



(21) 申请号 202311684184.3

(22) 申请日 2023.12.06

(71) 申请人 重庆医科大学附属第一医院

地址 400042 重庆市渝中区袁家岗友谊路1号

(72) 发明人 张亮 黄菊 王冬 李攀 王志刚
冷小静 林毅 詹柱 郑君
方明晓 徐涵

(74) 专利代理机构 重庆强大凯创专利代理事务所(普通合伙) 50217

专利代理师 陈雍

(51) Int. Cl.

A61K 49/22 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

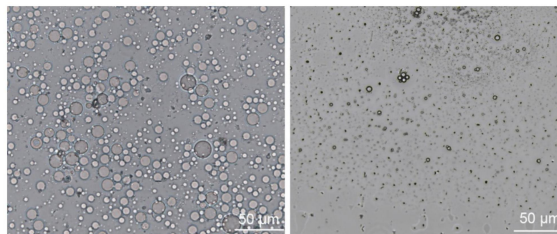
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

一种肿瘤细胞膜超声微泡及其制备方法和在增强肿瘤免疫治疗中的应用

(57) 摘要

本发明涉及超声微泡以及肿瘤免疫治疗药物技术领域,具体涉及一种肿瘤细胞膜超声微泡及其制备方法和在增强肿瘤免疫治疗中的应用。肿瘤细胞膜超声微泡包括由肿瘤细胞膜组成的磷脂双分子层外壳,壳内包裹有惰性气体;并由如下方法制备而成:将肿瘤细胞膜与含甘油的磷酸盐缓冲液混合,经超声处理后获得肿瘤细胞膜混悬液,转移至容器内;再加入全氟三丁胺,密封容器;抽出容器中的空气并注射惰性气体,经震荡处理,获得肿瘤细胞膜超声微泡。本微泡可用作肿瘤疫苗刺激机体免疫,解决传统肿瘤疫苗抗原单一、免疫原性低下的问题。微泡呈一种典型的中空结构,可用于增强超声造影成像,并在体内外促进树突状细胞成熟,具有理想的应用于肿瘤免疫治疗的前景。



1. 一种肿瘤细胞膜超声微泡,其特征在于:包括由肿瘤细胞膜组成的磷脂双分子层外壳,磷脂双分子层外壳内包裹有惰性气体。

2. 根据权利要求1所述的一种肿瘤细胞膜超声微泡,其特征在于:所述磷脂双分子层外壳由如下方式处理:将肿瘤细胞膜与含甘油的磷酸盐缓冲液混合,经超声处理之后获得肿瘤细胞膜混悬液;将肿瘤细胞膜混悬液与全氟三丁胺混合。

3. 根据权利要求2所述的一种肿瘤细胞膜超声微泡,其特征在于:肿瘤细胞膜混悬液与全氟三丁胺的体积比为0.2mL:20-50 μ L。

4. 根据权利要求1所述的一种肿瘤细胞膜超声微泡,其特征在于:所述肿瘤细胞膜提取自CT26细胞。

5. 根据权利要求1所述的一种肿瘤细胞膜超声微泡,其特征在于:所述惰性气体为 C_3F_8 。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的一种肿瘤细胞膜超声微泡的制备方法,其特征在于:包括以下依次进行的步骤:将肿瘤细胞膜与含甘油的磷酸盐缓冲液混合,经超声处理后获得肿瘤细胞膜混悬液,转移至容器内;再加入全氟三丁胺,密封容器;抽出容器中的空气并注射惰性气体,经震荡处理,获得肿瘤细胞膜超声微泡。

7. 根据权利要求6所述的一种肿瘤细胞膜超声微泡的制备方法,其特征在于:在含甘油的磷酸盐缓冲液中,甘油的质量百分数为10%,磷酸盐缓冲液的规格为0.01M,pH=7.4。

8. 根据权利要求6所述的一种肿瘤细胞膜超声微泡的制备方法,其特征在于:超声处理的功率为50W,时间为1min,且在超声处理过程中按照工作5s、暂停5s的程序进行。

9. 根据权利要求6所述的一种肿瘤细胞膜超声微泡的制备方法,其特征在于:所述容器为2mL西林瓶;将0.2mL肿瘤细胞膜混悬液加入西林瓶中,再加入20-50 μ L全氟三丁胺。

10. 根据权利要求1-5任一项所述的一种肿瘤细胞膜超声微泡在制备肿瘤免疫治疗的制剂中的应用。

一种肿瘤细胞膜超声微泡及其制备方法和在增强肿瘤免疫治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及超声微泡以及肿瘤免疫治疗药物技术领域,具体涉及一种肿瘤细胞膜超声微泡及其制备方法和在增强肿瘤免疫治疗中的应用。

背景技术

[0002] 肿瘤免疫治疗是一种新型的肿瘤治疗手段,在多种肿瘤类型中展示出强大的抗肿瘤活性。肿瘤疫苗作为其中一种免疫治疗策略,通过输注肿瘤相关抗原,增加抗原在抗原提呈细胞面前暴露机会,进而加强肿瘤特异性免疫反应,是一种极具潜力的治疗方式。目前,为了更有效地激活机体免疫,以确保体内抗肿瘤免疫反应的发生,研究者们研发了多种类型的肿瘤疫苗,主要包括:①多肽和蛋白质来源的肿瘤相关抗原;②基于核酸的肿瘤疫苗,如肿瘤DNA疫苗和RNA疫苗;③原位肿瘤疫苗,即借助不同的治疗手段将自体肿瘤细胞原位转化为肿瘤相关抗原。尽管上述疫苗在肿瘤免疫方面取得了一定的成效,但多数传统肿瘤疫苗由于其抗原成分单一、体内稳定性差、系统毒性作用大等一系列缺点影响临床前及临床治疗疗效。

[0003] 经研究证实,含有多种抗原的肿瘤细胞可用作肿瘤疫苗以诱发肿瘤特异性免疫反应。肿瘤细胞具有多种类的特异性抗原,是一种理想的肿瘤疫苗来源,通过物理、化学等方式处理自体或异体的肿瘤细胞使其不具备增殖活性和侵袭性。以肿瘤细胞裂解物为肿瘤相关抗原的肿瘤疫苗是其中重要的一类。然而,多数肿瘤细胞裂解物作为肿瘤疫苗的抗原无法诱导强烈的抗肿瘤免疫反应,因为肿瘤细胞裂解物的大部分是非肿瘤相关抗原成分。相比之下,肿瘤细胞膜具备高比例的肿瘤抗原,可以用于肿瘤疫苗的制备。亟需研发一种如何将肿瘤细胞膜制备成为肿瘤疫苗以刺激机体免疫的技术方案,以解决传统肿瘤疫苗抗原单一,免疫原性低下的问题。

发明内容

[0004] 本发明意在提供一种肿瘤细胞膜超声微泡,以解决传统肿瘤疫苗抗原单一、免疫原性低下的技术问题。

[0005] 为达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种肿瘤细胞膜超声微泡,包括由肿瘤细胞膜组成的磷脂双分子层外壳,磷脂双分子层外壳内包裹有惰性气体。

[0007] 本方案还提供了一种肿瘤细胞膜超声微泡的制备方法,包括以下依次进行的步骤:将肿瘤细胞膜与含甘油的磷酸盐缓冲液混合,经超声处理后获得肿瘤细胞膜混悬液,转移至容器内;再加入全氟三丁胺,密封容器;抽出容器中的空气并注射惰性气体,经震荡处理,获得肿瘤细胞膜超声微泡。

[0008] 本方案还提供了一种肿瘤细胞膜超声微泡在制备肿瘤免疫治疗的制剂中的应用。

[0009] 进一步,所述磷脂双分子层外壳由如下方式处理:将肿瘤细胞膜与含甘油的磷酸

盐缓冲液混合,经超声处理之后获得肿瘤细胞膜混悬液;将肿瘤细胞膜混悬液与全氟三丁胺混合。

[0010] 进一步,肿瘤细胞膜混悬液与全氟三丁胺的体积比为0.2mL:20-50 μ L。

[0011] 进一步,所述肿瘤细胞膜提取自CT26细胞。

[0012] 进一步,所述惰性气体为C₃F₈。

[0013] 进一步,在含甘油的磷酸盐缓冲液中,甘油的质量百分数为10%,磷酸盐缓冲液的规格为0.01M,pH=7.4。

[0014] 进一步,超声处理的功率为50W,时间为1min,且在超声处理过程中按照工作5s、暂停5s的程序进行。

[0015] 进一步,所述容器为2mL西林瓶;将0.2mL肿瘤细胞膜混悬液加入西林瓶中,再加入20-50 μ L全氟三丁胺。

[0016] 综上所述,本技术方案的原理以及有益效果在于:

[0017] 发明人使用制备脂质超声微泡的机械振荡法制备出了新型肿瘤细胞膜超声微泡,此类型肿瘤细胞膜作为壳材构成的超声微泡尚未见报道。新型肿瘤细胞膜超声微泡可用作肿瘤疫苗刺激机体免疫,解决传统肿瘤疫苗抗原单一,免疫原性低下的问题。体外实验证明制备出的肿瘤细胞膜微泡呈一种典型的中空结构,不仅可用于增强超声造影成像,还可体外促进树突状细胞成熟,在体内能刺激肿瘤组织、脾脏和淋巴结内树突状细胞成熟。

[0018] 当超声微泡的脂质外壳的成分全部为肿瘤细胞膜的时候,获得的超声微泡的促免疫细胞成熟的效果最为理想。但是,当超声微泡的脂质外壳的成分全部为肿瘤细胞膜时,按照常规方式难以成功制备超声微泡,发明人通过大量尝试,发现在制备过程中添加特定的液态氟碳PFTBA,可以解决制备问题。

[0019] 除此之外,在促进树突状细胞成熟方面,液态氟碳PFTBA的添加也有效促进了肿瘤部位的树突状细胞的成熟比例的提升,在施加超声处理的情况下,超声爆破促进微泡在肿瘤部位集中,可以进一步显著地促进树突状细胞成熟。

附图说明

[0020] 图1为实施例1的加入或不加入PFTBA的肿瘤细胞膜制备出的不同微泡的电镜图(左:PFTBA肿瘤细胞膜;右:未加PFTBA微泡)。

[0021] 图2为实施例2的不同比例肿瘤细胞膜-磷脂混合微泡体外刺激树突状细胞成熟情况的流式细胞术分析图像(a)以及定量分析结果(b)(在右侧的统计图中,数据的表示形式为mean \pm SD,n=4)。

[0022] 图3为实施例2的不同比例肿瘤细胞膜-磷脂混合微泡刺激CT-26移植瘤小鼠的(a,b)淋巴结的成熟情况和(c,d)肿瘤组织树突状细胞的成熟情况的流式细胞术分析图像以及定量分析结果(在右侧的统计图中,数据的表示形式为mean \pm SD,n=3)。

[0023] 图4为实施例3的体外增强超声成像图和回声强度定量分析。

[0024] 图5为实施例3的肿瘤细胞膜微泡光镜图和肿瘤细胞膜微泡荧光成像图。

[0025] 图6为实施例4的肿瘤细胞膜微泡体外促进树突状细胞成熟情况的流式细胞术分析图像(a)和树突状细胞成熟比例的定量分析(b)(在右侧的统计图中,数据的表示形式为mean \pm SD,n=5)。

[0026] 图7为实施例5的肿瘤细胞膜微泡促进肿瘤组织、淋巴结和脾脏树突状细胞成熟情况的流式细胞术图像 (a) 和树突状细胞成熟比例定量分析 (b-d) (在右侧的统计图中,数据的表示形式为 $\text{mean} \pm \text{SD}, n=5$)。

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例对本发明做进一步详细的说明,但本发明的实施方式不限于此。若未特别指明,下述实施例以及实验例所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,且所用的材料、试剂等,均可从商业途径得到。

[0028] 实施例1:超声微泡制作方法

[0029] (1) 肿瘤细胞膜提取

[0030] 为了获得肿瘤细胞膜,根据膜蛋白提取试剂盒提供的方法提取CT26(小鼠结肠癌细胞)肿瘤细胞膜。首先,将收集的细胞(1×10^8)重悬于3mL的膜蛋白提取液(上海碧云天生物技术有限公司,产品编号:P0033)中,并加入1mM苯甲基磺酰氟(PMSF,蛋白酶抑制剂,上海碧云天生物技术有限公司,产品编号ST505),在冰浴中孵化15分钟。然后,将细胞悬液在液氮中反复冻融三次后离心(2000rpm,10min)收集上清液。随后将细胞上清液再次进行离心(14,000rpm,30min)并收集沉淀细胞膜碎片。最后,收集沉淀物并冻干(-80°C ,8-12h,10pa)以便进一步使用。

[0031] (2) 超声微泡制备

[0032] 取上述获得的肿瘤细胞膜10mg(仅使用肿瘤细胞膜作为磷脂双分子层外壳的原料),加入1mL含10%甘油的磷酸盐缓冲液(0.01M,pH=7.4)后进行超声波机械处理(50W,工作5s,暂停5s)1min,获得肿瘤细胞膜混悬液。使用移液器吸取0.2mL上述混合液至2mL西林瓶内,并加入20 μL PFTBA(全氟三丁胺)至瓶内,封口膜密封后使用注射器将西林瓶内空气吸出,并立即使用另一个注射器推入2-3mL C_3F_8 惰性气体(后续实验尽量保证推入的 C_3F_8 惰性气体在3mL左右)。再经银汞胶囊调合器(频率:4300cpm)进行机械震荡50s,即可得到MBs@PFTBA即可得到肿瘤细胞膜微泡。作为对照,制备了不加入20 μL PFTBA的肿瘤细胞膜微泡,将超声处理后的混合物加入西林瓶内之后,直接进行后续惰性气体的注射和机械震荡。

[0033] 在光镜下观察肿瘤细胞膜微泡形态结构,并以不加入PFTBA的肿瘤细胞膜为对照,比较两者微泡差异。结果显示,在同等浓度条件下,加入PFTBA的肿瘤细胞膜通过机械振荡法后可形成大量粒径大小不一的圆形微泡,而未加入PFTBA的肿瘤细胞膜仅能形成极少量微泡,镜下观察到更多肿瘤细胞膜碎片(参见图1)。上述实验结果说明了,在使用单一的肿瘤细胞膜进行超声微泡的制备的时候,需要加入一定量的液态氟碳(例如,PFTBA),才能保证超声微泡的形成。传统的超声微泡的制备方法不采用加入少量液态氟碳的方式,而是直接充入气体。例如,中国专利CN111420073A(携带AMD070和ICG的多模态靶向纳米泡及其制备方法),采用脂质混悬液(二棕榈酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰甘油和二棕榈酰磷脂酰乙醇胺等)作为超声微泡的外壳(壳膜材料),可以在不加液态氟碳的情况下,直接冲入气体,最后形成超声微泡。但是,本技术方案直接采用肿瘤细胞膜作为微泡的壳膜材料,如果采用传统方法制备,会由于天然的细胞膜硬度不佳等问题,无法有效形成超声微泡。而经过发明人的大量探索,发现加入少量的液态氟碳可以解决上述问题。发明人推测液态氟碳的加入保证微泡成型,主要是由于液态氟碳本身的极

性影响微泡整体成型效果。

[0034] 除了PFTBA之外,发明人也尝试使用了其他种类的液态氟碳,例如:全氟戊烷(PFP)、全氟己烷(PFH)。使用上述其他类型的液态氟碳与本方案的PFTBA进行等量替换,并按照上述方法制备超声微泡,后文简称为PFP微泡、PFH微泡、PFTBA微泡。对制备获得的超声微泡进行显微观察,发现镜下微泡的稳定性不是很理想,受到环境影响会发生一定的相变。特别是在注射进入小鼠体内后,发生相变的微泡极易促进小鼠死亡。在相同注射剂量下,静脉注射PFP微泡、PFH微泡微泡后小鼠致死率高达50%以上,而推注PFTBA微泡后小鼠存活率高达95%。按照本技术方案获得的微泡稳定性较好,镜下观察,微泡基本上没有因为环境影响发生相变的情况。并且在注射入小鼠体内后,如果不采用特定的引导相变的刺激,微泡基本上不会出现相变现象,且小鼠因为注射本方案的微泡而死亡的情况出现的几率低(排除操作不当的情况)。

[0035] 除此之外,发明人在制备含有PFTBA的超声微泡的时候,也尝试了不同PFTBA添加量对超声微泡的形成的影响,经研究发现,PFTBA的加入量在大于20 μ L时,促进超声微泡形成的效果较为理想。对使用不同添加量的PFTBA制备的每种超声微泡进行微泡数量的统计(每种超声微泡对镜下三个视野进行计数并取平均值)。超声微泡的数量(20 μ L PFTBA加入量)、超声微泡的数量(30 μ L PFTBA加入量)、超声微泡的数量(50 μ L PFTBA加入量),三者之间不存在显著差异(t检验, $p>0.05$)。而超声微泡的数量(5 μ L PFTBA加入量)和超声微泡的数量(10 μ L PFTBA加入量),分别和超声微泡的数量(20 μ L PFTBA加入量)相比,均存在显著差异(t检验, $p<0.05$),超声微泡的数量(5 μ L PFTBA加入量)和超声微泡的数量(10 μ L PFTBA加入量),分别为超声微泡的数量(20 μ L PFTBA加入量)的约46%和69%。上述实验尝试说明了除了液态氟碳的类型对超声微泡的形成和效果非常关键,并且PFTBA的用量如果不在适合范围内,则会出现超声微泡的形成量显著下降的情况。因此,使用纯的肿瘤细胞膜作为超声微泡的脂质外壳,为了保证超声微泡的制备成功率,关键技术点在于是否加入一定量的液态氟碳以及液态氟碳的具体类型的选择。上述关键技术点在现有技术中并没有任何报道,是发明人经过大量独立研究的结果。

[0036] 实施例2:

[0037] 将实施例1中的肿瘤细胞膜替换为磷脂(二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇和二棕榈酰磷脂酰胆碱,二者质量比为5:3)和肿瘤细胞膜的混合物,再按照实施例1的方法进行微泡的制备。

[0038] 通过制备不同比例的肿瘤细胞膜-脂质混合微泡,即将制备脂质微泡的磷脂与肿瘤细胞膜混合形成一种混合微泡,通过流式细胞术考察不同微泡刺激树突状细胞成熟的能力。该实验分为两部分:测试混合微泡体外刺激骨髓树突状细胞(不成熟树突状细胞)成熟的能力;测试体内刺激CT26结直肠癌移植瘤小鼠淋巴结和肿瘤组织树突状细胞成熟的能力。测试用超声微泡的脂质外壳的原料为:体积比为0:3.2的肿瘤细胞膜和磷脂、体积比为0.5:2.4的肿瘤细胞膜和磷脂、体积比为1:1.6的肿瘤细胞膜和磷脂、体积比为2:0的肿瘤细胞膜和磷脂,其余制备步骤参照实施例1进行。

[0039] 体外测试的具体流程为:常规培养骨髓源性树突状细胞,即未成熟树突状细胞,按照 1×10^6 /孔的比例将骨髓源性树突状细胞接种于12孔板内,放入培养箱内继续培养24小时,然后加入200 μ L不同肿瘤细胞膜和磷脂质量比的参照实施例1方法制备的微泡,共

孵育24小时后收集细胞,分别加入APC标记的抗CD80抗体(0.06 μ g/test)和PE标记的抗CD86抗体(0.125 μ g/test)共染色后使用流式细胞仪检测不同质量比混合微泡刺激树突状细胞成熟能力。

[0040] 体内测试的具体流程为:建立小鼠结直肠癌肿瘤模型,经尾静脉注射200 μ L不同质量比混合微泡后立即使用低强度超声辐照肿瘤组织,超声辐照时间为5min,辐照频率为1MHz。每隔2天重复上述处理方式,共3次。在处理第7天收集小鼠肿瘤组织和淋巴结,制备成单细胞悬浮液后分别使用APC标记的抗CD80抗体(0.06 μ g/test)和PE标记的抗CD86抗体(0.125 μ g/test)对细胞进行染色,流式细胞术检测不同质量比混合微泡体内刺激树突状细胞成熟能力。

[0041] 结果显示,当未加入肿瘤细胞膜时,即肿瘤细胞膜与磷脂比例为0:3.2时(即超声微泡的脂质外壳的成分全部为磷脂),仅有少量骨髓树突状细胞被刺激转化为成熟树突状细胞,当增加肿瘤细胞膜后,可大量刺激树突状细胞成熟,成熟比例呈一定的浓度依赖性(图2)。当超声微泡的脂质外壳的成分全部为肿瘤细胞膜的时候,获得的超声微泡的促免疫细胞成熟的效果最为理想。但是,当超声微泡的脂质外壳的成分全部为肿瘤细胞膜时,按照常规方式难以成功制备超声微泡,发明人通过大量尝试,发现在制备过程中添加特定的液态氟碳PFTBA,可以解决制备问题。与体外结果一致,体内实验也证实增加肿瘤细胞膜比例后,淋巴结和肿瘤组织内树突状细胞成熟比例大大增加(图3)。

[0042] 实施例3

[0043] 实施例1制备的超声微泡的光镜图和荧光成像图参见图5,体外实验证明制备出的肿瘤细胞膜微泡呈一种典型的中空结构。对上述超声微泡进行超声造影成像研究,实验结果参见图4。

[0044] 实施例4

[0045] 使用流式细胞术分析不同微泡用量的情况下对树突状细胞成熟的体外促进作用。实验方法参照实施例2进行,实验结果参见图6。由本实施例的实验结果可知,肿瘤细胞膜微泡可促进树突状细胞成熟。

[0046] 实施例5

[0047] 本实施例研究了肿瘤细胞膜微泡促进肿瘤组织、淋巴结和脾脏树突状细胞成熟情况,具体研究方法为:建立小鼠结直肠癌肿瘤模型,并随机分为5组:空白对照组(control)、单纯超声辐照组(US)、未加入PFTBA的肿瘤细胞膜微泡组(MBs)、加入PFTBA的肿瘤细胞膜微泡组(PFTBA@aMBs)和加入PFTBA的肿瘤细胞膜微泡组联合超声辐照组(PFTBA@aMBs+US)。根据上述分组进行相应治疗,微泡注射剂量为200 μ L、2mg/mL,超声辐照时间设置为5min,超声辐照频率为1MHz。每隔2天重复上述治疗,共3次。在处理第7天收集小鼠肿瘤组织、脾脏和淋巴结,制备成单细胞悬浮液后分别使用APC标记的抗CD80抗体(0.06 μ g/test)和PE标记的抗CD86抗体(0.125 μ g/test)对细胞进行染色,流式细胞术检测肿瘤组织、脾脏和淋巴结内树突状细胞成熟比例。

[0048] 实验结果参见图7,实验结果显示本方案的超声微泡在体内能刺激肿瘤组织、脾脏和淋巴结内树突状细胞成熟情况。针对图7B,各组的具体数据为:

[0049] Control组:15.36 \pm 3.09%;US组:15.20 \pm 3.32%;MBs组:23.32 \pm 2.66%;PFTBA@MBs组:27.66 \pm 2.40%;PFTBA@MBs+US组:43.52 \pm 8.00%。单纯超声处理并不会提升DC细胞

的成熟比例(US组),但是,使用不加PFTBA的超声微泡,因为引入了癌细胞膜,一定程度上促进了DC细胞的成熟。如果加入PFTBA制备超声微泡,则超声微泡的质量以及完整程度更为理想,能够进一步提升DC细胞的成熟比例。并且,MBs组和PFTBA@MBs组之间的数据存在统计意义上的显著差异,说明PFTBA的使用在提升肿瘤等部位DC细胞活化比例发挥了重要作用,因此,PFTBA在本方案中起到了促进免疫进程和保证微泡形成的双重作用。进一步在PFTBA@MBs的基础上,施加超声处理,则可以非常显著地提升成熟DC细胞的比例,提升免疫反应进程,为进一步提升肿瘤免疫治疗效果创造了条件。发明人分析原因在于超声爆破促进微泡在肿瘤部位聚集更多,可以更为有效地促进DC细胞成熟的进程。

[0050] 以上所述的仅是本发明的实施例,方案中公知的具体技术方案和/或特性等常识在此未作过多描述。应当指出,对于本领域的技术人员来说,在不脱离本发明技术方案的前提下,还可以作出若干变形和改进,这些也应该视为本发明的保护范围,这些都不会影响本发明实施的效果和专利的实用性。本申请要求的保护范围应当以其权利要求的内容为准,说明书中的具体实施方式等记载可以用于解释权利要求的内容。

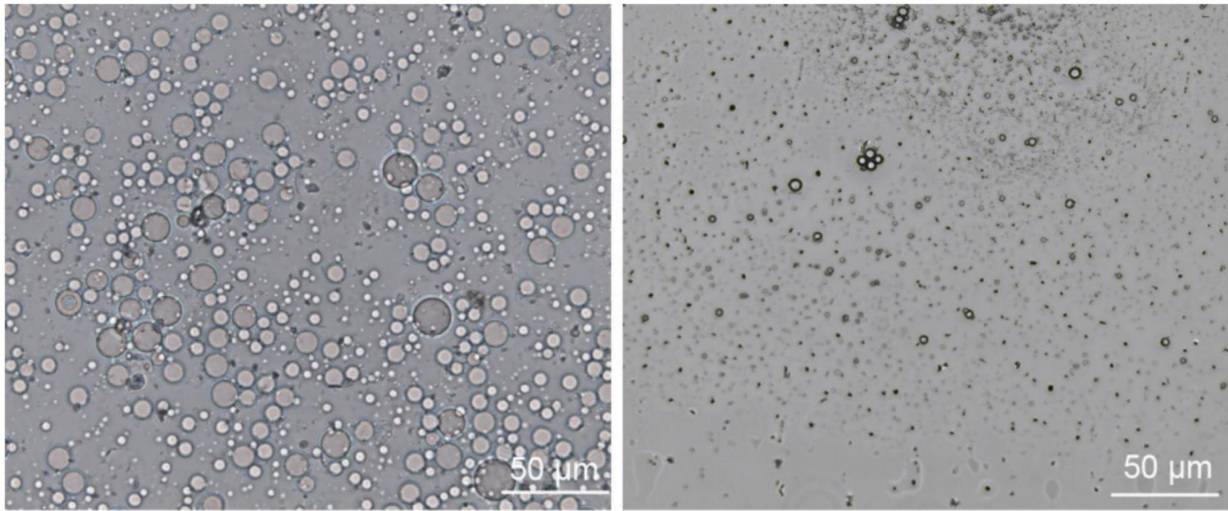


图1

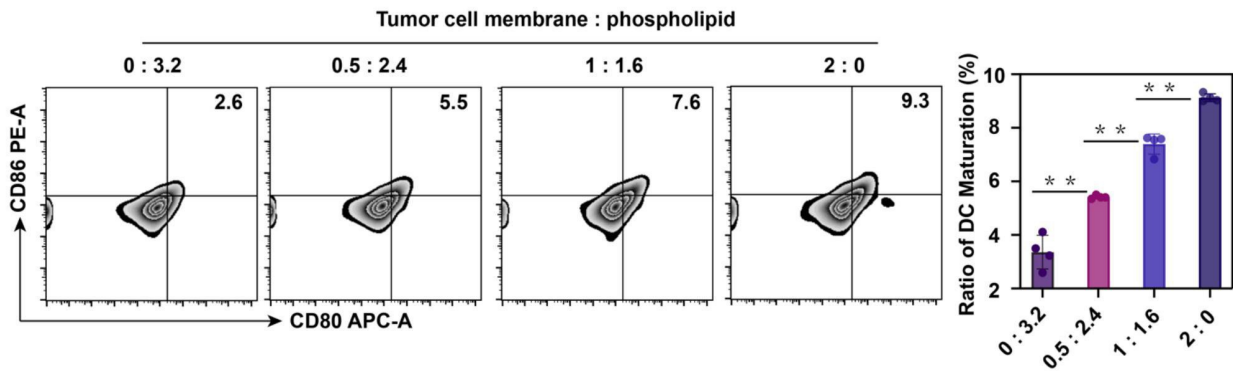


图2

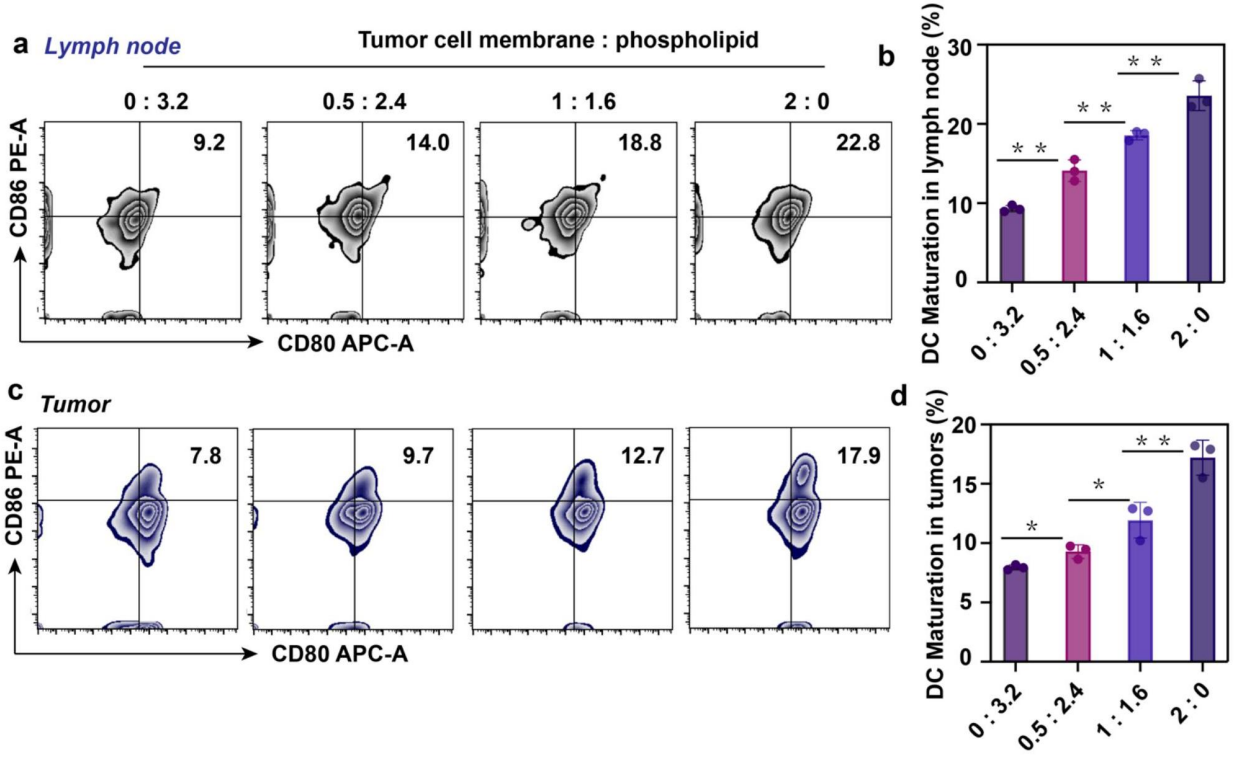


图3

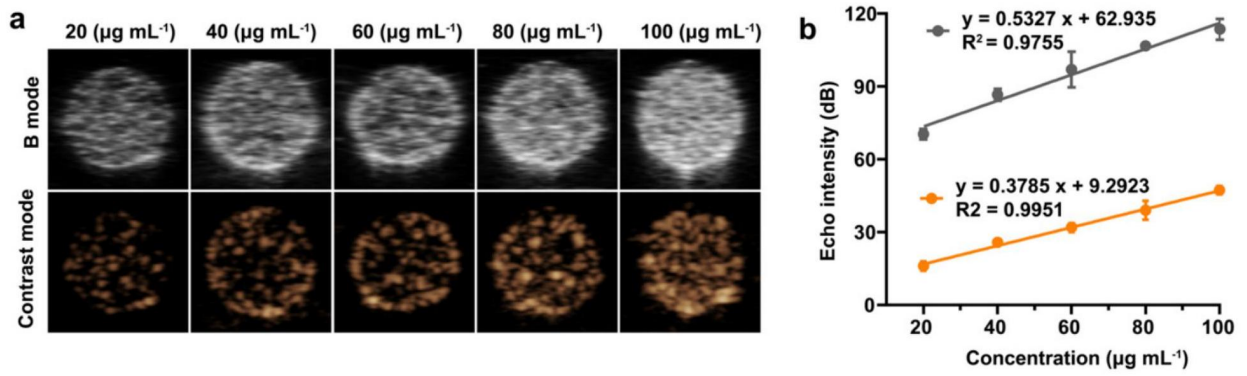


图4

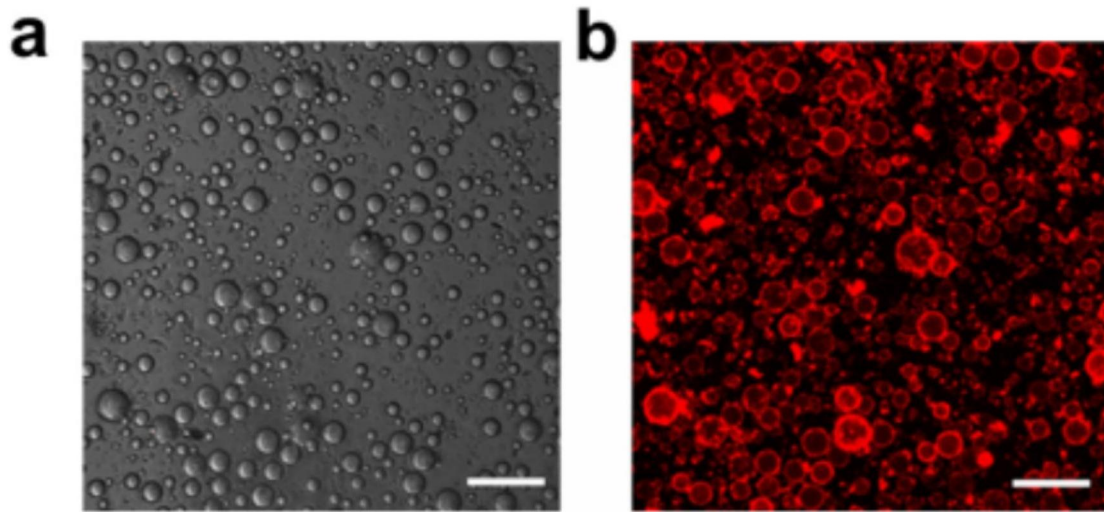


图5

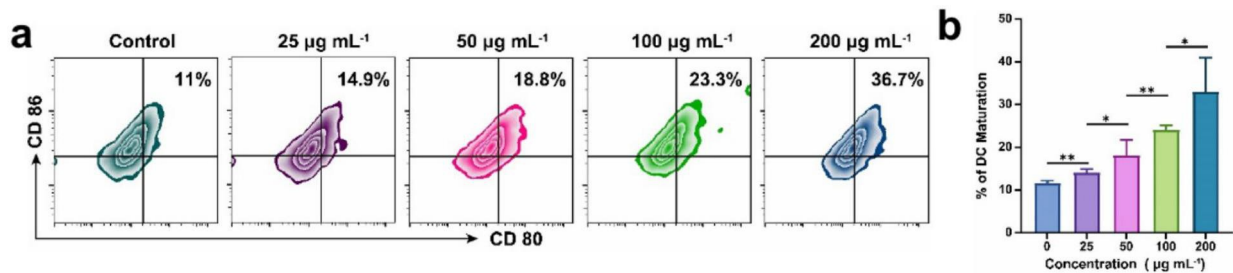


图6

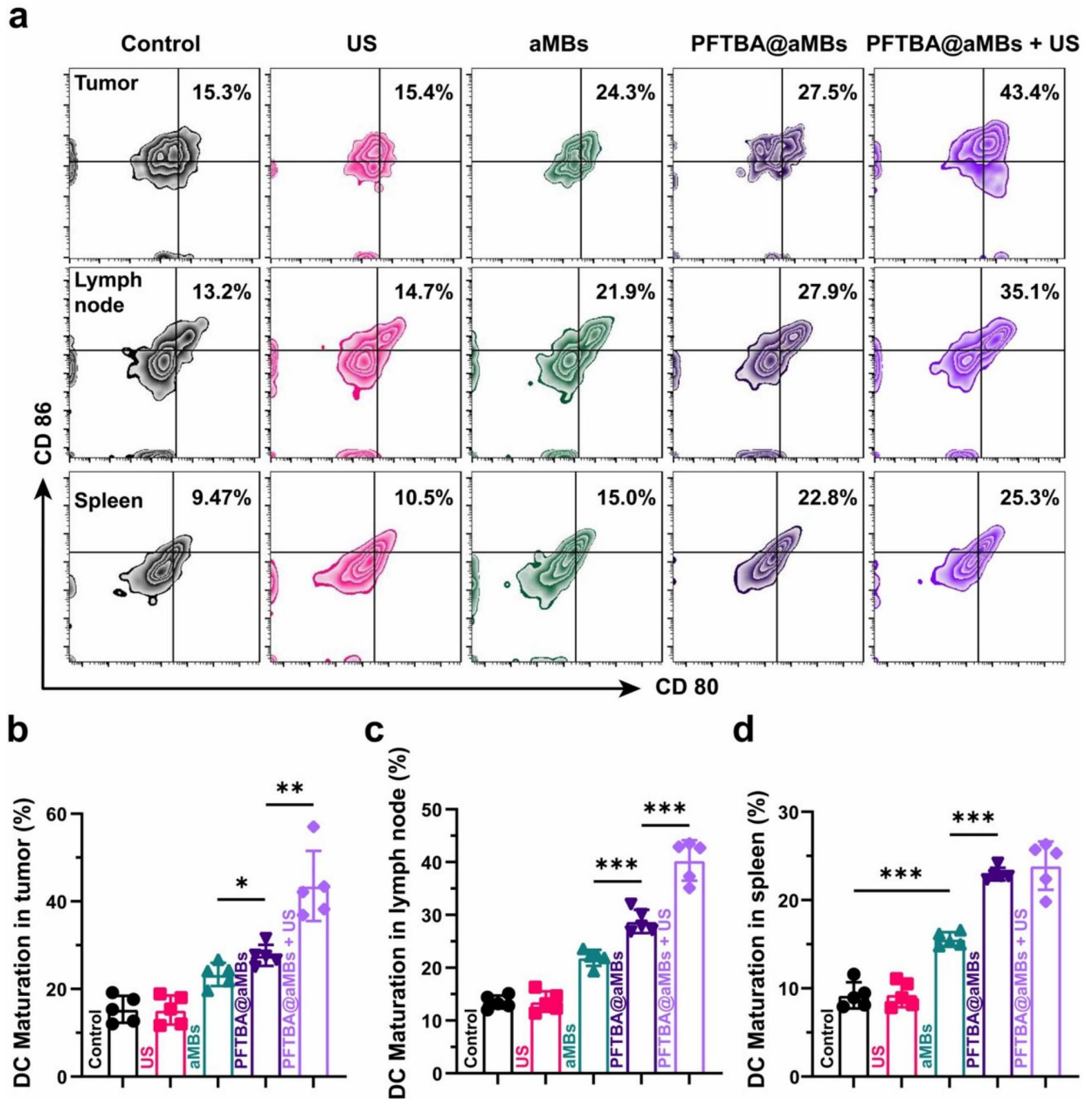


图7