



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116421590 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 29

(21) 申请号 202310701096.3

(22) 申请日 2023.06.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116421590 A

(43) 申请公布日 2023.07.14

(73) 专利权人 深圳市第二人民医院(深圳市转化医学研究院)

地址 518048 广东省深圳市福田区华富街道笋岗西路3002号

(72) 发明人 周洪钟 徐勇 顾大勇

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224

专利代理师 王秉丽

(51) Int. Cl.

A61K 31/155 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102028706 A, 2011.04.27

AU 2015201006 A1, 2015.09.10

CN 105148253 A, 2015.12.16

CN 105311486 A, 2016.02.10

CN 107375932 A, 2017.11.24

CN 112245422 A, 2021.01.22

FR 2792532 A1, 2000.10.27

US 2014105996 A1, 2014.04.17

WO 2015079413 A2, 2015.06.04

Wang, Xiang-Kun 等. Comprehensive analysis of candidate signatures of long non-coding RNA LINC01116 and related protein-coding genes in patients with hepatocellular carcinoma.《BMC GASTROENTEROLOGY》.2023,第23卷(第1期),1-19.

审查员 王珍珍

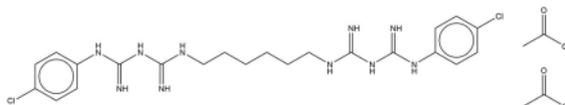
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

二乙酸氯己定在制备预防或/和治疗肝癌的药物中的用途

(57) 摘要

本申请涉及一种二乙酸氯己定的新用途,具体涉及二乙酸氯己定在制备预防或/和治疗肝癌的药物中的用途。进一步地,所述的肝癌细胞为SNU449。与传统技术相比,本申请具备如下有益效果:本申请首次将二乙酸氯己定应用于制备预防或/和治疗肝癌的药物。发明人发现,二乙酸氯己定能够特异性抑制肝癌细胞增殖,通过抑制RNA解旋酶DDX17,有望成为攻克肝癌的新型药物。



1. 二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途。
2. 根据权利要求1所述的二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途,其特征在於,治疗肝癌包括:抑制肝癌细胞增殖。
3. 根据权利要求2所述的二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途,其特征在於,抑制肝癌细胞增殖包括抑制DDX17蛋白的表达。
4. 根据权利要求3所述的二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途,其特征在於,所述肝癌细胞为肝癌细胞系SNU449。
5. 根据权利要求1至4任一项所述的二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途,其特征在於,所述药物包含二乙酸氯己定以及药物学接受的辅料。
6. 根据权利要求5所述的二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途,其特征在於,所述的药物的剂型为片剂。
7. 根据权利要求5所述的二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途,其特征在於,所述的药物的剂型为胶囊剂。
8. 根据权利要求5所述的二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途,其特征在於,所述的药物的剂型为口服液体剂、口服颗粒剂或者口服散剂。
9. 根据权利要求5所述的二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途,其特征在於,所述的药物的剂型为注射剂。
10. 根据权利要求9所述的二乙酸氯己定在制备治疗肝癌的药物中的用途,其特征在於,所述的注射剂为冻干粉针或者注射用乳剂。

二乙酸氯己定在制备预防或/和治疗肝癌的药物中的用途

技术领域

[0001] 本申请涉及药物技术领域,特别是涉及二乙酸氯己定在制备预防或/和治疗肝癌的药物中的用途。

背景技术

[0002] 肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)简称肝癌,肝癌是指发生于肝脏的恶性肿瘤,包括原发性肝癌和转移性肝癌两种,人们日常说的肝癌指的多是原发性肝癌。原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,根据最新统计,全世界每年新发肝癌患者约六十万,居恶性肿瘤的第五位,其死亡率在所有肿瘤中高居第二。原发性肝癌按细胞分型可分为肝细胞型肝癌、胆管细胞型肝癌及混合型肝癌。按肿瘤的形态可分为结节型、巨块型和弥漫型。

[0003] 肝癌的治疗手段多样,有手术和靶向治疗,但目前以肝切除术为代表的外科治疗仍然是肝癌的首选治疗方法。目前,肝癌的治疗药物包括索拉非尼、乐伐替尼、多纳非尼、贝伐珠单抗联合阿替利珠单抗、瑞戈非尼、阿帕替尼、卡博替尼等。常规化疗药物(如阿霉素、氟尿嘧啶、顺铂、 α -干扰素等)的治疗不仅毒副作用严重,而且通常也不能明显缓解疾病或延长生命,其他大多数药物的疗效都难尽人意。在肝癌的分子靶向治疗中,索拉非尼是目前晚期肝细胞癌的标准治疗手段,被证明可延长肝癌患者生存期的药物的酪氨酸激酶抑制剂索拉非尼,也被发现有明显的副作用。而继索拉非尼之后涌现其他新的靶向药物研究中,其主要治疗终点患者的总体生存率均未优于索拉非尼。原因在于肝细胞癌并不像肺癌一样,具备明确的驱动基因或生物标记物,这就给人肝癌的新药研发靶点增加了很大困难。除了免疫检查点抑制剂外,针对多种癌症靶点的多种抑制剂如各种生长因子受体、C-MET等抑制剂都在进行中,但整体在肝癌的治疗领域依然缺乏行之有效的靶点和抑制剂,临床上迫切需要开发更有效的抗癌药物。

[0004] 二乙酸氯己定(Chlorhexidine diacetate)属于双缩脲家族,分子式为 $C_{26}H_{38}Cl_2N_{10}O_4$,分子量为625.55,常作为广谱抗菌药和消毒药,对应的作用机理涉及扰乱细菌的细胞膜。对革兰氏阳性菌、阴性菌及真菌均有较强的杀菌作用,对绿脓杆菌也有效,常用于皮肤消毒、冲洗伤口,也可用于手术器械消毒。目前,暂未有二乙酸氯己定用在肝癌细胞上的研究。

发明内容

[0005] 基于此,本申请提供了一种二乙酸氯己定的新应用,具体是二乙酸氯己定在制备预防或/和治疗肝癌的药物中的应用,二乙酸氯己定能够有效抑制肝癌细胞,具有明显的治疗肝癌功效。

[0006] 本申请的技术方案包括:

[0007] 二乙酸氯己定在制备预防或/和治疗肝癌的药物中的用途。

[0008] 在其中一个实施例中,治疗肝癌包括:抑制肝癌细胞增殖。

- [0009] 在其中一个实施例中,抑制肝癌细胞增殖包括抑制DDX17蛋白的表达。
- [0010] 在其中一个实施例中,所述肝癌细胞为肝癌细胞系SNU449。
- [0011] 在其中一个实施例中,所述药物包含二乙酸氯己定以及药物学接受的辅料。
- [0012] 在其中一个实施例中,所述的药物的剂型为片剂。
- [0013] 在其中一个实施例中,所述的药物的剂型为胶囊剂。
- [0014] 在其中一个实施例中,所述的药物的剂型为口服液体剂、口服颗粒剂或者口服散剂。
- [0015] 在其中一个实施例中,所述的药物的剂型为注射剂。
- [0016] 在其中一个实施例中,所述的注射剂为冻干粉针或者注射用乳剂。
- [0017] 与传统的技术相比较,本申请的二乙酸氯己定在制备预防或/和治疗肝癌的药物中的应用包含如下有益效果:
- [0018] 本研究首次发现了二乙酸氯己定能够作为化疗药物,能显著抑制肝癌细胞(例如SNU449)的恶性生长、平板克隆形成能力以及DNA合成能力。并且发现二乙酸氯己定随着药物浓度增加可显著抑制DDX17蛋白的表达,二乙酸氯己定有望成为靶向DDX17抑制肝癌细胞恶性增殖的新一代药物。

附图说明

- [0019] 为了更清楚地说明本申请具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本申请的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。
- [0020] 图1为一实施例的二乙酸氯己定的结构式的示意图;
- [0021] 图2为一实施例的MTS实验检测二乙酸氯己定对肝癌细胞SNU449细胞活率的实验结果图;
- [0022] 图3为一实施例的平板克隆形成实验中二乙酸氯己定对肝癌细胞SNU449克隆形成的实验结果图;
- [0023] 图4为一实施例中EDU实验检测二乙酸氯己定对肝癌细胞SNU449 DNA合成能力的实验结果图;
- [0024] 图5为一实施例中采用表面等离子体共振技术测定二乙酸氯己定与DDX17蛋白相互作用亲和力的实验结果图;
- [0025] 图6为一实施例中DMSO处理的对照组和不同浓度的二乙酸氯己定处理后比较DDX17的表达水平的western blot蛋白质印迹图。

具体实施方式

- [0026] 为了便于理解本申请,下面将参照相关附图对本申请进行更全面的描述。附图中给出了本申请的较佳实施例。但是,本申请可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本申请的公开内容的理解更加透彻全面。
- [0027] 此外,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性

或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本申请的描述中,“多个”的含义是至少两个,例如两个,三个等,除非另有明确具体的限定。在本申请的描述中,“若干”的含义是至少一个,例如一个,两个等,除非另有明确具体的限定。

[0028] 当本文中公开一个数值范围时,上述范围视为连续,且包括该范围的最小值及最大值,以及这种最小值与最大值之间的每一个值。进一步地,当范围是指整数时,包括该范围的最小值与最大值之间的每一个整数。此外,当提供多个范围描述特征或特性时,可以合并该范围。换言之,除非另有指明,否则本文中所公开之所有范围应理解为包括其中所归入的任何及所有的子范围。

[0029] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本申请的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本申请的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本申请。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0030] “药学上可接受的”指在合理医学判断范围内适于施用患者且与合理益处/风险比相称的那些配体、材料、组合物和/或剂型。

[0031] “药学上可接受的载体”指药学上可接受的材料、组合物或媒剂,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或囊封材料。如本文所用,语言“药学上可接受的载体”包括与药物施用相容的缓冲剂、注射用无菌水、溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂及诸如此类。在与配制物中其他成分兼容且对患者无害的意义上,每种载体必须为“药学上可接受的”。合适的实例包括但不限于:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖及蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉及经取代或未经取代的 β -环糊精;(3)纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素及乙纤维素;(4)粉状黄耆胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,例如可可脂及栓剂蜡;(9)油类,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油及大豆油;(10)二醇,例如丙二醇;(11)多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇及聚乙二醇;(12)酯类,例如油酸乙酯及月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,例如氢氧化镁及氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲液;及(21)药物配制物中所采用的其他无毒兼容物质。

[0032] 施用方式

[0033] 本申请的化合物或其药物组合物的剂型和施用方式没有特别限制。

[0034] 代表性的施用方式包括但并不限于:口服、瘤内、直肠、肠胃外(静脉内、肌肉内或皮下)注射、和局部给药。

[0035] 用于口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,活性化合物与至少一种常规惰性赋形剂(或载体)混合,如柠檬酸钠或磷酸二钙,或与下述成分混合:(a)填料或增容剂,例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸;(b)粘合剂,例如,羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶;(c)保湿剂,例如,甘油;(d)崩解剂,例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸、某些复合硅酸盐、和碳酸钠;(e)缓溶剂,例如石蜡;(f)吸收加速剂,例如,季胺化合物;(g)润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(h)吸附剂,例如,高岭土;和(i)润滑剂,例如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,或其混合物。

[0036] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆或酞剂。除了活性化合物外,液体剂型可包含本领域中常规采用的惰性稀释剂,如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,具体例如,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺以及油,特别是棉籽油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油或这些物质的混合物。除了这些惰性稀释剂外,组合物也可包含助剂,如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和香料。如悬浮液可包含悬浮剂,具体例如,乙氧基化异十八烷醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、甲醇铝和琼脂或这些物质的混合物。

[0037] 用于肠胃外注射的组合物可包含生理上可接受的无菌含水或无水溶液、分散液、悬浮液或乳液,以及用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。适宜的含水或非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

[0038] 用于局部给药的剂型包括软膏剂、散剂、贴剂、喷射剂和吸入剂。由活性成分在无菌条件下与药学上可接受的载体及任何防腐剂、缓冲剂,或必要时可能需要的推进剂一起混合而成。

[0039] 本申请提供了一种二乙酸氯己定在制备预防或/和治疗肝癌的药物中的用途。

[0040] 可选地,治疗肝癌包括:抑制肝癌细胞增殖。

[0041] 进一步可选地,抑制肝癌细胞增殖包括抑制DDX17蛋白的表达。

[0042] 可选地,所述肝癌细胞为肝癌细胞系SNU449。

[0043] 可选地,所述药物包含二乙酸氯己定以及药物学接受的辅料。

[0044] 可以理解的是,根据药物的剂型的不同,所选择的辅料的种类、辅料的用量等也不同。二乙酸氯己定可以与合适种类的辅料结合,制备成不同形态的药物(例如液态、半固体、固体),相应形成不同的剂型。

[0045] 可选地,所述的药物的剂型为片剂。

[0046] 可以理解的是,在本申请中,片剂是药物与辅料均匀混合后压制而成的片状或异形片状的固体制剂,以口服普通片为主,也有含片、舌下片、口腔贴片等。为增加稳定性、掩盖药物不良臭味、改善片剂外观等,可对片剂进行包衣。

[0047] 在其中一个具体实例中,所述的片剂为包衣片剂。

[0048] 可选地,所述的药物的剂型为胶囊剂。

[0049] 可以理解的是,在本申请中,胶囊剂是指药物或与适宜辅料填充于空心的硬胶囊或密封于软质囊材中制成的固体制剂,可分为硬胶囊、软胶囊(胶丸),主要供口服用,也是一种临床应用广泛的固体制剂。

[0050] 可选地,所述的药物的剂型为口服液体剂、口服颗粒剂或者口服散剂。

[0051] 在其中一个具体实例中,所述的药物的剂型为口服颗粒剂。

[0052] 可以理解的是,在本申请中,口服颗粒剂是指原料药和适宜的辅料混合制成具有一定粒度的干燥颗粒状制剂,是常用的一种口服固体制剂。除另有规定外,颗粒剂中大于一号筛的粗粒和小于五号筛的细粒的总和不超过15%。颗粒剂可直接吞服,也可冲入水中服用。

[0053] 可选地,所述的药物的剂型为注射剂。

[0054] 可以理解的是,在本申请中,注射剂是指药物制成的供注入体内的无菌溶液(包括乳浊液和混悬液)以及供临用前配成溶液或混悬液的无菌粉末或浓溶液。

[0055] 在其中一个具体实例中,所述的注射剂为冻干粉针。

[0056] 在其中一个具体实例中,所述的注射剂为注射用乳剂。

[0057] 以上,本申请实施例只是对“剂型”的种类进行举例说明,可以理解的是,这并非是对“剂型”的具体限制,除了本申请举例的“片剂”、“胶囊剂”、“口服液”以及“注射剂”这几种剂型之外,还可以将二乙酸氯己定制备成其他合适的、药学上可以接受的剂型。

[0058] 以下结合具体实施例进行进一步说明,以下具体实施例中所涉及的原料,若无特殊说明,均可来源于市售,如本申请实施例所述的二乙酸氯己定是市购的,所使用的仪器,若无特殊说明,均可来源于市售,所涉及到的工艺,如无特殊说明,均为本领域技术人员常规选择。

[0059] 以下为具体实施例。

[0060] 实施例1

[0061] (1)准备细胞

[0062] 人肝癌细胞SNU449购买于广州吉尼欧生物公司;

[0063] 人肝癌细胞SNU449细胞培养方法:配置混合培养基,包括DMEM培养基+10%胎牛血清(FBS)+1%青霉素/链霉素双抗(P/S),将细胞加入配置好的混合培养基后置于37°C、5%CO₂细胞培养箱内培养,48-72h后观察培养皿的细胞满度,待细胞长至90%-100%时进行传代培养。

[0064] (2)二乙酸氯己定(Chlorhexidine diacetate)对肝癌细胞SNU449增殖的影响

[0065] 使用二乙酸氯己定(15μM)对肝癌细胞SNU449进行处理,随后利用MTS实验分别检测肝癌细胞在0h、24h、48h、72h四个时间点细胞的生长情况。

[0066] 结合图2结果显示,使用15μM二乙酸氯己定对SNU449进行处理后,相对于二甲基亚砜(DMSO)处理的对照组,培养72h后,二乙酸氯己定可以显著降低肝癌细胞SNU449的生长($P < 0.05$)。

[0067] (3)二乙酸氯己定对肝癌细胞SNU449平板克隆形成能力的影响

[0068] 将肝癌细胞SNU449接种在六孔中,细胞数量为0.1k~0.3k个细胞/孔,按照常规培养肝癌细胞的方法培养10天,随后使用15μM二乙酸氯己定进行处理2~3天,去除培养基后,用1×PBS清洗,加入1ml甲醇固定细胞30min,用0.1%结晶紫进行染色,60min后去除结晶紫,用1×PBS清洗,晾干后拍照计数,对照组同样按照上述处理,但是不添加二乙酸氯己定。

[0069] 结合图3结果显示,相对于DMSO处理的对照组,使用二乙酸氯己定进行处理后可以显著降低肝癌细胞SNU449的平板克隆形成能力($P < 0.05$)。

[0070] (4)二乙酸氯己定对肝癌细胞SNU449 DNA合成能力的影响

[0071] 将肝癌细胞SNU449接种在含有玻片的六孔中,第二天加入(15μM)二乙酸氯己定进行处理2-3天,使用EDU试剂盒进行处理(碧云天,C0085S),在荧光显微镜下观察二乙酸氯己定对肝癌细胞SNU449 DNA合成能力的影响。

[0072] 结合图4结果显示,相较于未添加二乙酸氯己定的对照组,使用二乙酸氯己定进行处理后,可以显著降低肝癌细胞SNU449的DNA合成能力($P < 0.05$)。

[0073] (5)二乙酸氯己定与DDX17蛋白具有相互作用亲和力

[0074] RNA解旋酶DDX17是DEAD-box17(DDX17)是RNA解旋酶DDX家族的重要成员之一,其解旋酶核心区域包含9个保守基序(Q、I、Ia、Ib、II-VI)。DDX17以保守的基序Asp-Glu-Ala-

Asp (DEAD) 为特征的DEAD盒蛋白涉及许多RNA二级结构改变的细胞过程,例如翻译起始,核和线粒体剪接以及核糖体和剪接体组装。该基因编码DEAD盒蛋白,它是一种被多种RNA而非dsDNA激活的ATPase,可参与从转录到翻译等几乎与RNA代谢相关的所有过程。在癌症的生长中起到重要作用。研究发现DDX17在多种肿瘤中表达明显升高,包括肝癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌等。此外,多项研究表明DDX17可促进肝癌恶性增殖和迁移侵袭。

[0075] 利用表面等离子体共振技术 (SPR) 建立DDX17蛋白-FDA上市化合物相互作用测定模型,通过将FDA上市药物库中1729个化合物按约50个/组分为36组混合物,进行SPR单浓度点 (10 μ M) 筛选,根据RU值降序选取4组化合物。接着将4组化合物共200个进行逐个单浓度 (10 μ M) SPR测序,根据RU值降序进行排序。最后将排名靠前的化合物设置多浓度进行SPR测试得到亲和力数据KD以及动力学数Kd、ka。基于结合模式分析筛选出与DDX17结合亲和力较高的化合物。利用表面等离子体共振技术 (SPR) 建立DDX17蛋白-化合物相互作用测定模型。

[0076] 图5结果显示,二乙酸氯己定与DDX17蛋白具有较高的相互作用亲和力。

[0077] (6) 二乙酸氯己定抑制RNA解旋酶DDX17表达水平

[0078] 使用二乙酸氯己定对肝癌细胞SNU449进行处理,利用WB实验检测在不同浓度作用下的二乙酸氯己定对DDX17蛋白表达水平的影响,具体操作过程如下:

[0079] 将肝癌细胞SNU449接种在六孔中,第二天分别使用3.75 μ M、7.5 μ M和15 μ M二乙酸氯己定进行处理2~3天,随后对DDX17蛋白进行裂解,测浓度、配置SDS聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE)、电泳、转膜及封闭、封闭及孵育一抗孵育、二抗孵育、显影。

[0080] 图6结果显示,相较于DMSO处理的对照组,随着二乙酸氯己定的药物浓度的增加,二乙酸氯己定抑制DDX17的表达水平的逐渐增强,15 μ M二乙酸氯己定对DDX17的抑制作用最强。根据上述结果分析可知,二乙酸氯己定可作为DDX17蛋白的小分子化合物抑制剂,并且可以抑制肝癌细胞的恶性增殖。

[0081] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0082] 以上所述实施例仅表达了本申请的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本申请的保护范围。因此,本申请专利的保护范围应以所附权利要求为准。

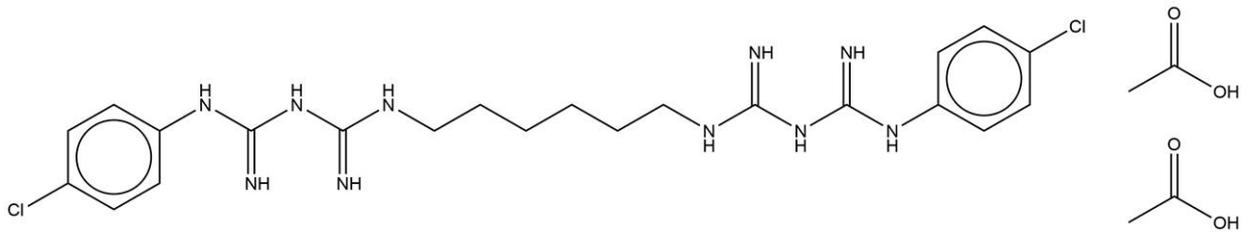


图 1

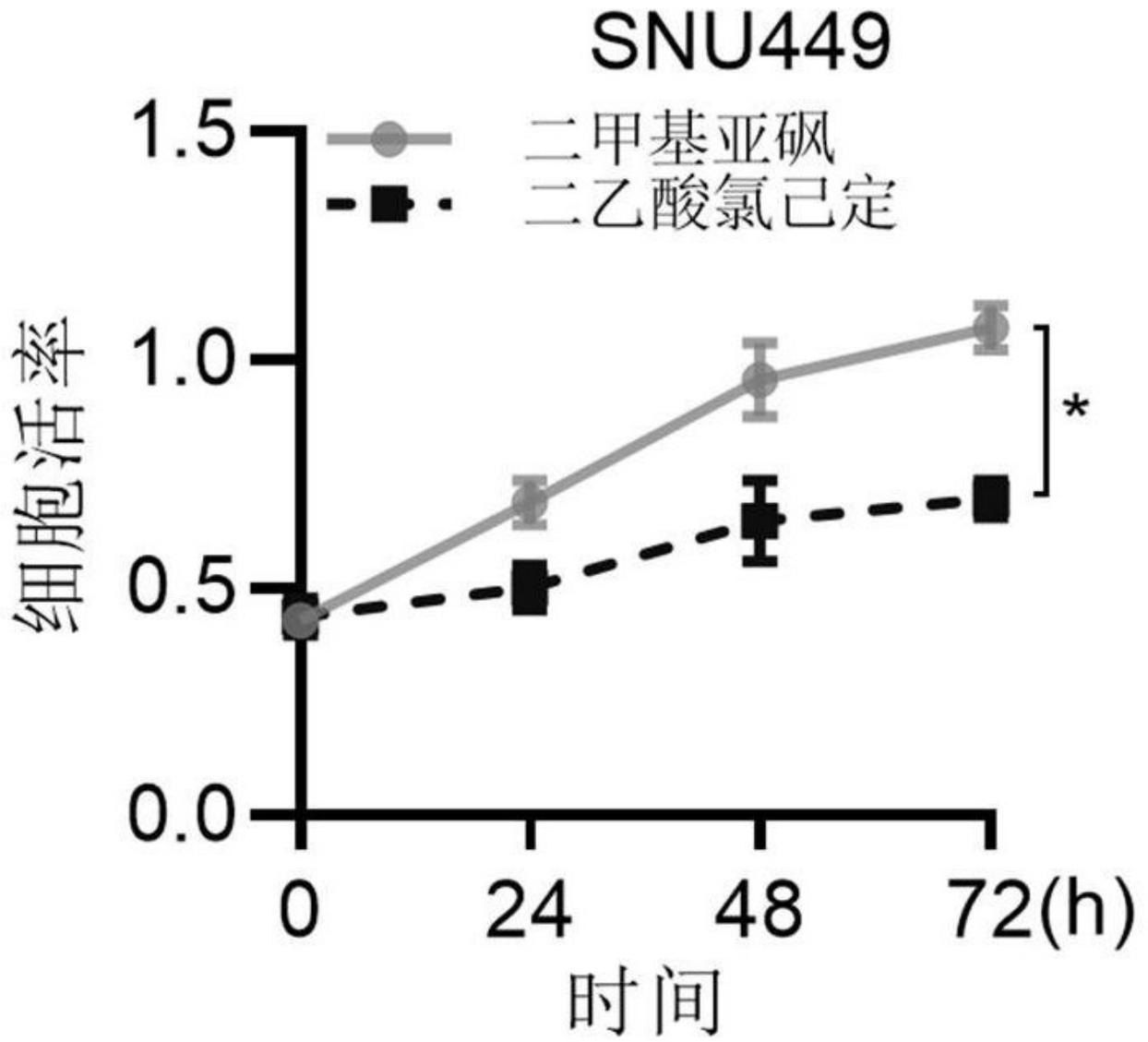


图 2

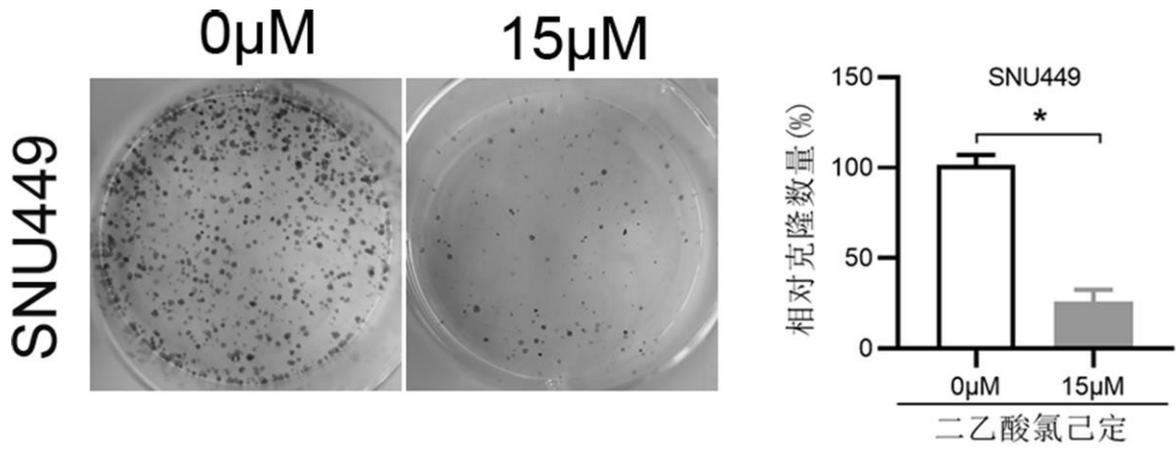


图 3

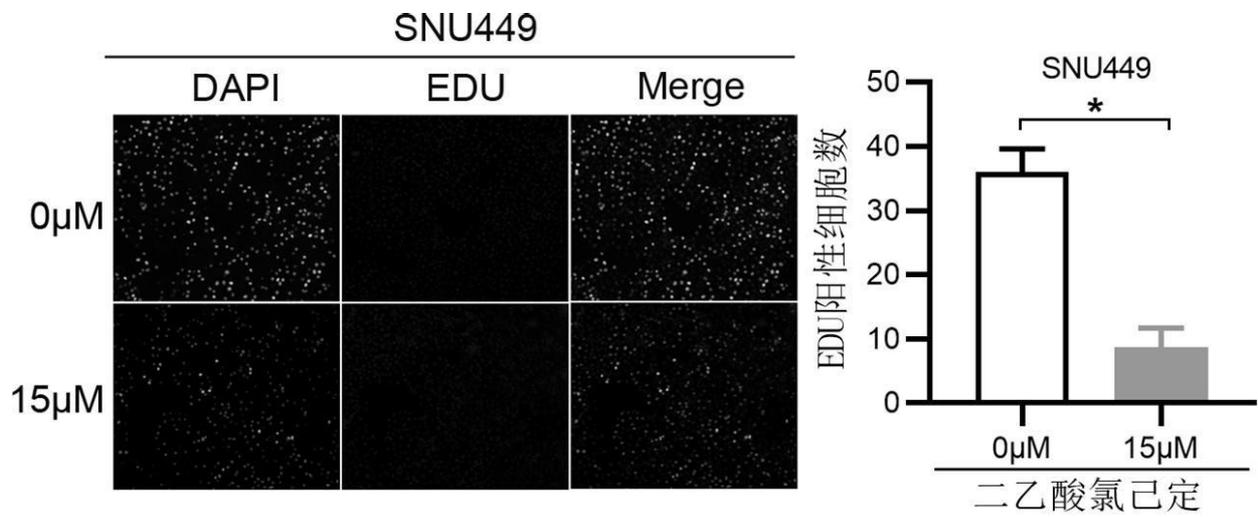


图 4

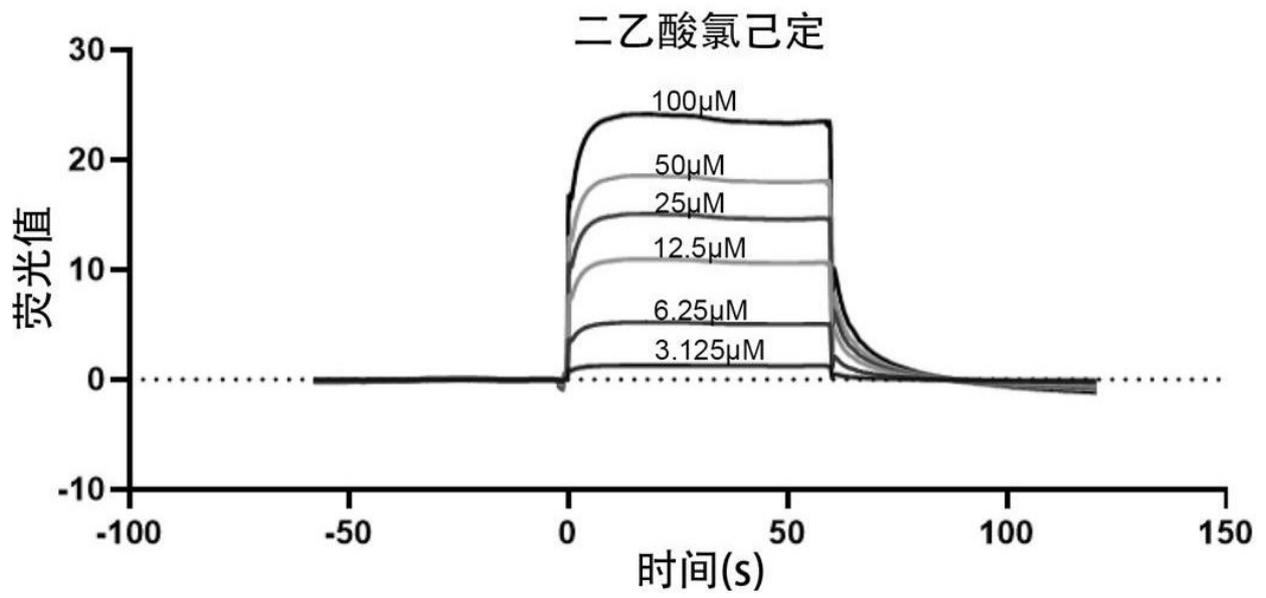


图 5

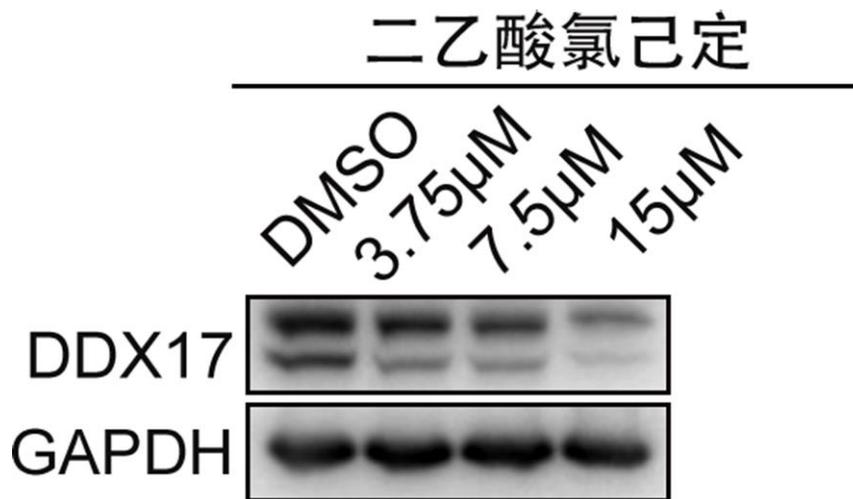


图 6