

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/48
C12N 7/01
A61K 39/21
C07K 16/10



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99810852.9

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1206355C

[22] 申请日 1999.8.12 [21] 申请号 99810852.9
[30] 优先权
[32] 1998. 8.12 [33] US [31] 60/096,235
[86] 国际申请 PCT/CA1999/000746 1999.8.12
[87] 国际公布 WO2000/009703 英 2000.2.24
[85] 进入国家阶段日期 2001.3.13
[71] 专利权人 西安大略大学
地址 加拿大安大略
[72] 发明人 C-Y·康 Y·李
审查员 刘玉玲

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 黄革生

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 12 页

[54] 发明名称 HIV 疫苗
[57] 摘要

本发明提供了新的 HIV 疫苗。特别的，该疫苗包含无毒且不溶细胞的重组 HIV，其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 被不溶细胞的信号序列取代，且病毒的 nef 基因被缺失使之变得无毒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种重组人类免疫缺陷病毒-1, 其中人类免疫缺陷病毒-1 包膜糖蛋白 gp120 的天然信号序列被不溶细胞的信号序列取代。

2. 权利要求 1 的重组人类免疫缺陷病毒-1, 其中人类免疫缺陷病毒-1 包膜糖蛋白 gp120 的天然信号序列被马尔他素信号序列或 IL-3 信号序列取代。

3. 权利要求 1 或 2 的重组人类免疫缺陷病毒-1, 其中逆转录病毒变得无毒。

4. 权利要求 3 的重组人类免疫缺陷病毒-1, 其中逆转录病毒通过缺失 *nef* 基因变得无毒。

5. 一种重组人类免疫缺陷病毒-1, 其中人类免疫缺陷病毒-1 包膜糖蛋白 gp120 的天然信号序列被修饰而提供不溶细胞的信号序列。

6. 权利要求 5 的重组人类免疫缺陷病毒-1, 其中所述经修饰的不溶细胞的信号序列经修饰后含有的带正电氨基酸不超过 1 个。

7. 权利要求 6 的重组人类免疫缺陷病毒-1, 其中所述经修饰的不溶细胞的信号序列经修饰后不含带正电氨基酸。

8. 权利要求 5-7 中任一项的重组人类免疫缺陷病毒-1, 其中逆转录病毒变得无毒。

9. 权利要求 8 的重组人类免疫缺陷病毒-1, 其中逆转录病毒通过缺失 *nef* 基因变得无毒。

10. 包含权利要求 1-9 中任一项的重组人类免疫缺陷病毒-1 的疫苗。

11. 权利要求 10 的疫苗, 其中还包含佐剂。

12. 重组人类免疫缺陷病毒-1 在制备用于预防或治疗逆转录病毒感染药物中的用途, 其中人类免疫缺陷病毒-1 包膜糖蛋白 gp120 的天然信号序列被不溶细胞的天然信号序列取代, 且逆转录病毒变得无毒。

13. 权利要求 12 的用途, 其中所述不溶细胞的信号序列选自马尔

他素信号序列或 IL-3 信号序列。

14. 权利要求 12 或 13 的用途，其中病毒通过缺失 *nef* 基因而变得无毒。

15. 重组人类免疫缺陷病毒-1 在制备用于预防或治疗逆转录病毒感染药物中的用途，其中人类免疫缺陷病毒-1 包膜糖蛋白 gp120 的天然信号序列被修饰以提供不溶细胞的天然信号序列。

16. 权利要求 15 的用途，其中提供不溶细胞的天然信号序列的修饰导致天然信号序列中带正电的氨基酸不超过 1 个。

17. 权利要求 16 的用途，其中提供不溶细胞的天然信号序列的修饰导致不含带正电的氨基酸。

18. 权利要求 15-17 中任一项的用途，其中病毒通过缺失 *nef* 基因而变得无毒。

19. 包含重组人类免疫缺陷病毒-1 的疫苗，其中人类免疫缺陷病毒-1 包膜糖蛋白 gp120 的信号序列被修饰以提供不溶细胞的信号序列，且逆转录病毒变得无毒。

20. 权利要求 19 的疫苗，其中所述天然信号序列经修饰后其中带正电的氨基酸数目减少至不超过 1 个。

21. 权利要求 20 的疫苗，其中带正电的氨基酸的数目为零。

22. 权利要求 19-21 中任一项的疫苗，其中病毒通过缺失 *nef* 基因而变得无毒。

23. 权利要求 19 的疫苗，其中还包含佐剂。

HIV 疫苗

发明领域

本发明涉及在 AIDS 治疗中使用的新疫苗，以及它们的生产方法。更具体的说，本发明涉及可以大量生产、不溶细胞、且无毒的疫苗。

发明背景

尽管抗病毒治疗取得了最新进展，仍然不能永久治愈 AIDS 或 HIV 感染。就提供有效治疗而言，药物治疗是有希望的方向，然而由于副作用、顺应性和费用，进展并不快。综合这些困难的一个事实是，在发展中国家获得这些药物较难，而预测，到 2000 年 90% 的 HIV 感染将发生在这些国家。

由于传染病疫苗已获得的成功，最值得注意的是抗小型痘病毒和脊髓灰质炎病毒的疫苗，寻找 AIDS 有效疫苗的工作一直继续着。已经尝试了多种方法。大多数 HIV-1 疫苗研制集中于亚单位疫苗。亚单位疫苗方法的难点在于产生最佳免疫力的能力。现在，仍未确切知道哪些 HIV 抗原和免疫系统成分是保护免受天然感染所必需的。

早期疫苗试验着眼于基于免疫原（诸如 HIV-1 包膜蛋白质 gp120）的重组亚单位蛋白质。该方法的结果令人失望，虽然采用活的重组病毒和亚单位蛋白质的免疫方案均在一些个体中引起了针对 HIV-1 包膜的包膜特异性 CD8⁺ CTL 和中和抗体（E. L. Cooney 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 1882 - 1886; M. J. McElrath 等人，J. Infect. Dis., 1994, 169, 41 - 47; B. S. Graham 等人，J. Infect. Dis., 1992, 166, 244 - 252; 和 B. S. Graham 等人，J. Infect. Dis., 1993, 167, 533 - 537）。

HIV 包膜糖蛋白的研究没能提供成功开发疫苗研制的途径。例如，关于 HIV-1 的 gp120，已经发现 HIV-1 包膜糖蛋白 gp120 的信号序列（称为 HIV-1 天然信号序列，NSS）与 gp120 的分泌情况有关。这方面

显示,用马尔他素(mellitin)或 IL-3 信号序列取代 NSS,将导致 gp120 高水平产生并有效分泌(Y.Li 等人, Virology, 1994, 204, 266 - 278; 和 Y.Li 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 9606 - 9611)。然而,仍未知道 HIV-1 gp120 的信号序列是否在病毒的致病性中发挥作用。

优选的路线是使用完整的灭活病毒疫苗(诸如灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗)或减毒的活病毒疫苗(诸如口服脊髓灰质炎疫苗)。不幸的是,该方法在寻找 AIDS 病毒疫苗的工作中显得太危险,存在潜在的问题,诸如“Cutter 事故”,即未充分灭活的脊髓灰质炎疫苗导致真实的临床脊髓灰质炎。一种以前的方法包括使用野生型 HIV-1,然而,不可能产生足量的病毒用于制备杀死的完整病毒,因为 HIV-1 感染的 T 细胞系的产量很低(Coffin 等人, Retroviruses, CSH Press, 1989)。假设可以提高产量,则还要考虑培养大量传染性 HIV-1 潜在的可能性。

关于 HIV 疫苗,已知缺失 HIV 的 *nef* 基因可以减弱病毒。Desrosiers 及其同事已经证明,给恒河猴接种缺失 *nef* 的 SIV 可保护其免受野生型 SIV 攻击(M.D.Daniels 等人, Science, 1992, 258, 1938; R.C.Desrosiers 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6353),而且其它人已经证明 *nef* 基因不是 SIV 和 HIV 复制必需的(M.D.Daniels 等人, Science, 1992, 258, 1938; J.S.Gibbs 等人, AIDS Res. and Human Retroviruses, 1994, 10, 343; T.Igarashi 等人, J. Gen. Virol., 1997, 78, 985; H.W.Kestler III 等人, Cell, 1991, 65, 651)。此外,缺失 *nef* 基因导致病毒在正常易感宿主中不致病(M.D.Daniels 等人, Science, 1992, 258, 1938)。但是该缺失不提供可以大量生产的病毒形式,而且该形式的病毒并未显示对疫苗生产是安全的。

因此,需要无毒、能够大量生产、而且没有使用野生型 HIV-1 时存在的考虑和问题的疫苗。

发明概述

本发明的发明人发现,人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)包膜糖蛋白

gp120 的天然信号序列 (NSS) 负责感染了病毒的细胞的凋亡以及常规坏死。发明人还发现, 用更有效的信号序列 (诸如马尔他素或 IL-3 信号序列) 取代 NSS, 可产生能够高效复制并分泌 gp120 的不溶细胞的 HIV-1。因此, 本发明涉及能够高效复制并因而可用于制备逆转录病毒疫苗的不溶细胞的逆转录病毒。在最主要的方面, 本发明提供了基本上不溶细胞的逆转录病毒, 其中病毒包膜糖蛋白的天然信号序列经修饰后基本上不溶细胞, 或用基本上不溶细胞的信号序列取代。

根据一个实施方案, 逆转录病毒包膜糖蛋白天然信号序列的修饰导致更有效的病毒 (优选 HIV) 复制。相应的, 本发明提供了能够高效复制、基本上不溶细胞的重组 HIV-1, 其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 经修饰后足以预防细胞被病毒损害, 优选修饰是通过消除带正电的氨基酸完成的, 甚至更优选该消除或修饰导致带正电的氨基酸不超过 1 个, 优选 0 个。

在另一个实施方案中, 天然信号序列的取代导致更有效的 HIV 复制。相应的, 本发明提供了能够高效复制、基本上不溶细胞的重组 HIV-1, 其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 用基本上不溶细胞且更有效的信号序列取代, 优选所用所含带正电的氨基酸不超过 1 个、最好 0 个的信号序列取代, 更优选用马尔他素信号序列 (MSS) 或 IL-3 信号序列 (ILSS) 取代。

根据另一个实施方案, 基本上不溶细胞的逆转录病毒也是无毒的。相应的, 本发明提供了无毒的、基本上不溶细胞的逆转录病毒, 其包含导致病毒无毒的核酸序列添加或缺失, 其中病毒包膜糖蛋白的天然信号序列受到修饰或取代以提供基本上不溶细胞的信号序列。

在优选的实施方案中, 提供了无毒的、基本上不溶细胞的逆转录病毒, 其中包含导致病毒无致病性的 *nef* 基因足够缺失, 其中病毒包膜糖蛋白 gp120 的 NSS 受到修饰或取代以提供更有效的信号序列。

根据本发明的特殊实施方案, 提供了能够高效复制的、无毒的、基本上不溶细胞的 HIV-1, 其中包含导致病毒在正常易感宿主中无致病力的 *nef* 基因足够缺失, 其中病毒包膜糖蛋白 gp120 的 NSS 用更有

效的信号序列取代, 优选 MSS 或 ILSS。

在另一个方面, 本发明提供了包含基本上不溶细胞的重组逆转录病毒、抗逆转录病毒感染的疫苗, 其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 受到修饰以提供基本上不溶细胞的 NSS, 或用基本上不溶细胞的 NSS 取代。由于掺入重组逆转录病毒的遗传修饰包含产生保护性免疫力必需的构象表位, 所以重组逆转录病毒可以提供针对野生型逆转录病毒的保护。优选的, 逆转录病毒是 HIV, 更优选所有不同进化枝的 HIV-1。

本发明还包括预防逆转录病毒感染诱导的凋亡的方法, 包括给有此需要的动物施用足量的 NSS 的拮抗剂, 优选抗体或反义分子。

本发明还包括预防或治疗逆转录病毒感染的方法, 包括给有此需要的动物施用基本上不溶细胞的重组逆转录病毒, 其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 受到修饰以提供基本上不溶细胞的 NSS, 或用基本上不溶细胞的 NSS 取代。

本发明还包括消灭此处称为“靶细胞”的细胞(优选癌细胞)的方法, 包括给有此需要的动物施用对靶细胞特异的、经改造后含有 HIV-1 的 NSS 的重组病毒。

本发明还包括用本发明重组逆转录病毒转染的细胞。

本发明的其它特色和优点由下列详述看是显而易见的。应当这样理解, 详述和特殊实施例只是以例示的方式说明了本发明的优选实施方案, 因为由此详述, 本发明精神和范围内的各种改变和修改对本领域技术人员是显而易见的。

图的简述

现在本发明将以下列图描述:

图 1 是感染了重组杆状病毒 (AcNPV) 的 SF2/昆虫细胞的显微镜检查的照片。

图 2 提供了图解 HIV-1 *env* 信号序列对细胞死亡的影响的曲线图。

图 3 显示了琼脂糖凝胶电泳的结果, 提供感染了重组 AcNPV (以不同信号序列表达 gp120) 的 SF21 细胞的 DNA 片段化分析。

图 4 显示了琼脂糖凝胶电泳, 提供感染了以或无 HIV-1 *env* 天然

信号序列表达水泡性口炎病毒糖蛋白 G (VSV-G)) 的重组杆状病毒的 SF21 细胞的 DNA 片段化分析。

图 5 是构建无信号序列的 VSV-G 蛋白质的重组质粒的图解。

图 6 是构建含 NSS 的 HIV-1 gp120 的图解。

图 7 是质粒 pBSK VSV-G-NSS 的图解；该质粒含有含 HIV-1 *env* 蛋白质的天然信号序列的 VSV-G 蛋白质基因序列。

图 8 是构建重组质粒的图解，其中 EcoRI - BamHI 位点含有 pBluescript SK 中 pNL4-3 的亚克隆片段。

图 9 是构建重组质粒的图解，其中含有克隆到 PstI - BamHI 位点的 2245bp 片段。

图 10 是构建重组质粒的图解，其中含有经 EcoRI 和 PstI 消化的 PCR 产物 (445bp 片段)。

图 11 是构建重组质粒的图解，含有编码马尔他素信号序列或白介素-3 信号序列的寡核苷酸。

图 12 是构建重组质粒的图解，其中在载体的 BamHI - XhoI 位点之间含有由 *nef* 基因编码序列分离得到的 421bp 片段。

发明详述

重组逆转录病毒

如上所述，本发明涉及基本上不溶细胞的逆转录病毒，其中 HIV-1 包膜糖蛋白 gp120 的天然信号序列 (NSS) 被修饰以基本上不溶细胞，或用基本上不溶细胞的信号序列取代。术语“基本上不溶细胞的”，如此处使用的，指逆转录病毒不显著损害或杀死它所感染的细胞。

在一个实施方案中，本发明提供了能够高效复制的、基本上不溶细胞的重组 HIV-1，其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 被充分修饰以预防细胞被病毒损害，优选这种修饰是通过消除带正电的氨基酸完成的，甚至更优选该消除或修饰导致带正电的氨基酸不超过 1 个，优选 0 个。可能被修饰或取代的带正电的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸。

在另一个实施方案中，天然信号序列的取代导致更有效的 HIV 复制。相应的，本发明提供了能够高效复制的、基本上不溶细胞的重组

HIV-1, 其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 被基本上不溶细胞且更有效的信号序列取代。在优选的实施方案中, HIV-1 包膜糖蛋白 NSS 被马尔他素或 IL-3 信号序列取代, 降低了逆转录病毒的细胞毒性。同样的, 本发明, 在其范围内, 包括用导致逆转录病毒基本上不溶细胞的任何信号序列取代 NSS。发明人还指出, 除了降低细胞毒性, 用马尔他素或 IL-3 信号序列取代 NSS 还导致更高水平产生并分泌 gp120。发明人还指出, NSS 取代导致部分缺失 *vpu* 基因。研究显示, *vpu* 基因可以完全被缺失而对病毒的复制能力没有任何可测量的影响 (James 等人, AIDS Res. Human Retrovirus, 1994, 10, 343 - 350)。

在另一个实施方案中, 逆转录病毒变得无毒。在优选的实施方案中, 病毒通过缺失 *nef* 基因而变得无毒。相应的, 本发明提供了无毒的、基本上不溶细胞的逆转录病毒, 其中包含对 *nef* 基因的充分缺失而导致病毒无致病力, 其中病毒包膜糖蛋白 gp120 编码序列用更有效的信号序列取代。如此处使用的, 术语“充分缺失”, 指序列缺失足够预防转录及由此 *nef* 蛋白质产物的产生。

在另一个实施方案中, 逆转录病毒变得无毒、基本上不溶细胞、且包含导致病毒无致病力的对 *nef* 基因和 *vpu* 基因的足够缺失。

本发明的重组逆转录病毒可以是任何逆转录病毒, 包括 HIV-1、HIV-2、SIV、HTLV-1。优选的, 逆转录病毒是选自 HIV-1 和 HIV-2 的人类免疫缺陷病毒, 更优选的, 逆转录病毒是 HIV-1。

本发明的重组逆转录病毒可以使用本领域已知技术进行制备。在一个实施方案中, 可以在适合逆转录病毒在宿主体内复制和表达的条件下, 将逆转录病毒导入宿主细胞内。相应的, 本发明还提供了转染了重组逆转录病毒的细胞, 其中病毒包膜糖蛋白 gp120 的天然信号序列受到修饰以提供基本上无细胞毒性的病毒, 或用基本上不溶细胞的信号序列取代。细胞优选 T 淋巴细胞, 更优选并非转化细胞系衍生的 T 细胞。

由于逆转录病毒可以以对宿主无致病力的形式大量生产, 所以本发明的基本上不溶细胞且无毒的逆转录病毒将对预防或治疗逆转录病

毒感染非常有用，优选的，本发明的病毒将对研制预防和治疗 HIV 感染的 HIV/AIDS 疫苗有用。相应的，本发明还提供了预防或治疗逆转录病毒感染的方法，包括给有此需要的动物施用有效量的本发明灭活的、重组的、基本上不溶细胞的、无毒的逆转录病毒。术语“有效量”，如此处使用的，指对于达到预期成效必需的剂量和周期有效的用量。术语“动物”，如此处使用的，包括动物界的所有成员，包括哺乳动物，优选人。

在优选的实施方案中，本发明提供了预防或治疗逆转录病毒感染的方法，包括给有此需要的动物施用有效量的灭活的、重组的、基本上不溶细胞的、无毒的逆转录病毒，其中病毒包膜糖蛋白（优选 gp120）的天然信号序列被修饰以提供基本上不溶细胞的信号序列，优选的，病毒通过缺失 *nef* 基因变得无毒。根据优选的实施方案，导致产生不溶细胞的 NSS 的修饰使得 NSS 序列中带正电的氨基酸不超过 1 个，更优选 0 个。最优选的动物是人，优选的逆转录病毒是 HIV-1。

在更优选的实施方案中，本发明提供了预防或治疗逆转录病毒感染的方法，包括给有此需要的动物施用有效量的灭活的、重组的、基本上不溶细胞的、无毒的逆转录病毒，其中病毒包膜糖蛋白（优选 gp120）的天然信号序列被基本上不溶细胞的信号序列取代，优选病毒通过缺失 *nef* 基因变得无毒。最优选的动物是人，优选的逆转录病毒是 HIV-1。

根据 NSS 被取代的方法中的一个优选实施方案，该不溶细胞的信号序列选自马尔他素序列和 IL-3 信号序列。

疫苗

本发明还包括包含有效量的无毒且基本上不溶细胞的逆转录病毒的疫苗，其中病毒包膜糖蛋白（优选 gp120）的天然信号序列被基本上不溶细胞的信号序列取代，且病毒通过缺失足够部分的 *nef* 基因变得无毒。逆转录病毒还可能缺失了部分 *vpu* 基因，这是 NSS 取代的结果。优选的，该基本上不溶细胞的信号序列选自马尔他素序列和 IL-3 信号序列。

根据一个实施方案，逆转录病毒包膜糖蛋白天然信号序列的修饰导致更有效的病毒（优选 HIV）复制。相应的，本发明提供了能够高效复制的、不溶细胞的重组 HIV-1，其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 被充分修饰以预防细胞被病毒损害，优选这种修饰通过消除带正电的氨基酸完成，甚至更优选该消除或修饰导致带正电的氨基酸不超过 1 个，更优选 0 个。

在另一个实施方案中，该不溶细胞的信号序列的取代导致更有效的 HIV 复制。相应的，本发明提供了包含能够高效复制的、不溶细胞的重组 HIV-1 的疫苗，其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 被不溶细胞且更有效的信号序列取代，优选该信号序列所含带正电的氨基酸不超过 1 个，优选马尔他素信号序列（MSS）或 IL-3 信号序列（ILSS）。

根据另一个实施方案，基本上不溶细胞的逆转录病毒也是无毒的，这优选是通过缺失 *nef* 基因达到的。相应的，本发明提供了包含无毒的、基本上不溶细胞的逆转录病毒的疫苗，该逆转录病毒包含导致病毒无毒的核酸序列添加或缺失，且病毒包膜糖蛋白的天然信号序列被修饰或取代以提供基本上不溶细胞的信号序列。

或者，疫苗可以包含有效量的无毒且基本上不溶细胞的逆转录病毒，其中病毒包膜糖蛋白 gp120 的天然信号序列被修饰而使其中带正电的氨基酸数目减少至不超过 1 个，优选 0 个，且病毒通过缺失足够部分的 *nef* 基因变得无毒。

相应的，本发明还提供了预防或治疗逆转录病毒感染的方法，包括给有此需要的动物施用本发明的疫苗。如此处使用的，“疫苗”包括所有预防性和治疗性疫苗。根据一个实施方案，疫苗包含无毒且基本上不溶细胞的重组逆转录病毒，其中病毒包膜糖蛋白的 NSS 被修饰以提供基本上不溶细胞的 NSS，或被基本上不溶细胞的 NSS 取代，且病毒通过缺失足够部分的 *nef* 基因变得无毒。

本发明的疫苗组合物适合于以体内生物学相容形式给主体施用。表述“适合于体内施用的生物学相容形式”，如此处使用的，指治疗作用超过毒性作用的任何物质施用形式。该物质可以给任何动物（优选

人)施用。

本发明的疫苗还可以包含合适的稀释液、佐剂和/或载体。优选的,疫苗包含能够增强疫苗体内免疫原性的佐剂。佐剂可以选自许多本领域的已知佐剂,包括革兰氏阴性细菌内毒素的类脂 A 部分、分枝杆菌的海藻糖二霉菌酸酯、磷脂溶血卵磷脂、二甲基双十八烷基溴化铵(dimethyldictadecyl ammonium bromide, DDA)、某些线性聚氧丙烯-聚氧乙烯(POP-POE)嵌段聚合物、氢氧化铝、和脂质体。疫苗中还可以包含已知增强免疫应答的细胞因子,包括 GM-CSF、IL-2、IL-12、TNF 和 IFN γ 。

疫苗的剂量随多种因素变化,诸如个体的患病状况、年龄、性别、体重、和抗体在个体体内引起期望应答的能力。可以调整给药方案以提供最佳治疗应答。例如,可以每天施用分装的剂量,或者可以根据治疗情况成比例的减小剂量。还可以根据情况改变疫苗的剂量以提供最佳预防性剂量应答。

疫苗还可以以方便的方式施用,诸如注射(皮下、静脉内、肌肉内、等等)、口服、吸入、经皮肤给药(诸如局部用霜或膏、等等)、或栓剂。

预防凋亡

本发明还包括预防逆转录病毒 NSS 对细胞发挥其凋亡作用的方法,凋亡由逆转录病毒感染诱导。相应的,本发明提供了预防或抑制凋亡的方法,包括给有此需要的动物施用足量的 NSS 拮抗剂。拮抗剂可以是能够抑制 NSS 基因或其蛋白质产物(此处称为“NSS 蛋白质”)的任何物质,优选的拮抗剂是抗体或反义分子。

在一个实施方案中,拮抗剂是抑制 NSS 蛋白质的物质,诸如 NSS 蛋白质特异性抗体。NSS 蛋白质的抗体可以使用本领域已知技术进行制备,诸如 Kohler 和 Milstein, Nature, 1975, 256, 495 和美国专利号 RE 32,011、4,902,614、4,543,439、和 4,411,993 中描述的,诸文献此处引用作为参考文献。(还可以参阅 Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis, Plenum

Press, Kennett、McKearn、和 Bechtol 编, 1980; 和 Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow 和 Lane 编, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, 此处引用作为参考文献)。在本发明的内容中, 抗体理解为包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(如 Fab 和 $F(ab)_2$) 和重组生产的结合配偶体。因此, 本发明提供了抑制逆转录病毒 NSS 作用的方法, 包括施用有效量的可抑制 NSS 蛋白质的抗体。

除了抗体, 也可以使用可与 NSS 蛋白质结合并抑制其功能的其它拮抗剂或配基。NSS 蛋白质配基可以通过试验样品中可与 NSS 蛋白质结合的肽进行鉴定。可以使用检测蛋白质-蛋白质相互作用的任何实验系统或测试方法, 包括免疫共沉淀、交联, 而且可以使用通过梯度或层析柱的共纯化。可以测试生物学样品和商品化的文库中的 NSS 蛋白质结合肽。例如, 可以使用标记的 NSS 蛋白质或可溶性 NSS 蛋白质探查噬菌体展示库。另外, 可以使用可与 NSS 蛋白质结合的抗体分离其它具有 NSS 蛋白质结合亲和力的肽。例如, 可以使用标记抗体探查噬菌体展示库或生物学样品。另外, 可以使用编码 NSS 蛋白质的核酸序列探查生物学样品或文库中编码 NSS 蛋白质结合蛋白质或配基的核酸。

在另一个实施方案中, NSS 拮抗剂是抑制 NSS 蛋白质表达的反义寡核苷酸。与来自 NSS 蛋白质基因的核酸序列互补的反义寡核苷酸可以用于本发明抑制 NSS 蛋白质的方法中。

因此, 本发明提供了抑制逆转录病毒 NSS 的作用的方法, 包括给有此需要的动物施用有效量的与来自 NSS 蛋白质基因的核酸序列互补的反义寡核苷酸。优选的逆转录病毒是 HIV-1。

术语“反义寡核苷酸”, 如此处使用的, 指与其靶序列互补的核苷酸序列。

术语“寡核苷酸”指核苷酸或核苷单体(由天然产生的碱基、糖、和糖间(主链)连接键组成)的寡聚物或聚合物。该术语还包括经修饰或取代的包含非天然产生的单体或其功能相似的部分的寡聚物。由于诸如细胞摄取增强、或核酸酶存在时的稳定性增加等特性, 这些经

修饰或取代的寡核苷酸可能优于天然形式。该术语还包括包含两种或多种化学独特区域的嵌合寡核苷酸。例如，嵌合寡核苷酸可以包含至少一个赋予有利特性（如增加核酸酶抗性、增加细胞摄取）的经修饰核苷酸区域、或者可以连接两种或多种本发明寡核苷酸以形成嵌合寡核苷酸。

本发明的反义寡核苷酸可以是核糖核酸或脱氧核糖核酸，而且可以包含天然产生的碱基，包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。寡核苷酸还可以包含经修饰碱基，诸如黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基、2-丙基和其它烷基腺嘌呤、5-卤代尿嘧啶、5-卤代胞嘧啶、6-氮尿嘧啶、6-氮胞嘧啶、6-氮胸腺嘧啶、假尿嘧啶、4-巯基尿嘧啶、8-卤代腺嘌呤、8-氨基腺嘌呤、8-巯基腺嘌呤、8-硫烷基腺嘌呤、8-羟基腺嘌呤、其它8-取代的腺嘌呤、8-卤代鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、8-巯基鸟嘌呤、8-硫烷基鸟嘌呤、8-巯基鸟嘌呤、其它8-取代的鸟嘌呤、其它氮和脱氮尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤、或鸟嘌呤、5-三氟甲基尿嘧啶和5-三氟胞嘧啶。

本发明的其它反义寡核苷酸可以在磷酸主链、短链烷基或环烷基糖间连接键、或短链杂原子或杂环糖间连接键中包含经修饰的磷、氧杂原子。例如，反义寡核苷酸可以包含硫代磷酸酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、和二硫代磷酸酯。在本发明的实施方案中，在4-6个3'末端碱基中含有硫代磷酸酯键。在另一个实施方案中，硫代磷酸酯键连接所有核苷酸。

本发明的反义寡核苷酸还可以包含可能更适合于作为治疗性或试验性试剂的核苷酸类似物。寡核苷酸类似物的实例是肽核酸（PNA），其中DNA（或RNA）的脱氧核糖（或核糖）磷酸主链被与肽中发现的相似的聚酰胺主链取代（P.E.Nielsen等人，Science, 1991, 254, 1479）。PNA类似物显示对酶的降解有抵抗力，而且在体内和体外寿命延长。而且由于PNA链和DNA链之间没有电荷排斥，所以PNA与互补DNA序列的结合更强。其它寡核苷酸可以包括包含聚合物主链、环状主链、或无环主链的核苷酸。例如，核苷酸可以包含吗啉主链结构（美国专

利号 5,034,506)。寡核苷酸还可以包含诸如报导基团、改进寡核苷酸药物动力学特性的基团、或改进反义寡核苷酸药效动力学特性的基团等基团。反义寡核苷酸还可以包含糖模拟物。

反义核酸分子可以通过化学合成和酶连接反应以本领域已知步骤进行构建。本发明的反义核酸分子或其片段可以使用天然产生的核苷酸或设计为增加分子的生物学稳定性、或增加与 mRNA 或天然基因形成的杂合体的物理学稳定性的各种经修饰核苷酸（如硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代核苷酸）进行化学合成。反义序列可以使用以重组质粒、噬菌粒或减毒病毒的形式导入细胞的表达载体进行生物学生产，其中反义序列在高效调控区域的控制下进行生产，所述调控区域的活性可以由载体导入的细胞类型确定。

此外，本发明还涉及检测可抑制逆转录病毒 NSS 活性的物质的方法，包括使包含 NSS 的逆转录病毒与待测物质在允许抑制 NSS 的条件下发生反应，试验逆转录病毒诱导凋亡的能力，并与不含待测物质时得到的诱导凋亡的能力进行比较，从而测定物质对逆转录病毒 NSS 的作用。

癌细胞的凋亡

本发明还包括杀死或消灭靶细胞（优选癌细胞）的方法，包括给细胞施用有效量的重组病毒，优选 VSV 或优选包含 HIV-1 的 NSS、对靶细胞特异的任何其它载体 RNA 病毒。优选的，细胞位于需要的动物体内，最优选在人体内。被感染细胞或癌细胞表达细胞特异标记，可以在掺入了 HIV-1 NSS 的合适载体中插入其互补识别位点。该方法已经用于经改造后包含 CD4 和 CXCR4 基因的水泡性口炎病毒（VSV），由此将经修饰的 VSV 靶向感染被 HIV-1 感染的细胞（M. J. Schnell 等人，Cell, 1997, 90, 849 - 857）。相应的，本发明提供了杀死靶细胞（诸如癌细胞）的方法，包括给有此需要的动物施用包含 NSS 和靶细胞特异性识别位点的重组病毒。在一个实施方案中，将 HIV-1 的 NSS 插入根据特殊癌细胞表面抗原靶向特异癌细胞类型的经修饰类 VSV 载体，由此为 VSV 提供在靶癌细胞中诱导凋亡的能力。

下列非限制性实施例是本发明的例证。

实施例

实施例 1

重组杆状病毒的构建

Li 等人 (Virology, 1994, 204, 266 - 278) 以前已经描述了表达 HIV-1 gp120 - NSS、gp120-MSS、和 gp120- Δ S 的重组杆状病毒的构建。

Bailey 等人 (Virology, 1989, 169, 323 - 331) 以前已经描述了表达 VSV_{Ind} 糖蛋白 (G) 的重组杆状病毒的构建。

表达含 HIV-1 *env* 信号序列的 VSV_{Ind}G 蛋白 (VSV-G-NSS) 的重组杆状病毒的构建:

为了取代 VSV-G 蛋白的信号序列, 本发明的发明人首先用下列两种引物通过 PCR 构建了 VSV-G- Δ S:

引物 # 1: 5'-GGC GGATCC GGATCA ACG TTC ACC ATA GTT-3'
(5'引物) BamHI SphI +1VSV-G

引物 # 2: 与 VSV-G 的 C 末端基因互补
(3'引物)

5'GGC GGATCC TTA CTT TCC AAG TCG -3'
BamHI 终止密码子

质粒 pwK1(包含 VSV_{Ind} 全长 G 基因, 由美国弗吉尼亚大学的 Robert R. Wagner 博士惠赠) 作为模板, 用基因扩增试剂盒由 20ng pwK1 模板和 1.0 μ M 每种引物在 Perkin-Elmer Cetus 热循环仪上通过 30 个循环的 PCR (94 $^{\circ}$ C, 1min; 45 $^{\circ}$ C, 2min; 72 $^{\circ}$ C, 3min) 进行扩增。

所有引物均在 5' 末端具有 BamHI 位点, 所以扩增的 VSV-G- Δ S DNA 片段可以插入到质粒 pBluescript SK 载体 (Stratagene) 的 BamHI 位点。选择 VSV-G- Δ S 的 5' 末端朝向 T7 启动子的克隆, 并用 SphI 和 XhoI 限制酶进行消化。载体显示于图 5。

HIV-1 信号序列的扩增:

由 pBluescript-gp120-NSS 用下列两种引物通过 PCR 扩增 *env* 基因的 HIV-1 信号序列:

引物 # 1: 5'-AATACGACTCAC TAT-3'

(T7 引物)

引物 # 2: 5'-GGC GCATGC ACTACA GATCAT-3'
SphI

(与 HIV-1 信号序列基因的 C 末端互补)

这图解于图 6。将包含 HIV-1 信号序列的扩增 DNA 片段用 XhoI 和 SphI 限制酶进行消化, 并插入到经 XhoI 和 SphI 消化的载体 pBluescript VSV-G-ΔS 中。将得到的质粒命名为 pBSK VSV-G-NSS, 并通过 DNA 测序进一步确认构建。这图解于图 7。

将 VSV-G-NSS 的 BamHI 片段插入到杆状病毒 pAcYM1 的 BamHI 位点 (Li 等人, Virology, 1994, 204, 266-278), 并通过常规转染方法构建表达 VSV-G-NSS 的重组杆状病毒 (Li 等人, Virology, 1994, 204, 266-278)。

实施例 2

感染了重组杆状病毒的细胞的显微镜检查

用重组 AcNPV 以 5 PFU/细胞的感染复数感染 SF21 细胞, 并于 27 °C 温育 48hr。通过相差显微镜检查被感染细胞。结果显示于图 1。(A) 感染了野生型 AcNPV 的细胞; (B) 感染了 vAcgp120-NS 的细胞 (含有 HIV-1 天然信号序列的 rgp120 显示细胞溶解); (C) 感染了 vAcgp120-ΔS 的细胞 (不含信号序列的 rgp120 显示完整细胞); (D) 感染了 vAc8gp120-MS 的细胞 (含有马尔他素信号序列的 rgp120 显示完整细胞); (E) 感染了 vAcVSV-G 的细胞 (VSV G 蛋白显示完整细胞); (F) 感染了 vAcVSV-G-NS 的细胞 (含有 HIV-1 *env* 天然信号序列的 VSV G 蛋白显示细胞溶解)。

上述结果证明 HIV-1 *env* 信号序列快速杀死细胞。

实施例 3

HIV-1 *env* 信号序列对细胞死亡的影响

台盼蓝实验:

用重组 AcNPV 以 5 PFU/细胞的感染复数感染 SF21 细胞 1hr, 除去接种物, 并在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的完全培养基 TNM-FH 中温育。感染 24、48、和 72hr 后, 细胞用台盼蓝 (GIBCO, BRL) 染色 5min, 通过显微镜对细胞进行计数, 并使用下列公式计算死细胞所占百分比:

$$\frac{\text{死细胞 (染色的)}}{\text{活细胞 (未染色的) + 死细胞}} \times 100 = \% \text{ 死细胞}$$

乳酸脱氢酶释放实验 (LDRA):

根据制造商 (Boehringer Mannheim 细胞毒性检测试剂盒) 的说明书, 进行 LDRA。

用重组 AcNPV 以 5 PFU/细胞的感染复数感染 SF21 细胞 1hr, 除去接种物, 并在完全培养基中于 27℃ 温育。每隔 12hr 收集培养物, 并以 12,000rpm 离心 1min。将培养物上清液稀释 10 倍, 并将 100 μl 上清液与 100 μl 反应混和物 (细胞毒性检测试剂盒) 一起于室温温育 30min。使用微量板 (ELISA) 读数仪 (Bio-Rad 550) 通过定量测定形成的甲臍染料, 测量样品于 490nm 的吸光值。

台盼蓝和乳酸脱氢酶释放实验的结果依次图解于图 2A 和 2B。图 2A: 表达具不同信号序列的 rgp120 或 VSV-G 蛋白后浸透了台盼蓝的细胞 (死细胞) 所占的百分比。图 2B: 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放实验 (Boehringer Mannheim 的细胞毒性检测试剂盒)。通过于 490nm 读数定量测定 ELISA 板中形成的甲臍染料, 测量感染了表达具不同信号序列的 rgp120 或 VSV-G 的重组病毒的 SF21 细胞释放的 LDH 量。

总之, 含有 HIV-1 *env* 天然信号序列的 rgp120 和 VSV-G 杀死细胞更加快速。在没有 HIV-1 *env* 天然信号序列或有马尔他素信号序列

的条件下, 细胞存活更久。HIV-1 *env* 天然信号序列负责快速细胞死亡。

实施例 4

凋亡检查

总 DNA 的抽提方法:

用重组 AcNPV 以 5 PFU/细胞的感染复数感染 SF21 细胞 (3×10^6) 1hr。除去接种物, 并在完全培养基中于 27℃ 温育 48hr。将细胞以 2500rpm 离心 10min, 并用 TSE (10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA, 1 % SDS, 并加入蛋白酶 K 至终浓度为 70 μ g/ml) 抽提。然后, 将样品于 37℃ 温育 2hr, 并在温育后加入 NaCl 至终浓度为 1M, 然后将样品于 4℃ 温育过夜。用酚:氯仿 (1:1) 和氯仿抽提 DNA。最后加入 100 % 乙醇沉淀 DNA (80℃ 15min), 并以 12,000rpm 15min 离心 DNA 沉淀。DNA 沉淀用 70 % 乙醇清洗一次, 重悬于含 RNase A (50 μ g/ml) 的 TE (10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA), 在 1.2 % 琼脂糖凝胶上进行电泳, 并用溴化乙锭进行染色 (N. Chejanovsky 和 E. Gershburg, Virology, 1995, 209, 519 - 525)。结果图解于图 3。总细胞 DNA (A) 或低分子量 DNA (B) 于感染后 48hr 抽提, 并在含溴化乙锭的 1.2 % 琼脂糖凝胶上进行电泳。M 道, DNA 标准; WT 道, 感染了野生型 AcNPV 的细胞; Δ S 道, 感染了 Δ S 的细胞 (无信号序列的 *rgp120*); NSS 道, 感染了 vAcgp120-NS 的细胞 (含 HIV-1 *env* 天然信号序列的 *rgp120*); MSS 道, 感染了 vAcgp120-MS 的细胞 (含马尔他素信号序列的 *rgp120*)。上述结果证明 HIV-1 *env* 天然信号序列诱导凋亡。

片段化 DNA 的抽提:

用 vAcVSV-G (VSV-G) 或 vAcVSV-G-NSS (VSV-G-NSS) 以 5 PFU/细胞的感染复数感染 SF21 细胞, 并于 27℃ 温育 48hr。感染 48hr 后, 将 SF21 细胞 (3×10^6) 以 2500rpm 离心 5min, 并在含 10mM Tris HCl (pH8.0)、10mM EDTA、和 0.5 % Triton X-100 的溶液中溶解, 然后在 Eppendorf 微量离心机中以 12,000rpm 离心 25min 以沉淀染色体 DNA。将上清液用 0.1mg/ml RNase A 于 37℃ 消化 1hr, 然后在存在 1

% SDS 的条件下用 1mg/ml 蛋白酶 K 于 50℃ 消化 2hr, 用酚和氯仿抽提, 用冷的乙醇沉淀。将沉淀重悬于 TE, 并在含 5 μg/ml 溴化乙锭的 11.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳。对 DNA 进行 UV 透视可视化 (Rosario Leopardi 和 Bernard Roizman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 9583 - 9587)。

结果显示于图 3 的 B 图和图 4 的 B 图。

实施例 5

含部分 *vpu* 和 *nef* 缺失和 NSS 取代的重组 HIV-1 的构建

1. 含 NSS 取代 (用 MSS、IL-3 或任何其它信号序列) 和 *vpu* 缺失的质粒 pNL4-3 的构建

传染性 HIV-1 原病毒 DNA 克隆, pNL4-3 (由 Malcolm Martin 博士通过 AIDS Research and Reference program, Division of AIDS, NIAID, NIH 提供, Adachi 等人, J. Virol., 1986, 59, 284 - 291) 含有两个单一限制酶位点: EcoRI (第 5744 位) 和 BamHI (第 8466 位)。 *env* 基因编码区由第 6221 位起始并终止于第 8785 位。为了用马尔他素、IL-3 或任何其它分泌蛋白信号序列取代 HIV-1 *env* 的天然信号序列, 由琼脂糖凝胶分离 pNL4-3 的 EcoRI - BamHI 片段, 并亚克隆到 pBluescript SK 载体的 EcoRI - BamHI 位点, 如图 8 图解的。根据该产物, 设计了下列 4 种引物:

引物 # 1 (正向):

5'-GGC GAATTC TGC AAC AAC TGC TG -3'
EcoRI

引物 # 2 (反向):

5'-GGC CTG CAG TCA TTA GGC ACT GTC TTC TGC TCT TTC -3'
PstI 终止密码子

引物 # 3 (正向):

5'-GGC CTG CAG CCA TGG ACA GAA AAA TTG TTG GTC ACA GTC -3'
PstI NcoI

引物 # 4 (反向):

5' - GGC GGATCC GTT CAC TAA TCG AAT GG - 3'
 BamHI

以 pBSK-*env* 作为模板, 并使用引物 # 1 和 # 2 进行 PCR, 扩增 *env* 区的左边部分, 477bp 片段。相似的, 使用引物 # 3 和 # 4 扩增 *env* 的右边部分, 2245bp。将 EcoRI - PstI PCR 产物 (477bp 片段) 用 EcoRI 和 PstI 进行消化, 而将 PstI - BamHI PCR 产物 (2245bp 片段) 用 PstI 和 BamHI 进行消化。然后, 将经 PstI - BamHI 消化的 2245bp 片段克隆到 pBSK 载体的 PstI - BamHI 的位点, 如图 9 显示的。

随后, 将 pBSK-2245 用 EcoRI 和 PstI 进行消化, 并与经 EcoRI 和 PstI 消化的 PCR 产物 (445bp 片段) 进行连接, 产生质粒 pBSK-*env*- Δ S, 如图 10 显示的。

将质粒 pBSK-*env*- Δ S 用 PstI 和 NcoI 进行消化, 然后与编码 MSS、IL-3 信号序列或任何其它期望的信号序列的合成寡核苷酸进行连接。该合成寡核苷酸在 5' 末端含有 PstI 位点, 而在 3' 末端含有 NcoI 位点。在连接到载体中之前, 首先将这些双链寡核苷酸用 PstI 和 NcoI 进行消化。

编码马尔他素信号序列的合成寡核苷酸 (只显示正义链):

PstI
 5' - GGC CTG CAG ATG AAA TTC TTA GTC AAC GTT GCC
 CTT GTT TTT ATG GTC GTG TAC ATT TCT TAC
 ATC TAT GCG GAT CCATGG GCC - 3'
 NcoI

编码白介素-3 信号序列的合成寡核苷酸 (只显示正义链):

```

      PstI
5'-GGC CTG CAG ATG CTG CTC CTG CTC CTG ATG CTC
      TTC CAC GGA CTC CAA GCT TCA ATC AGT GGC GAT
      CCATGG GCC -3'
      NcoI

```

产生的重组质粒显示于图 11。

测序核实修饰正确后, 将质粒用 EcoRI 和 BamHI 进行消化以分离 EcoRI - BamHI 片段, 再克隆到 pNL4-3 原病毒 DNA 载体的 EcoRI - BamHI 位点。将得到的质粒命名为 pHIV-1-MSS (或 pHIV-1-IL3SS)。

另外, 在上述构建过程中, NSS 不只用 MSS 或 IL-3 信号序列取代, 还产生部分 *vpu* 基因缺失。*vpu* 编码 82 个氨基酸, 而且它的 3' 末端与 HIV-1 *env* 基因的信号序列交叠大约 28 个氨基酸。然而, 它位于不同的阅读框架 (-1 阅读框架)。研究显示, 缺失 *vpu* 或 *env* 基因不改变病毒在黑猩猩 PBMC、人 PBMC、或 B/T 细胞杂交系 CEMx174 中的复制 (James 等人, AIDS Res. Human Retrovirus, 1994, 10, 343 - 350)。因此, 在用引物 # 1 和 # 2 PCR 扩增 *env* 左边部分的 455bp 片段的过程中, 在 *env* 基因的起始密码子前加入了两个终止密码子, 导致缺失了 *vpu* 的 28 个氨基酸 (见引物 # 2)。

2. 含 *nef* 缺失的质粒的构建

在 pNL4-3 原病毒 DNA 克隆中, *nef* 基因编码序列由第 8787 位起始, 并终止于第 9407 位。还有两个单一限制酶位点: 在 *env* 基因中位于第 8466 位的 BamHI 位点, 和在 *nef* 基因中位于第 8887 位的 XhoI 位点。为了产生 *nef* 基因缺失, 将质粒 HIV-1 MSS (或 IL-3SS) 用 BamHI 和 XhoI 进行消化。分离产生的 421bp 的 BamHI - XhoI 片段, 并亚克隆到 pBSK 载体的 BamHI - XhoI 位点, 如图 12 显示的。设计了两种引物:

引物 # 5: BamHI
(正向) 5'-GGC GGATCC TTA GCA CTT ATC TGG-3'

25 引物 # 6: XhoI
5'-GCC CTC GAG TCA TTA ATA CTG CTC CCA CCC-3'

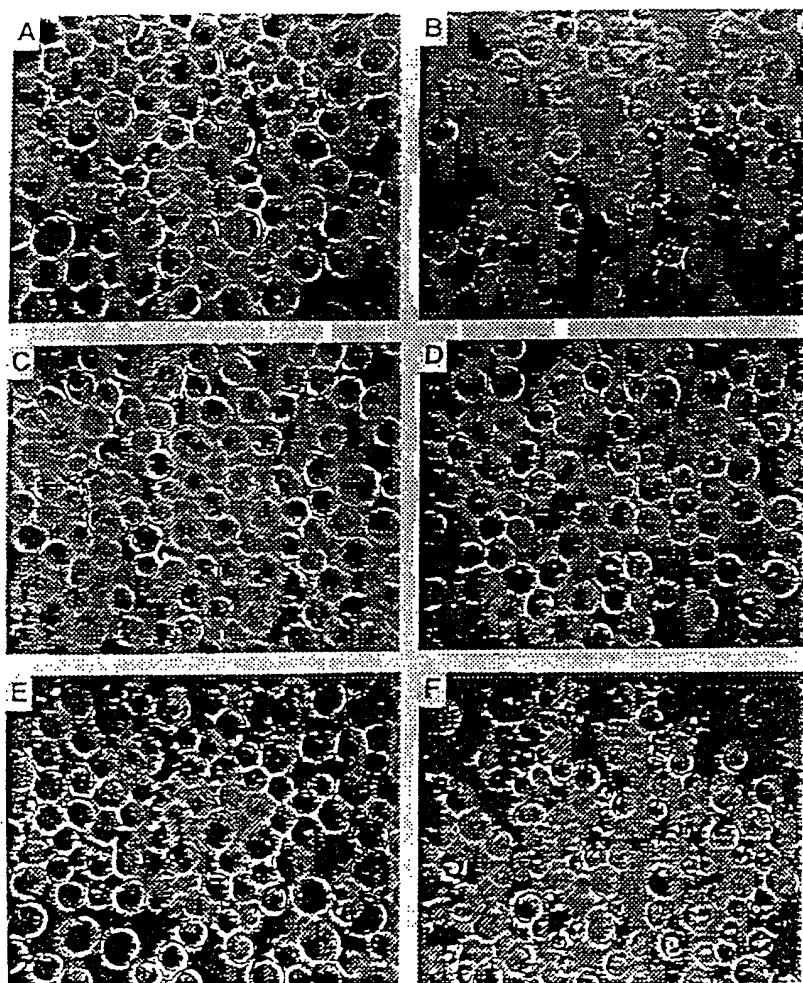
终止密码子

根据该设计, *nef* 基因编码 260 个氨基酸。在 XhoI 位点插入了两个终止密码子, 导致 *nef* 只编码 33 个氨基酸。PCR 扩增和 BamHI + XhoI 消化后, 将该 421bp 的 PCR DNA 片段克隆回 pHIV-1-MSS (或 IL-3SS) 载体的 BamHI - XhoI。产生的重组质粒含有 NSS 取代以及部分 *vpu* 和 *nef* 缺失, 将其用于疫苗测试。

在参照现在认为比较优选的实施例描述本发明后,应当这样理解,本发明并不受公开实施例的限制。恰恰相反,本发明意欲涵盖所附权利要求的精神和范围内的各种修饰和相应安排。

此处将所有出版物、专利和专利申请单独地全文引入本文作为参考文献。

图 1



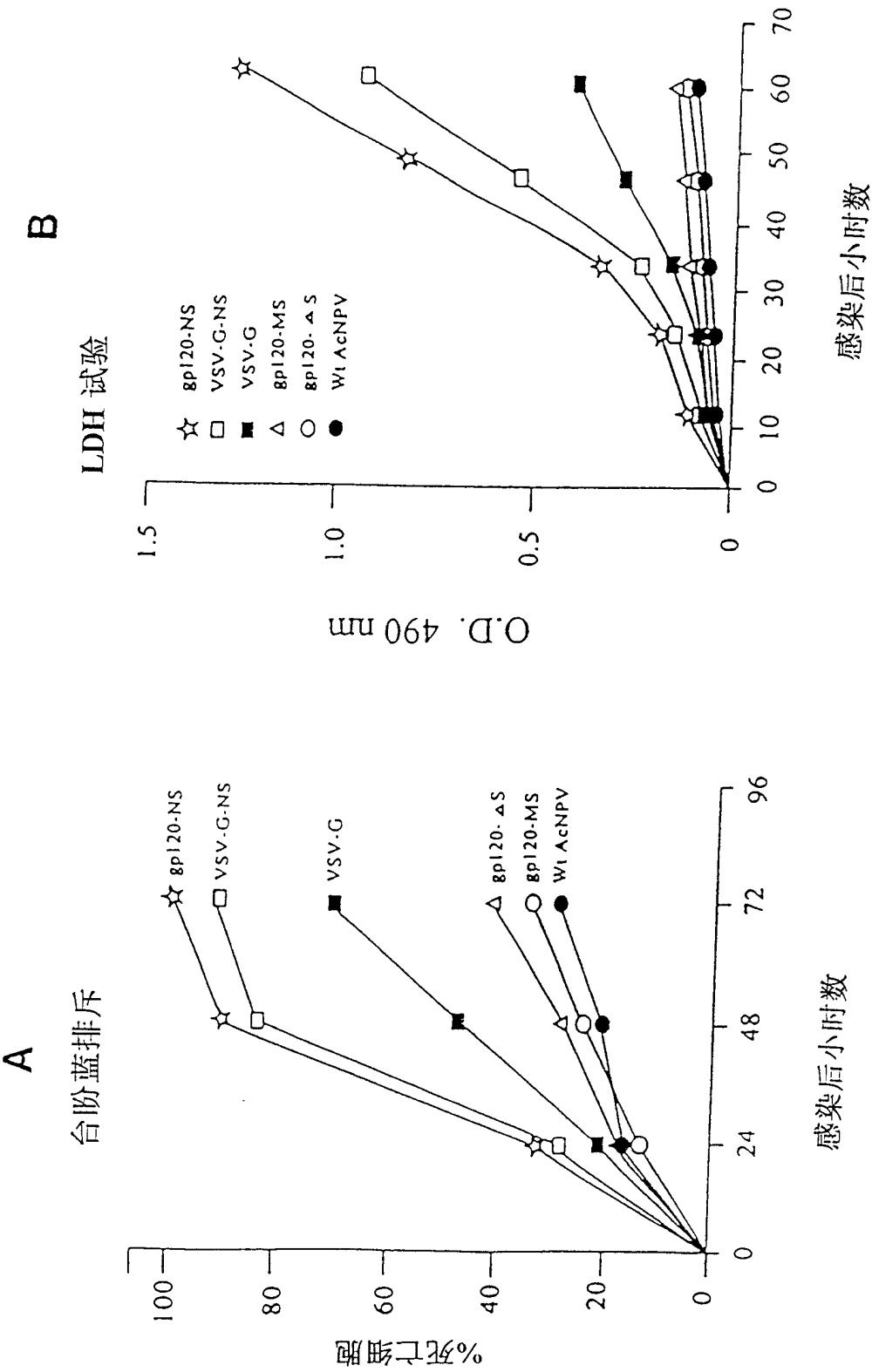


图 2

图 3

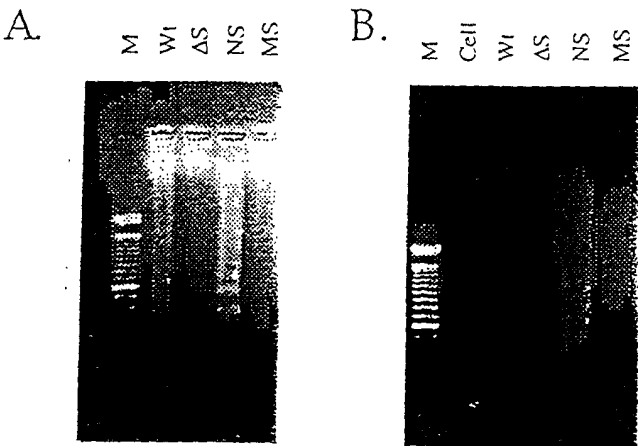


图 4

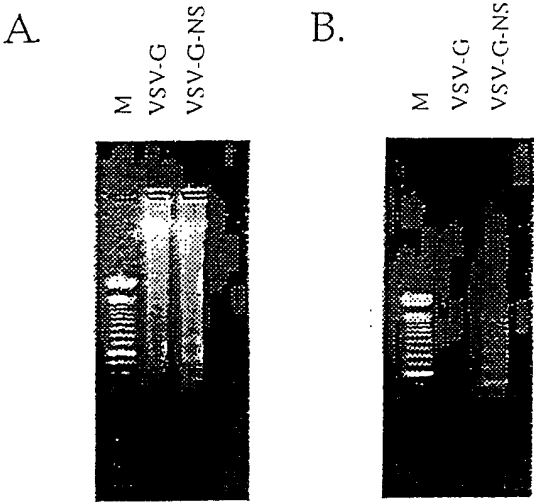


图 5

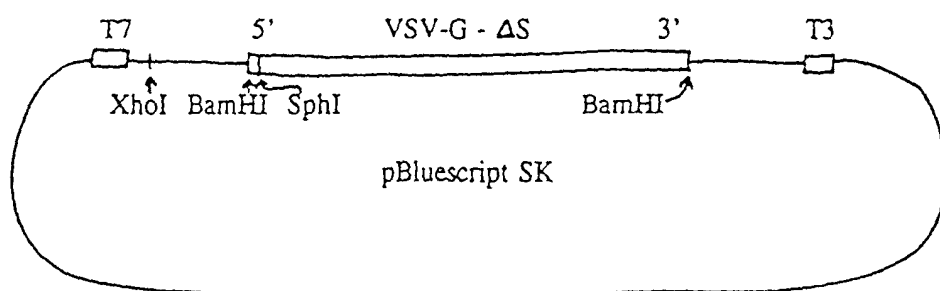


图 6

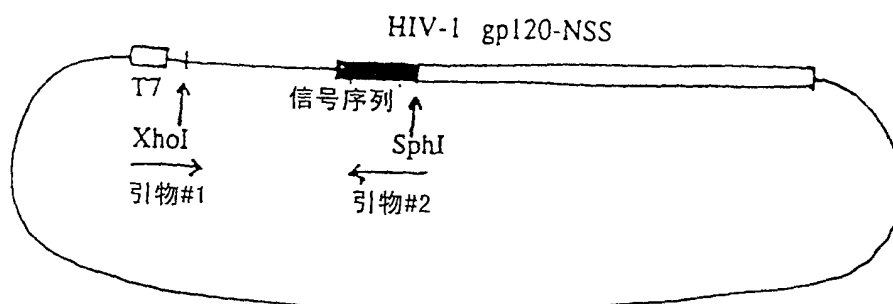


图 7

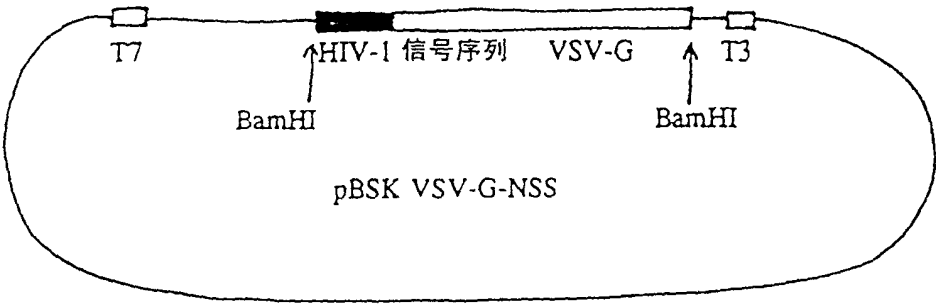


图 8

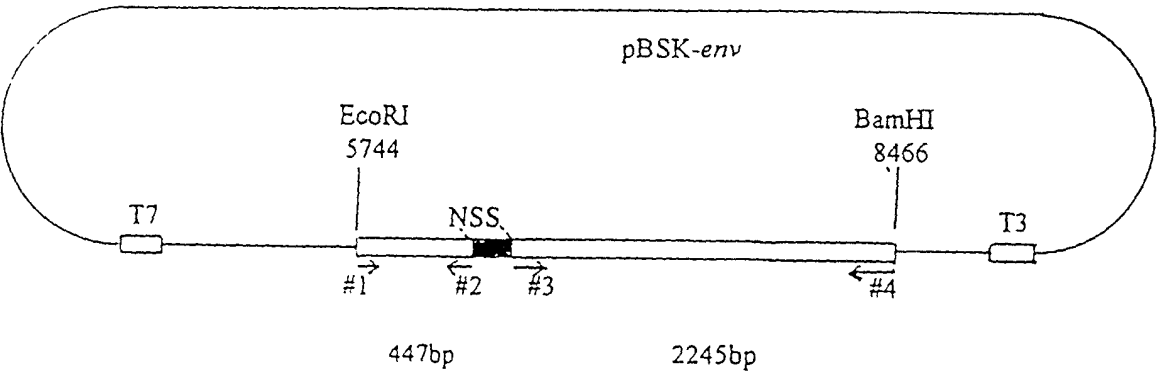


图 9

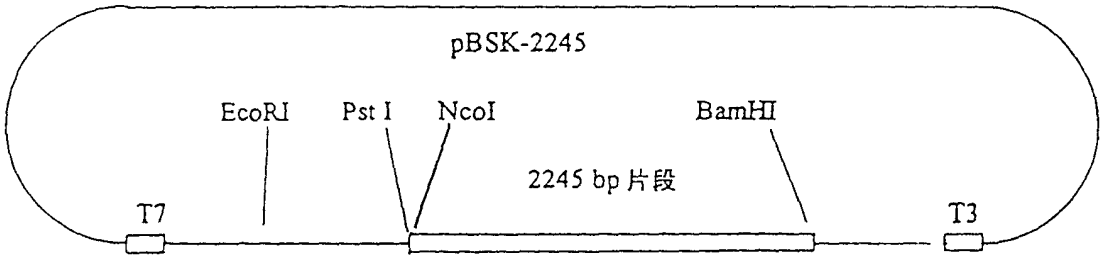


图 10

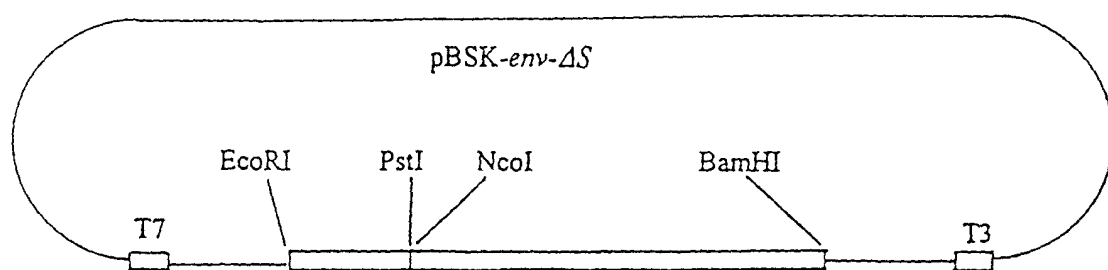


图 11

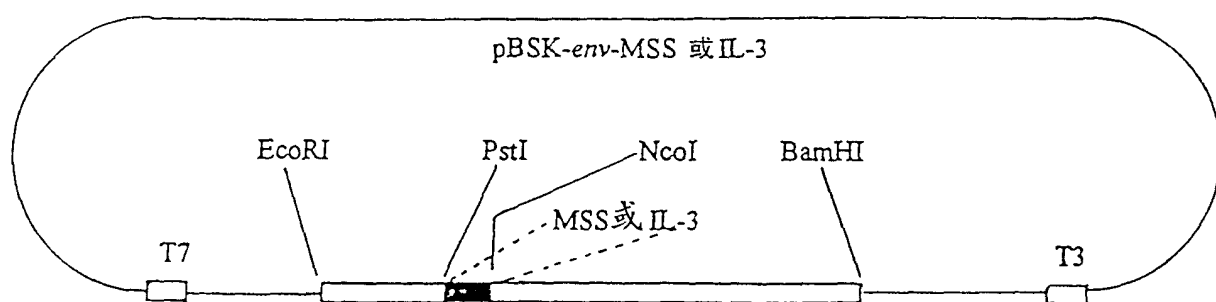


图 12

