

Sàng lọc các hợp chất tương tự nucleotide và nucleoside ức chế enzym RNA-dependent RNA polymerase của SARS-CoV-2 bằng phương pháp docking phân tử nhằm điều trị bệnh COVID-19

Tạ Thị Thu Hằng¹, Nguyễn Bảo Kim¹, Lê Đăng Huy², Bùi Thanh Tùng^{1*}

¹Trường Đại học Y dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trường Đại học Dược Hà Nội

Ngày nhận bài 8/6/2021; ngày chuyển phản biện 14/6/2021; ngày nhận phản biện 23/8/2021; ngày chấp nhận đăng 27/8/2021

Tóm tắt:

Đại dịch COVID-19 do virus SARS-CoV-2 gây ra hiện đang là mối quan tâm lớn của toàn nhân loại. Enzym RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) của SARS-CoV-2 tham gia điều hòa quá trình nhân lên của virus được đánh giá là một mục tiêu điều trị tiềm năng để kìm hãm sự lây nhiễm của SARS-CoV-2. Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành sàng lọc các hợp chất tương tự nucleotide có khả năng ức chế enzym SARS-CoV-2 RdRp bằng cách sử dụng phương pháp docking phân tử. Quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski được sử dụng để đánh giá đặc tính giống thuốc của các hợp chất tiềm năng. Các thông số được động học của các hợp chất tiềm năng được đánh giá bằng công cụ pkCSM. Dựa trên các công bố trước đây, bài báo đã thu thập được 100 hợp chất tương tự nucleotide và nucleoside. Kết quả cho thấy, có 18 hợp chất có tác dụng ức chế enzym SARS-CoV-2 RdRp mạnh hơn cả chất chứng dương remdesivir. Phân tích quy tắc Lipinski cho thấy, 17/18 hợp chất đó có đặc tính giống thuốc. Các hợp chất: novuridin, didanosine, sofosbuvir, puromycin, defibrotite, gemcitabine và nikkomycins là các chất có năng lượng âm nhất và đặc tính được động học dễ hấp thu, không bị chuyển hóa ở gan, thải trừ qua thận và có thể có độc tính với gan. Chính vì vậy, cần tiến hành các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* để có thể phát triển các hợp chất này thành thuốc điều trị COVID-19.

Từ khóa: *in silico*, molecular docking, remdesivir, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), SARS-CoV-2.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Kể từ khi hội chứng hô hấp cấp tính COVID-19 lần đầu tiên được phát hiện tại thành phố Vũ Hán, tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc, giới khoa học cũng như toàn nhân loại đã phải đối mặt với một thách thức chưa từng có để tìm ra phương pháp điều trị căn bệnh này. Với tốc độ lây lan nhanh chóng của nó, tính đến ngày 01/6/2021, đã có 171 triệu trường hợp lây nhiễm và 3,57 triệu trường hợp tử vong được báo cáo [1]. Tại Việt Nam, đã ghi nhận 7.625 trường hợp mắc và 48 trường hợp tử vong. Các triệu chứng lâm sàng thường được nhận thấy sau 5 hoặc 6 ngày sau khi nhiễm bệnh nhưng thời gian ủ bệnh có thể lên đến 14 ngày [2]. Sốt, ho, khó thở, mệt mỏi là những triệu chứng phổ biến nhất.

Virus SARS-CoV-2 có bộ gen RNA sợi đơn với kích thước 29,9 kb. Nó bao gồm 14 khung đọc mở (ORF), mã hóa cho tổng số 27 protein được chia thành protein cấu trúc và không cấu trúc [3]. RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) là một enzym quan trọng đối với vòng đời RNA của virus, tham gia vào quá trình phiên mã và dịch mã của bộ gen virus SARS-CoV-2. Do đó, RdRp được coi là mục tiêu chính

cho các chất ức chế giúp điều trị virus SARS-CoV-2 [4-7].

Docking phân tử là một kỹ thuật mô hình hóa để dự đoán vị trí và cấu hình thuận lợi mà phân tử cơ chất (phối tử) có thể liên kết với phân tử protein (đích tác dụng). Phương pháp này tiết kiệm thời gian và chi phí trong việc sàng lọc các hợp chất so với phương pháp thực nghiệm [8].

Remdesivir là một loại thuốc kháng virus đã được Cục Quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (FDA) chấp thuận để điều trị COVID-19 cho những bệnh nhân phải nhập viện [9]. Là một chất tương tự nucleotide, remdesivir có tác dụng ức chế enzym SARS-CoV-2 RdRp [10]. Các hợp chất tương tự nucleotide là các este phosphat của nucleoside, là tiểu đơn vị của axit deoxyribonucleic (DNA) và axit ribonucleic (RNA). Chúng bao gồm một gốc đường được liên kết với một gốc purin hoặc pyrimidin thông qua liên kết β -N-glycosidic [11]. Trên thực tế, cũng đã có những hợp chất tương tự nucleotide như cidofovir, abacavir, stavudine và entecavir được nghiên cứu trở thành thuốc và được FDA phê duyệt để điều trị các bệnh nhiễm virus khác nhau [12-15]. Do đó, dựa trên giả thuyết rằng, những chất có cấu trúc tương đồng được kỳ vọng là có hoạt tính sinh học giống

*Tác giả liên hệ: Email: tungasia82@gmail.com

Screening nucleotide and nucleoside analogues as potential inhibitors of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase by the molecular docking method for the treatment of COVID-19

Thi Thu Hang Ta¹, Bao Kim Nguyen¹, Dang Huy Le²,
Thanh Tung Bui^{1*}

¹University of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi

²Hanoi Pharmaceutical University

Received 8 June 2021; accepted 27 August 2021

Abstract:

The COVID-19 pandemic triggering acute respiratory syndrome is a major global health concern. The SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) enzyme regulating viral replication has been evaluated as a potential therapeutic target for inhibition of the infection of SARS-CoV-2. In this study, we evaluated the ability of RNA-dependent RNA polymerase drug inhibitors by using molecular docking *in silico* model. Lipinski's rule of Five was used to evaluate drug-like properties of potential compound. Pharmacokinetic parameters of potential compounds were assessed using the pkCSM tool. Based on previous publications, we have collected 100 compounds. The results exhibited that 18 compounds have RdRp inhibitory activity stronger than the remdesivir as reference compounds. The Lipinski's rule of Five showed that 17 among 18 compounds had proprietary drug-likeness. Compounds including novuridine, didanosine, sofosbuvir, puromycin, defibrotite, gemcitabine, and nikkomycins are the most negative energies and have pharmacokinetic good absorption, not metabolised in the liver, excreted by the kidney and may have hepatotoxicity properties. Therefore, it is necessary to conduct the *in vitro* and *in vivo* assays to develop these compounds into drugs for COVID-19 treatment.

Keywords: *in silico*, molecular docking, remdesivir, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), SARS-CoV-2.

Classification number: 3.4

nhau, chúng tôi tiến hành sàng lọc các hợp chất tiềm năng có cấu trúc tương tự nucleotide và nucleoside có khả năng ức chế enzym RdRp để điều trị bệnh COVID-19.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Mô hình docking

Chuẩn bị cấu trúc protein: cấu trúc enzym 3D của SARS-CoV-2 RdRp (PDB ID: 7BV2) được truy xuất từ Ngân hàng dữ liệu protein RCSB (www.rcsb.org). Trong phức hợp 7BV2 đã chứa sẵn ligand đồng kết tinh là [(2~{R}),3~{S},4~{R},5~{R})-5-(4-azanylpyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-5-cyano-3,4-bis (oxidanyl)oxolan-2-yl] methyl dihydrogen phosphate. Vùng hoạt động (binding site) của protein được xác định bằng phần mềm MOE và Discovery Studio Visualizer 4.0. Để chuẩn bị cho quá trình docking, tất cả các phân tử nước và đồng tinh thể đã được loại bỏ khỏi phân tử protein bằng phần mềm Discovery Studio Visualizer 4.0. Các phân tử hydrogen sẽ được thêm vào bằng phần mềm Autodock Vina trước khi tái lập vùng hoạt động của protein sử dụng phần mềm MGL Autodock tools 1.5.6. Vùng hoạt động của enzym SARS-CoV-2 RdRp được xác định trong một hộp lưới có kích thước 104x80x118 Å, trung tâm (x,y,z) là (87,682, 89,834, 107,939). Sau đó lưu protein dưới định dạng pdbqt để chuẩn bị cho quá trình docking.

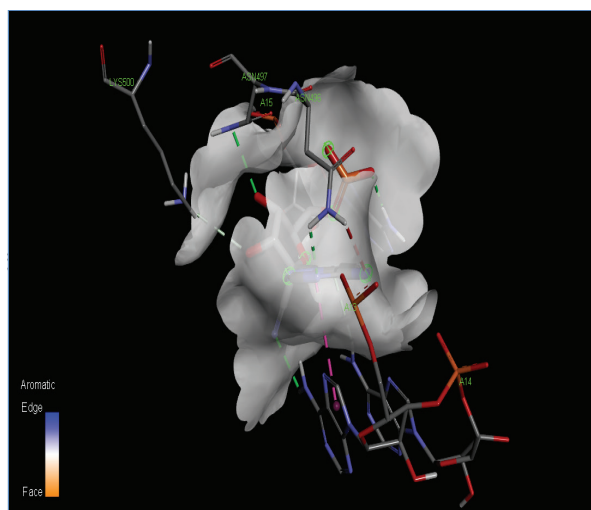
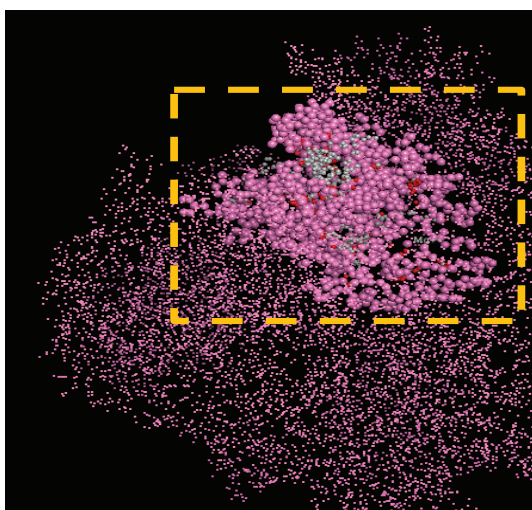
Chuẩn bị cấu trúc phối tử: dựa trên các công bố trước đây, chúng tôi thu thập được 100 hợp chất tương tự nucleotide. Cấu trúc 3D của những hợp chất này được lấy từ cơ sở dữ liệu PubChem ở định dạng sdf, sau đó chuyển thành định dạng pdb bằng phần mềm Chimera [16, 17]. Tiếp theo, các phối tử được tối ưu hóa bằng phần mềm Avogadro sử dụng phương pháp Gradient liên hợp (Conjugate Gradients) rồi chuyển thành định dạng pdbqt bằng phần mềm Autodock Tool [18, 19].

Thực hiện docking phân tử: các phối tử được dock vào trung tâm hoạt động của protein bằng phần mềm Autodock vina. Sử dụng phần mềm Discovery Studio Visualizer 2020 giúp quan sát các liên kết giữa protein và các hợp chất sàng lọc được.

Đánh giá kết quả docking: để đánh giá kết quả quá trình docking, phối tử từ đồng tinh thể đã được re-dock lại vào vị trí hoạt động của mục tiêu. Quá trình được thực hiện thành công nếu giá trị độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD) nhỏ hơn hoặc bằng 1,5 Å.

Đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski

Quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski được sử dụng để đánh giá đặc tính giống thuốc của các hợp chất [20]. Chúng tôi sử dụng công cụ online (<http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>) để đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski [21].



Hình 1. Vùng hoạt động của RdRp được xác định bằng phần mềm MOE (trái) và Discovery Studio Visualizer 2020 (phải).

Dự đoán các thông số dược động học

Kết quả dự đoán các thông số về dược động học bao gồm hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính (ADMET) của các hợp chất tiềm năng được đánh giá qua công cụ pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) [22].

Kết quả

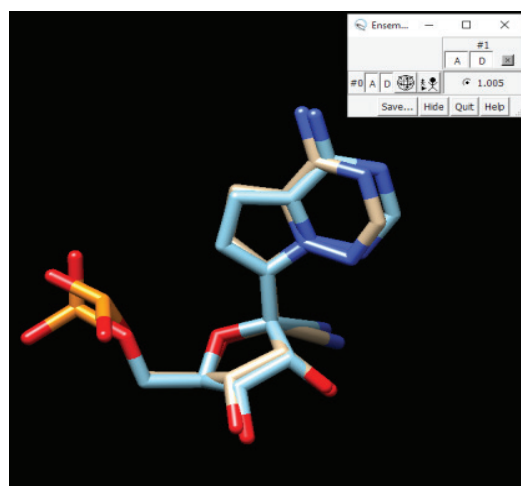
Vùng hoạt động của protein

Vùng hoạt động (vị trí liên kết) của protein RdRp được xác định bằng công cụ SiteFinder của phần mềm MOE và Discovery Studio Visualizer 2020 (hình 1). Đồng thời, các acid amin quan trọng ở vùng hoạt động này cũng được xác định, bao gồm: ASN496, LYS593, THR591, GLY590, LEU758, CYS813, ASP760, ASP761, ASP618, TYR619, PRO620, LYS621, CYS622, ASP623.

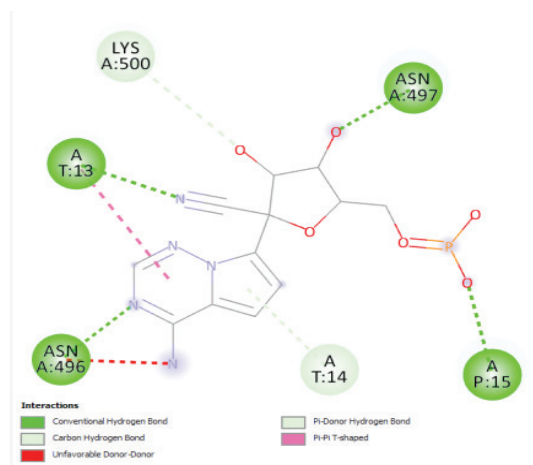
Đánh giá mô hình docking

Trước khi sàng lọc các hợp chất, phối tử đồng kết tinh được tách ra khỏi phức hợp 7BV2 rồi được re-dock lại vào vị trí hoạt động của mục tiêu để xác định độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD), từ đó đánh giá tính phù hợp của các thông số docking. Kết quả sau khi docking lại phối tử đồng kết tinh thể thu được giá trị RMSD là 1,005 Å (hình 2). Giá trị này thỏa mãn điều kiện RMSD nhỏ hơn 1,5 Å, chứng tỏ kết quả docking phân tử vào mục tiêu là đáng tin cậy.

Sự tương tác giữa phối tử đồng kết tinh và RdRp được thể hiện như trong hình 3. Từ hình ta có thể thấy được phối tử đồng kết tinh hình thành liên kết với nhiều acid amin như: liên kết conventional hydro với ASN496, ASN497; liên kết hydro carbon với LYS500 và liên kết với một số nucleobase như A13, A14, A15.



Hình 2. Kết quả re-dock của phối tử đồng kết tinh.



Hình 3. Tương tác 2D của ligand đồng kết tinh với SARS-CoV-2 RdRp.

Bảng 1. Kết quả docking các phân tử hợp chất vào đích RdRp với mức năng lượng liên kết tương ứng.

STT	Tên	Năng lượng liên kết (kcal/mol)	STT	Tên	Năng lượng liên kết (kcal/mol)
1	Zidovudin	-7,1	52	6-Azauridin	-6,6
2	Tenofovir alafenamit	-7,6	53	Mizoribin	-6,9
3	Zalcitabin	-7,5	54	Acyclovir fleximer 1	-6,1
4	Adefovir dipivoxil	-7,3	55	Acyclovir fleximer 2	-6,4
5	Defibrotite	-8,5	56	Acyclovir fleximer 3	-5,2
6	Emtricitabin	-6,1	57	CNDAC	-6,8
7	Azacitidin	-8,1	58	Fluorocyclopentenylcytosin	-6,9
8	Famciclovir	-5,6	59	TaraC	-6,2
9	Sofosbuvir	-8,7	60	8-amino-adenosin	-7,0
10	Gemcitabine	-8,5	61	8-chloro-adenosin	-7,3
11	Nelarabin	-7,2	62	ARC	-4,0
12	Penciclovir	-5,7	63	Valopicitabin	-7,5
13	Stavudin	-6,3	64	Mericitabin	-7,7
14	Decitabin	-6,6	65	Elvucitabin	-6,2
15	Telbivudin	-6,6	66	Apricitabin	-6,1
16	Abacavir	-7,1	67	Cyclopropavir	-7,1
17	Fluorouracil	-5,9	68	Festonavir	-7,5
18	Acyclovir	-6,5	69	4'-thio2'-deoxycytidin	-6,1
19	Entecavir	-7,2	70	5aza-4'-thio2'-deoxycytidin	-6,0
20	Trifluridin	-7,1	71	Zebularin	-7,0
21	Ganciclovir	-7,8	72	5-fluorouracil	-5,7
22	Tegafur	-5,9	73	6-thioguanin	-5,5
23	Ribavirin	-6,5	74	6-Mercaptopurin	-4,9
24	Neplanocin	-5,6	75	6-Azacytidin	-6,8
25	Acid Inosinic	-7,4	76	3-Deazauridin	-6,6
26	Tenofovir	-6,0	77	Fludarabin phosphat	-6,9
27	Tezacitabin	-6,8	78	2'-deoxycofomycin	-6,8
28	Triazavirin	-6,0	79	2-Chloro-2'-deoxyadenosin	-7,0
29	Galidesivir	-7,3	80	2'-Deoxy-2'-methylenecytidin	-6,5
30	Ropidoxuridin	-5,3	81	5-Ethyldeoxyuridin	-6,6
31	Acadesin	-6,9	82	Brivudin	-5,9
32	8-azaguanin	-6,1	83	5-(2-Chloroethyl)-2'-deoxyuridin	-6,0
33	GS-441524	-7,6	84	E-5-(2-Iodovinyl)-2'-deoxyuridin	-5,5
34	Troxacitabin	-6,2	85	HPMPA	-6,0
35	Cyclic GMP	-8,2	86	Novuridin	-8,8
36	Cyclic AMP	-7,6	87	Alovudin	-6,5
37	Cytarabin (Ara-C)	-6,4	88	Neosidomycin	-7,9
38	2-CdA	-6,8	89	Psicofuranin	-8,4
39	Fludarabine	-6,6	90	Tubercidin	-7,3
40	Didanosine	-8,7	91	Coformycin	-7,2
41	Vidarabine (Ara-A)	-6,9	92	Puromycin	-8,7
42	Valaciclovir	-6,4	93	Blasticidin S	-8,0
43	Brivudin	-6,1	94	Bamicetin	-9,8
44	Valganciclovir	-6,9	95	Nucleocidin	-7,7
45	Lamivudin	-6,0	96	Nikkomycins	-8,5
46	Cidofovir	-5,6	97	Cladribin	-7,7
47	Lobucavir	-6,8	98	Clofarabin	-7,1
48	Adefovir	-5,9	99	Floxuridin	-6,7
49	Idoxuridin	-6,3	100	EIDD-2801	-7,9
50	Immucillins	-6,7	101	Chứng dương Remdesivir	-7,7
51	β -d-N4-hydroxycytidin	-7,0			

Sàng lọc các hợp chất ức chế RdRp

Sau khi chuẩn bị các phối tử, tiến hành docking toàn bộ 100 hợp chất thu thập được vào enzym RdRp để tìm kiếm các hợp chất có khả năng ức chế RdRp. Kết quả thu được ở bảng 1.

So sánh năng lượng liên kết của phối tử đồng kết tinh với 100 hợp chất, chúng tôi thu được 18 hợp chất tối ưu so với phối tử đồng kết tinh remdesivir (-7,7 kcal/mol).

Kết quả đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski

Các hợp chất được gọi là “giống thuốc” khi chúng đáp ứng ít nhất 2 trong 5 tiêu chí theo quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski: (1) Khối lượng phân tử <500 Da; (2) Có tính ưa dầu cao (LogP nhỏ hơn 5); (3) Không có nhiều hơn 5 nhóm cho liên kết hydrogen; (4) Không có nhiều hơn 10 nhóm nhận liên kết hydrogen; (5) Độ khúc xạ mol phải nằm trong khoảng 40-130. Kết quả đáp ứng quy tắc 5 tiêu chí theo Lipinski của các hợp chất trên được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski.

STT	Hợp chất	Trọng lượng phân tử	Nhóm cho liên kết hydrogen (HBD)	Nhóm nhận liên kết hydrogen (HBA)	logP	Độ khúc xạ mol (MR)	Hợp chất giống thuốc
1	Defibrotite	444	4	9	3,370198	115,334564	Có
2	Azacitidin	244	5	9	-2,796001	55,109795	Có
3	Sofosbuvir	529	3	12	1,999300	123,152649	Có
4	Gemcitabine	263	4	7	-0,993700	54,697998	Có
5	Ganciclovir	255	5	8	-2,100000	60,020195	Có
6	Cyclic GMP	345	5	11	-1,653200	71,542686	Có
7	Didanosine	236	2	6	-0,043800	58,074993	Có
8	Mericitabin	399	2	9	1,130000	96,686371	Có
9	Novuridin	253	1	9	0,070980	55,173691	Có
10	Neosidomycin	348	4	7	-0,148599	87,392975	Có
11	Psicofuranin	297	6	9	-2,833500	68,767586	Có
12	Puromycin	471	5	11	-0,793701	123,256668	Có
13	Blasticidin S	422	9	13	-1,923828	107,118393	Có
14	Bamicetin	604	8	15	-1,378799	152,718018	Không
15	Nucleocidin	364	6	11	-1,374200	74,813385	Có
16	Nikkomycins	495	9	15	-3,134398	112,759758	Có
17	Cladribin	285,5	4	7	-0,297400	66,364990	Có
18	EIDD-2801	329	4	10	-1,142801	75,353088	Có

Kết quả từ bảng 2 cho thấy, hầu hết các hợp chất đều thỏa mãn lớn hơn hoặc bằng 2/5 tiêu chí trong quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski, ngoại trừ bamicetin. Mặc dù bamicetin cho kết quả mức năng lượng âm nhất (-9,8 kcal/mol) nhưng lại không thỏa mãn quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski nên khả năng phát triển thành thuốc bị hạn chế. Trong số 17/18 hợp chất thỏa mãn, chúng tôi chọn ra 7 chất có năng lượng liên kết âm

Bảng 3. Tương tác giữa các phối tử với các acid amin và nucleobase của 7 hợp chất có năng lượng âm nhất.

STT	Tên	Năng lượng liên kết (kcal/mol)	Các acid amin và nucleobase liên kết	Biểu diễn tương tác 2D của các hợp chất với acid amin và nucleobase
1	Novuridin	-8,8	A13, A19, GLY590, THR591, LEU758, ASP865	
2	Didanosine	-8,7	A13, A14, A19, U18, GLY590, THR591, LYSS93, LEU758, CYS813	
3	Sofosbuvir	-8,7	A13, A14, A15, A19, U10, U12, U17, U18, ASN496	
4	Puromycin	-8,7	A11, A13, A14, A15, A19, U12, U18, G16, ALA547, ILE548, PHE441	
5	Defibrotite	-8,5	A13, U18, A19, G16, ASN496	
6	Gemcitabine	-8,5	U18, GLY590, THR591, LYSS93	
7	Nikkomycins	-8,5	A19, U17, G16, U18, U20, LYSS45, TYR546, ALA547, ILE548	

nhất gồm: novuridin, didanosine, sofosbuvir, puromycin, defibrotite, gemcitabine và nikkomycins để tiến hành phân tích và đánh giá đặc tính dược động học (hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính) của những chất này.

Tương tác giữa 7 hợp chất có năng lượng liên kết âm nhất với các acid amin và nucleotit được tổng hợp trong bảng 3. Kết quả cho thấy, các liên kết phối tử - acid amin và phối tử - nucleobase đều có sự tương đồng so với phối tử đồng tinh thể.

Đánh giá các thông số dược động học và độc tính

Để đánh giá hiệu quả của các hợp chất trên, chúng tôi tiếp tục đánh giá thông số dược động học và độc tính (ADMET) thông qua việc sử dụng pkCSM. Bảng 4 là kết quả dự đoán ADMET của 7/17 chất có năng lượng liên kết âm nhất và thỏa mãn quy tắc Lipinski 5.

Về hấp thu, khả năng hấp thu của một chất được đánh giá dựa vào các thông số: độ tan trong nước, tính thấm qua màng Caco2 và khả năng hấp thu ở ruột (người). Một chất được cho là có khả năng thấm tốt khi tính thấm qua màng Caco2 ($\log P_{app}$ trong 10^{-6} cm/s) có giá trị lớn hơn 0,9. Kết quả từ bảng 4 cho thấy, cả 7 chất đều có giá trị nhỏ hơn 0,9, khả năng thấm qua màng thấp. Tuy nhiên, khả năng hấp thu ở ruột người (HIB) của hầu hết các hợp chất này đều khá tốt do HIB của chúng đều lớn hơn 30%, trừ hợp chất nikkomycins không hấp thu ở ruột. Đặc biệt, 2 hợp chất defibrotite và novuridin cho thấy % hấp thu tốt, với giá trị HIB lớn hơn 70%.

Về phân bố, giá trị logBB lớn hơn 0,3 được cho là có khả năng hấp thu tốt qua hàng rào máu não. Kết quả cho thấy, logBB của tất cả các hợp chất đều nhỏ hơn 0,3, không qua hàng rào máu não.

Về chuyển hóa, hệ cytochrome P450 là hệ enzym quan trọng trong quá trình chuyển hóa thuốc ở gan với hai CYP quan trọng là CYP3A4 và CYP2D6. Ở đây, hợp chất defibrotite là cơ chất của CYP3A4, cho thấy chúng có thể bị chuyển hóa ở gan. Ngoài ra, defibrotite được dự đoán có khả năng ức chế CYP3A4. Sáu hợp chất còn lại đều không là cơ chất và không ức chế hai enzym quan trọng này, do đó chúng có thể không bị chuyển hóa ở gan.

Về thải trừ, các hợp chất đều có khả năng thải trừ qua thận, trong đó didanosine thải trừ nhanh nhất với độ thanh thải toàn phần ($\log \text{ml/min/kg}$) là 0,94 và defibrotite thải trừ qua thận chậm nhất: -0,107.

Bảng 4. Kết quả đánh giá ADMET.

Hấp thu	Thông số						
	Defibrotit	Novuridin	Didanosin	Gemcitabin	Sofosbuvir	Puromycin	Nikkomycins
Tan trong nước (log mol/l)	-3,019	-3,293	-2,33	-2,749	-3,953	-2,811	-2,892
Tính thấm màng Caco2 (log P _{app} trong 10 ⁻⁶ cm/s)	0,195	0,017	0,175	-0,053	0,472	-0,511	-0,714
Hấp thu ở ruột (người) (%)	79,123	71,37	68,748	68,491	68,308	59,883	0
Phân bố							
Thể tích phân bố (người) (log L/kg)	-0,525	-0,101	-0,14	-0,283	-0,728	0,633	-0,069
Tính thấm hàng rào máu não (log BB)	-2,031	-0,636	-1,015	-0,878	-1,873	-1,357	-1,537
Chuyển hóa							
Cơ chất CYP2D6	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Cơ chất CYP3A4	Có	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Ức chế CYP2D6	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Ức chế CYP3A4	Có	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Thải trừ							
Độ thanh thải toàn phần (log ml/min/kg)	-0,107	-0,018	0,94	0,415	-0,106	0,703	0,488
Độc tính							
Độc tính AMES	Không	Không	Có	Không	Không	Có	Không
Độc tính gan	Có	Có	Có	Có	Có	Có	Có
Kích ứng da	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không

Về độc tính, các hợp chất đều dự đoán có độc tính trên gan, không gây kích ứng da. Ngoài ra, thử nghiệm AMES là một phương pháp được sử dụng rộng rãi, dùng để phân tích xem một chất có thể gây ra đột biến trong DNA hay không, và kết quả cho thấy là hầu hết các hợp chất không có độc tính AMES, ngoại trừ didanosine và puromycin.

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc 100 hợp chất tương tự nucleotide và nucleoside. Kết quả cho thấy, có 18 hợp chất có tác dụng ức chế enzyme SARS-CoV-2 RdRp mạnh hơn cả chất chứng dương remdesivir và sàng lọc được 7 hợp chất tiềm năng nhất bao gồm novuridin, didanosine, sofosbuvir, puromycin, defibrotite, gemcitabine và nikkomycins.

Defibrotite (DF) là một hỗn hợp của 90% oligonucleotide phosphodiester sợi đơn và 10% oligonucleotide phosphodiester sợi đôi, có nguồn gốc từ niêm mạc ruột lợn [23]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, defibrotit có tiềm năng ức chế đích RdRp với năng lượng liên kết là -8,5 kcal/mol. DF đã được chứng minh là làm giảm kích hoạt p38 MAPK thông qua tương tác trực tiếp với các tế bào nội mô, điều trị

COVID-19 [24]. Các nghiên cứu đã chứng minh sự gia tăng biểu hiện của phối tử integrin, phá vỡ màng tế bào nội mô và viêm quanh mạch ở COVID-19 [24, 25]. Ngoài ra, DF ức chế mạnh biểu hiện của heparanase (một chất điều hòa chính của quá trình viêm ở nội mạc, đóng vai trò trung tâm trong viêm mạch máu liên quan đến COVID-19) và hoạt động của enzyme [24, 26, 27].

Gemcitabine là một chất tương tự cytidine, được FDA chấp thuận để điều trị các bệnh ung thư [28]. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy, gemcitabine là một chất kháng virus phổ rộng hiệu quả chống lại nhiều loại virus RNA bao gồm coronavirus, MERS-CoV, SARS-CoV, enterovirus, virus influenza và virus Zika [29-31]. Gemcitabine ức chế MERS-CoV và SARS-CoV với EC50 tương ứng là 1,22 μ M và 4,96 μ M [31]. Trong một nghiên cứu của Y.-N. Zhang và cộng sự [32] cho thấy, EC50 của SARS-CoV-2 là 1,24 μ M. Trong nghiên cứu của chúng tôi, năng lượng liên kết của gemcitabine là -8,5 kcal/mol cùng với khả năng hấp thu ở ruột cao, cho thấy tiềm năng lớn của gemcitabine trong điều trị COVID-19.

Sofosbuvir là một chất tương tự nucleotide, là thuốc chống virus viêm gan C (HCV) đã được phê duyệt lâm

sàng. Sofosbuvir cũng có khả năng ngăn chặn các họ virus RNA sợi dương khác nên nó có tiềm năng ức chế SARS-CoV-2 RdRp [33]. Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, sofosbuvir có hoạt tính kháng virus *in vitro* và/hoặc *in vivo* chống lại virus Dengue, Zika [34, 35]. Thêm vào đó, sofosbuvir ít tương tác, an toàn và được dung nạp tốt với liều 400 mg mỗi ngày trong chế độ điều trị 24 tuần [36]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tính được năng lượng tự do của sofosbuvir với đích RdRp là -8,7 kcal/mol và dự đoán được khả năng hấp thu ở ruột khá cao (gần 70%). Chính vì vậy, sofosbuvir cần được nghiên cứu *in vitro*, *in vivo* để đánh giá khả năng ức chế SARS-CoV-2.

Didanosine là một loại thuốc kháng virus HIV thuộc nhóm chất ức chế men sao chép ngược nucleoside và đã được FDA phê duyệt để điều trị nhiễm HIV [37]. Sau khi gắn kết với đích, didanosine cho năng lượng liên kết với protein khá âm (-8,7 kcal/mol) so với phối tử đồng tinh thể. Trong các nghiên cứu *in silico* khác, didanosine cũng cho thấy tiềm năng trong điều trị SARS-CoV-2 [38, 39].

Novuridin là một nucleoside pyrimidine, đã được đánh giá về hoạt tính chống retrovirus với EC₅₀ là 0,36 μ M [40]. Novuridin cho kết quả năng lượng liên kết âm nhất (-8,8 kcal/mol) trong số 7 hợp chất thỏa mãn quy tắc Lipinski. Puromycin là một kháng sinh phổ rộng, ngăn chặn sự tổng hợp protein của tác nhân gây bệnh bằng cách phản ứng với polypeptide mới sinh trên vị trí peptidyl-tRNA của ribosome, xúc tác giải phóng các chuỗi peptide không hoàn chỉnh từ phức hợp peptidyl-tRNA-messenger-ribosome, hình thành peptidyl-puromycin [41]. Trong phân tích ADMET, hai hợp chất novuridin và puromycin đều cho thấy khả năng hấp thu ở ruột khá tốt. Nikkomycins là kháng sinh peptidyl nucleoside tự nhiên, ức chế tổng hợp chitin và thể hiện hoạt tính kháng nấm [42]. Trong nghiên cứu này, nikkomycins cho năng lượng tự do khá âm (-8,5 kcal/mol), nhưng không hấp thu ở ruột người. Chính vì vậy, cần nghiên cứu sâu hơn để đánh giá tác dụng cũng như cải thiện khả năng hấp thu của nikkomycins.

Nghiên cứu này đã cho thấy tiềm năng ức chế đích RdRp của hợp chất EIDD-2801 với năng lượng liên kết thấp (-7,9 kcal/mol), cao hơn 7 hợp chất bàn luận ở trên. Đặc biệt, EIDD-2801 đã được chứng minh là có khả năng chống lại SARS, MERS, SARS-CoV-2 và có hiệu quả gấp 3-10 lần so với remdesivir trong việc ngăn chặn sự sao chép của SARS-CoV-2 [43]. Trong một nghiên cứu khác, R. Abdelnabi và cộng sự đã sử dụng EIDD-2801 để điều trị chuột lang bị nhiễm SARS-CoV-2 với 200 mg/kg BID trong 4 ngày liên

tục, bắt đầu từ ngày nhiễm bệnh, kết quả làm giảm đáng kể hiệu giá virus lây nhiễm, tải lượng RNA của virus và cải thiện rõ rệt mô bệnh học phổi [44]. Vì vậy, 7 chất có năng lượng liên kết âm nhất ở trên (âm hơn EIDD-2801) càng cho thấy tiềm năng lớn trong ức chế SARS-CoV-2.

Kết luận

Sau khi sàng lọc 100 hợp chất, chúng tôi đã tìm ra 18 hợp chất có tiềm năng ức chế enzym RdRp. Trong đó có 7 hợp chất: defibrotite, gemcitabine, sofosbuvir, didanosine, puromycin, novuridi, nikkomycins có năng lượng liên kết âm nhất, thỏa mãn quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski, có đặc tính dược động học như hấp thu khá tốt, không chuyển hóa ở gan, thải trừ qua thận, có thể có độc tính với gan. Do đó cần tiến hành những nghiên cứu sâu hơn *in vitro* và *in vivo* để đánh giá và phát triển những hợp chất tiềm năng này trở thành thuốc điều trị SARS-CoV-2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] <https://ncov.moh.gov.vn>.
- [2] N. Chams, et al. (2020), "COVID-19: a multidisciplinary review", *Front Public Health*, **8**, p.383.
- [3] A. Wu, et al. (2020), "Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China", *Cell Host & Microbe*, **27**(3), pp.325-328.
- [4] A.A. Elfiky (2020), "Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19", *Life Sciences*, **248**, p.117477.
- [5] G. Li, and E. De Clercq (2020), "Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV)", *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **19**(3), DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117477.
- [6] A. Madhvi, et al. (2017), "A screen for novel hepatitis C virus RdRp inhibitor identifies a broad-spectrum antiviral compound", *Scientific Reports*, **7**(1), DOI: 10.1038/s41598-017-04449-3.
- [7] J. Yuan, et al. (2020), "Antibiotic fidaxomicin is an RdRp inhibitor as a potential new therapeutic agent against Zika virus", *BMC. Medicine*, **18**(1), DOI: 10.1186/s12916-020-01663-1.
- [8] A. Amberg (2013), *In Silico Methods, in Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. pp.1273-1296.
- [9] D. Rubin, et al. (2020), "FDA approval of remdesivir - a step in the right direction", *New England Journal of Medicine*, **383**(27), pp.2598-2600.
- [10] C.J. Gordon, et al. (2020), "The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus", *J. Biol. Chem.*, **295**(15), pp.4773-4779.
- [11] S. Mahmoud, et al. (2018), "Antiviral nucleoside and nucleotide analogs: a review", *Journal of Advanced Pharmacy Research*, **2**, pp.73-88.
- [12] E.D. Clercq (2011), "The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates: the magic of the phosphonate bond", *Biochemical Pharmacology*, **82**(2), pp.99-109.
- [13] J.V. Fernandez, A. Munir (2020), *Abacavir*, StatPearls

Publishing.

- [14] Z. Temesgen, A.J. Wright (1999), "Antiretrovirals", *Mayo. Clin. Proc.*, **74**(12), pp.1284-1301.
- [15] A. Rivkin (2005), "A review of entecavir in the treatment of chronic hepatitis B infection", *Curr. Med. Res. Opin.*, **21**(11), pp.1845-1856.
- [16] S. Kim, et al. (2021), "PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces", *Nucleic Acids Research*, **49**(D1), pp.D1388-D1395.
- [17] E.F. Pettersen, et al. (2004), "UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis", *J. Comput. Chem.*, **25**(13), pp.1605-1612.
- [18] M.D. Hanwell, et al. (2012), "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform", *J. Cheminform.*, **4**(1), DOI: 10.1186/1758-2946-4-17.
- [19] G.M. Morris, et al. (2009), "AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility", *J. Comput. Chem.*, **30**(16), pp.2785-2791.
- [20] C. Lipinski, et al. (2004), "Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution", *Drug Discovery Today: Technologies*, **1**, pp.337-341.
- [21] B. Jayaram, et al. (2012), "Sanjeevini: a freely accessible web-server for target directed lead molecule discovery", *BMC Bioinformatics*, Springer.
- [22] D.E. Pires, et al. (2015), "pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures", *J. Med. Chem.*, **58**(9), pp.4066-4072.
- [23] N. Kornblum, et al. (2006), "Defibrotide, a polydisperse mixture of single-stranded phosphodiester oligonucleotides with lifesaving activity in severe hepatic veno-occlusive disease: clinical outcomes and potential mechanisms of action", *Oligonucleotides*, **16**(1), pp.105-114.
- [24] M. Palomo, et al. (2016), "What is going on between defibrotide and endothelial cells? Snapshots reveal the hot spots of their romance", *Blood*, **127**(13), pp.1719-1727.
- [25] M. Ackermann, et al. (2020), "Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19", *New England Journal of Medicine*, **383**(2), pp.120-128.
- [26] D. García-Bernal, et al. (2020), "Defibrotide inhibits donor leucocyte-endothelial interactions and protects against acute graft-versus-host disease", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **24**(14), pp.8031-8044.
- [27] P. Richardson, et al. (2019), "Systematic review of defibrotide studies in the treatment of veno-occlusive disease/sinusoidal obstruction syndrome (VOD/SOS)", *Bone Marrow Transplantation*, **54**(12), pp.1951-1962.
- [28] H.J. Shin, C. Kim, and S. Cho (2018), "Gemcitabine and nucleoside synthesis inhibitors are broad-spectrum antiviral drugs that activate innate immunity", *Viruses*, **10**(4), DOI: 10.3390/v10040211.
- [29] O.V. Denisova, et al. (2012), "Obatoclax, saliphenylhalamide, and gemcitabine inhibit influenza A virus infection", *Journal of Biological Chemistry*, **287**(42), pp.35324-35332.
- [30] S. Kuivanen, et al. (2017), "Obatoclax, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism", *Antiviral Research*, **139**, pp.117-128.
- [31] J.Dyall, et al. (2014), "Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**(8), pp.4885-4893.
- [32] Y.-N. Zhang, et al. (2020), "Gemcitabine, lycorine and oxysphoridine inhibit novel coronavirus (SARS-CoV-2) in cell culture", *Emerging Microbes & Infections*, **9**(1), pp.1170-1173.
- [33] B. Sayad, M. Sobhani, and R. Khodarahmi (2020), "Sofosbuvir as repurposed antiviral drug against COVID-19: why were we convinced to evaluate the drug in a registered/approved clinical trial?", *Archives of Medical Research*, **51**(6), pp.577-581.
- [34] C.S. Gan, et al. (2018), "Sofosbuvir as treatment against dengue?", *Chemical Biology & Drug Design*, **91**(2), pp.448-455.
- [35] P. Mesci, et al. (2018), "Blocking Zika virus vertical transmission", *Scientific Reports*, **8**(1), pp.1-13.
- [36] A.C. Ferreira, et al. (2019), "Beyond members of the Flaviviridae family, sofosbuvir also inhibits chikungunya virus replication", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **63**(2), DOI: 10.1128/AAC.01389-18.
- [37] C.M. Perry, and J.A. Balfour (1996), "Didanosine. An update on its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV disease", *Drugs*, **52**(6), pp.928-962.
- [38] F.M. Alakwaa (2020), "Repurposing didanosine as a potential treatment for COVID-19 using single-cell RNA sequencing data", *Msystems*, **5**(2), DOI: 10.1128/mSystems.00297-20.
- [39] C. Cava, G. Bertoli, I. Castiglioni (2020), "In silico discovery of candidate drugs against COVID-19", *Viruses*, **12**(4), DOI: 10.3390/v12040404.
- [40] J. Balzarini, et al. (1988), "Anti-retrovirus activity of 3'-fluoro- and 3'-azido-substituted pyrimidine 2', 3'-dideoxynucleoside analogues", *Biochemical Pharmacology*, **37**(14), pp.2847-2856.
- [41] K. Isono (1988), "Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis", *The Journal of Antibiotics*, **41**(12), pp.1711-1739.
- [42] R. Furter, D.M. Rast (1985), "A comparison of the chitin synthase-inhibitory and antifungal efficacy of nucleoside-peptide antibiotics: structure-activity relationships", *FEMS Microbiology Letters*, **28**(2), pp.205-211.
- [43] T.P. Sheahan, et al. (2020), "An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice", *Science Translational Medicine*, **12**(541), DOI: 10.1126/scitranslmed.abb5883.
- [44] R. Abdelnabi, et al. (2020), "Molnupiravir (EIDD-2801) inhibits SARS-CoV2 replication in Syrian hamsters model", *bioRxiv*.