



УДК 577.113.4

## РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ФОСФОТИОАТНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ. II\*. СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОТИОАТНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АРОМАТИЧЕСКИЙ ОСТАТОК АЗОТИСТОГО ИПРИТА

© 1997 г. Н. В. Амирханов<sup>#</sup>, В. Ф. ЗарытоваНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 5.09.96 г. Принята к печати 21.01.97 г.

На примере 3'-фосфамидного алкилирующего производного тритимидинфосфотиоата TrpTrpTpN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>RCI исследованы алкилирующие свойства производных фосфотиоатных аналогов олигонуклеотидов, содержащих алкилирующую 3'-(N-метил-4-(N'-метил-N'-2-хлорэтиламино)бензил)фосфамидную (pN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>RCI) группу. Методом ионообменной хроматографии и <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии показано, что реагенты такого типа в зависимости от условий способны алкилировать как собственные ps-группы, так и нуклеофилы среды. В отсутствие внешних нуклеофилов в водных средах TrpTrpTpN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>RCI образует преимущественно продукты внутримолекулярного алкилирования ps-групп, а не продукт гидролиза RCI-группировки. В присутствии нуклеофила (1 М водный этилендиамин) реагент алкилирует в основном алифатические аминогруппы нуклеофила. При снижении концентрации этилендиамина до 0.1 М наблюдаются оба процесса, причем скорость реакции почти в 2 раза выше, чем скорость образования продукта внутримолекулярного алкилирования. Константа скорости лимитирующей стадии алкилирования – ионизации C–Cl-связи (*k*<sub>0</sub>) не зависит от присутствия в среде конкурентного нуклеофила (этилендиамина) и составляет при 37°C 3.95 × 10<sup>-4</sup> с<sup>-1</sup>.

*Ключевые слова:* фосфотиоатные аналоги, олигонуклеотиды, алкилирующие производные, внутримолекулярное алкилирование.

В последние годы идет интенсивный поиск аналогов олигонуклеотидов и их производных, способных эффективно воздействовать на экспрессию генов [2, 3]. В этом плане создание новых соединений, обладающих специфическими свойствами – устойчивостью к нуклеазной дегградации, возможностью проникновения через клеточную мембрану, способностью связываться ковалентно с молекулами НК и белков, – является актуальной задачей.

Среди множества производных олигодезоксирибонуклеотидов наибольшую биологическую активность проявили их фосфотиоатные аналоги (ФТАО) [2–7]. ФТАО отличаются от природных олигонуклеотидов наличием в межнуклеотидных

фосфатных группах атомов серы. Это обеспечивает им большую устойчивость к действию клеточных нуклеаз [8], большее сродство к рецепторам иммунной системы [9] и повышенную биологическую активность [3, 5], в том числе против вируса СПИДа. Реакционноспособные производные ФТАО, как и сами ФТАО, способны давать комплементарные комплексы с НК-мишенью, но и, кроме того, образуют с ней прочную ковалентную связь. Это может послужить одним из факторов повышения эффективности направленного воздействия ФТАО на НК. Однако при синтезе и использовании реакционноспособных производных ФТАО наличие высоконуклеофильных межнуклеотидных фосфотиоатных групп может привести к некоторым осложнениям, связанные с модификацией самих ps-групп.

Ранее нами была показана принципиальная возможность синтеза реакционноспособных алкилирующих производных ФТАО [1]. Было выяснено, что в ходе синтеза таких производных с использованием конденсирующей пары трифре-

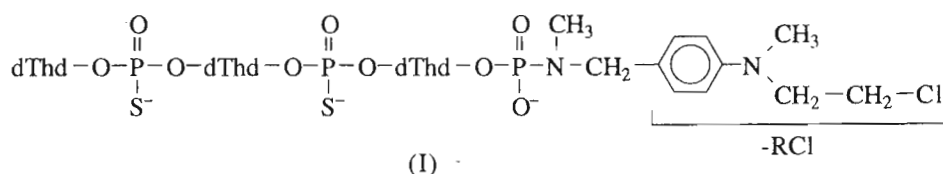
\* Сообщение I см. [1]. Используемые сокращения: ФТАО – фосфотиоатные аналоги олигонуклеотидов, ps – межнуклеотидный фосфотиоатный остаток, HN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>RCI – N-метил-4-(N'-метил-N'-2-хлорэтиламино)бензиламин, EDA – этилендиамин, НК – нуклеиновая кислота. Префикс "d" в обозначении дезокси-нуклеотидов опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

нилфосфин-дипиридилдисульфид и последующего их выделения межнуклеотидные фосфотиоатные группы не модифицируются. Были синтезированы 3'-фосфамидные производные ФТАО, содержащие в составе алкиламидной группы ароматический остаток азотистого иприта. Для выяснения принципиальной возможности использования алкилирующих производных ФТАО для комплементарно-адресованной модификации НК как *in vitro*, так и *in vivo* необходимы данные о ре-

акционной способности таких соединений, что и является предметом настоящего исследования.

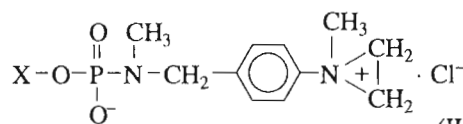
В качестве модельного соединения было использовано полученное ранее [1] производное тритимидинфосфотиоата (I), содержащее в своем составе две межнуклеотидные ps-группы и остаток N-метил-4-(N'-метил-N'-2-хлорэтиламино)бензиламина (-N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>RCl), введенный по 3'-концевому фосфату.



(I)

Важным свойством группировки RCl является способность алкилировать различные нуклеофильные соединения в водной среде. В случае комплементарно-адресованной модификации НК RCl-содержащими соединениями на основе при-

родных олигонуклеотидов в качестве нуклеофилов выступают остатки гетероциклических оснований НК-мишеней. Показано, что алкилирование при этом идет через лимитирующую стадию образования этилениммониевого катиона (II) [10-13]



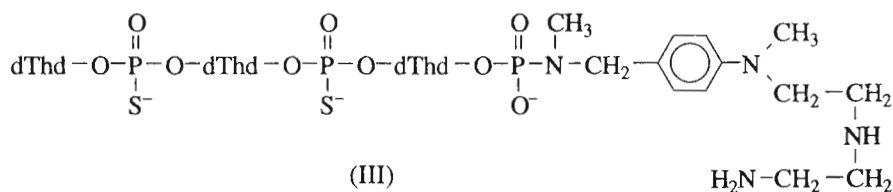
(II)

(IIa) X – олигонуклеотид

(IIб) X = TpsTpsT-

В качестве нуклеофила в настоящей работе был использован этилендиамин (EDA), первичные аминогруппы которого способны под-

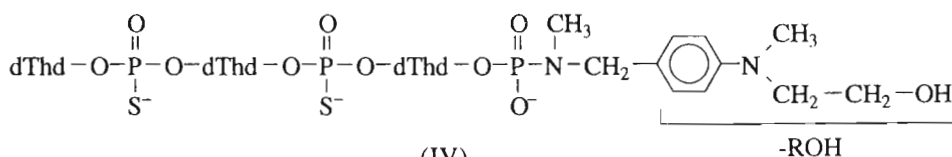
вергаться алкилированию остатком азотистого иприта с образованием продукта алкилирования (III).



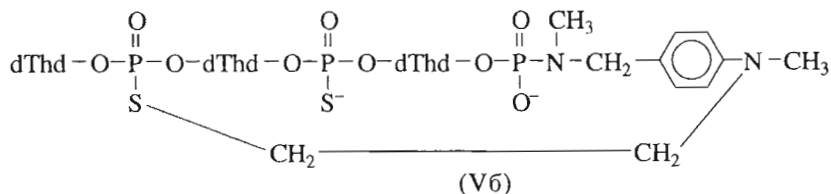
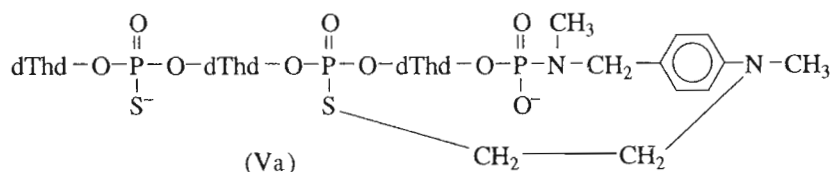
(III)

Помимо соединений (IIб) и (III) в реакционной смеси могут образовываться продукт гидролиза RCl-реагента (I) (соединение (IV)); ROH) и продук-

ты внутримолекулярного алкилирования по межнуклеотидным фосфотиоатным ps-группам (соединения (Va) и (Vб)).



(IV)



На первом этапе работы была исследована возможность образования продуктов алкилирования (Va) и (Vб). С этой целью реагент (I) выдерживали в воде или в водном растворе, содержащем EDA, при 37°C. За ходом реакции следили по данным ионообменной хроматографии и <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии.

Из рис. 1 видно, что в зависимости от условий, в которых выдерживается реагент (I), образуются разные продукты алкилирования, отличающиеся друг от друга по времени удерживания при ионообменной хроматографии. Так, например, в воде или в водном буфере А в отсутствие EDA, по данным ионообменной хроматографии (рис. 1а), наблюдается образование продуктов, время удерживания которых (τ 8.3 мин) меньше, чем у исходного реагента (I) (τ 11.0 мин) и меньше времени удерживания продуктов алкилирования EDA (τ 10.0 мин) (рис. 1б, 1в). В <sup>31</sup>P-ЯМР-спектрах конечных реакционных смесей, полученных из реагента (I) в воде или водном буфере (6 ч, 37°C) (рис. 2), помимо сигналов, принадлежащих исходным ps- (δ 55–56 м. д.) и фосфамидным (δ 9–11 м. д.) группам, обнаруживаются сигналы в области 30–32 м. д., принадлежащие фосфотриэфирным межнуклеотидным группам (-O)P(O)(SR)O- [14]. Мультиплетность сигналов в области 55–56 и 30–32 м. д. указывает на образование смеси продуктов (Va) и (Vб). Мультиплетность же сигналов в области 9–11 м. д., вероятно, обусловлена наличием двух асимметрических атомов фосфора в исследуемых продуктах алкилирования реагента (I), а также тем, что исследуемая реакционная смесь представляет собой смесь соединений (Va) и (Vб).

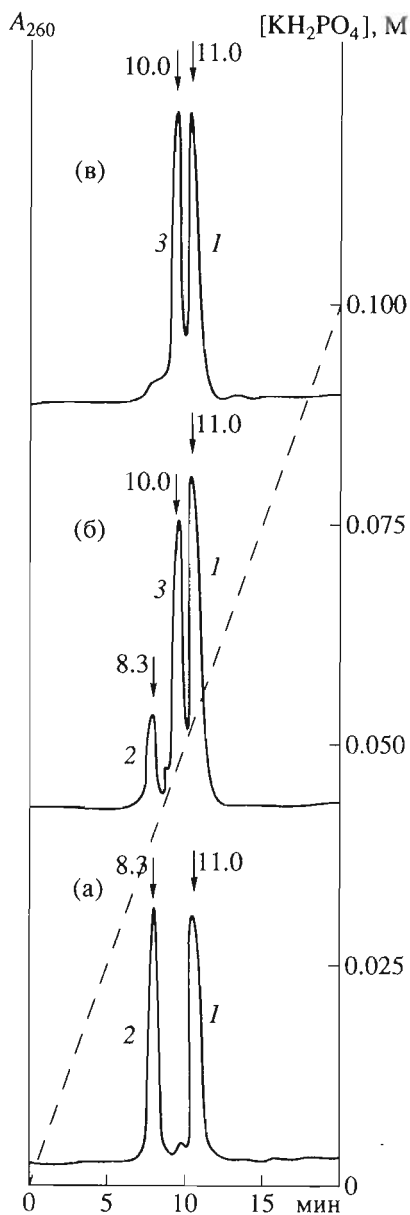
Последовательная щелочная и кислотная обработка конечных продуктов алкилирования (Va, б), полученных при выдерживании реагента (I) в воде или водном буфере (6 ч, 37°C), в условиях гидролиза триэфиров (конц. NH<sub>4</sub>OH, 4 ч, 40°C) и разрыва фосфамидной связи (0.1 М HCl, 2 ч, 40°C) по данным ионообменной хроматографии

(рис. 3а), приводит к образованию продуктов, время удерживания которых совпадает с временем удерживания контрольных тритимидинфосфотиоатов TrpTrpTr и TrTrpTr, содержащих одну межнуклеотидную ps-группу.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что в отсутствие внешних нуклеофилов RCl-производные ФТАО способны взаимодействовать с собственными ps-группировками с образованием циклических продуктов типа (V).

При выдерживании реагента (I) в присутствии нуклеофила (1 М EDA; рис. 1в) образуется продукт алкилирования этилендиамина (III), время удерживания которого (τ 10.0 мин) меньше, чем у исходного реагента (I) (τ 11.0 мин) и несколько больше, чем у продуктов (V), образующихся при выдерживании реагента в воде или водном буфере (τ 8.3 мин) (рис. 1а).

В <sup>31</sup>P-ЯМР-спектрах конечных реакционных смесей, полученных при выдерживании реагента (I) в 1 М EDA, регистрируются сигналы лишь межнуклеотидных ps- (δ 55–57 м. д.) и фосфамидных (δ 9–11 м. д.) групп, присутствующих в исходном соединении (I) (спектры не приведены). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что в данном случае межнуклеотидные ps-группы не затрагиваются. Кислотный гидролиз продуктов алкилирования EDA в условиях разрыва фосфамидной связи приводит, по данным ионообменной хроматографии (рис. 3в), к образованию продукта, по времени удерживания совпадающего с контрольным исходным тринуклеозидфосфотиоатом TrpTrpTr, содержащим две межнуклеотидные ps-группы. Таким образом, в присутствии нуклеофила в высокой концентрации RCl-производные ФТАО способны практически полностью "переключиться" с реакции внутримолекулярного алкилирования межнуклеотидных ps-групп на алкилирование внешнего нуклеофила с образованием продуктов типа (III).



**Рис. 1.** Профили ионообменной хроматографии реакционных смесей, полученных при выдерживании алкилирующего реагента  $\text{TrpTrpTrpN}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{RCl}$  (I) в водном буфере (А), в 0.1 М (б) и 1 М водном EDA (в) в течение 30 мин при 37°C. Концентрация реагента  $5 \times 10^{-5}$  М. I – исходный реагент (I), 2 и 3 – продукты алкилирования ps-групп ФТАО и EDA (соединения (V) и (III) соответственно).

При выдерживании реагента (I) в присутствии 0.1 М EDA (рис. 1б) удается зафиксировать образование продуктов алкилирования как ps-групп ( $\tau$  8.3 мин), так и EDA ( $\tau$  10.0 мин). Последовательные щелочной и кислотный гидролизы смеси этих продуктов алкилирования приводят к образованию соответствующих смесей тринуклеозидфосфотиоатов  $\text{TrpTrpTrp}$ ,  $\text{TrpTrpTrp}$  и  $\text{TrpTrpTrp}$  (рис. 3б).

Таким образом, было установлено, что в зависимости от присутствия в реакционной среде, содержащей алкилирующий реагент, конкурентного нуклеофила и его концентрации могут образовываться как продукты алкилирования этого нуклеофила, так и продукты внутримолекулярного алкилирования ps-групп.

По аналогии с RCl-производными природных олигонуклеотидов в случае RCl-производных ФТАО возможно образование ROH-продуктов типа (IV). Время удерживания ROH-продукта, образуемого в ходе гидролиза реагента (I), при ионообменной хроматографии совпадает с временем удерживания исходного RCl-реагента и поэтому ROH-продукт типа (IV) может быть зарегистрирован при ионообменной хроматографии лишь после полного гидролиза RCl-реагента (I) (данные не приведены). Поскольку при выдерживании реагента (I) в водной среде как в присутствии, так и в отсутствие EDA накапливается чрезвычайно малое количество продукта (IV) (не более 0.3–1.5%), его образование в дальнейшем не учитывалось. Преимущественное образование соединений (III) и (V) по сравнению с соединением (IV) обусловлено тем, что нуклеофильность ps-групп и первичных аминогрупп EDA существенно выше нуклеофильности воды.

Реакционная способность олигонуклеотидных реагентов, содержащих остатки ароматического азотистого иприта, в первую очередь характеризуется константой скорости ионизации C–Cl-связи ( $k_0$ ) [10–13]. С целью выяснения влияния ps-групп на кинетику реакции алкилирования нами была исследована скорость самоалкилирования реагента (I) в водной среде как в присутствии, так и в отсутствие конкурентного нуклеофила (EDA). На основании данных ионообменной хроматографии были построены кинетические кривые накопления продуктов алкилирования (V) и (III), имеющие линейный вид в полулогарифмических координатах (рис. 4). Это свидетельствует о том, что исследуемые реакции алкилирования, как и в случае реагентов на основе природных олигонуклеотидов [10, 12, 13], описываются кинетическим уравнением первого порядка, т.е. вне зависимости от условий проведения реакция проходит через лимитирующую стадию образования этиленимониевого катиона (II). Было найдено, что при выдерживании реагента (I) в водном буфере и в 0.1 М водном растворе EDA константы скорости ионизации C–Cl-связи ( $k_0$ ) при 37°C соответственно равны  $(3.95 \pm 0.18) \times 10^{-4}$  и  $(3.71 \pm 0.22) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ , т.е. скорость расходования реагента (I) практически не зависит от направления алкилирования и одинакова как в присутствии, так и в отсутствие нуклеофила (EDA). Следует отметить, что значения  $k_0$ , определенные ранее [11] для аналогичных реагентов на основе природных

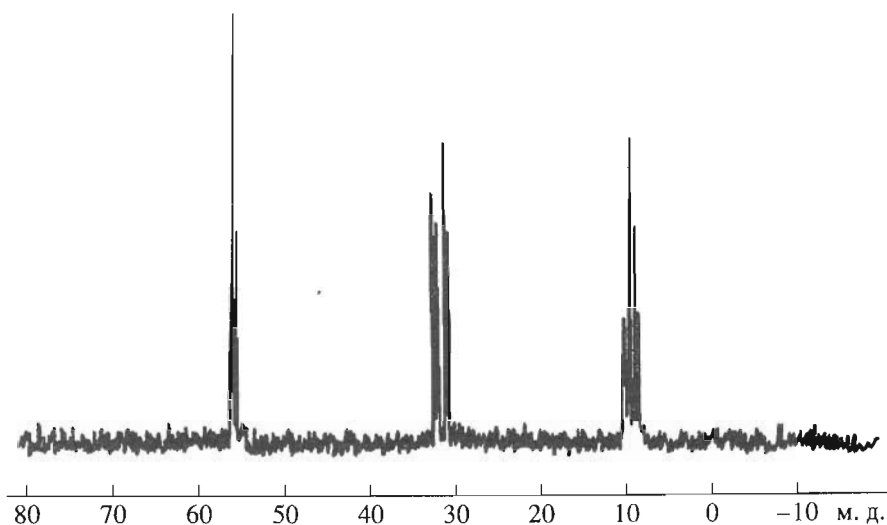


Рис. 2.  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектр конечной реакционной смеси, полученной при длительном выдерживании реагента (I) в воде (6 ч,  $37^\circ\text{C}$ ). Исходная концентрация реагента (I) в реакционной смеси 0.01 М.

олигонуклеотидов и равные  $(4.9 \pm 0.5) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  при  $40^\circ\text{C}$  или  $(3.36 \pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  при  $37^\circ\text{C}$ , хорошо коррелируют с найденными нами величинами  $k_0$  для алкилирующих производных ФТАО. Таким образом, наличие ps-групп в олигонуклеотидном реагенте не влияет на константу скорости лимитирующей стадии алкилирования.

Далее было проведено сравнение реакционной способности реагента (I) по отношению к фосфотиоатам (в составе самого реагента) и к алифатическим аминам (EDA). Поскольку реакция алкилирования ps-групп является внутримолекулярной, то ее скорость не зависит от концентрации реагента, а лишь от нуклеофильности и концентрации конкурентного нуклеофила среды, в данном случае EDA. Так, например, в случае проведения реакции алкилирования в 1 М EDA, по данным ионообменной хроматографии (рис. 1в), удается выявить практически лишь один продукт реакции, соответствующий продукту алкилирования EDA (соединение (III)). При проведении реакции в 0.1 М EDA (рис. 1б) удается зарегистрировать продукты алкилирования как EDA, так и ps-групп. При этом соотношения долей этих продуктов алкилирования  $[\text{XRN}] / [\text{XRS}]$ , найденные по данным ионообменной хроматографии (см., например, рис. 1б или 3б), составляют 1.9 : 1. Исходя из этих данных по аналогии с работами [15, 16] были рассчитаны относительные константы скоростей реакций ( $\chi$ ) этих нуклеофилов с активной промежуточной этилениммониевой частицей ( $\text{XR}^+$ ), образуемой на первой лимитирующей стадии процесса:

$$\chi = k_N/k_S = [\text{XRN}]/[\text{XRS}][\text{N}] = 19 \text{ М}^{-1},$$

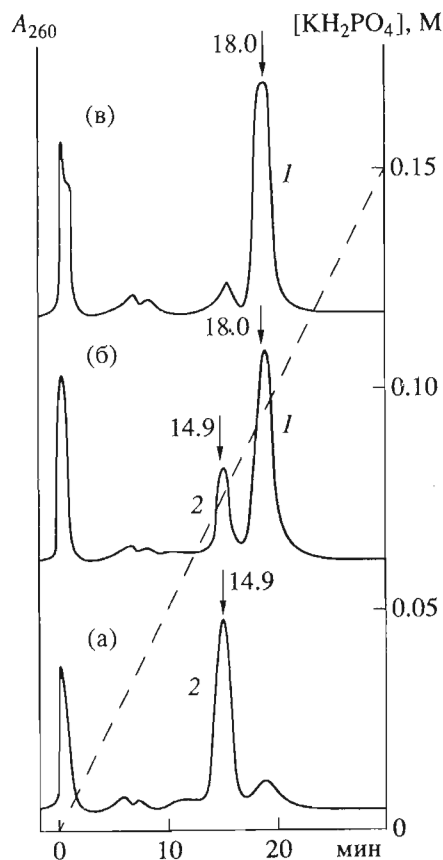


Рис. 3. Профили ионообменной хроматографии продуктов последовательной щелочной и кислотной обработки реакционных смесей, полученных при выдерживании реагента (I) (6 ч,  $37^\circ\text{C}$ ) в водном буфере А (а), в 0.1 М (б) и 1 М EDA (в). Стрелками указаны места выхода контрольных тринуклеозидфосфотиоатов TrpsTrpsTr (18.0 мин), TrpsTrTr и TrTrpsTr (14.9 мин).

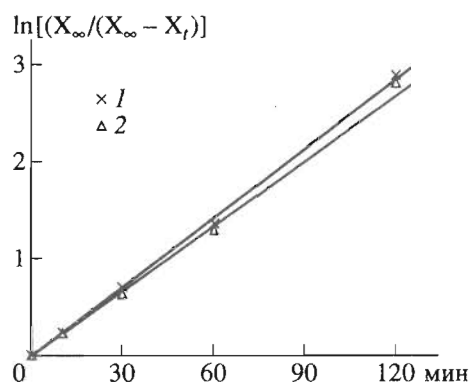


Рис. 4. Полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой накопления продуктов алкилирования (V) (1) и (V) + (III) (2), полученных при выдерживании реагента (I) в водном буфере А (1) и 0.1 М водном EDA (2).  $X_{\infty}$  – доля продуктов алкилирования при длительном выдерживании реагента,  $X_t$  – текущая доля продуктов алкилирования.

где  $k_N$  и  $k_S$  – константы скоростей реакций этилениммониевого катиона ( $XR^+$ ) соответственно с этилендиамином или ps-группами;  $[XRN]$  – концентрация продуктов алкилирования EDA;  $[XRS]$  – концентрация продуктов внутримолекулярного алкилирования ps-групп;  $[N]$  – концентрация EDA, которую при  $[N]_0 \gg [XRCl]_0$  принимали равной  $[N]_0$ .

Таким образом, реакционную способность реагента (I) по отношению к EDA и ps-группам можно выразить формулой

$$[XRN]/[XRS] = \chi[N]_0 = 19[N]_0,$$

из которой следует, например, что при концентрации EDA в реакционной смеси, равной 0.05 М, реакционная способность XRCl-реагента по отношению к ps-группам реагента и к EDA в водной среде сопоставима, тогда как в 1 М водном EDA скорость реакции алкилирования этилендиамином значительно (в 19 раз) превышает скорость внутримолекулярной реакции. Учитывая большую нуклеофильность ps-групп по сравнению с нуклеофильностью воды и природных фосфатных групп, можно ожидать, что алкилирующие реагенты на основе ФТАО при использовании их *in vivo* будут “выводиться” за счет внутримолекулярного самоалкилирования ps-групп и в меньшей степени, по сравнению с RCl-производными природных олигонуклеотидов, поражать жизненно важные нуклеофильные субстраты клеточной среды, что может привести к снижению токсичности алкилирующих олигонуклеотидных производных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использован этилендиамин фирмы Merck (Германия). В качестве водного буфера при реакции самоалкилирования реагента (I) использовали 0.15 М NaCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ EDTA в воде (буфер А).

Ионообменную хроматографию проводили на смоле Полисил СА отечественного производства (размер частиц 10–12 мкм, колонка  $4.6 \times 250$  мм) в градиенте концентрации  $KH_2PO_4$  (pH 6.5) в 20%  $CH_3CN$  при скорости элюции 2 мл/мин с использованием хроматографа Waters (США).

$^{31}P$ -ЯМР-спектр регистрировали на спектрометре AC-200 (Bruker, Германия) при 25°C. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м. д.) относительно 85%  $H_3PO_4$ .

Синтез исходного алкилирующего реагента  $TrpTrpTrpN(CH_3)CH_2RCl$  (I) и контрольных три-нуклеозидфосфотиоатов  $TrpTrpTrp$ ,  $TrpTrpTrp$  и  $TrpTrpTrp$  описан ранее в работе [1]. Содержание ковалентного хлора в реагенте (I) определяли по реакции с тиосульфатом натрия [1] с дальнейшим анализом реакционной смеси обращенно-фазовой хроматографией. Найдено, что содержание ковалентного хлора составляло 88%.

Щелочной и кислотный гидролиз конечных продуктов алкилирования проводили последовательной обработкой конечных реакционных смесей конц.  $NH_4OH$  в течение 4 ч при 40°C и 0.1 М HCl в течение 2 ч при 40°C. Превращение продуктов контролировали ионообменной хроматографией (рис. 3).

**Кинетика образования продуктов алкилирования реагента (I).** Раствор 0.5 мкмоль реагента (I) в 10 мл воды либо буфера А, 0.1 или 1 М водного раствора этилендиамином выдерживали при 37°C. Через определенные промежутки времени отбирали пробы (50 мкл) и анализировали на колонке с ионообменной смолой Полисил СА в градиенте концентрации  $KH_2PO_4$  в 20%  $CH_3CN$  при скорости элюции 2 мл/мин при комнатной температуре (рис. 1). Время хроматографии 12–15 мин. Долю продуктов алкилирования вычисляли из площадей треугольников соответствующих пиков.

Авторы выражают глубокую благодарность В.В. Кандауровой и группе ЯМР-спектроскопии НИОХ СО РАН за помощь при регистрации ЯМР-спектров.

Работа финансировалась в рамках ГНТП по теме “Новейшие методы биоинженерии. Ген-направленные биологически активные вещества” и частично грантами МНТП “Биотехнология” (№ 3Н-124-94) и РФФИ (№ 96-04-5091).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амирханов Н.В., Зарьтова В.Ф. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 365–375.
2. Goodchild J. // Bioconj. Chem. 1990. V. 1. P. 165–187.
3. Beaucage S.L., Iyer R.P. // Tetrahedron. 1993. V. 49. P. 1925–1963.
4. Matsukura M., Zon G., Shinozuka K., Stein C.A., Mitsya H., Cohen J.S., Broder S. // Gene. 1988. V. 72. P. 343–347.
5. Uhlmann E., Peyman A. // Chem. Rev. 1990. V. 90. P. 543–584.
6. Stein C.A., Cheng Y.-C. // Science. 1993. V. 261. P. 1004–1012.
7. Iversen P.L., Mata J., Tracewell W.G., Zon G. // Anti-sense Res. Dev. 1994. V. 4. P. 43–52.
8. Eckstein F. // Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 367–402.
9. Власов В.В., Паутова Л.В., Рыкова Е.Ю., Якубов Л.А. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 1247–1251.
10. Власов В.В., Гринева Н.И., Кнорре Д.Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1969. Вып. 1. С. 104–109.
11. Зарьтова В.Ф., Пичко Н.П. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. Вып. 3. С. 3–10.
12. Беликова А.М., Вахрушева Т.Е., Власов В.В., Гринева Н.И., Кнорре Д.Г., Курбатов В.А. // Молекуляр. биология. 1969. Т. 3. С. 210–219.
13. Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тигеева Н.Г., Чимитова Т.А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 210–214.
14. Кумарев В.П., Баранова Л.В., Богачев В.С., Лебедев А.В., Обухова Л.В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 1348–1358.
15. Беликова А.М., Вахрушева Т.Е., Власов В.В., Гринева Н.И., Зарьтова В.Ф., Кнорре Д.Г., Теплова Н.М. // Молекуляр. биология. 1970. Т. 4. С. 30–36.
16. Власов В.В., Кнорре Д.Г. // Молекуляр. биология. 1974. Т. 8. С. 234–243.

## Reactive Derivatives of Phosphorothioate Oligonucleotide Analogues. II. Properties of Phosphorothioate Oligodeoxyribonucleotide Derivatives Containing an Aromatic Analogue of Nitrogen Lost

N. V. Amirkhanov and V. F. Zarytova

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

**Abstract**—The alkylating properties of the derivatives of phosphorothioate oligonucleotide analogues containing the alkylating 3'-[N-methyl-4-(N'-methyl-N'-2-chloroethylamino)benzyl]phosphamide group were studied using the alkylating 3'-phosphamide derivative of trithymidine phosphorothioate TpsTpsTpN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>RCl. It was shown by ion-exchange chromatography and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy that reagents of this type are able to alkylate, depending on the conditions, both their own internucleotide phosphorothioate residues and nucleophiles in the medium. In the absence of external nucleophiles in aqueous media, TpsTpsTpN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>RCl forms predominantly the products of intramolecular alkylation of ps-groups rather than the products of hydrolysis of the RCl-group. In the presence of a nucleophile (1 M aqueous ethylenediamine), the reagent alkylates mainly the aliphatic amino groups of the nucleophile. If the ethylenediamine concentration is reduced to 0.1 M, both processes take place, whereby the rate of reaction with EDA is twice as high as that of intramolecular alkylation. The rate constant of the limiting stage of alkylation (ionization of the C–Cl bond), *k*<sub>0</sub>, does not depend on the presence of the competitive nucleophile (ethylenediamine) and is 3.95 × 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> at 37°C.

*Key words:* phosphorothioate analogues, oligonucleotides, alkylating derivatives, intramolecular alkylation