



УДК 577.113.4

© 1990 г.

*Н. В. Амирханов, В. Ф. Зарытова***РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ,****СОДЕРЖАЩИХ МЕТИЛФОСФОНАТНЫЕ ГРУППЫ****V *. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ****КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННОЙ МОДИФИКАЦИИ
ДНК-МИШЕНИ АЛКИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ
МЕТИЛФОСФОНАТНЫХ АНАЛОГОВ ОКТАТИМИДИЛАТА,
СОДЕРЖАЩИМИ ОСТАТКИ N-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)ФЕНАЗИНИЯ***Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР*

Исследована эффективность комплементарно-адресованной модификации октадезоксирибонуклеотида $d(pC_5A_5C_5)$ (мишень) 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилфосфамидными ($pNHCH_2RCl$)-производными R_p - и S_p -диастереомеров метилфосфонатных аналогов октатимидилата, содержащими дополнительно остатки N-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn): $ClRCH_2NHpTrp(TrpTrp)_3TrpNH(CH_2)_2NHPhn$ (I) и $PhnNH(CH_2)_2NHpTrp(TrpTrp)_3NHCH_2RCl$ (II), где $p = -OP(O)(CH_3)O-$. Стабилизация комплементарного комплекса, образованного олигонуклеотидом-мишенью и метилфосфонатными производными, содержащими остаток Phn, приводит к значительному повышению эффективности внутрикомплексного алкилирования мишени по сравнению с алкилированием реагентами, не содержащими остатка Phn. Среди исследуемых Phn-содержащих алкилирующих производных октатимидилата максимальная эффективность алкилирования обнаружена у реагентов на основе R_p -изомера метилфосфоната. Исследована позиционная направленность алкилирования мишени реагентами (I) и (II).

С целью создания аналогов олигонуклеотидов, обладающих повышенной эффективностью воздействия на генетический аппарат клетки, ранее были получены метилфосфонатные аналоги [2–10] и их N-(2-гидроксиэтил)феназиниевые производные [1]. Было показано, что последние обладают очень важным свойством — образуют комплементарные комплексы более высокой стабильности, чем первые. Это послужило серьезным аргументом в пользу создания на их основе реакционноспособных производных [1], пригодных для модификации НК-мишени.

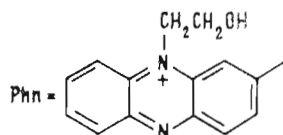
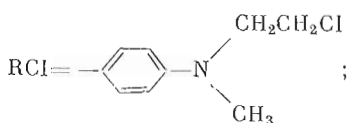
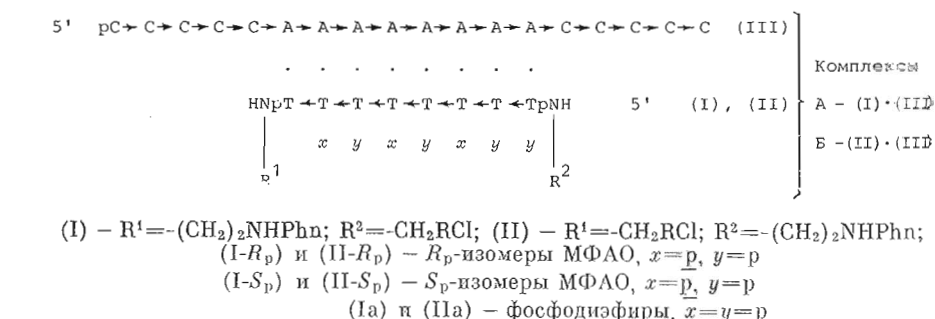
В данной работе представлены результаты модификации НК-мишени с помощью алкилирующих соединений метилфосфонатных аналогов октатимидилата, содержащих в своем составе остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn).

В качестве воздействующих на НК-мишень производных МФАО использовали 5'- и 3'-фосфамидные алкилирующие соединения (I) и (II), содержащие остаток Phn на 3'- либо на 5'-конце соответственно (см. схему 1) [1]. Исследуемые реагенты представляют собой индивидуальные диастереомеры, содержащие три метилфосфонатных остатка либо только

* Сообщение IV см. [1]. Сокращения: НК — нуклеиновая кислота, МФАО — метилфосфонатный аналог олигодезоксирибонуклеотида, CH_2RCl — 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензил, Phn — остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, p — метилфосфонатный остаток в нуклеотидах. Римские цифры со значком « R_p » и « S_p » соответствуют производным индивидуальных диастереомеров МФАО, имеющих R_p и S_p — абсолютные конфигурации заместителей при метилфосфонатном атоме фосфора; римские цифры с буквой «a» соответствуют фосфодиэфирным производным октатимидилата. T_{90} мод — температура полумодификации. В работе использованы олигонуклеотиды только дезоксирибона; префикс «d» перед названием олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

с R_p -((I- R_p) и (II- R_p)), либо только с S_p -((I- S_p) и (II- S_p)) конфигурацией заместителей при атоме фосфора. (Ia) и (IIa) — реагенты, содержащие фосфодиэфирные связи.

Схема 1



Эффективность и позиционную направленность алкилирования НК-мишени реагентами (I) и (II) исследовали на примере 5'- ^{32}P -меченой матрицы d(pC₅A₅C₅) (III) в условиях образования комплементарных комплексов типа А и Б (схема 1). Реакцию проводили в течение времени, необходимого для практически полной ионизации связи С—Cl [11] (т. е. времени, достаточного для практически полного расходования реагента на алкилирование матрицы или гидролиз его водой). Полученную реакционную смесь анализировали с помощью электрофореза (рис. 1). Оказалось, что продукты модификации НК-мишени имеют меньшую электрофоретическую подвижность по сравнению с подвижностью исходной немодифицированной мишени и могут быть таким образом зарегистрированы и выделены из реакционной смеси с помощью электрофореза (рис. 1).

На рис. 2а—в приведены кривые зависимости предельной степени модификации матрицы всеми исследованными реагентами от температуры, а также для сравнения представлена предельная степень модификации той же матрицы (III) реагентами типа (IV): Tr(TpTr)₃TrNHCH₂RCl (IV- R_n), Tr(TpTr)₃TrNHCH₂RCl (IV- S_p) и (Tr)₇TrNHCH₂RCl (IVa), не содержащими в своем составе остатка Phn [12]. Кривые имеют S-образный вид, косвенно отражающий процесс термической денатурации комплементарных комплексов. Для всех исследованных реагентов предельная степень модификации максимальна при низкой и минимальна при высокой температуре.

Следует особо отметить, что кривые модификации (рис. 2) Phn-содержащими реагентами (кривые 2, 3, 5, 6, 8 и 9) существенно смещены в область высоких температур по сравнению с кривыми модификации Phn-несодержащими реагентами (IV) (кривые 1, 4 и 7). Это свидетельствует о том, что эффективность алкилирования НК-мишени реагентами (I) и (II) выше, чем реагентами, не содержащими остатка Phn. Например, предельная степень алкилирования реагентами (I- R_p) и (II- R_p) (рис. 2а, 2 и 3 соответственно) при 40° С в 6—7 раз выше, чем реагентами (IV- R_p) (рис. 2а, 1).

Величиной, отражающей относительное смещение кривой модификации по температурной шкале координат, может служить температура полумодификации ($T_{1/2 \text{ мод}}$), равная той температуре, при которой предельная степень модификации НК-мишени достигает 50% (например, см. рис. 2а—в). При прочих равных условиях значения $T_{1/2 \text{ мод}}$ могут служить относительной оценкой эффективности алкилирования НК-мишени соответствующими реагентами. В таблице представлены значения $T_{1/2 \text{ мод}}$.

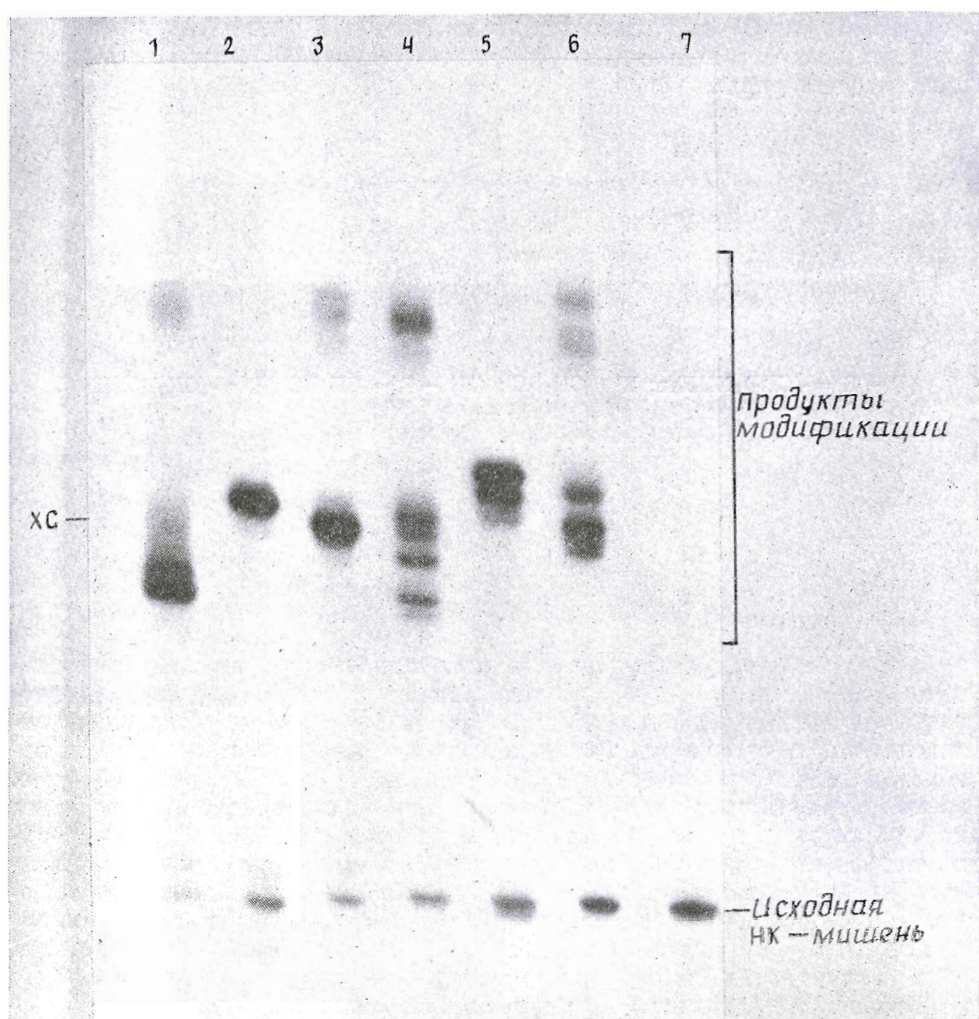


Рис. 1. Электрофореграмма (20% ПААГ, содержащий 7 М мочевины) продуктов алкилирования (20 сут, 8° С) $[5'-^{32}\text{P}]\text{pC}_5\text{A}_8\text{C}_5$ реагентами (I- R_p), (I- S_p), (Ia), (II- R_p), (II- S_p) и (IIa) (дорожки 1-6 соответственно) и исходного олигонуклеотида (III) (7). Концентрация реагентов — $2 \cdot 10^{-5}$ М, олигонуклеотида (III) — $1 \cdot 10^{-5}$ М. ХС — ксиленцианол FF

найденные из соответствующих кривых модификации. Видно, что при введении остатка Phn в состав исследованных реагентов наблюдается заметное повышение значения $T_{1/2 \text{ мод.}}$. Так, например, эта величина для 3'-Phn-реагентов R_p -изомеров (I- R_p) возрастает с 28 до 42° С, S_p -изомеров (I- S_p) — с 7 до 14° С и фосфодиэфиров (Ia) с 26 до 36° С. Таким образом, реагенты, обладающие большей эффективностью алкилирования, соответственно имеют и большие значения $T_{1/2 \text{ мод.}}$.

Изменение значений $T_{1/2 \text{ мод.}}$ коррелирует также с изменением $T_{пл}$ соответствующих комплементарных комплексов, образованных производными октатимидилатов, не содержащих ClRCH_2 -группировку [1, 10]. Например, октатимидилатные производные (V- R_p), (V- S_p) и (Va) [1], представленные в таблице, и реагенты, полученные на их основе — (I- R_p), (I- S_p) и (Ia), имеют значения $T_{пл}$, равные 30, 6 и 24° С [1], и $T_{1/2 \text{ мод.}}$ — 42, 14 и 36° С.

В работе рассмотрена также позиционная направленность алкилирования мишени всеми исследованными реагентами в условиях образования комплексов А и Б (схема 1). На рис. 3 приведены результаты электрофоретического анализа продуктов расщепления октадекануклеотида (III), модифицированного реагентами (I) и (II). На рис. 4 и 5 представлены

Значения $T_{1/2}$ мод и $T_{пл}$ комплексов, образованных октатимидилатными производными и комплементарной НК-матрицей *

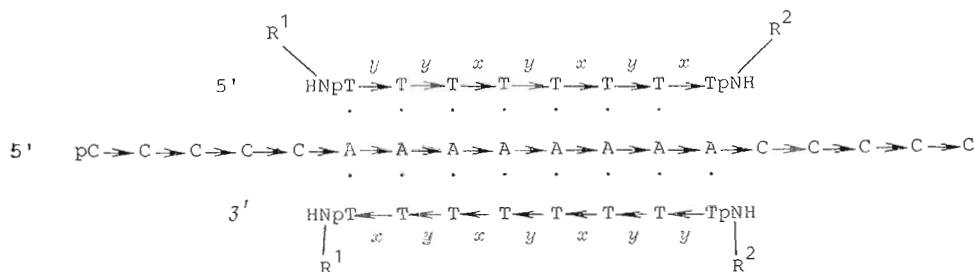
Октатимидилаты и их производные	Шифр соединения	$T_{1/2}$ мод	$T_{пл}$
		°C	
R_p -Изомеры МФАО			
$CIRCH_2NHpTp(TpTp)_3TpNH(CH_2)_2NHPhn$	I- R_p	42	—
$Tp(TpTp)_3TpNH(CH_2)_2NHPhn$	V- R_p	—	30
$PhnNH(CH_2)_2NHpTp(TpTp)_3TpNHCH_2RCl$	II- R_p	41	—
$PhnNH(CH_2)_2NHpTp(TpTp)_3TpSCH_3$	VI- R_p	—	38
$Tp(TpTp)_3TpNHCH_2RCl$	IV- R_p	28	—
$Tp(TpTp)_3TpSCH_3$	VII- R_p	—	20
S_p -Изомеры МФАО			
$CIRCH_2NHpTp(TpTp)_3TpNH(CH_2)_2NHPhn$	I- S_p	14	—
$Tp(TpTp)_3TpNH(CH_2)_2NHPhn$	V- S_p	—	6
$PhnNH(CH_2)_2NHpTp(TpTp)_3TpNHCH_2RCl$	II- S_p	17	—
$PhnNH(CH_2)_2NHpTp(TpTp)_3TpSCH_3$	VI- S_p	—	15
$Tp(TpTp)_3TpNHCH_2RCl$	IV- S_p	7	—
$Tp(TpTp)_3TpSCH_3$	VII- S_p	—	<3
Фосфодиэфир			
$CIRCH_2NHp(Tp)_7TpNH(CH_2)_2NHPhn$	Ia	36	—
$(Tp)_7TpNH(CH_2)_2NHPhn$	Va	—	24
$PhnNH(CH_2)_2NHp(Tp)_7TpNHCH_2RCl$	IIa	38	—
$PhnNH(CH_2)_2NHp(Tp)_7TpSCH_3$	VIa	—	33
$(Tp)_7TpNHCH_2RCl$	IVa	26	—
$(Tp)_7TpSCH_3$	VIIa	—	15

* При получении кривых модификации, из которых найдены значения $T_{1/2}$ мод (рис. 2), в качестве НК-матрицы использован олигонуклеотид $pC_5A_8C_5$ (III), а в качестве реагентов — производные октатимидилата, содержащие алкилирующий $CIRCH_2$ -остаток; при получении кривых плавления [1,10] использованы комплексы, образованные НК-матрицей $C_5A_8C_5$ и соответствующими производными октатимидилатов, не содержащими в своем составе алкилирующую $CIRCH_2$ -группировку.

гистограммы соответствующих дорожек геля, полученных путем счета радиоактивности продуктов расщепления.

Из данных рис. 3—5 видно, что в случае 5'-фосфамидных реагентов (I), как и в случае реагентов, не содержащих остатка Phn [12], идет преимущественная модификация основания цитидина C^{14} (рис. 3, 1—3; 4). При алкилировании 3'-фосфамидными реагентами (рис. 3, 4—6; 5) модификации подвергаются несколько оснований в районе C^1-A^9 с некоторым преимуществом по C^5 . Незначительное алкилирование в локусе C^1-C^3 при

с х е м а 2



Комплекс В (значения R^1 , R^2 , x и y см. в схеме 1)

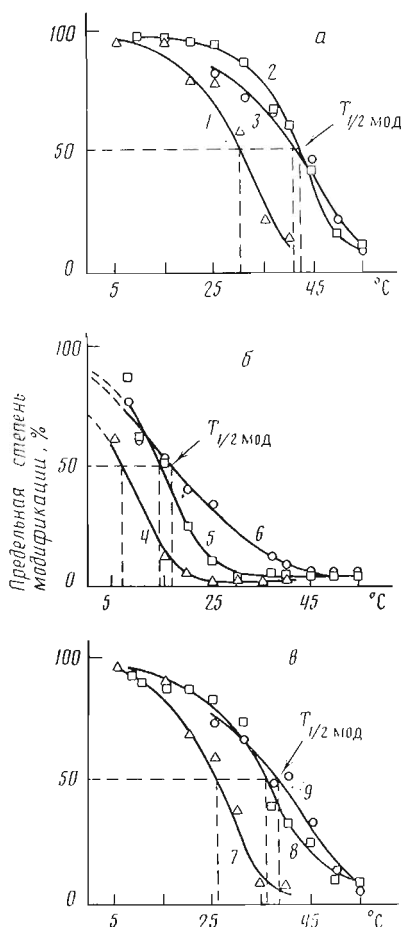


Рис. 2. Зависимости от температуры предельной степени модификации НК-мишени реагентами: а — (IV- R_p), (I- R_p) и (II- R_p) (1-3 соответственно); б — (IV- S_p), (I- S_p) и (II- S_p) (4-6); в — (IVa), (Ia) и (IIa) (7-9). Условия модификации см. в подписи к рис. 1. Штриховые линии указывают на температуру, при которой модификация олигонуклеотида (III) соответствующими реагентами протекает на 50% ($T_{1/2 \text{ мод}}$). Стрелкой указаны значения $T_{1/2 \text{ мод}}$ для реагентов (I- R_p), (II- S_p) и (IIa)

алкилировании 5'-фосфамидными реагентами (рис. 4) и C^{14} — C^{18} в случае 3'-фосфамидных реагентов (рис. 5), вероятно, связано с алкилированием внутри тройного комплекса типа В, приведенного на схеме 2, т. е. комплексов (I)·(III)·(I) и (II)·(III)·(II) соответственно, где одна из октати-мидилатных цепей, участвующих в комплекссообразовании, ориентирована параллельно последовательности матрицы (III) [13]. Алкилирование в тройных комплексах отмечалось ранее, например в работах [12, 14].

Кроме того, на гистограммах представлены данные, относящиеся к продуктам, обладающим меньшей электрофоретической подвижностью, чем исходная немодифицированная матрица (III) (рис. 4 и 5, продукты А'1—А'3 и Б'1—Б'3 соответственно). Вероятно, это продукты модификации 5'-концевой фосфатной группы мишеней: для 3'-фосфамидных реагентов — при образовании комплексов типа Б [12, 15], для 5'-фосфамидных реагентов — в случае тройного комплекса [12] (I)·(III)·(I) типа В (схема 2).

Из сравнения гистограмм, приведенных на рис. 4 и 5, видно, что размер основного локуса модификации НК-мишени (III) (количество модифицированных оснований) реагентами типа (II) (рис. 5, основания C^1 — A^9) больше, чем реагентами типа (I) (рис. 4, основание C_{14}). Причина такого различия требует специальных исследований. Возможно, это обусловлено различным пространственным расположением и соответственно разной подвижностью $ClRCH_2$ -группировки на 5'- и 3'-конце олигонуклеотида, что особенно проявляется при наличии в реагенте остатка Phn. Из результатов, полученных в настоящей работе, следует, что различие в размере локусов алкилирования реагентами типа (I) и (II) не связано с наличием метилфосфонатных остатков в реагентах, поскольку, как видно из гистограмм, такое же различие в размере локусов алкилирования наблю-

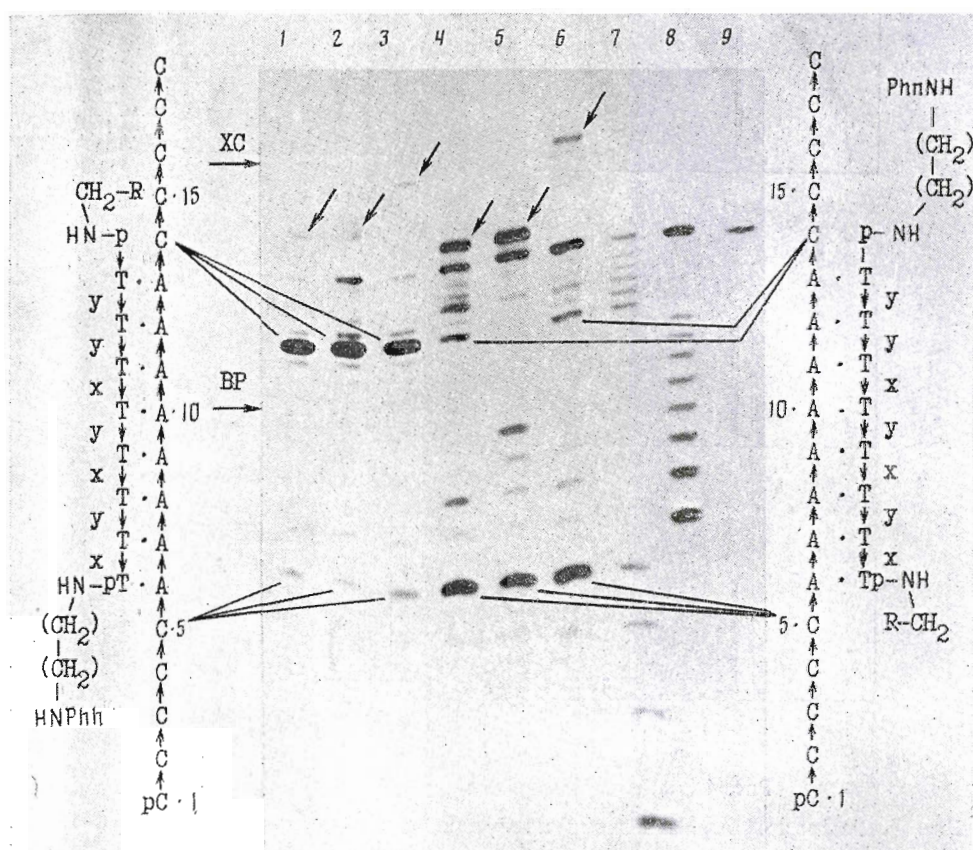


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов расщепления модифицированного (условия и обозначения см. в подписи к рис. 1) реагентами (I- R_p), (I- S_p), (Ia), (II- R_p), (II- S_p), (IIa) олигонуклеотида (III) последовательным действием гидразингидрата и пиперидина (дорожки 1-6) и продуктов частичного расщепления олигонуклеотида (III) по остаткам пиримидинов (7) и пуринов (8). Исходный олигонуклеотид (III) — дорожка 9. BP — бромфеноловый синий. Стрелками отмечены продукты, имеющие меньшую электрофоретическую подвижность, чем матричный олигонуклеотид (III)

дается и для реагентов, полученных на основе контрольных фосфодиэфирных олигонуклеотидов (Ia) и (IIa), не имеющих в своем составе метилфосфонатных остатков (рис. 4в и 5в соответственно).

Таким образом, в данной работе показано, что реагенты на основе МФАО, содержащие остаток Phn, могут быть полезны в комплементарно-адресованной модификации НК. Причем Phn-содержащие реагенты МФАО более эффективны, чем аналогичные реагенты, не содержащие остатка Phn.

Повышение эффективности модификации НК-мишени реагентами на основе МФАО открывает возможность воздействия на НК-мишень более доступными производными достаточно коротких МФАО. Кроме того, в некоторых случаях, вероятно при использовании Phn-содержащих реагентов, можно будет достигать заметной степени модификации не только индивидуальными высокоэффективными R_p -изомерными производными МФАО, но и реагентами на основе перазделенной смеси МФАО, содержащей малоэффективные S_p -изомерные последовательности олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

Синтез и основные характеристики использованных в работе олигонуклеотидов и их алкилирующих производных описаны ранее [1, 10]. ^{32}P -Меченый олигонуклеотид (III) получали по методике [16], используя

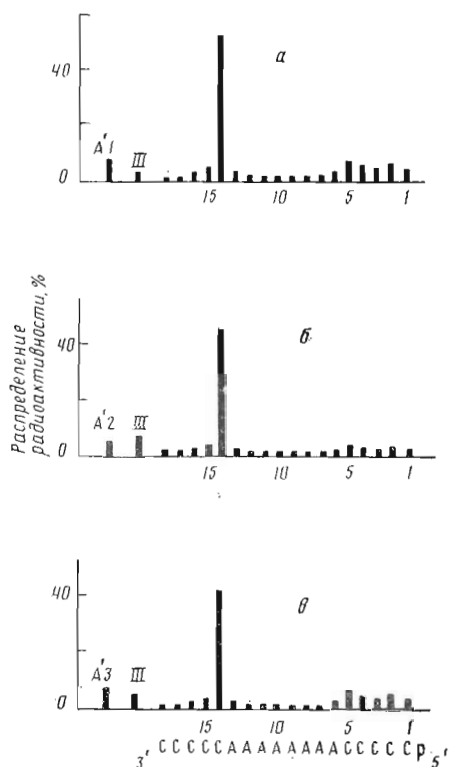


Рис. 4

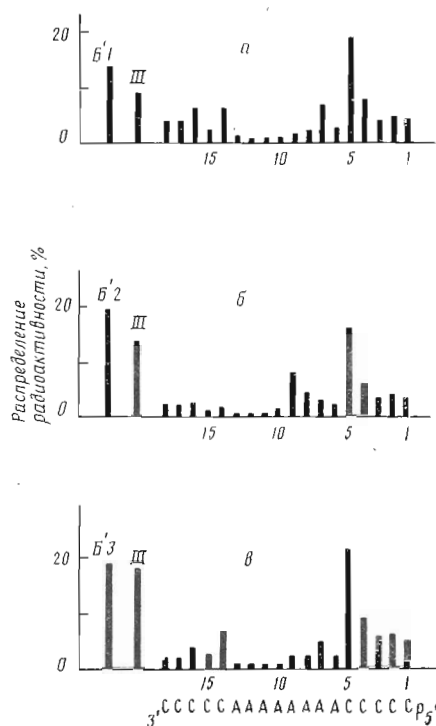


Рис. 5

Рис. 4. Гистограммы расщепления модифицированных оснований олигонуклеотида (III) реагентами (I- R_p), (I- S_p), (Ia) в условиях образования комплексов А, полученные при сканировании дорожек ПААГ, радиоавтограмма которого представлена на рис. 3, 1-3 (а - в соответственно). Числа на оси абсцисс обозначают номер основания, считая с 5'-конца олигонуклеотида

Рис. 5. Гистограммы расщепления модифицированных оснований олигонуклеотида (III) реагентами (II- R_p), (II- S_p), (IIa) в условиях образования комплексов Б, полученные при сканировании дорожек ПААГ, радиоавтограмма которого представлена на рис. 3, 4-6 (а - в соответственно)

[γ - ^{32}P]АТР (3000 Ки/ммоль), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.88; НИКТИ БАН, Бердск).

Модификацию октадекануклеотидной мишени (III) реакционноспособными производными (I- R_p), (I- S_p), (Ia) или (II- R_p), (II- S_p) и (IIa) проводили аналогично описанным ранее методикам [12] в буфере, содержащем 0,2 М NaCl, 0,01 М трис-HCl (рН 7,4), 0,01 М MgCl₂. Концентрации реагентов в реакционной смеси составляли $2 \cdot 10^{-5}$ М, олигонуклеотида (III) - $1 \cdot 10^{-5}$ М.

Термические кривые модификации (рис. 2) построены [12, 15], исходя из значений предельной степени модификации олигонуклеотида (III) соответствующими реагентами (I) и (II) в зависимости от температурного режима реакции. Реакционную смесь, содержащую реагент и ^{32}P -меченый олигонуклеотид, выдерживали при 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 и 55° С в течение 20, 10, 5 сут; 60; 29; 14; 8,5; 4,8; 2,4; 1,2 и 0,6 ч соответственно. Далее реакционные смеси подвергали электрофорезу в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины (рис. 1). По отношению радиоактивности продуктов модификации к сумме радиоактивности продуктов модификации и исходного немодифицированного олигонуклеотида (III) определяли степень модификации (рис. 2).

Позиционную направленность алкилирования олигонуклеотида (III) реагентами (I) и (II) определяли аналогично описанным ранее методикам [12, 15]. Реакционную смесь, содержащую олигонуклеотид (III) и соот-

ветствующие реагенты (I) или (II), выдерживали 20 сут при 8°С, подвергали расщеплению по остаткам алкилированных пуринов и N³-алкилдитидинов. Расщепление модифицированного додекануклеотида по остаткам алкилированных пуринов проводили при 95–100°С 1 М пиперидином [17] в течение 10–16 ч, по остаткам N³-алкилдитидинов — обработкой модифицированной мишени смесью гидразингидрат — диоксан — вода (2:1:1, по объему) в течение 1,5–2 ч при 0°С с последующей обработкой пиперидином, как описано в работе [48]. Продукты частичного расщепления цепи по пуринам получали, обрабатывая олигонуклеотид 30–40 мин 2% раствором дифениламина в 66% водной муравьиной кислоте при 37°С [19]. Для получения продуктов частичной деструкции олигонуклеотидной цепи по остаткам пиримидинов применяли последовательно обработку гидразингидратом (37°С, 30–40 мин), а затем пиперидином при 95–100°С в течение 30–40 мин [17]. По завершении указанных процедур олигонуклеотидный материал выделяли осаждением, добавляя 10–15-кратный избыток (по объему) 2% перхлората лития в ацетоне, растворяли в формамиде и подвергали электрофорезу. После радиоавтографии (пленка РТ-1) (рис. 3) полосы, соответствующие радиоактивным продуктам, вырезали и их радиоактивность измеряли в воде по Черенкову, используя счетчик Marck III (Nuclear Chicago, США). Результаты сканирования соответствующих дорожек геля, содержащих продукты расщепления, приведены на рис. 4 и 5, где распределение радиоактивности (%) получено по отношению радиоактивности соответствующей полосы геля к сумме радиоактивности всех полос.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Лохов С. Г. // Биоорган. химия. 1986. Т. 15. № 12. С. 1618–1626.
2. Miller P. S., Yano J., Yano E., Carroll C., Jayaraman K., Ts'O P. O. P. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 23. P. 5134–5143.
3. Miller P. S., Dreon N., Pulford S. M., McParland K. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 20. P. 9659–9665.
4. Miller P. S., McParland K. B., Jayaraman K., Ts'O P. O. P. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 7. P. 1874–1880.
5. Jayaraman K., McParland K., Miller P. S., Ts'O P. O. P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1537–1541.
6. Engels J., Jüger A. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1982. B. 21. № 12. S. 912.
7. Miller P. S., Agris C. H., Aurelian L., Blake K. R., Muracami A., Reddy M. P., Spitz S. A., Ts'O P. O. P. // Biochimie. 1985. B. 67. № 7/8. S. 769–776.
8. Marrug J. E., de Vroom E., Dreef C. E., Tromp M., van der Mareel G. A., van Boom J. H. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 5. P. 2171–2185.
9. Zon G. // J. Protein Chem. 1987. V. 6. № 2. P. 131–145.
10. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 267–276.
11. Гринева Н. И., Домокина Т. С., Тигеева Н. Г., Чимитова Т. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 210–214.
12. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 379–386.
13. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. С. 292.
14. Кнорре Д. Г., Зарытова В. Ф., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. № 4. С. 1006–1009.
15. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогин М. А., Сильников В. И., Шишкин Г. В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212–1220.
16. Muracami A., Blake K. R., Miller P. S. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 15. P. 4041–4046.
17. Mazam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
18. Kirkegaard K., Bus H., Spassky A., Wang J. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 9. P. 2544–2548.
19. Коробко В. Г., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 10. С. 1420–1422.

Поступила в редакцию
9.II.1989

После доработки
28.VI.1989

REACTIVE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES BEARING
METHYLPHOSPHONATE GROUPS. V. ALKYLATING METHYLPHOSPHONATE
OCTATHYMIDYLATE DERIVATIVES BEARING
A N-(2-HYDROXYETHYL)PHENAZINIUM RESIDUE INCREASE THE
EFFICIENCY OF COMPLEMENTARY ADDRESSED MODIFICATION
OF DNA-TARGET

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of the USSR*

Efficiency of the intracomplex alkylation of octadecadeoxyribonucleotide d(pC₅A₈C₅) (target) by *R*_p- and *S*_p-individual diastereomers of the methylphosphonate octathymidylate 4-(N-methyl-N-2-chloroethylamino)benzyl phosphoramidate (–pNHCH₂Cl) derivatives bearing an additional N-(2-hydroxyethyl)phenazinium residue (Phn), viz. ClRCH₂NH_pTP · (TpTp)₃TPNH(CH₂)₂NHPhn (I) and PhnNH(CH₂)₂NH_pTP(TpTp)₃TPNHCH₂Cl (II) (p=–OP(O)(CH₃)O–), has been investigated. Stabilisation of the complementary complex formed by the target oligonucleotide and methylphosphonate oligonucleotide derivatives by the Phn group considerably rose the efficiency of the intracomplex alkylation of the target as compared with alkylation by reagents without Phn. *R*_p-isomeric derivatives of (I) and (II) proved to be the most effective alkylating reagents. Specificity of alkylation of nucleic acid target by reagents (I) and (II) is studied.