du tube</u>	<u>Contenu du tube</u>
1 à 4	Vide (pour mesure de bruit de fond)
5 à 8	Etalonneur négatif
10 9 à 12	Etalonneur positif
13 et 14	Témoin positif
15 et 16	Echantillon de sérum du patient

- En d'autres termes, au début de l'analyse, les tubes 5 à 8 contiennent chacun 100 µl de réactif D, les tubes 9 à 12 contiennent chacun 100 µl de réactif E, les tubes 13 et 14 contiennent chacun 100 µl de réactif F et les tubes 15 et 16 contiennent chacun 100 µl de l'échantillon de fluide biologique.

- Ensuite, on ajoute une quantité connue (0,5 ml) du facteur intrinsèque immobilisé (réactif A) aux tubes 5 à 16. On soumet les tubes à une agitation et on les met ensuite à incuber à une température à laquelle la complexation entre le facteur intrinsèque et l'anticorps peut avoir lieu, soit par exemple à la température ambiante pendant environ deux (2) heures. Ensuite, les tubes sont centrifugés et décantés. A ce stade, toute protéine de fixation de vitamine B12 endogène susceptible de se trouver dans l'échantillon de sérum est alors éliminée par décantation. On ajoute aux tubes 5 à 16 une quantité connue (1,0 ml) du radio-coordinat (réactif B) qu'on soumet ensuite à une nouvelle incubation, par exemple d'environ une (1) heure à la température ambiante. On effectue une nouvelle centrifugation, suivie d'une décantation. On mesure la radio-activité de chaque tube.

- 35 Si le patient se trouve sous administration de vitamine B12, on peut traiter l'échantillon provenant du patient, au cours de l'analyse, de façon à éliminer toute vitamine B12 présente à l'état libre, par exemple par

addition préalable de fixateur de vitamine B12 au réactif A. En variante, on pourrait ajouter du fixateur de vitamine B12 aux tubes 15 et 16 préalablement à l'addition du facteur intrinsèque immobilisé. En général, les échantillons de
5 sérum à teneur en vitamine B12 aussi forte que 2000 pg/ml ne contiendront pas assez de vitamine B12 libre pour gêner l'analyse.

Lorsqu'on en utilise, le dithiothréitol sera ajouté aux échantillons au moment de l'addition du radio-
10 coordinat à titre de constituant de la solution de vitamine B12 radioactive. L'utilisation de cet ingrédient est facultative, son but étant d'améliorer la fixation non spécifique.
Calculs sur les échantillons

Toutes les valeurs utilisées sont des valeurs
15 moyennes réduites par déduction du total de comptage moyen des tubes de bruit de fond. Comme cette application de l'épreuve est de forme qualitative, les calculs qu'elle fait intervenir sont aisés. On divise simplement le nombre de coups nets par minute fourni par l'étalonneur négatif,
20 par le nombre de coups nets par minute fourni par l'étalonneur positif, pour obtenir une valeur (A) qui est supérieure à 1,00. On fait ensuite le quotient de l'étalonneur négatif par les nombres de coups nets moyens de chaque échantillon à analyser pour obtenir un nombre pour chaque échantillon
25 à analyser. On compare ce nombre à la valeur (A). L'expérience montre qu'il faut que (A) soit supérieur ou égal à 1,15 pour que l'épreuve puisse être considérée comme significative. Si la valeur d'un échantillon à analyser est inférieure ou égale à (A), cet échantillon est présumptive-
30 ment négatif à la recherche d'anticorps. Si la valeur de l'échantillon à analyser est supérieure à (A), l'échantillon est positif à la recherche d'anticorps. Bien entendu, il existe une "zone grise" (indéterminée) entre (A) et 1,00.

L'invention admet des variantes qui seront
35 évidentes pour le technicien expérimenté. Ainsi, il va de soi que les paramètres des périodes d'incubation peuvent

varier très largement, que des opérations facultatives de lavage pourraient être effectuées lorsque désiré, qu'il n'est pas obligatoire que la séparation soit effectuée par centrifugation et décantation, que les calculs pourraient
5 être effectués d'une façon différente, que l'on pourrait utiliser les valeurs obtenues pour le coordinat qui ne vient pas se fixer au substrat immobilisé dans le calcul d'une réponse positive ou négative.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la détection de la présence d'un anticorps auto-bloquant, caractérisé en ce que : (a) on mélange un échantillon de fluide biologique suspecté de contenir
5 l'anticorps auto-bloquant avec un récepteur comportant des sites de fixation sélective pour ledit anticorps, ledit récepteur étant immobilisé sur un support inanimé; (b) on fait incuber le mélange obtenu par l'opération (a) sous des conditions suffisantes pour permettre à la quasi-totalité de
10 l'anticorps bloquant présent de se fixer au récepteur, d'où s'ensuivent une phase solide comprenant ledit support inanimé et l'anticorps bloquant à l'état fixé sur celui-ci et une phase liquide comprenant ledit échantillon de fluide biologique sans ledit anticorps bloquant; (c) on sépare la phase
15 solide de la phase liquide; (d) on mélange à la phase solide séparée un liquide comprenant un coordinat marqué propre à se fixer sur lesdits sites de fixation sélective; (e) on fait incuber le mélange obtenu par l'opération (d) sous des conditions suffisantes pour permettre au coordinat marqué de
20 se fixer aux sites de fixation sélective dudit récepteur qui n'ont pas contracté de liaison avec ledit anticorps bloquant, d'où s'ensuivent une deuxième phase solide comprenant ledit support inanimé et l'anticorps bloquant et/ou le coordinat marqué fixé(s) audit support et une deuxième phase liquide
25 comprenant du coordinat marqué à l'état non fixé; (f) on sépare la deuxième phase solide de la deuxième phase liquide; et (g) on détermine la quantité de coordinat marqué présent dans la deuxième phase solide et/ou la deuxième phase liquide.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé
30 en ce que le récepteur est une protéine.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'on fait agir en tant que témoins un étalonneur négatif connu et un étalonneur positif connu.

4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé
35 térérisé en ce que le récepteur est du facteur intrinsèque et le coordinat de la vitamine B12.

5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le récepteur est du facteur intrinsèque et le coordinat de la vitamine B12 et en ce qu'on prépare l'étalonneur négatif à partir de plasma humain et l'étalonneur positif à partir de plasma humain contenant ledit anticorps auto-bloquant suspecté.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le support est formé par des particules de verre.

10 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le récepteur est lié par covalence au verre.

8. Procédé selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que la marque est radioactive, fluorescente ou enzymatique.

15 9. Jeu de réactifs pour l'exécution du procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend un récepteur comportant des sites de fixation sélective pour ledit anticorps, le récepteur étant immobilisé sur un support inanimé, et un
20 coordinat marqué pour ledit récepteur.

10. Jeu de réactifs selon la revendication 9, caractérisé en ce que le récepteur est une protéine ou du facteur intrinsèque et le coordinat de la vitamine B12 et en ce qu'on prépare l'étalonneur négatif à partir de plasma
25 humain et l'étalonneur positif à partir de plasma humain contenant ledit anticorps auto-bloquant suspecté.

11. Jeu de réactifs selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comporte un témoin positif préparé à partir de plasma humain contenant ledit anticorps auto-
30 -bloquant suspecté en quantité plus grande que celle présente dans ledit étalonneur positif.

12. Jeu de réactifs selon la revendication 9, 10 ou 11, caractérisé en ce que le support est formé par des particules de verre et en ce que le récepteur est lié au
35 verre par covalence.