

ЗАВИСИМОСТЬ «СТРУКТУРА–АКТИВНОСТЬ» НОВЫХ НЕНУКЛЕОЗИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ-1, ОСНОВАННАЯ НА МОДИФИКАЦИИ ЛИНКЕРОВ

Захарова Е.К.

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: ekzakharova1@gmail.com

В обзоре представлены современные научные работы по дизайну и конструированию новых ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ-1. В частности, рассмотрены модификации линкеров панели новых производных DAPY, HEPT и DABO, большинство из которых проявили высокую активность против ВИЧ-1 дикого типа и против двойного мутанта ВИЧ-1 K103N/Y181C. В работе изучена зависимость «структура–активность» для лидеров ряда ННИОТ. Доказано, что влияние линкера играет существенную роль во взаимодействии между ингибиторами и ОТ (в том числе за счет образования новых водородных связей с аминокислотами гидрофобного кармана), поэтому дальнейшие модификации могут привести к созданию еще более сильнодействующих соединений против ВИЧ. В линейках указанных ННИОТ были рассмотрены линкеры, состоящие из атома кислорода, серы, аминогруппы, метиленового фрагмента, нафталинового кольца, кетогруппы, пептидной связи. Мощную противовирусную активность показали соединения с пиперидиновым линкером, эффективные производные дигидрофуоро[3,4-d]пиримидина в качестве ННИОТ, а также двухатомных линкеров, содержащих метиленовый фрагмент с атомом азота, кислорода или серы и комбинации: амидная связь, метиленовый фрагмент, кислород/сера; карбонильная группа, метиленовый фрагмент, сера. Приведены данные, подтверждающие высокую ингибирующую активность. При сравнении анти-ВИЧ-1 активности ранее опубликованных соединений с метиленовым или карбонильным линкером было выявлено, что их активность сильно зависит от положения заместителей в соседнем ароматическом кольце.

Ключевые слова: ВИЧ-1, обратная транскриптаза, ненуклеозидный ингибитор, линкер, модификация.

STRUCTURE-ACTIVITY DEPENDENCE OF NEW NON-NUCLEOSIDE HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS BASED ON LINKER MODIFICATION

Zakharova E.K.

FGBOU VO «Volograd State Medical University» Ministry of Health of the Russian Federation, Volgograd, e-mail: ekzakharova1@gmail.com

The review presents modern scientific work on the design and construction of new non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). In particular, modifications of panel linkers of new derivatives DAPY, HEPT and DABO are considered, most of which showed high activity against wild-type HIV-1 and against the HIV-1 double mutant K103N/Y181C. In this work, the dependence «structure-activity» for the leaders of a number of NNRTIs was studied. It has been proven that the influence of the linker plays a significant role in the interaction between inhibitors and RT (including through the formation of new hydrogen bonds with amino acids of the hydrophobic pocket), so further modifications can lead to even more potent anti-HIV compounds. In the lines of these NNRTIs, linkers consisting of an oxygen atom, sulfur, an amino group, a methylene fragment, a naphthalene ring, a keto group, and a peptide bond were considered. Compounds with a piperidine linker, effective derivatives of dihydro[3,4-d]pyrimidine, have shown potent antiviral activity as NNRTIs. As well as diatomic linkers containing a methylene fragment with a nitrogen, oxygen or sulfur atom and combinations: amide bond, methylene fragment, oxygen/sulfur; carbonyl group, methylene fragment, sulfur. The data confirming the high inhibitory activity are given. When comparing the anti-HIV-1 activity of previously published compounds with a methylene or carbonyl linker, it was found that their activity is highly dependent on the position of the substituents in the adjacent aromatic ring.

Keywords: HIV-1, reverse transcriptase, non-nucleoside inhibitor, linker, modification.

В наши дни ВИЧ-инфекция превратилась в пандемию и является одной из основных глобальных проблем общественного здравоохранения. Несмотря на предпринимаемые усилия,

эпидемия продолжает развиваться без признаков к замедлению и к настоящему времени унесла почти 36,3 млн человеческих жизней [1]. По данным Роспотребнадзора, на 2021 г. число граждан Российской Федерации (РФ), заразившихся ВИЧ-инфекцией, составляет более 1,5 млн человек [2]. За 10 лет коэффициент заболеваемости вырос в 3 раза, а число смертельных случаев – в 13 раз [3].

В настоящее время прилагаются колоссальные усилия, направленные на предупреждение, профилактику и подавление ВИЧ-инфекции.

Высокоактивная антиретровирусная терапия – метод терапии ВИЧ-инфекции (ВИЧ относят к семейству ретровирусов), состоящий в регулярном приеме двух и более противовирусных препаратов. Ключевым компонентом современных протоколов высокоактивной антиретровирусной терапии являются нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ.

ННИОТ являются неконкурентными ингибиторами фермента, которые связываются с аллостерическим центром ОТ, влияющим на мобильность и гибкость центра полимеризации, приводя к резкому снижению эффективности фермента. Центр связывания ННИОТ расположен на расстоянии 10 Å от полимеразного центра в р66-субъединице и образован преимущественно гидрофобными аминокислотными остатками (L100, K101, K103, V106, T107, V108, V179, Y181, Y188, V189, G190, F227, W229, L234, Y318 р66 субъединицы и E138 р51 субъединицы [4]).

Цель исследования. Важнейшей причиной неэффективности лекарственных средств при длительном применении является развитие резистентности вируса, что делает актуальной разработку новых препаратов [5]. Поэтому изучение имеющихся литературных данных по дизайну и конструированию новых ННИОТ на основе базовых структур, анализ фармакологически активных веществ, а также исследование зависимости «структура–активность» являются целью данного обзора.

Материал и методы исследования. Анализ репрезентативной литературы в наукометрических базах данных, таких как РИНЦ, ISI, SCOPUS. Критериями отбора, в первую очередь, являлись издания, подходящие по тематике ННИОТ. Затем рассматривались высокий импакт-фактор журнала и его востребованность в научном мире.

Результаты исследования и их обсуждение. Одними из важнейших варьируемых фрагментов в структуре исследуемых ННИОТ, влияющих на противовирусную активность, являются модификации линкеров. Обозначим их в структурах DAPY, HEPT и DABO соответственно (рис. 1).

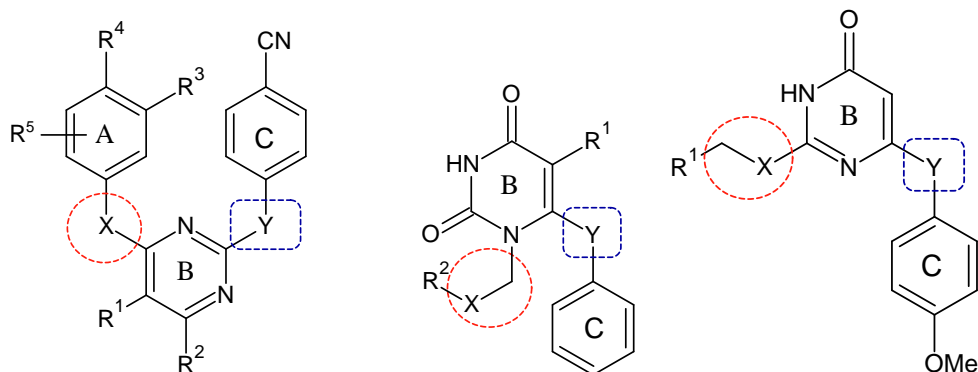
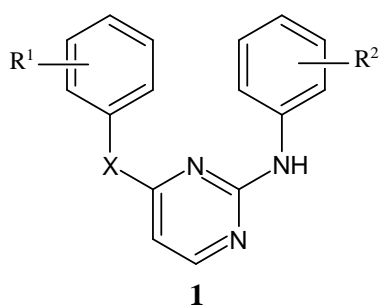


Рис. 1. Варьируемые линкеры производных пиримидинов



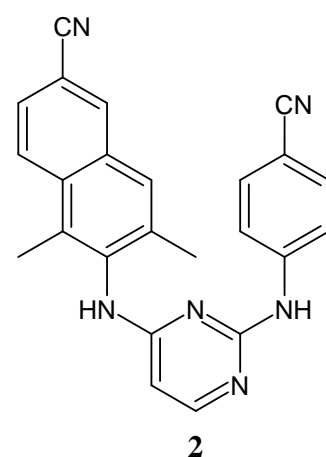
Новые производные DAPY **1**, включая *S*-DAPY, *NH*-DAPY и *O*-DAPY, были идентифицированы как ННИОТ с сильным действием против дикого и клинически мутантного штамма вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Наличие между кольцами А и В атома кислорода, серы, аминогруппы или метиленового фрагмента предпочтительнее для высокой анти-ВИЧ активности соединений, как в отношении вируса дикого типа, так и в отношении резистентных мутантных штаммов.

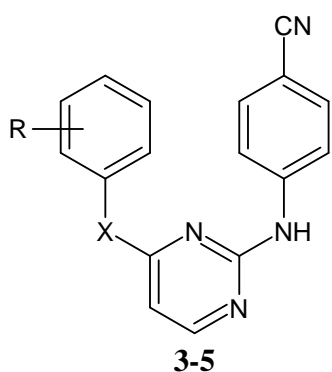
В ходе исследований по разработке новых ННИОТ был синтезирован ряд 4-(4-(замещенный-нафталин-1 или 2-илокси)пиримидин-2-иламино)бензонитрилов, в которых фенильное крыло А заменено нафталиновым кольцом, связанным с аминогруппой. Эта серия соединений проявляла высокую активность и очень низкую цитотоксичность в отношении ВИЧ-1 [6, 7].

При этом замена на аминогруппу привела к соединению **2** с ингибирующей активностью в наномолярном диапазоне ($EC_{50}=2,9$ нМ) против дикого типа ВИЧ и против его мутантных штаммов.

Результаты испытаний на биологическую активность показали, что линкер между пиримидиновым каркасом В и арильным крылом А сыграл существенную роль во взаимодействии между ингибиторами



и ОТ, поэтому дальнейшие модификации могут привести к созданию еще более сильнодействующих соединений против ВИЧ.



Были получены соединения **3-5** с линкером между ароматическим фрагментом и пиримидиновым кольцом для усиления связывания с аминокислотным остатком W229 [8] (табл. 1).

Ингибирующая активность соединений **3-5** в отношении ОТ ВИЧ

Вещество	R	X	IC ₅₀ /EC ₅₀ * (нМ)			
			WT	K103N	Y181C	K103N+Y181C
3	2,4,6-CH ₃	NH	1	4.3	7.5	44
4	2,6-CH ₃ , 4-CN	NH	0.4	1.9	7.1	37
5	2,6-CH ₃ , 4-CN	O	1.1	2.7	37	94
NVP*			40	6300	10000	>10000
DLV*			63	2500	2000	>10000
EFV*			1	40	2	40

Примечание. * – испытания проводились на линии клеток МТ-4

Группой Гу и Джу были синтезированы новые диарилпиримидины **6** (рис. 2) с двухатомным линкером между левым крылом А и центральным пиримидином В для улучшения конформационной гибкости. Большинство соединений проявили высокую активность против ВИЧ-1 дикого типа. Однако им не хватало активности против двойного мутанта ВИЧ-1 K103N/Y181C [9]. Биоизостеры **7** продемонстрировали аналогичную активность против ВИЧ-1 дикого типа, среди которых **7a** также показал высокую активность против мутанта ВИЧ-1 E138K [10]. Общей проблемой **6** и **7** является отсутствие активности против двойного мутанта ВИЧ-1 K103N/Y181C.

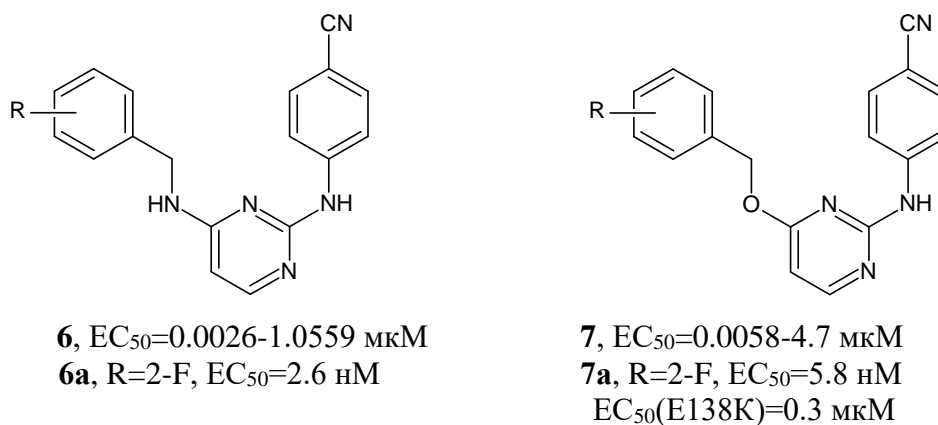
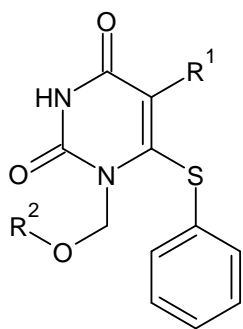


Рис. 2. Структура производных DAPY **6**, **7** и их активность против ВИЧ

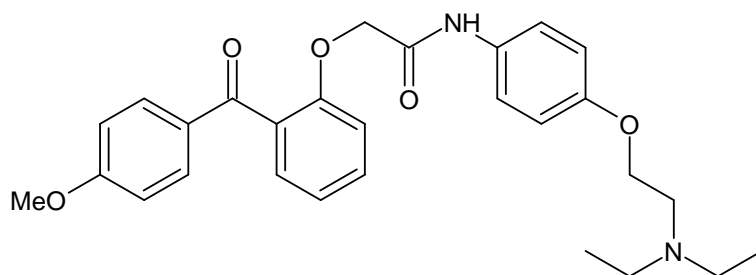


8

Замена линкера между пиримидиндионовым кольцом В и ароматическим С на серу, метиленовый фрагмент и кетогруппу в производных НЕРТ также приводит к повышению ингибирующей активности в соединении **8**. Повышенная активность ввиду наличия атома кислорода в составе линкера между фенильным фрагментом в *N*-1 положении и пиримидиновым циклом обусловлена образованием водородной связи с боковой группой Y318, располагающейся вблизи

«входа» в гидрофобный карман ОТ ВИЧ.

Усилия по поиску новых ННИОТ, эффективных против резистентных вирусных штаммов, привели к разработке новых ингибиторов, содержащих бензофеноновый фрагмент **9** [11].



9

При сравнении анти-ВИЧ-1 активности ранее опубликованных соединений с метиленовым или карбонильным линкером было выявлено, что их активность сильно зависит от положения заместителей в арильном кольце А. Наличие заместителей как в *C*-2, так и в *C*-6 положениях фенильного кольца А имеет решающее значение для биологической активности ННИОТ, как и случай 2,6-диметилфенильной части Этравирина и Рилпивирин. Два *орто*-заместителя дают почти перпендикулярную геометрию арильного кольца А к плоскости пиримидина и модуляции в обоих *орто*-положениях кольца В привели к значительному увеличению активности анти-ВИЧ-1. Такие структурные признаки ранее сочетались в соединениях, содержащих арильное кольцо А, замещенное хлором, бромом либо фтором в обоих *орто*-положениях. В частности, полученная серия, основанная на сочетании структурных особенностей DAPY и DABO аналогов с кольцом 2,6-дифторфенила, проявляла наномолярную анти-ВИЧ-1 активность против дикого типа, а также клинически значимых мутантных штаммов [12]. На основании вышеуказанных данных была разработана новая серия ННИОТ (рис. 3) [13].

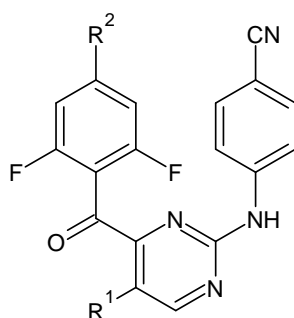
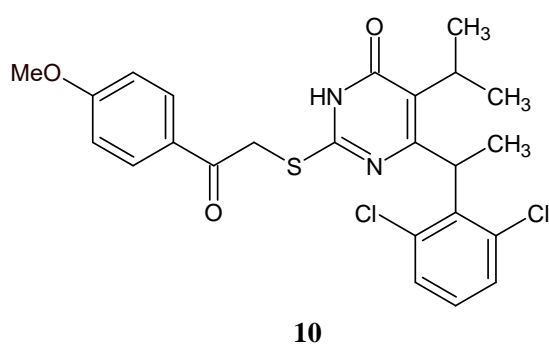


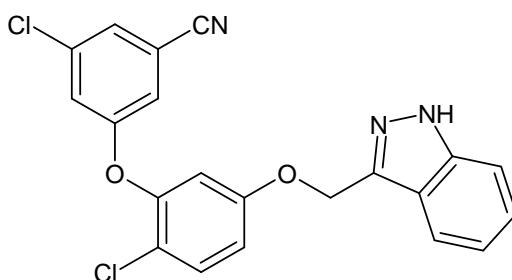
Рис. 3. Структура молекул-мишеней с карбонильным линкером и кольцом 2,6-дифторфенила



10

Введение кетогруппы в линкер между кольцами А и В увеличило активность в отношении ВИЧ-1 дикого типа (для соединения-лидера **10** $EC_{50} = 0,4$ нМ).

Такер и иные [14] получили соединение **11**, содержащее кислород в линкере между кольцами А и В, которое обладало высокой эффективностью по сравнению с большинством проверенных мутаций (табл. 2).



11

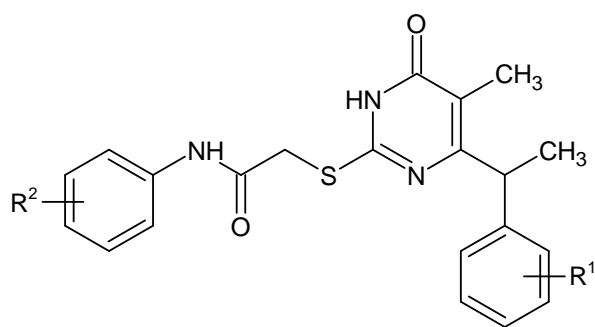
Таблица 2

Анализ зависимости «структура–активность» для гетероциклического производного **11**

Ингибирование ОТ, IC_{50} (нМ) ^a			Противовирусная активность в культуре клеток, IC_{95} (нМ) ^b		
WT	K103N	Y181C	WT (10% FBS)	K103N (10% FBS)	Y181C (10% FBS)
1.35	1.12	2.62	22.57	33.44	101.5

Примечание.^a Соединения оценивали в стандартном анализе SPA; значения представляют собой среднее геометрическое нескольких определений.

^b IC_{95} (концентрация, ингибирующая культуру клеток) определяется как концентрация, при которой распространение вируса подавляется >95% в Т-лимфоидных клетках человека МТ-4, поддерживаемых в среде RPMI 1640, содержащей 10% FBS. Значения представляют собой среднее геометрическое значение нескольких определений. Отсутствие цитотоксичности не наблюдалось вплоть до верхнего предела анализа (8,3 мкМ).

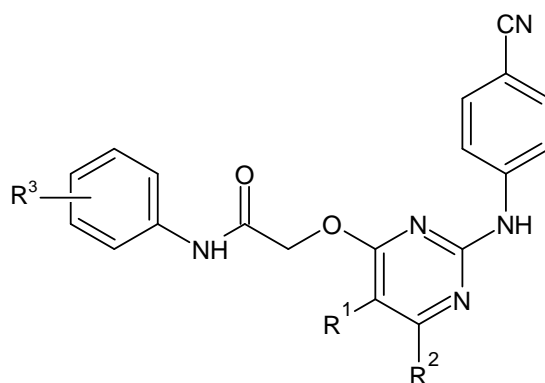


12

Известно, что образование пептидной связи в линкере между кольцами А и В в соединении **12** предположительно способствует образованию новых водородных связей с аминокислотами гидрофобного кармана и компенсирует утрату взаимодействия с Y181 и Y188 в случае мутации последних. По отдельности водородные связи

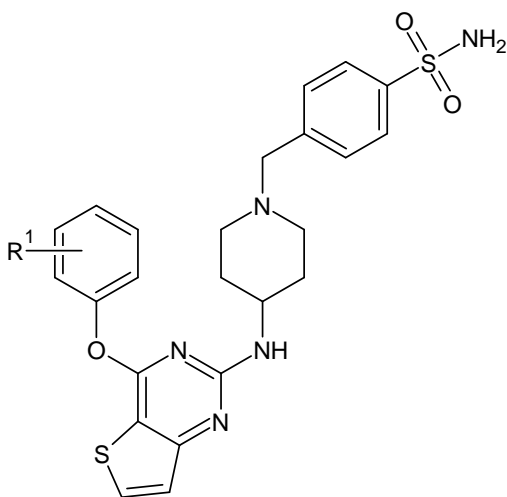
очень слабы, но за счет того, что в белке они образуются в огромных количествах, суммарно их вклад очень велик.

Нафтилзамещенные диарилпиримидины (наномолярная активность) являются сильнодействующими ННИОТ, но у этих соединений наблюдалась плохая растворимость. Кроме того, QSAR исследования показывают, что гибкость положения линкера благоприятна для усиления активности. Однако диарилловые эфиры (DPE) – еще один класс ННИОТ, занимающий тот



13

же сайт ОТ, что и DAPY, были хорошо известны своей высокой пероральной биодоступностью и активностью против ВИЧ. Поэтому, объединив важные фармакофоры DAPY и диарилловые эфиры, Чен и иные [15] разработали новую серию гибридов DAPY-DPE **13**, которые показали хорошую или отличную активность против дикого типа ВИЧ-1 в диапазоне от 0,16 до 0,016 мкМ.



14

В 2019 г. были разработаны и синтезированы эффективные производные дигидрофуро[3,4-d]пиримидина в качестве ННИОТ. Некоторые соединения оказались эффективными против широкого спектра штаммов ВИЧ-1, несущих единичные мутации, устойчивые к ННИОТ ($EC_{50}=0,9-8,4$ нМ), и проявляли сравнимую активность с ETV в отношении вируса с двойными мутациями F227L + V106A и K103N + Y181C. Это дало толчок к последующей структурной оптимизации, которая привела к созданию соединений

с вариацией пиперидинового линкера, обладающих мощной противовирусной активностью [16, 17]. Кроме того, открытый атом кислорода дигидрофуро[3,4-d]пиримидина способен образовывать дополнительную водородную связь, взаимодействуя с аминокислотными остатками в кармане связывания, что может способствовать улучшению профилей стойкости соединений. Лучшими оказались пиперидинзамещенные производные тиофена[3,2-d]пиримидина **14**, которые продемонстрировали более сильную анти-ВИЧ-1 активность в сравнении с Этравирином, а также повышенную растворимость и биодоступность [18, 19, 20].

Заключение. Работа по созданию новых соединений-лидеров, основанная на совокупности знаний химических закономерностей и прогнозировании свойств на качественном уровне, позволяет значительно сохранить время и ресурсы и открывает широкие

возможности для более целенаправленного синтеза соединений. Так, было установлено, для некоторых ННИОТ наличие в линкере атома кислорода, серы, аминогруппы, метиленового или пиперидинового фрагмента предпочтительнее для высокой анти-ВИЧ активности соединений как в отношении вируса дикого типа, так и в отношении резистентных мутантных штаммов. На улучшение конформационной гибкости влияет наличие двухатомного линкера, содержащего атом кислорода и аминогруппу. Введение кетогруппы в линкер способствует увеличению активности до нано- и субнаномолярной в отношении ВИЧ-1 дикого типа. Представленные структуры представляют большой интерес для дальнейших исследований, дизайна и конструирования потенциальных лекарственных средств.

Список литературы

1. Doherty M. Global Progress Report 2021: HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections. World Health organization. 2021. [Электронный ресурс]. URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/who_global_report_2021_webinar_doherty_20may_2021.pdf?sfvrsn=3a2a5f04_7 (дата обращения: 25.09.2022).
2. Справка ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом от 30 июня 2021 г. «ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 30 июня 2021 г.» [Электронный ресурс]. URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2021/08/Spravka-VICH-v-Rossii-1-polugodie-2021-g.pdf> (дата обращения: 25.09.2022).
3. Левинская А.Ю. Без секретов. М.: Бомбора, 2021. 170 с.
4. Валуев-Эллистон В.Т., Кочетков С.Н. Новые ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1: комбинаторный подход // Успехи биологической химии. 2017. Т. 57. С. 331–384.
5. Захарова Е.К. Синтез и исследование новых функциональных производных 6-[(2,6-дигалогенфенил)(метокси)метил]пиримидин-4(3*H*)-она: дис. ... канд. хим. наук. Волгоград, 2015. 135 с.
6. Feng X.Q., Liang Y.H., Zeng Z.S., Chen F.E., Balzarini J., Pannecouque C., De Clercq E. Structural modifications of DAPY analogues with potent anti-HIV-1 activity. ChemMedChem. 2009. vol. 4. P. 219–224. DOI: 10.1002/cmdc.200800334.
7. Liang Y.H., Feng X.Q., Zeng Z.S., Chen F.E., Balzarini J., Pannecouque C., De Clercq E. Design, Synthesis, and SAR of Naphthyl-Substituted Diarylpyrimidines as Non-Nucleoside

Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. *ChemMedChem*. 2009. vol. 4. P. 1537–1545. DOI: 10.1002/cmdc.200900212.

8. Liu S., Abbondanzieri E.A., Rausch J.W., Le Grice S.F., Zhuang X. Slide into action: dynamic shuttling of HIV reverse transcriptase on nucleic acid substrates. *Science*. 2008. vol. 322. no. 5904. P. 1092–1097. DOI: 10.1126/science.1163108.

9. Gu S.-X., Qiao H., Zhu Y.-Y., Shu Q.-C., Liu H., Ju X.-L., De Clercq E., Balzarini J., Pannecouque C. A novel family of diarylpyrimidines (DAPYs) featuring a diatomic linker: design, synthesis and anti-HIV activities. *Bioorg. Med. Chem.* 2015. vol. 23. no. 20. P. 6587–6593. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.09.020.

10. Lu H.-H., Xue P., Zhu Y.-Y., Ju X.-L., Zheng X.-J., Zhang X., Xiao T., Pannecouque C., Li T.-T., Gu S.-X. Structural modifications of diarylpyrimidines (DAPYs) as HIV-1 NNRTIs: synthesis, anti-HIV activities and SAR. *Bioorg. Med. Chem.* 2017. vol. 25. no. 8. P. 2491–2497. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.03.009.

11. Staszewski S., Morales-Ramirez J., Tashima K.T., Rachlis A., Skiest D., Stanford J., Stryker R., Johnson P., Labriola D.F., Farina D., Manion D.J., Ruiz N.M. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. *N. Engl. J. Med.* 1999. vol. 341. no. 25. P. 1865–1873. DOI: 10.1056/NEJM199912163412501.

12. Rotili D., Tarantino D., Artico M., Nawrozkij M.B., Gonzalez-Ortega E., Clotet B., Samuele A., Este J.A., Maga G., Mai A. Diarylpyrimidinedihydrobenzyloxopyrimidine hybrids: new, wide-spectrum anti-HIV-1 agents active at (sub)-nanomolar level. *J. Med. Chem.* 2011. vol. 54. no. 8. P. 3091–3096. DOI: 10.1021/jm101626c.

13. Šimon P., Baszczyński O., Šaman D., Stepan G., Hu E., Lansdon E.B., Jansa P., Janeba Z. Novel (2,6-difluorophenyl)(2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)methanones with restricted conformation as potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-1. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016. vol. 122. P. 185–195. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.06.026.

14. Thomas J.T., Sandeep S., John T.S., Robert M.T., Theresa M.W., Peter J.F., Jessica A.F., Ming-Tain L., Yuexia L., Georgia Mc., Meiquing L., Mike M., Gregory M., Vandna M., Rebecca P., Sridhar P., Rosa S., Maricel T., Joseph P.V., Bang-Lin W., Youwei Y. The design and synthesis of diaryl ether second generation HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) with enhanced potency versus key clinical mutations. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. vol. 18. no. 9. P. 2959–2966. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.03.064.

15. Wu H.-Q., Yao J., He Q.-Q., Chen W.-X., Chen F.-E., Pannecouque C., De Clercq E., Daelemans D. Synthesis and biological evaluation of DAPY–DPEs hybrids as non-nucleoside

inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.* 2015. vol. 23. no. 3. P. 624–631. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.11.032.

16. Takeuchi T., Oishi S., Kaneda M., Ohno H., Nakamura S., Nakanishi I., Yamane M., Sawada J.-i., Asai A., Fujii N. Kinesin spindle protein inhibitors with diaryl amine scaffolds: crystal packing analysis for improved aqueous solubility. *ACS Med. Chem. Lett.* 2014. vol. 5. no. 5. P. 566–571. DOI: 10.1021/ml500016j.

17. Kang D., Zhang H., Wang Z., Zhao T., Ginex T., Luque F.J., Yang Y., Wu G., Feng D., Wei F., Zhang J., De Clercq E., Pannecouque C., Chen C.H., Lee K.-H., Murugan N.A., Steitz T.A., Zhan P., Liu X. Identification of Dihydrofuro[3,4-d]pyrimidine Derivatives as Novel HIV-1 Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors with Promising Antiviral Activities and Desirable Physicochemical Properties. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2019. vol. 62. no. 3. P. 1484–1501. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01656.

18. Kang D., Fang Z., Li Z., Huang B., Zhang H., Lu X., Xu H., Zhou Z., Ding X., Daelemans D., De Clercq E., Pannecouque C., Zhan P., Liu X. Design, synthesis, and evaluation of thiophene[3,2-d]pyrimidine derivatives as HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors with significantly improved drug resistance profiles. *J. Med. Chem.* vol. 2016. vol. 59. P. 7991–8007. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00738.

19. Kang D., Fang Z., Huang B., Lu X., Zhang H., Xu H., Huo Z., Zhou Z., Yu Z., Meng Q., Wu G., Ding X., Tian Y., Daelemans D., De Clercq E., Pannecouque C., Zhan P., Liu X. Structure-based optimization of thiophene[3,2-d]pyrimidine derivatives as potent HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors with improved potency against resistance-associated variants. *J. Med. Chem.* 2017. vol. 60. P. 4424–4443. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00332.

20. Yang Y., Kang D., Nguyen L.A., Smithline Z.B., Pannecouque C., Zhan P., Liu X., Steitz T.A. Structural basis for potent and broad inhibition of HIV-1 RT by thiophene[3,2-d]pyrimidine non-nucleoside inhibitors. *ELife.* 2018. vol. 7. P. 3340–3360. DOI: 10.7554/eLife.36340.