



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108295030 B

(45)授权公告日 2020.04.07

(21)申请号 201710028050.4

(22)申请日 2017.01.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108295030 A

(43)申请公布日 2018.07.20

(73)专利权人 香港理工大学深圳研究院

地址 518000 广东省深圳市南山区高新技术产业园南区粤兴一道18号香港理工大学产学研大楼205室

专利权人 昆士兰大学

(72)发明人 陈四保 哈兰德·帕勒 荆晶

(74)专利代理机构 深圳中一专利商标事务所
44237

代理人 黄志云

(51)Int.Cl.

A61K 9/107(2006.01)

A61K 31/585(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

W0 2011036557 A1,2011.03.31,说明书摘要,权利要求1-10.

审查员 陈卫星

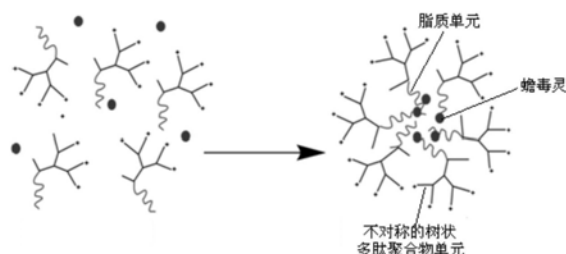
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

蟾毒灵胶束纳米制剂及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种蟾毒灵胶束纳米制剂,包括蟾毒灵、以及包裹所述蟾毒灵的脂化多肽胶束载体,且一分子的所述脂化多肽胶束载体包括一分子亲水单元和一分子与所述亲水单元相连的疏水单元,其中,所述亲水单元为不对称的树状多肽聚合物单元,所述疏水单元为脂质单元,且所述树状多肽聚合物单元的末端携带正电荷。



1. 一种蟾毒灵胶束纳米制剂, 其特征在于, 包括蟾毒灵、以及包裹所述蟾毒灵的脂化多肽胶束载体, 且一分子的所述脂化多肽胶束载体包括一分子亲水单元和一分子与所述亲水单元相连的疏水单元, 其中, 所述亲水单元为不对称的树状多肽聚合物单元, 所述疏水单元为脂质单元, 且所述树状多肽聚合物单元的末端携带正电荷且含有赖氨酸的多肽聚合物, 所述脂质单元为含有末端羟基的脂溶性基团。

2. 如权利要求1所述的蟾毒灵胶束纳米制剂, 其特征在于, 所述蟾毒灵和所述脂化多肽胶束载体的摩尔比为1: (1.8-2.2)。

3. 如权利要求2所述的蟾毒灵胶束纳米制剂, 其特征在于, 所述树状多肽聚合物单元为 Gly-Lys-Lys-(Arg)₂。

4. 如权利要求3所述的蟾毒灵胶束纳米制剂, 其特征在于, 所述脂质单元为含有末端羟基的癸酸。

5. 如权利要求1-4任一所述的蟾毒灵胶束纳米制剂, 其特征在于, 所述树状多肽聚合物单元为 Gly-Lys-Lys-(Arg)₂, 所述脂质单元为含有末端羟基的癸酸, 且所述癸酸与所述树状多肽聚合物单元中靠近甘氨酸的赖氨酸缩合, 所述脂化多肽胶束载体的临界胶束浓度为 105.38 μmol/L。

6. 如权利要求1-4任一所述的蟾毒灵胶束纳米制剂, 其特征在于, 所述蟾毒灵胶束纳米制剂为球形结构, 且所述球形结构的平均粒径为45-50nm。

7. 一种蟾毒灵胶束纳米制剂的制备方法, 包括以下步骤:

制备脂化多肽 Gly-Lys (R₁) -Lys-(Arg)₂, 其中, 所述R₁为羧基与Lys的末端氨基缩合后的癸酸残基;

在所述脂化多肽中加入去离子水, 得到脂化多肽胶束载体;

提供蟾毒灵, 将所述蟾毒灵溶解在甲醇中, 然后旋蒸完全除去甲醇, 避光环境下, 加入所述脂化多肽胶束载体, 搅拌反应24-48小时, 得到树脂状物-药物悬浮液;

将所述树脂状物-药物悬浮液通过0.2 μm的过滤器过滤处理后, 将滤液冻干处理, 得到白色絮状粉末蟾毒灵胶束纳米制剂。

8. 如权利要求7所述的蟾毒灵胶束纳米制剂的制备方法, 其特征在于, 所述脂化多肽 Gly-Lys (R₁) -Lys-(Arg)₂的制备方法包括以下步骤:

提供Rink酰胺树脂, 溶胀处理后用哌啶溶液脱保护, 用DMF洗涤后, 将Fmoc-Gly-OH偶联到Rink酰胺树脂上, 得到Rink-Gly-OH;

将Fmoc-Lys (Mtt) OH去保护, 偶联到Rink-Gly-OH上, 得到Rink-Gly-Lys (Mtt) -OH;

在Rink-Gly-Lys (Mtt) -OH上偶联脂质, 得到Rink-Gly-Lys (R₁) -OH; 依次将Fmoc-Lys (Mtt) OH去保护、偶联, Fmoc-Arg (Pbf) -OH去保护、偶联, 得到脂化多肽 Gly-Lys (R₁) -Lys-(Arg)₂。

蟾毒灵胶束纳米制剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂领域,尤其涉及一种蟾毒灵胶束纳米制剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 蟾毒灵是一种对多种肿瘤具有良好治疗效果的化合物,但由于水溶性差、毒性大、体内半衰期短、生物利用度差等原因,蟾毒灵单独使用不能满足抗癌新药候选化合物的筛选条件,因此极大地限制了蟾毒灵在临床上的推广应用。

[0003] 树枝状聚合物(Dendrimers)是一类新的人造大分子,作为药物/基因递送的载体具有极大的优势,比如极低的多分散性、规则的高度支化、多电位化、纳米粒径、球状结构和明确的分子量等。目前文献报道中大多使用非多肽的PAMAM树枝状大分子作为药物载体的研究。虽然在药物传递的应用中表现出有极大的优势,但是也暴露出潜在的风险,主要集中在高阳离子电荷密度引起的细胞毒性。此外,非多肽的PAMAM树枝状大分子的球形结构,也限制了在特定位点添加功能性基团的性能。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种蟾毒灵胶束纳米制剂及其制备方法,旨在解决蟾毒灵单独使用不满足抗癌新药候选化合物的筛选条件,而现有的非多肽PAMAM树枝状大分子药物载体引发的引起的细胞毒性、且难以添加功能性基团的问题。

[0005] 本发明是这样实现的,一种蟾毒灵胶束纳米制剂,包括蟾毒灵、以及包裹所述蟾毒灵的脂化多肽胶束载体,且一分子的所述脂化多肽胶束载体包括一分子亲水单元和一分子与所述亲水单元相连的疏水单元,其中,所述亲水单元为不对称的树状多肽聚合物单元,所述疏水单元为脂质单元,且所述树状多肽聚合物单元的末端携带正电荷。

[0006] 以及,一种蟾毒灵胶束纳米制剂的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 制备脂化多肽Gly-Lys(R1)-Lys-(Arg)₂,其中,所述R1为羧基与Lys的末端氨基缩合后的癸酸残基;

[0008] 在所述脂化多肽中加入去离子水,得到脂化多肽胶束载体;

[0009] 提供蟾毒灵,将所述蟾毒灵溶解在甲醇中,然后旋蒸完全除去甲醇,避光环境下,加入所述脂化多肽胶束载体,搅拌反应24-48小时,得到树脂状物-药物悬浮液;

[0010] 将所述树脂状物-药物悬浮液通过0.2 μ m的过滤器过滤处理后,将滤液冻干处理,得到白色絮状粉末蟾毒灵胶束纳米制剂。

[0011] 本发明提供的蟾毒灵胶束纳米制剂,采用脂化的树状多肽聚合物作为蟾毒灵载体。所述脂化多肽胶束聚合物由水性环境中的亲水和疏水单元组成,由于其具有两亲的特性,在临界胶束浓度(CMC)形成胶束包裹蟾毒灵,形成胶束制剂。本发明提供的蟾毒灵胶束纳米制剂,采用无毒的氨基酸和脂质单元作为原料,药物本身安全性提高,具有非细胞毒性。且由于所述树状多肽聚合物单元的末端携带正电荷,蟾毒灵胶束纳米制剂作用时,有利于癌症细胞的结合和药物释放,同时改善蟾毒灵的理化性质,是其水溶性增加,从而提高生

物利用度。此外,本发明提供的蟾毒灵胶束纳米制剂,能够实现蟾毒灵在抗肿瘤应用中的靶向给药。

[0012] 本发明提供的蟾毒灵胶束纳米制剂的制备方法,采用固相合成技术合成多肽,方法简单易控,具有很好地应用前景。

附图说明

[0013] 图1是本发明实施例提供的脂化多肽胶束载体的示意图;

[0014] 图2是本发明实施例提供的形成蟾毒灵胶束纳米制剂的效果示意图;

[0015] 图3是本发明实施例提供的蟾毒灵的HF时间曲线(DSC)图;

[0016] 图4是本发明实施例提供的不对称树脂状聚合物的HF时间曲线(DSC)图;

[0017] 图5是本发明实施例提供的蟾毒灵和不对称树脂状聚合物的HF时间曲线(DSC)图;

[0018] 图6是本发明实施例提供的蟾毒灵胶束纳米制剂的HF时间曲线(DSC)图;

[0019] 图7是本发明实施例提供的脂化多肽Gly-Lys(R₁)-Lys-(Arg)₂的制备工艺示意图。

具体实施方式

[0020] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0021] 由于单独的蟾毒灵水溶性差、毒性大、体内半衰期短、生物利用度差等原因,难以作为药物使用。而常规的非肽树枝状聚合物药物载体,细胞毒性过大,潜在风险高,且不利于进行结构改性。因此,本发明发明人经过长期的研发过程,提出了一种有望蟾毒灵用于临床药物的技术方案。

[0022] 结合图1-6,本发明实施例提供了一种蟾毒灵胶束纳米制剂,包括蟾毒灵、以及包裹所述蟾毒灵的脂化多肽胶束载体,且一分子的所述脂化多肽胶束载体包括一分子亲水单元和一分子与所述亲水单元相连的疏水单元,其中,所述亲水单元为不对称的树状多肽聚合物单元,所述疏水单元为脂质单元,且所述树状多肽聚合物单元的末端携带正电荷。

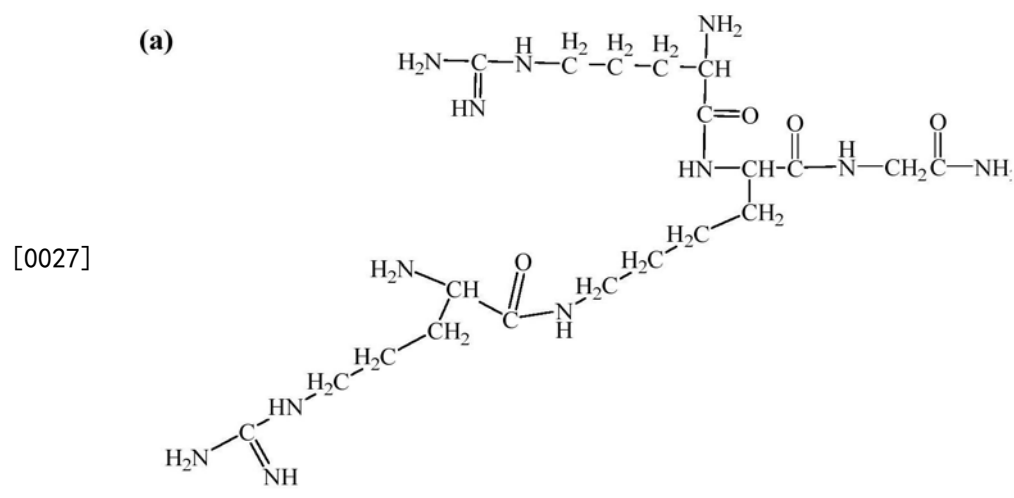
[0023] 具体的,本发明实施例中,所述蟾毒灵胶束纳米制剂除了蟾毒灵,还含有能够将所述蟾毒灵包裹形成纳米制剂的药物载体,进一步的,所述药物载体为脂化多肽胶束载体。

[0024] 本发明实施例所述脂化多肽胶束载体中,一分子的所述脂化多肽胶束载体包括一分子亲水单元和一分子与所述亲水单元相连的疏水单元。由于具有两亲特性,因此能够形成胶束用于包裹蟾毒灵形成胶束制剂。进一步的,所述亲水单元为不对称的树状多肽聚合物单元,所述疏水单元为脂质单元,且所述树状多肽聚合物单元的末端携带正电荷。本发明实施例所述脂化多肽胶束载体用无毒的氨基酸和脂质单元制成,且其表面带面携带正电荷,不仅利于所述蟾毒灵的包裹,而且有利于癌症细胞的结合和药物释放,同时改善使蟾毒灵的理化性质,使其水溶性增加,从而提高生物利用度。更进一步地,所述脂化多肽胶束载体的浓度为临界胶束浓度,从而保证其胶束结构,进而能够实现蟾毒灵的包裹。所述脂化多肽胶束载体的示意图如图1所示,所述脂化多肽胶束载体包裹蟾毒灵形成蟾毒灵胶束纳米制剂的效果图如图2所示。

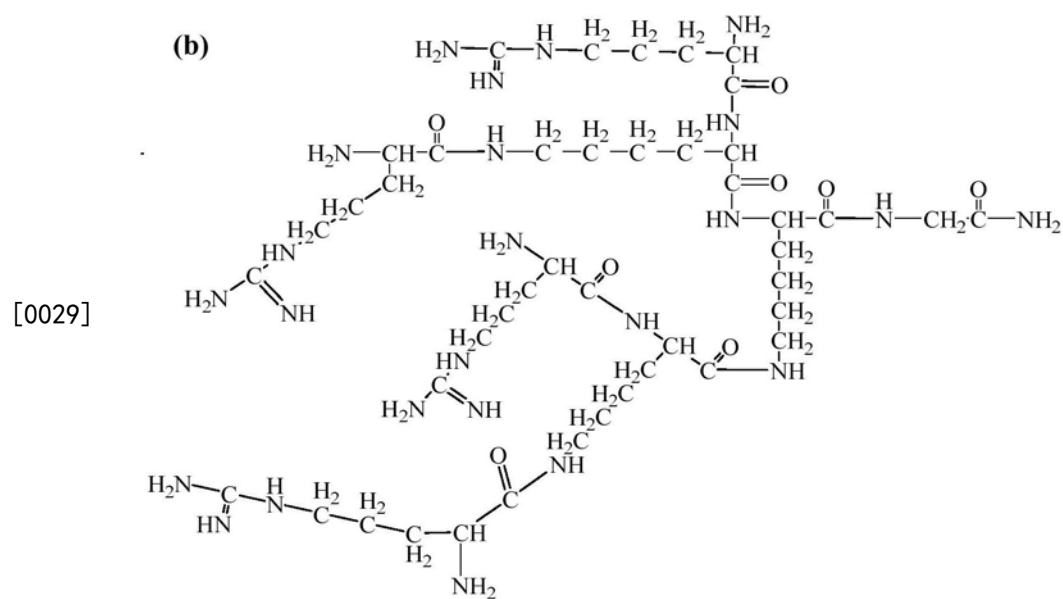
[0025] 应当理解,本发明实施例中,所述脂化多肽胶束载体中部队称的树状多肽聚合物

单元、以及所述树状多肽聚合物单元的末端携带正电荷,脂质单元,是本发明实施例所述蟾毒灵胶束纳米制剂具有较好的生物利用度和非生物毒性、并能够作为药物制剂使用的必要前提。

[0026] 其中,优选的,所述树状多肽聚合物单元为末端含有赖氨酸的多肽聚合物,更优选为含有两个末端赖氨酸。所述赖氨酸含有两个末端氨基,且可进一步在末端氨基上改性,形成末端带有多个正电荷的分子结构。由于体内细胞表面都呈现负电位,所选载体正电末端可以跟细胞表面静电结合,从而有利于药物的释放。且经Zeta点位测定,蟾毒灵在溶液中呈现负电位(-0.55mV),而载体本身末端携带的正电荷,二者产生静电结合,产生物理结合作用。因此,末端赖氨酸结构,有利于蟾毒灵胶束纳米制剂与癌症细胞的结合和药物释放。进一步优选的,所述树状多肽聚合物单元为Gly-Lys-Lys-(Arg)₂,结构如下式(a)所示:



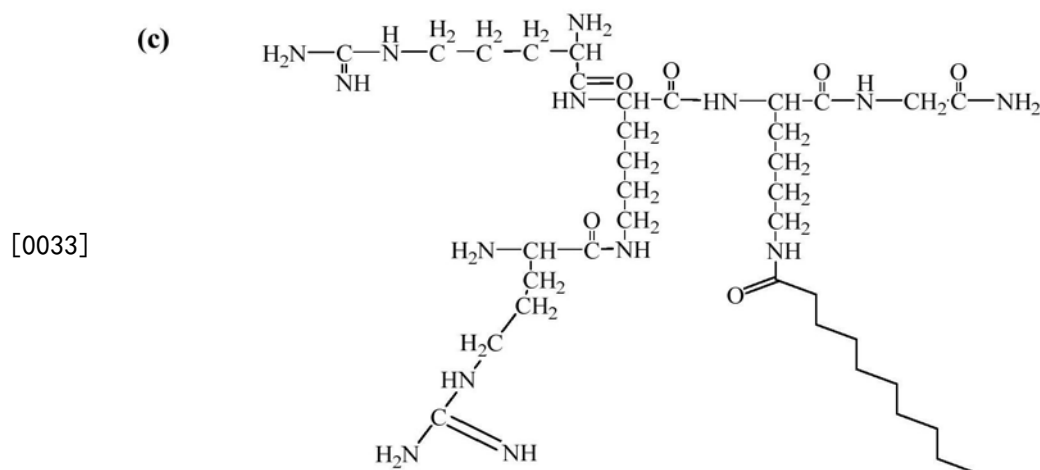
[0028] 该优选的树状多肽聚合物单元作为多肽与脂质单元结合后,能够有效形成胶束包裹所述蟾毒灵,得到生物利用度高、且与癌症细胞的结合和药物释放效果更佳的制剂。具体的,所述树状多肽聚合物单元Gly-Lys-Lys-(Arg)₂的赖氨酸含有-NH₂和-NH-C(NH)-NH₂两个末端结构,从而更有利于上述效果的提高。当然不限于此,如所述树状多肽聚合物单元还可以为下式(b)所示的结构:



[0030] 由于蟾毒灵的水溶性太差,单独的树状多肽聚合物不能包裹蟾毒灵,因此,本发明实施例在非杂合的不对称树状多肽聚合物单元的基础上,引入直至侧链,从而增加了载体对蟾毒灵的包裹能力。优选的,所述脂质单元为含有末端羟基的脂溶性基团,以便与氨基酸如赖氨酸(Lys)末端的 NH_2 发生缩合反应,从而牢固结合,且所述脂溶性基团碳原子数为10。所述脂溶性基团碳原子数过少,则脂溶性的增加有限,不能有效提高载体对蟾毒灵的包裹能力;若所述脂溶性基团碳原子数过多,则脂肪链过长,可能会缠绕住多肽物质,同样不利于蟾毒灵的包裹。具体优选的,所述脂质单元为含有末端羟基的癸酸。所述含有末端羟基的癸酸长度适宜,能够与不对称的树状多肽聚合物单元有效结合,提高载体对蟾毒灵的包裹能力。

[0031] 在上述实施例中,优选的,所述蟾毒灵和所述脂化多肽胶束载体的摩尔比为1:(1.8-2.2)。若所述蟾毒灵的浓度过高,则所述脂化多肽胶束载体不能完全包裹蟾毒灵,多余的蟾毒灵会被过滤除去,从而降低了利用度,造成了浪费;所述蟾毒灵的浓度过高,则所述脂化多肽胶束载体过剩,同样会造成浪费,且过多的所述脂化多肽胶束载体,会降低蟾毒灵胶束纳米制剂中药物活性成分的有效含量。

[0032] 最为最佳实施例,本发明实施例提供了一种蟾毒灵胶束纳米制剂,包括蟾毒灵、以及包裹所述蟾毒灵的脂化多肽胶束载体,所述脂化多肽胶束载体的临界胶束浓度为 $105.38 \mu\text{mol/L}$,且一分子的所述脂化多肽胶束载体包括一分子亲水单元和一分子与所述亲水单元相连的疏水单元,其中,所述亲水单元为不对称的树状多肽聚合物单元,所述疏水单元为脂质单元,且所述树状多肽聚合物单元为 $\text{Gly-Lys-Lys-(Arg)}_2$,所述脂质单元为含有末端羟基的癸酸,且所述癸酸与所述树状多肽聚合物单元中靠近甘氨酸的赖氨酸缩合,即所述脂化多肽胶束载体为 $\text{Gly-Lys(R}_1\text{)-Lys-(Arg)}_2$,所述 R_1 为羧基与Lys的氨基缩合后的含末端羟基的癸酸。所述脂化多肽胶束载体的结构如下式(c)所示:



[0034] 该优选的种蟾毒灵胶束纳米制剂,采用无毒的氨基酸和脂肪酸为多肽胶束载体,其表面带面携带正电荷,有利于癌症细胞的结合和药物释放,同时改善使蟾毒灵的理化性质,水溶性由原有的 $42.4 \mu\text{g/ml}$ (蟾毒灵) 提高到 $142.9 \mu\text{g/ml}$ (蟾毒灵胶束纳米制剂),增加了3倍,显著提高生物利用度。对优选的蟾毒灵胶束纳米制剂及其原料采用热熔方法检测,分别得到如图3所示的蟾毒灵的HF时间曲线(DSC)图,如图4所示的不对称树脂状聚合物的HF时间曲线(DSC)图,如图5所示的蟾毒灵和不对称树脂状聚合物的HF时间曲线(DSC)图,如图6所示的蟾毒灵胶束纳米制剂的HF时间曲线(DSC)图。由图可以确定,蟾毒灵和不对称树脂

状聚合物的结合方式为物理结合。

[0035] 在上述实施例中,优选的,所述蟾毒灵胶束纳米制剂为球形结构,且所述球形结构的平均粒径为45-50nm。所述蟾毒灵胶束纳米制剂的纳米结构特性,有利于实现蟾毒灵在抗肿瘤应用中的靶向给药。

[0036] 本发明实施例提供的蟾毒灵胶束纳米制剂,采用脂化的树状多肽聚合物作为蟾毒灵载体。所述脂化多肽胶束聚合物由水性环境中的亲水和疏水单元组成,由于其具有两亲的特性,在临界胶束浓度(CMC)形成胶束包裹蟾毒灵,形成胶束制剂。本发明实施例提供的蟾毒灵胶束纳米制剂,采用无毒的氨基酸和脂质单元作为原料,药物本身安全性提高,具有非细胞毒性。且由于所述树状多肽聚合物单元的末端携带正电荷,蟾毒灵胶束纳米制剂作用时,有利于癌症细胞的结合和药物释放,同时改善蟾毒灵的理化性质,是其水溶性增加,从而提高生物利用度。此外,本发明实施例提供的蟾毒灵胶束纳米制剂,能够实现蟾毒灵在抗肿瘤应用中的靶向给药。

[0037] 本发明实施例提供的蟾毒灵胶束纳米制剂,可以通过下述方法制备获得。

[0038] 结合图7,本发明实施例还提供了一种蟾毒灵胶束纳米制剂的制备方法,包括以下步骤:

[0039] S01.制备脂化多肽Gly-Lys(R₁)-Lys-(Arg)₂,其中,所述R₁为羧基与Lys的末端氨基缩合后的癸酸残基;

[0040] S02.在所述脂化多肽中加入去离子水,得到脂化多肽胶束载体;

[0041] S03.提供蟾毒灵,将所述蟾毒灵溶解在甲醇中,然后旋蒸完全除去甲醇,避光环境下,加入所述脂化多肽胶束载体,搅拌反应24-48小时,得到树脂状物-药物悬浮液;

[0042] S04.将所述树脂状物-药物悬浮液通过0.2μm的过滤器过滤处理后,将滤液冻干处理,得到白色絮状粉末蟾毒灵胶束纳米制剂。

[0043] 具体的,上述步骤S01中,制备脂化多肽Gly-Lys(R₁)-Lys-(Arg)₂,其中,所述R₁为羧基与Lys的氨基缩合后的含末端羟基的癸酸。优选的,所述脂化多肽Gly-Lys(R₁)-Lys-(Arg)₂通过固相合计技术合成,其制备方法包括以下步骤:

[0044] S011.提供Rink酰胺树脂,溶胀处理后用哌啶溶液脱保护,用DMF洗涤后,将Fmoc-Gly-OH偶联到rink酰胺树脂上,得到Rink-Gly-OH,如图7中步骤1;

[0045] 具体的,上述步骤S011中,所述Rink酰胺树脂可以通过购买获得。将所述Rink酰胺树脂进行溶胀处理可以采用N,N-二甲基甲酰胺(DMF),然后用哌啶溶液(DMF中哌啶体积百分含量为20%,两次,每次8分钟)脱保护。Fmoc-Gly-OH采用HBTU和DIPEA预先活化,偶联到Rink酰胺树脂上。

[0046] S012.将Fmoc-Lys(Mtt)OH去保护,偶联到Rink-Gly-OH上,得到Rink-Gly-Lys(Mtt)-OH,如图7中步骤2;

[0047] 具体的,该步骤可参照下述方法实现:将Fmoc-Lys-NH(Boc)-OH溶于二氯甲烷(DCM)中。向该溶液中缓慢加入三氟乙酸(TFA),并将反应在室温下搅拌1小时。用TLC监测反应以确认反应混合物中Fmoc-Lys(Boc)-OH的完全消失。使用高真空除去DCM和TFA,并使用高真空将另外的甲苯加入到粗产物中以除去任何痕量的TFA。收集干燥的产物,并再次溶于10ml DCM中。向该溶液中加入2当量的三乙胺(TEA)和甲基三苯甲基氯(Mtt),通过用TLC监测反应继续24小时以确保完全消失Fmoc-Lys(NH₂)-OH斑点。将混合物用DCM(2×20mL)萃

取。将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。残余物通过柱色谱使用正己烷和乙酸乙酯(80:20v/v)纯化。

[0048] S013. 在Rink-Gly-Lys (Mtt) -OH上偶联脂质, 得到Rink-Gly-Lys (R_1) -OH, 如图7中步骤3;

[0049] 该步骤中, 先将Rink-Gly-Lys (R_1) -OH用TFA溶液(3% v/v, 在DCM中)、DMF洗涤, 将癸酸先前用HBTU和DIEA活化, 然后偶联到Rink-Gly-Lys (Mtt) -OH上, 得到Rink-Gly-Lys (R_1) -OH。

[0050] S014. 依次将Fmoc-Lys (Mtt) OH去保护、偶联, Fmoc-Arg (Pbf) -OH去保护、偶联, 得到脂化多肽Gly-Lys (R_1) -Lys- (Arg) $_2$ 。

[0051] 该步骤中, Fmoc-Lys (Mtt) OH的去保护、偶联, 如图7中步骤4、5, 可以通过常规方法实现。在偶联完成后, 通过用哌啶(在DMF中哌啶的体积百分含量为20%)处理, 将最终的Fmoc基团从树脂上裂解下来, 如图7中步骤6, 得到脂化多肽Gly-Lys (R_1) -Lys- (Arg) $_2$ 。进一步的, 对得到的产物用DMF洗涤, 干燥的产物在TFA、DCM、水和TIPS的混合物中搅拌, 如图7中步骤7, 除去TFA后, 残余物与乙腈共沸, 然后加入乙醚挥干。最后将其溶于水中并冻干, 制成冻干粉, 经RP-HPLC系统纯化。

[0052] 本发明实施例采用固相合计技术合成脂化多肽Gly-Lys (R_1) -Lys- (Arg) $_2$, 不仅方法简单可控, 而且氨基酸偶联的效率 $\geq 99.8\%$, 效果较好。

[0053] 上述步骤S02中, 在所述脂化多肽中加入去离子水, 在临界胶束浓度形成脂化多肽胶束载体。

[0054] 上述步骤S03中, 采用共沉淀法制备蟾毒灵制剂, 具体的, 将所述蟾毒灵溶解在甲醇中, 然后旋蒸完全除去甲醇, 避光环境下, 加入所述脂化多肽胶束载体, 搅拌反应24-48小时, 得到树脂状物-药物悬浮液。所述搅拌反应的时间不宜过长或过短, 若时间过短, 则反应不充分; 若时间过长, 超过48小时, 则脂化多肽胶束载体在水中不稳定, 容易降解。

[0055] 进一步优选的, 为了避免脂化多肽胶束载体的降解, 本发明实施例在提供蟾毒灵后, 将含有脂质化树枝状多肽聚合物的去离子水加入蟾毒灵中发生反应。

[0056] 上述步骤S04中, 过滤去除树状物-药物悬浮液中的过量固体药物, 具体的, 采用 $0.2\mu\text{m}$ 的过滤器过滤处理后, 进一步的, 所述过滤器采用尼龙注射器过滤器。

[0057] 本发明实施例提供的蟾毒灵胶束纳米制剂的制备方法, 采用固相合计技术合成多肽, 通过共沉淀法制备制剂, 方法简单易控, 具有很好地应用前景。

[0058] 以上所述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、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。



图1

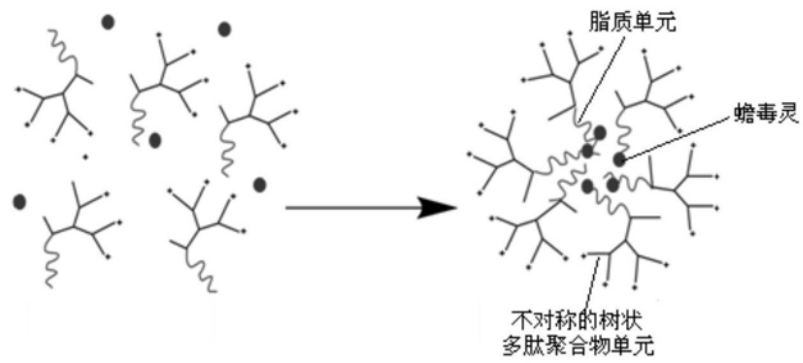


图2

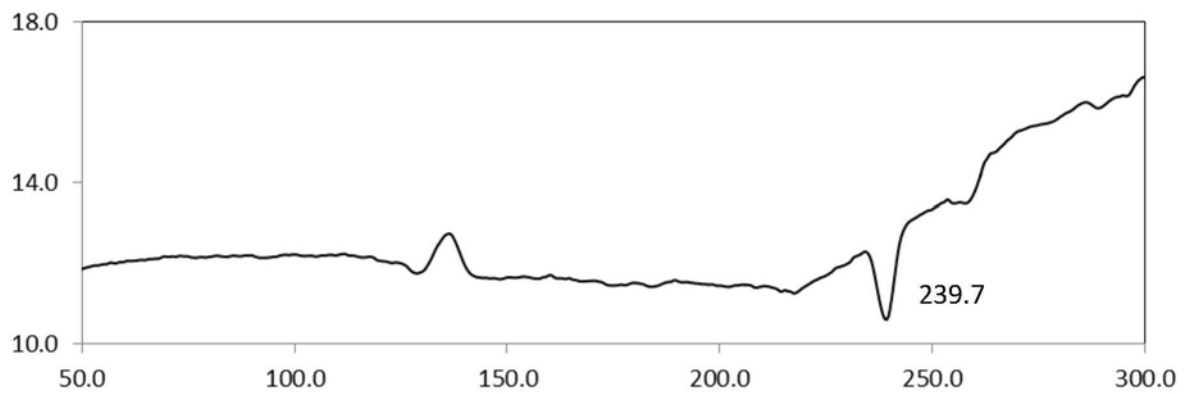


图3

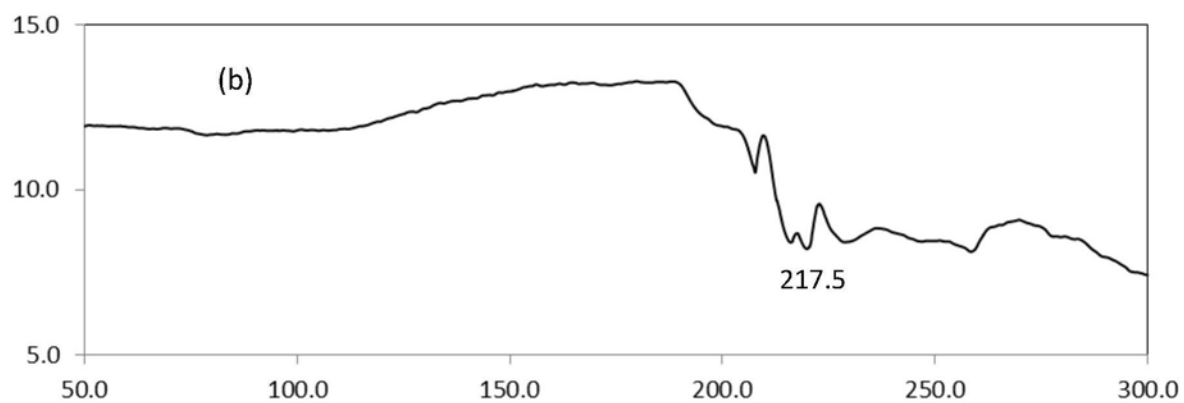


图4

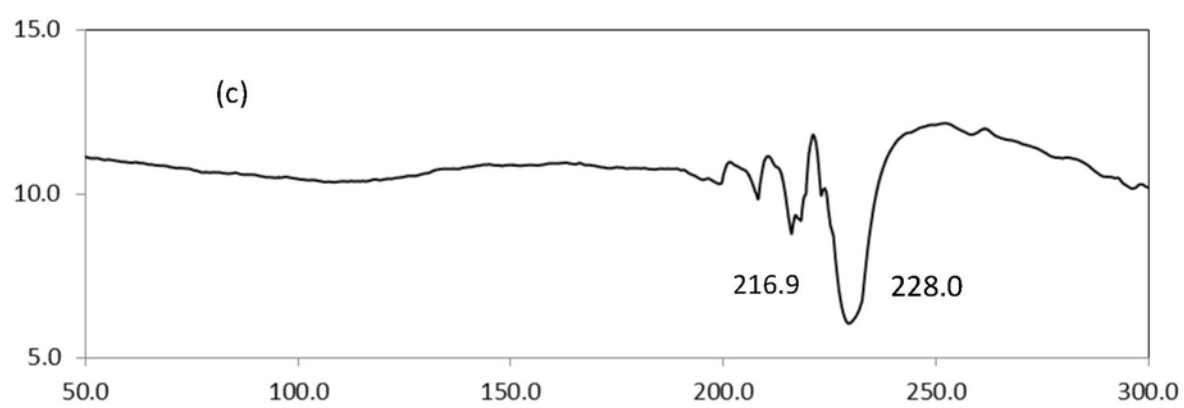


图5

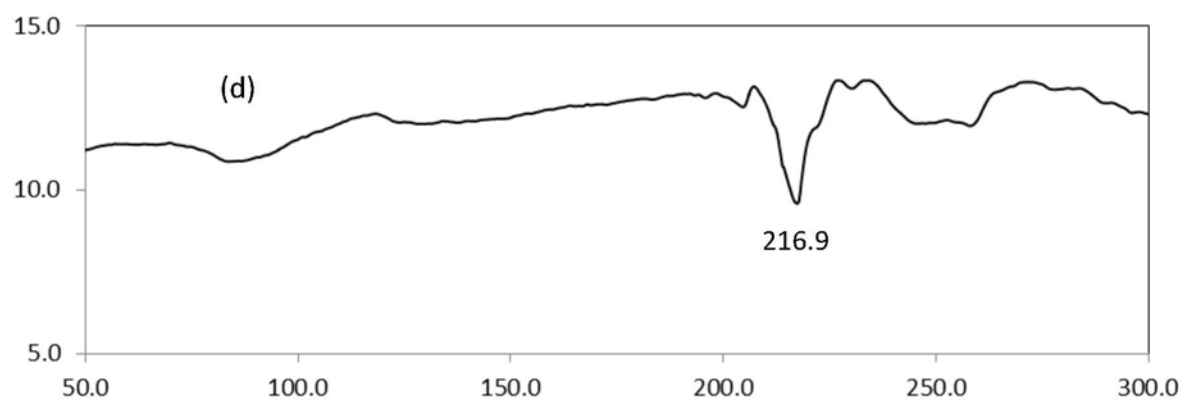


图6

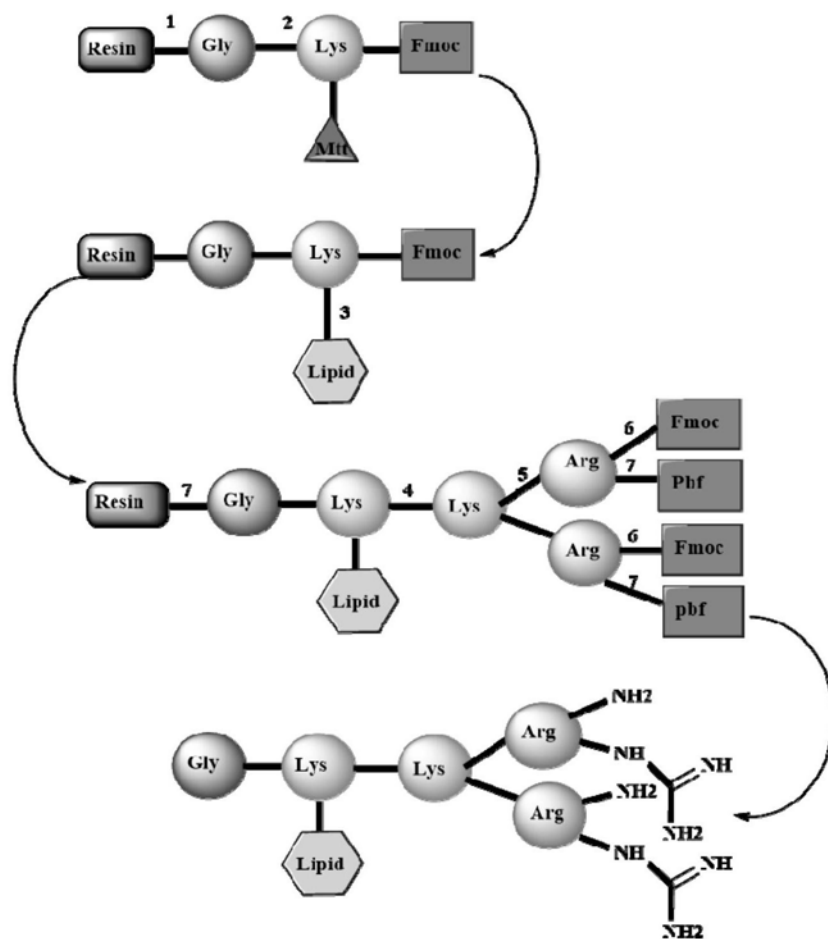


图7