

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1996
УДК 577.152.1

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ФРАГМЕНТ ИНСУЛИНА С ИНСУЛИНОПОДОБНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

В.Н.ПРОЗОРОВСКИЙ, Е.М. МАКСИМОВА А.Е. АЛЕКСЕЕВА,
О.Г. ГРЕБЕНЩИКОВА, О.Ю. АБАКУМОВА, Н.Г. КУЦЕНКО, Т.А.ЦВЕТКОВА,
А.И. АРЧАКОВ.

Институт биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул. 10, факс: (095) 2450857

Синтезирован фрагмент инсулина, представляющий собой С-концевой функционально важный район молекулы и непосредственно ответственный за связывание инсулина с рецептором. Фрагмент состоит из двух пептидов: дипептида (А-цепь, аминокислотные остатки 20-21) и октапептида (В-цепь, 19-26), соединенных между собой дисульфидной связью (А-цепь, Цис 20, В-цепь, Цис 19). Проведено тестирование биологической активности синтезированного фрагмента в сравнении с инсулином по влиянию на гликогенез, по способности стимулировать поглощение глюкозы культивируемыми клетками L-929, по влиянию на синтез ДНК.

Обнаружено, что синтезированный фрагмент обладает способностью стимулировать поглощение глюкозы культивируемыми клетками в концентрациях 0.01-1 мкМ, увеличивать включение глюкозы в гликоген адипоцитов, а также стимулировать синтез ДНК в концентрациях 0.5 и 1 мкМ.

Проведенное сравнительное с инсулином тестирование биологической активности синтетического фрагмента позволяет заключить, что он обладает инсулиноподобными свойствами.

Ключевые слова: инсулин, синтетические пептиды, биологическая активность.

Введение. Гормон инсулин является одним из примеров наиболее глубокого, полного и последовательного исследования белковой молекулы во всех отношениях: физико-химических свойств, структуры, химического и биологического синтеза, функциональной роли отдельных аминокислотных остатков и т.д. В мировой литературе накоплен богатейший материал, посвященный обобщению и практическому использованию имеющихся сведений об этом белке. Разработаны различные способы получения широкого спектра препаратов быстрого и пролонгированного действия на основе целой молекулы инсулина, применяемые при терапии инсулинозависимого диабета. Однако, один из важнейших фундаментальных вопросов — возможность замены целого гормона инсулина на небольшие пептиды с инсулиноподобной биологической активностью — все еще недостаточно изучен.

К настоящему времени, непосредственно для инсулина установлены остатки аминокислот, ответственные за связывание с рецептором и в целом формирующие в структуре инсулина центр взаимодействия. Показано, что район структуры инсулина для взаимодействия с рецептором и район, принимающий участие в формировании димера инсулина, перекрываются между собой. Установлено, что в димере инсулина эти районы образуют антипараллельную β -структуру. Высказаны предположения о том, что, вероятно, механизм узнавания в системе инсулин-рецептор также связан с формированием вторичной β -структуры между соответствующими районам белкового гормона и его рецептора, по аналогии с системой взаимодействия молекул инсулина при образовании димера.

Согласно современному уровню знаний для проявления биологической активности аналоги инсулина должны обладать определенными структурными и химическими свойствами. Так наличие остатка аргинина В22 необходимо для проявления активности инсулина [1]. С другой стороны, укороченные пептидные аналоги В-цепи инсулина, содержащие аргинин В22, но не содержащие ароматических аминокислот В24-В26 после комбинации с природной А-цепью инсулина проявляют слабую активность, менее 4% [1-5]. Известны дезоктапептид В-цепи инсулина и дезаспарагин А-цепи инсулина, обладающие утраченной в значительной степени биологической активностью и являющиеся фрагментами протеолитической деградации молекулы инсулина [6]. Установлено, что С-концевой участок А-цепи инсулина А20 - 21 (Цис-Асн) также чрез-

вычайно важен для проявления инсулином биологической активности. Так дезаспаргин инсулин обладает слабой активностью, менее 4% активности нативного гормона [7,8].

Выявлен ряд пептидных фрагментов инсулина, которые проявляют остаточную биологическую активность *in vivo* и *in vitro*. Так синтетические пептидные фрагменты Арг-Гли-Фен-НН и Арг-Гли-Фен-Фен-НН проявляют слабую биологическую активность *in vivo* и *in vitro* по сравнению с активностью инсулина [9]. Известен также малоактивный пентапептидный фрагмент (В22-26) Арг-Гли-Фен-Фен-Тир В-цепи инсулина, содержащий активный центр молекулы. Этот гидрофобный участок на С-конце В-цепи молекулы инсулина является важнейшей областью, ответственной за связывание с рецептором, биологическую активность, образование димеров [3].

Анализ данных об аминокислотных остатках, непосредственно участвующих и ответственных за связывание с рецептором и проявление биологической активности инсулина приводит к выводу, что район связывания с рецептором сформирован на С-концевых участках В- и А-цепи инсулина [10].

Цель настоящей работы заключалась в поиске и создании биологически активного пептидного аналога инсулина на основе обобщенных данных в этой области. Для решения поставленной задачи нами был синтезирован новый пептидный фрагмент, непосредственно ответственный за связывание гормона с рецептором и обладающий сравнимой с нативным гормоном биологической активностью.

Методика. Для получения фрагмента инсулина (ФИ) предварительно проводили синтез его составляющих: дипептида (Цис-Асн) и октапептида (Цис-Гли-Глу-Арг-Гли-Фен-Фен-Тир). Синтез проводили на пептидном синтезаторе Applied Biosystems 431A дициклогексилкарбодиимидным методом в присутствии 1-гидроксibenзотриазола с использованием 9-флуоренилметоксикарбонил-(Fmoc)-защищенных L-аминокислот. В качестве твердой фазы для синтеза октапептида использовали смолу *p*-benzytoxybenzyl alcohol resin (Novabiohem). Синтез дипептида проводили с использованием смолы Fmoc-Asn-(Mbh) resin (Novabiohem), где Mbh — 4,4-диметилоксибензгидрил. Снятие пептидов со смолы, так же, как и снятие всех боковых защитных групп, кроме ацетамидометил-(Асм) защитной группы цистеина, осуществляли при инкубации в течение 4 часов в атмосфере азота в смеси: 90% трифторуксусная кислота (ТФУ), 5% тионизол, 3% этандитиол, 2% анизол. Раствор отфильтровывали и высаживали в холодном диэтиловом эфире. Выпавшие кристаллы выделяли, сушили под вакуумом над P205.

Полученные пептиды очищали от избытка реагентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с помощью градиентного элюирования ацетонитрилом в 0.1%-ной ТФУ на колонке диасорб 130 С-16\Т, фракции с пептидным материалом лиофилизировали.

Фрагмент инсулина получали с помощью образования дисульфидной связи между дипептидом и октапептидом по ранее описанному методу [11]. Дипептид и октапептид (по 10 мМ), содержащие Асм-защитные группы цистеина, растворяли в 350 мл смеси метанол: вода (1:6), при комнатной температуре. К полученному раствору постепенно, в течение 1 часа при постоянном перемешивании добавляли 50 мл 1 мМ-ного раствора иода в метаноле. Раствор охлаждали до 0°C и добавляли 1М раствор тиосульфата натрия до исчезновения желтого окрашивания, затем добавляли избыток тиосульфата натрия (50% по отношению к концентрации иода). Метанол отгоняли на ротаторном испарителе, а водную фракцию с пептидным материалом лиофилизировали.

Полученный лиофилизат, содержащий смесь пептидов и пептидный фрагмент (фрагмент инсулина из дипептида и октапептида соединенных дисульфидной связью), растворяли в 30%-ной уксусной кислоте и после удаления нерастворимого осадка центрифугированием (4000 об./мин), разделяли методом ВЭЖХ на колонке Ultropack ODS-120 с помощью градиентного элюирования ацетонитрилом в 0.1%-ной ТФУ на протяжении 60 мин., при скорости элюции 1мл/мин. Детектирование пептидного материала в элюате осуществляли при 254 нМ. Фракции с пептидным материалом собирали, высушивали, и сохраняли при 4°C.

Анализ аминокислотного состава синтезированных пептидов и пептидного фрагмента определяли в автоматическом анализаторе LKB-3201. Анализируемые пробы предварительно гидролизовали в вакуумированной ампуле 6 н. НСL с добавлением 0.05%-ного β-меркаптоэтанола при 105°C, в течение 24 часов.

Для определения инсулиноподобной активности ФИ использовали адипоциты крыс и клетки L-929 (фибробластоподобные клетки фибросаркомы мышей).

Анализировали влияние препаратов на поглощение глюкозы, на синтез гликогена и ДНК. В качестве контроля сравнения взяты коммерческие препараты инсулина (Россия, активность 40 ед\мл, 0,13 ед=0,83 нмоль) и тетрапептида (ТП) Арг-Гли-Фен-Фен (Novabiochem, В 22-25).

Для проведения исследований адипоциты получали из эпидидимальной жировой ткани крыс по методу [12]. Кусочки эпидидимальной жировой ткани инкубировали в течение 30 мин. в бикарбонатном буферном растворе Кребс-Рингера, рН 7,4, содержащем 0,3% коллагеназы IV типа (Sigma), 4% бычьего сывороточного альбумина (БСА, V фракция, "Sigma"). Полученные адипоциты промывали в том же буферном растворе, содержащем 1% БСА. Клетки подсчитывали в камере Горяева.

Клетки L-929 культивировали в атмосфере 95% воздуха, 5% CO₂ при 37°C в среде DMEM, содержащей 10% бычьей сыворотки, пенициллин и стрептомицин (оба 100 мкг\мл) в 24-х луночных плашках фирмы "Costar" до состояния плотного моно-слоя (2·10⁵ клеток/лунку). Расчет количества клеток проводили, окрашивая их генциан-виолетом по методу [17].

Влияние пептидов на биосинтез гликогена в адипоцитах крыс определяли по методу [13]. Адипоциты (10⁵-10⁶ клеток/пробу) инкубировали при 37°C в бикарбонатном буферном растворе Кребс-Рингера, рН 7,4, содержащем 1% БСА, 0,5 мМ С-14 глюкозы (0,5 мккюри\пробу, "Изотоп", Россия, удельная активность 1500 Гбк/моль) и анализируемый материал (инсулин, пептиды). Контроль не содержал анализируемый материал. Через 10 и 20 мин. инкубации реакцию останавливали 10 н КОН. Щелочной гидролизат наносили на диски из фильтровальной бумаги Ватман 3М и промывали 60% этанолом для удаления свободной С-14-глюкозы. Радиоактивность гликогена измеряли, помещая высушенные диски в толуоловый сцинтиллятор в счетчике 1219 RACKBETA, LKB.

Поглощение глюкозы культивируемыми клетками L-929 проводили по методу [2]. Для этого меняли ростовую среду (DMEM с добавками) на глюкозодефицитную среду DPBS, содержащую фосфатный буфер рН 7,4, аминокислоты, витамины, БСА, антибиотики. Через 24 часа в опытные лунки вносили анализируемый материал в концентрациях 0,01 мкМ, 0,1 мкМ и 1,0 мкМ, а в контрольные - DPBS и инкубировали в течение 3-х часов при 37°C. Затем добавляли 5мМ С-14-глюкозы (0,5 мккюри\мл) и инкубировали 10 мин. После инкубации среду удаляли, клетки трижды промывали холодным PBS, лизировали 0,3 н КОН при 37° С в течение ночи и определяли радиоактивность лизата клеток после его нейтрализации 1 н HClO₄, используя жидкость Брея.

Биосинтез ДНК в культивируемых клетках L-929 определяли по методу (14). Для этого клетки, растущие в 24-х луночных плашках и достигшие состояния конfluence, синхронизовали в среде DMEM, содержащей 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотики, в течение 48 часов со сменой среды через 24 часа. После этого к клеткам добавляли исследуемый материал в концентрациях 0,5 мкМ, 1,0 мкМ и 0,05 мкМ, 0,1 мкМ для ФИ и инсулина, соответственно. Через 21 час добавляли С-14-тимидин (1 мккюри\мл, "Изотоп", Россия, удельная активность 1850 Гбк/моль) и продолжали инкубировать при 37° С в течение 4 часов. После удаления среды клетки промывали холодным 0,1 М фосфатным буфером рН 7,4 (PBS), фиксировали в течение ночи при 0°C холодной смесью этиловый спирт-ледяная уксусная кислота (9:1), лизировали 0,3 н. КОН как описано выше и определяли радиоактивность лизата клеток после его нейтрализации 1 н HClO₄.

Результаты выражены в % к контролю (8000-10000 cpm/10⁶ клеток) и являются средними значениями, полученными на 4-5 лунках в двух аналогичных экспериментах. Статистическая достоверность результатов была рассчитана с использованием t-теста по Стьюденту.

Результаты и обсуждение. Примененный нами метод компьютерного моделирования пространственной структуры молекулы инсулина (Onix, ИБМХ РАМН) анализ данных литературы о локализации аминокислотных остатков, ответственных за связывание с рецептором, показали, что все они пространственно сближены между собой и, вероятно, формируют область активного центра инсулина, ответственную за связывание с рецептором и проявление биологической активности. Эта область непосредственно сформирована аминокислотными остатками В-цепи [19-26] и А-цепи (20-21).

Сближенность в пространстве участков A20-21 и B19-26 обусловлена наличием дисульфидной связи между цистеинами в позициях B19 и A20.

Методом твердофазного синтеза были синтезированы пептиды, составляющие фрагмент инсулина: октапептид (ОП), представляющий участок В-цепи (19-26) и дипептид (ДП)-С-концевой участок А-цепи (20-21). Оба пептида содержат в своем составе по одному остатку цистеина, Sn-группа которого защищена ацетамидометильной группировкой (Асм). Асм-группа относительно стабильна к трифторуксусной кислоте при снятии пептида со смолы, поэтому снятие защитной группировки с цистеина обычно проводят обработкой ионами ртути или иода [11,15,16]. При снятии защиты иодом происходит одновременное окисление Sn-групп цистеина и образование дисульфидной связи, что и было использовано в настоящей работе с целью получения синтетического фрагмента инсулина (ФИ), состоящего из ДП и ОП соединенных дисульфидной связью.

Полученный лиофилизат, содержащий смесь пептидов и пептидный фрагмент (фрагмент инсулина из дипептида и октапептида соединенных дисульфидной связью), растворяли в 30%-ной уксусной кислоте и после удаления нерастворимого осадка центрифугированием (4000 об./мин), разделяли методом ВЭЖХ на колонке Ultropack ODS-120 с помощью градиентного элюирования ацетонитрилом в 0.1%-ной ТФУ на протяжении 60 мин., при скорости элюции 1 мл/мин. Детектирование пептидного материала в элюате осуществляли при 254 нМ. Фракции с пептидным материалом собирали, высушивали, и сохраняли при 4°C.

Типичная хроматограмма разделения пептидов и ФИ методом ВЭЖХ представлена на рис.1

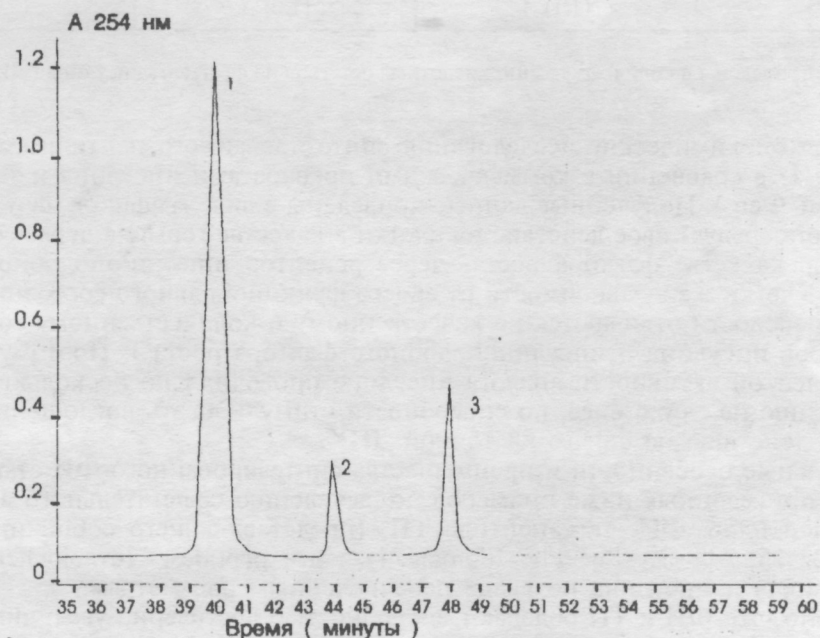


Рис. 1 Очистка синтетического фрагмента инсулина методом ВЭЖХ

1- фрагмент инсулина 2- октапептид 3- димер, образованный октапептидами.

По данным анализа аминокислотного состава фракция 1 содержит пептидный материал, соответствующий ФИ, фракция 2 -ОП. Во фракции 3 значительно снижено содержание аспарагиновой кислоты по сравнению с фракцией 1, хотя содержание остальных аминокислотных остатков соответствует ОП. Вероятно, данная фракция соответствует более высокомолекулярному пептидному фрагменту, полученному за счет образования дисульфидной связи между ОП (таблица 1).

Фракция 1 (время удержания 40 мин.) содержит 57% пептидного материала, фракция 2 (время удержания 44 мин.) - 20%, а фракция 3 (время удержания 48 мин.) - 23%. Собранный материал по фракциям высушивали под вакуумом и сохраняли при 4°C.

Материал фракции 1 при рехроматографии методом ВЭЖХ в тех же условиях дает единственный пик с поглощением в ультрафиолете при 254 нм (за счет остатка тирозина).

Результаты анализа аминокислотного состава фракции 1 (состав соответствует заданной для синтеза структуре), присутствие единственного пептидного пика при использовании метода ВЭЖХ с соответствующими спектральными данными, после окончательной очистки (рехроматография) свидетельствует о соответствии синтезированного материала фрагменту инсулина, состоящему из двух пептидов (ДП, Цис-Асп и ОП, Цис-Гли-Глу-Арг-Гли-Фен-Фен-Тир), соединенных между собой дисульфидной связью. Выход целевого пептидного фрагмента (ФИ) в расчете на исходный ОП составляет около 20%.

Таблица 1

Данные анализа аминокислотного состава пептидных фракций, полученных при разделении методом ВЭЖХ*

Аминокислоты	Фракция 1	Фракция 2	Фракция 3
Асп	(1.0) 1	(0.2) 0	(0.4) 0
Глу	(1.3) 1	(1.2) 1	(1.4) 1
Гли	(2.2) 2	(2.1) 2	(2.1) 2
Тир	(0.8) 1	(0.8) 1	(0.7) 1
Фен	(1.9) 2	(1.9) 2	(2.1) 2
Арг	(1.1) 1	(1.0) 1	(0.9) 1

*Результаты приведены в количестве аминокислотных остатков на фрагмент инсулина (ФИ). Цистеин не определяли.

Проведены биохимические исследования синтезированного пептидного фрагмента инсулина (ФИ) в сравнении с коммерческими препаратами инсулина и тетрапептида (Арг-Гли-Фен-Фен). Полученные данные приведены в виде графиков на рисунках 2-4.

Инсулин опосредует свое действие на клетки в качестве гормона через собственный рецептор, а в качестве фактора роста - через рецептор инсулиноподобного фактора роста I. [18] Клетки же в зависимости от своего функционального состояния, фенотипа и степени зрелости отличаются по качественному и количественному составу наборов рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста I. Поэтому тестирование биологической активности аналога инсулина проводили по нескольким параметрам: по влиянию на гликогенез, по способности стимулировать поглощение клетками глюкозы, по действию на синтез клеточной ДНК.

Отличительные особенности и преимущества синтезированного ФИ становятся понятными из приведенных ниже примеров по выявлению сравнительного влияния инсулиновых пептидов: ФИ, тетрапептида ТП, (представляющего собой инсулиновый фрагмент B22-25, Arg-Gly-Phe-Phe Biologically active peptides, Novabiochem, коммерческий препарат) и инсулина по выше перечисленным параметрам.

Обнаружено, что ФИ и ТП обладают способностью достоверно увеличивать (хотя и в меньшей степени, чем инсулин) скорость включения С-14 глюкозы в гликоген адипоцитов крыс. Количество включившейся за 20 мин. С-14 глюкозы для инсулина, ФИ и ТП составляет соответственно 185, 155, 125% по отношению к контролю (Рис.2).

Проводили также сравнительное исследование влияния инсулина и инсулиновых пептидов ФИ и ТП на поглощение С-14 глюкозы культивируемыми клетками L-929 (фибробластоподобные клетки фибросаркомы мышей). Показано, что оба инсулиновых пептида достоверно стимулируют поглощение С-14 глюкозы, причем ФИ значительно активнее, чем ТП. В концентрации 0.1 мкМ ТП не влияет на поглощение глюкозы, а ФИ стимулирует поглощение на 180% по сравнению с контролем. В концентрации 1 мкМ ТП стимулирует поглощение С-14 глюкозы примерно на 150%, а ФИ на 305%. (Рис.3).

При исследовании влияния ФИ на синтез ДНК в клетках L-929 обнаружено, что при добавлении к клеткам ФИ в концентрации 0.5 и 1 мкМ синтез ДНК возрастает до

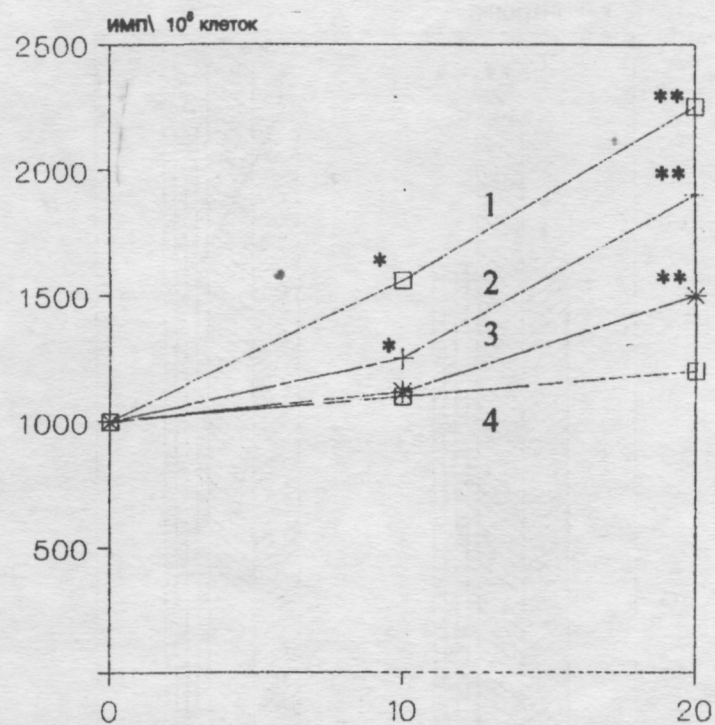


Рис. 2. Влияние инсулина и пептидов на синтез гликогена в адипоцитах крыс.

1- инсулин 2- ФИ 3- ТП 4- контроль.

Инсулин и пептиды - в концентрации 1мкМ. * - $p < 0,05$ ** - $p < 0,01$

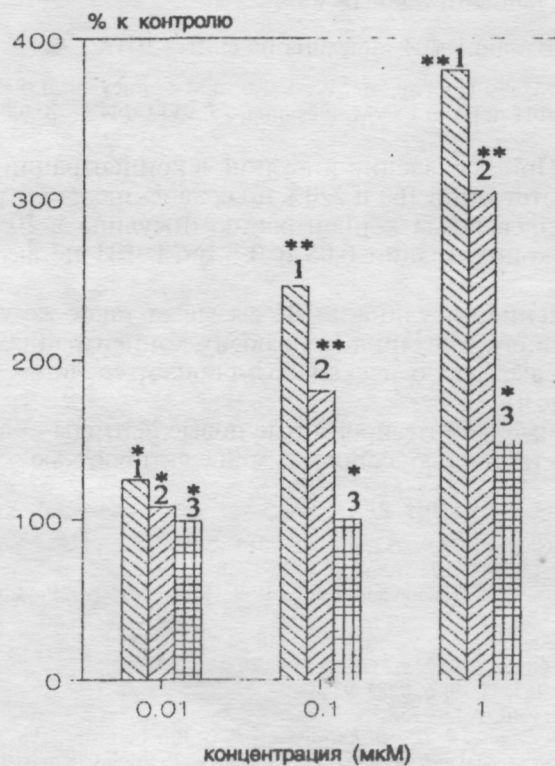


Рис. 3. Влияние инсулина и инсулиновых пептидов ФИ и ТП на поглощение С-14 глюкозы клетками L-929.

1- инсулин 2- ФИ 3- ТП * - $p < 0,01$ ** - $p < 0,001$

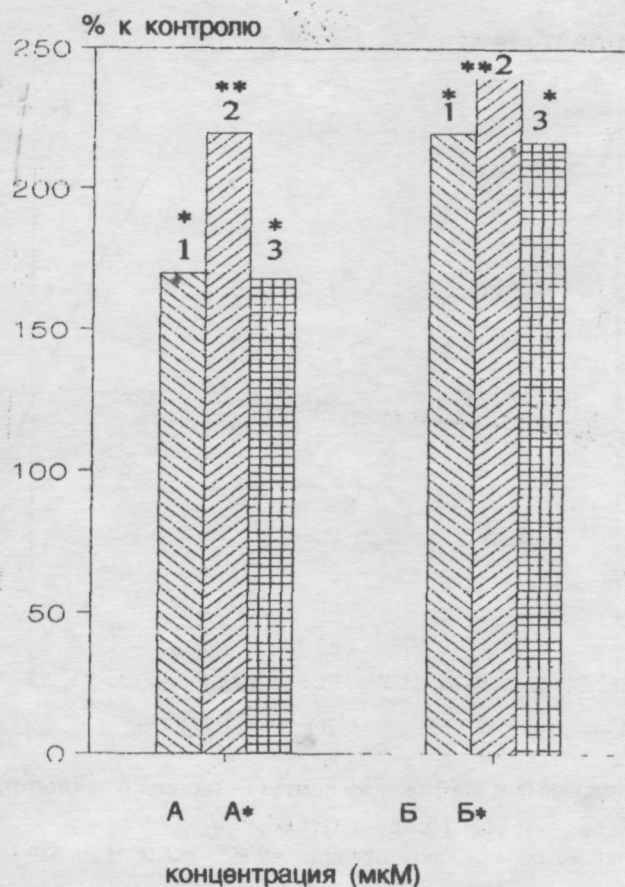


Рис. 4. Влияние ФИ инсулина на синтез ДНК

1- инсулин в А-0,05мкМ; в Б-0,1мкМ 2- ФИ в А-0,5мкМ; в Б-1,0 мкМ 3- инсулин и ФИ совместно: в А* - 0,05мкМ инсулина; 0,5 мкМ ФИ; в Б* - 0,1 мкМ инсулина; 1,0 мкМ ФИ * - $p < 0,05$ ** - $p < 0,01$

220 и 245 % соответственно. При добавлении инсулина в концентрации 0.05 и 0.1 мкМ синтез ДНК составляет соответственно 160 и 220% по сравнению с контролем. В эксперименте концентрация ФИ превышала концентрацию инсулина в 10 раз, поскольку нами было выяснено, что в концентрации 0.05 и 0.1 мкМ ФИ не активен в синтезе ДНК в этих клетках.

Однако совместное добавление инсулина и ФИ вызывает такое же усиление синтеза ДНК, что и добавление одного инсулина (при обеих концентрациях), что, по всей видимости, косвенно свидетельствует о несколько меньшем сродстве ФИ к рецептору, чем самого инсулина (рис.4).

Таким образом предложенные и синтезированные новые пептиды — аналоги инсулина обладают биологической активностью, сопоставимой с активностью самого инсулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weitzel G. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 1971, v.352, p. 1005-1013
2. Weitzel G. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1971, v.352, p. 1735-1738
3. Weitzel G., Eisele Kari, Guglielmi Hans, Stock Wieland and Remvel Rolf. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 1976, v. 357, p. 187-200
4. Young J.D., Carpenter F.H., J. Biol. Chem., 1961, V.236, p.743-748.
5. Carpenter F.H., Baum W.E., J. Biol. Chem., 1962, v.237, p.409-412.
6. Kikuchi K. J. Biol. Chem., 1980, vol.255, N 19, p. 9281-9288
7. Carpenter F.H., Amer. J. Med., 1966, v.40, p.750-758
8. Chu Y. C. Wang R. Y., Burke G. T., Chanley J. D. and Katsoyannis P. G. Biochemistry, 1987, v.26, p.6966-6971.
9. Weitzel G., Eisele Kari, Shuiz Volker and Wieland Stock. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1973, v.354, p.321-330.
10. Drejer K., Diabetes/Metabolism Reviews, 1992, vol.8, p-259-286).
11. Kambler B., Helv. Chim. Acta, 1971, v.54, p. 927-930
12. Rodbel M., J. Biol. Chem., 1964, v.239, P.375-380

13. Thomas Y.A., Schlender K.K., Lamer J. A. *Anal. Biochem.* 1968, v.25, p.486-499
14. Rotella C.M. *et al*, *Horm. Metab. Res.*, 1981, v.13, p. 565-569
15. Veber O.F., Milkovski J. D., Varga S., Denkwalter R. G. and Hirschmann R. J. *Am. Chem. Soc.*, 1972, v. 94, p. 5456-5461.
16. Albericio F., Hammer R. P. *Pep. Protein Res.*, 1991, v.37, p. 402
17. Kueng W., Sieber E., Eppenberger U. *Anal. Biochem.*, 1982, v. 182, p. 16-19.
18. Kern P., Sloboda M., Eckel R., Van Wyk J. *Diabetes.*, 1989, v. 38, p. 710-717.

THE SYNTHETIC INSULIN FRAGMENT WITH INSULIN-LIKE BIOLOGICAL ACTIVITY

V.N.Prozorovski, E.M.Maximova, A.E.Alexeeva, O.G.Grebenshchikova, O.Yu.Abakumova, N.G.Kutsenko, T.A.Tsvetkova,
A.I.Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Moscow. Russia

We have used computer modeling of insulin 3-D structure and experimental data about action of site point mutation on insulin activity to design functionally important domain with signaling activity and synthesized peptide that might be sufficient for the binding to insulin receptor.

The designed and synthesized peptide consist of ten residues and may be obtained in two forms: oxidized and reduced (with or without disulfide bond).

The synthesized decapeptide peptide represents functionally important site for binding to the insulin receptor. Amino acid residues at position 1-8 correlate with B-chain of insulin at position (B19-B26). Residues at position 9,10 correlate with Achain at position A-10-A21.

This peptide was tested with cell culture L-929 (glucose uptake) in comparison with bioactive commercial peptide (R-G-FF) and insulin. It was shown that synthesized peptide exhibit biological activity at molar concentration 0,01-1 mkM. Our results successfully demonstrate the synthetic insulin fragment have insulin-like biological activity.

Key words: insulin, synthetic peptides, biological activity.