



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109337873 A

(43)申请公布日 2019.02.15

(21)申请号 201811153193.9

(22)申请日 2018.09.30

(71)申请人 北京鼎成肽源生物技术有限公司
地址 100096 北京市昌平区回龙观镇生命园路20号院7号楼一层东北侧

(72)发明人 焦顺昌 张嵘 张天赋 周子珊
解佳森 王海燕 吴子明

(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
代理人 郭晓迪

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

一种LRFF细胞

(57)摘要

本发明使用患者外周血进行ctDNA测序或肿瘤组织进行全外显子测序,筛选出突变位点进行抗原表位预测,连接并合成突变多肽表达基因序列;同时构建慢病毒载体,包装慢病毒,转染APC细胞,完成特异性LV细胞的改造,体外与从外周血中分离的PBMC共培养,筛选出有效的精准多肽,通过精准多肽刺激的第二次冲击,将普通T细胞改造成为具有更精准杀伤能力的LRFF细胞,提高了T细胞对肿瘤细胞的杀伤力。发明提供的LRFF细胞可广泛应用于个体化精准治疗实体肿瘤。

1. 一种LRFF细胞,其特征在于,所述LRFF细胞由以下步骤制备:1) 使用人源外周血进行ctDNA测序或肿瘤组织进行全外显子测序,筛选出突变位点;2) 根据突变位点进行抗原表位预测,合成突变多肽的基因序列;3) 构建表达突变多肽的慢病毒载体,包装慢病毒;4) 转染抗原递呈细胞并与PBMC共培养,获得LFF细胞;4) 所述突变多肽作为抗原刺激所述LFF细胞,筛选出有效的精准多肽;5) 以所述精准多肽作为抗原再次刺激所述LFF细胞,筛选出能够识别所述精准多肽的特异性细胞,即得LRFF细胞。

2. 如权利要求1所述的LRFF细胞,其特征在于,所述人源外周血也可以是市售工程细胞系。

3. 如权利要求1所述的LRFF细胞,其特征在于,所述抗原表位预测是以突变的氨基酸位点为中心,向两侧各延伸8个氨基酸,将这段17个氨基酸的多肽作为潜在抗原表位;使用预测软件分析潜在抗原表位的IC50,如 $IC_{50} < 1000nM$ 则认为此潜在抗原表位为抗原表位。

4. 如权利要求1所述的LRFF细胞,其特征在于,所述抗原递呈细胞包括:外周血单个核细胞、树突状细胞、中性粒细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞。

一种LRFF细胞

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种LRFF细胞及其制备方法。

背景技术

[0002] 目前,在肿瘤的特异性免疫治疗方面,现有的LAK、DC、CIK、DC-CIK细胞和方法基本被证明是无效的,而NK、CAR-NK、TIL等细胞技术还有待成熟,CAR-T细胞在安全性和实体瘤治疗中还有缺陷。现有技术一般通过改造DC细胞,由DC递呈T细胞产生特异杀伤。有些实验室在尝试用病毒做为载体的方法进行转染递呈T细胞,诱导T细胞的特异性杀伤。我们也曾用突变混合多肽直接刺激PBMC,诱导T细胞。

[0003] 以上治疗方法都有局限性,尤其是体外诱导DC细胞及DC细胞负载肿瘤抗原技术理论上研究较多,但在具体实施过程中还有许多问题,缺乏明确的、肿瘤细胞发生发展关键的信号传导通路相关分子作为诱导抗原,因为肿瘤抗原不明及肿瘤微环境免疫抑制的障碍,使实现特异性细胞靶向免疫治疗难以顺利实施。另外,有的虽然进行了抗原体外冲击,但没有进行体外共培育和体外扩增,让较为单薄的特异性细胞直接面对复杂的肿瘤免疫微环境,因此,很难起到预期的效果。也有的虽然也可以体外递呈和共培育,但靶点单一(MAGE-3),仅对非小细胞肺癌等个别癌种起效。虽然也有尝试慢病毒为载体的方法进行转染递呈,但安全性、方便性不如多肽方式。而简单混合多肽的直接刺激,虽然简单方便,但效率较低。

[0004] 上述方案普遍缺乏对患者抗原准确有效的分析,更有效的方式应该是既要考虑安全性问题,又要兼顾抗原递呈效率,这样才能达到精准治疗的目的。

发明内容

[0005] 本发明使用患者外周血进行ctDNA测序或肿瘤组织进行全外显子测序,筛选出突变位点进行抗原表位预测,连接并合成突变多肽表达基因序列;同时构建慢病毒载体,包装慢病毒,转染APC细胞,完成特异性LV细胞的改造,体外与从外周血中分离的PBMC共培养,筛选出有效的精准多肽,通过精准多肽刺激的第二次冲击,将普通T细胞改造成为具有更精准杀伤能力的LRFF细胞,提高了T细胞对肿瘤细胞的杀伤力。

[0006] 本发明提供的LRFF细胞可广泛应用于个体化精准治疗实体肿瘤。

[0007] 对于专用名词的解释:

[0008] L:慢病毒转染技术

[0009] R:精准多肽二次冲击技术

[0010] FF:混合多肽技术

[0011] 例如:LRFF细胞,即经由上述L、R、FF各项技术方案或技术手段改造而最终获得的细胞。

[0012] LRFF细胞改造方案概述如下:

[0013] 1、抗原表位预测

[0014] 1) 使用人源外周血进行ctDNA测序或市售工程细胞系(如H1299、H226、H358、

H1563、H2228、A549、Renca、LLC小鼠Lewis肺癌细胞、CRL-6323B16F1、CRL-2539 4T1、U14小鼠子宫颈癌细胞、BV-2小鼠小胶质瘤细胞、G422小鼠神经胶质瘤细胞等)进行MHC类型检测和全外显子测序检测RNA突变;

[0015] 2) 利用MHC类型和基因突变信息预测抗原表位:以突变的氨基酸位点为中心,向两侧延伸8个氨基酸,将这段17个氨基酸的多肽作为潜在抗原表位;

[0016] 3) 使用预测软件分析潜在抗原表位的IC₅₀,如IC₅₀<1000nM则认为此潜在抗原表位为抗原表位;

[0017] 2、多肽连接

[0018] 1) 使用前述软件分析任意抗原表位两两相连后接头处的IC₅₀,IC₅₀≥1000nM时认为是弱免疫原性,可以连接;IC₅₀<1000nM时认为是强免疫原性,不能连接;

[0019] 2) 根据上述结果,将弱免疫原性的抗原表位连接在一起,接头处IC₅₀要高于两侧抗原表位的IC₅₀(也就是接头处尽量避免产生强结合抗原);

[0020] 3、合成编码多肽的基因序列

[0021] 1) 将连接后的多肽还原为核酸序列,并进行密码子优化;

[0022] 2) 使用固相合成法合成抗原表位肽的基因序列;或由技术服务公司进行合成;

[0023] 4、慢病毒包装

[0024] 将上步合成的基因序列构建表达抗原表位肽的慢病毒表达质粒后,进行慢病毒包装;

[0025] 5、转染抗原递呈细胞(APC)并与PBMC共培养

[0026] 1) 使用表达抗原表位肽的慢病毒转染抗原递呈细胞(包括但不限于:外周血单个核细胞、树突状细胞、中性粒细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞);

[0027] 2) 收集处理完成的APC,以APC:PBMC=1:5-20的比例混合共培养,得到效应细胞;

[0028] 6、筛选有效的精准多肽,并使用精准多肽再次刺激T细胞

[0029] 1) 离心收集以上方案获得的T细胞,多肽作为抗原直接刺激T细胞筛选精准多肽;

[0030] 2) 设置阳性对照:T细胞+100ng/mL OKT3;阴性对照:T细胞+1640+10%FBS+200U/mL IL2;

[0031] 3) 精准多肽评判标准:

[0032] a. 阳性对照和阴性对照正常,则说明此数据可信;

[0033] b. 实验组显著大于阴性对照组的为有效的精准多肽;

[0034] 4) 以筛选出的精准多肽二次冲击T细胞,筛选出能够识别所述精准多肽的特异性细胞,即得LRFF细胞;

[0035] 7、构建特异性抗原表达靶细胞及肿瘤模型生存实验。

[0036] 本发明的有益效果:

[0037] 1. 本发明新型特异性LRFF细胞,在LV细胞的基础上,找出精准多肽进行二次刺激,更好地解决了患者免疫细胞不能准确识别和杀伤肿瘤细胞的问题,同时弥补了LV细胞和RFF细胞的不足,RFF的杀伤效率不如LRFF细胞,LV细胞的特异性不如LRFF细胞。

[0038] 2. 肿瘤抗原为突变抗原,与其它组织不同,靶点专一性强,不易发生脱靶效应,安全性高;

[0039] 3. 获得的特异性细胞比例高,通常能够识别肿瘤抗原的特异性细胞,在PBMC的分

布为0.5%以下,经过LRFF方案改造的细胞,识别肿瘤抗原的特异性T细胞(TCR+)比例为10%以上。

附图说明

- [0040] 图1:慢病毒转染APC效率检测;其中,1A:对照组,1B:转染组。
- [0041] 图2:LRFF细胞分型检测。
- [0042] 图3:精准多肽的筛选。
- [0043] 图4:流式检测特异性T细胞比例;其中,4A:对照组,4B:LRFF方案。
- [0044] 图5:LDH释放检测细胞杀伤效率。
- [0045] 图6:ELISA检测细胞因子IFN- γ 的释放。
- [0046] 图7:动物荷瘤模型生存曲线。

具体实施方式

[0047] 下面通过具体的实施方案叙述本发明。除非特别说明,本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外,实施方案应理解为说明性的,而非限制本发明的范围,本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

[0048] 技术方案详述如下:

[0049] 1、抗原表位预测

[0050] 1) 使用肺癌患者外周血进行ctDNA测序和HLA分型检测;

[0051] 2) 利用软件对测序信息进行分析:将ctDNA测序结果与正常细胞的基因组相比,筛选出突变位点;

[0052] 3) 以突变的氨基酸位点为中心,向两侧延伸8个氨基酸,将这段17个氨基酸的多肽作为潜在抗原表位;

[0053] 4) 使用预测软件分析潜在抗原表位的IC₅₀(推荐软件:NetMHCpan 3.0、PickPocket、artificial neural networks(ANN)),如IC₅₀<1000nM则认为此潜在抗原表位为抗原表位。

[0054] 2、多肽连接

[0055] 1) 使用前述软件分析任意抗原表位两两相连后接头处的IC₅₀,IC₅₀≥1000nM时认为是弱免疫原性,可以连接;IC₅₀<1000nM时认为是强免疫原性,不能连接(此处应考虑3个预测软件的IC₅₀计算结果,当≥2个软件计算的IC₅₀≥1000nM时才能认为是弱免疫原性,当≥2个软件计算的IC₅₀<1000nM时才能认为是强免疫原性);

[0056] 2) 根据上述结果,将抗原表位连接在一起,接头处IC₅₀要高于两侧抗原表位的IC₅₀(也就是接头处尽量避免产生强结合抗原);必要时将弱免疫原性肽做为连接肽将强免疫原性肽间隔;或者添加患者自身氨基酸到接头处,用来降低产生强抗原的可能性。

[0057] 3、合成编码多肽的基因序列

[0058] 1) 将连接后的多肽还原为核酸序列,并进行密码子优化;

[0059] 连接完成后的核酸序列如果较短(<100bp)可以适当把氨基酸序列进行重复,但

是,需要注意还原成基因序列时,应尽量避免基因序列中反向重复、直接重复和镜像重复序列的出现

[0060] 2) 使用固相合成法合成抗原表位肽的基因序列(由技术服务公司进行合成)。

[0061] 4、慢病毒包装

[0062] 1) 将合成的抗原表位肽基因序列克隆到pCDH-MSCV-MCS-EF1-copGFP质粒

[0063] 中,构建表达抗原表位肽的慢病毒表达质粒;

[0064] 2) 慢病毒包装:

[0065] a. 复苏293T细胞,传两代后用于慢病毒包装;

[0066] b. 细胞转染:(T175培养瓶)

[0067] 取一支15ml离心管(标记为A),将400 μ L Lipofectamine 2000轻轻地加入4mL DMEM 中,轻轻地混匀,室温静置培养5min;

[0068] 另取两支15mL离心管(标记为B和C,B为对照组,C为实验组),加入以下试剂并轻轻地混匀,室温静置培养5min;

	试剂名称	试剂数量
B 管	对照质粒 (0.23 μ g/ μ L)	34.8 μ L
	包装质粒 mix (1 μ g/ μ L)	24 μ L
	DMEM	1.75mL
[0069] C 管	含 目 的 基 因 的 pCDH-MSCV-MCS-EF1-copGFP 质 粒 (1.95 μ g/ μ L)	4.1 μ L
	包装质粒 mix (1 μ g/ μ L)	24 μ L
	DMEM	1.75mL

[0070] 将A管液体平均转入到B管和C管内,轻轻地混匀,室温静置培养20min。

[0071] 将T175中旧的培养基倒出,使用PBS把细胞洗一遍,换成新的25mL DMEM(不含抗生素和血清),轻轻地加入A、B或A、C混合液,轻轻摇匀,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养;

[0072] 转染6h后,吸去含有转染复合物的培养基,更换为37 $^{\circ}$ C预热的新鲜培养基;培养48h,并收集;

[0073] 3) 慢病毒浓缩及滴度测定:

[0074] 慢病毒包装成功后,收集慢病毒上清液,4 $^{\circ}$ C,4000g离心10min;用0.45 μ m滤器过滤上清液,除去细胞碎片;按照病毒上清液:浓缩试剂=5:1的比例混合,4 $^{\circ}$ C放置2h或者过夜;将孵育好的混合液于4 $^{\circ}$ C,4000g离心30min,即可见管底有米白色沉淀;小心移去上清(切勿碰触沉淀物);加入适量体积的DMEM或者PBS,轻轻吹打重悬沉淀物;按需求分装病毒,-80 $^{\circ}$ C保存(注:慢病毒切忌反复冻融,每冻融一次,慢病毒效价将下降10%-20%);

[0075] 测定前一天,将生长状态良好的293H细胞消化计数后稀释至5 \times 10⁴/mL,加入96孔板,100 μ L/孔,为每个病毒准备8-10个孔。放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养

[0076] 取一定量的病毒液感染细胞:在EP管中做10倍梯度稀释。稀释方法如下:每种病毒准备10个1.5mL EP管,每管加入90 μ L培养液,往第一个管中加入10 μ L病毒原液,记作10⁰;混匀后,吸取10 μ L加入第二个管混匀,记作10⁻¹;以此类推(10⁰-10⁻⁸),在对应细胞孔中加入10 μ L稀释好的病毒液并做好标记,培养48-72h后观察结果;

[0077] 滴度计算:对于带有荧光标记的慢病毒可使用荧光技术法测定滴度;在荧光显微

镜下观察结果,并数出最后两个有荧光的荧光细胞克隆数,假设为X和Y,则滴度(TU/mL) = $(X+Y \times 10) \times 1000/2/X$ 孔的病毒液的含量(μ L)。

[0078] 5、慢病毒转染抗原递呈细胞(APC)并与PBMC共培养

[0079] 1) 使用RPMI-1640配制含有300U/mL rIL-2,10%FBS的全细胞培养基,记为 RPMI-10-IL-2;使用RPMI-10-IL-2把APC细胞浓度调整到 1×10^6 /mL;使用表达抗原表位肽的慢病毒以MOI=5-20感染APC(包括但不限于:外周血单个核细胞、树突状细胞、中性粒细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞);放入37℃培养72h;

[0080] 4) 收集处理完成的APC,以APC:PBMC=1:5-20的比例混合,PBMC约为 5×10^7 ,加入50mL OKM100培养基到T75培养瓶中;放入30-37℃细胞培养箱中培养14天,即获得 LFF方案效应细胞。

[0081] 6、筛选有效的精准多肽

[0082] 多肽作为抗原直接刺激效应细胞筛选精准多肽:

[0083] 1) 离心收集以上LFF方案细胞,1500rpm离心5min收集T细胞,加入10mL PBS重悬细胞并计数,1500rpm离心5min,收集T细胞以1640+10%FBS+200U/mL IL2重悬,计数调整至 1×10^6 cells/mL;

[0084] 2) 以排枪将T细胞分至96孔平底板中,200 μ L/孔,细胞数为 2×10^5 cells;再分别加入 10 μ L 1mg/mL的突变多肽,终浓度为50 μ g/mL,每条多肽设置3复孔;

[0085] 3) 设置阳性对照:T细胞+100ng/mL OKT3;阴性对照:T细胞+1640+10%FBS+200U/mL IL2;

[0086] 4) 37℃、5%CO₂刺激24h后,1500rpm离心10min,转移140 μ L上清至新的96孔板中;

[0087] 5) 再将96孔板进行离心,1500rpm 10min,取样品进行ELISA检测(或将样品至于-80℃保存);

[0088] 检测IFN- γ 的ELISA系统:

[0089] 1) 目前测试过可用于检测IFN- γ 的ELISA试剂盒有Biolegend:LEGEND MAX Human IFN- γ ELISA Kit with Pre-coated Plates(货号:430107)和达科为:Human IFN- γ ELISA Kit(货号:DKW12-1000-096),请严格按照厂家说明书进行操作;

[0090] 2) ELISA手动包板系统(15块板):Human IFN-gamma DuoSet 15plate(货号: DY285B) \times 1,DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2(货号:DY008) \times 3;

[0091] 精准多肽评判标准:

[0092] 1) 阳性对照和阴性对照正常,则说明此数据可信;

[0093] 2) 实验组显著大于阴性对照时,说明多肽为有效的精准多肽。

[0094] 7、以筛选出的精准多肽二次冲击T细胞

[0095] 1) PBMC以步骤5培养至第2~14天时,取 2×10^7 的效应细胞,加入终浓度为10 μ g/mL~100 μ g/mL的精准多肽,冲击1-4h;

[0096] 2) 冲击4h后,转入OKM25预包板的6孔板中或T25cm²培养瓶,补OKM100+12%FBS,37℃5%CO₂培养,根据细胞生长情况,转移至T75培养瓶中,尽量保持细胞密度在 1×10^6 cells/mL;

[0097] 3) 进入T175培养瓶中时,培养基为OKM200+5%FBS,培养10~14天即可获得精准多肽二次冲击得到的T细胞;

[0098] 8、构建特异性抗原表达靶细胞及肿瘤模型生存实验

[0099] 1) 构建可以表达筛选的精准多肽(特异性抗原)的慢病毒载体。

[0100] 2) 将特异性抗原表达慢病毒载体包装成慢病毒颗粒,感染HLA配型合适的肿瘤细胞,稳定过表达特异性抗原,流式检测表达水平及表达强度。

[0101] 3) 稳定过表达特异性抗原肽的肿瘤细胞系接种NSG小鼠,做异位荷瘤动物模型。将 5×10^5 表达特异性抗原的肿瘤细胞悬于100 μ l生理盐水中,分别皮下注射至30只NSG小鼠的右侧肋部皮下,同时对小鼠进行编号。

[0102] 4) 在肿瘤生长至100-120mm³左右时分组回输细胞,根据肿瘤体积大小,将动物模型随机分成三组,每组5-6只小鼠,一组给予安慰剂生理盐水,一组给予没有进行任何遗传操作的T细胞(对照组) 1×10^7 ,一组给予LRFF细胞 1×10^7 ,首次注射细胞7天后进行第二次注射,7天之后第三次注射细胞,连续观察60天,统计存活数据,绘制生存曲线。

[0103] 试验结果:

[0104] 1、突变位点及抗原表位预测

[0105] 表1为测序检测到的突变位点及抗原表位预测结果;

[0106] 表1抗原表位预测

[0107]

多肽编号	抗原表位	与 HLA 的亲合力 (nM)
1	SSMQTGMNL	15.5
2	AVGKHTLK	34.77
3	IVIPNDGLY	33.3
4	YMFQRNVNSVL	18.17
5	ASDVDYCVAK	32.4
6	NMAVGKHTLK	240.35
7	FVNVTFQMK	75.79
8	VLMPKAV	57.82
9	TQFVNVTFQMK	91.58

[0108]

10	QPIEWVKDTY	16.22
11	QASSPPVGIPM	30.21
12	KLATRYVFQI	21.2

[0109] 2、慢病毒转染APC效率检测

[0110] 1) 使用RPMI-1640配制含有300U/mL rIL-2,10%FBS的全细胞培养基,记为 RPMI-10-IL-2;使用RPMI-10-IL-2把APC细胞浓度调整到 1×10^6 /mL;使用表达抗原表位肽的慢病毒以MOI=5-20感染APC(包括但不限于:外周血单个核细胞、树突状细胞、中性粒细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞);放入37 $^{\circ}$ C培养72h;

[0111] 2) 使用流式细胞仪检测APC中GFP阳性比例(如图1所示)。

[0112] 3、LFF细胞分型检测

[0113] LFF方案细胞培养结束后,进行CD4+、CD8+细胞的分型检测,结果如图2所示:CD8+T细胞为89.1%,CD4+T细胞为8.11%。

[0114] 4、以LFF细胞筛选精准多肽

[0115] 以12条多肽分别刺激培养的T细胞,通过检测IFN- γ 的分泌,检测有效的多肽,结果如图3所示:3号和7号多肽引起的IFN- γ 的释放量>阴性对照的释放量,属于有效精准多肽。

[0116] 5、对精准多肽特异性的T细胞的鉴定及分选

[0117] 以筛选的3号和7号多肽,刺激LFF方案细胞,以流式检测对精准多肽特异性的T细胞比例,结果如图4所示,FL1+为特异性T细胞:LRFF方案细胞,3号和7号多肽引起的释放IFN- γ 的细胞比例,明显高于没有刺激的细胞(对照组),说明,LRFF方案,可以获得对精准多肽的特异性T细胞;

[0118] 6、LRFF细胞对靶细胞的杀伤作用

[0119] 分别以对照细胞和LRFF细胞对突变抗原表位来源的靶细胞进行杀伤效率的检测,以无处理的细胞作为对照(Mock),效靶比设置为40:1,结果如图5所示,与对照组相比,LRFF细胞对靶细胞有较强的杀伤效果。

[0120] 7、LRFF细胞释放细胞因子的检测

[0121] 肿瘤细胞与效应细胞共培养时,由于效应细胞,可以识别肿瘤细胞上突变抗原,因此,会产生一系列的细胞因子,IFN- γ 是抗肿瘤作用中最主要的细胞因子之一,图6为LRFF细胞与肿瘤细胞1:1共培养时,释放的IFN- γ 的检测,结果表明:与效应细胞自身产生的IFN- γ 相比(T cells only),与肿瘤细胞共培养后,LRFF细胞可产生大量的IFN- γ 此结果与杀伤实验结果一致说明:精准多肽再次刺激的特异性T细胞可以更有效的提高抗肿瘤能力。

[0122] 8、构建特异性抗原表达靶细胞及肿瘤模型生存实验

[0123] 成功构建了特异性抗原表达肿瘤靶细胞系,建立荷瘤动物模型,结果显示(图7),LRFF细胞对肿瘤荷瘤小鼠的生存改善具有显著影响作用。

[0124] 9、临床案例:

[0125] 某男:57岁

[0126] 疾病诊断:左肾肿瘤;

[0127] 第一疗程:每个月一次LRFF细胞,数量 1×10^9 个细胞,共2次;

[0128] 第二疗程:每半年一次LRFF细胞,数量 1×10^9 个细胞,共2次;

[0129] 给药结束后,22个月无进展生存;

[0130] 其它案例:

[0131]

患者编号	疾病诊断	无进展生存时间
1	胃腺癌肝转移	2015.4-至今
2	胃癌	2015.4-至今
3	肺癌	2015.5-至今
4	肺腺癌	2015.5-至今

5	肺腺癌	2015.5-至今
6	食管癌	2015.6-至今

[0132] 注：“至今”的含意为“申请日前一天”。

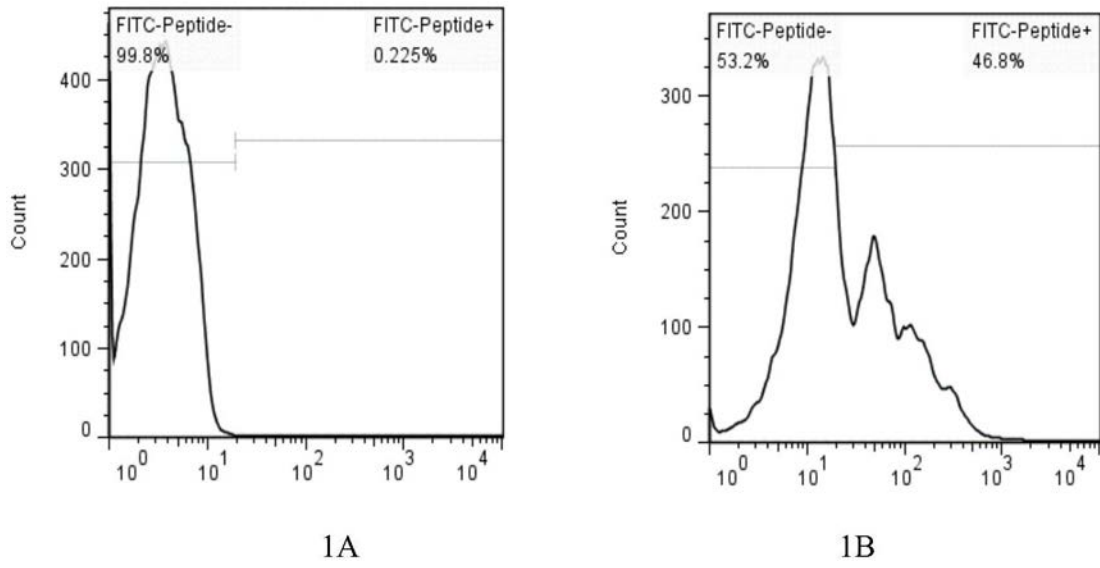


图1

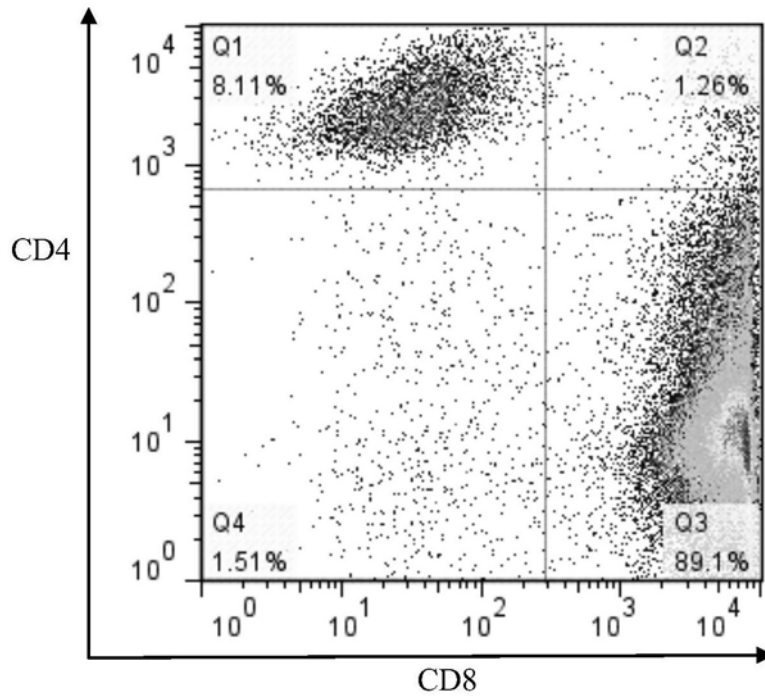


图2

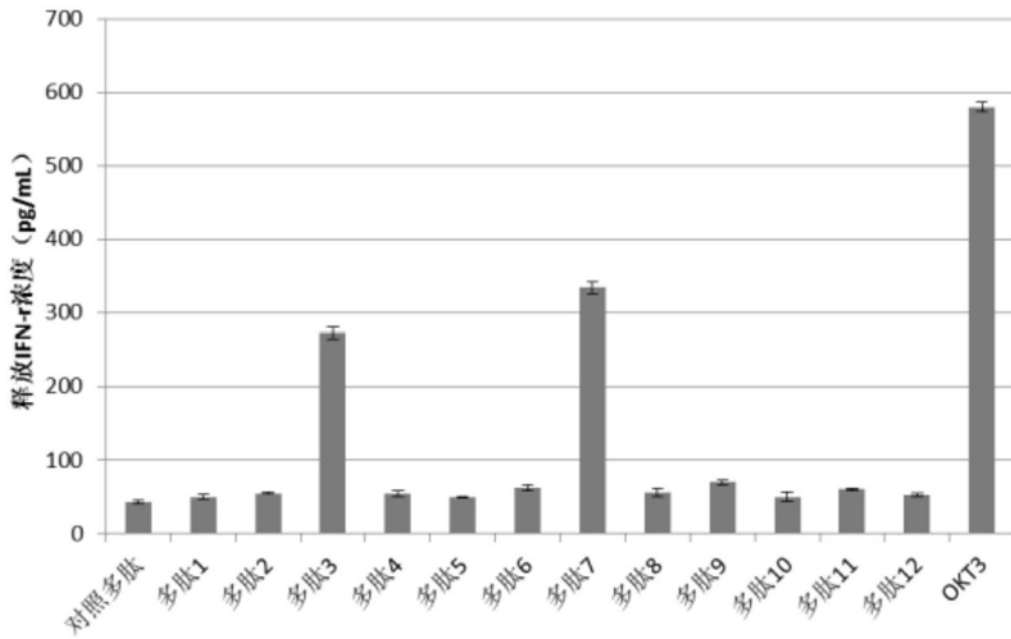


图3

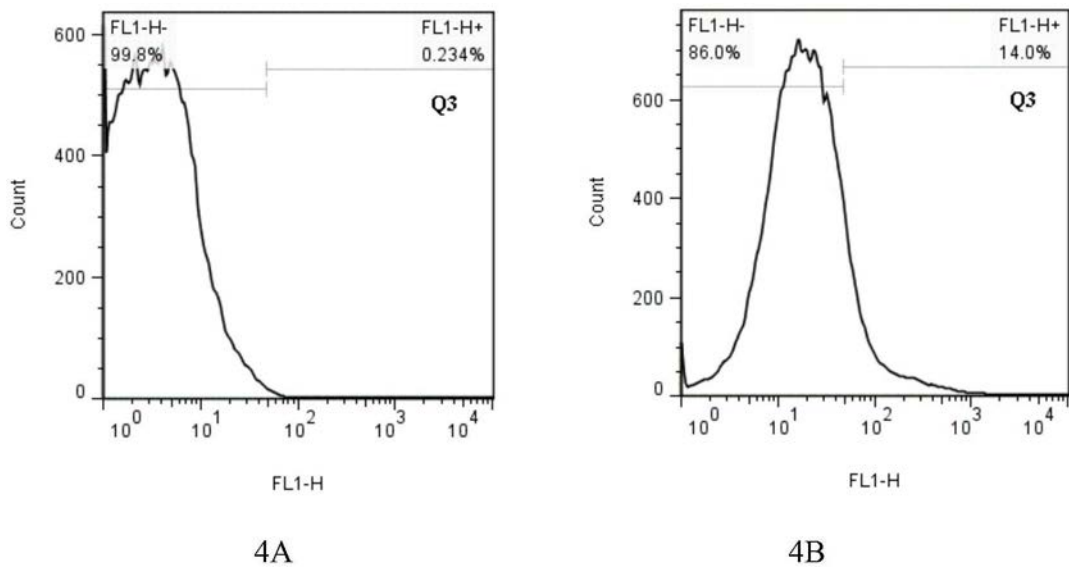


图4

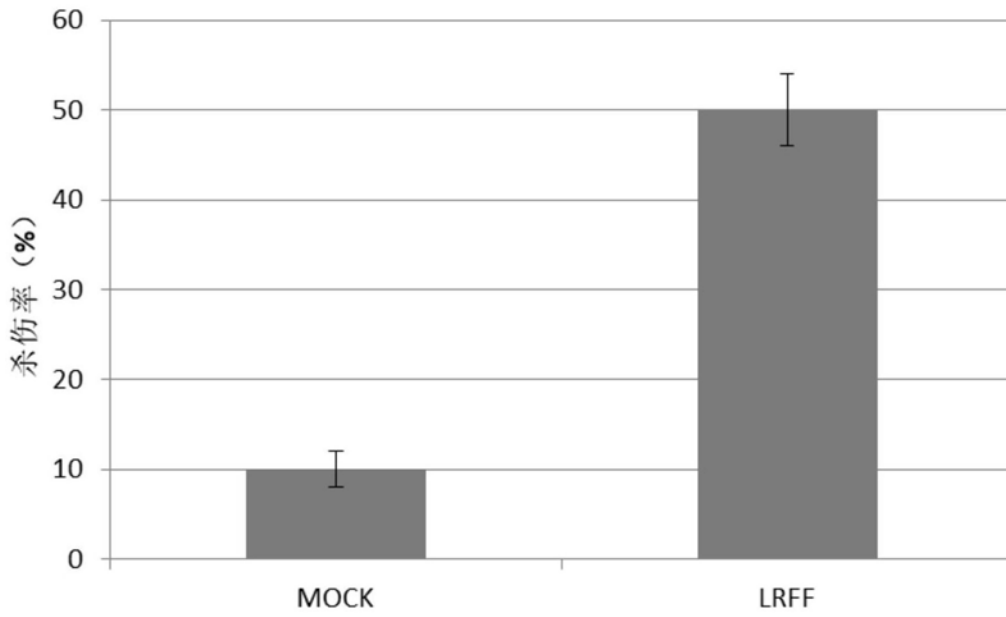


图5

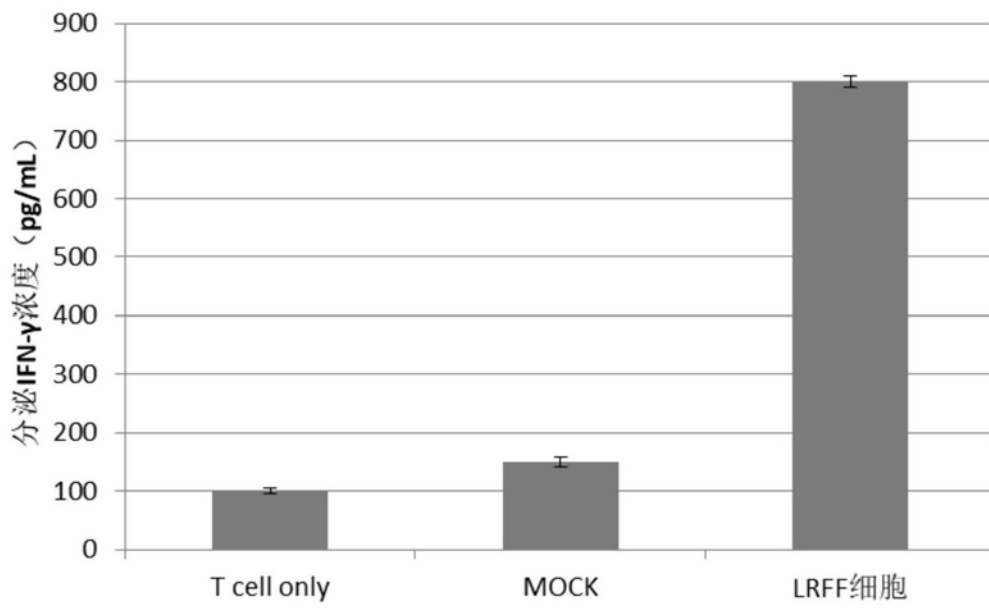


图6

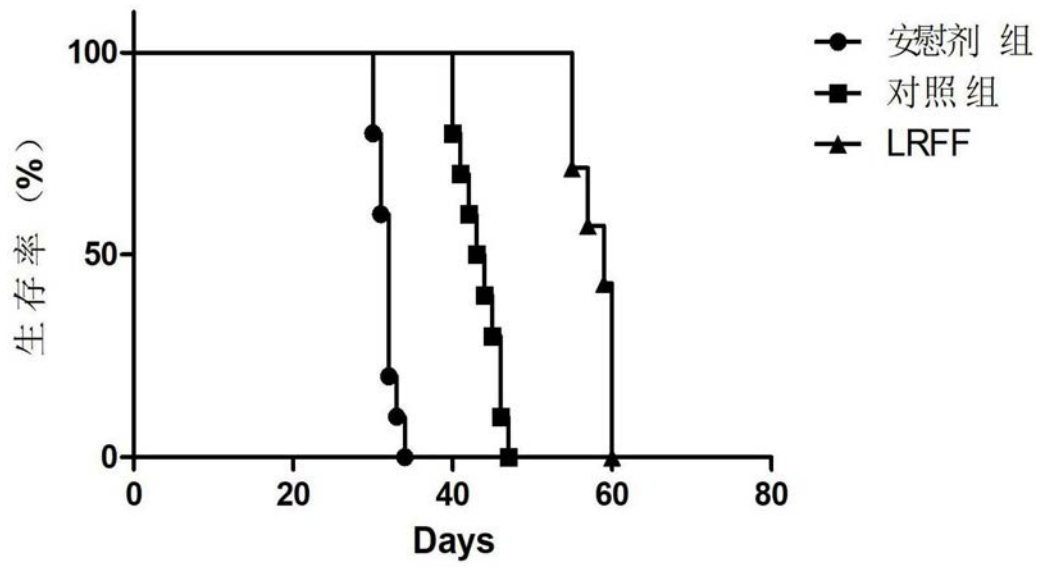


图7