

NUKLEOSIDOVÁ CHEMIE V ÚOCHB – OHLÉDNUTÍ DO HISTORIE

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

MARCELA KREČMEROVÁ

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Česká republika
marcela.krecmerova@uochb.cas.cz

Došlo 26.2.24, přijato 27.3.24.

Nukleosidová chemie se v ÚOCHB rozvíjela od roku 1957 díky předvídavosti jeho prvního ředitele Františka Šorma. Tento nový obor, z počátku cílený hlavně na syntézu oligonukleotidů, si brzy vydobyl skvělou reputaci. ÚOCHB byl v té době jedním z pouhých čtyř pracovišť na světě úspěšných v syntéze oligonukleotidů. Prvními úspěchy v syntézách chemicky modifikovaných nukleosidů byly syntézy 6-azauridinu jako antileukemika, 6-azauridin-triacetátu jakožto léčiva proti lupénce (Riboazauracil) a zejména 5-azacytosinových nukleosidů 5-azacytidinu a 2'-deoxy-5-azacytidinu (decitabinu), které byly syntetizovány na počátku 60. let Aloisem Pískalou. Obě sloučeniny jsou antileukemické látky fungující na epigenetickém principu jako inhibitory DNA methylací. V současné době se klinicky používají k léčbě myelodysplastických syndromů a dalších hematologických malignit a jsou prodávány pod obchodními názvy Vidaza® (5-azacytidin, schválen 2004) a Dacogen® (5-aza-2'-deoxycytidin, schválen 2006). Významné syntetické úspěchy jsou spjaty s osobností Antonína Holého včetně syntéz L-nukleosidů a acyklických nukleosidových analogů, tj. látek, v nichž je cukerný furanosový kruh nahrazen (poly)hydroxylovaným acyklickým řetězcem. Mnohé byly shledány účinnými antiviroty a jeden z nich, 9-(S)-[(2,3-dihydroxypropyl)]adenin, dokonce vstoupil do klinické praxe jako antiherpetické léčivo Duvira gel. Skutečným milníkem se stal vývoj acyklických nukleosidfosfonátů (ANP), poprvé publikovaných Holým a De Clercqem v roce 1986. V průběhu příštích tří dekad bylo identifikováno ohromné množství biologicky aktivních ANP jako antivirotik, cytostatik, imunomodulátorů a antiparazitik. Tři z nich se dostaly do klinické praxe jako úspěšná antivirotika: cidofovir pro léčbu cytomegalovirové retinitidy u pacientů s AIDS, tenofovir pro léčbu a prevenci HIV a později schválen též pro léčbu hepatitidy B a adefovir taktéž pro léčbu hepatitidy B. Tenofovir je ve formě proléčiv nyní nejvíce používán jako součást kombinovaných anti-HIV preparátů obsahujících v jedné tabletě několik různých anti-HIV léčiv současně a stal se nejúspěšnějším a nejpoužívanějším anti-HIV léčivem vůbec.

Klíčová slova: 6-azauracil, 5-azacytidin, decitabin, antimetabolity, L-nukleosidy, acyklické analogy, DHPA, acyklické nukleosidfosfonáty, cidofovir, adefovir, antivirotika, HIV, tenofovir, kombinovaná antiretrovirová terapie, antiparazitika

V historii vědy zůstane rok 1953 už navždy spojen s jedním z nejvýznamnějších objevů 20. století. Stalo se tak v Cavendishově laboratoři v Cambridgi a onou událostí bylo vyřešení struktury DNA jako dvojité šroubovice s antiparalelní orientací obou řetězců, kde se párují adenin s thyminem a guanin s cytosinem pomocí vodíkových vazeb. Revoluční objev, který položil základy budoucí molekulární biologie a genetiky, byl odhalen světu 25. dubna 1953 v časopise *Nature*¹. Článek dlouhý jen něco přes jednu stránku začínající poněkud nesmělým úvodem „Rádi bychom navrhli strukturální podobu soli deoxyribonukleové kyseliny (D.N.A). Vyznačuje se novými rysy, které mají značnou biologickou zajímavost...“ záhy ovlivnil směřování vědeckého výzkumu chemických a biochemických laboratoří po celém světě.

V pražských Dejvicích byl ve stejném roce založen Ústav organické chemie a biochemie ČSAV v čele s jeho

prvním ředitelem Františkem Šormem. Činnost ústavu se zaměřovala hlavně na chemii přírodních látek (terpenů a rostlinných léčiv), steroidů, klasickou organickou syntézu (syntézy antibiotik, azulenů, aminokyselin a peptidů), aplikaci fyzikálních metod (IČ a UV spektroskopie), chemii a biochemii bílkovin a enzymologii. František Šorm byl člověk s mimořádnou vědeckou intuicí a brzy dokázal rozpoznat nezbytnost výzkumu nukleových kyselin pro další rozvoj biologických a chemických věd. Proto již čtyři roky po založení ústavu, v roce 1957, založil v ÚOCHB oddělení chemie nukleových kyselin, jehož vedoucím se stal Dr. Jiří Smrt. Jedním z hlavních témat nového oddělení byla syntéza oligonukleotidů.

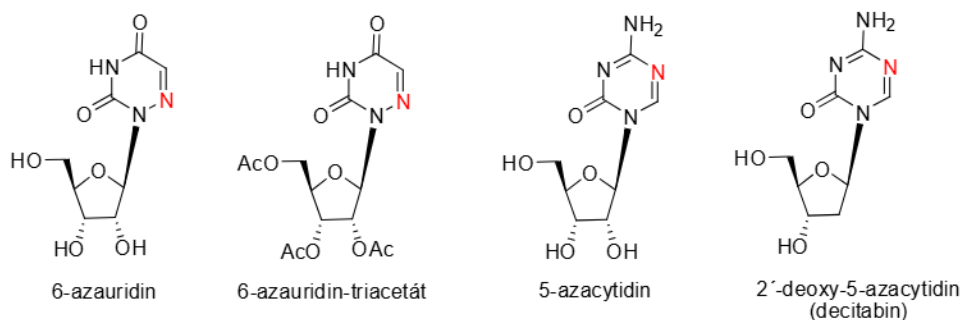
První oligonukleotidová práce autorů Smrta a Šorma z roku 1961 popisuje syntézu dimeru 6-azaU-p-U kondenzační reakcí chráněného 6-azauridinu a uridin-3'-fosfátu s DCC a následným odchráněním². Požadavky molekulár-

ních biologů na syntetické oligonukleotidy byly hnací silou k rychlému vývoji nových efektivnějších metod syntézy a pražská skupina si zde vydobyla velmi brzy prestižní pozici. Na počátku 60. let patřil ÚOCHB k pouhým čtyřem pracovištím na světě úspěšných v syntéze oligonukleotidů. Původní metoda syntézy oligonukleotidů v roztoku fosfodiesterovou metodou (Khorana) byla postupně nahrazována nejprve účinnější fosfortriesterovou metodou (Letsinger), poté metodou H-fosfonátovou (Todd, Froehler, Matteucci) a fosfitovou (Letsinger), která vytvořila základ fosforamiditové metody (Caruthers), která je v současnosti jedinou prakticky používanou metodou syntézy oligonukleotidů na pevné fázi³. Také zde jsme dokázali držet krok se západními pracovišti. Díky technické zdatnosti Jiřího Smrta a pracovníků vývojových dílen byly na ústavu svépomocí sestrojeny první automatické syntetizátory SynGen-1 a SynGen-2.

Paralelně s chemií oligonukleotidů byla věnována pozornost syntézám a biochemickým studiím chemicky modifikovaných nukleosidů. Strukturně pozměněné nukleosidy fungují jako antimetabolity v procesech metabolismu nukleových kyselin a mohou tedy ovlivňovat enzymové reakce v buňkách nebo buněčných parazitech (např. viry, bakterie, plísň). Osobnostmi nukleosidového výzkumu byli v 60. letech František Šorm, Alois Pískala, Jiří Žemlička, Stanislav Chládek, Jiří Beránek, Miroslav Prystaš, Antonín Holý, Josef Piřha, Jiří Veselý, Alois Čihák a Karel Raška, Jr. Pozornost farmaceutického průmyslu se v té době upínala hlavně na látky s cytostatickými účinky. První nukleosidové práce v ÚOCHB na konci 50. let se týkaly hlavně 6-azauridinu (obr. 1), což byl v té době v socialistickém Československu jediný komerčně dostupný nukleosid. Získával se jako vedlejší produkt z jedné biotechnologické výroby na Slovensku a důvodem zájmu o něj byly jeho cytostatické účinky. 6-Azauridin byl krátce vyvíjen firmou Spofa jako prostředek k léčbě leukémie a byl dokonce licencován britské firmě Distillers Co. V klinických zkouškách se však jeho antileukemické účinky ukázaly jako nedostatečné a vývoj byl ukončen. Mnohem úspěšnější byl 6-azauridin-triacetát. Tento derivát byl komerčně dostupný pod názvem Ri-boazauracil a prodával se v USA jako léčivo na lupénku^{4,5}.

I jeho používání však bylo zastaveno, a to z důvodu tromboembolických vedlejších účinků u malého procenta pacientů.

Biologická zajímavost 6-azapyrimidinových derivátů vedla logicky k myšlence syntetizovat jejich 5-azaanalogy. Toto téma bylo náplní disertační práce vědeckého aspiranta Aloise Pískaly. Ukázalo se, že syntetizovat 5-azauridin je nesmírně obtížné, a to z důvodu nestability triazinového kruhu – poloha 6 je extrémně náchylná k ataku nukleofilních činidel včetně OH^- iontů vody a dochází vždy spontánně k jeho otevření⁶. Po velkém úsilí se Pískalovi látka podařilo připravit značně složitým postupem výstavby celé heterocyklické části. K velkému zklamání však byly jeho biologické účinky nulové a Šorm poté Pískalovi zakázal další 5-azapyrimidinové deriváty připravovat jakožto ztrátu času a plýtvání drahými chemikáliemi. Pískala ale i tak v syntézách tajně pokračoval a roku 1963 připravil 5-azacytidin⁷. K překvapení všech se ukázaly jednak jeho mimořádně silné antibakteriální účinky, ale především účinky cytostatické, konkrétně antileukemické. Tématika 5-azacytosinových derivátů získala ihned oficiální podporu a rok na to byl syntetizován i 2'-deoxy analog, 5-aza-2'-deoxycytidin (decitabin, obr. 1). Na obě molekuly byly podány patentové přihlášky a patenty dokonce licencovaly velké farmaceutické firmy (Bayer a Upjohn, později Bristol-Myers). Vzhledem ke komplikovanému způsobu přípravy byl prakticky veškerý materiál obou nukleosidů na preklinické a klinické testy (mnohačetgramové až kilogramové šarže) po dlouhá léta syntetizován v ÚOCHB vlastníma rukama Dr. Pískaly a jeho spolupracovníků. Bohužel jeho objevy byly učiněny v nepříliš vhodné době, a přestože obě látky po 40 letech výzkumu nakonec dospěly až ke klinickému schválení, jejich autor ani ústav z nich neměl nikdy žádný zisk. Na tom se podepsaly jak nevýhodné smlouvy s firmami nebo jejich nedodržení, tak především neznalost patentového práva a všeobecně špatná patentová politika tehdejší Československé akademie věd. Pohnutá historie vývoje obou léčiv byla nedávno podrobně vylíčena v časopise Vesmír⁸. Průlomový objev, který hlavní měrou přispěl ke klinickému vývoji obou léčiv, učinili v roce 1980 profesor Peter Jones se svou doktorandkou



Obr. 1. Struktury biologicky aktivních 6-aza- a 5-azapyrimidinových nukleosidů

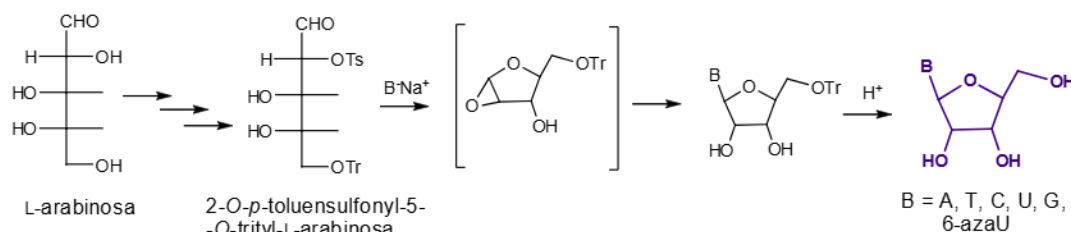
Shirley Taylor z University Jižní Kalifornie (USC, Los Angeles), když při práci s 5-azacytidinem pozorovali v té době téměř neuvěřitelný jev přeměny rakovinných buněk do stadia víceméně normálních buněk. K objevu došlo náhodou. Stačilo, aby si jeden z laborantů Jonesovy laboratoře po skončení experimentů s azacytidinem neuklidil stůl a odjel na dovolenou. Když se vrátil, zapomenuté rakovinné buňky byly po několikátýdenním působení azacytidinu zcela zdravé. Profesora Jonese účinek látky natolik nadchnul, že si 5-azacytidin podle Piskalovy publikace v Collection of Czechoslovak Chemical Communication⁷ ihned nasyntetizoval k dalším výzkumům a dokonce si nechal jeho označení 5-AZA-C přepsat jako novou poznávací značku svého auta.

Jak tedy 5-azacytidin funguje? Ukázalo se, že při nízkých koncentracích mají 5-azacytosinové nukleosidy zcela nový mechanismus účinku, odlišný od všech dosud známých cytostatik. 5-Azacytidin a decitabin fungují na epigenetickém principu jako inhibitory DNA methylací⁹. DNA je methylována enzymem DNA methyltransferasou v poloze 5 cytosinu; K DNA methylací dochází téměř výhradně v oblasti zvýšeného výskytu CpG dinukleotidů, tzv. CpG ostrůvků, které jsou přítomny v promotorové oblasti přibližně 50 % genů. Právě abnormální hypermethylace promotorových regionů v CpG ostrůvcích byla u mnoha druhů malignit prokázána jako příčina utlumení funkce tumorsupresorových genů a rozvoje rakovinného bujení. Enzym DNA methyltransferasa a její inhibice se tak stává důležitým targetem ve vývoji antitumorových léčiv, která necílí na rakovinné buňky za účelem jejich zničení, ale místo toho umožňují zpětnou přeměnu maligní buněčné populace do stavu více méně normálních zdravých buněk¹⁰. Po čtyřiceti letech od publikace prvních syntéz a mnoho let po expiraci původních patentů byly nakonec oba 5-azacytosinové nukleosidy schváleny FDA jako léčiva k terapii myelodysplastických syndromů pod názvy Vidaza® (5-azacytidin, schválen 2004) a Dacogen® (5-aza-2'-deoxycytidin, schválen 2006). Dalšími indikacemi pro jejich aplikaci jsou akutní myeloidní leukémie (Vidaza®, Dacogen®) a chronická myelomonocytová leukémie (Vidaza®).

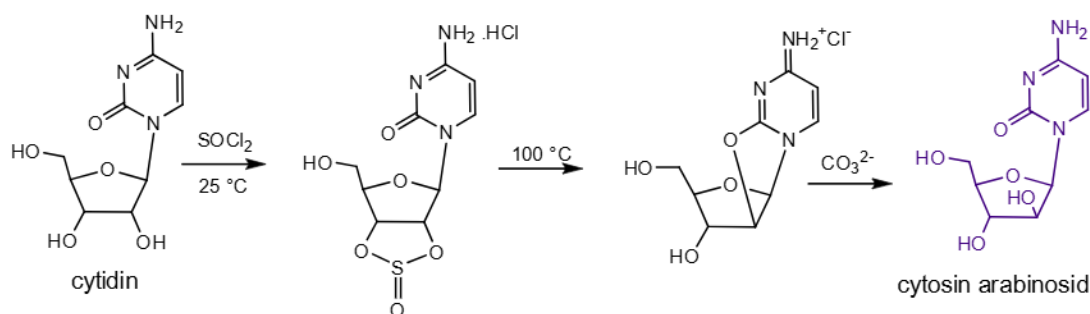
Ve stejné době, kdy Piskala rozvíjí svou chemii 5-azacytidinu, začíná svou kariéru v ÚOCHB také mladý Antonín Holý. Ten se nejprve jako aspirant pod vedením Dr. Zdeňka Arnolda věnoval klasické organické syntéze,

speciálně syntetickému využití reaktivity dimethylformamidu a polymethiniových solí^{11–13}. Do nukleosidové skupiny nastoupil po aspirantůře a zde se několik let zabýval hlavně 6-azauridinovou chemií, fosforylačními reakcemi, přípravou krátkých oligoribonukleotidů, cyklických ribonukleosidfosfátů a nukleosid 5'-fosfitů. Jeho průlomovou prací však byla roku 1969 syntéza L-nukleosidů a jejich fosforylovaných metabolitů. L-Nukleosidy byly v hledáčku biochemiků již nějaký čas, ale cesta k nim byla synteticky obtížná. První syntézy popsané o pět let dříve vycházející z halogenosy L-ribosy nebo halogenosy 5'-difenylofosforyl-L-ribosy a soli příslušné báze vedly jen k malým množstvím požadovaného produktu^{14,15}. Holého syntéza vycházející z L-arabinosy přes 2-O-p-toluensulfonfyl-5-O-trityl-L-arabinosu, uzavření epoxidového kruhu mezi polohami 1 a 2 a následné otevření epoxidu sodnou solí příslušné báze bylo synteticky jednoduché, univerzální a umožnilo získávat L-nukleosidy ve velkých, až 100 g šaržích¹⁶ (obr. 2). O tři roky později, roku 1972 publikoval Holý podobně úspěšnou metodiku syntézy L-deoxyribonukleosidů¹⁷. L-Nukleosidy byly předmětem výzkumu mnoha biochemických pracovišť, avšak významné účinky a uplatnění v té době ještě nenašly. Jejich „zlatá éra“ měla přijít až o několik desítek let později, když se hlavním úkolem farmaceutických firem stal boj s těžkými virovými infekcemi, jako HIV, hepatitida B nebo cytomegalovirové infekce u transplantovaných pacientů. Antivirotika, která dnes patří k hlavním terapeutikům proti těmto virovým infekcím, jako např. lamivudin, emtricitabin, clevudin, telbivudin nebo maribavir, jsou sloučeniny na bázi L-nukleosidů¹⁸. Přesto, že žádný z těchto preparátů není originálním produktem našeho ústavu, původní syntetické know-how našich chemiků k jejich vývoji přispělo významnou měrou.

Omezený přístup k devizovým prostředkům byl iniciací snahy o maximální soběstačnost, a to v nejrůznějších odvětvích, chemii a zdravotnictví nevyjímaje. Proto bylo např. vysoce oceňovaným počinem vypracování originální syntézy cytostatika 1-β-D-arabino-furanosylcytosinu (cytosin arabinosid, araC, cytarabin) používaného k léčbě leukémií. Inovativní pouze tříkroková syntéza vycházející z cytidinu (obr. 3) byla velmi efektivní a firma Spofa tak mohla podle tohoto postupu vyrábět vlastní cytarabin, který byl dodáván na trh pod firemním názvem Alcyten. Autoři syntézy Hubert Hřebabecský a Josef Brokeš pod



Obr. 2. Zkrácené schéma syntézy L-nukleosidů



Obr. 3. Originální syntéza cytosin arabinosidu (cytarabinu) vyvinutá v ÚOCHB

vedením Jiřího Beránka byli za tuto syntézu v roce 1980 oceněni Cenou ČSAV „Za nové poznatky v oblasti kancerostatika 1- β -D-arabinofuranosylcytosinu vedoucí k praktické aplikaci dosažených výsledků.“ (cit.¹⁹).

Zatímco v 50. a 60. letech byl hlavní zájem farmaceutického průmyslu soustředěn na vývoj látek cytostatické povahy, koncem 60. a počátkem 70. let se začíná obracet pozornost stále více i k virovým infekcím. Jedním z iniciátorů tohoto trendu byl v té době explozivní nárůst genitálního herpesu v USA, zřejmě jako důsledek společenských změn vedoucích k celkovému uvolnění morálky, vzniku hnutí hippies a zvýšení promiskuity. Genitální herpes je sexuálně přenosné onemocnění, které je způsobené nejčastěji virem herpes simplex typu 2 (HSV-2), ale původcem může být někdy i HSV-1. Jedna z prvních, kdo se začal systematicky věnovat hledání a testování protivirových látek na bázi nukleosidových analogů, byla americká biochemička a farmakoložka Gertrude Elion, vedoucí oddělení experimentální terapie společnosti Burroughs Wellcome. Poté, co si všimla, že adenin arabinosid vykazoval známky aktivity proti některým DNA virům, začala syntetizovat nové látky na bázi nukleosidových analogů. Výsledkem tohoto úsilí byl mezi jinými také purinový analog 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanin (acyklovir, Zovirax), který se záhy ukázal jako účinný inhibitor herpes simplex viru typu I a typu II a dalších herpetických virů^{20,21}. Zovirax firmy Burroughs Wellcome dlouho vedl na žebříčku prodeje protivirových léků a v roce 1988 byla za něj Gertrudě Elion spolu s kolegou Georgem Hitchingsem udělena Nobelova cena. Byla to historicky první Nobelova cena cílená do farmaceutického průmyslu. Z chemického hlediska byl acyklovir představitelem nové generace antimetabolitů, založené na tom, že potřebné prostorové uspořádání bioaktivní molekuly nemusí být *a priori* fixováno, ale může být vyvoláno z rozvolněné struktury molekuly teprve kontaktem s cílovým enzymem metabolismu, na nějž působí. Podobně jako u antimetabolitů dříve zmíněných, je i zde pro jejich funkci klíčovým metabolickým krokem fosforylace. V buňkách infikovaných herpes virem je tato fosforylace 30–120krát rychlejší než u neinfikova-

ných buněk, klíčovým enzymem katalyzujícím tuto fosforylací je thymidinkinasa.

Nový typ nukleosidových antimetabolitů s acyklickým řetězcem nahrazujícím cukerný kruh inspiroval nukleosidové chemiky z různých pracovišť. V ÚOCHB tato tematika zaujala mladého vědce Antonína Holého, který brzy na to syntetizoval svou vlastní sérii acyklických analogů. V květnu 1976 dostal Holý příležitost zúčastnit se v Göttingenu nukleosidové konference s názvem „Symposium on synthetic nucleosides, nucleotides and polynucleotides“. Konferenci organizoval Karl-Heinz Scheit, který byl Holého přítelem a spolupracovníkem spolu s Fritzem Ecksteinem během Holého tříměsíční postdoktorské stáže v Göttingenu. Na konferenci se Holý seznámil s předními osobnostmi nukleosidové chemie té doby, přičemž do budoucna nejvýznamnější bylo setkání s mladým belgickým lékařem – virologem z Lovaně Erikem De Clercqem. De Clercq, ač vzděláním lékař, vynikal znalostmi chemie a schopností správného chemického myšlení. Velmi rychle odhadl potenciál nukleosidů a nukleosidových antimetabolitů v jejich působení proti buněčným parazitům včetně virů. Na konferenci do Göttingenu přijel hlavně proto, aby se tu pokusil najít chemika ochotného ke spolupráci v hledání protivirově aktivních látek. Setkání De Clercqa s Holým bylo pro oba muže doslova osudové. Z obou vědců se stali doživotní přátelé a z jejich spolupráce vnikla v průběhu let protivirová léčiva zachraňující životy miliónů lidí. Toto první setkání později oba zmiňovali ve svých přednáškách a retrospektivních publikacích jako zcela zásadní^{22,23}. Erik De Clercq se mnohokrát vyjádřil, že jeho největší životní výhrou byla právě účast na konferenci v Göttingenu v roce 1976 a objev zdejší plejády vynikajících nukleosidových chemiků, z nichž první mezi všemi byl Antonín Holý. První série pouhých šesti látek přišla poštou z Prahy do Lovaně ještě téhož roku. K obrovskému překvapení byly dvě látky protivirově aktivní, z čehož nejnadějnější se jevil (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin (DHPA)²⁴. K objevu DHPA došlo jen krátce poté, co byl objeven protivirový účinek acykloviru. Na rozdíl od acykloviru působícímu selektivně proti her-

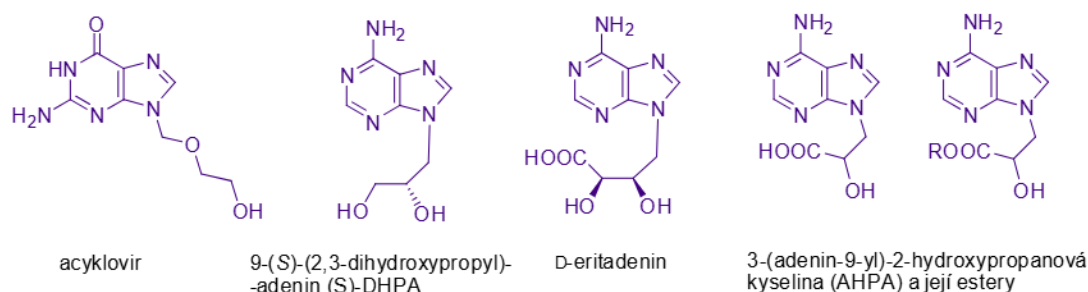
pesvirům na základě přednostní fosforylace virovou thymidinkinasou, DHPA má široké spektrum aktivit jak proti DNA virům, tak i RNA virům. Jeho účinek spočívá v reverzibilní inhibici enzymu *S*-adenosylhomocystein-hydrolasy katalyzujícímu hydrolýzu *S*-adenosylhomocysteinu (SAH) na adenosin a *L*-homocystein. Hromadí se SAH, jenž vzniká z *S*-adenosyl-*L*-methioninu (SAM) odštěpením methylu, následně působí jako inhibitor různých SAM-dependentních methylačních procesů včetně těch, které jsou nezbytné pro fázi zrání (maturace) virové RNA²⁵. Pro svou vysokou účinnost a prakticky nulovou toxicitu byl DHPA postoupen do klinického testování a posléze schválen jako léčivo k topickému použití pro indikaci herpes labialis (opar), jehož původcem je virus HSV-1. Preparát se prodával ve formě krému pod názvem Duvira® gel a byl vyráběn firmou Spofa.

Dalšími Holého účinnými virostatiky s podobným mechanismem účinku (inhibice methylačních reakcí) byly látky D-eritadenin, 3-(adenin-9-yl)-2-hydroxypropanová kyselina (AHPA) a AHPA estery (obr. 4, cit.^{26–28}). Z těchto látek se však už žádná do klinické fáze nedostala. Nejvýznamnější Holého objevy z oboru protivirotických léčiv však již měly přijít za nedlouho.

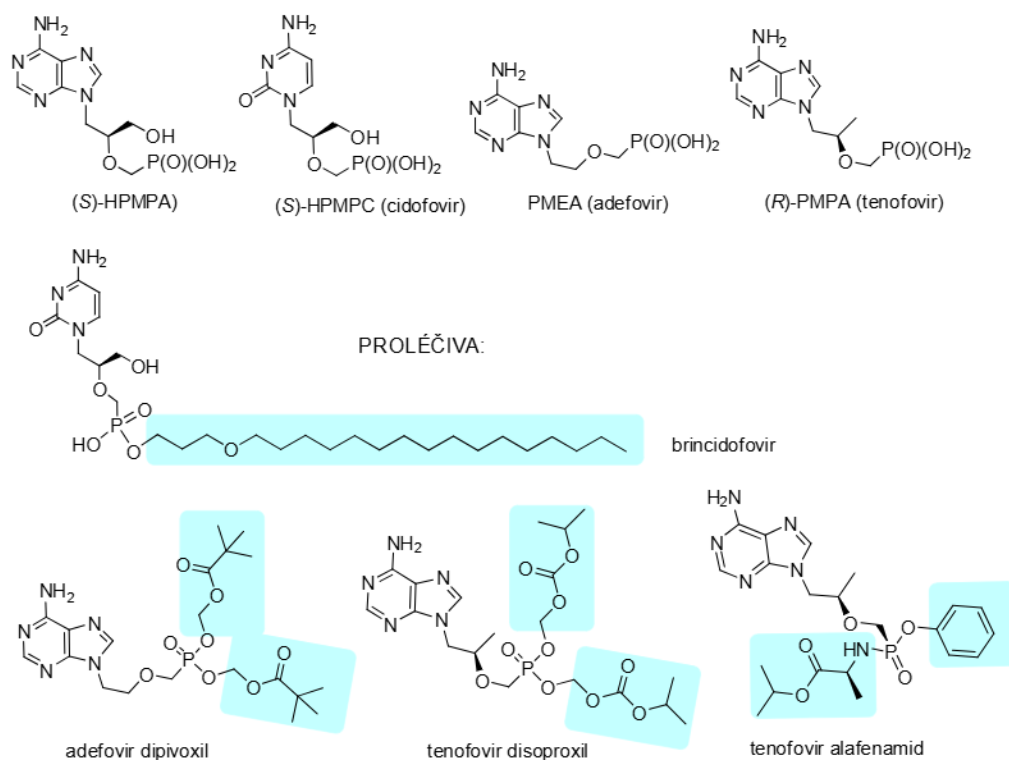
Jak již bylo zmíněno výše, většina nukleosidových analogů při vstupu do buňky potřebuje být fosforylována, aby se mohl projevit jejich biologický účinek jakožto anti-metabolitu. Přímá aplikace nukleosidfosfátů však není reálná, fosfáty jsou chemicky a metabolicky nestabilní. Tento problém vyřešil Holý jednoduchým a velmi elegantním způsobem – připojením fosfátového uskupení přes methylenový můstek. Takové látky jsou tedy nikoli fosfáty, ale fosfonomethylderiváty. Nemohou v organismu hydrolyticky odštěpit fosfát, ale mohou se dále fosforylovat a vstupovat do metabolických dějů podobně jako nukleosidtrifosfáty. Připojením fosfonomethylového uskupení k molekule (*S*)-DHPA tak vznikla první látka nového strukturního typu, 3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl-derivátů, zde konkrétně (*S*)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)adenin [(*S*)-HPMPA] (obr. 5). (*S*)-HPMPA vykazoval široké spektrum aktivit proti prakticky všem DNA virům, tj. herpesvirům, poxvirům, adenovirům, hepadnavirům a papillomavirům²⁹. Navzdory výsledkům protivirotických testů nebyl HPMPA nikdy dále vyvíjen jako

protivirotické léčivo, a to ani proti těm indikacím, kde žádná alternativní možnost léčby nebyla známá, jako je tomu např. u adenovirových infekcí. Jeho objev však inicioval syntézu dalších acyklických nukleosidfosfonátů (ANP) a v podstatě určil směr nukleosidové chemie v ÚOCHB na příští tři dekády. Při té příležitosti je třeba zmínit úzkou spolupráci Antonína Holého s Ivanem Rosenbergem. Ivan Rosenberg byl Holého první vědecký aspirant. Tématem jeho disertační práce byla příprava fosfonomethylderivátů přirozených ribonukleosidů³⁰. Tyto látky sice žádnou biologickou aktivitu neměly, stejně jako jejich analogy v 2'-deoxy řadě³¹, ale byly zde vypracovány základní metodiky fosfonátové chemie. Největším výsledkem spolupráce obou kolegů jsou nové protivirotické struktury ANP, z nichž některé se později staly klinickými léčivy (adefovir, cidofovir). Nedílnou součástí celého týmu a Holého přítelem byl Dr. Ivan Votruba. Ten prováděl nejen veškeré dostupné biochemické eseje, ale též farmakokinetické studie a položil v ÚOCHB základy nového oboru biochemické farmakologie. Antivirový screening ANP byl nadále prováděn Erikem De Clercqem v Rega Institute for Medical Research Katolické Univerzity v Lovani. Klíčovým partnerem pro klinický vývoj a komercializaci úspěšných kandidátů byl John Martin, generální ředitel firmy Gilead Sciences, Inc.

Prvním acyklickým nukleosidfosfonátem, který dosáhl klinické praxe, byl cidofovir, (*S*)-1-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)cytosin (HPMPC, cidofovir, obr. 5, cit.³²). Tato látka s univerzální aktivitou proti veškerým DNA virům byla schválena FDA roku 1996 jako léčivo proti cytomegalovirové retinitidě u pacientů s AIDS a prodává se pod názvem Vistide™ (výrobce Gilead Sciences, Inc.). Kromě toho se používá off-label k léčbě závažných virových infekcí, kde není známa jiná možnost léčby nebo stávající léčba selhává. Mezi takové indikace patří těžké papilomatózy, polyomavírové infekce (progresivní multifokální leukoencefalopatie), adenovirové infekce a poxviróvé infekce (molluscum contagiosum, orf, opičí neštovice)³³. V odůvodněných případech lze cidofovir také použít i pro imunokompromitované pediatrické pacienty s komplikovanými adeno-, polyoma- nebo cytomegalovirovými infekcemi. Cidofovir se aplikuje intravenózně, přičemž jeho biodostupnost je velmi nízká.



Obr. 4. Acyklovir a protivirotické acyklické analogy nukleosidů syntetizované v ÚOCHB



Obr. 5. Struktury protivirových acyklických nukleosidfosfonátů a jejich prolékových forem

Více než 90 % léčiva se vylučuje v nezměněné podobě ledvinovou cestou a způsobuje poškození ledvin. Problém s nefrotoxicitou se dá částečně vyřešit použitím nefroprotektivního léčiva probenecidu, který se podává před vlastní aplikací cidofoviru³⁴.

Aby se zvýšila biodostupnost cidofoviru, byly syntetizovány a zkoušeny různé formy proléčiv, avšak většina pokusů aplikovat cidofovir v podobě orálně dostupného proléčiva selhala. Jedinou výjimkou byly alkoxyalkylestery, z nichž nejúspěšnějším kandidátem byl hexadecyloxypropylester cidofoviru (brincidofovir, obr. 5), vyvíjený firmou Chimerix, Inc. V červnu 2021 byl brincidofovir schválen FDA jako možný prostředek k léčbě pravých neštovic v případě zneužití jejich původce, viru variola, k bioteroristickému útoku nebo v případě jeho náhodného úniku. Brincidofovir se prodává pod komerčním názvem TembexaTM. V klinických zkouškách proti adenovirovým a cytomegalovirovým infekcím dospěl brincidofovir až do fáze 3, avšak jeho další vývoj byl ukončen kvůli vážným vedlejším účinkům³⁵.

Dalším léčivem z řad ANP byl 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin (PMEA, adefovir, obr. 5, cit.^{36,37}). Adefovir je aktivní proti retrovirům (HIV) a některým typům DNA virů. Aktivita proti HIV a viru hepatitidy B spočívá v jeho funkci inhibitoru reverzní transkriptasy. Adefovir se používá v prolékové formě jako bis (pivaloyloxymethyl)ester (adefovir dipivoxil)³⁸ a původně

byl vyvíjen jako léčivo proti HIV. Klinické testy však ukázaly, že potřebná denní dávka (120 mg) je s ohledem na jeho nefrotoxicitu příliš vysoká a vývoj adefoviru jako anti-HIV preparátu byl proto ukončen. Nicméně se ukázalo, že látka má mnohonásobně vyšší účinnost proti HBV, kde lze dosáhnout požadovaného terapeutického efektu již při denní dávce desetkrát nižší^{39,40}, tj. 10 mg. To umožnilo pokračující klinický vývoj adefoviru jako terapeutika proti chronické hepatitidě B a posléze roku 2002 jeho schválení FDA a prodej pod obchodním názvem HepseraTM (Gilead Sciences, Inc.).

Nejúspěšnějším ANP a bez pochyby nejslavnější sloučeninou pocházející z ÚOCHB je (R)-9-[(2-fosfonomethoxy)propyl]adenin (PMPA, tenofovir, obr. 5). Jeho syntéza byla publikována poprvé roku 1995 v časopisu Collection⁴¹. O rok později následovala práce popisující jeho mimořádné protivirové účinky proti hepadnavirům (HBV) a retrovirům⁴², a to na principu inhibice jejich reverzní transkriptasy. Podobné účinky kromě tenofoviru vykazoval také ještě jeho 2,6-diaminopurinový analog (HPMPDAP). Situace kolem HIV/AIDS byla na počátku 90. let nesmírně vážná. V rozvojových zemích, zejména v zemích subsaharské Afriky, začalo šíření viru nabírat katastrofického rozměru. V zemích s vyspělejšími zdravotnictvím sice již některé preparáty proti HIV byly k dispozici, avšak léčba spočívala více méně jen v určitém zpomalení infekce. Virus si na tyto látky (převážně nukle-

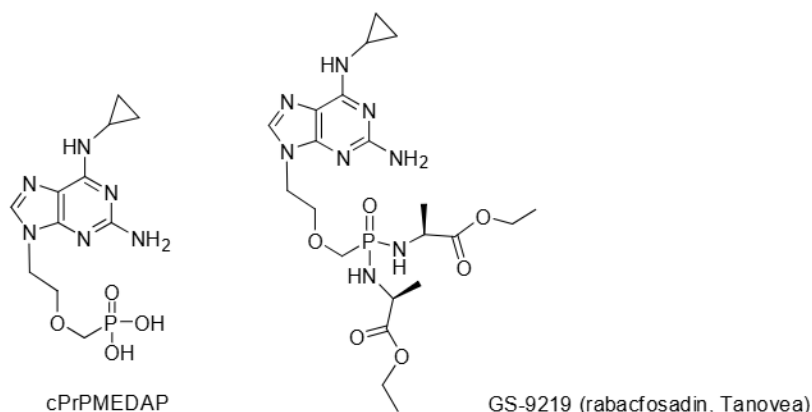
osidové povahy) rychle vytvářel rezistenci. Pacient byl nucen užívat denně až dvacet různých tablet a léčba byla prováděna závažnými vedlejšími účinky. Zvládnutí problému s HIV se stalo prioritou farmaceutického průmyslu. Firma Gilead Sciences, která již měla jeden Holého preparát (Vistide) na trhu a druhý (adefovir) tou dobou v klinickém vývoji, začala po zjištění anti-HIV účinnosti tenofoviru na lidech ihned s jeho klinickým vývojem. Vzhledem k jeho nízké biodostupnosti ve formě volné fosfonové kyseliny bylo přistoupeno k syntéze proléčiva, bis(isopropoxykarbonyloxymethyl)esteru (tenofovir disoproxil-fumarát, TDF, obr. 5). Hlavní zásluha na dotažení tohoto náročného projektu do konce náleží tehdejšímu prezidentovi Gilead Sciences Johnu Martinovi. To celé by však nikdy nebylo možné bez vzájemné souhry a absolutní důvěry všech tří zúčastněných stran, tj. Antonína Holého jakožto autora látky, virologa Erika De Clercq a Johna Martina jako průmyslového partnera. Dramatický průmyslový vývoj látek z Holého laboratoře popisuje geniálním způsobem divadelní hra Petra Zelenky *Elegance molekuly* v podání Dejvického divadla. Historickým mezníkem v boji s HIV se stal 26. říjen 2001, kdy byl tenofovir disoproxil-fumarát schválen FDA pro léčbu HIV. Na trh byl uveden pod názvem Viread a aplikoval se orálně jako jedna tableta denně. Brzy na to Gilead uvedl na trh kombinace Vireadu s dalšími antiretrovirovými léčivy. Jsou to preparáty Atripla (TDF/ emtricitabin/efavirenz), Complera (TDF/ emtricitabin/rilpivirin), Stribild (TDF/ emtricitabin/elvitegravir/cobicistat), a Truvada (TDF/ emtricitabin). Kombinovaná antiretrovirová terapie (cART) je v současné době preferenční léčbou pro naprostou většinu z celkových dnes již 38 miliónů HIV pozitivních lidí na světě. Princip cART spočívá v kombinaci několika antiretrovirových léčiv zasahujících několik stadií replikačního cyklu viru současně. Tenofovir jakožto nukleosidový inhibitor reverzní transkriptasy (NRTI) tak může být kombinován s nenukleosidovými inhibitory reverzní transkriptasy (NNRTI), inhibitory virové proteasy, inhibitory vstupu nebo integrasovými inhibitory⁴³. Obrovský význam tenofoviru v potlačení šíření HIV infekce bylo

zjištěno, že tato látka funguje též profylakticky. Zabraňuje přenosu HIV z matky na dítě a jeho preventivní užívání dokáže také spolehlivě chránit osoby, které jsou s HIV pozitivními běžně ve styku. To jsou především rodinní příslušníci, partneři nebo zdravotnický personál. Jen díky tenofoviru mohou dnes HIV pozitivní prožívat normální plnohodnotný život a nákaza HIV už definitivně přestala být rozsudkem smrti, ale léčitelným chronickým onemocněním. Je smutným paradoxem, že ke schválení léčebné kombinace TDF s emtricitabinem pro preventivní použití jakožto preparátu Truvada, došlo dne 16. července roku 2012, což je den Holého úmrtí.

V roce 2015 byla firmou Gilead uvedena na trh nová proléková forma tenofoviru – tenofovir alafenamid-fumarát (TAF). Toto proléčivo je představitelem tzv. pro-Tides, aryloxyfosforamidátových derivátů, v nichž amidátovou složku představuje ester aminokyseliny. „ProTides“ jsou ve farmacii častou používanou prolékovou formou, zejména díky optimálním farmakokinetickým vlastnostem a relativně snadné syntéze. TAF má 10krát vyšší účinnost než TDF a na rozdíl od TDF k jeho aktivaci dochází cíleně až v lymfoidních buňkách, což představuje výhodu nižší systémové expozice a tedy i nižší toxicity. TAF se prodává pod komerčním názvem Vemlidy a je též součástí několika preparátů cART jako Genvoya, Odefsey, Descovy, Biktarvy a Symtuza.

Nesmírně důležitý přínos tenofoviru spočívá i v léčbě další závažné virové choroby, a to chronické hepapatitidy B. K léčbě HBV byly schváleny obě prolékové formy – tenofovir disoproxil i tenofovir alafenamid⁴⁴.

Dále je třeba zmínit, že kromě oněch tří klinicky úspěšných ANP cidofoviru, adefoviru a tenofoviru byly v Holého týmu během tří dekád systematického výzkumu syntetizovány stovky dalších sloučenin tohoto strukturního motivu. Mnohé z nich jsou účinná antivirotika, ale jsou zde též cytostatika a látky s antiparazitickými účinky nebo imunomodulačními účinky. Před několika lety byla velká pozornost věnována cytostatickým fosfonomethoxyethyl derivátům purinových bazí: guaninu, 2,6-diaminopurinu a N⁶-substituovaným 2,6-diaminopurinům⁴⁵. Jeden z nich,



Obr. 6. Struktura cytostatických fosfonátů cPrPMEDAP a jeho prolékové formy rabacfosadinu (GS-9219, Tanovea)

N⁶-cyklopropyl-2,6-diamino-9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]-purin (cPrPMEDAP, obr. 6) byl dokonce vybrán jako vůdčí struktura a ve formě bis-amidátového prolečiva s ethylesterem L-alaninu vyvíjen firmou Gilead Sciences jako cytostatikum k léčbě Non-Hodgkinových lymfomů. Jeho vysoká účinnost v *in vivo* testech a dobrá snášenlivost záhy vedly k zahájení klinických zkoušek na lidských pacientech. U testů na psech stačila jedna jediná injekce látky a nádory zmizely do několika dnů. Výsledky měly tehdy značný ohlas i ve sdělovacích prostředcích i tím pádem též u laické veřejnosti. O to větší zklamání bylo, když se u lidských pacientů objevily nečekané a zcela neakceptovatelné vedlejší účinky a klinické zkoušky musely být ukončeny. Nicméně, osud této látky byl nakonec přece jen úspěšný. Licenci odkoupila firma na veterinární léčiva VetDC v Coloradu, kde byla látka vyvíjena jako léčivo proti psím lymfomům pod označením (VDC-1101, rabacfosadin). V dubnu 2017 byl rabacfosadin oficiálně schválen FDA a v současné době je vyráběn a prodáván firmou Elanco pod názvem TanoveaTM. Celý tento pozoruhodný příběh nedávno zpracoval ve svém review⁴⁶ Erik De Clercq.

Jakým směrem pokračovala nukleosidová chemie v ÚOCHB po smrti Anonína Holého a jaké jsou současné trendy v medicíně chemii ANP?

Jak již bylo zmíněno, ANP nejsou jen virostatika a cytostatika. Velká pozornost je věnována novým strukturám účinným proti parazitům. Ve spolupráci s Univerzitou v Queenslandu již několik let úspěšně vyvíjíme ANP jako potenciální antimalarika. Princip účinku spočívá v inhibici enzymů 6-oxopurin fosforibosyltransferas původců malárie parazitů *Plasmodium falciparum* a *Plasmodium vivax*. Jedná se o enzymy, které hrají zásadní roli v životním cyklu těchto parazitů při syntéze purinů *de novo*^{47,48}. Hlavní zásluhu na rozvoji této tematiky měla Dr. Dana Hocková (1970–2021) a v současné době výzkum stále probíhá v týmu Dr. Zlatka Janeby. Z dalších parazitů je cíleno na parazity *Trypanosoma brucei* (původce spavé nemoci). Nesmírně důležitý je vývoj nových ANP derivátů proti těžkým bakteriálním infekcím, kde se ANP uplatňují např. jako inhibitory adenylátcyklasového toxinu bakterie *Bordetella pertussis* (původce černého kašle), nebo jako látky potenciálně účinné proti antraxu (bakterie *Bacillus anthracis*)⁴⁹.

Je třeba si připomínat, že navzdory veškerému pokroku v moderní medicíně potřeba nových biologicky aktivních molekul stále trvá. Důvodem jsou nově se objevující infekce, rezistence mnohých patogenů vůči stávající léčbě a narůstající počet pacientů s imunitními problémy. Mnohé nukleosidové analogy včetně ANP s vysokou aktivitou proti vážným, život ohrožujícím infekcím dosud čekají na svůj další vývoj a klinické využití. Stále např. chybí efektivní léčba cytomegalovirových a polyomavirových infekcí u imunokompromitovaných pacientů, léčba poxvirových infekcí a některých specifických herpesvirových infekcí (např. lidský herpesvirus typu 6, HHV-6). To vše opodstatňuje náš další výzkum, kterým se aktuálně zabýváme a budeme se zabývat i nadále.

Vypracováno s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu Český národní uzel Evropské infrastruktury pro translační medicínu EATRIS-CZ, grant č. LM2023053.

Seznam zkratk

AC	5-azacytidin (5-azacytidine)
ANP	acyklické nukleosidfosfonáty (acyclic nucleoside phosphonates)
cART	kombinovaná antiretrovirová terapie (combination antiretroviral therapy)
DAC	decitabin (decitabine)
DHPA	(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin
DMT	DNA methyltransferasa (DNA methyltransferase)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
HBV	virus hepatitidy B (hepatitis B virus)
HCMV	lidský cytomegalovirus (human cytomegalovirus)
HHV-6	lidský herpesvirus typu 6 (human herpes virus type 6)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)
HPMP	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)-propyl]
HPMP-5-azaC	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)-propyl]-5-azacytosin
HPMPC	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)-propyl]cytosin
HSV-1	herpes simplex virus typu 1 (herpes simplex virus type 1)
HSV-2	herpes simplex virus typu 2 (herpes simplex virus type 2)
PME	(fosfonomethoxy)ethyl ((phosphonomethoxy)ethyl)
PMP	(fosfonomethoxy)propyl ((phosphonomethoxy)propyl)
TAF	tenofovir alafenamid (tenofovir alafenamide)
TDF	tenofovir disoproxil-fumarát (tenofovir disoproxil fumarate)
VZV	Varicella zoster virus

LITERATURA

1. Watson J. D., Crick F. H. C.: *Nature* 171, 737 (1953).
2. Smrt J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 27, 73 (1962).
3. Rosenberg I.: *Chem. Listy* 108, 375 (2014).
4. Šorm F., Škoda J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 21, 487 (1956).
5. Deneau D. G., Farber E. M.: *Dermatologica* 151, 158 (1975).
6. Krečmerová M.: *Chem. Listy* 116, 152 (2022).
7. Pískala A., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*

- 29, 2060 (1964).
8. Vrtiška O.: *Vesmír* 97, 598 (2018).
9. Jones P. A., Taylor S. M.: *Nucleic Acids Res.* 9, 2933 (1981).
10. Yang X., Lay F., Han H., Jones P. A.: *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 536 (2010).
11. Arnold Z., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 40 (1965).
12. Arnold Z., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 47 (1965).
13. Holý A., Arnold Z.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 53 (1965).
14. Acton E. M., Ryan K. J., Goodman L.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 5353 (1964).
15. Shimizu B., Saito A., Nishimura T., Miyaki M.: *Chem. Pharm. Bull.* 15, 2011 (1967).
16. Holý A., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 34, 3383 (1969).
17. Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 37, 4072 (1972).
18. Mathé C., Gosselin G.: *Antiviral Res.* 71, 276 (2006).
19. Brokeš J., Beránek J., Hřebaběcký H.: *Method of Preparation of the 1-β-D-arabinofuranosylcytosine*. Patent No. CS212052 B1 (1982).
20. Fyfe J. A., Keller P. M., Furman P. A., Miller R. L., Elion G. B.: *J. Biol. Chem.* 253, 8721 (1978).
21. Kent R., Huber B.: *Nature* 398, 380 (1999).
22. De Clercq E.: *Med. Res. Rev.* 33, 1278 (2013).
23. Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71, 5 (2006).
24. De Clercq E., Descamps J., De Somer P., Holý A.: *Science* 200, 563 (1978).
25. Votruba I., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 45, 3039 (1980).
26. Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 49, 2148 (1984).
27. Votruba I., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 167 (1982).
28. De Clercq E., Holý A.: *J. Med. Chem.* 28, 282 (1985).
29. De Clercq E., Holý A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzarini J., Maudgal P. C.: *Nature* 323, 464 (1986).
30. Holý A., Rosenberg I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 3447 (1982).
31. Krečmerová M., Hřebaběcký H., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 55, 2521 (1990).
32. De Clercq E., Sakuma T., Baba M., Pauwels J., Balzarini J., Rosenberg I., Holý A.: *Antiviral Res.* 8, 261 (1987).
33. De Clercq E.: *Med. Res. Rev.* 28, 929 (2008).
34. Wolf D. L., Rodriguez C. A., Mucci M., Ingrosso A., Duncan B. A., Nickens D. J. J.: *Clin. Pharmacol.* 43, 41 (2003).
35. Huston J., Curtis S., Egelund E. F.: *Ann. Pharmacother.* 57, 1197 (2023).
36. Holý A., Rosenberg I., Dvořáková H.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 54, 2190 (1989).
37. Holý A.: *Curr. Pharm. Design* 9, 2567 (2003).
38. Starrett J. E. Jr., Tortolani D. R., Hitchcock M. J., Martin J. C., Mansuri M. M.: *Antiviral Res.* 19, 267 (1992).
39. Fontaine H. a 10 spoluautorů: *Transplantation* 80, 1086 (2005).
40. de Fraga R. S., Van Vaisberg V., Mendes L. C. A., Carrilho F. J., Ono S. K.: *J. Gastroenterol.* 55, 496 (2020).
41. Holý A., Dvořáková H., Masojídková M.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 60, 1390 (1995).
42. Balzarini J., Aquaro S., Perno C. F., Witvrouw M., Holý A., De Clercq E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 337 (1996).
43. Weichseldorfer M., Reitz M., Latinovic O. S.: *Pharmaceuticals* 13, 1798 (2021).
44. de Fraga R. S., Van Vaisberg V., Mendes L. C. A., Carrilho F. J., Ono S. K.: *J. Gastroenterol.* 55, 496 (2020).
45. Holý A., Votruba I., Tloušťová E., Masojídková M.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 66, 1545 (2001).
46. De Clercq E.: *Biochem. Pharmacol.* 154, 265 (2018).
47. Keough D. T. a 11 spoluautorů.: *J. Med. Chem.* 56, 6967 (2013).
48. Keough D. T. a 12 spoluautorů.: *ACS Chem. Biol.* 13, 82 (2018).
49. Kraina P., Česnek M., Tloušťová E., Mertlíková-Kaiserová, Fulton C. J., Davidson E. K., Smith B. P., Watts V. J., Janeba Z.: *Bioorg. Med. Chem.* 95, 117508 (2023).

M. Krečmerová (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Nucleoside Chemistry at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry – Looking Back on History**

Nucleoside chemistry has been developing at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry (IOCB) since 1957 thanks to the foresight of its first director František Šorm. This new area, targeted especially to oligonucleotide synthesis, earned soon an excellent reputation. At that time IOCB was one of only four institutions in the world successful in oligonucleotide synthesis. First successes in the field of chemically modified nucleosides were syntheses of 6-azauridine as antileukemic agent, 6-azauridine triacetate investigated as antipsoriatic drug (Riboazauracil) and especially 5-azacytosine nucleosides, i.e., 5-azacytidine and 2'-deoxy-5-azacytidine (decitabine) synthesized in early 1960s by Alois Pískala. Both compounds are antileukemic agents working on the epigenetic principle as inhibitors of DNA methylations. At present, they are clinically used for the treatment of myelodysplastic syndromes and other haematological malignancies, marketed under the names Vidaza® (5-azacytidine, approved 2004) and Dacogen® (5-aza-2'-deoxycytidine, 2006). Remarkable synthetic achievements are connected with the personality of Antonín Holý including syntheses of L-nucleosides or acyclic nucleoside analogues, compounds having a sugar furanose ring replaced by a (poly)hydroxylic carbon chain.

Many of them were found effective antivirals. One of them, 9-(*S*)-[(2,3-dihydroxypropyl)]adenine entered to clinical practice as antiherpetic drug Duvira gel. However, it was the development of acyclic nucleoside phosphonates (ANPs), first reported by Holý and De Clercq in 1986, that became a real milestone. During next three decades a number of biologically active ANPs were identified as antivirals, cytostatics, immunomodulators and antiparasitics. Three of them reached the stage of clinical practice as successful antivirals: cidofovir for the treatment of cytomegalovirus retinitis in AIDS patients, tenofovir for the treatment and prevention of HIV (later

approved also for the treatment of hepatitis B), and adefovir for the treatment of hepatitis B. Tenofovir in the form of prodrugs is mostly used as a part of several combined anti-HIV therapeutics containing various anti-HIV drugs in all-in-one pill and is currently the most successful anti-HIV drug available.

Keywords: 6-azauracil, 5-azacytidine, decitabine, antimetabolites, L-nucleosides, acyclic analogues, DHPA, acyclic nucleoside phosphonates, cidofovir, adefovir, antivirals, HIV, tenofovir, combined antiretroviral therapy, antiparasitics



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.