



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115089727 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 07

(21) 申请号 202210643259.2

CN 112175997 A, 2021.01.05

(22) 申请日 2022.06.08

CN 112791092 A, 2021.05.14

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 113198020 A, 2021.08.03

申请公布号 CN 115089727 A

US 10166259 B1, 2019.01.01

(43) 申请公布日 2022.09.23

US 2006135410 A1, 2006.06.22

(73) 专利权人 天津医科大学眼科医院

US 2012058177 A1, 2012.03.08

地址 300384 天津市南开区复康路251号

贺林等主编.《临床遗传学》.上海科学技术出版社,2013,(第2013年5月第1版),第602-603页.

(72) 发明人 林婷婷 汤勤 孙迪 朱利民

刘勋 赵今稚

Zhou Guannan等 .Exosome Mediated Cytosolic Cisplatin Delivery Through Clathrin-Independent Endocytosis and Enhanced Anti-cancer Effect via Avoiding Endosome Trapping in Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer.《FRONTIERS IN MEDICINE》.2022,第09卷摘要部分、第2页左栏第1行至右栏第22行、第2页右栏第33页至第3页左栏第29行.

(74) 专利代理机构 北京瑞盛铭杰知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11617

专利代理师 刘莹

(51) Int. Cl.

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 47/62 (2017.01)

A61K 31/555 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

审查员 陈晓真

(56) 对比文件

CN 104177474 A, 2014.12.03

CN 105727305 A, 2016.07.06

CN 111012924 A, 2020.04.17

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

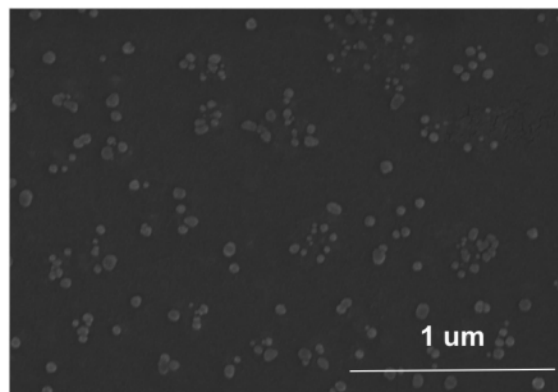
(54) 发明名称

KC26多肽修饰的牛奶外泌体及其制备方法和应用

性和不良反应,具有很好的抑癌效果。

(57) 摘要

本发明提出KC26多肽修饰的牛奶外泌体的制备方法和应用,属于医药技术领域。所述制备方法包括如下步骤:(a)制备牛奶外泌体,将所得牛奶外泌体添加至溶剂中,得牛奶外泌体溶液;(b)将KC26多肽添加至超纯水中,搅拌,得多肽溶液;(c)将上述牛奶外泌体溶液添加到上述多肽溶液中,反应后,冻干保存,得KC26多肽修饰的牛奶外泌体。本发明以卡铂为细胞毒药物,以牛奶外泌体为载体,以天冬酰胺内肽酶为靶点,三者有机结合,形成“药物-载体-靶点”模型,更有利于提高化疗药物的生物利用度,有效降低药物毒



CN 115089727 B

[接上页]

**(56) 对比文件**

Zhou Guannan等 .Exosome Mediated Cytosolic Cisplatin Delivery Through Clathrin-Independent Endocytosis and Enhanced Anti-cancer Effect via Avoiding Endosome Trapping in Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer.《FRONTIERS IN MEDICINE》.2022,第09卷摘要部分、第2页左栏第1行至右栏第22行、第2页右栏第33页至第3页左栏第29行.

金红跃.基于酶响应型脂质体共递送辛伐他汀及紫杉醇克服肿瘤EMT相关耐药的研究.《中国博士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2020,(第2020年第1期),第51页第1行至第53页第26行、第59页第11行至第60页第6行.

金红跃.基于酶响应型脂质体共递送辛伐他

汀及紫杉醇克服肿瘤EMT相关耐药的研究.《中国博士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2020,(第2020年第1期),第51页第1行至第53页第26行、第59页第11行至第60页第6行.

Cao Haiqiang等.Bioengineered Macrophages Can Responsively Transform into Nanovesicles To Target Lung Metastasis.《NANO LETTERS》.2018,第18卷(第08期),第4762-4770页.

周建芬等.外泌体作为药物递送载体的研究进展.《中国医药工业杂志》.2020,第51卷(第04期),第425-433页.

黄平等.叶酸受体- $\alpha$ 、Legumain在视网膜母细胞瘤细胞系的表达实验研究.《医学研究杂志》.2015,第44卷(第09期),第47-51页.

1. KC26多肽修饰的牛奶外泌体在制备用于治疗视网膜母细胞瘤药物中的应用,其特征  
在于,将KC26多肽修饰的牛奶外泌体与卡铂混合得用于治疗视网膜母细胞瘤药物;

其中,所述KC26多肽修饰的牛奶外泌体的制备方法,包括如下步骤:

(a) 制备牛奶外泌体,将所得牛奶外泌体添加至溶剂中,得牛奶外泌体溶液;

(b) 将KC26多肽添加至超纯水中,搅拌,得多肽溶液;

(c) 将上述牛奶外泌体溶液添加到上述多肽溶液中,反应后,冻干保存,得KC26多肽修  
饰的牛奶外泌体;所述牛奶外泌体与所述KC26多肽的质量比为1:3。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征  
在于,

步骤(c)中,所述反应为4°C反应24小时。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征  
在于,

步骤(b)中,所述KC26多肽与超纯水的比例为36mg:10mL。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征  
在于,

步骤(a)中,所述牛奶外泌体与溶剂的比例为12mg:1mL;

所述溶剂为甲醇、乙醇、丙醇、尿素、甘油、氢氧化钠或乙酸中至少一种。

5. 根据权利要求1所述的应用,其特征  
在于,

步骤(a)中,所述牛奶外泌体的制备方法,包括如下步骤:

(a1) 牛奶第一离心后,去除脂肪球、酪蛋白和碎片,得第一溶液;

(a2) 将上述第一溶液第二离心后,去除大颗粒和微泡,得第二溶液;

(a3) 将上述第二溶液第三离心后,弃上清液,洗涤沉淀,得外泌体沉淀;

(a4) 将上述外泌体沉淀重新悬浮于磷酸盐缓冲液中,通过0.22 $\mu$ m过滤器过滤、灭菌,得  
牛奶外泌体。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征  
在于,

步骤(a1)中,所述第一离心为4°C以13000g离心30min;

步骤(a2)中,所述第二离心为4°C以10万g离心60min;

步骤(a3)中,所述第三离心为4°C以135000g离心90min。

## KC26多肽修饰的牛奶外泌体及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,尤其涉及KC26多肽修饰的牛奶外泌体的制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma, RB)是儿童最常见的眼内恶性肿瘤,好发于3岁以下儿童,平均发病年龄仅18个月,约10%~15%的患者可以发生肿瘤转移,严重危害患儿的视功能及生命。我国每年新增患者约为1100例,且84%为眼内期晚期高风险患者。

[0003] 治疗技术的进步使RB患者能够在保生命的前提下保存眼球(保眼)和视功能。治疗方法主要包括冷冻、激光光凝、全身化疗、眼球摘除术以及通过眼内、球周和眼动脉介入途径的局部化疗等,并且强调多学科综合治疗。

[0004] 目前,化学治疗(化疗)仍是眼内期RB的一线治疗方法,其有效抑制RB细胞转移,同时减少放射治疗(放疗)的诸多并发症。根据注药途径分为静脉化疗、动脉化疗和玻璃体腔注药化疗。RB化疗面临两大困境:一是药物缺乏靶向性,全身或局部副作用大;二是药物对视网膜下腔或玻璃体腔的肿瘤渗透性差,残存肿瘤细胞成为复发根源。可见,临床仍然缺乏一种积极有效的新型靶向递药系统用于提高化疗药物的生物利用度和安全性。

[0005] 靶向药物递送系统(targeted drug delivery systems, TDDS)是提高化疗效果的重要手段之一。天然细胞来源的外泌体大小约30-150nm,常被用作肿瘤靶向纳米药物递送系统的载体。主要具有以下特征:可以逃避单核吞噬细胞系统的快速清除,甚至可以穿透血脑屏障;磷脂双分子层构成的中空结构使其既可以在膜上装载亲脂性药物,也可以在内部包裹亲水性药物;其生物来源保证了良好的生物相容性、低免疫原性和低毒性;表面呈现负电为其提供了循环稳定性。然而,天然细胞来源的外泌体生产成本高,操作复杂。

### 发明内容

[0006] 本发明提出酶敏感的KC26多肽修饰的牛奶外泌体及其制备方法和应用,根据天冬酰胺内肽酶可作为肿瘤微环境响应型递药设计及治疗应用靶点的特点,引入天冬酰胺内肽酶敏感的KC26多肽修饰牛奶外泌体,以实现药物靶向作用,提高化疗药物生物利用率。

[0007] 本发明提出一种KC26多肽修饰的牛奶外泌体的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (a) 制备牛奶外泌体,将所得牛奶外泌体添加至溶剂中,得牛奶外泌体溶液;

[0009] (b) 将KC26多肽添加至超纯水中,搅拌,得多肽溶液;

[0010] (c) 将上述牛奶外泌体溶液添加到上述多肽溶液中,反应后,冻干保存,得KC26多肽修饰的牛奶外泌体。

[0011] 进一步地,步骤(c)中,所述牛奶外泌体与所述KC26多肽的质量比为1:3。

[0012] 进一步地,步骤(c)中,所述反应为4℃反应24小时。

[0013] 进一步地,步骤(b)中,所述KC26多肽与超纯水的比例为36mg:10mL。

[0014] 进一步地,步骤(a)中,所述牛奶外泌体与溶剂的比例为12mg:1mL;

- [0015] 所述溶剂为甲醇、乙醇、丙醇、尿素、甘油、氢氧化钠或乙酸中至少一种。
- [0016] 进一步地,步骤(a)中,所述牛奶外泌体的制备方法,包括如下步骤:
- [0017] (a1) 牛奶第一离心后,去除脂肪球、酪蛋白和碎片,得第一溶液;
- [0018] (a2) 将上述第一溶液第二离心后,去除大颗粒和微泡,得第二溶液;
- [0019] (a3) 将上述第二溶液第三离心后,弃上清液,洗涤沉淀,得外泌体沉淀;
- [0020] (a4) 将上述外泌体沉淀重新悬浮于磷酸盐缓冲液中,通过0.22 $\mu$ m过滤器过滤、灭菌,得牛奶外泌体。
- [0021] 进一步地,步骤(a1)中,所述第一离心为4 $^{\circ}$ C以13000g离心30min;
- [0022] 步骤(a2)中,所述第二离心为4 $^{\circ}$ C以10万g离心60min;
- [0023] 步骤(a3)中,所述第三离心为4 $^{\circ}$ C以135000g离心90min。
- [0024] 本发明还提出上述任一所述的制备方法制备得到的KC26多肽修饰的牛奶外泌体。
- [0025] 本发明还提出上述任一KC26多肽修饰的牛奶外泌体在制备用于治疗视网膜母细胞瘤药物中的应用。
- [0026] 进一步地,将KC26多肽修饰的牛奶外泌体与卡铂混合得用于治疗视网膜母细胞瘤药物。
- [0027] 本发明具有以下优势:
- [0028] 本发明以牛奶外泌体为载体的,选取KC26与肿瘤高表达的天冬酰胺内肽酶(靶点)进行酶响应。其中,牛奶外泌体作为天然的纳米载体,具有良好的生物相容性、低免疫原性、低毒性、循环稳定性、成本低廉、易于获取等优势。KC26多肽可以与肿瘤微环境中的天冬酰胺内肽酶进行酶响应从而实现靶向作用。本发明中的递药体系,以卡铂为细胞毒药物,以牛奶外泌体为载体,以天冬酰胺内肽酶为靶点,三者有机结合,形成“药物-载体-靶点”模型,更有利于提高化疗药物的生物利用度,有效降低药物毒性和不良反应,具有很好的抑癌效果。

## 附图说明

- [0029] 构成本发明的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:
- [0030] 图1为本发明实施例1所得KC26多肽修饰的牛奶外泌体的形貌分析图;
- [0031] 图2为本发明试验例1中视网膜母细胞瘤(Y79)细胞采用CCK-8试剂实验检测给药48小时后,不同浓度下的卡铂、卡铂-牛奶外泌体、卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体的细胞抑制率;
- [0032] 图3为本发明试验例1中视网膜母细胞瘤(WERI-Rb1)细胞采用CCK8实验检测给药48小时后,不同浓度下的卡铂、卡铂-牛奶外泌体、卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体的细胞抑制率;
- [0033] 图4为本发明试验例2中视网膜母细胞瘤(Y79)细胞采用流式细胞术检测给药24小时后的凋亡率;
- [0034] 图5为本发明试验例2中视网膜母细胞瘤(WERI-Rb1)细胞采用流式细胞术检测给药24小时后的凋亡率。

## 具体实施方式

[0035] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。在不冲突的情况下,本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0036] 本发明一实施例提出一种KC26多肽修饰的牛奶外泌体的制备方法,包括如下步骤:

[0037] (a) 制备牛奶外泌体,将所得牛奶外泌体添加至溶剂中,得牛奶外泌体溶液;

[0038] (b) 将KC26多肽添加到超纯水中,搅拌,得多肽溶液;

[0039] (c) 将上述牛奶外泌体溶液添加到上述多肽溶液中,反应,冻干保存,得牛奶外泌体。

[0040] 本发明实施例中提出的KC26多肽修饰的牛奶外泌体的制备方法,以牛奶外泌体为载体的,选取KC26与肿瘤高表达的天冬酰胺内肽酶(靶点)进行酶响应。其中,牛奶外泌体作为天然的纳米载体,具有良好的生物相容性、低免疫原性、低毒性、循环稳定性、成本低廉、易于获取等优势。KC26多肽可以与肿瘤微环境中的天冬酰胺内肽酶进行酶响应从而实现靶向作用。该方法操作简单,成本较低,具有较强的医学应用价值。

[0041] 本发明一实施例中,步骤(c)中,所述牛奶外泌体与所述KC26多肽的质量比为1:3。步骤(c)中,所述反应为4℃反应24小时。

[0042] 本发明一实施例中,步骤(b)中,所述KC26多肽与超纯水的比例为36mg:10mL。

[0043] 本发明一实施例中,步骤(a)中,所述牛奶外泌体与溶剂的比例为12mg:1mL。所述溶剂为甲醇、乙醇、丙醇、尿素、甘油、氢氧化钠或乙酸中至少一种。

[0044] 本发明一实施例中,步骤(a)中,所述牛奶外泌体的制备方法,包括如下步骤:

[0045] (a1) 牛奶第一离心后,去除脂肪球、酪蛋白和碎片,得第一溶液;

[0046] (a2) 将上述第一溶液第二离心后,去除大颗粒和微泡,得第二溶液;

[0047] (a3) 将上述第二溶液第三离心后,弃上清液,洗涤沉淀,得外泌体沉淀;

[0048] (a4) 将上述外泌体沉淀重新悬浮于磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液)中,通过0.22 $\mu$ m过滤器过滤、灭菌,得牛奶外泌体。

[0049] 本发明一实施例中,步骤(a1)中,所述第一离心为4℃以13000g离心30min。具体地,所述第一离心用TA-10.250转子和Allegra 25R离心机;第一离心在250mL离心瓶中进行。

[0050] 本发明一实施例中,步骤(a2)中,所述第二离心为4℃以10万g离心60min。具体地,所述第二离心为4℃使用Optima LE-80K超速离心机(贝克曼库尔特,美国)在10万g的45-Ti型固定角转子中离心60min。

[0051] 本发明一实施例中,步骤(a3)中,所述第三离心为4℃以135000g离心90min。步骤(a3)中,所述洗涤为用PBS洗涤三次。步骤(a3)中,用Optima LE-80K超离心机在45-Ti型固定角转子中。具体地,将上述上清液(70mL/管)最终在135000g,4℃,用Optima LE-80K超离心机在45-Ti型固定角转子中离心90min,弃上清,用PBS洗涤三次。

[0052] 本发明一实施例还提出上述任一制备方法制备得到的KC26多肽修饰的牛奶外泌体。本发明实施例中,KC26多肽是一条基于穿膜肽的“发夹”结构,由三部分组成,一段具有穿膜肽功能的R9序列,一段能封闭R9功能的富含谷氨酸的序列,中间含有一段能被天冬酰

胺内肽酶酶切响应的底物肽序列,具体序列为Ke5Ne4GPTN2R9C。当KC26修饰的牛奶外泌体被肿瘤微环境中的天冬酰胺内肽酶水解后,穿膜肽被激活,包载药物的牛奶外泌体更好地进入肿瘤细胞释放药物,可以有效增加药物在靶细胞的累积。并且,不表达或者低表达天冬酰胺内肽酶的正常细胞将很难与之结合,因此不被化疗药物损伤,可以有效减少化疗药物的副作用。故KC26多肽修饰的牛奶外泌体包载的卡铂等药物可有效地抑制视网膜母细胞瘤细胞的增殖并且促进凋亡,具有很好的作用效果。

[0053] 本发明一实施例还提出上述KC26多肽修饰的牛奶外泌体在制备用于治疗视网膜母细胞瘤药物中的应用。具体地,将KC26多肽修饰的牛奶外泌体与卡铂混合后得用于治疗视网膜母细胞瘤药物。

[0054] 本发明实施例提出KC26多肽修饰的牛奶外泌体在作为肿瘤靶向纳米药物递送系统的载体中的应用。以牛奶外泌体为载体,使用KC26多肽进行修饰可以靶向肿瘤细胞及其微环境中的天冬酰胺内肽酶,以卡铂作为抗肿瘤药物,三者有机结合制备了卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体,具有高生物相容性和安全性。

[0055] 相较于单独使用卡铂和卡铂-牛奶外泌体,卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体对视网膜母细胞瘤细胞增殖和凋亡能力的影响具有显著意义,其作用效果有了显著提高。这主要是由于牛奶外泌体的脂质双层结构具有高的生物相容性,可以载带药物进入视网膜母细胞瘤细胞。与脂质体、树枝状大分子和聚合物等合成纳米制剂相比,外泌体尺寸小、生物相容性好、毒性低,更适合作为药物输送载体。并且,KC26多肽的存在能够让其底物肽与视网膜母细胞瘤细胞分泌的天冬酰胺内肽酶进行酶响应,从而穿膜肽被激活将载药牛奶外泌体靶向肿瘤细胞,从而提高化疗药物的抗肿瘤效果。

[0056] 下面将结合实施例详细阐述本发明。

[0057] 实施例1一种KC26多肽修饰的牛奶外泌体的制备方法

[0058] 牛奶用TA-10.250转子和Allegra 25R离心机,4℃在250mL离心瓶中以13000g离心30min,去除脂肪球、酪蛋白和其他碎片。乳清通过乳酪布收集,随后转移到70mL聚碳酸酯管中,并在4℃使用Optima LE-80K超速离心机(贝克曼库尔特,美国)在10万g的45-Ti型固定角转子中离心60min,去除大颗粒和微泡。上清液(70mL/管)最终在135 000g,4℃,用Optima LE-80K超速离心机在45-Ti型固定角转子中离心90min,弃上清,用PBS洗涤三次。将外泌体沉淀重新悬浮于PBS中,得到均质的悬浮液,再通过0.22μm过滤器过滤灭菌。

[0059] 取牛奶外泌体12mg,用1mL甲醇溶解。称取KC26多肽36mg,用10mL超纯水溶解,放在磁力搅拌器上缓慢搅拌。用移液器缓慢的将牛奶外泌体加到多肽溶液中,在4度反应24小时,冻干保存。

[0060] 所得KC26多肽修饰的牛奶外泌体采用扫描电镜进行形貌分析,结果见图1。

[0061] 试验例1采用CCK-8法检测药物(KC26多肽修饰的牛奶外泌体包载卡铂)对细胞(视网膜母细胞瘤细胞系Y79、WERI-Rb1细胞)增殖能力的影响

[0062] 将稳定生长的视网膜母细胞瘤细胞系Y79、WERI-Rb1细胞按照 $1 \times 10^4$ /孔接种于96孔板,每组至少设3个复孔,在不同时间段加入10微升的CCK-8试剂,并在37℃孵育1.5-2小时。使用酶标仪测定在450纳米处每孔的吸光度(OD)值。视网膜母细胞瘤(Y79)细胞采用CCK-8试剂实验检测给药48小时后,测不同浓度下的卡铂、卡铂-牛奶外泌体、卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体的细胞抑制率,结果见图2-3。

[0063] 由图2可得,相同浓度下,卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体对Y79细胞的抑制率显著大于另外两组,表明卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体显著提高了卡铂的作用效果。

[0064] 其中,细胞抑制率的计算如下:细胞抑制率(%) = (对照组吸光度值-实验组吸光度值)/对照组吸光度值×100%。<sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01, <sup>\*\*\*</sup>P<0.001, <sup>\*\*\*\*</sup>P<0.0001。

[0065] 由图3可得,相同浓度下,卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体对Y79细胞的抑制率显著大于另外两组,表明卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体显著提高了卡铂的作用效果。

[0066] 其中,细胞抑制率的计算如下:细胞抑制率(%) = (对照组吸光度值-实验组吸光度值)/对照组吸光度值×100%。<sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01, <sup>\*\*\*</sup>P<0.001, <sup>\*\*\*\*</sup>P<0.0001。

[0067] 试验例2流式细胞术用于检测药物(KC26多肽修饰的牛奶外泌体包载卡铂)对细胞(视网膜母细胞瘤细胞系Y79和WERI-Rb1细胞)凋亡能力的影响

[0068] 收集接种于6孔板中的视网膜母细胞瘤细胞系Y79和WERI-Rb1细胞并用磷酸盐缓冲液洗涤两次。根据细胞凋亡检测试剂盒,把收集的细胞悬浮于缓冲液中。然后加入异硫氰酸荧光素和碘化丙啶室温避光反应10-15分钟。最后使用流式细胞仪检测凋亡细胞。

[0069] 视网膜母细胞瘤细胞系Y79的测试试验中,细胞凋亡率(%) = Q2+Q3。阴性对照组不给药,三组实验组中卡铂的浓度为50微克/毫升,结果见图4。

[0070] 由图4可得,卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体对肿瘤细胞凋亡率的影响具有显著意义,且相同浓度下卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体对Y79细胞的凋亡率显著大于另外两组,表明卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体显著提高了卡铂的作用效果。<sup>\*\*\*</sup>P<0.001, <sup>\*\*\*\*</sup>P<0.0001。

[0071] WERI-Rb1细胞的测试试验中,细胞凋亡率(%) = Q2+Q3。阴性对照组不给药,三组实验组中卡铂的浓度为50微克/毫升,结果见图5。

[0072] 由图5可得,卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体对肿瘤细胞凋亡率的影响具有显著意义,且相同浓度下卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体对Y79细胞的凋亡率显著大于另外两组,表明卡铂-KC26多肽-牛奶外泌体显著提高了卡铂的作用效果。<sup>\*\*</sup>P<0.01, <sup>\*\*\*</sup>P<0.001, <sup>\*\*\*\*</sup>P<0.0001。

[0073] 以上仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。



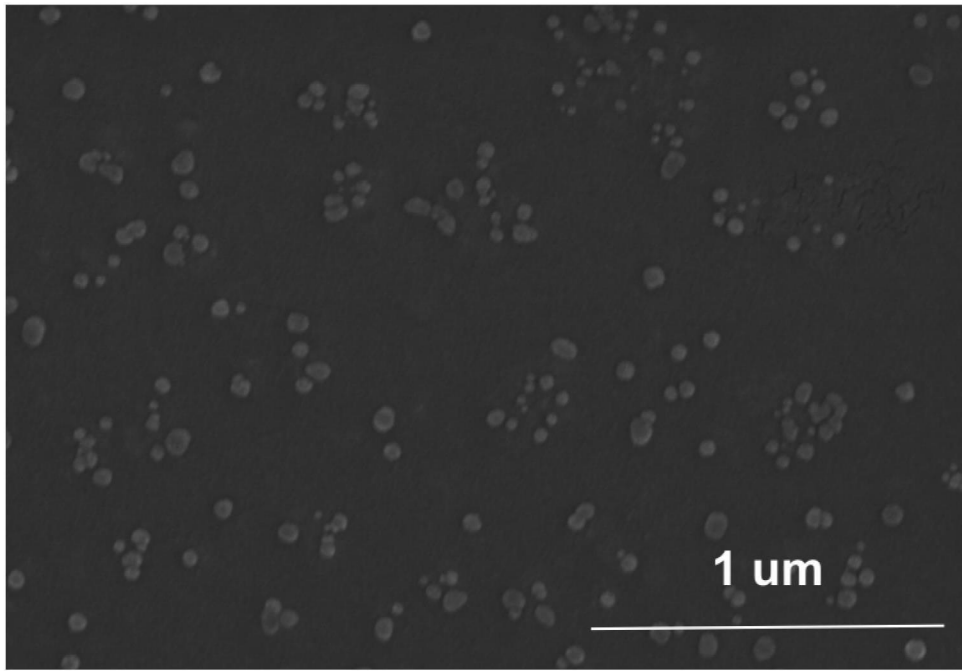


图1

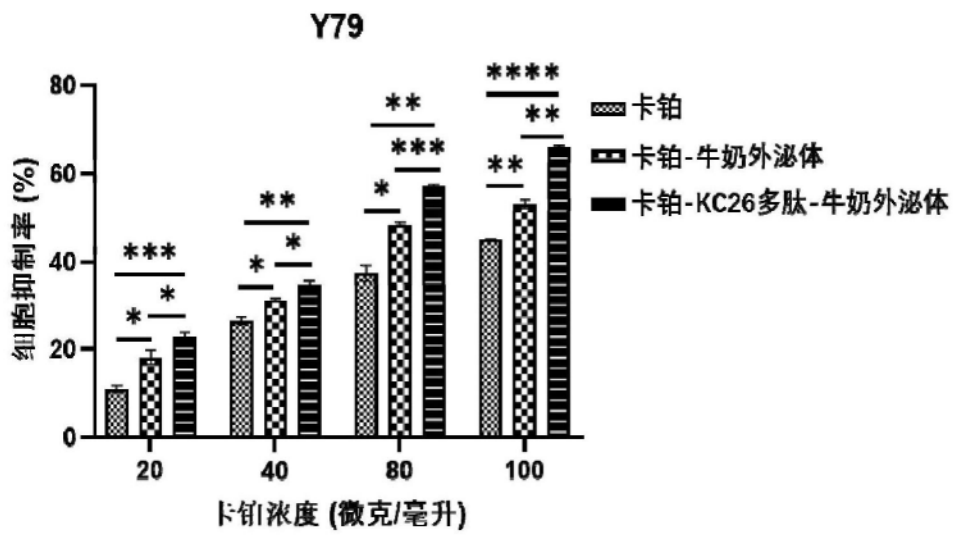


图2

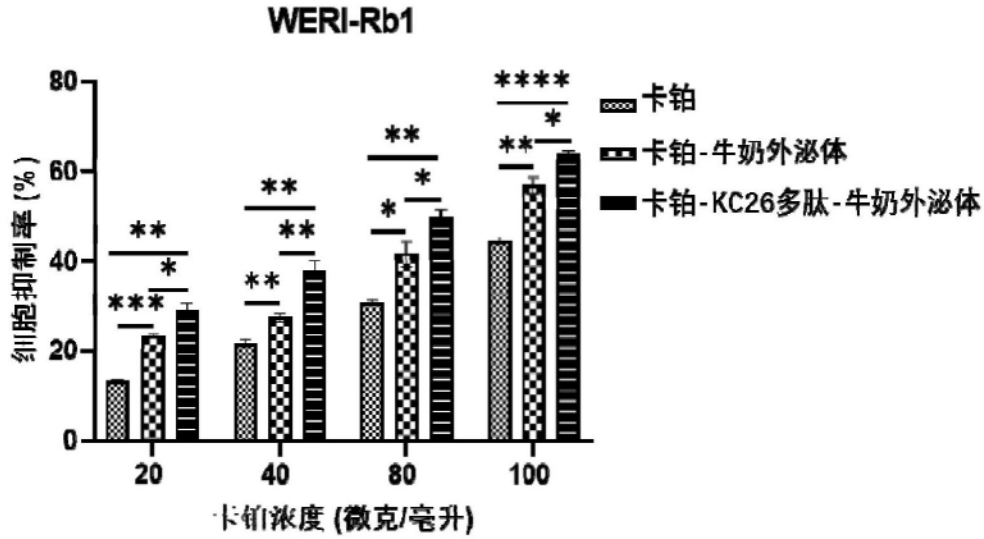


图3

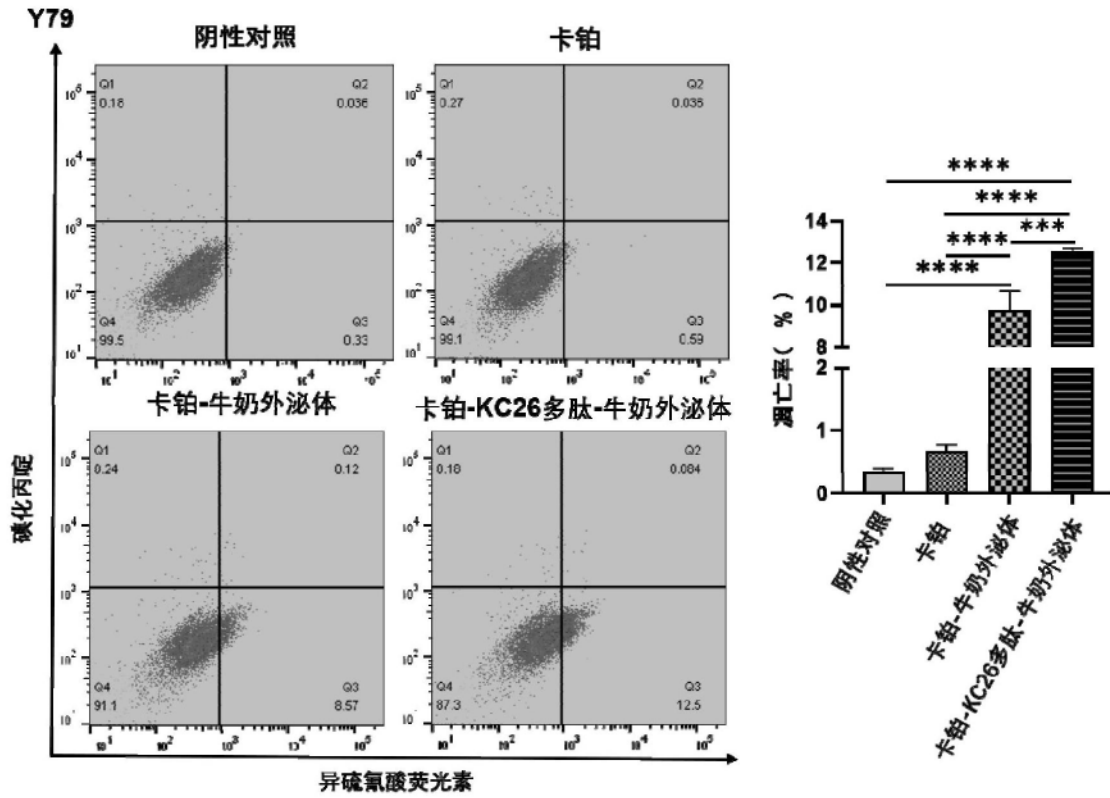


图4

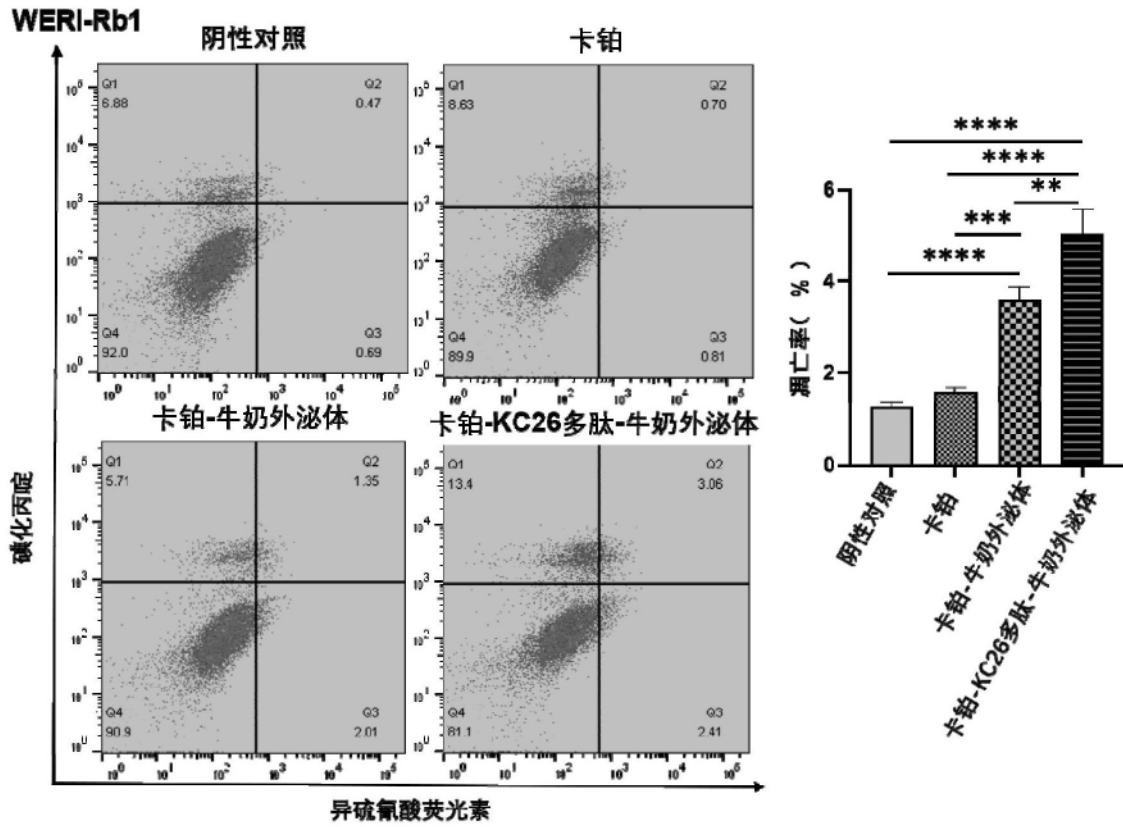


图5