

Синтез и исследование влияния новых аналогов эксенатида на уровень гликемии и функции почек у крыс

К.м.н. А.Е. БОГОЛЕПОВА¹, к.м.н. А.В. КУТИНА¹, А.С. МАРИНА¹, С.К. НИКОЛЬСКАЯ², к.б.н. Е.И. ШАХМАТОВА¹, д.х.н. М.И. ТИТОВ², акад. Ю.В. НАТОЧИН¹

Synthesis of new exenatide analogs and investigation of their influence on glycemia and renal function in rats

A.E. BOGOLEPOVA, A.V. KUTINA, A.S. MARINA, S.K. NIKOL'SKAYA, E.I. SHAKHMATOVA, M.I. TITOV, YU.V. NATOCHIN

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский государственный университет

Синтезированы новые аналоги эксенатида с аминокислотными заменами в положениях 14, 35, 39. Установлена их большая, чем у эксенатида, стабильность в водных растворах. В экспериментах на крысах выявлено их гипогликемическое действие в условиях нагрузки глюкозой. Впервые показано, что эксенатид и его аналоги увеличивают выведение почкой ионов натрия, магния и осмотически свободной воды и слабо влияют на выделение ионов калия. В экспериментах на изолированной коже и мочевых пузырях самцов лягушки прямого ингибирующего влияния эксенатида на транспорт натрия и воды не обнаружено. Высказано предположение о том, что эксенатид и его аналоги способствуют синтезу физиологически активных веществ, влияющих на функции почек.

Ключевые слова: эксенатид, аналоги эксенатида, синтез, гипогликемическое действие, почка, действие новых синтезированных аналогов эксенатида.

New analogs of exenatide with amino acid substitutions at 14, 35, and 39 have been synthesized. They were shown to be more stable than original exenatide in aqueous solutions. *In vivo* testing on rat models of glucose loading showed that exenatide and its novel analogs possess hypoglycemic activity and stimulate renal excretion of sodium and magnesium ions and osmotically free water but have virtually no effect on the elimination of potassium ions. Experiments with isolated skin and urinary bladder preparations from male frogs showed that exenatide and its analogs promote biosynthesis of physiologically active compounds modulating renal functions.

Key words: exenatide, exenatide analogs, synthesis, hypoglycemic activity, kidney, effects of newly synthesized exenatide analogs.

В экспериментах на млекопитающих [1] и клинических исследованиях [2] показана роль глюкагоноподобного пептида 1 (ГПП-1) в нормализации уровня глюкозы в крови. Установлено, что этот пептид и его миметик (эксенатид) способствуют секреции инсулина и достижению нормогликемии [3]. Фармакологические средства (Баета) [4], созданные на их основе, оказались эффективны в терапии сахарного диабета 2-го типа [5, 6]. Введение ГПП-1 снижает потребление пищи и воды [7], усиливает выведение натрия почкой [8]. В литературе нет детальных исследований влияния эксенатида на различные функции почек, хотя это представляет очевидный интерес в связи с таким осложнением сахарного диабета, как нефропатия и рядом побочных эффектов Баеты. Важно было установить, в какой степени влияние эксенатида на функцию почки зависит от прямого его воздействия на клетки эпителия, и в какой — обусловлено действием иных веществ. Учитывая физиологическое и клиническое значение эксенатида, представлялось интересным синтезировать его новые аналоги и выяснить влия-

ние эксенатида и его аналогов на гликемию и функциональное состояние почек. Это и являлось задачей нашей работы.

Материал и методы

Исследование выполнено на 4–6-месячных самках крыс Вистар массой 150–220 г и на изолированной коже и мочевых пузырях самцов лягушки *Rana temporaria* L. (масса тела 20–30 г) в период с января по март. Крыс содержали в виварии при стандартных условиях. Утром в день, предшествующий эксперименту, крысы получали корм, затем до опыта им не давали пищи при свободном доступе к воде. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ИЭФБ РАН.

Влияние аналогов эксенатида на концентрацию глюкозы в плазме крови. Эксперименты проведены на наркотизированных крысах, что исключало влияние стресса (взятие проб крови) на уровень глюкозы. Наркоз осуществляли внутривенно введением 0,6 мл на 100 г массы тела смеси 0,75% нембутала и

0,37% хлоралозы. Через 30 мин брали каплю капиллярной крови из хвоста для определения концентрации глюкозы с помощью тест-полосок на глюкометре Ассу-Chek Go («Roche», Швейцария).

Эксенатид и его аналоги растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия до концентрации 0,25–1,2 нмоль/мл и инъектировали в/м в объеме 0,1 мл на 100 г массы тела. Животным контрольной группы вводили тот же объем 0,9% раствора хлорида натрия. Через 15 мин после введения препаратов проводили тест на толерантность к глюкозе [9]: внутривенно вводили 0,3 мл на 100 г массы тела 50% раствора глюкозы, контрольным животным — внутривенно 0,3 мл на 100 г массы тела 0,9% раствора хлорида натрия. Через 15, 30 и 60 мин после введения глюкозы у крыс брали пробы крови для определения концентрации глюкозы.

Влияние эксенатида и его аналогов на функции почек. Опыты выполнены на ненаркотизированных крысах. Эксенатид и его аналоги вводили внутримышечно в объеме 0,1 мл на 100 г массы тела в дозах 0,005–0,5 нмоль на 100 г массы тела, крысы контрольной группы получали 0,9% раствор хлорида натрия. Животных помещали в клетки-пеналы с проволочным дном, откуда моча стекала по воронке в пробирку. Измеряли спонтанный диурез. Кровь брали по окончании эксперимента из сонной артерии под эфирным наркозом.

В пробах сыворотки и мочи определяли осмоляльность на микроосмометре 3300 («Advanced Instruments, Inc.», США), концентрацию Na^+ и K^+ — на пламенном фотометре Corning-410 (Великобритания) в воздушно-пропановом пламени, Mg^{2+} — в воздушно-ацетиленовом пламени на атомном абсорбционном спектрофотометре Hitachi-508 (Япония), концентрацию креатинина — кинетическим методом по реакции Яффе на автоматическом биохимическом анализаторе EOS Bravo W (Италия) с применением реактивов фирмы «Randox». При фотометрии и спектрофотометрии использованы стандарты фирмы «Aldrich Chemical Company Inc.» (США).

Исследование действия эксенатида на транспорт натрия в коже лягушки. Действие эксенатида на транспорт натрия в коже лягушки исследовали путем измерения короткозамкнутого тока на установке EVC-4000 («World Precision Instruments», США). С обеих сторон изолированной кожи брюшка лягушки находился аэрируемый раствор, соответствующий физико-химическим характеристикам плазмы крови лягушек в данное время года. Физиологический раствор готовили с добавлением на 1 кг воды 6,5 г NaCl , 0,25 г KCl , 0,2 г NaHCO_3 , 0,9 г глюкозы, 0,19 мл 10% раствора CaCl_2 ; осмоляльность 225 мОсм/кг H_2O pH 7,6. Опыты проводили при 22–24 °С. Эксенатид и аргинин-вазопрессин («Sigma Chemical Co», США) разводили в этом же физиологическом рас-

творе без добавления кальция до концентрации 1 и 0,1 мкмоль/л соответственно. Препараты добавляли к внутренней стороне кожи лягушки.

Исследование действия эксенатида на транспорт воды в мочевом пузыре лягушки. Со стороны серозной оболочки мочевых пузырей находился аэрируемый физиологический раствор (225 мОсм/кг H_2O), со стороны слизистой оболочки — гипотонический раствор (25 мОсм/кг H_2O). Осмотическую проницаемость рассчитывали по потоку воды по осмотическому градиенту в мкл/мин на 1 cm^2 площади поверхности мочевого пузыря [10]. Одна из долей мочевого пузыря служила контролем; к ней со стороны серозной оболочки добавляли аргинин-вазопрессин 10^{-8} М («Sigma Chemical Co», США); к другой доле перед добавлением аргинин-вазопрессина в раствор вносили 10^{-9} М эксенатида.

Синтез аналогов эксенатида. Аналоги эксенатида с заменой метионина в 14-м положении на норлейцин, аланина в положении 35 на D-аланин и серина в 39-м положении на серинол были получены с использованием как конвергентного твердофазного метода, так и классического синтеза в растворе:

Эксенатид: HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnMetGluGluGluAlaVal ArgLeu PheIleGluTrpLeuLysAsnGlyGlyProSerSerGlyAlaProProProSer-NH₂.

Аналог I (14-норлейцин,39-серинол-эксенатид): HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnNleGluGluGluAlaValArgLeuPheIleGluTrpLeuLysAsnGlyGlyProSerSerGlyAlaProProProSer-ol.

Аналог II (14-норлейцин,35-D-аланин,39-серинол-эксенатид): HisGlyGluGlyThr PheThrSerAspLeuSerLysGlnNleGluGluGluAlaValArgLeuPheIleGluTrpLeuLysAsnGlyGlyProSerSerGlyD-AlaProProProSer-ol.

39-Аминокислотная последовательность была разбита на фрагменты с учетом специфики аминокислотных остатков. Фрагменты синтезировали твердофазным методом с использованием Fmoc-/tBu-стратегии на 2-хлортритилхлоридной смоле; восстановление карбоксильной группы фрагмента 35–39 борогидридом натрия проводили в растворе. Финальная конденсация фрагментов 1–34 и 35–39 проходила в растворе, степень протекания реакции контролировали с помощью обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полное деблокирование защитных групп пептидной цепи проводили в смеси TFA:TIS:H₂O в соотношении 95:2,5:2,5 в течение 2 ч при комнатной температуре. Анализ полученных продуктов методом обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии в системе ацетонитрил—вода (0,1% TFA) при 42 °С показал 75–80% содержание целевых пептидов в смеси. После очистки с помощью обращеннофазной (C18) препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии были полу-

ченые аналоги эксенатида с чистотой 98% (I) и 97% (II). Пики молекулярных ионов в масс-спектрах MALDI-TOF соответствовали расчетным.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 6.0. Все данные представлены в виде $M \pm m$. Значимость различий показателей между группами оценивали по тесту ANOVA и критерию Ньюмена—Кейлса для множественных сравнений (при $p < 0,05$). Достоверность различий проницаемости парных мочевых пузырей оценивали по t -критерию Стьюдента для попарно связанных вариантов.

Результаты и обсуждение

Влияние аналогов эксенатида на уровень гликемии в условиях нагрузки глюкозой. Изменение функции почек при сахарном диабете вызвано рядом причин, в том числе осмотическим диурезом, связанным либо с избыточным поступлением глюкозы при гломерулярной фильтрации в просвет проксимального канальца нефрона, либо с уменьшением ее реабсорбции. В исходном состоянии у крыс концентрация глюкозы в плазме составляет $6,2 \pm 0,3$ ммоль/л. После внутрибрюшинного введения $0,3$ мл на 100 г 50% раствора глюкозы ее концентрация в плазме почти удваивалась и постепенно к концу 1-го часа возвращалась к исходному значению (табл. 1). В экспериментах с инъекцией $0,05$ нмоль на 100 г эксенатида наблюдалась более быстрая нормализация уровня глюкозы в крови (см. табл. 1). Эксенатид и аналог II в этой дозе оказывали равное гипогликемическое действие. Аналог I был менее эффективен; он препятствовал повышению концентрации глюкозы в крови после ее внутрибрюшинного введения лишь в дозе $0,12$ нмоль на 100 г (см. табл. 1).

Для сравнения стабильности синтезированных препаратов и эксенатида водные буферные растворы аналогов I и II инкубировали при 40 °C и pH 7,0 в течение 3 мес. Аликвоты растворов периодически отбирали и анализировали с помощью высокоэф-

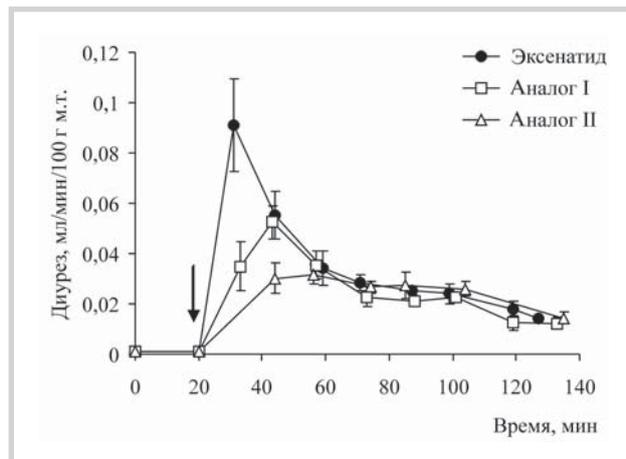


Рис. 1. Влияние эксенатида и его аналогов на мочеотделение у крыс.

Здесь и на рис. 1—3: стрелка — инъекция эксенатида или его аналогов в дозе $0,05$ нмоль/100 г.

фективной жидкостной хроматографии. За весь период исследования деградация пептидов не превышала 3%, тогда как деградация эксенатида составляла около 10% в течение 1 мес [11]. Таким образом, к достоинству новых синтезированных пептидов следует отнести их большую, чем у эксенатида, устойчивость в водных растворах при равной с эксенатидом гипогликемической активности на фоне нагрузки глюкозой.

Влияние аналогов эксенатида на функции почек. После инъекции крысам эксенатида или его аналогов в дозе $0,05$ нмоль на 100 г возрастало мочеотделение. В течение первого получаса оно достигало максимума, затем постепенно снижалось до исходного уровня (рис. 1). Сопоставление динамики влияния аналогов на мочеотделение показало, что аналог I обладает более выраженным эффектом, чем аналог II; вместе с тем оба аналога в меньшей степени повышали диурез, чем эксенатид. Одновременно с нарастанием мочеотделения после инъекции аналогов эксенатида отмечался выраженный рост

Таблица 1. Влияние эксенатида и его аналогов на концентрацию глюкозы (ммоль/л) в крови крыс в условиях нагрузки глюкозой ($M \pm m$)

Серия экспериментов	n	Время после введения глюкозы, мин			
		0	15	30	60
Контроль	5	$6,1 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,1$
Глюкоза	9	$6,2 \pm 0,2$	$11,4 \pm 0,6^+$	$10,3 \pm 0,4^+$	$5,4 \pm 0,2$
Глюкоза+эксенатид $0,025$ нмоль	6	$6,1 \pm 0,1$	$10,3 \pm 0,6^+$	$8,3 \pm 0,7^+$	$4,4 \pm 0,2$
Глюкоза+аналог I $0,025$ нмоль	5	$6,5 \pm 0,2$	$11,0 \pm 0,6^+$	$11,3 \pm 0,3^+$	$5,7 \pm 0,3$
Глюкоза+эксенатид $0,05$ нмоль	10	$6,4 \pm 0,3$	$8,4 \pm 0,7^{*+}$	$6,6 \pm 0,7^{*+}$	$4,7 \pm 0,3$
Глюкоза+аналог I $0,05$ нмоль	5	$5,6 \pm 0,2$	$10,1 \pm 0,4^+$	$7,9 \pm 0,8^+$	$4,6 \pm 0,1$
Глюкоза+аналог II $0,05$ нмоль	5	$6,5 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,6^{*+}$	$6,5 \pm 0,3^{*+}$	$4,9 \pm 0,4$
Глюкоза+аналог I $0,12$ нмоль	5	$6,5 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,1^{*+}$	$5,4 \pm 0,4^*$	$4,3 \pm 0,4$

Примечание. n — число животных в группе. $p < 0,05$ по сравнению $^+$ — с контролем, * — с введением глюкозы без препаратов. Дозы препаратов приведены на 100 г массы тела.

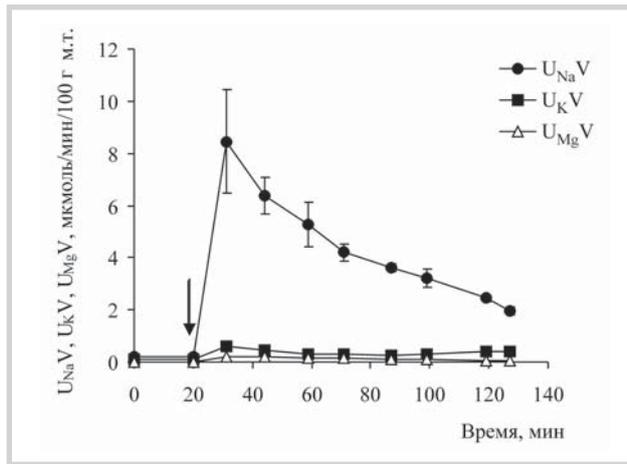


Рис. 2. Влияние эксенатида на выведение ионов натрия (U_{NaV}), калия (U_{KV}) и магния (U_{MgV}) почкой крысы.

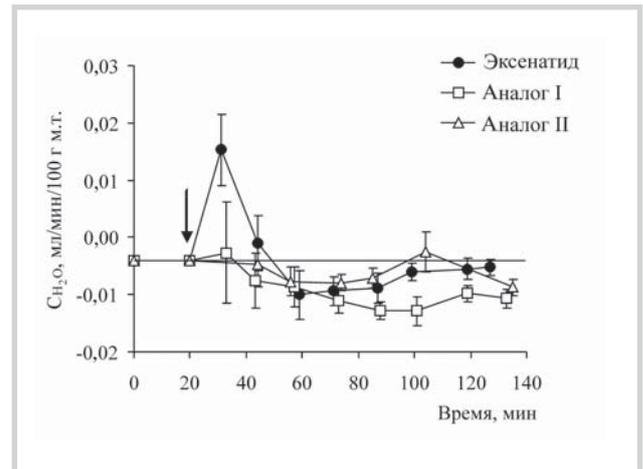


Рис. 3. Влияние эксенатида и его аналогов на очищение от осмотически свободной воды (C_{H_2O}) почкой крысы.

эксекреции ионов натрия (рис. 2). Экскреция калия возросла в меньшей степени. Отмечался заметный рост выведения ионов магния. В первые 30 мин после инъекции препаратов отмечается значительное увеличение образования и выделения осмотически свободной воды почкой (рис. 3). Через 45 мин экскреция осмотически свободной воды сменялась на ее интенсивную реабсорбцию. Общая экскреция осмотически свободной воды за 2 ч эксперимента после инъекции эксенатида или его аналогов достоверно снижалась (табл. 2).

Таким образом, эксенатид и аналоги I и II обладают высокой, ранее неизвестной селективной ионорегулирующей и диуретической активностью. Клинически важным является усиление экскреции жидкости и натрия почкой в сочетании со слабым влиянием на выделение калия из организма, поскольку это благоприятствует нормализации водно-солевого обмена и не вызывает неблагоприятных побочных эффектов, связанных с гипокалиемией.

Влияние вазопрессина и эксенатида на осмотическую проницаемость мочевого пузыря лягушки. Важно было выяснить, действует ли эксенатид на функции почек прямо или опосредованно физиологически

активными веществами, выделяющимися в кровь под его влиянием (подобно тому, как это происходит в случае инсулина). Для ответа на этот вопрос были проведены опыты на эпителии кожи и мочевого пузыря лягушки. Мочевой пузырь амфибий является принятым тест-объектом при изучении регуляции проницаемости эпителия для воды и влияния вазопрессина. Существенно, что молекулярные механизмы увеличения реабсорбции воды в эпителии собирательных трубочек почки и мочевого пузыря лягушек практически сходны. В этих опытах эксенатид не влиял на осмотическую проницаемость ни сам по себе, ни при одновременном введении аргинин-вазопрессина (рис. 4). Полученные данные позволяют заключить, что эффект эксенатида на осмотическую проницаемость эпителия опосредован физиологически активными веществами, синтезируемыми под его влиянием.

Влияние вазопрессина и эксенатида на транспорт натрия в коже лягушки. Эпителий кожи лягушки служит тест-объектом при изучении действия гормонов и лекарственных средств на транспорт натрия в дистальных сегментах нефрона. Добавление 10^{-6} М эксенатида к раствору с внутренней стороны кожи,

Таблица 2. Влияние инъекции эксенатида и его аналогов (0,05 нмоль/100 г массы тела) на диурез и экскрецию катионов и воды почкой крыс ($M \pm m$)

Параметр	Контроль (n=10)	Эксенатид (n=9)	Аналог I (n=10)	Аналог II (n=10)
$V^{2ч}$, мл	0,30±0,04	2,9±0,1*	2,2±0,1**	2,3±0,2**
$U_{Osm} V^{2ч}$, мкосм	186±20	1083±34*	1027±22*	951±47*
$U_{Na} V^{2ч}$, мкмоль	24±4	391±15*	339±9*	312±20**
$U_{K} V^{2ч}$, мкмоль	24±3	39±4*	65±4**	62±5**
$U_{Mg} V^{2ч}$, мкмоль	2,8±0,3	10,6±1,0*	8,1±0,7*	4,6±0,5**
$C_{H_2O}^{2ч}$, мл	-0,4±0,04	-0,7±0,1*	-1,2±0,1**	-0,9±0,1*

Примечание. $V^{2ч}$, $U_{Osm} V^{2ч}$, $U_{Na} V^{2ч}$, $U_{K} V^{2ч}$, $U_{Mg} V^{2ч}$, $C_{H_2O}^{2ч}$ — мочеотделение, выведение осмотически активных веществ, натрия, калия, магния и очищение от осмотически свободной воды за 2 ч эксперимента. $p < 0,05$ по сравнению * — с контролем, + — с инъекцией эксенатида.

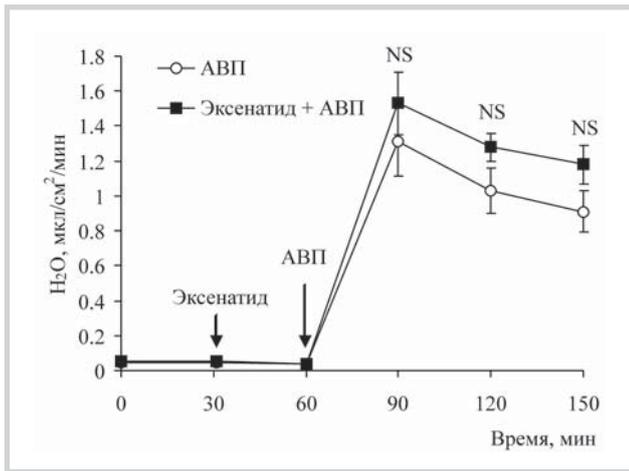


Рис. 4. Влияние эксенатида и аргинин-вазопрессина на транспорт воды в мочевом пузыре лягушки.

Стрелки — момент добавления препаратов в раствор со стороны серозной оболочки. NS — $p > 0,05$ при сравнении групп. Здесь и на рис. 5: AVP — аргинин-вазопрессин.

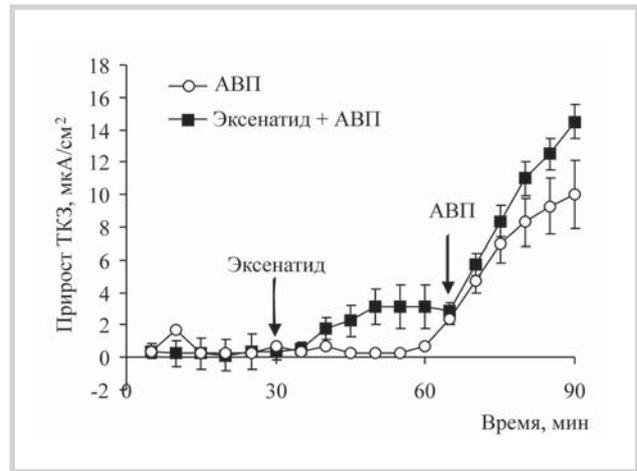


Рис. 5. Влияние эксенатида и аргинин-вазопрессина на ток короткого замыкания (TKZ) в коже лягушки.

Стрелки — момент добавления препаратов в раствор со стороны внутренней поверхности кожи лягушки.

где располагаются кровеносные сосуды, не снижало значений тока короткого замыкания; напротив, наблюдалась тенденция к его увеличению (рис. 5). На фоне действия эксенатида сохраняется нормальная реакция клеток на аргинин-вазопрессин: увеличение транспорта натрия и эквивалентного ему тока короткого замыкания. Отсутствие прямого тормозящего влияния эксенатида на транспорт натрия в эпителии дистальных отделов нефрона.

Таким образом, новые синтезированные аналоги эксенатида сопоставимы с эксенатидом по гликемическому эффекту, но обладают большей устойчивостью в растворе, что может придавать им определенные преимущества. В литературе практически нет данных об изменении деятельности почек под влиянием эксенатида. В нашей работе установлен ряд положительных (с клинической точки зрения) эффектов этих пептидов — диуретическое и натрийуретическое действие в сочетании с сохранением калия в организме. Особенно важно впервые обнаруженное нами влияние эксенатида на осморегулирующую функцию почек и выведение осмотически свободной воды, т.е. его способность стабилизировать осмотический гомеостаз.

В нашей работе показано, что влияние эксенатида на функции почек зависит от вовлечения неизвестных эндогенных, возможно, эндокринных факторов. Нормализация гликемии при участии ГПП-1 и эксенатида зависит от их способности усиливать секрецию инсулина в условиях повышенной концентрации глюкозы в крови. Исследования на эпителии кожи и мочевого пузыря, функционально подобных

клеткам дистального сегмента нефрона, свидетельствуют о том, что в исходном состоянии и в присутствии аргинин-вазопрессина эксенатид не влияет на систему реабсорбции воды и натрия *ex vivo*. Следовательно, те эффекты, которые постоянно проявляются *in vivo*, могут быть опосредованы секрецией физиологически активных веществ, меняющих функцию почек. Таким образом, речь может идти не только о синтезе новых эффективных аналогов эксенатида, но и о новых сторонах его функциональной активности в эндокринной системе.

Выводы

1. Синтезированы аналоги эксенатида с заменой аминокислотных остатков в 14-м, 35-м, 39-м положениях.
2. Аналоги подобно эксенатиду оказывают гипогликемический эффект при гипергликемии.
3. Синтезированные аналоги эксенатида обладают большей устойчивостью в растворе.
4. Эксенатид и его аналоги усиливают выведение почкой натрия, магния и осмотически свободной воды в сочетании с сохранением ионов калия.
5. Эксенатид не оказывает прямого ингибирующего влияния на транспорт натрия и воды на изолированной коже и мочевых пузырях лягушки. Его действие *in vivo*, вероятно, опосредовано образованием физиологически активных веществ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 08-04-00610), программ «Ведущие научные школы» (проект НШ-65100.2010.4) и ОБН РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hargrove D.M., Nardone N.A., Persson L.M. et al.* Glucose-dependent action of glucagon-like peptide-1 (7-37) in vivo during short- or long-term administration. *Metabolism* 1995;44:9:1231—1237.
2. *Holst J.J., Gromada J.* Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *AJP-Endo* 2004;287:199—206.
3. *Degn K.B., Brock B., Juhl C.B. et al.* Effect of intravenous infusion of exenatide (synthetic exendin-4) on glucose-dependent insulin secretion and counterregulation during hypoglycemia. *Diabetes* 2004;53:9:2397—2403.
4. *Neumiller J.J.* Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. *J Am Pharm Ass* 2003;2009:49:Suppl 1:S16—S29.
5. *Kolterman O.G., Buse J.B., Fineman M.S. et al.* Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:7:3082—3089.
6. *Викуллова О.К., Шестакова М.В.* Миметик инкретинов эксенатид — новый препарат для лечения сахарного диабета 2-го типа. *Consilium Medicum* 2006;8:9:113—118.
7. *Gutzwiller J.P., Drewe J., Göke B. et al.* Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am J Physiol* 1999;276:5:Pt 2:R1541—R1544.
8. *Gutzwiller J.P., Hruz P., Huber A.R. et al.* Glucagon-like peptide-1 is involved in sodium and water homeostasis in humans. *Digestion* 2006;73:2—3:142—150.
9. *Hargrove D.M., Kendall E.S., Reynolds J.M. et al.* Biological activity of AC3174, a peptide analog of exendin-4. *Regul Pept* 2007;141:1—3:113—119.
10. *Natochin Y.V., Parnova R.G., Shakhmatova E.I. et al.* AVP-independent high osmotic water permeability of frog urinary bladder and autacoids. *Pflügers Arch* 1996;433:1—2:136—145.
11. *Bryson N.* WIPO Patent Application WO/2008/116294 Exendin analogs. Matrogen Corp (CA), Bryson N. (CA); CA2008/000537; Fil. date Mar 20, 2008; Pub. date Oct 02, 2008. Priority Mar, 23, 2007 № 60/896,584. C07K14/575; A61K38/26. 36 p. URL: <http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Exendin-analogs/WO2008116294.html>.