

# POMEN KAKOVOSTI PROTITELES V RAZISKAVAH

## SIGNIFICANCE OF ANTIBODY QUALITY IN RESEARCH

AVTOR / AUTHOR:

mag. Maja Černilec, univ. dipl. kem.  
prof. dr. Vladka Čurin Šerbec, univ. dipl. kem.

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino,  
Center za razvoj in izdelavo diagnostičnih reagentov,  
Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: maja.cernilec@ztm.si

## 1 UVOD: PROTITELESA IN NJIHOVA PRIPRAVA

Protitelesa so topni glikoproteini iz skupine imunoglobulinov. Proizvaja jih imunski sistem v odzivu na patogene oz. organizmu tuje molekule. V laboratorijih z njimi določamo antigene, predvsem proteine, pa tudi druge vrste molekul. Del molekule antigena, na katerega se protitelo veže, imenujemo epitop, vezavno mesto na protitelesu pa paratop. Znanstveniki uporabljajo protitelesa za raziskave že od začetka prejšnjega stoletja, neprecenljiva pa je tudi njihova uporaba v diagnostičnih laboratorijih in pri zdravljenju različnih bolezni. Protitelesa lahko okvirno razdelimo na poliklonska, monoklonska in rekombinantna.

## POVZETEK

Protitelesa sodijo med najbolj uporabljana orodja v raziskavah, diagnostiki in terapiji. Njihova naravna vloga je, da uničujejo patogene, v laboratoriju pa z njimi določamo ali proučujemo proteine in druge molekule. Z različnimi biotehnološkimi postopki lahko pripravimo unikatna protitelesa. Veliko povpraševanje je privedlo do široke ponudbe, znotraj katere mnogokrat težko najdemo protitelesa, primerna za določen namen, saj so pogosto pomanjkljivo opredeljena. V članku poudarjamo pomembnost uporabe preverjeno kakovostnih protiteles v raziskavah ter pristope k njihovi validaciji. Uporabnik protiteles je namreč tisti, ki mora zagotoviti zanesljive rezultate z uporabo ustreznih in kakovostnih reagentov.

## KLJUČNE BESEDE:

protitelesa, validacija, zanesljivost rezultatov

## ABSTRACT

Antibodies are among the most used tools in research, diagnostics and therapy. Their natural role is to destroy pathogens, whereas in the laboratory we use them to determine proteins and other molecules or to study them. Various biotechnological procedures are applied for production of unique antibodies. The high demand has led to the existence of a wide range of often under-defined antibodies, and it is often difficult to select a suitable one for a particular purpose. This article emphasises the importance of using validated antibodies in research, as well as approaches for their validation. Namely, the antibody user is exclusively responsible for providing reliable results by using appropriate reagents of adequate quality.

## KEY WORDS:

antibodies, validation, reliability of results

Preprost način pridobivanja protiteles je imunizacija eksperimentalnih živali z želenim proteinom ali drugim antigenom. Eksperimentalne živali najpogosteje imuniziramo s sintezniimi peptidi ali očiščenimi proteini. Prednost sinteznih peptidov je v tem, da sami izberemo krajše aminokislinsko zaporedje, na katerega želimo, da se protitelo veže. Težava pri uporabi omenjenih peptidov pa je, da aminokislinski ostanki v peptidu pogosto zavzemajo strukturo,



ki se razlikuje od tridimenzionalne strukture v zrelem proteinu. Protitelesa, pridobljena proti peptidom, so tako usmerjena proti linearnim epitopom ter so večinoma uporabna v metodah, v katerih določamo denaturirane proteine, npr. prenos western. Kadar kot imunogen uporabimo očiščen nativni protein, pridobimo protitelesa proti aminokislinskim ostankom v nativni konformaciji. Epitopi takih protiteles običajno niso linearni, pač pa diskontinuirni, saj se vežejo na specifičen del tridimenzionalne strukture proteina. Tako pridobljena protitelesa so uporabna v metodah, s katerimi določamo nativne proteine, kot so: pretočna citometrija, encimskoimunski test ELISA, imunohistokemija in fluorescenčna mikroskopija.

Serum imunizirane živali vsebuje poliklonska protitelesa različnih afinitet proti različnim epitopom nekega antigena kot tudi številna protitelesa proti drugim antigenom (1). Ta se med seboj razlikujejo v razredih, podrazredih, specifičnostih in afinitetah do epitopa. Zadostno količino identičnih protiteles znotraj poliklonskega nabora protiteles pridobimo tako, da limfocite B imunizirane živali zlijemo z nesmrtnimi mielomskimi celicami, nato pa s primernim izborom pridobimo monoklonske celične linije. Posamezna linija proizvaja monoklonska protitelesa s točno določeno epitopsko specifičnostjo (2).

Z razmahom molekularne biologije in biotehnologije se je pred dobrima dvema desetletjema začelo obdobje priprave rekombinantnih protiteles. Proizvedena so s kloniranjem znanega zaporedja protitelesnih genov v ekspresijske vektorje, ki jih vstavimo v gostiteljske, npr. sesalske celice, kjer jih izrazimo kot funkcionalne imunoglobuline (3).

## 2 TRG PROTITELES

S postopki pridobivanja protiteles v teoretično neomejenih količinah se ukvarja preko 300 podjetij, ki prodajajo več kot dva milijona različnih protiteles za raziskovalne namene (4). V tej nepregledni množici je veliko protiteles s slabo opredeljenima specifičnostjo in afiniteto. Pri tem ne gre le za protitelesa, ki so namenjena za raziskave, ampak v sicer redkih primerih tudi za eksperimentalno diagnostiko, analizo hrane, antigenov iz okolja in za druge namene. Pri uporabi protiteles dvomljivih lastnosti morebitne posledice seveda čutijo bolniki in vsi drugi, ki so odvisni od rezultatov tovrstnih raziskav oz. testiranj. Posledica uporabe takih protiteles v raziskavah je slaba ponovljivost objavljenih rezultatov (5,

6). To predstavlja veliko izgubo časa raziskovalcev zaradi nepotrebnega ponavljanja poskusov, posledično pa tudi velike finančne stroške. Zaskrbljujoče je, da ne obstajajo povezave med dejavniki vpliva objavljenih rezultatov in ponovljivostmi znanstvenih raziskav, poleg tega pa tudi, da nizka ponovljivost rezultatov onemogoča napredek pri raziskovalnem delu (6, 7).

V raziskavah protitelesa največkrat uporabljamo za identifikacijo proteinov. Najobširnejši pregled protiteles, uporabljenih v ta namen, so naredili v okviru konzorcija Human Protein Atlas. Že leta 2008 so ugotovili, da manj kot polovica komercialno dostopnih preverjenih protiteles specifično prepozna tarčno molekulo, proti kateri naj bi bila usmerjena (5). Edina olajševalna okoliščina je bilo dejstvo, da vsa preskušana protitelesa niso imela potrdil za uporabo pri metodi prenosa proteinov western, ki so jo uporabili v raziskavi (5). Razprave na temo preverjanja ustreznosti in kakovosti protiteles, ki so tem ugotovitvam sledile, kažejo na potrebo po poenotenih kriterijih za izvedbo validacij in primernih načinov poročanja o validacijskih rezultatih, saj bi s tem uporabniki lahko našli ustrezno protitelo kot reagent za določanje izbrane tarčne molekule z izbrano, preverjeno metodo (8, 9).

## 3 VALIDACIJA PROTITELES

Validacija protiteles je proces, s katerim dokazujemo, da v izbrani analizni metodi protitelo deluje antigensko specifično in selektivno ter da so z njim pridobljeni rezultati ponovljivi, kar potrjuje njegovo primernost za predvideno uporabo (8, 10). Validacija ni enostaven proces, saj na rezultate določitve neke molekule z izbrano metodo vplivajo predanalizni, analizni in poanalizni dejavniki.

V okviru analiznega procesa moramo izbrati primerno metodo in določiti pogoje, kot so npr. redčenje protiteles, izbor detekcijskega sistema in način interpretacije rezultatov (10). Glede na podatke s portala Antibodypedia so najpogosteje uporabljane metode za validacijo protiteles prenos western, imunohistokemija in imunocitokemija ter za klinične raziskave zelo pomembni encimskoimunski testi (8, 11). V primeru, da kasneje uporabimo kako drugo metodo, ki je nismo vključili v proces validacije, moramo preveriti predvsem vpliv morebitno spremenjenega načina priprave testnih vzorcev na sposobnost specifične vezave uporabljenega protitelesa na analit, saj ustreznost protitelesa za

določeno analizo metodo ne zagotavlja njegove enako učinkovite uporabnosti za drugo (10, 12). Upoštevati moramo tudi to, da lahko med pripravo testnega vzorca, npr. med njegovo fiksacijo pri imunohistokemiji, pride do izpostavitve epitopov, ki v neobdelanem vzorcu protitelesom niso dostopni.

### 3.1 POMEN PREVERJANJA SPECIFIČNOSTI PROTITELES

Specifičnost protitelesa je določena z epitopom, na katerega se veže. V primeru nizke specifičnosti se lahko protitelo veže na več podobnih epitopov, ki se lahko nahajajo tudi na nesrodnih proteinskih molekulah. Po drugi strani pa je selektivnost protitelesa definirana kot njegova vezava na edinstven epitop. Tako se monoklonsko protitelo sicer veže na specifičen, torej točno določen epitop, a kadar ta ni edinstven, sama specifičnost protitelesa ne bo zadoščala za odsotnost njegove navzkrižne reaktivnosti z drugimi, običajno analitu sorodnimi proteini (13). V idealnem primeru si torej želimo 100-odstotno selektivnost oz. specifičnost protitelesa do izbranega antigena (analita) ali pa njegovo vezavo na skupino analitu sorodnih antigenov. Seveda pa so v realnosti povsem možne tudi nepričakovane navzkrižne reakcije protitelesa v kompleksnih vzorcih. S praktičnega vidika je zato zelo pomembno ugotoviti, v kolikšni meri določena navzkrižna reaktivnost uporabljenega protitelesa vpliva na rezultat, pridobljen z izbrano analizo metodo, obenem pa se zavedati, da je določanje protitelesne navzkrižne reaktivnosti vedno omejeno s posamičnim preverjanjem le majhnega deleža vseh možnih antigenov, ki so lahko prisotni v posameznem testnem vzorcu (6).

V postopku validacije protitelesa za preverjanje njegove specifičnosti v prvem koraku običajno uporabimo metodo prenosa western. Za preskušano protitelo lahko trdimo, da je specifično, kadar je prisotna le ena lisa na nitrocelulozni membrani, ki se nahaja v višini molekulske mase tarčne molekule. Če je lis več, je bodisi možno, da je v vzorcu prisotnih več oblik tarčnega proteina, kar je lahko posledica posttranslacijskih modifikacij, ali pa da je prišlo do razpada tarčne molekule na različno velike produkte. Takšen rezultat seveda poraja dvom v specifičnost protitelesa. V naslednjih korakih validacije uporabimo tudi druge metode, v katerih želimo uporabljati testirano protitelo. Kadar poznamo epitop, ki ga protitelo specifično prepozna, izvedemo test inhibicije z uporabo blokirajočih peptidov. Ti s svojo vezavo na protitelo preprečijo njegovo interakcijo s tarčno molekulo. Če je protitelo specifično, bo torej dodatek blokirajo-

čega peptida značilno zmanjšal ali celo preprečil njegovo vezavo na tarčno molekulo. S tem sicer potrdimo, da je protitelo specifično, ne pa tudi njegove selektivnosti, saj prisotnost inhibitornega peptida zmanjša možnost za morebitne vezave protitelesa na druge molekule, prisotne v vzorcu (10).

Specifičnost vezave protiteles na tarčno molekulo je odvisna tudi od njihove koncentracije, saj večja količina protiteles omogoča tudi vezavo na tiste epitope, do katerih ima protitelo sicer nižjo afiniteto. Pri uporabi protitelesa v določeni analizi metodi je zato ključno ustrezno redčenje vseh reagentov, da optimiziramo razmerje med merjenim signalom in ozadjem (14).

Pri izvedbi vseh validacijskih testov moramo uporabiti tudi ustrezne kontrole, ki jih narekuje posamezna metoda. Za pozitivno kontrolo nam lahko služi antigen, ki je bil uporabljen za imunizacijo, ali pa ustrezno protitelo. Negativno kontrolo pripravimo tako, da ne vsebuje preverjanih protiteles, ali pa v ta namen uporabimo primerljiv vzorec, ki ne vsebuje antigena, ki naj bi ga preverjano protitelo prepoznalo (10). V idealnem primeru bi lahko kot kontrole uporabili referenčne materiale ali standarde, ki pa so za področje validacije protiteles žal le redko na voljo (6).

### 3.2 PREVERJANJE PONOVLJIVOSTI REZULTATOV IN POMEN ZAGOTAVLJANJA KAKOVOSTI

Pomemben kriterij pri validaciji protiteles je ponovljivost rezultatov pri uporabi različnih serij istega protitelesa (10). Za doseganje ponovljivosti rezultatov moramo zagotoviti ustrezno kakovost že v proizvodnji protiteles, primerne pogoje njihovega transporta do uporabnika ter njihovo ustrezno shranjevanje in manipulacijo, poleg tega pa preprečiti morebitno kontaminacijo med njihovo uporabo (6, 10). Neupoštevanje omenjenih zahtev ima za posledico nižjo dejansko koncentracijo, s tem pa tudi aktivnost uporabljene protitelesa, glede na deklarirane vrednosti (6). Ponojljive rezultate lahko pridobimo le tako, da zagotovimo ustrezno kakovost vzorcev, uporabimo reagente z veljavnim rokom trajanja, natančno sledimo predpisanim postopkom, meritve pa izvajamo na pravilno umerjenih in vzdrževanih aparatih (8, 15).

Področje ponovljivosti rezultatov in zagotavljanja kakovosti najbolj natančno urejata standarda ISO 9001 (zagotavljanje kakovosti v različnih gospodarskih sektorjih in drugih dejavnostih) in ISO 13485 (doseganje kakovosti medicinskih pripomočkov) (14). Dobro izvedena validacija, ki jo opravi



proizvajalec oz. ponudnik posameznega protitelesa, mora dokazovati, da je to specifično in da so rezultati ponovljivi v okviru vsake od analizičnih metod, za katere je njegova uporaba specificirana. Kljub obsežnim podatkom dobavitelja pa mora uporabnik obvezno preveriti protitelo na svojih vzorcih in v postopkih, ki jih izvaja. Pri tem se mora zavedati, da protitelesa niso čudežno orodje, s katerimi lahko pridobimo 100-odstotno zanesljive rezultate brez natančne in kritične presoje njihovih lastnosti oz. učinkovitosti (10).

### 3.3 NOVEJŠI PRISTOPI K VALIDACIJI PROTITELES

Modernejše pristope za validacijo protiteles proti protein-skim antigenom je predlagala mednarodna delovna skupina za validacijo protiteles. Za preverjanje specifičnosti protiteles naj bi, glede na njihova priporočila, izbrali vsaj enega od naslednjih petih predlaganih pristopov: (i) gensko strategijo, (ii) ortogonalno strategijo, (iii) neodvisno strategijo, (iv) strategijo izražanja proteinov z dodanim označevalcem ali (v) afinitetno lovljenje molekul, ki jih protitelo prepozna, ter njihovo analizo z masno spektrometrijo (16). Pri genski strategiji validacije merimo signal v vzorcih celic ali tkiva, v katerih je tarčni gen ali epitop izbit ali manj izražen. Vsak signal, ki ga v teh okoliščinah zaznamo, kaže na navzkrižno reaktivnost preskušane protitelesa. Ta način je uporaben pri preverjanju specifičnosti protiteles proti sorodnim proteinom, ki niso človeškega izvora. Pri ortogonalni strategiji uporabimo set vzorcev z različno močno izraženim tarčnim proteinom in ga analiziramo z dvema komplementarnima metodama, in sicer z metodo, ki je neodvisna od uporabe reagenčnih protiteles, npr. s kvantitativno masno spektrometrijo, ter z imunološko metodo, npr. s prenosom western. Jakost izmerjenega signala naj bi v slednji močno korelirala s količino tarčnega proteina v vzorcu. Metodo neodvisne strategije lahko uporabimo takrat, ko imamo na voljo dve medsebojno neodvisni protitelesi, ki se vežeta na različni mesti tarčnega proteina. Sočasna vezava obeh protiteles, ki jo spremljamo npr. s fluorescenčno mikroskopijo s kolo-kalizacijo, dokazuje, da je v vzorcu prisoten protein, ki ga prepoznavata obe protitelesi. S to metodo preverjanja izključimo prisotnost nespecifičnih imunskih reakcij, saj je verjetnost, da bi se na nek nesorodni protein vezali obe protitelesi, minimalna. Protitelesa lahko validiramo tudi tako, da tarčni protein izrazimo z dodanim označevalcem. Kadar sta vzorca vezave validiranega protitelesa na tarčni protein in drugega protitelesa, ki je usmerjen proti uporabljenemu označevalcu, primerljiva, lahko izključimo navzkrižno reaktivnost. Pri zadnji predlagani strategiji (tj. afinitetno lovljenje

molekul) pa tarčni protein izoliramo z afinitetno kromatografijo s pomočjo tarčno specifičnih protiteles, in ga nato po eluciji in encimski razgradnji analiziramo z masno spektrometrijo. Preskušano protitelo je specifično, kadar prvi trije najpogosteje prisotni peptidi izhajajo iz pričakovanega tarčnega proteina (16).

## 4 POMOČ PRI IZBIRI USTREZNEGA PROTITELESA

Kot pomoč pri izbiri ustreznega protitelesa so uporabnikom na voljo različne spletne podatkovne baze. Na portalu Antibodypedia, za katerega skrbi konzorcij Human Protein Atlas, so zbrani validacijski podatki za več kot 1,8 milijona protiteles, uporabnih v različnih eksperimentalnih oz. analizičnih metodah (11). Omenjeno število predstavlja 250.000–500.000 osnovnih protiteles, ki prepoznavajo 27.000 različnih antigenov. Na portalu Antibodies-online so združeni rezultati validacijskih raziskav, ki jih za proizvajalce oz. ponudnike protiteles proti plačilu izvedejo neodvisni laboratoriji (17). Neprofiten in neodvisen portal, v katerega uporabniki protiteles vpisujejo ocene o uporabnosti določenega protitelesa za določeno metodo, je pAbmAb (18). AbMiner je plačljivo orodje, ki uporabnikom omogoča, da izberejo primerno, komercialno dostopno protitelo za raziskovalne namene, poleg tega pa tudi povezavo protitelesa z genom, ki kodira za tarčni antigen (19). Rezultati za protitelesa, objavljeni na tej spletni strani, so bili preverjeni z metodo prenosa proteinov western, in sicer z uporabo enakega nabora vzorcev 60 izbranih celičnih linij. Podatke o velikem številu komercialnih ponudnikov protiteles lahko najdemo tudi na spletni strani Antibodyresource (20).

Nekatera podjetja (npr. Abcam, Cambridge, Velika Britanija; Abgent, San Diego, Kalifornija, ZDA) želijo povečati svoj ugled tako, da spodbujajo uporabnike k posredovanju rezultatov testiranja njihovih protiteles na njihovi spletni strani. Raziskovalci se za pridobivanje informacij o posameznem protitelesu lahko obrnejo tudi neposredno na dobavitelja. Pogosto pa je dobavitelj protiteles le posrednik, zato ni sposoben odgovoriti na zastavljena tehnična vprašanja. Najprimernejša za usmerjanje uporabnikov in zagotavljanje učinkovitih in zanesljivih tovrstnih eksperimentalnih orodij raziskovalcem so še vedno tista podjetja, ki so vključena v vse stopnje izdelave protiteles, od načrtovanja antigena za imunizacijo, proizvodnje in validiranja oz. testiranja v okviru različnih imunskih testov (21).

Pri izbiri primerne protitelesa moramo od proizvajalca pridobiti vse potrebne podatke, s čimer se izognemo morebitni manipulaciji s strani komercialnih ponudnikov, ki nemalokrat isto protitelo prodajajo pod drugo oznako, ali pa celo pod isto oznako prodajo drugo protitelo (6).

## 5 ZAKLJUČEK

Glede na opisano kompleksnost uporabe protiteles in širok spekter antigenov, ki jih prepoznavajo, je težko izbrati preprost in uniformen način njihovega vrednotenja. Poleg tega postopki priprave in validacije protiteles v raziskovalni srenji niso dovolj cenjeni, zato jih je tudi težje objaviti, celo v primerjavi z objavami novih metod, v katerih so morda uporabili slabo opredeljena protitelesa (6). Avtorji člankov in recenzenti bi se morali zavedati, da so dobro opredeljena in validirana protitelesa izjemnega pomena za verodostojnost eksperimentov, njihovih rezultatov in zaključkov raziskav. K sreči je prišlo v zadnjih letih do pozitivnega zasuk, saj so zaradi morebitne neponovljivosti objavljenih rezultatov nekatere ugledne znanstvene revije začele izpostavljati pomen ustrezne validacije uporabljenih protiteles in zahtevati dokazila o njihovi preverjeni uporabnosti z metodami, ki smo jih omenili v tem prispevku (22). Dejstvo je tudi, da proizvajalci pogosto ne pokrijejo stroškov razvoja protiteles, razen npr. v primerih, ko se zanje zanimajo in jih nato odkupijo podjetja, ki izdelujejo eksperimentalne ali diagnostične testne komplete. Slabša stran te zgodbe pa je, da taka, nedvomno dovolj dobro ovrednotena protitelesa, ki zadostujejo kriteriju uporabnosti za določen namen, postanejo nedostopna raziskovalcem (6).

Ker so protitelesa biološki material, se moramo zavedati, da je med gojenjem monoklonskih celičnih linij, ki jih proizvajajo, zaradi mutacij možna izguba njihove edinstvene strukture in s tem tudi njihovih lastnosti. Lahko se zgodi tudi to, da protitelesa, ki smo jih dolgo časa uspešno uporabljali in z njimi razvili teste, niso več na voljo (6). Take težave bi v prihodnje lahko rešila priprava rekombinantnih protiteles (23). Vodja konzorcija Human Protein Atlas, opozarja, da so stroški take proizvodnje 10- do 100-krat višji v primerjavi s hibridno tehnologijo, ter da rekombinantna tehnologija ne zagotavlja enakih lastnosti in uporabnosti tako izdelanih protiteles, kot jih imajo klasična oz. izvorna monoklonska protitelesa (4, 16). Večina protiteles, katerih

rezultati so objavljeni v znanstvenih revijah, je tako še vedno monoklonskih, proizvedenih s hibridno tehnologijo, ali pa poliklonskih, proizvedenih z imunizacijo živali (24). Ker so uporabniki protiteles tisti, ki z njihovim izborom odgovarjajo za svoje eksperimentalne ali analize rezultate, imajo na voljo dva pristopa, in sicer da v celoti zaupajo podatkom komercialnih ponudnikov ali pa se zamudnega preverjanja oz. validacije njihovih lastnosti lotijo sami. Pri načrtovanju in izvedbi postopka validacije protiteles pa lahko uporabniki poiščejo pomoč tudi na spletni strani Evropske mreže priznanih laboratorijev, ki proizvajajo monoklonska protitelesa (9, 25).

## 6 ZAHVALA

Za pregled rokopisa se avtorici zahvaljujeva Vesni Galvani in Valeriji Kovač.

## 7 LITERATURA

1. Leenaars M, Hendriksen CF. *Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations*. *ILAR journal*. 2005;46(3):269-79.
2. Ritter MA, Ladyman HM. *Monoclonal Antibodies*: Cambridge University Press; 1995.
3. Easthope E. *The Advantages of Recombinant Antibodies* [Internet]. *Biocompare*; [updated 2018 Jun 5; cited 2019 Aug 23]. Available from: <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/349914-The-Advantages-of-Recombinant-Antibodies/>
4. Baker M. *Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies*. *Nature*. 2015;521(7552):274-6.
5. Berglund L, Bjorling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Szigartyo CA, et al. *A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies*. *Molecular & cellular proteomics* : MCP. 2008;7(10):2019-27.
6. Weller MG. *Quality Issues of Research Antibodies*. *Analytical chemistry insights*. 2016;11:21-7.
7. Vasilevsky NA, Brush MH, Paddock H, Ponting L, Tripathy SJ, Larocca GM, et al. *On the reproducibility of science: unique identification of research resources in the biomedical literature*. *PeerJ*. 2013;1:e148.
8. Taussig MJ, Fonseca C, Trimmer JS. *Antibody validation: a view from the mountains*. *New biotechnology*. 2018;45:1-8.
9. Roncador G, Engel P, Maestre L, Anderson AP, Cordell JL, Cragg MS, et al. *The European antibody network's practical guide to finding and validating suitable antibodies for research*. *mAbs*. 2016;8(1):27-36.





10. Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, Killiam E, Baquero M, Hanna J, et al. Antibody validation. *BioTechniques*. 2010;48(3):197-209.
11. *Antibodypedia* [Internet]. [updated 2019 Aug 22; cited 2019 Aug 26]. Available from: <https://www.antibodypedia.com/>
12. Marcon E, Jain H, Bhattacharya A, Guo H, Phanse S, Pu S, et al. Assessment of a method to characterize antibody selectivity and specificity for use in immunoprecipitation. *Nature methods*. 2015;12(8):725-31.
13. Biotech A. What is the difference between antibody's specificity and its selectivity? [Internet]. [updated 2018 Dec 13; cited 2019 Aug 27]. Available from: <https://aeonianbiotech.com/what-is-the-difference-between-antibodys-specificity-and-its-selectivity/>
14. Goodman SL. The 3rd Antibody Validation meeting: Bath UK 20-21 (st) September 2018. *F1000Research*. 2018;7:1989.
15. Baker M. How quality control could save your science. *Nature*. 2016;529(7587):456-8.
16. Uhlen M, Bandrowski A, Carr S, Edwards A, Ellenberg J, Lundberg E, et al. A proposal for validation of antibodies. *Nature methods*. 2016;13(10):823-7.
17. ELISA Kits - Antibodies - Research Products [Internet]. [updated 2019 Aug 26; cited 2019 Aug 26]. Available from: <https://www.antibodies-online.com/>
18. Kollision. pAbmAbs antibody blog and review site [Internet]. AARHUS; [updated 2019 Aug 23; cited 2019 Aug 27]. Available from: <http://pabmabs.com/>
19. AbMiner - omicX [Internet]. [updated 2019 Aug 26; cited 2019 Aug 27]. Available from: <https://omictools.com/abminer-tool>
20. Antibody Product Search | AntibodyResource.com [Internet]. [updated 2019 Aug 26; cited 2019 Aug 27]. Available from: <https://www.antibodyresource.com/>
21. Ascoli CA. The Antibody Dilemma [Internet]. [updated 2018 Oct 29; cited 2019 Aug 23]. Available from: <https://www.genengnews.com/magazine/253/the-antibody-dilemma/>
22. Goodman SL. The path to VICTORY - a beginner's guide to success using commercial research antibodies. *J Cell Sci*. 2018;131(10).
23. Bradbury A, Pluckthun A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature*. 2015;518(7537):27-9.
24. Johnson M. Recombinant Antibodies [Internet]. Labome; [updated 2019 Jul 23; cited 2019 Aug 23]. Available from: <https://www.labome.com/method/Recombinant-Antibodies.html>
25. EuroMAbNet: European Monoclonal Antibodies Network [Internet]. [updated 2019 Aug 23; cited 2019 Aug 23]. Available from: <https://www.euromabnet.com/>



Dr. Paul Janssen

**Ponosni smo** na preteklost. Ustvarjamo boljšo **prihodnost**.

Nadaljujemo z znanstvenim delom dr. Paul Janssen-a, ustanovitelja farmacevtskega podjetja Janssen in enega najbolj inovativnih znanstvenikov na področju farmacije.