



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101870723 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 04

(21) 申请号 200910049954. 0

(22) 申请日 2009. 04. 24

(73) 专利权人 上海交通大学医学院附属瑞金医院

地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路 197 号  
专利权人 中国科学院上海药物研究所

(72) 发明人 陈楠 张骥 朱维良 王伟铭  
俞海瑾 陈永熙

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
31002  
代理人 薛琦 朱水平

(51) Int. Cl.

*C07K 7/06* (2006. 01)

*A61K 38/08* (2006. 01)

*A61P 37/06* (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101033251 A, 2007. 09. 12, 全文.

CN 101242854 A, 2008. 08. 13, 全文.

审查员 张彬

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种短肽及含有其的免疫抑制剂和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种短肽及其免疫抑制剂和应用。该短肽是 6 肽, 其氨基酸序列是选自 Thr, Pro, Ala, Ile, Phe, His, Trp, Tyr 或 Glu 中的任意 6 种氨基酸残基的任意顺序的组合。该短肽可用于制备拮抗 Fc $\gamma$ RIIA 受体 (Fc $\gamma$ RIIA) 和免疫球蛋白 G (IgG) 相互作用的药物和制备治疗或预防自身免疫性疾病的药物。具有特异性强, 结构短小, 免疫原性低, 合成简单的特点。以本发明的短肽为活性成分的药物, 可以特异性拮抗 Fc $\gamma$ RIIA 和 IgG 之间的相互作用, 而不拮抗 Fc $\gamma$ RI 和 IgG 之间的作用, 因此其副作用低。在制造新型免疫抑制剂中将会得到广泛应用, 并且将会带来巨大的社会及经济效益。

1. 一种短肽,其特征在于,其氨基酸序列是 Thr-Pro-Ala-Pro-Ile-Phe。
2. 一种免疫抑制剂,其特征在于,其活性成分包括权利要求 1 所述的短肽。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的短肽在制备 Fc  $\gamma$  IIA 受体拮抗剂中的应用。
4. 权利要求 1 或 2 所述的短肽在制备拮抗 Fc  $\gamma$  IIA 受体和免疫球蛋白 G 相互作用的药物中的应用。

## 一种短肽及含有其的免疫抑制剂和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,特别涉及一种短肽及含有其的免疫抑制剂和应用。

### 背景技术

[0002] 抗体产生的自身免疫性疾病是一类由于自身抗体产生而导致组织、细胞损伤的自身免疫性疾病。其包含多种疾病,如较为常见的有系统性红斑狼疮,类风湿性关节炎,多发性硬化,抗中性粒细胞抗体 (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody, ANCA) 相关性小血管炎。这些疾病都是一类慢性进展,预后较差的疾病。近年来,对于抗体产生的自身免疫性疾病的发病机制还没有完全清楚。但是一些重要的受体及细胞通路在抗体产生的自身免疫性疾病的发生发展中起着关键作用。如 Fc $\gamma$  受体 (Fc $\gamma$  receptor, Fc $\gamma$  R) 是介导体液免疫和细胞免疫的桥梁,即其介导了自身抗体导致的免疫细胞活化和组织、细胞的免疫损伤,导致疾病的急性炎症反应及慢性进展。

[0003] 抗体产生的自身免疫性疾病的治疗,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、多发性硬化、ANCA 相关性血管炎等,是近代医学的治疗难点,一旦诊断,往往预后较差。随着近年来糖皮质激素及免疫抑制剂在抗体产生的自身免疫性疾病治疗中的广泛及正规应用,该类疾病的预后获得了明显改善,尤其是患者的 5 年生存率,获得了显著提高。但是随着治疗及研究的深入,糖皮质激素 + 免疫抑制剂的治疗方案的缺陷日益显露。其副作用大,如糖皮质激素可以导致物质代谢和水盐代谢紊乱,诱发和加重感染 (这是导致患者死亡的重要原因),引起各个系统的并发症,诱发精神异常,导致白内障青光眼等,而免疫抑制的副作用更不低于糖皮质激素,尤其是在导致恶性肿瘤、造血系统功能异常、性腺抑制等。这些都大大的阻碍了糖皮质激素 + 免疫抑制剂在治疗抗体产生的自身免疫性疾病上的应用。

[0004] 目前,如何降低糖皮质激素和免疫抑制剂在治疗抗体产生的自身免疫性疾病中产生的副作用,是临床医生最为关注的问题。通过大量的临床试验,规范、合理应用糖皮质激素和免疫抑制剂在一定程度上降低了其副作用,但是不能根本解决这个问题。因此,越来越多的研究者开始关注特异性更强的生物型免疫抑制药物,如利妥昔单抗,阿巴西普等生物型制药,都是特异性非常强的免疫抑制剂。这些药物逐步在自身免疫性疾病的治疗中获得应用,而且表现出优秀的低毒性反应,高敏感性的特点。但是由于这些药物的专利大多由国外掌握,且治疗费用昂贵,限制了这些药物在我国的广泛的应用。因此,开发新的治疗抗体产生的自身免疫性疾病的药物成为一个急需解决的问题。

[0005] 由抗体产生的自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮,过敏性紫癜,抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎等自身免疫性疾病均存在大量自身抗体。其血清中抗体的滴度和疾病的严重性相关,在疾病好转时抗体滴度下降,而复发时抗体滴度上升。Fc $\gamma$  R 是几乎所有免疫细胞膜表面均表达的免疫球蛋白受体,参与一系列的生理和病理的免疫反应,在免疫系统的调节中也起着关键作用。TG19320 (一种能够通过结合 IgG Fc 段而拮抗 Fc $\gamma$  R 和 IgG 之间的相互作用的多肽) 能够拮抗 Fc $\gamma$  R 和 IgG 之间的相互作用,从而保护系统性红斑狼疮小鼠的组织损伤,降低其死亡率 (Nat Biotechnol, 2000, 18(7) :735-739)。TG19320 也

能够干预抗中性粒细胞胞浆抗体对正常中性粒细胞的作用,降低抗中性粒细胞胞浆抗体诱导的中性粒细胞凋亡和活化(中华肾脏病杂志,2006,22(8):483-487,中华风湿病学杂志,2007,11(5):267-270)。但是Fc $\gamma$ R也担任着机体抵抗病原微生物入侵,保持内环境稳定的作用,完全阻断Fc $\gamma$ R的作用可能会导致严重后果。因而可以通过阻断部分Fc $\gamma$ R与抗体的结合,如特异性的阻断Fc $\gamma$ RIIA与IgG的作用,来治疗自身免疫性疾病。Fc $\gamma$ RIIA(即Fc $\gamma$ IIA受体)是Fc $\gamma$ R中的一个亚型,是介导抗体产生的自身免疫性疾病的重要受体,在疾病发生发展中起到重要作用。因此拮抗Fc $\gamma$ RIIA和IgG之间的相互作用已成为治疗抗体产生的自身免疫性疾病的重要靶点之一,拮抗Fc $\gamma$ RIIA和IgG的结合能够治疗或预防自身免疫性疾病。

## 发明内容

[0006] 因此,本发明要解决的技术问题就是针对现有的治疗抗体产生的自身免疫性疾病的药物中存在不易生产,生产成本高,价格昂贵的不足,提供一种新的治疗自身免疫性疾病的药物,该药物能够特异性拮抗Fc $\gamma$ RIIA和IgG相互作用,从而预防或治疗抗体产生的自身免疫性疾病。

[0007] 本发明人经过研究后发现,通过特异性拮抗免疫细胞膜的免疫球蛋白受体Fc $\gamma$ RIIA而不影响其他受体的功能,是治疗抗体相关的自身免疫性疾病的重要靶点。因此,本发明人以Fc $\gamma$ RIIA蛋白的胞外段为靶标,设计并合成的一种短肽,发现该短肽可以特异性拮抗IgG和Fc $\gamma$ RIIA的相互作用,从而完成了本发明。

[0008] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案之一是:一种短肽,其是6肽,其氨基酸序列是选自Thr(苏氨酸),Pro(脯氨酸),Ala(丙氨酸),Ile(异亮氨酸),Phe(苯丙氨酸),His(组氨酸),Trp(色氨酸),Tyr(酪氨酸)或Glu(谷氨酸)中的任意6种氨基酸残基的任意顺序的组合。

[0009] 根据本发明,较佳的,所述的短肽的氨基酸序列为选自以下氨基酸序列中的一种:J-Pro-Ala-Pro-Ile-R,其中J代表Thr、His、Trp或Glu氨基酸残基,R代表Phe或Tyr氨基酸残基;较佳地,所述的氨基酸序列为选自以下氨基酸序列中的一种:Thr-Pro-Ala-Pro-Ile-Phe, His-Pro-Ala-Pro-Ile-Phe, Trp-Pro-Ala-Pro-Ile-Phe, Trp-Pro-Ala-Pro-Ile-Tyr和Glu-Pro-Ala-Pro-Ile-Phe。

[0010] 根据本发明,较佳的,所述的短肽的氨基酸序列较佳的为选自以下氨基酸序列中的一种:Pro-Ile-Phe-Ala-Pro-Thr, Phe-Ile-Pro-Pro-Thr-Ala, Pro-Phe-Ile-Ala-Thr-Pro和Pro-Pro-Phe-Thr-Ala-Ile。

[0011] 本发明短肽可采用现有技术中的公知方法获得。既可以用多肽自动合成仪进行化学合成,又可以将短肽序列推导成核苷酸序列,然后克隆到表达载体中进行生物合成。

[0012] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案之二是:一种免疫抑制剂,其活性成分包括所述的短肽。

[0013] 本发明的免疫抑制剂含有治疗有效量的本发明短肽。需要的时候,也可以还含有其他的活性成分。上述免疫抑制剂中还可以含有一种或多种药学上可以接受的载体。所述载体包括药学领域常规的稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂、吸附载体和润滑剂等。本发明的免疫抑制剂可以制成片剂、粉剂、粒剂、胶囊、口

服液及注射液等多种形式,各种剂型均可以按药学领域的常规方法制备。

[0014] 本发明的短肽具有结合 Fc $\gamma$ RIIA 的活性,体外实验证实具有特异性拮抗 Fc $\gamma$ RIIA 和 IgG 相互作用的能力,是 Fc $\gamma$ RIIA 拮抗剂。因此本发明的短肽可用于制备拮抗 Fc $\gamma$ RIIA 受体 (Fc $\gamma$ RIIA) 和免疫球蛋白 G(IgG) 相互作用的药物,特别是用于制备 Fc $\gamma$ RIIA 拮抗剂。该药物通过对 Fc $\gamma$ RIIA 的拮抗作用而抑制抗体介导的自身免疫性疾病的组织、细胞损伤及急性炎症状态,从而阻断抗体介导的自身免疫性疾病的进展,进而预防或治疗抗体介导的自身免疫性疾病。因此本发明的短肽可用于制备预防或治疗自身免疫性疾病的药物。所述的自身免疫性疾病较佳的为系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、多发性硬化和 ANCA 相关性血管炎等。

[0015] 本发明所用的原料或试剂除特别说明之外,均市售可得。

[0016] 相比于现有技术,本发明的有益效果如下:本发明的短肽具有特异性强,结构短小,免疫原性低,合成简单,且具有较强的抑制 IgG 单体和 Fc $\gamma$ RIIA 结合的能力。可用于制备拮抗 Fc $\gamma$ RIIA 和 IgG 相互作用的药物和制备自身免疫性疾病的药物。以本发明的短肽为活性成分的药物,可以特异性拮抗 Fc $\gamma$ RIIA 和 IgG 之间的相互作用,而不拮抗 Fc $\gamma$ RI 和 IgG 之间的作用。因此其副作用低。在制造新型免疫抑制剂中将会得到广泛应用,并且将会带来巨大的社会及经济效益。

#### 附图说明

[0017] 以下结合附图说明本发明的特征和有益效果。

[0018] 图 1 为不同浓度的本发明的 1 号短肽对 Fc $\gamma$ RIIA 和 IgG 相互作用的影响。

[0019] 图 2 为玫瑰花环形成实验显微镜下照片。图 A 为阳性对照组,图 B 为 IgG 组,图 C 为 1 号短肽,图 D 为 2 号短肽,图 E 为 3 号短肽,图 F 为 4 号短肽,图 G 为 5 号短肽,图 H 为 6 号短肽。

[0020] 图 3 为玫瑰花环形成实验中各组中玫瑰花环形成及未形成的 K562 细胞数。1~6 为 1~6 号短肽。

#### 具体实施方式

[0021] 下面用实施例来进一步说明本发明,但本发明并不受其限制。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所述的“室温”是指进行试验的操作间的温度,一般为 10~25℃。

[0022] 实施例 1 短肽序列的设计和合成

[0023] 经过序列设计、优化和筛选后获得 9 个短肽,见表 1。送交上海吉尔生化合成,纯度均>95%,用于以下实施例的试验。

[0024] 表 1. 经过设计、优化获得的短肽

短肽编号	短肽序列
1 号短肽	Thr-Pro-Ala-Pro-Ile-Phe
2 号短肽	His-Pro-Ala-Pro-Ile-Phe
3 号短肽	Trp-Pro-Ala-Pro-Ile-Phe
4 号短肽	Trp-Pro-Ala-Pro-Ile-Tyr
5 号短肽	Glu-Pro-Ala-Pro-Ile-Phe
6 号短肽	Pro-Ile-Phe-Ala-Pro-Thr
7 号短肽	Phe-Ile-Pro-Pro-Thr-Ala
8 号短肽	Pro-Phe-Ile-Ala-Thr-Pro
9 号短肽	Pro-Pro-Phe-Thr-Ala-Ile

[0026] 实施例 2 本发明短肽化合物特异性拮抗 Fc  $\gamma$  RIIA 和 IgG 的相互作用

[0027] 所用的短肽为 :1 ~ 5 号短肽。

[0028] (1) 细胞培养

[0029] U937 细胞 (从上海中科院细胞库购买), 采用含 10% (v/v) 小牛血清的 RPMI1640 培养液, 在 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> 培养。K562 细胞 (从上海中科院细胞库购买), 采用含 10% (v/v) 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 IMDM 培养液, 在 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> 培养。

[0030] (2) 短肽化合物拮抗 Fc  $\gamma$  RIIA-IgG 相互作用活性的测定

[0031] 利用流式细胞计数法计数细胞表面 Fc  $\gamma$  R 和 IgG 的结合情况。

[0032] 具体步骤: 取处于倍增期的细胞, 无菌 PBS 洗 3 次, 用 PBS 重悬浮至  $1 \times 10^6$ /ml。阴性对照组不加入 IgG 和短肽, 以等体积的 PBS 为阴性对照。阳性对照组加入 IgG (Sigma) 50  $\mu$ g/ml, 室温下孵育 30min, PBS 洗 2 次。短肽干预组先加入人工合成短肽 200  $\mu$ g/ml 室温孵育 30 分钟, 再加入 IgG 50  $\mu$ g/ml, 再室温下孵育 30min, PBS 洗 2 次。最后 3 组各加 FITC 标记的抗人 IgG Fab 段抗体 (Sigma) 室温下避光孵育 30min, PBS 洗 2 次, 1% (w/v) 多聚甲醛 -PBS 固定。流式细胞计数仪计数荧光阳性的细胞数。每个样本计数 10000 个细胞, 取阳性细胞和总计数细胞的百分比表示阳性率, 每个样本设 3 个复孔, 重复实验 1 次, 统计采用卡方检验。

[0033] (3) 结果

[0034] 流式细胞计数仪计数细胞阳性率见表 2。阴性对照组和其他组相比, 差异均具有统计学意义。在 k562 细胞组中, 阳性对照组和 1 号、5 号短肽相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 和其他组相比, 差异不具有统计学意义, 但是 2 号短肽组的阳性细胞数仍较阳性组要低。在 U937 细胞组, 阳性细胞组和其他短肽干预组均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

[0035] 表 2. 流式细胞计数仪计数细胞阳性率

组别	K562细胞 (%)	U937细胞 (%)
阴性对照	17.59±0.354	4.52±3.46
阳性对照	55.34±7.11 <sup>a</sup>	95.63±3.84 <sup>a</sup>
[0036] 1号短肽	42.38±3.21 <sup>ab</sup>	95.04±3.99 <sup>a</sup>
2号短肽	50.56±3.5 <sup>a</sup>	93.48±3.94 <sup>a</sup>
3号短肽	53.19±1.96 <sup>a</sup>	96.80±2.29 <sup>a</sup>
4号短肽	53.55±4.49 <sup>a</sup>	94.11±3.68 <sup>a</sup>
5号短肽	48.33±3.46 <sup>ab</sup>	95.23±2.30 <sup>a</sup>

[0037] 注 :a :和阴性对照组比差异具有统计学意义 ( $p < 0.05$ ) ;b :和阳性对照组比差异具有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。

[0038] U937 细胞同时表达 Fc  $\gamma$  RI 和 Fc  $\gamma$  RIIA 受体,而 K562 细胞仅表达 Fc  $\gamma$  RIIA 受体,而且 Fc  $\gamma$  RI 受体是高亲和力受体,能优先和 IgG 结合。U937 细胞作为 Fc  $\gamma$  RI 受体的载体细胞, K562 细胞作为 Fc  $\gamma$  RIIA 受体的载体细胞,观察短肽对这两种受体的特异性阻断功能。通过流式细胞计数阳性细胞占总细胞的比例,发现短肽能够阻断 IgG 和 K562 细胞的结合而不能阻断 IgG 和 U937 细胞的结合,说明合成的新型短肽能够特异性阻断 Fc  $\gamma$  RIIA 受体,而不能阻断 Fc  $\gamma$  RI 受体。

[0039] 实施例 3 短肽能够浓度依赖性拮抗 Fc  $\gamma$  RIIA-IgG 之间的结合

[0040] 所用短肽为 1 号肽。

[0041] (1) 细胞培养

[0042] K562 细胞,采用含 10% (v/v) 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100  $\mu$  g/ml 链霉素的 IMDM 培养液,在 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> 培养。

[0043] (2) CELL ELISA 验证短肽浓度依赖性拮抗 Fc  $\gamma$  RIIA-IgG 之间作用

[0044] 96 孔板用 2% (w/v) PBS-B (2% (w/v) PBS-B, 是用 2g 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶解到 100ml PBS 中,下面均类似) 封闭,4°C 过夜或室温 2h。取对数生长期的 K562 细胞用 1% (w/v) PBS-B 洗 3 次。1% (w/v) PBS-B 重悬浮 K562 细胞,调浓度至  $6 \times 10^6$ /ml,每孔加 K562 细胞 100  $\mu$  l,离心后去上清。IgG 组直接加入 IgG 的浓度梯度,分别是 5000  $\mu$  g/ml, 1000  $\mu$  g/ml, 100  $\mu$  g/ml, 50  $\mu$  g/ml。短肽组先加入短肽,浓度为分别为 10  $\mu$  g/ml, 100  $\mu$  g/ml, 室温孵育 30 分钟后,加相同的 IgG 浓度梯度,37°C 孵育 60min。用 1% (w/v) PBS-B 洗 3 次,加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗人 IgG 抗体 (Sigma), 37°C 孵育 30min。1% (w/v) PBS-B 洗 3 次,用 ABTS 显色试剂盒显色 (上海生工),具体显色步骤按说明书操作。BioTek 酶标仪 405nm 波长读取 OD 值。

[0045] (3) 结果

[0046] IgG 浓度梯度组未加任何短肽,10  $\mu$  g/ml 短肽组加入 10  $\mu$  g/ml 短肽,100  $\mu$  g/ml 短肽组加入 100  $\mu$  g/ml 短肽。以纵坐标为 405nm 处吸光值,横坐标为 IgG 浓度的对数值绘

图,结果见图 1。从图中可以明显看出,在 IgG 组,随 IgG 的浓度增加,OD 值明显上升,说明 IgG 和 Fc  $\gamma$  RIIA 的结合增加,呈浓度依赖性。在加入 10  $\mu$  g/ml 和 100  $\mu$  g/ml 的短肽组,发现 OD 值仍随着 IgG 浓度的增高而增高,但是和 IgG 组相比,相同浓度下,其 OD 值下降,且短肽 100  $\mu$  g/ml 组比短肽 10  $\mu$  g/ml 组 OD 值下降明显,说明短肽拮抗 IgG 和 Fc  $\gamma$  RIIA 受体的结合也具有浓度依赖性,随着短肽浓度的增高,拮抗能力增强。

[0047] 实施例 4 本发明短肽阻断 K562 细胞形成玫瑰花环实验

[0048] 所用短肽:1 ~ 6 号短肽。

[0049] (1) 细胞培养

[0050] K562 细胞,采用含 10% (v/v) 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100  $\mu$  g/ml 链霉素的 IMDM 培养液,在 37°C,5% (v/v) CO<sub>2</sub> 培养。

[0051] (2) EA 的制备

[0052] 取 4% (v/v) 绵羊红细胞悬液加入试管中,再加等量的 (1 : 1000) 稀释的兔抗绵羊红细胞抗体,混匀,置 37°C 水浴中 15min,以 Hank' s 液洗涤 2 次,再以等体积的 Hank' s 液重悬浮,为 EA 悬液。

[0053] (3) 玫瑰花环形成实验

[0054] 设 3 组,分别为阳性组, IgG 组,短肽组。

[0055] 具体步骤:

[0056] 取对数生长期的 K562 细胞,用 HBSS 洗 3 次,重悬浮,调细胞浓度为 4 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞 / ml。

[0057] 阳性组:取 K562 细胞悬液 0.1ml 于 EP 管中,加入 0.1ml 的 EA 悬液,混匀。

[0058] IgG 组:取 K562 细胞悬液 0.1ml 于 EP 管中,先加入人 IgG 20  $\mu$  g,再加入 0.1ml 的 EA 悬液,混匀。

[0059] 短肽组:取 K562 细胞悬液 0.1ml 于 EP 管中,先加入专利要求 1 短肽和专利要求 2 短肽 20  $\mu$  g,再加入 0.1ml 的 EA 悬液,混匀。

[0060] 4°C,2h 静置,轻轻悬起沉淀细胞,取 20  $\mu$  l 细胞悬液,用细胞计数板涂片,显微镜下随机选取多个视野,计数玫瑰花环形成及未形成的 K562 细胞。

[0061] (4) 玫瑰花环形成实验结果

[0062] 用细胞计数板计数 200 个以上的 K562 细胞,以 1 个 K562 细胞上结合 5 个以上绵羊红细胞为玫瑰花环阳性细胞,显微镜下照片见图 2。计数玫瑰花环阳性细胞占总细胞数的百分比,结果见图 3。从图中可以看出阳性对照组的玫瑰花环阳性率高,且 1 个 K562 细胞周围绕大量绵羊红细胞,而 IgG 组和 1 号、2 号、5 号、6 号短肽组的玫瑰花环阳性细胞减少,且大部分 K562 细胞结合的绵羊红细胞较阳性对照减少,这说明 IgG 组、1 号短肽组、2 号短肽组、4 号短肽组、5 号短肽组、6 号短肽组均能降低 K562 细胞的玫瑰花环形成率,可见本发明的短肽具有拮抗 Fc  $\gamma$  RIIA 和 IgG 之间的相互作用。



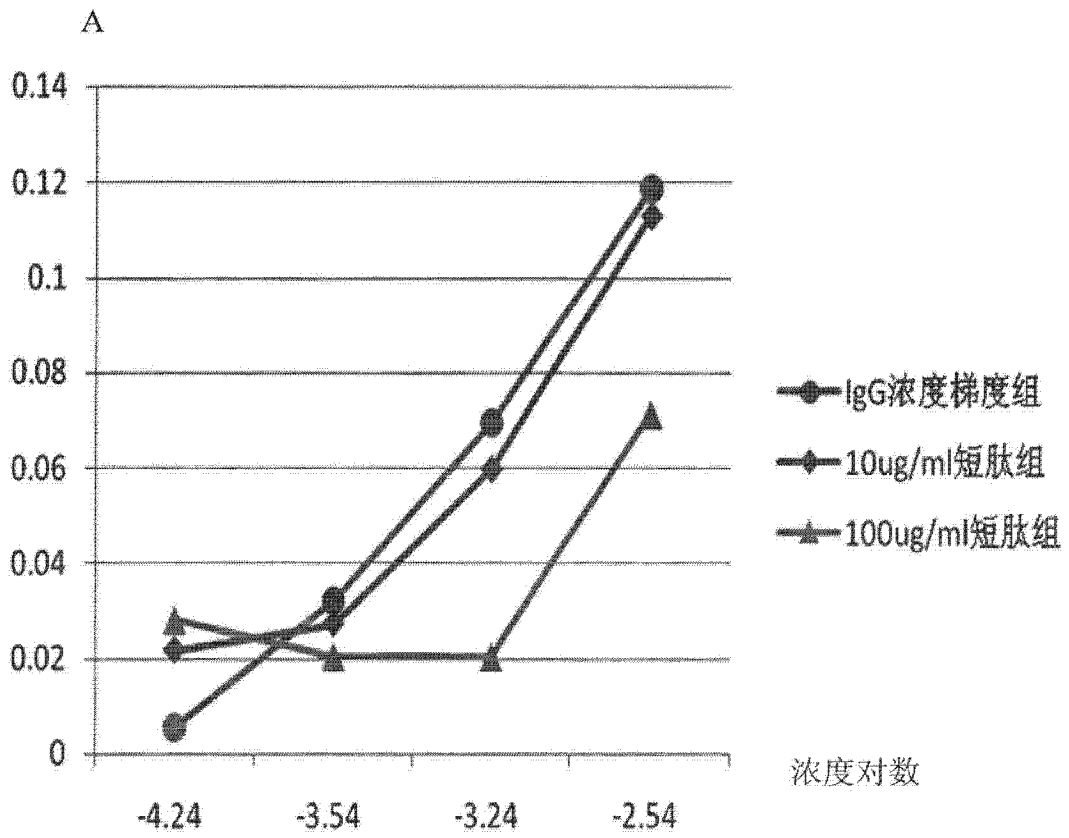


图 1

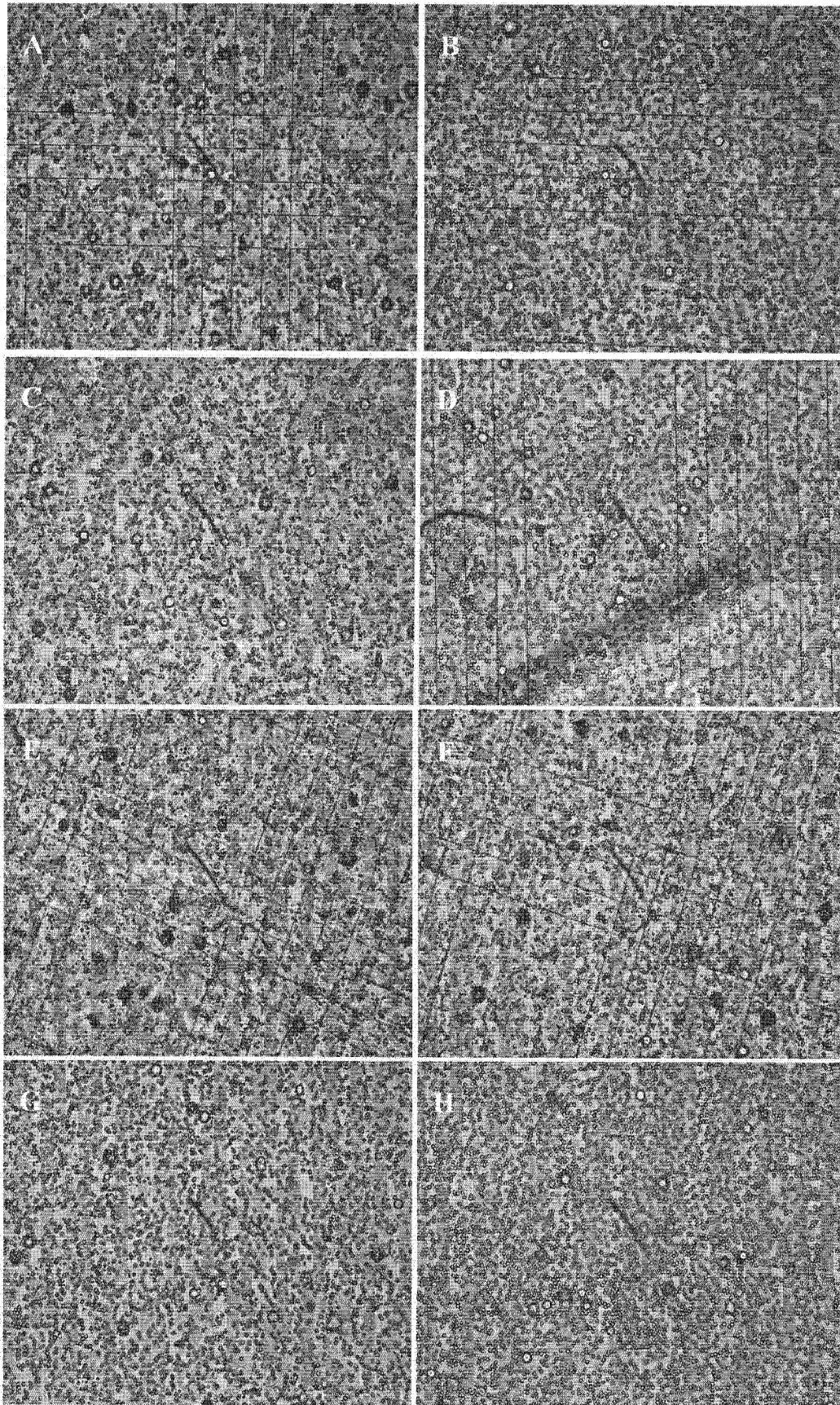


图 2

玫瑰花环的百分比

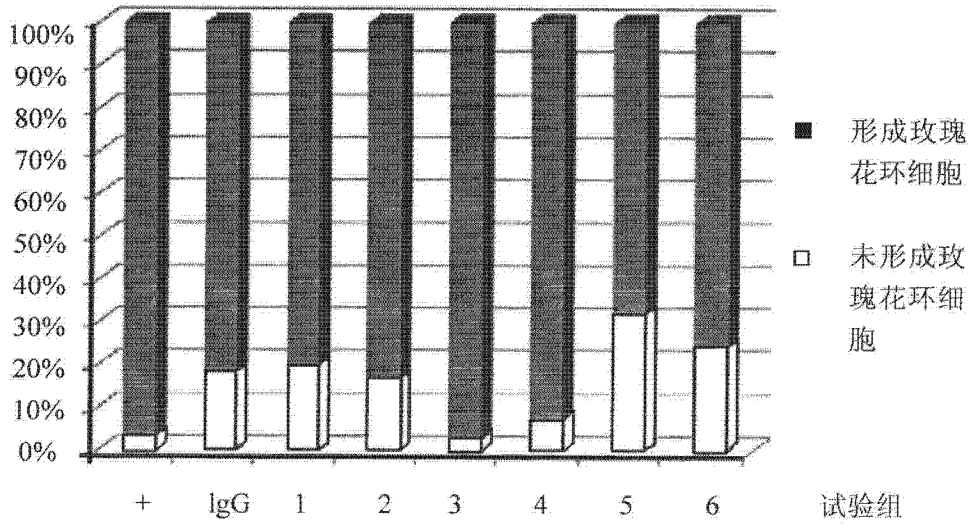


图 3