

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 12 月 1 日 (01.12.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/188112 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/867 (2006.01) *A61N 5/06* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/099667
- (22) 国际申请日: 2015 年 12 月 30 日 (30.12.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510279845.3 2015 年 5 月 27 日 (27.05.2015) CN
- (71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。
- (72) 发明人: 屠洁 (TU, Jie); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。王立平 (WANG, Liping); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。杨帆 (YANG, Fan); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。刘运辉 (LIU, Yunhui); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。
- (74) 代理人: 北京三友知识产权代理有限公司 (BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROPERTY

AGENCY LTD.); 中国北京市金融街 35 号国际企业大厦 A 座 16 层, Beijing 100033 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: COMPOSITION FOR SPECIFICALLY EXCITING GABAERGIC NEURONS IN NUCLEUS ACCUMBENS AND USE THEREOF IN IMPROVING ABNORMAL SCHIZOPHRENIC BEHAVIOURS

(54) 发明名称: 特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物及其在改善精神分裂症异常行为中的应用

(57) Abstract: Provided are a composition for specifically exciting GABAergic neurons in the nucleus accumbens and the use thereof in improving abnormal schizophrenic behaviours. The composition comprises a viral vector carrying a light-sensitive gene for infecting GABAergic neurons in the nucleus accumbens and an irradiation device capable of generating blue light, wherein the viral vector comprises a Syn promoter, a light sensation gene and a green fluorescence labelling gene.

(57) 摘要: 提供了一种特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物及其在改善精神分裂症异常行为中的应用。该组合物包括用于感染伏隔核中的 GABA 能神经元的携带光感基因的病毒载体和能产生蓝光的光照装置, 其中所述病毒载体包括 Syn 启动子、光感基因、绿色荧光标记基因。



WO 2016/188112 A1

特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物及其在改善精神分裂症异常行为中的应用

技术领域

5 本发明是关于一种特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物及其在改善精神分裂症异常行为中的应用。

背景技术

中国十二个地区精神疾病流行病学调查显示，目前我国约有1亿人有心理疾病，
10 严重精神疾病患者约1600万人，每年约有二十五万人死于自杀。中国十七岁以下的3.4
亿儿童、青少年中，约有三千万人受到情绪障碍和心理行为问题的困扰。当前神经精神疾病在我国疾病总负担中排名第一，占全部疾病和外伤所致残疾及劳动力丧失的五分之一。据专家预测，21世纪将是精神疾患流行的世纪，随着我国经济建设和社会发展的步伐加快，生活节奏和竞争日益增强，精神疾病会继续增加，预计到2020年，精神
15 疾病在我国疾病总负担中将占到25%。世界卫生组织把新世纪的第一年定为精神卫生年，所以不管我们愿意与否，我们正无情地进入到了“精神疾病时代”。

精神分裂症（schizophrenia）是人类最严重的精神性疾病之一，以基本个性改变，思维、知觉、情感、行为的分裂，精神活动与环境的不协调为主要特征。流行病学调查资料显示，目前全世界患有精神分裂症和神经两级错乱的病人约占总人口的2%。精神
20 分裂症具有致残率高、复发率高、预后不佳、社会负担沉重等特点，严重影响了我国人口健康和经济发展。

目前主流认为精神分裂症患者出现的症状与大脑内部多巴胺功能的亢进有某种联系。临床上把 D2 型多巴胺受体(Dopamine Receptor D2, DRD2)拮抗剂作为治疗精神病药物表现出了明显的治疗效果。相反，在健康个体上反复使用苯丙胺这类增加多巴胺释放的神经活性物质可以诱导出精神病，也可以加剧精神分裂症患者的精神病性
25 症状。同样，对帕金森病患者使用多巴胺的前体左旋多巴，可以在许多患者中诱发精神病性症状（通常是幻觉和妄想）。

现在针对精神分裂症多巴胺类药物已持续了30多年，正反两方面的依据都有，但都没有突破性的进展。而且，精神分裂症患者是否存在多巴胺水平异常也缺乏直接的

证据：与健康个体比，精神分裂症患者的神经元在刺激下是否向突触释放出更多的多巴胺，至今没有定论；也有研究表明，精神分裂症患者可能存在对多巴胺运输和功能的异常调节。因此，目前控制精神病的发病主要依靠药物治疗和家庭社会的支持，无法对异常神经回路中多巴胺系统进行特异性的调控而无法实现真正治疗的目的，只是

5 “治标”而已。

近年来 γ -氨基丁酸 (GABA) 能网络在精神分裂症、抑郁症、自闭症及焦虑症等疾病中的作用正逐步被人们所认知。最新国际上的研究证据表明，GABA神经元的异常在精神分裂症中扮演了非常重要的作用。伏隔核位于基底核与边缘系统交界处，隔区的外下方，尾壳核的内下方，前方与嗅前核相连，后续终纹床核，腹侧为腹侧苍白

10 球和嗅结节，是基底前脑的一个较大的核团。该核团的基本细胞类型是中型多棘神经元。这类神经元产生的神经递质是 γ -氨基丁酸 (GABA)。但伏隔核是否可作为调控精神分裂症异常行为的靶点还未进行研究，现有技术也尚未提供一种特异性干预伏隔核进而改善精神分裂症异常行为的方法。

15 发明内容

本发明的主要目的在于提供一种特异性调控靶标进而有效改善精神分裂症异常行为的技术。

本发明利用光遗传调控技术，特异性地调控精神分裂症动物伏隔核携带光敏通道蛋白的细胞，同时监测行为学的改变，发现伏隔核脑区特异性地兴奋后，能显著改善

20 其先天恐惧弱化和/或焦虑的异常行为，从而认为伏隔核很可能是干预精神分裂症异常行为的新靶点。

从而，一方面，本发明提供一种特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物，该组合物包括：

用于感染伏隔核中的 GABA 能神经元的携带光感基因的病毒载体；该载体中包

25 括启动子、光感基因、绿色荧光标记基因，其中，所述启动子为 Syn 启动子；

能产生蓝光的光照装置，用于对感染后的伏隔核进行光照调控以使其兴奋。

本发明中将携带光敏基因的慢病毒载体注入到伏隔核区，其将会感染伏隔核区中的GABA能神经元，在GABA能神经元内表达相应的光敏受体，通过光照系统对表达了光敏受体的GABA能神经元进行光刺激，使其兴奋，GABA能神经元受光兴奋后，

发挥改善精神分裂症异常行为的功能。本发明通过高架迷宫实验证明通过本发明的组合物刺激伏隔核兴奋后，能够明显的改善精神分裂症异常行为，例如先天性弱化恐惧和/或焦虑，可有效改善精神分裂症动物模型对危险因素的错误判断，提高其回避相关不利环境的能力。因此，本发明提供了针对精神分裂症患者缺乏安全意识的特征性异常行为，提高其回避危险的认知能力新的治疗靶点；同时为研制开发新型药物提供了新的策略。

根据本发明的具体实施方案，本发明中所述的特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物也可以称为一种“套组”或“套件”，其中包括了本发明中特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元所采用的各试剂、材料及仪器设备等组件，作为一种产品例如试剂盒的形式，各组件可按照预定的位置在大包装中分别放置或是独立包装后成套销售及使用。

根据本发明的具体实施方案，本发明中所述的特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物还包括：使所述携带光感基因的病毒载体感染伏隔核中的 GABA 能神经元的试剂材料。具体例如可包括：立体定位仪及相关进样系统，能够准确的将携带光敏基因的病毒载体注入到伏隔核区，从而使其感染伏隔核区中的 GABA 能神经元细胞。

在本发明的一具体实施方案中，构建了用于感染伏隔核中 GABA 能神经元细胞或其前体细胞的携带光感基因的病毒载体；该载体中的启动子为 Syn 启动子；光感基因为 ChR2；绿色荧光标记基因为 eYFP；所述病毒为慢病毒；具体的构建过程可以参照所属领域中的现有技术进行。

根据本发明的具体实施方式，其中所述的携带光敏基因的病毒载体为含带有 Syn 质粒的慢病毒载体。伏隔核中 GABA 能神经元细胞感染含带有 Syn 质粒的慢病毒载体后，启动子 Syn 启动携带光敏基因开始转录，在伏隔核区中 GABA 能神经元细胞内表达相应的光敏受体，在受到光刺激后从而使伏隔核脑区兴奋，起到改善精神分裂症异常行为的作用。根据本发明的具体实施方式，本发明中所述的改善精神分裂症异常行为的组合物，其中，所述的携带光敏基因的慢病毒载体为含带有 Syn-ChR2-eYFP 质粒的慢病毒载体，其结构如图 1A 所示。在本发明的一具体实施例，所述的 Syn-ChR2-eYFP 可采用如下方法构建，将含有光敏基因、绿色荧光标记基因及用于特定性标记神经元的启动子 Synapsin (Syn) 的质粒和与慢病毒包装相关的混合质粒

pCMVΔR8.74、pMD2.G一起，利用脂质体一起转染至 293FT 细胞，培养后破膜得到含带有 Syn-ChR2-eYFP 质粒的慢病毒载体。

根据本发明的具体实施方式，本发明所述的特异性兴奋伏隔核中 GABA 能神经元的组合物中，其中，所述蓝光为波长 460~480nm 的蓝光，优选为波长 470nm 的蓝光。

另一方面，本发明提供特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物在制备用于改善精神分裂症异常行为系统中的应用。例如特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物为本发明所述的组合物，所述的应用为本发明的组合物在制备用于改善精神分裂症引起的先天恐惧弱化和/或焦虑系统中的应用。

根据本发明的具体实施方式，在本发明所述的应用中，其中，所述的改善精神分裂症异常行为系统是利用所述组合物中携带光感基因的病毒载体感染大脑伏隔核区中的 GABA 能神经元，并通过光照装置对感染后的伏隔核进行蓝光光照刺激，以改善精神分裂症异常行为。

根据本发明的具体实施方式，在本发明所述的应用中，其中，所述系统还包括用于将蓝光传导至感染后的伏隔核的光纤。在本发明的一具体实施例中，采用 200μm 的光纤将光照装置产生的光引入大脑伏隔核，用于对感染后的伏隔核进行光调控。

根据本发明的具体实施方式，在本发明所述的应用中，其中，所述蓝光光照条件为：蓝光波长 470~480nm，光纤的出口功率 12~20 mW 左右，光照频率 40~80Hz 的光；1:1 的占空比，持续 5min 以上。

另一方面，本发明还提供一种改善精神分裂症异常行为系统，该系统包括本发明所述的组合物。例如，所述的精神分裂症异常行为是先天恐惧弱化和/或焦虑。

另一方面，本发明还提供了一种改善精神分裂症异常行为的方法，该方法包括：将本发明的携带光敏基因的慢病毒载体注入到伏隔核区，使其感染伏隔核区中的 GABA 能神经元，在 GABA 能神经元内表达相应的光敏受体；

通过光照系统对表达了光敏受体的 GABA 能神经元进行光刺激，使其兴奋。

本发明的改善精神分裂症异常行为的方法中，GABA 能神经元受光兴奋后，发挥改善精神分裂症异常行为的功能。

根据本发明的具体实施方案，本发明的改善精神分裂症异常行为的方法中，是通过光照装置对感染后的伏隔核进行蓝光光照刺激，以改善精神分裂症异常行为。所述

蓝光光照条件为：蓝光波长 470~480nm，光纤的出口功率 12~20 mW 左右，光照频率 40~80Hz；占空比 1：1，持续 5min 以上。

本发明的有益技术效果：本发明的技术可以精确地特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元，可以有效改善精神分裂症异常行为，较传统的多巴胺拮抗剂药物治疗，真正实现了特异性，具有重要意义。

附图说明

图1A为Syn-ChR2-eYFP质粒示意图；

图1B~1C为小鼠伏隔核中GABA能神经元细胞成功表达Syn-ChR2-eYFP的示意图，图中Acbbc为伏隔核，Acbbsh为伏隔核壳体；

图2为通过光照对小鼠伏隔核区进行光照的示意图，图中Acbbc为伏隔核，Acbbsh为伏隔核壳体；

图3为实施例1中光照条件下提高了伏隔核脑区兴奋性的实验结果图；

图4为实施例1中野生型、DISC1::ChR2以及DISC1::eYFP型小鼠的高架十字迷宫实验结果示意图；

图5为实施例1中野生型、DISC1::ChR2以及DISC1::eYFP型小鼠的高架十字迷宫实验结果的统计结果图。

具体实施方式

为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现结合具体实例对本发明的技术方案进行以下详细说明，应理解这些实例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照所属领域的常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

以下实施例中，所用原始试剂和材料均可商购获得，或可按照现有技术的记载制备得到。

实施例 1

(1)、携带 Syn-ChR2-eYFP 质粒的慢病毒载体的制备。

制备用于在动物活体感染伏隔核的慢病毒载体，其携带有Syn-ChR2-eYFP质粒：将含有光敏基因、绿色荧光标记基因及用于特异性标记神经细胞的启动子Syn的质粒

(0.5 μg) (该融合质粒结构如图1A所示), 和与慢病毒包装相关的混合质粒pCMV Δ R8.74、pMD2.G (1.5 μg) 一起, 利用脂质体 (Invitrogen公司产品) 一起转染至293FT细胞 (ATCC公司产品, 该细胞传代至25代后即需要更换新的一批细胞株) 中 (每200,000个细胞用6 μL 脂质体)。24小时后, 培养293FT细胞的培养液换成无血清含有5 mM丙酮酸钠的DMEM后继续孵育。16小时后, 利用超速离心机在50,000g速度下破膜, 将悬液通过20%的蔗糖滤柱, 收集上清。该病毒滴度能达 3×10^8 TU/mL以上, 产出的病毒颗粒以灭菌的磷酸盐缓冲液以1: 1000的体积比进行重悬。将获取的病毒重悬液按1: 400的体积比混入无血清DMEM中, 用于感染动物模型的目标脑区: 伏隔核。

10 (2)、将携带Syn-ChR2-eYFP质粒的慢病毒载体注入调控区使其感染细胞。

采用神经科学领域常规的立体定位技术以及微量进样系统将上述制备得到的携带光敏基因的慢病毒注入到小鼠的伏隔核, 注入量一般为0.4 μL , 注入后, 等待3周, 取1~3只小鼠脑组织, 进行免疫组织荧光染色鉴定, 鉴定结果显示有绿色荧光, 表明Syn-ChR2-eYFP在原位表达成功 (可参见图1B及图1C), 即可开展光调控下的患精神分裂症的小鼠行为学检测, 其中患精神分裂症的小鼠为采用他莫昔芬 (tamoxifen) 诱导DISC1突变蛋白表达的转基因小鼠。

(3)、光调控下的患精神分裂症的小鼠行为学检测。

如图2所示, 在上述Syn-ChR2-eYFP原位表达成功的小鼠的伏隔核脑区垂直插入市售直径为200 μm 光纤, 进行470nm的蓝光刺激, 光强为1.1 mW, 光照频率为60Hz, 每隔50 ms照射50ms, 占空比为1:1, 持续5 min后, 采用在体光-电一体刺激和记录的方法对伏隔核脑区神经元放电特征进行提取分析, 其结果如图3所示, 图3结果表明光刺激后, 提高了大脑伏隔核脑区的兴奋性, 然后对小鼠 (编号为DISC1::ChR2) 进行高架十字迷宫实验, 同时对野生型小鼠以及DISC1型及仅转染eYFP基因的精神分裂症小鼠 (编号为DISC1::eYFP) 进行对比实验, 其结果如图4所示, 图5为其统计结果。

25 图4及图5中DISC1::ChR2表示患精神分裂症的伏隔核中的GABA能神经元细胞转染了ChR2并表达了光敏感通道蛋白的DISC1转基因小鼠, DISC1::eYFP表示患精神分裂症的伏隔核中的GABA能神经元细胞仅感染了eYFP并表达了该基因的DISC1转基因小鼠, 图中ON表示打开光刺激, 所示的光刺激的方式如上所述, OFF表示关闭光刺激。

所述的高架十字迷宫 (High plus maze) 是利用动物对新异环境的探究特性和对

高悬敞开臂的恐惧形成矛盾冲突行为来考察动物的焦虑状态。高架十字迷宫具有一对开臂和一对闭臂，啮齿类动物由于嗜暗性会倾向于在闭臂中活动，但出于好奇心和探究性又会在开臂中活动，在面对新奇刺激时，动物同时产生探究的冲动与恐惧，这就造成了探究与回避的冲突行为，从而产生焦虑心理。而抗焦虑药物能明显增加进入开臂的次数与时间，十字迷宫距离地面较高，相当于人站在峭壁上，使实验对象产生恐惧和不安心理。本实施例的迷宫离地高 60cm，开放臂为 $25 \times 5 \text{ cm}$ （长 $\times$ 宽），闭合臂 $25 \times 5 \times 14.3 \text{ cm}$ （长 $\times$ 宽 $\times$ 高）。

从图 4 及图 5 可以看出，高架十字迷宫实验表明，在调控前的 OFF 状态下，DISC1 精神分裂症型小鼠（DISC1::ChR2 及 DISC1::eYFP）对开放臂的先天恐惧低于野生型小鼠，进入开放臂的概率大于野生型。但是在 ON 状态下，光遗传技术特异性调控 DISC1 小鼠的 NAc 脑区（DISC1::ChR2）后（注射含有光基因 ChR2 在 NAc 脑区，并用光直接刺激该脑区），其对比野生型对照组，其进入开放臂的概率就没有显著差异，提示调控起效；另外，对比打了空壳病毒（DISC1::eYFP）的 DISC1 小鼠，其显著降低了进入开放臂的概率。

权利要求书

1、一种特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物，该组合物包括：

用于感染伏隔核中的 GABA 能神经元的携带光感基因的病毒载体；该载体中包括启动子、光感基因、绿色荧光标记基因，其中，所述启动子为 Syn 启动子；

5 能产生蓝光的光照装置，用于对感染后的伏隔核进行光照调控以使其兴奋。

2、根据权利要求 1 所述的特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物，该组合物还包括：使所述携带光感基因的病毒载体感染伏隔核中的 GABA 能神经元的试剂材料。

3、根据权利要求 1 所述的特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物，其中，所述蓝光为波长 460~480nm 的蓝光，优选为波长 470nm 的蓝光。

4、特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物在制备用于改善精神分裂症异常行为的系统中的应用，其中，所述特异性兴奋伏隔核中的 GABA 能神经元的组合物优选为权利要求 1~3 中任一项所述的组合物。

5、根据权利要求 4 所述的应用，其中，所述的改善精神分裂症异常行为的系统是
15 是利用所述组合物中携带光感基因的病毒载体感染伏隔核中的 GABA 能神经元，并通过光照装置对感染后的伏隔核进行蓝光光照刺激，以改善精神分裂症异常行为。

6、根据权利要求 4 所述的应用，其中，所述的精神分裂症异常行为是先天恐惧弱化和/或焦虑。

7、根据权利要求 5 所述的应用，其中，所述改善精神分裂症异常行为的系统还包括
20 包括用于将蓝光传导至感染后的伏隔核的光纤。

8、根据权利要求 7 所述的应用，其中，所述蓝光光照条件为：蓝光波长 470~480nm，光纤的出口功率 12~20 mW，光照频率 40~80Hz 的光；1: 1 的占空比，持续 5min 以上。

9、一种改善精神分裂症异常行为的系统，该系统包括权利要求 1~3 中任一项所述的组合物。

10、根据权利要求 9 所述的改善精神分裂症异常行为的系统，其中，所述的精神分裂症异常行为是先天恐惧弱化行为和/或焦虑。

11、一种改善精神分裂症异常行为的方法，该方法包括：

将一种携带光敏基因的慢病毒载体注入到伏隔核区，使其感染伏隔核区中的GABA能神经元，在GABA能神经元内表达相应的光敏受体；其中所述携带光敏基因的病毒载体包括启动子、光敏基因、绿色荧光标记基因，其中，所述启动子为Syn启动子；

5 通过光照系统对表达了光敏受体的GABA能神经元进行光刺激，使其兴奋。

12、根据权利要求 11 所述的方法，其中是通过光照装置对感染后的伏隔核进行蓝光光照刺激，以改善精神分裂症异常行为。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其中，所述蓝光光照条件为：蓝光波长470~480nm，光纤的出口功率 12~20 mW 左右，光照频率 40~80Hz；占空比 1: 1，持
10 续 5min 以上。

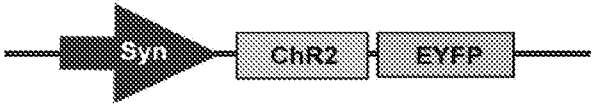


图 1A

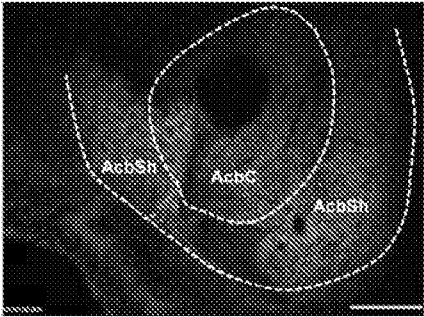


图 1B

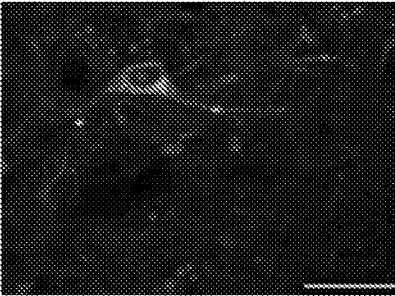


图 1C

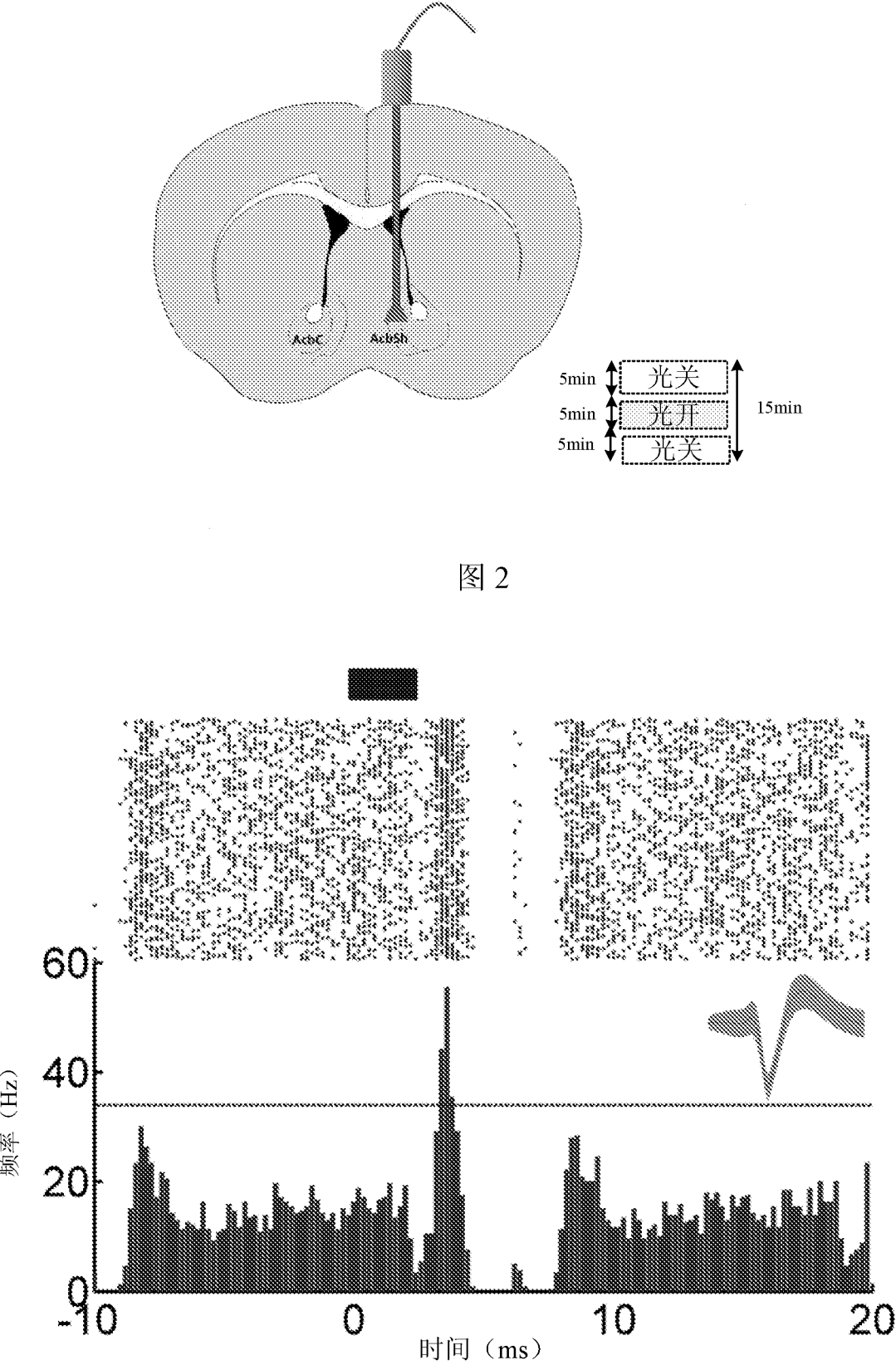


图 2

图 3

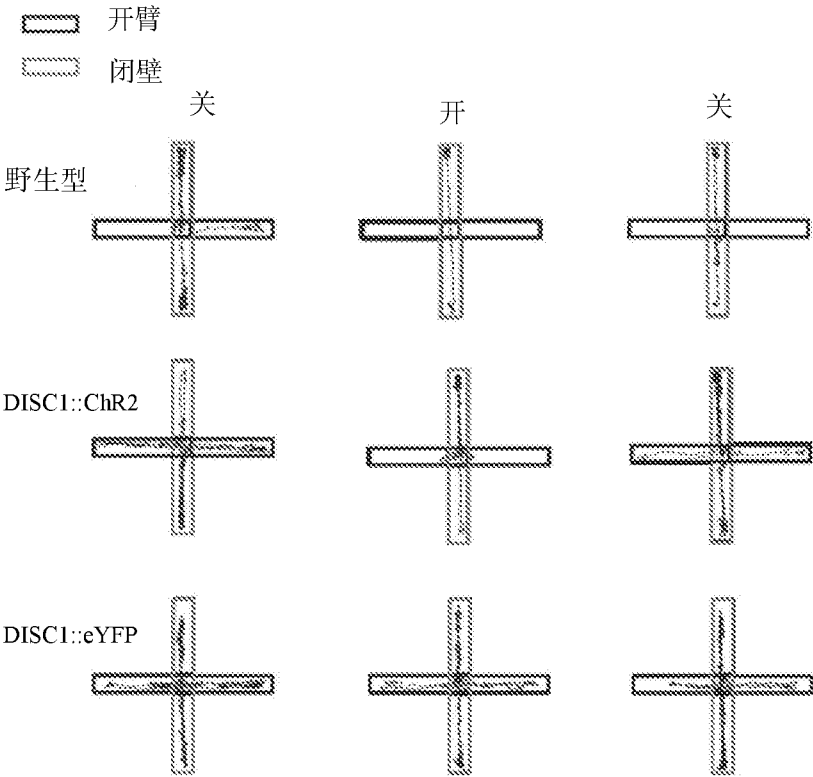


图 4

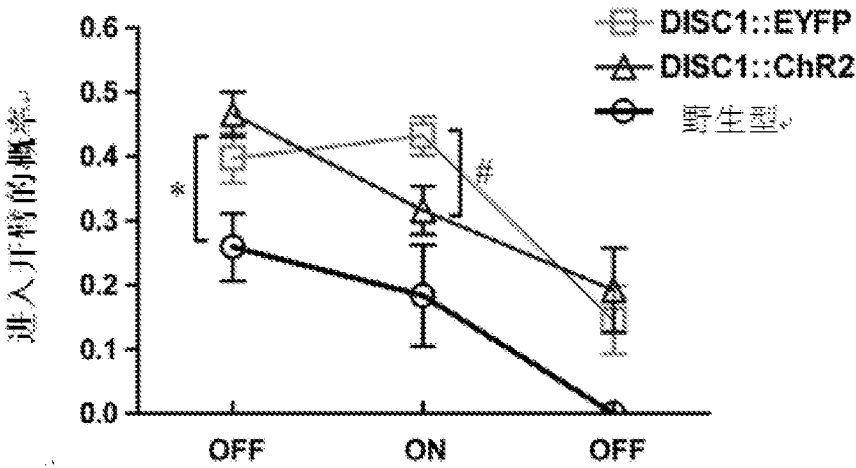


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/099667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/867 (2006.01) i; A61N 5/06 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; SIPOABS; CNKI; wanfang, google scholar: synapsin, syn, promoter?, Channelrhodopsin-2, CHR2, channel opsins -2, channelrhodopsin, light sensitive channel protein, light sens+ gene?, GFP, EGFP, green fluorescen+, YFP, EYFP, yellowish-green fluorescence, yellow fluorescen+, gamma aminobutyric acid, γ -aminobutyric acid, gabaergic, nucleus D accumbens, nucleus accumbens, schizophrenia, excit+, stimulat+, activate.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAY, Y. A. et al., "Nicotinic Transmission onto Layer 6 Cortical Neurons Relies on Synaptic Activation of Non- α 7 Receptors", CEREBRAL CORTEX ADVANCE ACCESS, 01 May 2016 (01.05.2016), pages 1-14, see page 2, "Animal, Virus, and Surgery" and page 3, "Photostimulation"	1-3, 9-10
A	HAY, Y. A. et al., "Nicotinic Transmission onto Layer 6 Cortical Neurons Relies on Synaptic Activation of Non- α 7 Receptors", CEREBRAL CORTEX, 01 May 2016 (01.05.2016), pages 1-14, see the whole document	4-8
X	FRANCIS, T.C. et al., "Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes Mediate Depression-Related Outcomes to Social Defeat Stress", BIOLOGICAL PSYCHIATRY, vol. 77, no. 3, 01 February 2015 (01.02.2015), ISSN: 0006-3223, supplemental information, pages 1-10, see page 2, paragraphs 2-3	1-3, 9-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 February 2016 (14.02.2016)	Date of mailing of the international search report 09 March 2016 (09.03.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Chi Telephone No.: (86-10) 62411932

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/099667

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRANCIS, T.C. et al., "Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes Mediate Depression-Related Outcomes to Social Defeat Stress", BIOLOGICAL PSYCHIATRY, vol. 77, no. 3, 01 February 2015 (01.02.2015), ISSN: 0006-3223, supplemental information, pages 1-10, see the whole document	4-8
X	WANG, J. et al., "Laser-evoked Synaptic Transmission in Cultured Hippocampal Neurons Expressing Channelrhodopsin-2 Delivered by Adeno-associated Virus", JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, vol. 183, no. 2, 15 October 2009 (15.10.2009), ISSN: 0165-0270, pages 165-175, see sections 2.1 and 2.4	1-2, 9-10 (parts)
A	WANG, J. et al., "Laser-Evoked Synaptic Transmission in Cultured Hippocampal Neurons Expressing Channelrhodopsin-2 Delivered by Adeno-associated Virus", JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, vol. 183, no. 2, 15 October 2009 (15.10.2009), ISSN: 0165-0270, pages 165-175, see sections 2.1 and 2.4	4-8
A	KLIGLER, S. et al., "Human Synapsin 1 Gene Promoter Confers Highly Neuron-specific Long-term Transgene Expression from an Adenoviral Vector in the Adult Rat Brain Depending on the Transduced Area", GENE THERAPY, vol. 10, ISSN: 0969-7128, pages 337-347, see the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/099667

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] the subject matter of claims 11-13 relates to a method for treating a living human or animal body, and thus falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv), for which an international search is not required.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/099667

A. 主题的分类

C12N 15/867(2006.01)i; A61N 5/06(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;DWPI;SIPOABS;CNKI;wanfang, google scholar:synapsin, syn, 突触素, promoter?, 启动子, Channelrhodopsin-2, CHR2, 紫红质通道蛋白2, 通道视蛋白-2, 通道型视紫红质, 光敏感通道蛋白, light sens+ gene?, 光感基因, GFP, EGFP, green fluorescent+, 绿色荧光, YFP, EYFP, 黄色荧光, 黄绿色荧光, yellow fluorescent+, gamma aminobutyric acid, γ -aminobutyric acid, γ -氨基丁酸, gabaergic, nucleus D accumbens, 伏隔核, 伏核, 精神分裂, schizophrenia, 兴奋, 刺激, 激活, excit+, stimulat+, activate+

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Y. Audrey Hay et al. "Nicotinic Transmission onto Layer 6 Cortical Neurons Relies on Synaptic Acitivation of Non- α 7 Receptors" Cerebral Cortex Advance Access, 2016年 5月 1日 (2016 - 05 - 01), 第1-14页, 参见第2页 "Animal, Virus, and Surgery" 和第3页 "Photostimulation"	1-3, 9-10
A	Y. Audrey Hay et al. "Nicotinic Transmission onto Layer 6 Cortical Neurons Relies on Synaptic Acitivation of Non- α 7 Receptors" Cerebral Cortex, 2016年 5月 1日 (2016 - 05 - 01), 第1-14页, 参见全文	4-8
X	T. Chase Francis et al. "Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes Mediate Depression-Related Outcomes to Social Defeat Stress" Biological Psychiatry, 第77卷, 第3期, 2015年 2月 1日 (2015 - 02 - 01), ISSN: 0006-3223, supplemental information, 第1-10页, 参见第2页第2-3段	1-3, 9-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 2月 14日

国际检索报告邮寄日期

2016年 3月 9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

张弛

电话号码 (86-10)62411932

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	T. Chase Francis et al. "Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes Mediate Depression-Related Outcomes to Social Defeat Stress" Biological Psychiatry, 第77卷, 第3期, 2015年 2月 1日 (2015 - 02 - 01), ISSN: 0006-3223, supplemental information, 第1-10页, 参见全文	4-8
X	Jennifer Wang et al. "Laser-evoked synaptic transmission in cultured hippocampal neurons expressing channelrhodopsin-2 delivered by adeno-associated virus" Journal of Neuroscience Methods, 第183卷, 第2期, 2009年 10月 15日 (2009 - 10 - 15), ISSN: 0165-0270, 第165-175页, 参见第2.1和2.4节	1-2, 9-10 (部分)
A	Jennifer Wang et al. "Laser-evoked synaptic transmission in cultured hippocampal neurons expressing channelrhodopsin-2 delivered by adeno-associated virus" Journal of Neuroscience Methods, 第183卷, 第2期, 2009年 10月 15日 (2009 - 10 - 15), ISSN: 0165-0270, 第165-175页, 参见第2.1和2.4节	4-8
A	S Kügler et al. "Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area" Gene Therapy, 第10卷, ISSN: 0969-7128, 第337 - 347页, 参见全文	1-10

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 11-13
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求11-13的主题涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT实施细则第39.1(iv)规定的不要国际检索单位检索的情况。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。