

Sàng lọc *in silico* các phân tử nhỏ có khả năng ức chế thụ thể AT₁ để nghiên cứu phát triển thuốc điều trị bệnh tăng huyết áp

Nguyễn Lê Anh Tuấn*, Võ Lê Anh Thư, Đào Chí Tuyên

Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng, 10 Huỳnh Văn Nghệ, phường Bửu Long, TP Biên Hòa, tỉnh Đồng Nai, Việt Nam

Ngày nhận bài 14/3/2023; ngày chuyển phân biên 16/3/2023; ngày nhận phân biên 8/4/2023; ngày chấp nhận đăng 14/4/2023

Tóm tắt:

Ức chế thụ thể AT₁ của angiotensin II là một chiến lược phổ biến trong điều trị tăng huyết áp. Nghiên cứu này áp dụng phương pháp sàng lọc *in silico* nhằm tìm ra các chất mới có khả năng ức chế thụ thể AT₁. Dữ liệu cấu trúc của các hợp chất được thu thập từ nhiều thư viện hóa học khác nhau. Mô hình docking phân tử và mô hình 3D-pharmacophore được xây dựng để thực hiện sàng lọc. Quy tắc 5-Lipinski được áp dụng để đánh giá tiềm năng giống thuốc của các hợp chất. Các đặc tính dược động học của các hợp chất tiềm năng được phân tích bằng công cụ pkCSM. Từ 21.994.845 hợp chất ban đầu, có 7.290 hợp chất thỏa mãn mô hình 3D-pharmacophore, 7.103 hợp chất thực hiện docking thành công, 626 hợp chất có ái lực với thụ thể AT₁ cao hơn olmesartan. Trong số đó, 10 hợp chất được xác định là có tiềm năng nhờ tương tác tốt với các acid amin quan trọng và điểm số docking vượt trội so với olmesartan. Tất cả các hợp chất này đều đáp ứng quy tắc 5-Lipinski, đồng thời có đặc tính dược động học tốt, phù hợp với yêu cầu của các hợp chất giống thuốc dùng đường uống.

Từ khóa: angiotensin II, AT₁, docking, *in silico*, tăng huyết áp, 3D-pharmacophore.

Chỉ số phân loại: 3.1, 3.4

***In silico* screening of small molecules capable of inhibiting AT₁ receptors for research and development of drugs to treat hypertension**

Le Anh Tuan Nguyen*, Le Anh Thu Vo, Chi Tuyen Dao

Faculty of Pharmacy, Lac Hong University, 10 Huynh Van Nghe Street, Buu Long Ward, Bien Hoa City, Dong Nai Province, Vietnam

Received 14 March 2023; revised 8 April 2023; accepted 14 April 2023

Abstract:

Inhibition of the AT₁ receptor of angiotensin II is a common strategy in hypertension treatment. This study applied *in silico* screening methods to identify novel compounds with potential AT₁ receptor inhibition. The structural data of compounds were collected from various chemical libraries. Molecular docking models and 3D-pharmacophore models were developed for screening purposes. Lipinski's rule of five was employed to evaluate the drug-like potential of the compounds. The pharmacokinetic properties of potential compounds were analysed using the pkCSM tool. From an initial set of 21,994,845 compounds, 7,290 compounds satisfied the 3D-pharmacophore model, 7,103 compounds were successfully docked, and 626 compounds demonstrated higher affinity for the AT₁ receptor than olmesartan. Among them, 10 compounds were identified as potential candidates due to their strong interactions with key amino acids and higher docking scores than olmesartan. All of these compounds comply with Lipinski's rule of five and exhibit favourable pharmacokinetic properties, making them suitable for oral drug formulation.

Keywords: angiotensin II, AT₁, docking, hypertension, *in silico*, 3D-pharmacophore.

Classification numbers: 3.1, 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: tuanguyen@lhu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Tăng huyết áp là một bệnh lý mạn tính, đặc trưng bởi áp lực máu lên thành động mạch tăng cao [1]. Tình trạng này được xác định khi huyết áp tâm thu lúc nghỉ từ 130 mmHg trở lên hoặc huyết áp tâm trương lúc nghỉ từ 80 mmHg trở lên, hoặc cả hai giá trị đều vượt ngưỡng [2]. Huyết áp cao kéo dài làm tăng gánh nặng cho tim, đồng thời là yếu tố nguy cơ chính dẫn đến các biến chứng tim mạch nghiêm trọng, bao gồm đột quỵ, suy tim, bệnh động mạch vành và nhồi máu cơ tim.

Các nhóm thuốc được sử dụng điều trị tăng huyết áp vẫn đang được nghiên cứu phát triển. Mục tiêu của nghiên cứu này là khám phá các phân tử nhỏ có khả năng phát triển thành thuốc điều trị tăng huyết áp. Do nhận thấy những ưu điểm của thuốc ức chế thụ thể angiotensin II trên AT₁ (ARB) như dùng đầy đủ liều có thể điều trị tăng huyết áp tương tự nhóm thuốc ức chế men chuyển (ACEi) nhưng lại ít gây ho khan hơn, ức chế renin angiotensin aldosterone triệt để hơn ACEi vì đối kháng cạnh tranh với angiotensin II tại thụ thể AT₁ [3]. Ngoài ra, thuốc ức chế thụ thể angiotensin/neprilysin (ARNIs) là sự kết hợp của nhóm ARB và neprilysin trong một số nghiên cứu gần đây cũng cho thấy kết quả an toàn và hiệu quả hơn so với nhóm ACEi [4]. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm mục tiêu xác định các hợp chất có tiềm năng ức chế thụ thể AT₁ để sử dụng trong điều trị tăng huyết áp.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

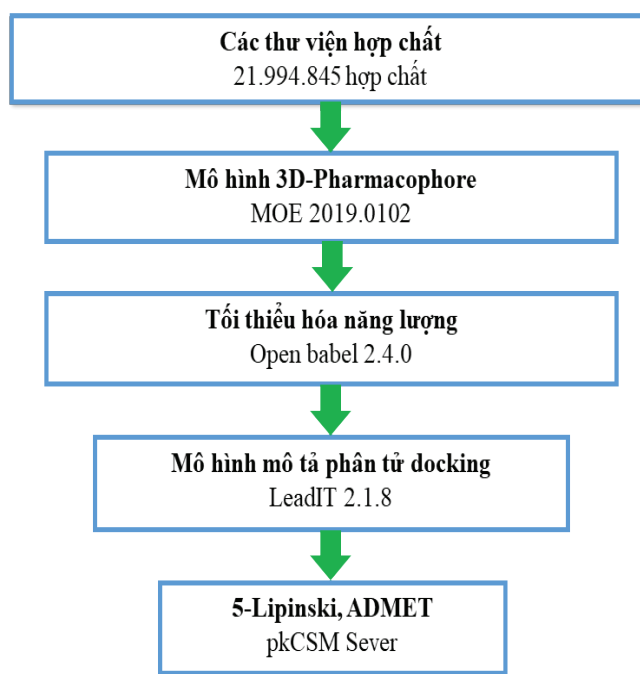
Olmesartan ức chế angiotensin II thông qua việc liên kết với thụ thể AT₁, điểm số redock -37,6458 kJ/mol và tương tác trực tiếp với bốn acid amin quan trọng: Ser105, Arg167, Trp84 và Tyr35. Các acid amin này đóng vai trò then chốt trong việc xây dựng mô hình 3D-pharmacophore và mô hình mô tả phân tử docking. Nghiên cứu đã sử dụng các mô hình *in silico* để sàng lọc thư viện hợp chất, nhằm tìm ra các chất có ái lực với thụ thể AT₁ vượt trội so với olmesartan.

Cấu trúc thụ thể AT₁ và olmesartan có sẵn với ID 4ZUD trên cơ sở dữ liệu RCSB Protein Data Bank. Sau khi kiểm tra sơ bộ cấu trúc, công cụ QuickPrep trong phần mềm MOE 2019.0102 được sử dụng để sửa chữa cấu trúc protein và thực hiện quá trình proton hóa 3D. Nhóm nghiên cứu đã tạo mô hình 3D-pharmacophore bằng phần mềm MOE

2019.0102 [5, 6]. Các hợp chất phù hợp với mô hình 3D-pharmacophore đã được tối thiểu hóa năng lượng bằng phần mềm Open Babel 2.4.0 để chuẩn bị cho quá trình docking [7]. Phương pháp docking được thực hiện bằng phần mềm LeadIT 2.1.8, cho kết quả là điểm số docking tương ứng theo từng cấu dạng [8]. Kết quả thu được sẽ được phân tích thông qua công cụ Ligand Interactions trong phần mềm MOE 2019.0102, nhằm đánh giá mức độ gắn kết của các hợp chất với thụ thể AT₁. Trước khi tiến hành quá trình docking, phối tử olmesartan đã được tách ra từ phức hợp 4ZUD và được tái docking vào khoang gắn kết. Kết quả docking được đánh giá là đáng tin cậy nếu độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD) nhỏ hơn 2 Å. Một số hợp chất có khả năng gắn kết tốt (được đánh giá qua điểm số docking) với AT₁ sẽ được đánh giá các đặc tính giống thuốc (drug-like) thông qua quy tắc 5-Lipinski và các chỉ số dược động học như hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ, độc tính (ADMET) bằng công cụ pkCSM [9].

Quá trình sàng lọc ảo sử dụng các hợp chất được thu thập từ nhiều thư viện khác nhau, bao gồm: Maybridge (MAY), Drug Bank (DB), ZINC (ZINC) và các hợp chất có nguồn gốc từ y học cổ truyền Trung Quốc [10-14].

Quy trình sàng lọc được mô tả trong hình 1.



Hình 1. Quy trình sàng lọc.

3. Kết quả và bàn luận

Từ các thư viện DB, MAY, TCM, ZINC có tổng cộng 21.994.845 hợp chất được thu thập và tiến hành sàng lọc nhằm tìm kiếm các chất có khả năng ức chế thụ thể AT₁ của angiotensin II. Các chất được chạy cấu dạng trước khi dùng để sàng lọc qua mô hình *in silico*. Kết quả thu thập dữ liệu được trình bày ở bảng 1.

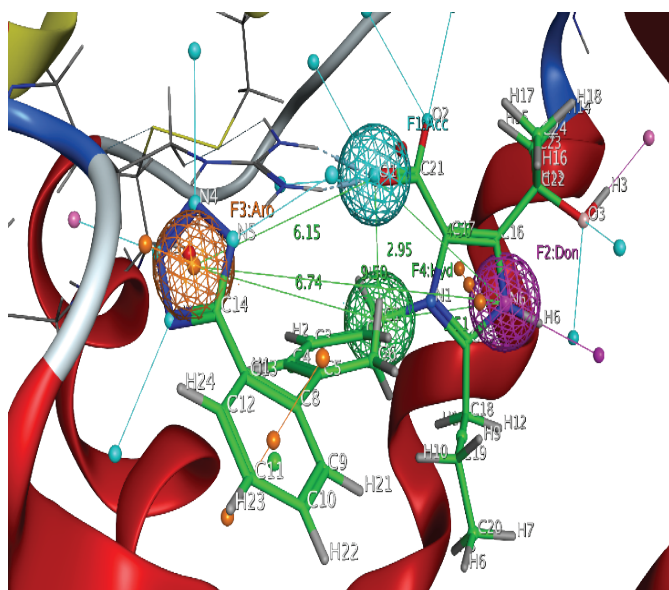
Bảng 1. Kết quả thu thập dữ liệu.

Thư viện	Số lượng hợp chất
DB	8.993
TCM	57.424
MAY	151.335
ZINC	21.777.093
Tổng cộng	21.994.845

DB: Drug Bank, TCM: Traditional Chinese Medicine, MAY: Maybridge, ZINC: ZINC.

3.1. Mô hình 3D-pharmacophore

Dựa trên các tương tác giữa thụ thể AT₁ và thuốc olmesartan, nghiên cứu đã xác định được bốn acid amin đóng vai trò quan trọng trong việc xây dựng mô hình 3D-pharmacophore. Các acid amin này bao gồm: Ser 105, Arg 167, Trp 84 và Tyr 35 (hình 2). Đây là những vị trí thiết



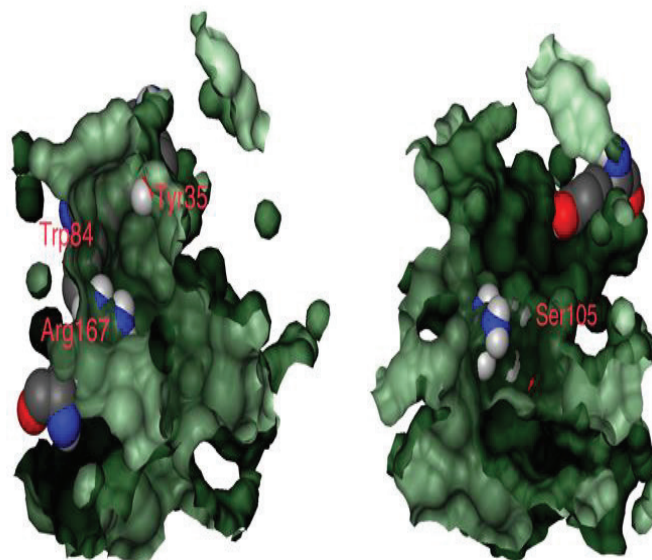
Hình 2. Mô hình 3D-pharmacophore.

yếu để thiết lập mô hình 3D-pharmacophore và mô hình docking phân tử. Trong đó:

- Vị trí N6 liên kết H-donor với Tyr 35
- Vị trí O1 liên kết H-acceptor với Arg 167
- Vị trí C1 liên kết H-pi với Trp 84
- Vị trí Vòng 5 liên kết pi-H với Ser 105

3.2. Mô hình mô tả phân tử docking

Trong nghiên cứu, mô hình protein AT₁ được mở rộng với bán kính 6,5 Å nhằm đảm bảo bao phủ đầy đủ các vùng tương tác quan trọng gồm bốn acid amin chính. Bề mặt tương tác của AT₁ có đặc điểm lõm, với các acid amin này tập trung tại khu vực lõm. Do đó, để gắn kết thành công, các phối tử cần có cấu trúc phù hợp với hình dạng cụ thể của bề mặt này. Mô hình chi tiết về phân tử docking được minh họa trong hình 3.



Hình 3. Mô hình mô tả phân tử docking.

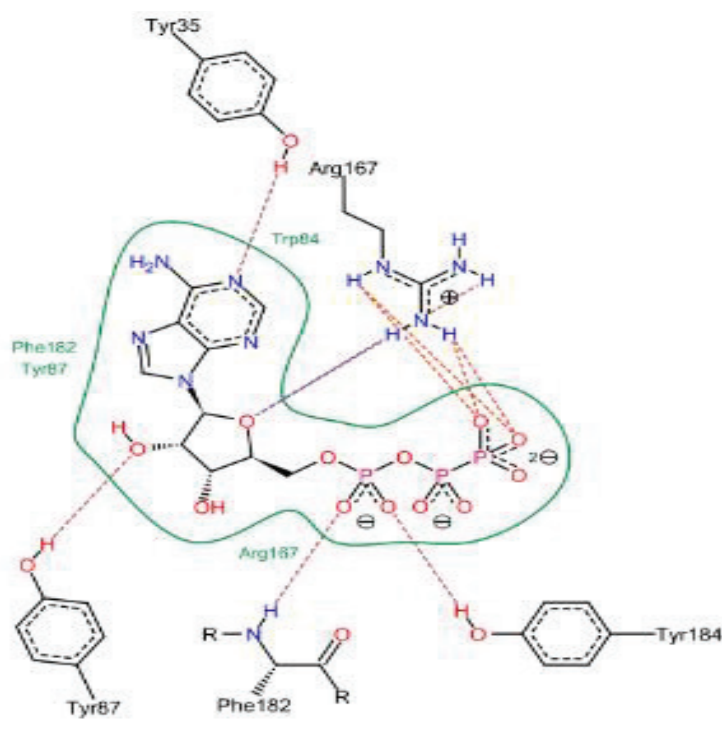
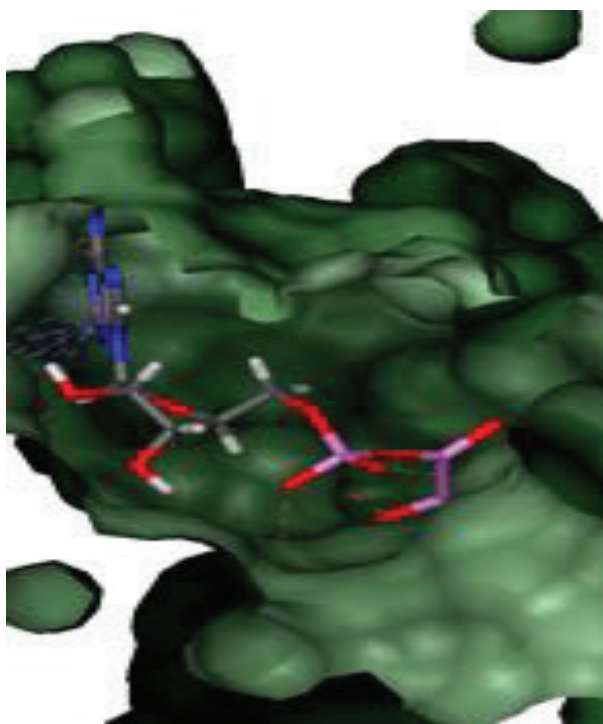
3.3. Kết quả sàng lọc

Nghiên cứu đã sử dụng mô hình 3D-pharmacophore để tiến hành sàng lọc các hợp chất từ nhiều thư viện khác nhau. Kết quả cho thấy, có 7.189 hợp chất phù hợp với tiêu chí của mô hình 3D-pharmacophore, trong đó 7.103 hợp chất đã được thực hiện docking thành công. Thông tin chi tiết về quá trình sàng lọc được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Số liệu tổng hợp quá trình sàng lọc

Thư viện	Thoả mãn mô hình 3D-pharmacophore	Docking thành công
DB	78	71
TCM	2.686	2.537
MAY	101	92
ZINC	4.426	4.403
Tổng	7.190	7.103

DB: Drug Bank, TCM: Traditional Chinese Medicine, MAY: Maybridge, ZINC: ZINC.



Hình 4. Tương tác giữa TCM184 và các acid amin quan trọng trong thụ thể AT₁.

Khi đánh giá sự tương tác giữa các hợp chất và các acid amin quan trọng, kết quả cho thấy tất cả các hợp chất đã docking thành công đều liên kết với ít nhất một acid amin quan trọng. Đặc biệt, có 626 hợp chất thể hiện ái lực với thụ thể AT₁ cao hơn so với olmesartan, với điểm số docking thấp hơn -37,6458 kJ/mol. Có 10 hợp chất có điểm số docking tốt nhất và có liên kết với ít nhất 2 trong 4 acid amin quan trọng, được thể hiện ở bảng 3.

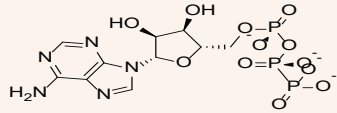
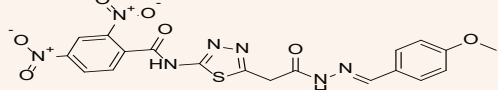
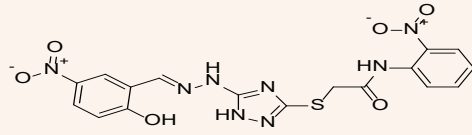
Hợp chất TCM184 đạt điểm số docking ấn tượng nhất (-54,2874 kJ/mol), với khả năng liên kết mạnh mẽ tại nhiều vị trí acid amin quan trọng. Điều này cho thấy tiềm năng cao của TCM184 trong việc ức chế thụ thể AT₁. Kết quả chi tiết được minh họa trong hình 4.

3.4. Đánh giá theo quy tắc 5-Lipinski

Một hợp chất được coi là giống thuốc và có thể sử dụng qua đường uống cần không vi phạm quá 1 trong 4 tiêu chí của quy tắc 5-Lipinski: (1) Khối lượng phân tử không

vượt quá 500 Da; (2) Tính thân dầu cao (LogP không vượt quá 5); (3) Không có quá 5 nhóm cho liên kết hydro; (4) Không có quá 10 nhóm nhận liên kết hydro [15]. Cả 10 chất đều thỏa mãn điều kiện của quy tắc 5-Lipinski, trong đó có ZINC21125103, ZINC12560331, ZINC01187319 thỏa mãn cả 4 điều kiện, còn lại các chất ZINC59498759, ZINC59498761, ZINC59498771, ZINC59498781, ZINC59498790, TCM184, ZINC58997256 thỏa mãn 3 trên 4 điều kiện (bảng 4).

Bảng 3. Một số hợp chất tiềm năng đã docking thành công.

STT	Tên hợp chất/Cấu trúc	Điểm số docking (kJ/mol)	Acid amin tương tác
1	TCM184 	-54.2874	Tyr35 , Tyr87, Arg167 , Phe182, Tyr184
2	ZINC59498761 	-53.1585	Tyr35 , Tyr87, Thr88, Arg167 , Cys180, Phe182, Tyr184, Lys199
3	ZINC59498781 	-52.3130	Tyr35 , Tyr87, Arg167 , Phe182, Tyr184, Lys199
4	ZINC59498759 	-49.6501	Tyr35 , Tyr87, Arg167 , Cys180, Phe182, Tyr184
5	ZINC59498790 	-48.9353	Tyr35 , Tyr87, Arg167 , Cys180, Phe182, Tyr184, Lys199
6	ZINC01187319 	-48.5896	Tyr35 , Tyr87, Arg167
7	ZINC59498771 	-48.3779	Tyr35 , Tyr87, Arg167 , Cys180, Phe182, Tyr184, Lys199
8	ZINC58997256 	-48.0929	Tyr35 , Arg167
9	ZINC12560331 	-45.1562	Tyr35 , Tyr87, Arg167
10	ZIN21125103 	-45.0217	Tyr35 , Tyr87, Arg167 , Tyr 184

Bảng 4. Kết quả đánh giá theo nguyên tắc 5-Lipinski và đánh giá ADMET.

	TCM184	ZINC 21125103	ZINC 12560331	ZINC 59498759	ZINC 59498761	ZINC 59498771	ZINC 59498781	ZINC 59498790	ZINC 01187319	ZINC 58997256
5-Lipinski										
Khối lượng phân tử	487,151	466,406	480,5	487,41	487,41	471,411	485,438	499,421	401,358	458,416
Tính thân dầu cao	-4,0886	3,7814	4,3951	17.108	17.108	2,0052	2,3082	2,0283	2,5253	2,5035
Nhóm cho liên kết hydrogen (HBD)	3	2	0	4	4	3	2	2	1	4
Nhóm nhận liên kết hydrogen (HBA)	17	8	6	12	12	11	11	12	7	11
Hấp thu										
Tan trong nước (log mol/l)	-2,706	-4,57	-3,477	-3,277	-3,537	-3,841	-4,127	-4,019	-2,908	-2,95
Tính thấm màng CaCO ₂ (log P _{app} trong 10 ⁻⁶ cm/s)	-0,669	0,049	0,883	-0,051	0,127	0,205	0,294	0,234	0,112	-0,793
Hấp thu ở ruột (người) (%)	36,602	93,172	83,7	62,785	62,562	68,808	70,582	76,696	75,199	64,504
Phân bố										
Thể tích phân bố VDss (người) (logL/kg)	0,754	-1,313	-1,828	-3,277	-0,451	-0,659	-0,764	-0,801	-0,791	-0,516
Tỷ lệ hợp chất ở dạng tự do (người)	0,665	0	0	0	0	0	0	0	0,101	0,315
Tính thấm BBB	-2,247	-0,901	-0,729	-1,725	-1,603	-1,43	-1,064	-1,222	-0,919	-2,17
Chuyển hóa										
Cơ chất CYP2D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ức chế CYP2D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cơ chất CYP3A4	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
Ức chế CYP3A4	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-
Thải trừ										
Độ thanh thải toàn phần (log ml/min/kg)	-0,345	0,07	0,461	0,166	0,022	-0,017	0,13	-0,027	0,182	0,308
Cơ chất OCT2 thận	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Độc tính										
AMES	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Gan	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Da	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.5. Đánh giá ADMET

Về khả năng hấp thu, một hợp chất được xem là có tính thấm tốt nếu giá trị thấm qua màng CaCO_2 lớn hơn 0,9. Kết quả từ bảng 4 chỉ ra rằng, tất cả 10 hợp chất đều có giá trị thấm nhỏ hơn 0,9, cho thấy khả năng thấm qua màng thấp. Tuy nhiên, hầu hết các hợp chất này lại có khả năng hấp thu ở ruột người (HIB) khá tốt, với HIB đều lớn hơn 30%. Chất có tỷ lệ hấp thu cao nhất qua ruột là ZIN21125103 với 93,172%, chất có khả năng hấp thu qua ruột thấp nhất là TCM184 với 36,602%. Một phân tử có giá trị $\log BB > 0,3$ được xem là dễ dàng vượt qua hàng rào máu não, ngược lại, phân tử có $\log BB < -1$ được xem là phân bố đến não kém. Qua bảng khảo sát ta thấy, hầu hết 10 chất hầu như không hoặc rất ít qua được hàng rào máu não ($\log BB$ từ -2,247 đến -0,729).

Về chuyển hóa, hầu hết các chất được chuyển hóa qua CYP3A4 ngoại trừ hợp chất TCM184 và ZINC01187319. Kết quả dự đoán cho thấy, tất cả 10 hợp chất đều không phải là chất nền của vận chuyển cation hữu cơ ở thận.

Về độc tính, cả 10 chất đều không gây kích ứng da. Thử nghiệm AMES là một phương pháp dùng để phân tích khả năng gây ra đột biến trong ADN. Hầu hết các chất đều gây độc tính từ thử nghiệm AMES và độc tính trên gan ngoại trừ 2 hợp chất TCM184 và ZINC12560331.

4. Kết luận

Với mục tiêu đề ra, nhóm nghiên cứu đã sàng lọc và tìm kiếm ra những hợp chất tiềm năng có khả năng ức chế thụ thể AT_1 của angiotensin II. Nghiên cứu thu thập tổng cộng có 21.994.845 từ nhiều thư viện hợp chất: DB, TCM, ZINC, MAY. Dựa trên các tương tác giữa thuốc olmesartan và thụ thể AT_1 , nhóm nghiên cứu đã xác định được các acid amin quan trọng gồm: Tyr35, Trp84, Ser105 và Arg167. Các acid amin này đã được sử dụng để xây dựng mô hình 3D-pharmacophore và mô hình docking phân tử cho các hợp chất có khả năng gắn kết với thụ thể AT_1 . Quá trình sàng lọc đã thu được 7.190 hợp chất thỏa mãn mô hình 3D-pharmacophore, trong đó có 7.103 hợp chất docking

thành công. Sau khi phân tích sự tương tác giữa các hợp chất này và các acid amin quan trọng trong thụ thể AT_1 , nhóm nghiên cứu đã chọn ra 10 hợp chất tiềm năng. Tất cả các hợp chất này đều đáp ứng quy tắc 5-Lipinski, đồng thời có đặc tính dược động học tốt, phù hợp với yêu cầu của các hợp chất giống thuốc dùng đường uống. Đặc biệt, hai hợp chất TCM184 và ZINC12560331 được dự đoán không gây độc tính từ thử nghiệm AMES, độc tính trên gan và không gây kích ứng da. Để đạt được những bước tiến lớn hơn trong việc khám phá thuốc ức chế thụ thể AT_1 , cần tiến hành mô phỏng động lực học phân tử, tính toán năng lượng tự do liên kết cho tất cả các chất tiềm năng đã sàng lọc được trong nghiên cứu này và thực hiện các nghiên cứu thực nghiệm *in vitro*, *in vivo*. Từ đó, các chất tiềm năng sẽ được chứng minh hoạt tính một cách chính xác hơn, nhằm tiến tới nghiên cứu, phát triển thuốc mới trong điều trị bệnh tăng huyết áp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K.T. Mills, J.D. Bundy, T.N. Kelly, et al. (2016), "Global disparities of hypertension prevalence and control: A systematic analysis of population-based studies from 90 countries", *Circulation*, **134**(6), pp.441-450, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018912.
- [2] L.D. Colantonio, J.N. Booth, A.P. Bress, et al. (2018), "2017 ACC/AHA blood pressure treatment guideline recommendations and cardiovascular risk", *Journal of The American College of Cardiology*, **72**(11), pp.1187-1197, DOI: 10.1016/j.jacc.2018.05.074.
- [3] F. Contreras, M.A.D.L. Parte, J. Cabrera, et al. (2003), "Role of angiotensin II AT_1 receptor blockers in the treatment of arterial hypertension", *American Journal of Therapeutics*, **10**(6), pp.401-408, DOI: 10.1097/00045391-200311000-00005.
- [4] T.S. Bhat, I. Hafeez, S. Fatima, et al. (2022), "Safety and efficacy of ARNI (valsartan/sacubitril) vs ACEI (enalapril) in acute heart failure - A prospective observational study", *Indian Heart Journal*, **74**(3), pp.178-181, DOI: 10.1016/j.ihj.2022.04.003.
- [5] American Autoimmune Related Diseases Association (2020), "Autoimmune disease statistics, American autoimmune related diseases association", <https://www.aarda.org/>, accessed 13 June 2020.

- [6] P. Li, Y. Zheng, X. Chen, et al. (2017), “Drugs for autoimmune inflammatory diseases: From small molecule compounds to anti-tnf biologics”, *Frontiers in Pharmacology*, **8**, DOI: 10.3389/fphar.2017.00460.
- [7] N.M. O’Boyle, M. Banck, C.A. James, et al. (2011), “Open Babel: An open chemical toolbox”, *Journal of Cheminformatics*, **3**(1), DOI: 10.1186/1758-2946-3-33.
- [8] BioSolveIT-GmbH (2012), “FlexX (protein-ligand docker) - User & technical reference as part of LeadIT 2.1”, <https://www.biosolveit.de>, accessed on 17 September 2019.
- [9] D.E.V. Pires, T.L. Blundell, D.B. Ascher, et al. (2015), “pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures”, *Journal of Medicinal Chemistry*, **58**(9), pp.4066-4072, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
- [10] K. Reich, M. Gooderham, D. Thaçi, et al. (2019), “Risankizumab compared with adalimumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis (IMMvent): A randomised, double-blind, active-comparator-controlled phase 3 trial”, *The Lancet*, **394**(10198), pp.576-586, DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30952-3.
- [11] F. Atzeni, A. Doria, M. Ghirardello, et al. (2007), “Potential target of infliximab in autoimmune and inflammatory diseases”, *Autoimmunity Reviews*, **6**(8), pp.529-536, DOI: 10.1016/j.autrev.2007.03.009.
- [12] R. Milo, O. Stüve (2016), “Spotlight on daclizumab: Its potential in the treatment of multiple sclerosis”, *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, **6**, pp.95-109, DOI: 10.2147/DNND.S85747.
- [13] M. Akdis, A. Aab, C. Altunbulakli, et al. (2016), “Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **138**(4), pp.984-1010, DOI: 10.1016/j.jaci.2016.06.033.
- [14] Y.C. Lo, C.A. Su, S.B. Calvin, et al. (2022), “TCM database”, <http://tcm.cmu.edu.tw/>, accessed on 12 September 2022.
- [15] R.E. Mahgoub, N. Atatreh, M.A. Ghattas, et al. (2022), “Using filters in virtual screening: A comprehensive guide to minimise errors and maximise efficiency”, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **58**, pp.99-136, DOI: 10.1016/bs.armc.2022.09.002.