

SÀNG LỌC CÁC CHẤT TIỀM NĂNG ỨC CHẾ PAPAIN-LIKE PROTEASE CỦA SARS-CoV-2 TRÊN MÔ HÌNH DOCKING

Nguyễn Thị Thanh Thảo⁽¹⁾, Nguyễn Thị Phương Trúc⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 29/3/2023; Ngày gửi phản biện 10/4/2023; Chấp nhận đăng 20/6/2023

Liên hệ email: thanhthaont@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2023.04.448>

Tóm tắt

Đại dịch COVID-19 do coronavirus 2 (SARS-CoV-2) gây ra hội chứng hô hấp cấp tính nghiêm trọng dẫn đến nhu cầu cấp thiết về các liệu pháp kháng vi-rút hiệu quả. Papain-like protease (PLpro) đã được xác định là mục tiêu đầy hứa hẹn để phát triển thuốc do có vai trò quan trọng trong quá trình nhân lên của vi-rút và làm gián đoạn phản ứng của vật chủ. Nghiên cứu đã thực hiện quá trình docking trên PLpro. Tổng cộng có 1184 hợp chất có khung chalcone được sàng lọc qua mô hình docking. Trong nghiên cứu này đã xác định được 3 hợp chất tiềm năng trong việc ức chế PLpro. Phân tích sâu hơn cho thấy rằng hợp chất CID101544859 tạo được một liên kết hydro với Thr30 và CID101585417 tương tác với Leu162, Asp164, Pro248, Tyr264, Tyr268 thông qua liên kết hydrophobic. Các hợp chất này có thể được đánh giá thêm thông qua các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* để xác định hiệu quả của chúng trong việc ức chế PLpro. Những phát hiện này cung cấp thông tin có giá trị về các chất ức chế tiềm năng và các tương tác giữa ligand với PLpro có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát triển các phương pháp điều trị COVID-19.

Từ khóa: COVID-19, docking phân tử, papain-like protease, SARS-CoV-2

Abstract

MOLECULAR DOCKING FOR VIRTUAL SCREENING OF POTENTIAL SARS-CoV-2 PAPAIN-LIKE PROTEASE INHIBITORS

The current COVID-19 pandemic caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has led to an urgent need for effective antiviral therapies. The Papain-like protease (PLpro) has been identified as a promising target for drug development due to its crucial role in viral replication and immune evasion. The study performed docking process on PLpro. Virtual screening from 1,184 chalcones were conducted based on the developed molecular docking. In this study, we identified 3 several compounds for PLpro inhibitors. Further analysis revealed that CID101544859 form a hydrogen bond with Thr30 and CID101585417 interact with Leu162, Asp164, Pro248, Tyr264, Tyr268 through hydrophobic bonding. These compounds can be

further evaluated through in vitro and in vivo studies to determine their efficacy in inhibiting PLpro. These findings provide valuable insights into the potential inhibitors and the molecular interactions between ligand and PLpro may facilitate the development of novel therapeutics for COVID-19.

1. Đặt vấn đề

Vào tháng 12/2019, sự bùng phát một bệnh viêm phổi đã được báo cáo ở Vũ Hán, Trung Quốc. Sau khi được phân lập đã xác định bệnh viêm phổi này do nhiễm một loại coronavirus mới gây triệu chứng hô hấp cấp tính nghiêm trọng (Zhou và nnk., 2020; Takashita và nnk., 2022) và được Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization) gọi là COVID-19 do SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome 2) gây ra. Đến nay, đã ghi nhận hơn 762 triệu ca nhiễm COVID-19 và số người tử vong vì đại dịch đã lên tới gần 7 triệu người (World Health Organization, 2022).

Đại dịch COVID-19 diễn biến tiếp tục do vi-rút SARS-CoV-2 liên tục thay đổi dẫn đến xuất hiện nhiều biến thể. Cuối năm 2020, các biến thể alpha (B.1.1.7), beta (B.1.351) và gamma (P.1) lần lượt xuất hiện ở Anh, Nam Phi và Brazil. Tiếp theo là biến thể B.1.1.529/Omicron xuất hiện đầu tiên ở Châu Phi vào cuối năm 2021. Biến thể Omicron có khả năng truyền nhiễm cao, số lượng protein đột biến lớn, vì thế nó nhanh chóng trở thành biến thể phổ biến toàn cầu (Barouch, 2022). Những đột biến ở biến thể mới làm tăng tỷ lệ mắc bệnh và tử vong và có khả năng làm giảm hiệu quả điều trị của các thuốc điều trị và vắc-xin hiện có (Vasireddy và nnk., 2021). Hiện tại, đã có nhiều nghiên cứu phát triển các loại vắc-xin bảo vệ cơ thể chống lại sự xâm nhập của vi-rút SARS-CoV-2, trong đó có hai loại vắc-xin mới là vắc-xin mRNA và vắc-xin vectơ vi-rút đang được nhiều nước sử dụng. Vắc-xin là biện pháp phòng bệnh COVID-19 tốt nhất, tuy nhiên vắc-xin tồn tại nhiều nhược điểm như hiệu quả chủng ngừa ngắn, cần liều tăng cường, phản ứng dị ứng gây sốc phản vệ, tác dụng phụ lâu dài chưa được nghiên cứu (Pourkarim và nnk., 2022). Các chiến lược điều trị cho các biến thể SARS-CoV-2 mới bao gồm: Liệu pháp miễn dịch, các peptid ngăn chặn tương tác giữa ACE-2 và SARS-CoV-2, các protease đặc hiệu, các enzym giống furin, các thuốc kháng vi-rút và các phương pháp khác như sử dụng RNA của vi-rút can thiệp nhỏ. Các loại thuốc kháng vi-rút được coi là tiềm năng trước đây như Remdesivir (đã được FDA chấp thuận để sử dụng điều trị bệnh nhân nhiễm SARS-CoV-2), Hydroxychloroquine, Lopinavir và Interferon, không có hoặc ít ảnh hưởng đến bệnh nhân COVID-19 nhập viện trong các thử nghiệm lâm sàng toàn cầu của WHO (WHO Solidarity Trial Consortium, 2021). Do đó, cần nhanh chóng tìm ra phương thức điều trị COVID-19 hiệu quả là cấp thiết.

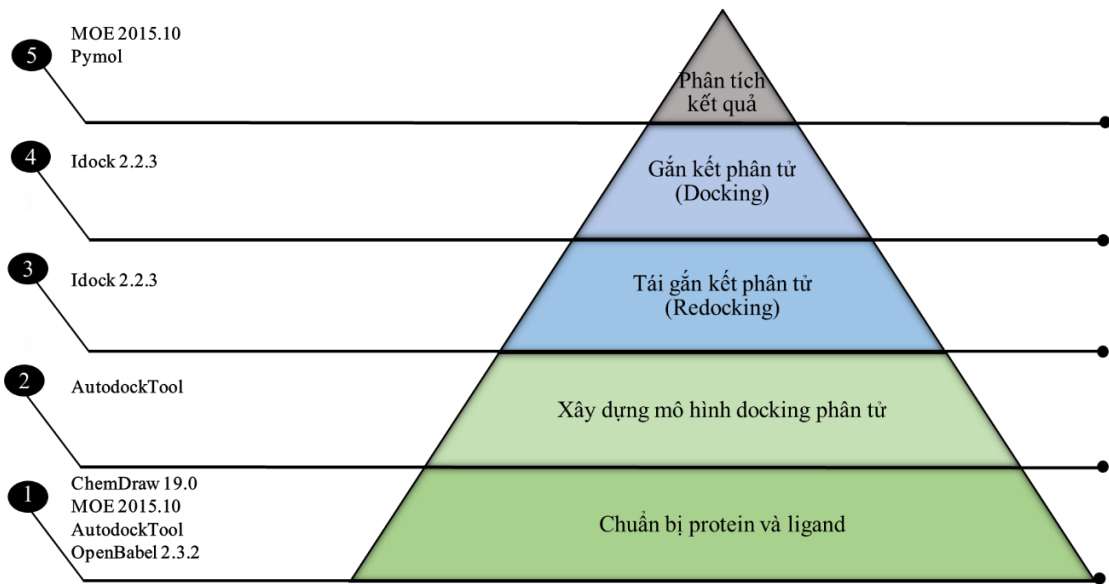
Là một vi-rút RNA bên trong vỏ của virion là nucleocapsid sợi đơn, SARS-CoV-2 mã hóa hai protease chức năng là PLpro và Mpro (3Clpro). Chức năng chính của Mpro là phân cắt các polyprotein của vi-rút, đây là yếu tố quan trọng đối với sự trưởng thành, sao chép và xâm nhập của vi-rút (Ma và nnk., 2020). PLpro (hay còn gọi là papain-like

protease hay nsp3, EC 3.4.22.46) cùng với 3CLpro (3-chymotrypsin hoặc np5), tạo thành phức hợp RTC đóng vai trò quan trọng trong việc xử lý các protein thành các protein chức năng của vi-rút. PLpro chủ yếu đảm nhiệm thủy phân liên kết peptit nhóm cacboxyl của glycine tại các protein không cấu trúc Nsp1, Nsp2 và Nsp3 (Puckey và Pharm, 2022). Bên cạnh đó, PLpro mã hóa các hoạt động xúc tác của enzym deISGylating (deISGyl) và deUbiquitinating (DUB), góp phần vào việc ức chế phản ứng miễn dịch bẩm sinh bằng cách tác động trên các con đường tín hiệu IFN- β và NF- κ B (Devaraj và nnk., 2007). PLpro với chức năng chính như cần cho quá trình vi-rút trưởng thành, gây rối loạn phản ứng viêm của vật chủ giúp vi-rút tránh khỏi hệ thống miễn dịch của vật chủ (Báez-Santos và nnk., 2015). Cho nên, việc phát triển các loại thuốc điều trị đích vào Mpro, PLpro có thể mở ra một hướng kháng vi-rút tiềm năng trong điều trị COVID-19 (Liu và nnk., 2020). Các loại chalcone tổng hợp cũng như tự nhiên đã được chứng minh sở hữu các hoạt tính sinh học phong phú như: hoạt tính kháng ung thư (Fogaça và nnk., 2017), điều hòa miễn dịch (Lee và nnk., 2015), kháng viêm (Herencia nnk., 1998), kháng khuẩn (Okolo và nnk., 2021), kháng vi-rút HIV (Lee và nnk., 2015), cúm A (Herencia và nnk., 1998), rubella (Okolo và nnk., 2021) và đặc biệt là hoạt tính ức chế RNA polymerase phụ thuộc RNA của vi-rút SARS-CoV-2 (Duran và nnk., 2021). Ngoài ra, các hợp chất chalcone này cũng ức chế việc sản xuất nhiều cytokine như TNF - α , IL - 1 β , IL - 6, và I κ B kinase (IKKs) - một trong những chất điều hòa thiết yếu của con đường nuclear factor kappa B (NF- κ B), hay còn được biết đến là chất trung gian trung tâm của các phản ứng miễn dịch và phản ứng viêm. Các chalcones thể hiện hoạt động ức chế NF- κ B bằng cách biến đổi cộng hóa trị của các protein IKK (Pahl, 1999). Qua đó có thể thấy rằng việc tìm kiếm các hoạt chất chalcone có khả năng ức chế PLpro vừa có thể ngăn chặn sự nhân lên của vi-rút, vừa tăng cường hệ thống miễn dịch của vật chủ, ngoài ra còn góp phần hạn chế cơn bão Cytokin giúp bệnh nhân hồi phục nhanh chóng.

Do đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu sàng lọc được các chất ức chế PLpro từ dữ liệu các hợp chất chalcone bằng phương pháp sử dụng mô hình docking để đáp ứng nhu cầu khám phá ra thuốc, thay thế các loại thuốc hiệu quả trong điều trị COVID-19.

2. Phương pháp nghiên cứu

Để tiến hành sàng lọc ảo, một quy trình các bước tiến hành được trình bày ở Hình 1. Trong nghiên cứu này đã sử dụng dữ liệu để sàng lọc là thư viện 1184 hợp chất có khung chalcone được lấy từ thư viện Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) với từ khóa tìm kiếm “Chalcone” và “Chalcone substance”. Các chất được lưu ở định dạng *.sdf và chuyển sang định dạng *.mdb bằng phần mềm MOE 2015.10. Sau đó các hợp chất sẽ được tiến hành sàng lọc và đánh giá kết quả thông qua mô hình gắn kết phân tử (mô hình docking).



Hình 1. Quy trình các bước tiến hành xây dựng và đánh giá mô hình docking

2.1. Chuẩn bị cơ sở dữ liệu docking và cấu trúc SARS-CoV-2 PLpro

Để chuẩn bị ligand cho quá trình sàng lọc ảo bằng docking phân tử, các chất sau khi được tải về từ các thư viện sẽ được tối thiểu hóa năng lượng nhằm tìm ra cấu dạng có mức năng lượng thấp nhất. Việc tối thiểu hóa năng lượng được thực hiện bằng công cụ *Energy Minimize* của phần mềm MOE 2015.10 với thông số *Gradient* = 0.0001 kcal/mol. Sau khi được chuẩn bị xong các chất sẽ được lưu lại dưới dạng file *.pdb.

Tại thời điểm nghiên cứu, cấu trúc tinh thể của SARS-CoV-2 PLpro được chọn để docking trong nghiên cứu này được tải từ Protein Data Bank (PDB: 7JN2) với độ phân giải đạt tiêu chuẩn < 2 Å (1,93 Å), với sự có mặt của ligand đồng kết tinh PLP_Snyder441. Cấu trúc này được đưa vào MOE 2015.10 loại bỏ các phân tử nước và các ion khác ra khỏi protein. Sau đó, protein được chuẩn bị bằng công cụ *Quickprep* của phần mềm MOE 2015.10 với các quá trình: *Protonate*: proton hóa và tích điện cho các acid amin của protein; *Tether* và *fix*: các nguyên tử trong protein được xác định vùng không gian chuyển động nhằm đảm bảo các nguyên tử không lệch quá xa so với tọa độ ban đầu; *Refine*: tối thiểu hóa năng lượng cho protein, giá trị RMSD Gradient được nhập vào là 0.0001 kcal/mol/Å. Sau khi được chuẩn bị bằng công cụ *QuickPrep*, protein được lưu dưới dạng file *.pdb.

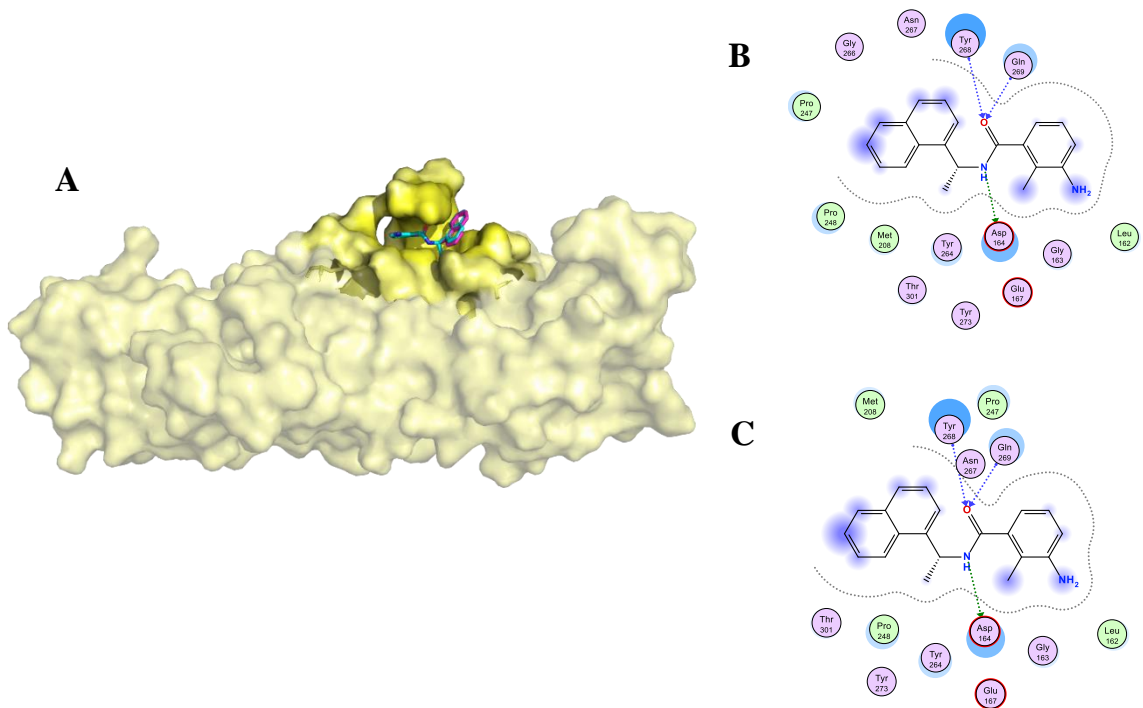
2.2. Xác định binding site và molecular docking

Cấu trúc của SARS-CoV-2 PLpro sau khi được chuẩn bị bằng phần mềm MOE 2015.10 được đưa vào phần mềm AutoDock để xây dựng khoang gắn kết. Khoang gắn kết được xác định bằng cách mở rộng một bán kính thích hợp từ vị trí phối tử là ligand PLP_Snyder441 để tạo thành mô hình docking phân tử. Phối tử PLP_Snyder441 vừa là một chất ức chế thuận nghịch vừa góp phần để xác định active site của SARS-CoV-2 PLpro.

Sau khi đã xác định xong binding site, tiến hành thực hiện quá trình redock để đánh giá “độ lặp lại” và góp phần chứng minh việc lựa chọn các thông số cho khoang gắn kết là hợp lý. Kết quả redock được thể hiện qua vị trí ligand trong khoang, điểm số docking và chỉ số *RMSD* (*Root-mean-square deviation*) của các cấu dạng phân tử. Giá trị *RMSD* thể hiện được phần nào độ lệch của phối tử so với ligand tham chiếu ban đầu trong phức hợp đồng kết tinh với PLpro. Giá trị *RMSD* càng nhỏ càng chứng tỏ được cấu dạng của phối tử càng gần với ligand tham chiếu và mô hình được đánh giá là đáng tin cậy khi giá trị *RMSD* của các poses không quá 2 Å (Trott và Olson, 2020). Quá trình docking được tiến hành với các bước tương tự quá trình redock bao gồm chuẩn bị cấu trúc protein và ligand, xác định và xây dựng binding site, thực hiện docking phối tử vào khoang gắn kết của protein. Kết quả của quá trình docking được đánh giá qua điểm số docking (đơn vị kcal/mol). Điểm số docking càng âm thì chất càng có tiềm năng gắn kết mạnh với enzym. Ngoài ra, tương tác hình thành được giữa các phối tử và protein cũng được phân tích bằng phần mềm MOE 2015.10. Các tương tác thường gặp nhất có thể kể đến liên kết hydro, liên kết ion, liên kết kỵ nước và tương tác van der Waals.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả redocking và mô hình docking phân tử

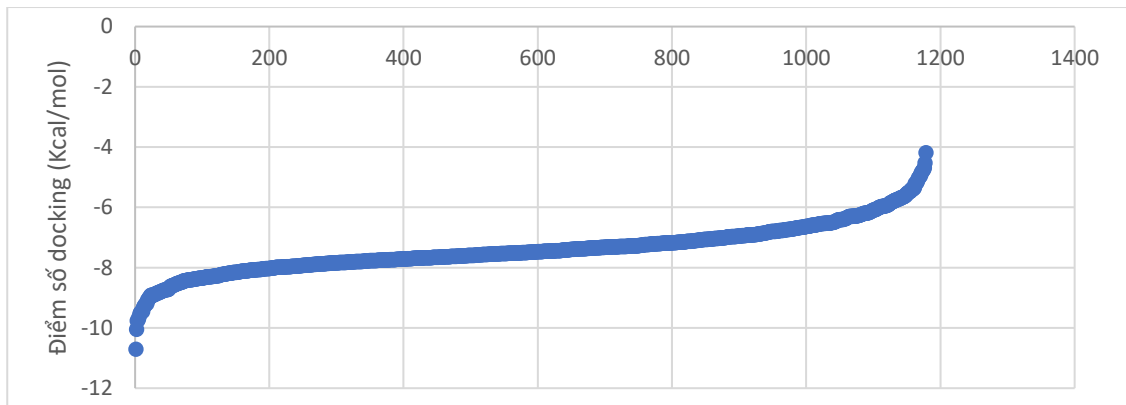


Hình 2. A) Vị trí của ligand gốc và kết quả redocking trong khoang gắn kết (trong đó ligand gốc có màu xanh, ligand redocking có màu hồng); B) Tương tác giữa ligand gốc với các acid amin trong khoang gắn kết của PLpro của SARS-CoV-2; C) Tương tác giữa ligand redocking với các acid amin trong khoang gắn kết của PLpro của SARS-CoV-2

Kết quả redocking cho thấy mô hình gắn kết phân tử có thể sàng lọc và cho kết quả đáng tin cậy khi thể hiện chỉ số RMSD là 0.57Å (nhỏ hơn 2Å). Điểm số docking của model tốt nhất đạt được là -9.907kcal/mol, với vị trí ligand nằm gọn trong khoang gắn kết và hình thành được các liên kết với các acid amin gần như tương đồng với ligand đồng kết tinh như tương tác hydrophobic với Asp164, Pro248, Tyr264, Gln269 hay tương tác hydro với các acid amin Asp164, Gln269, Tyr273. Từ vị trí của phối tử tham chiếu PLP_Snyder441, một khoang gắn kết bên trong thụ thể PLpro đã được mở rộng một cách hợp lý để thu được mô hình docking phân tử. Các thông số cụ thể của mô hình lần lượt là vị trí trong không gian (Center_X: 51,4 Center_Y: 31,92 Center_Z: -2,31), kích thước hộp (Size_X: 14,91 Size_y: 17,49 Size_Z: 14,04) và Spacing = 1.

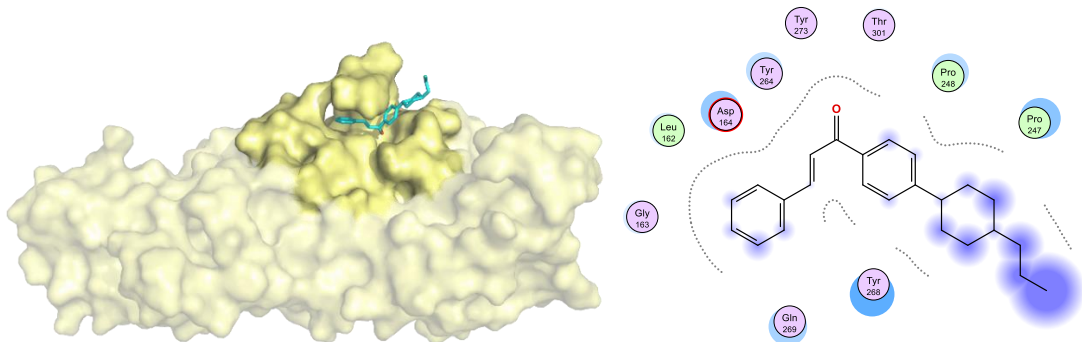
3.2. Sàng lọc bằng docking phân tử

Các chất sau khi được lưu dưới dạng *.pdbqt sẽ được chuyển vào một thư viện chung để chuẩn bị cho quá trình docking. Việc sàng lọc qua mô hình docking chỉ được tiến hành sau khi đã chuẩn bị (prepare) đầy đủ protein, ligand và config (thông số binding site). Kết quả thu được 100% các chất dock thành công (1184/1184 chất) vào binding site của PLpro với điểm số cụ thể được thể hiện ở hình 3. Các chất sẽ được đánh giá và phân tích khả năng tương tác với các acid amin của protein so với ligand đồng kết tinh. 3 chất có điểm số tốt nhất và có tương tác tốt với PLpro được lựa chọn để tiến hành các phân tích tiếp theo.



Hình 3. Biểu đồ phân bố điểm số docking

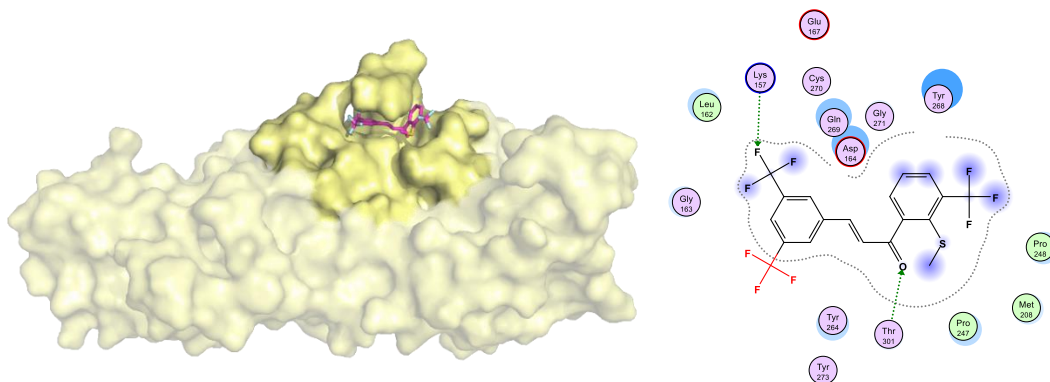
CID101544859



Hình 4. Mô hình gắn kết 3D của CID101544859 với PLpro

Dẫn chất CID101544859 nằm gọn trong khoang gắn kết với điểm số docking là -9,76kcal/mol. CID101544859 tạo được một liên kết hydro với Thr301 và các gốc kỵ nước với Leu162, Asp164, Pro248, Tyr264, Tyr268, Gln269. Trong đó có rất nhiều liên kết với các acid amin tương đồng với liên kết của ligand redock, góp phần làm tăng tác động gắn kết của nó trên protein đích.

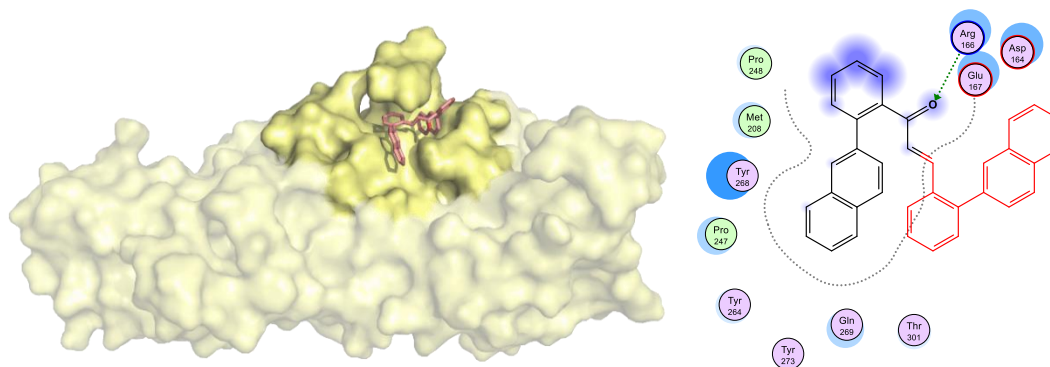
CID101585417



Hình 5. Mô hình gắn kết 3D của CID101585417 với PLpro

Dẫn chất CID101585417 nằm gọn trong khoang gắn kết và có điểm số docking -9,75kcal/mol. Tương tự với CID101544859, dẫn chất này cũng tạo được một liên kết hydro với Thr301 và các gốc kỵ nước cũng tương tác với Leu162, Asp164, Pro248, Tyr264, Tyr268 thông qua liên kết hydrophobic, đồng thời cũng tạo được liên kết hydro và liên kết π -Stacking với Thr301 và Tyr268. Với những liên kết với các acid amin tương đồng với chất đối chiếu thể hiện tiềm năng hoạt tính cao của CID101585417 với PLpro.

CID102120512



Hình 6. Mô hình gắn kết 3D của CID102120512 với PLpro

Chất cuối cùng trong tập tiềm năng, CID102120512, có điểm số docking là -9,705 kcal/mol và có vị trí nằm khá nông trong khoang gắn kết. Tuy nhiên, ligand này chỉ hình thành được một liên kết hydro nào với các acid amin Arg166 của PLpro nhưng lại hình thành được rất nhiều liên kết kỵ nước với Asp164, Glu167, Pro247, Tyr268, Gln269, Thr301 và hình thành được với Tyr264, Tyr268 các liên kết π -Stacking góp phần làm ổn định khoang gắn kết.

4. Bàn luận

So sánh với các nghiên cứu trước đây, nghiên cứu này đã thành công trong việc xây dựng mô hình *in silico* bằng phương pháp docking từ đó góp phần sàng lọc được các hợp chất tự nhiên có tiềm năng trong việc ức chế PLpro của SARS-CoV-2 (Valipour, 2022). Đối với SAR, điểm chung của các chất nằm trong nhóm đầu có điểm số docking tốt nhất đều được bổ sung các nhóm thế vào cấu trúc chung của chalcone ở vị trí vòng kép A và B. Dị vòng pyran và các vòng thơm phenyl, benzyl được thêm vào góp phần hình thành liên kết kỵ nước với các acid amin quan trọng của vị trí liên kết gồm: Asp164, Arg166, Tyr264, Tyr268, Tyr273 (tương tự như kết quả redock của quá trình đồng kết tinh). Tuy nhiên, vẫn cần phải tiến hành thêm các mô hình *in silico* khác như ADMET, MDs hay pharmacophore,... cũng như tiến hành *in vitro* để có thể khẳng định tiềm năng làm thuốc của các hợp chất tự nhiên dẫn xuất chalcone.

5. Kết luận

Từ dữ liệu 11 chất ức chế thuận nghịch SARS-CoV-2 PLpro, nghiên cứu đã lựa chọn được mã PDB: 7JN2 phù hợp để xây dựng mô hình gắn kết phân tử. 1184 chalcone và các dẫn xuất đã được sàng lọc qua mô hình được xây dựng trên khoang liên kết của PLpro và chất ức chế PLP_Snyder441. Kết quả thu được 3 hợp chất tiềm năng trong việc ức chế protein đích. Nghiên cứu sẽ tiến hành thực hiện mô phỏng động lực học phân tử và các thí nghiệm *in vitro* để có thể đánh giá sâu hơn về khả năng làm thuốc và ứng dụng trong điều trị COVID-19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Báez-Santos, Y.M., John, S.E.S., & Mesecar, A.D. (2015). The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral research*, 115, 21-38.
- [2] Barouch, D.H. (2022). Covid-19 vaccines—immunity, variants, boosters. *New England Journal of Medicine*, 387(11), 1011-1020.
- [3] Devaraj, S.G., Wang, N., Chen, Z., ... & Li, K. (2007). Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32208-32221.
- [4] Duran, N., Polat, M.F., Aktas, D.A., ... & Algul, O. (2021). New chalcone derivatives as effective against SARS-CoV-2 agent. *International Journal of Clinical Practice*, 75(12), e14846.
- [5] Fogaça, T.B., Martins, R.M., Begnini, K.R., ... & Collares, T. (2017). Apoptotic effect of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene in human breast cancer cells. *Pharmacological Reports*, 69(1), 156-161.
- [6] Herencia, F., Ferrandiz, M.L., Ubeda, A., ... & Alcaraz, M.J. (1998). Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 8(10), 1169-1174.

- [7] Lee, J.S., Bukhari, S.N.A., & Fauzi, N.M. (2015). Effects of chalcone derivatives on players of the immune system. *Drug design, development and therapy*, 9, 4761.
- [8] Liu, C., Zhou, Q., Li, Y., ... & Albaiu, D. (2020). Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases. *ACS Central Science*, 6(3), 315-331.
- [9] Ma, C., Sacco, M.D., Hurst, B., ... & Wang, J. (2020). Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. *Cell research*, 30(8), 678-692.
- [10] Okolo, E.N., Ugwu, D.I., Ezema, B.E., ... & Ujam, O.T. (2021). New chalcone derivatives as potential antimicrobial and antioxidant agent. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13.
- [11] Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853-6866.
- [12] Pourkarim, F., Pourtaghi-Anvarian, S., & Rezaee, H. (2022). Molnupiravir: A new candidate for COVID-19 treatment. *Pharmacology Research & Perspectives*, 10(1), e00909.
- [13] Puckey, M. & Pharm, B. (2022). COVID-19: Prevention & Investigational Treatments. Truy cập vào ngày 31/10/2022, từ <https://www.drugs.com/condition/covid-19.html>.
- [14] Takashita, E., Kinoshita, N., Yamayoshi, S., ... & Kawaoka, Y. (2022). Efficacy of antibodies and antiviral drugs against Covid-19 omicron variant. *New England Journal of Medicine*, 386(10), 995-998.
- [15] Trott, O., Olson, A.J. (2020). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461.
- [16] Valipour, M. (2022). Chalcone-amide, a privileged backbone for the design and development of selective SARS-CoV/SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 240.
- [17] Vasireddy, D., Vanaparthi, R., Mohan, G., Malayala, S.V., & Atluri, P. (2021). Review of COVID-19 variants and COVID-19 vaccine efficacy: what the clinician should know?. *Journal of Clinical Medicine Research*, 13(6), 317.
- [18] WHO Solidarity Trial Consortium. (2021). Repurposed antiviral drugs for Covid-19-interim WHO solidarity trial results. *New England journal of medicine*, 384(6), 497-511.
- [19] World Health Organization. *Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it*. [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
- [20] World Health Organization (2022). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Truy cập ngày 20/10/2022. <https://covid19.who.int/>.
- [21] Zhou, P., Yang, X.L., Wang, X.G., ... & Shi, Z.L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273.