

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.02.2007**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **27.08.2008**
(Věstník č. 35/2008)

(21) Číslo dokumentu:

2007-136

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07H 19/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Praha 6, CZ

(72) Původce:

Holý Antonín Prof. RNDr. DrSc. Dr. h.c. mult., Horní
Počernice, CZ

Otmar Miroslav RNDr. CSc., Praha 8, CZ

Pískala Alois RNDr. CSc., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:

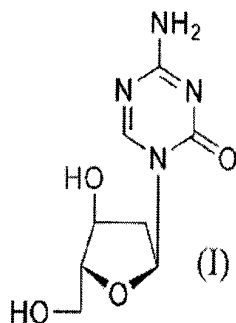
Inventia s. r. o., Ing. Marta Gabrielová, Na Bělidle 3,
Praha 5, 15000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby 1-(2-deoxy-alfa-D-erythro-
pentofuranosyl)-5-azacytosinu**

(57) Anotace:

Způsob výroby 1-(2-deoxy- α -D-erythro-pentofuranosyl)-5-azacytosinu vzorce I reakcí chráněného alkyl nebo aralkyl 2-deoxy-D-erythro-pentofuranosidu se sílylovaným 5-azacytosinem v přítomnosti Lewisovy kyseliny a následném odstranění chránících skupin.



Způsob výroby 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu, účinného jako činidlo indukující hypomethylaci DNA.

Dosavadní stav techniky

Nejvýznamnější látkou ze skupiny deoxynukleosidů 5-azacytosinu je 5-aza-2'-deoxycytidin (Decitabine, 1-(2-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosin), který je silným chemoterapeutikem účinným proti různým nádorovým onemocněním (Mompalmer R. L.: *Semin. Hematol.* **2005**, 42, (Suppl. 2), S9). V roce 2006 byl tento nukleosid schválen pro léčbu všech subtypů myelodysplastického syndromu (Hennessey B. T., Garcia-Manero G., Kantarjian H. M., Giles F. J.: *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **2003**, 12, 1985). Účinnost 5-aza-2'-deoxycytidinu je založena na schopnosti inhibovat DNA methyltransferasu, a tím snižovat úroveň methylace DNA, která je jedním z epigenetických mechanismů hrajících klíčovou úlohu v karcinogenezi a rozvoji nádorů. Hypomethylace DNA vede k reaktivaci skupiny genů nezbytných pro normální buněčnou funkci, které byly „umlčeny“ při tumorogenezi v důsledku aberantní hypermethylace. To následně vede k návratu buňky do normálního stavu, což je podstatou epigenetické terapie nádorových onemocnění (Yoo C. B., Jones P. A.: *Nature Rev.* **2006**, 5, 37). 5-Aza-2'-deoxycytidin je zatím nejúčinnějším hypomethylačním činidlem z dosud studovaných látek. Vyhledávání léčiv zaměřených na specifické enzymy, které se účastní epigenetické regulace genové exprese, představuje účinný a cenný přístup k chemoterapii jakož i chemoprevenci rakoviny.

Je známo, že výše zmíněný 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosin (látko vzorce I), jenž je α -anomerem 5-aza-2'-deoxycytidinu, vykazuje také významnou antileukemickou aktivitu. Jeho účinnost je sice menší než u 5-aza-2'-deoxycytidinu, avšak je také mnohem méně toxický (Veselý J., Pískala A.: *Cancer Res.* **1984**, 44, 5165). Nyní jsme zjistili, že 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosin má také schopnost indukovat hypomethylaci DNA v míře srovnatelné s klinicky používaným 5-aza-2'-deoxycytidinem, aniž by se sama inkorporovala do DNA a byla intracelulárně degradována cytidindeaminasou

(Fojtová M., Pískala A., Votruba I., Otmar M., Bártová E., Kovařík A.: *Pharmacol. Res.* **2007**, 55, 16; Holý A., Otmar M., Pískala A., Votruba I., Kovařík A., Fojtová M., Bártová E.: CZ patentová přihláška PV 2007-18). Vzhledem k nižší toxicitě, větší stabilitě ve vodných roztocích a snadnější přípravě ve srovnání s 5-aza-2'-deoxycytidinem je 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosin využitelný pro epigenetickou terapii nádorových onemocnění.

Přesný mechanismus účinku 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu nebyl dosud podrobně zkoumán, nicméně se předpokládá, že jeho biologická účinnost je založena na pozvolné anomerizaci na vysoce účinný beta anomer – 5-aza-2'-deoxycytidin, jež byla pozorována ve vodných roztocích *in vitro*. Tato anomerizace spočívá v reversibilním hydrolytickém rozevření 5-azacytosinové složky molekuly na 2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl derivát formylkarbamoylguanidinu následovaném epimerizací na anomerním uhlíku cukerné složky a recyklizací na 5-aza-2'-deoxycytidin.

1-(2-Deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosin byl obvykle získáván jako vedlejší produkt při přípravě 5-aza-2'-deoxycytidinu. 5-Aza-2'-deoxycytidin byl poprvé připraven v roce 1963 různými modifikacemi obecného postupu, jenž spočívá v postupné výstavbě azacytosinového kruhu na peracylglycosylisokyanátech (Šorm F., Pískala A.: CS patent 139 542 (Neth. 6 414 959)). Jiná varianta této obecné metody sloužící původně pro přípravu 5-azacytidinu (Šorm F., Pískala A.: CS patent 116 297; Pískala A., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, 29, 2060) byla také použita k přípravě 5-aza-2'-deoxycytidinu, avšak bez určení anomerní konfigurace produktu (Pliml J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, 29, 2576). Další optimalizací tohoto postupu byl později připraven v dobrých výtěžcích jak 5-aza-2'-deoxycytidin tak jeho α -anomer – 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosin (Pískala A., Šorm F.: *Nucleic Acid Chem.* **1978**, 1, 443 (L. B. Townsend, R. S. Tipson, Eds), Wiley, New York).

Jiná metoda pro přípravu 5-aza-2'-deoxycytidinu a jeho α -anomeru – 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu spočívá v reakci chráněných (2-deoxy-D-*erythro*-pentofuranosyl)halogenidů s O^2,N^4 -bis-(trimethylsilyl)-5-azacytosinem (Winkley M. W., Robins R. K.: *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 491; Pískala A., Synáčková M., Tománková H., Fiedler P., Žižkovský V.: *Nucleic Acid Res., Spec. Publ.*, **1978**, 4, 109; Ben-Hattar J., Jiricny J.: *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 3211). Reakcí (2-deoxy-3,5-di-*O*-*p*-toluoyl- α -D-*erythro*-

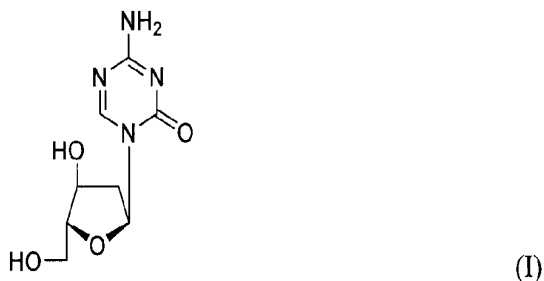
pentofuranosyl)chloridu s O^2,N^4 -bis-(trimethylsilyl)-5-azacytosinem v přítomnosti chloridu cíničitého byl připraven v nižším výtěžku produkt, jenž byl deklarován jako 2'-deoxy-3',5'-di-*O-p*-toluoyl-5-azacytidin (Niedbally U., Vorbrüggen H.: *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 3672), avšak dle uváděných ^1H NMR spekter je zřejmé, že se jedná o α -anomer a nikoliv o β -anomer, jak chybně předpokládali citovaní autoři. Příprava odpovídajícího volného nukleosidu nebyla v uvedené publikaci provedena. Volný nukleotid, získaný odstraněním chránících skupin z 3,5-di-*O-p*-toluoyl derivátu připraveného dle Niedbally a Vorbrügena, byl popsán později (Benjamin E. J.: Ph.D. Thesis, **1979**, University of Kansas; *Diss. Abstr.* **1980**, *41*, 208-B); nicméně byl stále mylně považován za β -anomer, ačkoli jasně vykazoval ^1H NMR spektrum i bod tání α -anomeru. Také kinetika hydrolyzy ukázala větší stabilitu, než byla později zjištěna u skutečného β -anomeru (Lin K.-T., Momparler R. L., Rivard G. E.: *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 1228). Srovnání hydrolytických stabilit obou anomerů je také popsáno ve výše uvedené publikaci (Veselý J., Pískala A.: *Cancer Res.* **1984**, *44*, 5165).

Další publikovaná metoda přípravy 5-aza-2'-deoxycytidinu využívá částečné anomerizace, ke které dochází při hydrolyze α -anomeru. Recyklizací směsi hydrolytických produktů, která vznikla působením vodného roztoku amoniaku na α -anomer, dimethylacetalem dimethylformamidu byl v nižším výtěžku získán 5-aza-2'-deoxycytidin (Pískala A., Veselý J.: CS AO 220430). V uvedeném patentovém spisu byla předpokládána výrazná transformace α -anomeru na β -anomer, což bylo později revidováno na základě pečlivé analýzy pomocí NMR spekter, jež ukázala, že za daných podmínek vzniká směs anomerů furanosyl a v menší míře i pyranosyl derivátů (Pískala A., Hanna N. B., Masojídková M., Otmar M., Fiedler P., Ubik K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2003**, *68*, 711). To také vysvětluje uvedený nižší výtěžek 5-aza-2'-deoxycytidinu.

Výše uvedené syntetické postupy poskytují pouze směsi obou anomerů, jejichž separace je nesnadná a vyžaduje opakovanou chromatografii nebo velmi ztrátovou frakční krystalizaci, což značně problematizuje přípravu ve větším množství. Tyto nevýhody odstraňuje způsob výroby podle překládaného vynálezu, spočívající v reakci chráněného 2-deoxy-D-*erythro*-pentofuranosidu se silylovaným 5-azacytosinem v přítomnosti Lewisovy kyseliny a následném odstranění chránících skupin.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je způsob výroby hypomethylačního činidla 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu vzorce I,



jenž spočívá v reakci chráněného 2-deoxy-D-*erythro*-pentofuranosidu obecného vzorce II,

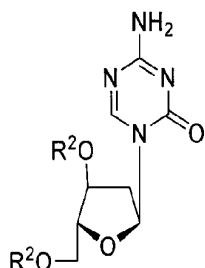


kde

R¹ značí alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku nebo aralkyl se 7 až 10 atomy uhlíku, případně substituovaný na aromatickém jádře alkylem s 1 až 3 atomy uhlíku, halogenem, methoxyskupinou nebo nitroskupinou, a R² značí alkanoyl s 1 až 6 atomy nebo aralalkanoyl se 7 až 11 atomy uhlíku, případně substituovaný na aromatickém jádře alkylem s 1 až 3 atomy uhlíku, halogenem, methoxyskupinou nebo nitroskupinou, nebo aroyl se 7 až 11 atomy uhlíku, případně substituovaný na aromatickém jádře alkylem s 1 až 3 atomy uhlíku, halogenem, methoxyskupinou nebo nitroskupinou, s *O*²,*N*⁴-bis-(trialkylsilyl)-5-azacytosinem obecného vzorce III,



kde R^3 značí alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž substituenty R^3 mohou být stejné nebo různé, v inertním v organickém rozpouštědle v přítomnosti Lewisovy kyseliny za vzniku chráněného 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu obecného vzorce IV,



(IV)

kde R^2 má stejný význam jako ve vzorci II, a následně se odstraní chránící alkanoyl, aralalkanoyl nebo aroyl skupiny R^2 nadbytkem alkalického alkoxidu s 1 až 4 atomy uhlíku nebo amoniaku v alkoholu s 1 až 4 atomy uhlíku.

Výhodnými skupinami R^1 jsou podle předloženého vynálezu methyl a benzyl, R^2 je s výhodou vybraný z množiny zahrnující acetyl, benzoyl a *p*-toluoyl skupinu a R^3 je s výhodou methyl.

Význakem způsobu podle vynálezu je dále to, že Lewisova kyselina je s výhodou chlorid cíničitý.

Výhodným inertním organickým rozpouštědlem podle předloženého způsobu je rozpouštědlo vybrané z množiny chlorovaných uhlovodíků a acetonitrilu.

Význakem způsobu podle předmětného vynálezu je dále, že se reakce provádí s anomerní směsí methyl 2-deoxy-3,5-di-*O*-*p*-toluoyl-D-*erythro*-pentofuranosidů a O^2,N^4 -bis-(trimethylsilyl)-5-azacytosinem.

Dále je význakem způsobu podle předmětného vynálezu, že se reakce chráněného 2-deoxy-D-*erythro*-pentofuranosidu obecného vzorce II a O^2,N^4 -bis-(trimethylsilyl)-5-azacytosinu obecného vzorce III provádí v acetonitrilu v přítomnosti nadbytku chloridu cíničitého při teplotě místnosti.

Význakem způsobu podle předmětného vynálezu je, že se odstranění alkanoylových, aralkanoylových nebo aroylových chránících skupin R^2 sloučeniny obecného vzorce IV provádí nadbytkem methoxidu sodného v methanolu při teplotě místnosti.

Jako velmi výhodné se tedy pro provádění způsobu podle předmětného vynálezu ukázaly acetyl, benzoyl a *p*-toluoyl skupiny pro chránění hydroxylů (R^2) a methyl nebo benzyl jako alkylové skupiny R^1 ve sloučeninách obecného vzorce II; jako R^3 ve sloučeninách obecného vzorce III se s výhodou používá methyl. Reakce sloučenin obecného vzorce II se silylovanými basemi obecného vzorce III se provádí v inertních organických rozpouštědlech jako jsou např. chlorované uhlovodíky – dichlormethan, dichlorethan nebo chloroform; zejména výhodný je acetonitril. Jako Lewisova kyselina se zejména osvědčil chlorid cínčitý. Tuto reakci je vhodné provádět v inertní atmosféře nejen kvůli odstranění případné vzdušné vlhkosti ale také k zabránění oxidace nukleobase v poloze 6 vzdušným kyslíkem, jež částečně probíhá za podmínek kondenzace a vede k její transformaci na 6-oxo-5-azacytosin (amelid).

Předkládaný způsob výroby je tedy založený na reakci O^2,N^4 -bis-(trimethylsilyl)-5-azacytosinu se směsí α - a β -anomerů methyl 2-deoxy-3,5-di-O-*p*-toluoyl-D-*erythro*-pentofuranosidu v acetonitrilu v přítomnosti chloridu cínčitého, kdy vzniká s velmi vysokou selektivitou 1-(2-deoxy-3,5-di-O-*p*-toluoyl- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosin. Vzhledem k nižší rozpustnosti této látky ve srovnání s jejím β -anomerem, jenž může být přítomen v malém množství v surovém produktu, lze produkt snadno získat krystalizací ve zcela čistém stavu a vysokém výtěžku. Po odstranění chránících skupin působením methoxidu sodného v methanolu se získá ve vysokém výtěžku čistý 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosin vzorce I.

Uvedený postup poskytuje selektivně žádaný produkt ve vysokém výtěžku a čistotě. Dostupnost výchozí látky – směsi α - a β -anomerů methyl 2-deoxy-3,5-di-O-*p*-toluoyl-D-*erythro*-pentofuranosidu je výrazně lepší než u výchozích látek využívaných v dříve popsáných metodách. Navíc je tato výchozí látka zcela stabilní, oproti nestabilním peracylglycosylisokyanátům nebo chráněným (2-deoxy-D-*erythro*-pentofuranosyl)halogenidům, z nichž vycházejí předchozí syntézy. Oproti nim je také mnohem snadnější izolace produktu – odpadá zdlouhavá chromatografická separace anomerů, respektive ztrátová frakční krystalizace.

V dalším je vynález blíže objasněn v příkladech provedení, aniž se na tyto jakkoliv omezuje.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava 1-(2-deoxy-3,5-di-*O*-*p*-toluoyl- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu

Ke směsi anomerních methyl 2-deoxy-3,5-di-*O*-*p*-toluoyl-D-*erythro*-pentofuranosidů (3.8 g), *O*²,*N*⁴-bis-(trimethylsilyl)-5-azacytosinu (2.6 g) a suchého acetonitrilu (20 ml) se v argonové atmosféře, při 0 °C a míchání přidá po kapkách roztok chloridu cíničitého (1.8 ml) v suchém acetonitrilu (20 ml) a směs se nechá stát přes noc při teplotě místnosti. Průběh reakce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě. Pokud je druhého dne ještě přítomna výchozí směs chráněných methyl furanosidů přidá se při 0 °C a míchání po kapkách další dávka roztoku chloridu cíničitého (0.9 ml) v suchém acetonitrilu (10 ml) a reakce se prodlouží o další den. Pak se směs nalije za intenzivního míchání do ledem chlazené studené směsi nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (250 ml) a chloroformu (100 ml). Směs se ještě 15 min intenzivně míchá, pak se přimíchá křemelina (10 g) a směs se odsaje přes silnou vrstvu křemeliny. Odsávání se urychluje rozhrnováním povrchu filtrační vrstvy špachtlí. Materiál na filtru se promyje chloroformem (5 x 10 ml), organická vrstva čirého filtrátu se po vysušení pomocí MgSO₄ odpaří ve vakuu při 40 °C ve vodní lázni na hustý sirup, který se povaří s benzenem (30 ml) až se začne vylučovat krystalický produkt. Směs se ponechá do druhého dne při teplotě místnosti, sraženina se odsaje a promyje benzenem. Surový produkt se rozpustí za varu v 1,2-dichlorethanu (30 ml) a po částech se do mírného zákalu přidává petrolether. Roztok se ponechá volné krystalizaci do druhého dne, produkt se odsaje a promyje směsí 1,2-dichlorethan–petrolether (2:1). Po zpracování matečných louhů se získá celkem 3.3 g (70%) jednotného 1-(2-deoxy-3,5-di-*O*-*p*-toluoyl- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu, b.t. 221-223 °C (rozklad).

Příklad 2

Příprava 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu

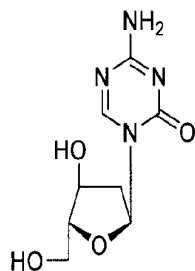
Směs 1-(2-deoxy-3,5-di-O-p-toluoyl- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu (2.32 g), methanolu (14 ml), octanu ethylnatého (6 ml) a methanolickeho roztoku methoxidu sodného (1 M, 5 ml) se míchá po dobu 24 h při teplotě místnosti. Vyloučený krystalický produkt se odsaje, promyje směsí methanol – octan ethylnatý (1:1, 6 ml) a vysuší ve vakuu. Získá se 0.91 g (80%) jednotného 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu, b.t. 175-177 °C (rozklad). Zpracováním matečných louhů se získá ještě dalších 10% stejného produktu. Rekrystalizací z methanolu se bod tání zvýšil na 182-184 °C (rozklad). ^1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.47 (s, H-6), 6.12 (dd, $J_{1',2'b} = 1.7$, $J_{1',2'a} = 6.9$, H-1'), 2.70 (ddd, $J_{2'a,3'} = 5.7$, $J_{2'a,1'} = 6.9$, $J_g = 14.9$, H-2'a), 2.27 (dt, $J_{2'b,1'} = J_{2'b,3'} = 1.7$, $J_g = 14.9$, H-2'b), 4.45 (dt, $J_{3',2'b} = J_{3',4'} = 1.7$, $J_{3',2'a} = 5.7$, H-3'), 4.52 (ddd, $J_{4',3'} = 1.7$, $J_{4',5'a} = 4.2$, $J_{4',5'b} = 5.5$, H-4'), 3.73 (dd, $J_{5'a,4'} = 4.2$, $J_g = 12.2$, H-5'a), 3.65 (dd, $J_{5'b,4'} = 5.5$, $J_g = 12.2$, H-5'b), $[\alpha]_D -45.4$ (c 0.50, voda).

Průmyslové využití

1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosin vzorce I jako činidlo indukující hypomethylaci DNA je vhodné pro výrobu farmaceutického přípravku pro epigenetickou terapii nádorových a jiných epigeneticky determinovaných onemocnění.

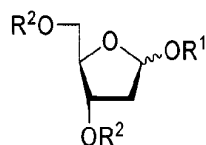
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy 1- (2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu vzorce I,



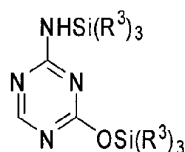
(I)

vyznačený tím, že se chráněný 2'- deoxy-D-*erythro*-pentofuranosid obecného vzorce II,



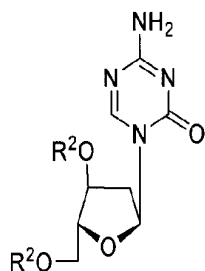
(II)

R^1 značí alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku nebo aralkyl se 7 až 10 atomy uhlíku, případně substituovaný na aromatickém jádře alkylem s 1 až 3 atomy uhlíku, halogenem, methoxyskupinou nebo nitroskupinou, a R^2 značí alkanoyl s 1 až 6 atomy nebo aralalkanoyl se 7 až 11 atomy uhlíku, případně substituovaný na aromatickém jádře alkylem s 1 až 3 atomy uhlíku, halogenem, methoxyskupinou nebo nitroskupinou, nebo aroyl se 7 až 11 atomy uhlíku, případně substituovaný na aromatickém jádře alkylem s 1 až 3 atomy uhlíku, halogenem, methoxyskupinou nebo nitroskupinou, s O^2,N^4 -bis-(trialkylsilyl)-5-azacytosinem obecného vzorce III,



(III)

kde R^3 značí alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku, přičemž substituenty R^3 mohou být stejné nebo různé, v inertním v organickém rozpouštědle v přítomnosti Lewisovy kyseliny za vzniku chráněného 1-(2-deoxy- α -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-azacytosinu obecného vzorce IV,



(IV)

kde R^2 má stejný význam jako ve vzorci II, a následně se odstraní chránící alkanoyl, aralalkanoyl nebo aroyl skupiny R^2 nadbytkem alkalického alkoxidu s 1 až 4 atomy uhlíku nebo amoniaku v alkoholu s 1 až 4 atomy uhlíku.

2. Způsob podle nároku 1, vyznačený tím, že R^1 je vybrán ze skupiny zahrnující methyl a benzyl.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, vyznačený tím, že R^2 je vybrán z množiny zahrnující acetyl, benzoyl a *p*-toluoyl skupinu.
4. Způsob podle nároků 1 až 3, vyznačený tím, že R^3 je s výhodou methyl.
5. Způsob podle nároku 1 až 4, vyznačený tím, že Lewisova kyselina je s výhodou chlorid cínčitý.
6. Způsob podle nároku 1 až 5, vyznačený tím, že inertní organické rozpouštědlo je vybráno z množiny chlorovaných uhlovodíků a acetonitrilu.
7. Způsob podle nároku 6, vyznačený tím, že inertní organické rozpouštědlo je vybráno ze skupiny chlorovaných uhlovodíků zahrnující dichlormethan, dichlorethan a chloroform.

8. Způsob podle nároku 1, vyznačený tím, že se reaguje anomerní směs methyl 2-deoxy-3,5-di-*O*-*p*-toluoyl-*D*-*erythro*-pentofuranosidů obecného vzorce II s O^2, N^4 -bis-(trimethylsilyl)-5-azacytosinem obecného vzorce III.

9. Způsob podle nároku 1, vyznačený tím, že se reakce chráněného 2'-deoxy-*D*-*erythro*-pentofuranosidu obecného vzorce II a O^2, N^4 -bis-(trimethylsilyl)-5-azacytosinu obecného vzorce III provádí v acetonitrilu v přítomnosti nadbytku chloridu cíničitého při teplotě místnosti.

10. Způsob podle nároku 1, vyznačený tím, že se odstranění alkanoylových, aralkanoylových nebo aroylových chránících skupin R^2 sloučeniny obecného vzorce IV provádí nadbytkem methoxidu sodného v methanolu při teplotě místnosti.