



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110358736 B

(45) 授权公告日 2023.07.07

(21) 申请号 201910620164.7

C12N 15/85 (2006.01)

(22) 申请日 2016.05.20

C12N 13/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110358736 A

(43) 申请公布日 2019.10.22

(62) 分案原申请数据
201610340117.3 2016.05.20

(73) 专利权人 杭州朔溪生物医药有限公司
地址 311231 浙江省杭州市萧山区宁围街
道传化科创大厦1幢703-15室

(72) 发明人 卓朗 王晖 王柯

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理
有限公司 11112
专利代理师 樊晓焕 张苏娜

(51) Int. Cl.
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(56) 对比文件

CN 105112370 A, 2015.12.02
CN 105143441 A, 2015.12.09
CN 101684456 A, 2010.03.31
CN 102559600 A, 2012.07.11
黄庆生等. 人NK细胞体外高效扩增的实验研究.《细胞与分子免疫学杂志》.2008, (第12期),
邵阳等. 体外扩增肾癌患者自体NK细胞及其对人肾细胞癌786-0细胞的杀伤.《中国肿瘤生物治疗杂志》.2012, (第06期),
周智锋等. 细胞因子组合体外扩增人NK细胞的研究.《中华肿瘤防治杂志》.2014, (第03期),
曹正锋等. 双表达外源性4-1BBL/IL-15的K562细胞活化外周血淋巴细胞的研究.《现代免疫学》.2007, (第01期),

审查员 周韵品

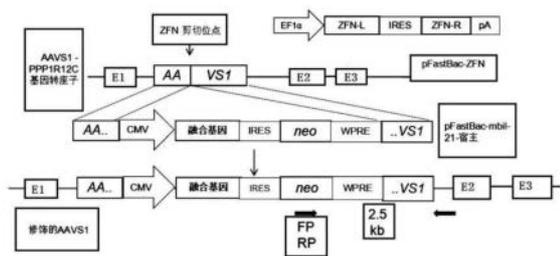
权利要求书1页 说明书6页 附图6页

(54) 发明名称

一种修饰的K562细胞、其制备方法及NK细胞培养组合物

(57) 摘要

本发明提供一种修饰的K562细胞、其制备方法及NK细胞培养组合物。所述修饰的K562细胞是通过将融合基因通过质粒进行基因重组至K562细胞的AAVS1转座子而得到的；其中，所述融合基因包括人源基因，其中所述人源基因包括mbIL15、4-1BBL和mbIL21。所述修饰的K562细胞是通过使用位点特异性基因的整合技术开发出的细胞系，通过其扩增的NK细胞具有较高的细胞活性、纯度、细胞毒性和扩增效率；具有极大的市场前景和经济价值。



1. 一种修饰的K562细胞,其特征在于,所述修饰的K562细胞是通过将融合基因通过质粒进行基因重组至K562细胞的AAVS1转座子而得到的;其中,所述融合基因为人源基因mbIL15、4-1BBL和mbIL21。

2. 如权利要求1所述的修饰的K562细胞,其特征在于,所述质粒的骨架为pFastBac1。

3. 如权利要求2所述的修饰的K562细胞,其特征在于,所述质粒的骨架的启动子为巨细胞病毒启动子。

4. 如权利要求1所述的修饰的K562细胞,其特征在于,所述基因重组使用锌指核酸酶ZFN介导的同源重组技术。

5. 一种NK细胞培养组合物,其特征在于,该NK细胞培养组合物包含如权利要求1-4任一项所述的修饰的K562细胞、IL-2和无血清干细胞生长培养基。

6. 如权利要求5所述的NK细胞培养组合物,其特征在于,该NK细胞培养组合物还包括FBS。

7. 一种制备如权利要求1-4任一项所述的修饰的K562细胞的方法,包括:

构建pFastBac-融合基因;其中,所述融合基因为人源基因mbIL15、4-1BBL和mbIL21;

将K562细胞进行悬浮处理;

将pFastBac-ZFN和所述pFastBac-融合基因电转至所述K562细胞;

将经电转的所述K562细胞转移到K562生长培养基中进行培养;

培养后,进行单细胞克隆扩增、对单细胞克隆进行PCR基因分型、流式细胞术分析,制得稳定表达所述融合基因的所述修饰的K562细胞。

一种修饰的K562细胞、其制备方法及其NK细胞培养组合物

[0001] 本专利申请是申请号为201610340117.3、申请日为2016年5月20日、发明名称为“一种高效扩增冷冻保存NK细胞的方法及其应用”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于细胞工程领域,具体涉及一种修饰的K562细胞、其制备方法、以及包含所述修饰的K562细胞的NK细胞培养组合物。

背景技术

[0003] 人自然杀伤(NK)细胞是由表达CD56和缺乏CD3(CD-CD56+)的天然免疫系统的淋巴细胞组成的。NK细胞具有广谱的杀伤肿瘤细胞的功能,能够通过细胞毒性颗粒诸如穿孔素和颗粒酶,并通过如死亡受体相互作用,Fas-Fas配体结合和TNF相关的细胞凋亡诱导配体结合等机制发挥抗肿瘤作用。NK细胞还可以通过膜受体FcR γ III(CD16)介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。NK细胞的靶向识别和激活通过抑制和激活NK细胞表面受体和表达在靶细胞上的相关配体这个平衡来发挥作用,其允许对病原体入侵和恶变立即响应。这一独特的靶向识别NK细胞的机制不同于主要组织相容性复合体(MHC)限制性T细胞受体(TCR)的T细胞依赖性机制。因此,使用同种异体NK细胞来治疗癌症可能不会引起移植物抗宿主病(GVHD)。

[0004] 在健康受试者中,NK细胞大约占外周血单个核细胞(PBMC)的5-20%。在过继免疫治疗中,大剂量的NK细胞范围从 5×10^6 - 5×10^7 /kg体重每剂量,最多4剂量。现有技术中,能够从大量的外周血中富集扩增NK细胞的方法,多数是借助于使用侵入性白细胞分离和大型磁分离装置,这种方式十分昂贵,并对患者造成一定风险。另一种流行的NK细胞疗法是使用饲养细胞扩增NK细胞,如K562细胞修饰的膜结合分子,例如白介素(IL)-15和4-1BB配体(K562-mb15-41BBL)。这些饲养细胞可以迅速地从外周血单个核细胞扩增NK细胞,使NK细胞在第7天平均扩增21.6倍,第21天扩增277倍。但是,由于衰老导致的端粒酶缩短,所以会限制继续扩增。

[0005] 获得大剂量NK细胞通常需要扩增数周,回输的NK细胞必须是新鲜的,细胞培养和多剂量细胞输注之间的协调是具有极大的挑战性的。因此,扩增后的NK细胞的冻存是非常有必要的。然而,传统的NK细胞的冻存对细胞具有有害的影响,如降低NK细胞活力,细胞毒性以及对功能至关重要的NK细胞受体的表达。通常NK细胞无法从冻存解冻后立即裂解癌细胞,复苏的NK细胞需要用IL-2刺激过夜以恢复冻存的NK细胞的细胞毒性(Denman, Senyukov et al., 2012; Lapteva N et al., 2012)。因此,现有技术中,细胞存活性仍然是一个问题,并且复苏后的NK细胞存活不能持续超过一周。同时,复苏的NK细胞能否进一步扩增仍然不明。因此,本领域目前非常需要一种新的保持NK细胞活性和原有功能并且具有很好的扩增性的冻存方法。

发明内容

[0006] 为此,本发明所要解决的技术问题在于,提出一种保持NK细胞活性,功能以及扩增

性的冻存方法。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明公开了一种高效扩增冷冻保存NK细胞的方法,所述方法通过将融合基因通过质粒进行基因重组至AAVS1转座子,并在细胞扩增中间阶段引入冷冻/融化步骤至修饰K562细胞系为基础的NK细胞扩增步骤;最后进行NK细胞的扩增和保存。

[0008] 优选的,所述融合基因为人染色体19编码mbIL15,4-1BBL和mbIL21。

[0009] 优选的,所述融合基因的基因表达质粒骨架为pFastBac1。

[0010] 优选的,所述质粒骨架的启动子为巨细胞病毒。

[0011] 优选的,所述质粒的重组使用锌指核酸酶-介导的同源重组技术。

[0012] 优选的,所述基因重组的步骤具体为:

[0013] 将K562细胞进行悬浮处理;

[0014] 将pFastBac-ZFN和PFB-融合基因宿主电转至细胞;

[0015] 将电穿孔的细胞随后转移到K562生长培养基进行培养。

[0016] 培养后,进行扩增单细胞、克隆进行PCR基因分型、流式细胞术分析,制得稳定表达融合基因的细胞。

[0017] 优选的,所述NK细胞的扩增具体步骤为:

[0018] 先取外周血单个核细胞,并进行密度梯度法分析处理;

[0019] 然后使用无血清干细胞生长培养基对所述NK细胞进行扩增,并用PBMC与 γ 照射K562饲养细胞在NK细胞生长培养基中共同培养;

[0020] 将扩增得到的NK细胞在含有SCGM培养基和10%FBS的冷冻培养基以及10%DMSO的冷冻管中冻存;

[0021] 更为优选的,将细胞置于冻存处理后再进行解冻和洗涤;最后将解冻的NK细胞再次与K562饲养细胞以1:1的比例进行刺激培养。

[0022] 本发明还公开了所述的高效扩增冷冻保存NK细胞的方法在细胞保存领域中的应用。

[0023] 本发明的上述技术方案相比现有技术具有以下优点,通过使用位点特异性基因的整合技术开发的K562-mbIL15-41BBL-mbIL21细胞系,通过具有高的NK细胞活性,纯度和细胞毒性,实现高NK细胞扩增效率以提高NK扩增。

附图说明

[0024] 为了使本发明的内容更容易被清楚的理解,下面根据本发明的具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明,其中

[0025] 图1是实施例中的位点特异性整合的融合基因至K562细胞的过程示意图;

[0026] 图2是实施例中的流式细胞仪分析mbIL15,4-1BBL和mbIL21在修饰的K562细胞中的蛋白表达水平;

[0027] 图3是实施例中心NK细胞扩增倍数;

[0028] 图4是实施例中使用K562mbil15-41BBL-mbil21后NK细胞的纯度比较;

[0029] 图5是实施例中心扩增后NK细胞激活受体,抑制受体以及NK细胞标记的表达情况;

[0030] 图6是实施例中心扩增得到的NK细胞对K562人白血病细胞系的杀伤活性示意图;

[0031] 图7是实施例中在抗CD20人源抗体存在下NK细胞对抗Raji B-细胞淋巴瘤细胞系的ADCC作用示意图；

[0032] 图8是实施例中EpCAM特异性CAR修饰的初始NK细胞对PCRC7结直肠癌细胞的杀伤活性示意图；

[0033] 图9是实施例中EpCAM特异性CAR修饰的初始NK细胞对MCF7乳腺癌细胞的杀伤活性。

具体实施方式

[0034] 实施例1本实施例公开了一种高效扩增冷冻保存NK细胞的方法,具体步骤如下:

[0035] 1、人源细胞系的培养

[0036] 从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得野生型K562和Raji细胞系。并将这些细胞放在含10%胎牛血清(GIBCO)的RPMI-1640培养基(GIBCO)中,并放入37°C,5%CO₂的培养箱中进行培养。

[0037] 2、质粒的构建

[0038] 将pFastBac1(Invitrogen,Carlsbad,CA)作为质粒骨架用于表达ZFN和编码mbil15,4-1BBL和mbIL21的融合基因,其中启动子为巨细胞病毒(CMV)。其中,pFastBac-ZFN的具体构建之前被报道过(Tay,Tan et al.2013)。

[0039] 对于pFB-融合基因宿主的构建,该编码融合基因的DNA片段首次由AIT生物技术根据现有技术中报道的序列基因合成,将合成的构建体克隆到pUC57(氨苄抗性),然后将该片段通过PCR扩增。

[0040] 另外,CMV启动子,内部核糖体进入位点(IRES),新霉素抗性基因(新)和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)也通过PCR扩增。所有这些片段使用GENEART无缝克隆和组装试剂盒(Invitrogen)克隆到一个pUC19的质粒。随后将合并片段切除,使用Asc/ClaI I克隆到pFastBac1骨干,其中包含属于AAVS1转座子的一个810bp的左同源臂与一个837bp的右同源臂(Tay,Tan et al.2013)。

[0041] 3、位点特异性整合的融合基因至K562细胞AAVS1基因座

[0042] 将 2×10^6 个K562细胞系分别重新悬浮于100 μ l的Opti-MEM。使用NE PA 21电穿孔和Bio-Rad公司试管将3 μ g每一个的pFastBac-ZFN和PFB-融合基因宿主电转至细胞。将电穿孔的细胞随后转移到在6孔板中的新鲜的K562生长培养基。电穿孔后第5天,在200 μ g/mL浓度下进行为期1个月的G418选择。培养基每2天更换。1个月的选择后,使用细胞分选仪,BD FACSAria(BD Biosciences公司)将单细胞分选到96孔板。扩增单细胞和克隆进行PCR基因分型和流式细胞术分析,以证实该位点特异性整合的融合基因的表达和稳定表达。PCR基因分选以鉴定细胞克隆与AAVS1位点的整合。细胞的基因组DNA,用DNeasy[®]血液及组织试剂盒(Qiagen,希尔登,德国)分离出来。PCR基因分型被用于检测OKSM盒的位点特异性整合。KAPA高保真热启动预拌(KAPA Biosystem,Woburn,MA)被一起使用,正向引物:ATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGG和反向引物:CGGGGATGCAGGGGAACGGGGCTCAGTCTG。扩增产物在1%琼脂糖凝胶上进行分析。

[0043] 4、NK细胞的扩增和冻存

[0044] 取20名健康捐助者外周血单个核细胞,并使用Ficoll-Paque PREMIUM(GE医疗集

团生命科学),从外周血单个核细胞的新鲜棕黄层进行密度梯度法分析处理。使用补充有10%FBS(GIBCO)和10或50IU/ml的IL-2(PeproTech,Rocky.Hill,NJ,USA)的GMP的无血清干细胞生长培养基(SCGM)(CellGro/CellGenix)对NK细胞进行扩增,并用PBMC与 γ 照射K562饲养细胞(数量比1:2)在NK细胞生长培养基中共培养。在T75培养瓶中 2×10^6 个PBMC与 4×10^6 的K562饲养细胞在10ml的NK培养基中共培养。每2-3天半量换液并补加100IU/ml IL-2。

[0045] NK细胞扩增7天后,扩增得到的NK细胞以 2×10^7 细胞/mL在含有SCGM培养基+10%FBS的冷冻培养基+10%DMSO(Invitrogen)中在冷冻管(NUNC)中冻存。将细胞置于冷冻1°C的冷冻容器(Thermo Fisher Scientific,Rochester,NY)在-80°C冰箱中冻存24小时,然后转移并储存在液氮蒸气储罐。冷冻的NK细胞在37°C水浴中解冻直至剩下少量冷冻物质,然后在NK细胞生长培养基洗涤。解冻NK细胞每7天再次与K562饲养细胞以1:1的比例刺激。冻存NK细胞可至少扩增3个月。

[0046] 5、流式细胞仪分析

[0047] 所用流式细胞仪为BD Accuri C6流式细胞仪(BD Biosciences,Franklin Lakes,NJ)。

[0048] 所使用的APC标记的抗体购自美天旎(德国Bergisch Gladbach),BD Biosciences公司,或Beckman Coulter(Brea,CA)。

[0049] 6、细胞毒性分析

[0050] 所述 DELFIA[®]细胞的细胞毒性试剂盒(Perkin Elmer)用来测试对野生型K562和Raji细胞的细胞毒性。

[0051] NK细胞与靶细胞在1:1,1:5和1:10比例下在37°C,5%CO₂的培养箱中共培养2小时。

[0052] 7、实验结果

[0053] 位点特异性整合的融合基因至K562饲养细胞

[0054] 利用已建立的锌指核酸酶(BV-ZFN)(Tay,Tan et al.2013),两个质粒构建技术:一个编码ZFN,靶向和裂解AAVS1转座子(pFastBac-ZFN)和其他用过含有CMV启动子以驱动融合基因编码的表达的宿主mbil15,4-1BBL,和mbil21以及新霉素基因。具体见图1。图中,位点特异性整合的融合基因至K562细胞。pFastBac-融合基因宿主的构建,AAVS1至PPP1R12C基因,剪切位点BV-ZFN,以及修饰的AAVS1在同源重组后。E1,E2和E3:前三个PPP1R12C基因的外显子。箭头表示PCR前头和反向启动子(FP和RP)结合形成的一个2.4kb片段的3'修饰的AAVS1。

[0055] 此表达盒是由一个810-bp的左同源臂侧翼和一个837-bp的右同源臂关于所述AAVS1转座子(pFastBac-mbIL21-宿主)(图1)。K562细胞通过电穿孔将两种质粒实现位点特异性整合。电穿孔后,将K562细胞进行G418选择,5天后,进行单细胞分选。从G418耐性单细胞克隆的基因组提取DNA,并通过使用特异于19号染色体的新霉素存在于所述的pFastBac-mbIL21-宿主基因(右同源臂的3'末端的下游)引物对进行PCR基因分型。2.5-kb的片段的扩增表明通过ZFN介导的同源重组成功AAVS1修饰。以证明成功的修改将导致融合基因在克隆的稳定的蛋白质表达,所述克隆进行流式细胞仪分析。一个克隆显示出蛋白质的高水平表达被选定为NK细胞扩增的饲养细胞。具体见图2。

[0056] 冻存后NK细胞的扩增

[0057] 已经知道NK细胞的冻存对细胞有害,如细胞活力,细胞毒性的下降,NK细胞受体表达的减少。为了克服这个问题,我们开发了一种方案,将新鲜分离的NK细胞与我们获得的K562细胞以1:2的比例培养短短7天,然后冻存扩增得到的细胞,然后在复苏后以1:1的比例与K562细胞共培养。随后每隔7天将NK细胞用K562饲养细胞再刺激,NK细胞的扩增长达3个月。我们发现,这种方法可克服冷冻保存所引起的细胞活力下降的问题。如图3所示,冷冻保存的NK细胞能够在复苏后增殖至少35天。图中显示,NK细胞的平均总扩增倍数为78,880,152,范围在280,354到226,456,888倍。每一行代表一个PBMC患者($n=3$)。NK细胞用K562mbi115-41BBL-mbi121饲养层细胞扩增PBMC:K562比例为1:2前7天,冻存于 -80°C 后。冻存的NK细胞一周后复苏,用K562刺激后再次扩增。

[0058] 为确定NK细胞增殖的最佳培养条件,分别评价PBMC至K562-mbIL15-41BBL-mbIL21比率,1:2,1:1.5和1:1的差异。观察到,在配给初始PBMC刺激的降低可能导致NK细胞扩增倍数的降低,PBMC:K562为1:2的比例产生最高NK细胞扩增倍数。比例的增加也将保持较高的NK细胞纯度,于PBMC:K562为1:2可以在培养的21天(图4)后达到 $94.9\pm 2.8\%$ 的最高纯度。

[0059] 实验例

[0060] 1、扩增的NK细胞的表型检测实验

[0061] 对扩增得到的NK细胞粘附分子和受体的一个广泛的阵列进行测试。大部分高表达受体和粘附分子,有少数例外-活化受体,NKp44,和抑制性受体,表面CD158a,h,CD158i和CD158e1/e2(图5)。

[0062] 同时还比较了培养7天的NK细胞复苏后粘附分子的表达以及在用K562-mbIL15-41BBL-mbIL21重新刺激1周后黏附分子和受体的表达情况。抑制性受体,表面CD158a,h和CD158e1/e2的以及活化受体,NGK2D和NKp44的表面表达出现显著增加。结果显示表面标记CD16的表达会因NK细胞(Sakamoto,Ishikawa et al.2015)的冷冻保存而下调。与这些结果相一致的是,在冻存和复苏后NK细胞的表面标记CD16的表达出现显著的下降(高达86%)。不过,这个问题在使用K562-mbIL15-41BBL-mbIL21再刺激1周后得到改善。CD16表面表达显示增加至平均 $90.6\pm 1.8\%$ 。

[0063] 2、扩增的NK细胞对癌细胞杀伤性测试

[0064] 扩增的NK细胞能够直接杀死NK敏感的白血病细胞K562,平均16.1%(范围从0.9%至31.2%),69.8%(范围从58.5%至98.9%)和86.3%(从74.9%到98.7%),以1效靶比例分别为1:1,5:1和10:1(图6)。其中NK细胞与K562细胞以1:1,5:1和10:1的比例共培养2个小时。每一行代表一个PBMC健康志愿者($n=6$)。但是,Raji淋巴瘤细胞对NK细胞较不敏感。通过利用这些NK细胞的ADCC功能,在抗体CD20-hIgG1(图7)的存在下可以明显观察到对Raji细胞的细胞毒性。因此,扩增得到的NK细胞的ADCC功能可以显著扩大对恶性细胞的杀伤谱。

[0065] 将免疫细胞嵌合抗原受体(CAR)可以提高它们对癌细胞的杀伤活性。冷冻保存后进一步增加扩增的NK细胞的癌细胞杀伤效率,通过测试抗EpCAM CAR-重定向NK细胞是否显示抗EpCAM的阳性结肠直肠癌和乳腺癌细胞的细胞毒性。电穿孔编码抗EpCAM的mRNA后,将修饰的NK细胞与pCRC7人大肠癌细胞(图8)和MCF-7乳腺癌细胞(图9)共培养。图8、9中EpCAM为特异性CAR修饰的初始NK细胞;CAR为对照修饰的初始NK细胞;wt为初始的NK细胞。

[0066] 得到如下结果:抗EpCAM CARNK细胞显示强的细胞毒性活性,并能在E:T比值10:1时100%的杀死肿瘤细胞,这较未修饰的初始NK细胞和mGFP CAR修饰的对照NK细胞具有更

有效的杀伤活性。

[0067] 综上所述,可以看出过继性NK细胞疗法是一种有效的癌症治疗方法,显示了高的抗肿瘤潜力,同时在临床试验中具有极低的移植物抗宿主病(GVHD)的风险。然而,获得足够数量的NK细胞用于过继移植的难度是NK细胞疗法的一个限制。NK细胞的体外扩增通常与复杂的方案和昂贵的成本相关联。通过使用位点特异性基因的整合技术开发的K562-mbIL15-41BBL-mbIL21细胞系,通过具有高的NK细胞活性,纯度和细胞毒性实现高NK细胞扩增效率以提高NK扩增方案。随机整合编码NK刺激分子染K562细胞的逆转录病毒载体的基因用来产生经遗传修饰的K562细胞,这可能导致刺激分子的表达水平不同,因此这将是具有挑战性的复制的细胞系可能表达转基因的相同的表达水平。通过克服了由位点特异性基因的整合问题引入AAVS1转座子。AAVS1位于蛋白磷酸酶1,调节(抑制剂)亚单位12C(PPP1R12C)基因对人19号染色体(19q13.3-qter)之内。这个位点用作特异性整合基因座AAV血清型2(AAV2)的非致病性人细小病毒。AAVS1具有转录能力,包括一个敞开的染色质结构和包含天然绝缘体,使对转基因沉默的基因整合阻力。由于存在来自PPP1R12C基因和插入位点的转基因盒的转录能力的破坏所造成的细胞上没有已知的不利影响保持在不同类型的细胞,AAVS1被认为是一个“安全港”为加法转基因的成人类基因组。

[0068] 扩增的NK细胞被冷冻保存后具有更好的效率,并在后续的扩增过程中具有改善的NK细胞功能。

[0069] 目前,由于冷冻对CD16表达的影响,立即复苏的NK细胞不能用于ADCC抗肿瘤治疗。这种疗法将通过用K562-mbIL15-41BBL-mbIL21重新刺激变得可行。目前NK细胞疗法治疗白血病较实体瘤更成功。这是由于该显示抑制信号以NK细胞的杀伤作用的固体肿瘤微环境因素的影响。因此,CAR的基因修饰的NK细胞具有靶向实体瘤有抗药性的NK细胞,开辟了更广泛的NK细胞治疗各种癌症类型的可能性。因此,复苏冻存的NK细胞后,抗EpCAM CAR-重定向NK细胞能有效杀灭EpCAM阳性结肠直肠癌和乳腺癌细胞。

[0070] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

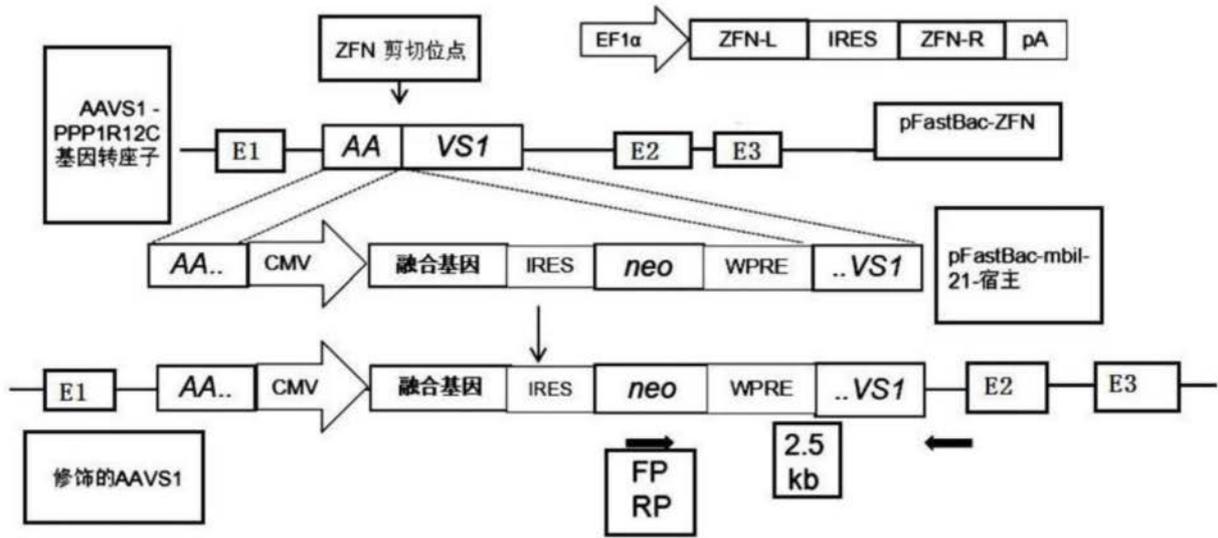


图1

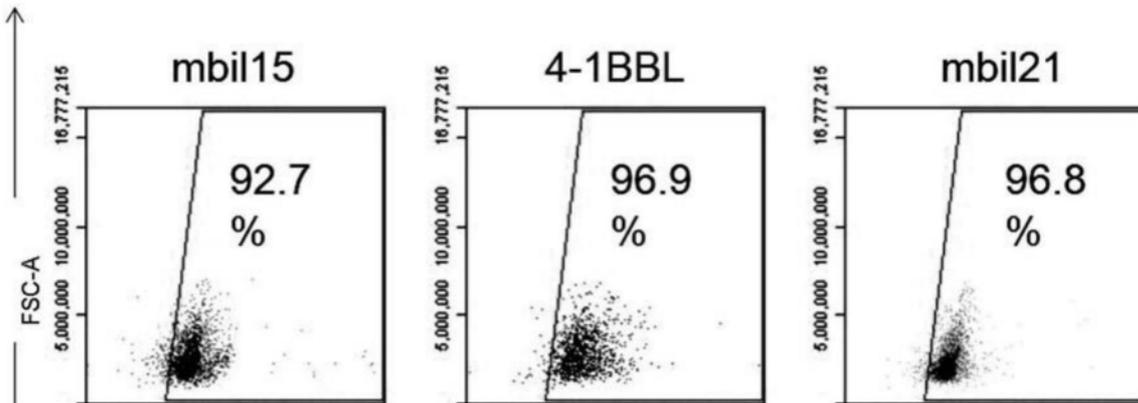


图2

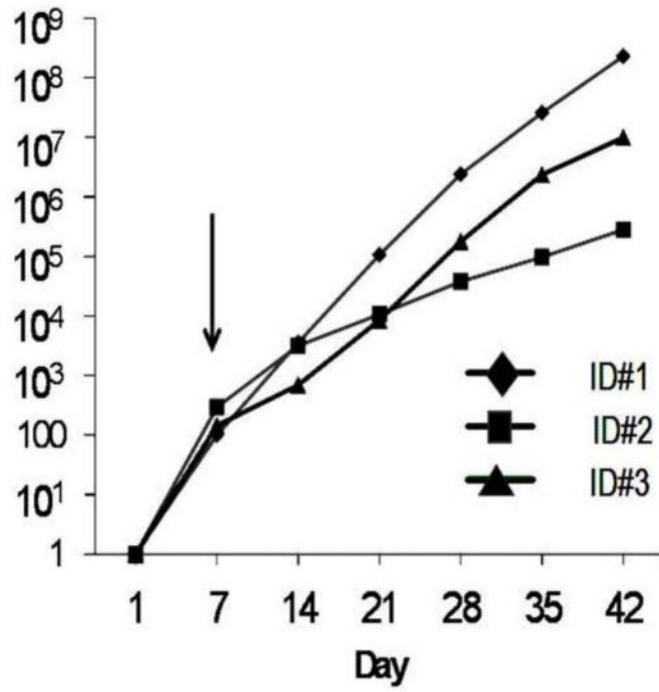


图3

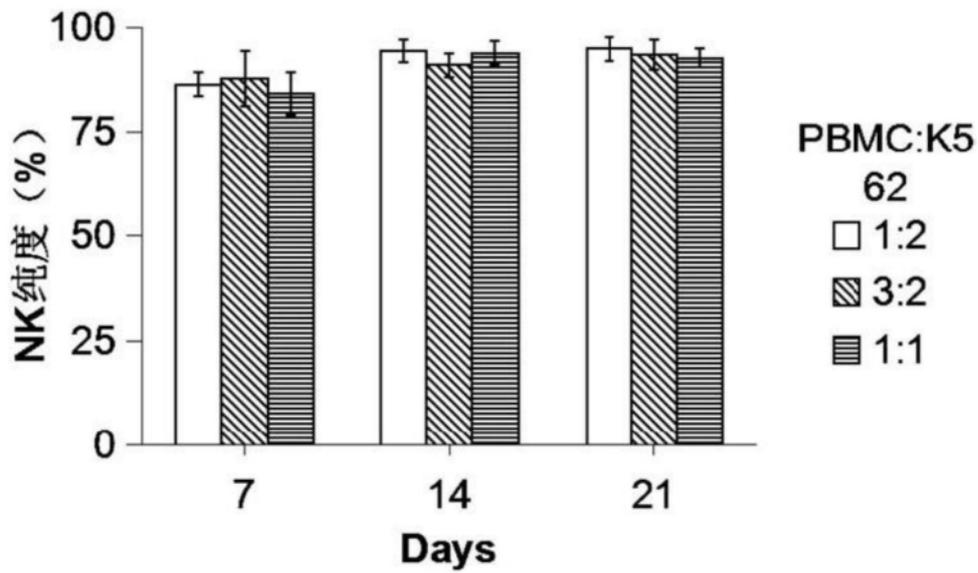


图4

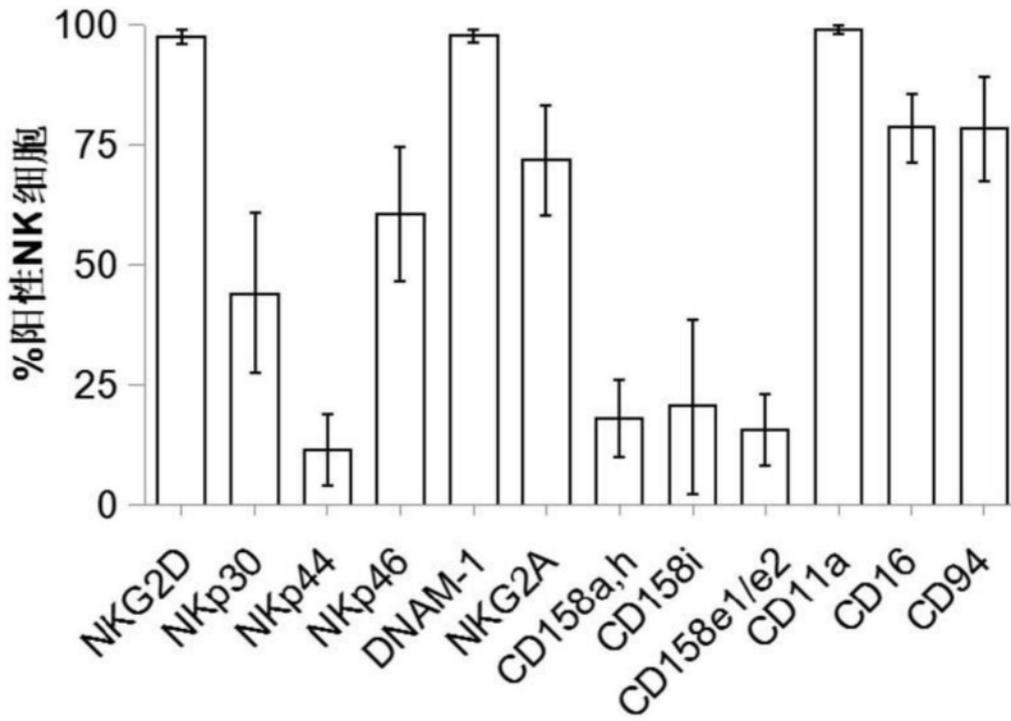


图5

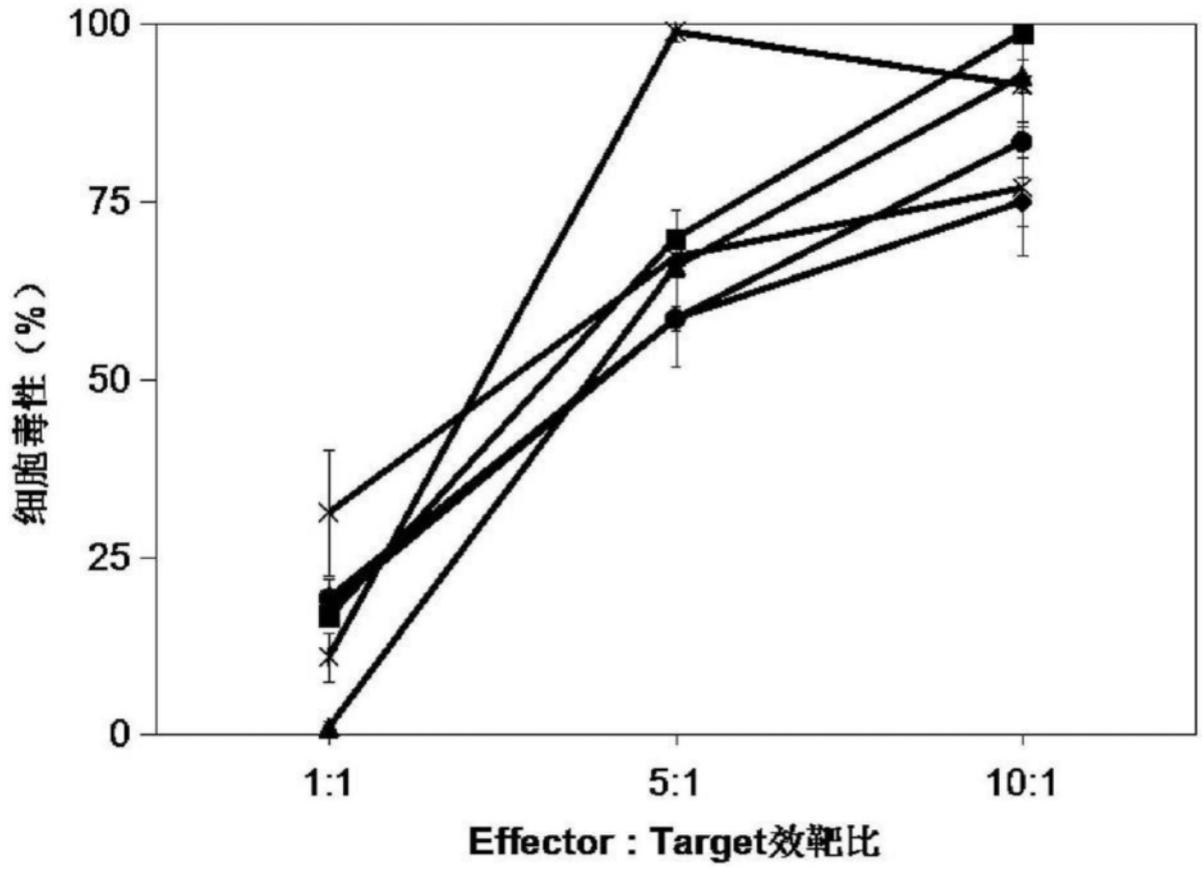


图6

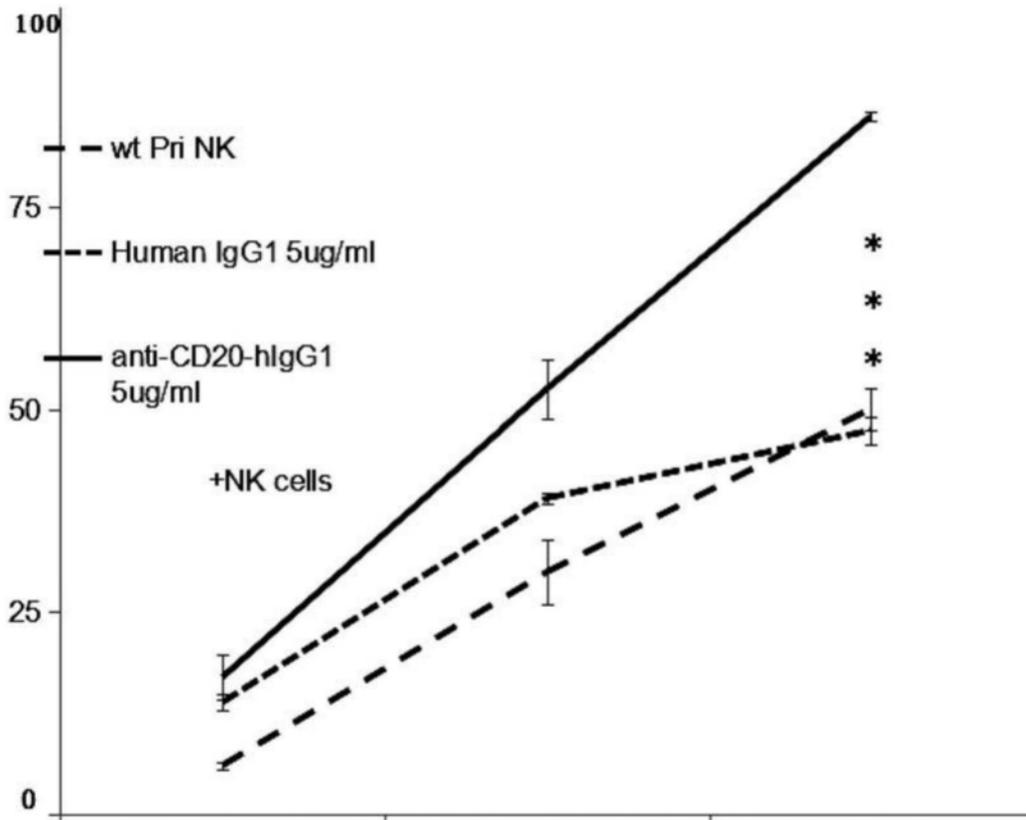


图7

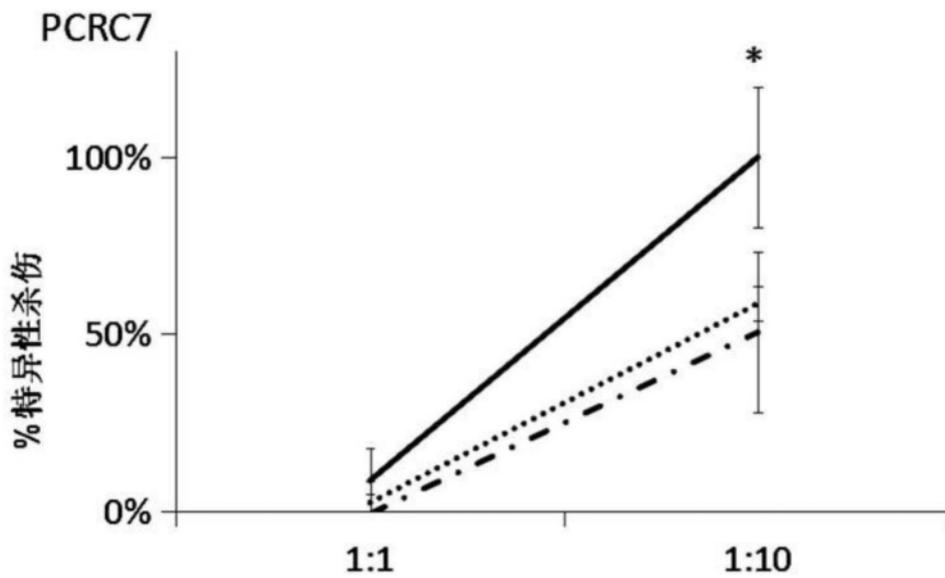


图8

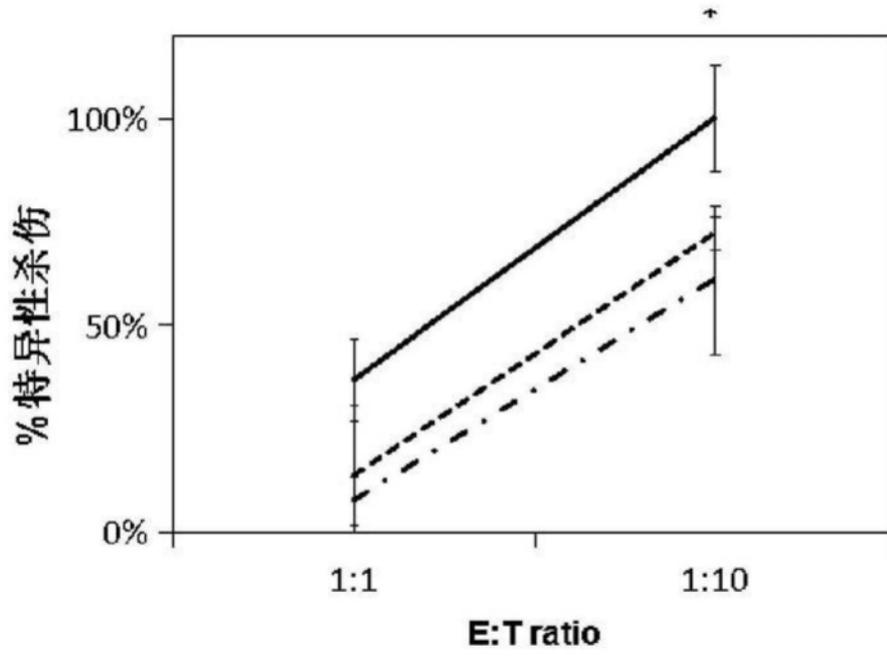


图9