

SARS-CoV 单克隆抗体的制备及抗原表位的初步鉴定

Development of Monoclonal Antibodies Against SARS-CoV and Identification of Antigenic Epitopes

周艳君, 华荣虹, 王云峰, 安同庆, 刘金霞, 杨金雨, 华玉卓, 童光志*

ZHOU Yan-Jun, HUA Rong-Hong, WANG Yun-Feng, AN Tong-Qing, LIU Jin-Xia, YANG Jin-Yu, HUA Yu-Zhuo, TONG Guang-Zhi*

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001

National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Harbin 150001, China

摘 要 参照已发表的 SARS 冠状病毒 BJ01 株基因序列, 利用计算机软件预测并选取该病毒 S、M、N 三种主要结构蛋白部分抗原性优势区域, 以编码 Gly-Pro-Gly 序列相连接合成两段嵌合基因 A 和 B。并分别克隆于 pGEX-6p-1 载体上用 IPTG 进行诱导表达, 以纯化的嵌合蛋白 A 和 B 为抗原, 分别免疫 BALB/c 小鼠制备单克隆抗体。利用单克隆抗体亚型检测试剂盒和 SARS-CoV 商品化 ELISA 检测试剂盒对其进行亚型和特异性鉴定。结果表明融合表达两段嵌合基因产物, 其大小分别为 34kD 和 35kD, Western blot 分析证实两种表达产物都能被 SARS 病人康复期血清所识别。获得了 6 株能稳定分泌特异性抗体的阳性细胞克隆株。亚型鉴定结果除 D3C5 为 IgG2a 外其他单抗均为 IgG1, 而且所有单抗的轻链均为 κ 链。特异性鉴定发现除 D3D1 外, 其余的 5 株单抗均能与 SARS-CoV 商品化 ELISA 检测试剂盒发生特异性反应。将 D3D1 与灭活后经超声波裂解的 SARS-CoV 进行 Western blot 分析, 发现它能特异性识别 180kD 的蛋白带。分别融合表达了 6 个 S 蛋白的寡肽 (S1-S6), 并对筛选出的单克隆抗体相对应的抗原表位进行了初步鉴定。结果发现单克隆抗体 D3D1 特异性识别 S2 基因表达产物 (S 蛋白的 447-458aa), D3C5 特异性识别 S5 基因表达产物 (S 蛋白的 789-799aa)。

关键词 SARS-CoV, 单克隆抗体, 抗原表位

中图分类号 Q785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0211-05

Abstract Based on the genomic sequence of SARS-CoV strain BJ101, antigenic immunodominant genes coding for the structure proteins of SARS-CoV were predicted by bio-informatics methods, and two chimeric genes A and B with multi-immunodominants lined up by Gly-Pro-Gly linker were synthesized. The chimeric genes were cloned into plasmid pGEX-6p-1 and expressed in *E. coli* with IPTG inducing. BALB/c mice were immunized with the purified recombinant fusion protein. The specificity of monoclonal antibodies were tested with a commercial ELISA kit for detecting antibody against SARS-CoV. The results showed that two peptides with molecular weights of 34kD and 35kD expressed by the two chimeric genes could be recognized by SARS patient convalescent serum in Western blot. Six positive hybridoma cell lines stably secreting monoclonal antibodies were selected. The subtype of monoclonal antibody D3C5 is IgG2a, and subtypes of all other five monoclonal antibodies are IgG1. Light chains of all monoclonal antibodies are kappa. With a commercial SARS-CoV antibodies detection ELISA kit, five out of six monoclonal antibodies were positively recognized. In western blot analysis with inactivated virus cultures, D3D1 specifically recognized a band of about 180 kD. To further analyse the epitopes corresponding to the monoclonal antibodies, six oligoes (S1-S6) from S gene were synthesized and expressed. The results showed that the monoclonal antibodies D3D1 and D3C5 specifically recognized expression

Received: October 12, 2004; Accepted: December 23, 2004.

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-451-82734181; E-mail: gztong@hvri.ac.cn

product of S2 and S5 oligoes, respectively. The S2 and S5 oligoes are corresponding to 447-458aa and 789-799aa of SARS-CoV S protein respectively.

Key words severe acute respiratory syndrome coronavirus virus (SARS-CoV), monoclonal antibody, antigenic epitope

SARS (severe acute respiratory syndrome) 是 2002 年 11 月最早发生于我国广东省的一种传染性强、严重威胁人类健康的传染性疾病,其病原体是一种新的冠状病毒^[1]。

该病毒是一个不分节段、正链 ssRNA 病毒,其基因组大小根据毒株不同约在 27~31kb 之间,包括 2 个大的开放阅读框,即 ORF1a 和 ORF1b,约占基因组全长的 2/3,分别编码两个与病毒复制酶形成相关的多聚蛋白,在 ORF1 下游有 8~10 个较小的 ORF,分别编码病毒的纤突蛋白(S)、囊膜蛋白(E)、膜蛋白(M)、核衣壳蛋白(N)以及一些较小的被推测为非结构性的蛋白^[2-5]。其中 S 蛋白是细胞受体结合蛋白,主要暴露在病毒粒子表面,在诱导病毒中和抗体的产生中起重要作用^[6]。N 蛋白和病毒 RNA 结合是构成病毒核心区域的主要组成成份^[7],另外 N 蛋白可能还参与 RNA 的合成^[8]。膜蛋白的 N-末端暴露在病毒的表面,易被糖基化,参与病毒包膜的形成,同时 M 蛋白还与 N 蛋白相互作用,在病毒包装过程中发挥重要作用^[9-11]。

根据病毒基因序列分析相应编码结构蛋白的免疫学性状,在全面认识病毒相关抗原结构的基础上,为 SARS 病毒的免疫学研究以及诊断方法的建立奠定基础。本研究拟通过选取合成的 SARS 病毒 S 蛋白、M 蛋白、N 蛋白的部分优势抗原活性区,将其表达纯化后,免疫 BALB/c 小鼠,以期获得特异性针对 SARS 病毒的单克隆抗体,为进一步对 SARS-CoV 感染的诊断和主要结构蛋白的 B 细胞表位的鉴定及其功能分析等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、实验动物与试剂

参考序列为 SARS-CoV BJ01 株基因(GenBank 登录号:AY278488)。SARS 病人康复期血清由华南农业大学廖明教授提供;灭活的 SARS-CoV、SARS-CoV 抗体 ELISA 检测试剂盒由军事医学科学院提供;实验用 BALB/c 小鼠由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。弗氏佐剂、HAT、HT、PEG 购于 SIGMA 公司;标准胎牛血清、RM-1640 购于 GIBCO 公司;单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购于 PERSEN 公司。

1.2 方法

1.2.1 嵌合基因的合成:利用 DNASTAR 生物学软件,根据 SARS-CoV BJ01 株 M、N、S 蛋白序列的亲水性、表面可及性、抗原指数和二级结构等分析其可能存在的抗原活性区域,选取 10 个推测的免疫优势区域,即 M1、M2、N1、N2、S1~S6 作为研究对象,将这 10 个区域组合为两段嵌合基因,即 S1~S4~M1~M2~N1~N2 和 S1~S2~S3~S4~S5~S6,各区域之间均以 Gly-Pro-Gly 相连接,构建成两段嵌合基因,分别命名为 A 和 B,同时分别在两段嵌合基因的 5' 和 3' 末端分别引入 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点(图 1),嵌合基因由宝生物工程(大连)有限公司合成。

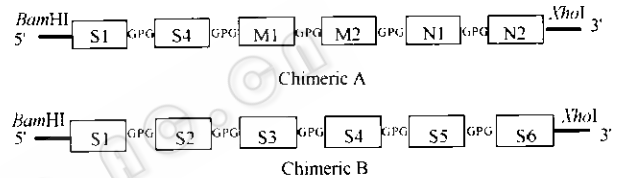


图 1 嵌合基因 A 和嵌合基因 B 的构建

Fig. 1 Structure of chimeric genes A and B

The locations of antigenic dominants on genes coding S, M or N proteins of SARS-CoV are: S1 (1270 - 1311nt), S2 (1339 - 1374nt), S3 (1678 - 1713nt), S4 (2260 - 2292nt), S5 (2365 - 2397nt), S6 (3415 - 3456nt), M1 (112 - 132nt), M2 (472 - 501nt), N1 (1 - 45nt), N2 (106 - 141nt). Linker GPG represents ggaccggga.

1.2.2 嵌合基因的表达与鉴定:将合成后的两个嵌合基因分别插入到原核表达载体 pGEX-6p-1 中进行诱导表达。将表达产物用 12% 的 SDS-PAGE 电泳进行鉴定,对已经获得表达的融合蛋白 A 和 B 分别用 SARS 病人康复期血清进行 Western blot 分析。

1.2.3 动物免疫:将表达的嵌合蛋白 A 和 B 用带 GST 标签的亲和层析柱 Glutathione Sepharose 4B 进行纯化,取纯化后的嵌合蛋白 A 和 B 各 50 μ g 用弗氏完全佐剂乳化,经皮下多点注射免疫 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,间隔 2 周用弗氏不完全佐剂加强免疫 2 次,取脾细胞融合前 3 天分别用 25 μ g 嵌合蛋白 A 和 B 经尾静脉加强免疫 1 次。

1.2.4 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选与纯化:融合前取正常小鼠的腹腔巨噬细胞作为饲养细胞,于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 24h,然后取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞以 1:7 的比例在融合剂 PEG3000 的作用下进行细胞融合,其融合过程按文献报道的

方法^[12]进行。融合后加入选择培养基 HAT 于 37℃ CO₂ 培养箱进行选择培养,约 7~10d,当有融合细胞出现时,更换 HT 培养基继续培养。同时分别用融合表达的嵌合蛋白 A 和 B 作为检测抗原,以 5μg/孔包被 96 孔板,对融合细胞的上清液进行间接 ELISA 检测以筛选阳性细胞克隆株。将经初步筛选得到的可疑阳性细胞克隆株用有限稀释法再进行 3~5 次单克隆,同时用间接 ELISA 方法进行检测,当得到纯一的分泌特异性抗体的杂交瘤细胞克隆时,再分别扩大培养,并冻存于液氮中。

1.2.5 单克隆抗体腹水的制备:取成年的 BALB/c 小鼠,于腹腔内预先注入 0.5mL 的液体石蜡,1 周后,再将筛选到的阳性杂交瘤细胞分别以 3 × 10⁵ 个/0.5mL 细胞的剂量注入小鼠的腹腔,约 10 d 左右,当小鼠的腹腔增大时,抽取腹水,5000r/min 离心取上清,-20℃ 保存备用。

1.2.6 单克隆抗体效价的测定及亚类鉴定:分别将腹水做 10 倍系列稀释,以融合表达的嵌合蛋白 A 和

B 为抗原,采用间接 ELISA 方法测定各抗体的效价。同时按照单克隆抗体亚型鉴定试剂盒操作说明对所得到的单克隆抗体进行亚型鉴定。

1.2.7 单克隆抗体的特异性鉴定:将制备的腹水按照商品化的 SARS-CoV ELISA 检测试剂盒操作说明进行间接 ELISA 检测。根据试剂盒提供的判定标准判定检测结果,并将与试剂盒反应介于阴性和阳性判定结果之间的腹水,用经灭活和超声波裂解后的 SARS-CoV 进一步通过 Western blot 分析鉴定。

1.2.8 抗原表位的初步鉴定:将嵌合基因 B 中的 S1,S2,S3,S4,S5,S6 基因片段的正义和反义序列送宝生物工程(大连)有限公司合成(合成序列见表 1)。各片段经退火后,分别克隆于经 *Bam*HI/*Xho*I 处理过的 pGEX6p-1 表达载体中,将测序鉴定正确的菌株用 IPTG 进行诱导表达,然后分别以 S1,S2,S3,S4,S5,S6 的表达产物为抗原,以空载体诱导表达产物为对照抗原包被 ELISA 反应板,对筛选出的单克隆抗体进行检测,以初步鉴定其抗原表位。

表 1 合成的基因片段序列及编码的多肽序列

Table 1 Synthesized oligoes and corresponding peptides

No.	Sequences of oligoes	Amino acids and locations on S protein
S1	5'-gatccaatactaggaacattgatgctacttcaactgtaataataataac-3'	NTRNIDATSTGNYN (424-437)
S2	5'-gatccaagcttaggccctttgagagagacatatactaatgtgtaa-3'	KLRPFERDISNV (447-458)
S3	5'-gatccgattcggcttcgagatcctaaacatctgaaatattataac-3'	DSVRDPKISEIL (560-571)
S4	5'-gatccgctgaacagatcgcaacacacgtgaagtgttctaa-3'	AEQDRNTREVF (754-764)
S5	5'-gatcccctgaccctctaaagccaactaagaggtctttttaa-3'	PDPLKPTKRSF (789-799)
S6	5'-gatccaaaaatcatacatcaccagatgttgatctggcgacattcataac-3'	KNHTSPDVLGDIS (1139-1152)
M1	5'-tattetaatcggacagggtt-3'	YSNRNRF (38-44)
M2	5'-tgtgacattaaggacctgccaaaagagatc-3'	CDIKDLPKEI (158-167)
N1	5'-atgctgataatggaccceaatcaaacacagtagtgecececegc-3'	MSDNGPQSNQRSAPR (1-15)
N2	5'-gcaaggccaaaacagcggcggccccaagggtttacc-3'	ARPKRRPQGLP (36-47)

Note: Those listed in the table are sequences of sense strand.

2 结果

2.1 嵌合基因 A 和 B 的表达与鉴定

将两个嵌合基因分别克隆于 pGEX-6p-1 原核表达载体中进行表达,分别得到了约 34kD 和 35kD 的可溶性蛋白(图 2)。将表达的融合蛋白 A 和 B 纯化后分别用 SARS 病人康复期血清进行 Western blot 分析,结果显示所表达的两个融合蛋白均能被 SARS 病人康复期血清所识别(图 2)。

2.2 杂交瘤细胞株的建立

用纯化的两种嵌合抗原分别免疫 BALB/c 小鼠,经细胞融合和 ELISA 筛选,纯化后共得到了 6 株能稳定分泌特异性抗体的阳性杂交瘤细胞,分别命名为: A1F4、A2B3、A2B7、A2D5、D3D1、D3C5。其中

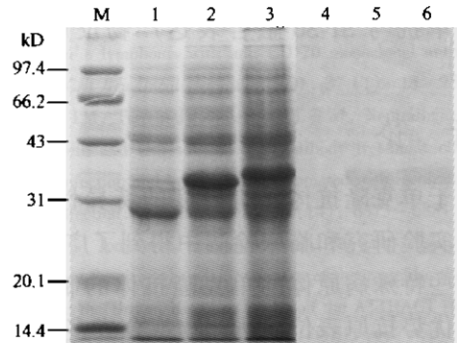


图 2 融合表达嵌合基因 A 和 B 的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

Fig.2 Analysis of GST-fusion expressed products of Chimeric A and B by SDS-PAGE and Western blot

M: Low MW protein marker; 1, 4: expression product of pGEX-6p-1 plasmid; 2, 5: expression product of Chimeric A; 3, 6: expression product of Chimeric B. In Western blot, antibody was from SARS patient convalescent serum.

A1F4、A2B3、A2B7、A2D5 是由嵌合基因 A 表达产物免疫鼠所获得;D3D1、D3C5 是由嵌合基因 B 表达产物免疫鼠所获得。

2.3 单克隆抗体效价的测定及亚类的鉴定

将 6 株阳性杂交瘤细胞分别注入小鼠腹腔,约 10d 左右小鼠腹腔明显胀大,抽取腹水,并分别将其经 10 倍系列稀释后以嵌合蛋白 A 和 B 为抗原测定抗体效价。其中,由于注入 D3D1、A2B3、A1F4 单克隆细胞株的小鼠分别于注入后 6~8d 死亡,产生的腹水较少,抗体效价也较低。按照单克隆抗体亚型鉴定试剂盒操作说明对以上实验中得到的 6 株单克隆抗体进行亚型鉴定,结果除 D3C5 为 IgG2a 外,其

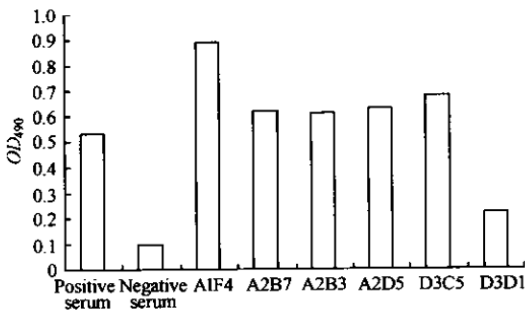


图3 SARS-CoV ELISA 对 6 株单克隆抗体细胞株腹水特异性检测

Fig.3 Monoclonal antibody detection by ELISA with SARS-CoV as antigen

2.5 抗原表位的初步鉴定

对筛选出的 6 株单克隆抗体与 S1, S2, S3, S4, S5, S6 的融合表达产物的 ELISA 反应结果显示,仅单抗 D3D1 特异性识别 S2 融合蛋白的表达产物,单抗 D3C5 特异性识别 S5 融合蛋白的表达产物,而其余四株单抗与 S1-S6 融合表达产物反应均为阴性(图 5)。

3 讨论

由于单克隆抗体具有高度的特异性和均一性,使其在实验研究和临床检测中得到了广泛应用。而对于一些特殊病原体的单克隆抗体的制备来说,以选用的优势抗原表位表达产物或合成多肽作为免疫原,无疑为研制鼠源性单克隆抗体带来极大方便。本研究就是在此前提下根据 B 细胞表位的特征,对 SARS 冠状病毒 S 蛋白、M 蛋白、N 蛋白的抗原表位进行预测,并选取其中 10 个可能包含优势表位的区域,将其分别通过 Gly-Pro-Gly 相互串联,人工分为两

他单抗均为 IgG1,而且所有单抗的轻链均为 κ 链。

2.4 单克隆抗体的特异性的鉴定

用商品化的 SARS-CoV ELISA 试剂盒检测制备的腹水,并在 490nm 的波长下测定其 OD 值,同时按照试剂盒操作说明进行结果判定,发现其中有 5 株单抗和试剂盒提供的阳性血清与试剂盒反应 OD 值均大于 0.5,呈阳性,而 D3D1 反应较弱,介于阳性血清与阴性血清反应值之间(图 3)。用经灭活和超声波裂解后的 SARS-CoV 对单抗 D3D1 进行 Western blot 分析,结果发现在约 180kD 处出现一条特异的反应带(图 4)。

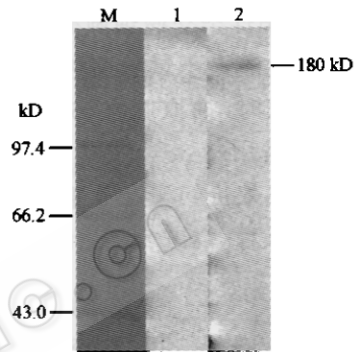


图4 单抗 D3D1 与灭活和超声波裂解后的 SARS-CoV 的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of monoclonal antibody D3D1 and inactivated SARS-CoV

M: protein marker; 1: VeroE6 cells without infection of SARS-CoV; 2: inactivated VeroE6 cells infected with SARS-CoV.

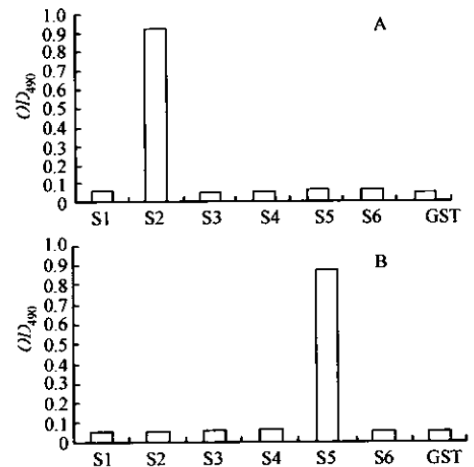


图5 单克隆抗体 D3D1(A)和 D3C5(B)抗原表位初步鉴定结果

Fig.5 Identification of antigenic epitopes with monoclonal antibodies D3D1(A) and D3C5(B)

段嵌合基因 A 和 B,并以融合蛋白的方式使之分别获得表达,而且表达的两个嵌合蛋白经 Western blot 分析,发现能被 SARS 病人康复期血清所识别,故证实这两个嵌合蛋白具有免疫学活性。据此我们以表

达的融合蛋白作为免疫原制备单克隆抗体,期望获得针对 SARS-CoV 特异性抗原表位的单克隆抗体。实验中我们获得了 6 株针对合成表位的特异性单克隆抗体,而且这 6 株单克隆抗体除 D3D1 的腹水外,其他单抗腹水均与 SARS-CoV ELISA 诊断试剂盒发生反应。将 D3D1 腹水与 SARS 病毒裂解产物进行 Western blot 分析,结果发现它能与 SARS-CoV 约 180kD 的蛋白带发生特异性反应,推测其可能主要是针对 S 蛋白的单克隆抗体,由此证实所获得的 6 株单克隆抗体都可以识别 SARS-CoV,这将为 SARS 冠状病毒结构蛋白及其功能研究以及抗原表位的分析和精确定位起到了促进作用。

虽然在 SARS 肆虐之际,鼠源性单克隆抗体并不能解燃眉之急,但是从 SARS 其他相关研究和建立免疫学诊断方法角度来看,单克隆抗体的研制却是必不可少的。而且随着分子生物学技术的发展,人们将鼠源单克隆抗体进行人源化改造已有一些成功的例子^[13-15],这就为单克隆抗体进入 SARS 的诊断和治疗提供了很好的应用前景。另外对 SARS 病毒抗原表位的分析和精确定位,也是研究该病的诊断及疫苗分子设计等的重要手段。在实验中利用分段合成的 S1, S2, S3, S4, S5, S6 融合表达产物对由嵌合基因表达产物免疫鼠所获得的 6 株单抗抗原表位进行了初步鉴定,结果显示 D3D1、D3C5 分别针对的是 SARS-CoV S 蛋白的 S2(447-458aa)和 S5(789-799aa)编码的肽段。而其余 4 株单抗则不识别 S1-S6 融合表达产物,推测这四株单抗可能是针对合成的 M 蛋白或 N 蛋白的特异性肽段。以前的研究已经证实 S 蛋白是由靠近 N 端的球状结构域 S1 和靠近 C 端的棒状结构域 S2 两部分组成,其中在球状部分 S1 中具有参与受体细胞识别的特定位点^[10,16],最近,Wong 等报道了与 SARS-CoV 受体 ACE2 结合的部分位于 S 蛋白的 318-510 位氨基酸之间^[17],而在本研究中我们鉴定单抗 D3D1 识别的抗原表位 S2(447-458aa)也包含在这一区域中;在棒状结构域 S2 中包括 N/M/C Helix 和将整个 S 蛋白固定在病毒外壳膜上的穿膜部分^[10,16],试验中鉴定单抗 D3C5 识别的表位 S5(789-799aa)则位于 S 蛋白的棒状区域。虽然这两个抗原表位在病毒侵入宿主细胞的过程中究竟发挥怎样的作用尚不得知,但这一鉴定结果将会对以后进行深入地探索提供有益的帮助。另外,在本研究中所选定的 10 个表位经嵌合表达后虽然能够诱导小鼠产生针对 SARS-CoV 的特异性抗体,但是要充分证明诱导的抗体是否具有中和病毒感染

的生物学活性,仍然需要进一步通过病毒中和试验来加以确认。

REFERENCES(参考文献)

[1] Nie QH, Luo XD, Zhang JZ *et al.* Current status of severe acute respiratory syndrome in China. *World J Gastroenterol*, 2003, 9 (8): 1635 - 1645

[2] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, 300(5624): 1394 - 1399

[3] Marra MA, Jones SJM, Astell CR *et al.* The genome sequence of the SARS associated coronavirus. *Science*, 2003, 300 (5624): 1399 - 1404

[4] de Haan CA, Volders H, Koetzner CA *et al.* Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *J Virol*, 2002, 76 (24): 12491 - 12502

[5] Ruan YJ, Wei CL, Vega VB *et al.* Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet*, 2003, 361 (9371): 1779 - 1795

[6] Morkett APA, Cavanagh D, Brown TDK. Monoclonal antibodies directed against viron proteins. *J Gen Virol*, 1984, 65:2281 - 2286

[7] Enjuanes L, Sola I, Almazan F *et al.* Coronavirus derived expression systems. *Adv Exp Med Biol*, 2001, 494:309 - 321

[8] Narayanan K, Maeda A, Maeda J *et al.* Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cell. *J Virol*, 2000, 74(17):8127 - 8134

[9] Krueger DK, Kelly SM, Lewicki DN *et al.* Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation of membrane fusion. *J Virol* 2001, 75(6):2792 - 2802

[10] Gallagher TM, Buchmeier MJ. Coronavirus spike protein in viral entry and pathogenesis. *Virology*, 2001, 20:279 (2):371 - 374

[11] Taguchi F, Shimazaki YK. Functional analysis of an epitope in the S2 subunit of the murine coronavirus spike protein: involvement in fusion activity. *J Gen Virol*, 2000, 81 (12):2867 - 2871

[12] Zhang GS(章谷生), Rong BP(容秉培), Eds. Application of Monoclonal Antibody in Medicine. Shanghai Science and Technology Publishing House(上海科学技术出版社), 1987, pp. 299 - 300

[13] Sacchi S, Federico M, Dastoli G *et al.* Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD 20 monoclonal antibody Rituximab. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001, 37 (1): 13 - 25

[14] Haynes LM, Tonkin J, Anderson LJ *et al.* Neutralizing anti-F glycol-protein and anti-substance P antibody treatment effectively reduces infection and inflammation associated with respiratory syncytial virus infection. *J Virol*, 2002, 76 (14): 6873 - 6881

[15] Kobelt G, Jonsson L, Young A *et al.* The cost-effectiveness of infliximab (Remicade) in the treatment of rheumatoid arthritis in Sweden and the United Kingdom based on the ATTRACT study. *Rheumatology (Oxford)*, 2003, 42 (2): 326 - 335

[16] Krueger DK, Kelly SM, Lewicki DN *et al.* Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation of membrane fusion. *Virology*, 2001, 75(6):2792 - 802

[17] Wong SK, Li W, Moore MJ *et al.* A 193-amino-acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds *angiotensin*-converting enzyme 2. *Biol Chem*, 2004, 279 (5): 3197 - 201