



环形RNA翻译及其在药物研发中的应用

茅缪伟^{1,3*}, 张喆宇³, 魏言欢³, 王泽峰^{2,3*}

1. 中国科学院上海免疫与感染研究所, 上海 200031;

2. 南方科技大学生命科学学院, 深圳 518055;

3. 中国科学院上海营养与健康研究所, 上海 200031

* 联系人, E-mail: maomiaowei@siii.cas.cn; wangzf@sustech.edu.cn

收稿日期: 2023-12-24; 接受日期: 2024-03-13; 网络版发表日期: 2024-04-12

国家重点研发计划“生物大分子与微生物组”重点专项(批准号: 2021YFA1300503)资助

摘要 以新冠mRNA疫苗为代表的mRNA药物在新冠疫情中发挥重要的作用. 而在后疫情时代, mRNA技术的应用范围不断被扩展. 环形RNA比线性mRNA有更高的稳定性, 有望提供比mRNA更大的治疗窗口, 因此作为新一代的mRNA药物平台有广泛应用前景. 同时环形RNA的设计与生产、载体选择与制备以及递送选择等方面, 也有很多技术特色和挑战. 本文对于环形RNA的体内外合成、翻译调控以及递送和应用各方面进行简要的总结和讨论. 期望对关心环形RNA技术应用的读者有所参考和启发. 未来研究中, 环形RNA技术将向着提高表达和递送效率, 以及降低其天然免疫原性的方向来进行优化.

关键词 mRNA疗法, 环形RNA, 非经典翻译, RNA递送

作为和生命起源相关的古老生物大分子, RNA既是遗传信息的传递者又是生物功能的执行者. 遗传信息在细胞核中由DNA经转录与剪接后生成mRNA, mRNA在细胞质中由核糖体借由tRNA翻译成蛋白质, 从而行使不同的生物学功能. 除mRNA外, 体内还有多种不同种类的非编码RNA, 其本身也可以行使各种各样的生物学功能, 比如用于细胞内蛋白翻译的核糖体RNA(rRNA)、可降解或者抑制mRNA表达的microRNA、以及各种核酶与RNA适配体等^[1]. 因此, 依赖RNA的多种特性和生物学功能, 基于不同RNA的各种疗法在生物医学领域有着非常广泛的应用前景.

随着两款为应对新型冠状病毒肺炎的mRNA疫苗(BioNTech-Pfizer公司的BNT162b2和Moderna公司的

mRNA-1273)在2021年的紧急临床应用^[2,3], 基于RNA的药物和疗法越来越受到研究者的关注, 目前已经成为学术界与产业界的研究热点. 而环形RNA(circular RNA)作为一种特殊形态的RNA, 具有稳定的闭环结构与广泛的生物学功能, 其相关技术被普遍认为是下一代RNA技术. 随着研究的不断深入和技术的快速进步, 环形RNA凭借其更佳的稳定性和更低的免疫原性, 成为mRNA疗法中的一颗新星. 本文对目前环形RNA的翻译研究及其在医疗领域的应用进行总结和讨论, 将主要阐述环形RNA的生成机制、翻译原理、合成策略以及在药物研发中的应用. 在环形RNA药物的研发方面, 本综述将聚焦于环形RNA翻译的应用, 而对非编码环形RNA的应用只给予简要介绍.

引用格式: 茅缪伟, 张喆宇, 魏言欢, 等. 环形RNA翻译及其在药物研发中的应用. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 602–617

Mao M W, Zhang Z Y, Wei Y H, et al. Circular RNA translation and its application in drug development (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 602–617, doi: [10.1360/SSV-2023-0315](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0315)

1 mRNA 疗法简介

mRNA疗法是利用mRNA在细胞内指导蛋白翻译的生物特性, 在体外设计并合成的编码特定蛋白的mRNA, 并以不同方法来包装并递送至体内, 使其在生物体内表达目标蛋白以到达不同的医疗应用目的的一种新型治疗方法。

研究者通常根据体内mRNA的序列和结构, 来设计并优化其人工mRNA的序列和结构以提高其表达效率. 和内源mRNA一样, 人工设计的线性mRNA通常包含5种基本结构: 5'帽子结构、编码区(coding sequence, CDS)、5'-和3'-非翻译区(untranslated regions, UTR), 以及多聚腺苷酸(poly A)尾巴. 其中CDS负责编码目标蛋白, 5'帽子结构和poly A尾巴可以促进翻译并提高mRNA稳定性, 5'-UTR和3'-UTR对翻译过程起到调控作用. mRNA的体外合成是利用RNA聚合酶, 在体外以DNA为模板转录合成目标RNA, DNA模板通常带有对应聚合酶的启动子序列以及线性RNA需要的所有序列^[4]. 同时, 在体外转录过程中还需要把部分GTP替换为帽子模拟物来为RNA的5'末端加上帽子结构^[5]. 体外合成线性mRNA需要通过加入修饰碱基(例如假尿嘧啶等)合成拥有特定碱基修饰的修饰mRNA. 修饰碱基能够极大地降低mRNA被固有免疫系统Toll-like受体识别的几率, 从而使其获得更好的稳定性和更低的免疫原性^[6,7].

目前基于mRNA疗法的研究非常广泛. mRNA疗法相比基于蛋白的治疗方式, 其可以在细胞质表达蛋白使其在细胞内或者细胞膜定位并行使功能. 同时, 相比于基于DNA的治疗方式, 其规避DNA的入核步骤, 这使其比DNA更容易递送, 且整合到基因组的风险更低. 根据mRNA表达蛋白的不同类型, mRNA疗法可分为多种策略. 一方面, mRNA疗法可以作为疫苗, 通过表达特定抗原蛋白激活免疫反应, 比如新型冠状病毒肺炎病毒的两款mRNA疫苗^[2,3]. 同时也可以利用mRNA表达特定抗原蛋白激活免疫反应的特性来研发相应的肿瘤免疫治疗方法^[8]. 另一方面, 可以利用mRNA表达疾病中异常或者缺失的蛋白以用作蛋白替代疗法. 比如, 针对苯丙酮尿症、法布里病、糖原累积病 I a型等由于相关代谢酶基因缺陷导致的代谢疾病. 此外, mRNA疗法也能够通过表达细胞因子以调控细胞生长分化, 比如使用编码VEGF-A的mRNA促进心肌细胞更新以治疗心肌梗死模型小鼠^[9].

2 环形RNA 的体内生成

在细胞内, mRNA的成熟过程其实是一个无缝整合的过程, 包括转录、剪接、加帽、多聚腺苷酸化以及运输等^[10,11]. 在正常剪接过程的初期, 识别剪接位点的不同剪接小体间进行选择配对, 可以使外显子通过不同方式连在一起, 产生多种选择性剪接亚型(图1). 而外显子还可以通过一种非正常的选择性剪接方式, 进行反向剪接而产生环形RNA(图1)^[12]. 同时, 正常剪接的内含子中间体通过进一步加工, 也可以形成另一类环形RNA. 这些环形RNA有着多种不同的功能, 包括作为非编码RNA来特异识别miRNA或RNA结合蛋白(RNA binding protein, RBP)来调控其活性, 或者作为翻译模板指导蛋白翻译. 对可生成环形RNA的外显子的基因组进行大规模特征分析表明, 超过99%的已知环形RNA的形成均需要利用外显子经典的3'和5'剪接位点^[13], 并由经典剪接体机制执行反向剪接^[14,15]. 除剪接位点外, 环化并不需要特定的序列结构^[16,17], 但是对可以发生环化的外显子长度有一定的要求: 大多数人类内源环形RNA包含两个或三个外显子; 可发生反向剪接环化的单个外显子中位数长度为353个核苷酸; 多个外显子参与的反向剪接环化中, 每个外显子长度为112~130个核苷酸^[17].

由于绝大多数的内源环形RNA是由反向剪接所生成的, 下文将主要阐述反向剪接生成环形RNA的几种模型(图2). 基于RNA的组成和生物合成机制, 内源circRNA可以分为三个亚类: 外显子环形RNA(EcircRNA)、外显子-内含子环形RNA(EIciRNA)和环形内含子RNA(ciRNA)^[18]. EcircRNA是通过反向剪接环化或外显子跳跃(exon skipping)产生的^[19]. 反向剪接环化, 也称为环状剪接或头-尾剪接, 是指一个外显子的下游3'端与其前面一个外显子的上游5'端连接, 形成一个环形RNA的过程. 单独一个外显子也可以生成一个环形RNA; 在这种情况下, 一个外显子的3'端与同一外显子的5'端连接^[19]. 外显子跳跃是生成EcircRNA的另一种过程, 即前体RNA首先进行外显子跳跃, 然后在内部剪接过程中通过环状内含子形成一个包含外显子的环形RNA^[20]. 内含子配对驱动环化是一种直接的反向剪接机制, 其通过反向互补序列的辅助拉近显子的距离, 进而诱导反向剪接环化反应的发生, 并通过内含子去除机制产生一个EIciRNA或EcircRNA(图2A)^[17].

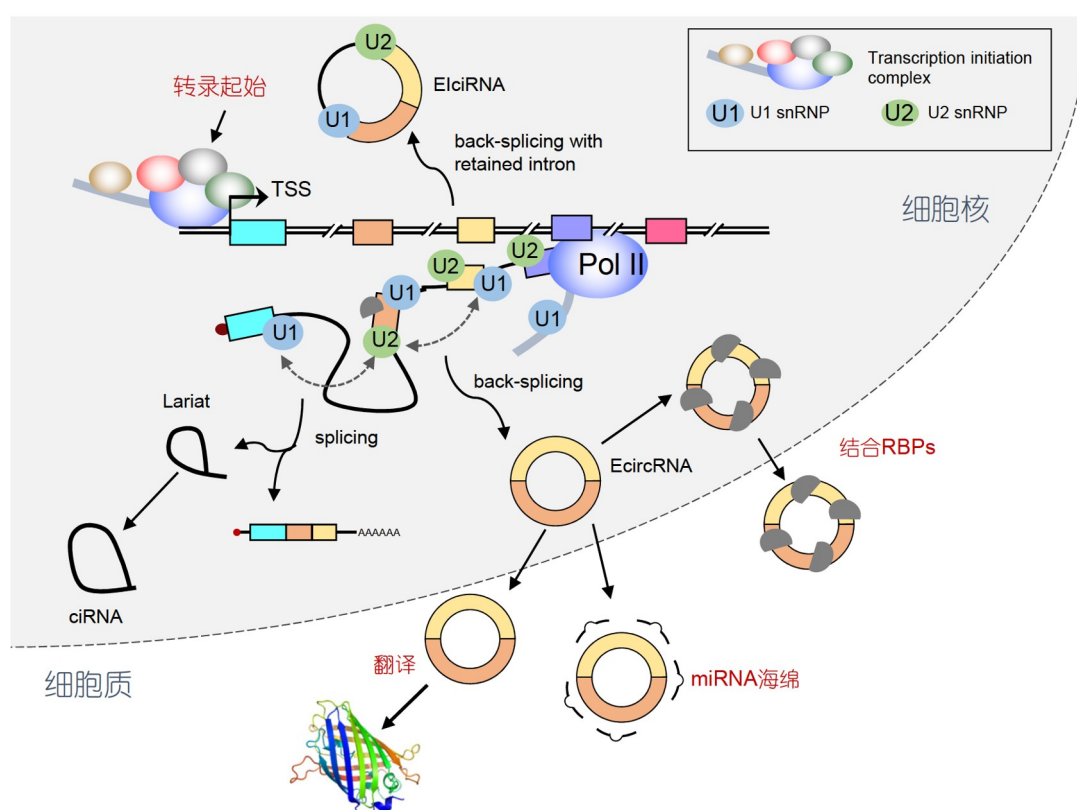


图1 环形RNA的体内合成与功能

Figure 1 Synthesis and function of circular RNA in cells

RNA结合蛋白驱动的回化反应是反向剪接机制的另一个模型。该过程通过RBPs的帮助,使外显子周围非配对的内含子也能紧密结合,拉近外显子的距离进而发生反向剪接反应,从而形成一个环形RNA(图2B)^[21]。除受序列中顺式元件的调控外,前体RNA的反向剪接还受到反式作用因子的调控,这些因子通常与相关的内含子顺式元件协同作用^[22],主要包括核心剪接体组分蛋白^[23]、丝氨酸-精氨酸蛋白^[22]、异质核糖核蛋白(hnRNP)^[22](例如hnRNP L^[24])以及其他已知的调控另类剪接的蛋白质,如RNA结合结构蛋白20(RBM20)^[25]、FUS^[26]和剪接调控因子QKI^[27]等。在某些情况下,这些RBPs与RNA结合状况的改变将导致显著的生理变化。例如,在果蝇中,肌肉盲蛋白(MBNL1)可直接与MBNL1的前体RNA相互作用,促进circMBNL1生成,并因此限制线性MBNL1 mRNA(以及MBNL1蛋白)的表达^[14]。又例如,在人类细胞中,剪接调控因子QKI可以在上皮向间质转化过程中,与环形RNA周围的内含子结合以促进这些环形RNA产生^[21]。

除内含子配对驱动的回化和RBP依赖的回化,Lariat(内含子在剪接时形成的套索结构)驱动的回化也是EcircRNA或ElciRNA形成的主要模式。Lariat驱动的回化其实是一个外显子跳跃的过程,在此过程中首先生成一个Lariat中间体,其中一个外显子的5'端供体结合另一个外显子的3'端受体,随后通过移除外显子之间的内含子形成一个EcircRNA(图2C)^[16]。

然而,与EcircRNA的形成方式不同,ciRNA的形成取决于剪接体两侧的保守序列^[28]。当一个5'端剪接供体结合到一个3'端剪接受体时,会生成一个Lariat内含子,该段保守序列由一个靠近5'剪接位点的7个核苷酸(GU-rich)和靠近分支点的11个核苷酸(C-rich)组成,保护内含子Lariat避免被解支酶降解(图1D)^[29]。

除以上几种细胞体内自发的回化机制外,最近也有人工设计的体内回化系统取得成功。2019年,康奈尔大学的Samie R Jaffrey研究组^[30]开发一种基于tRNA剪接策略的细胞内RNA回化方法(取名为Tornado回化系统)。该技术利用具备自剪切活性的核酶(Ribozyme)

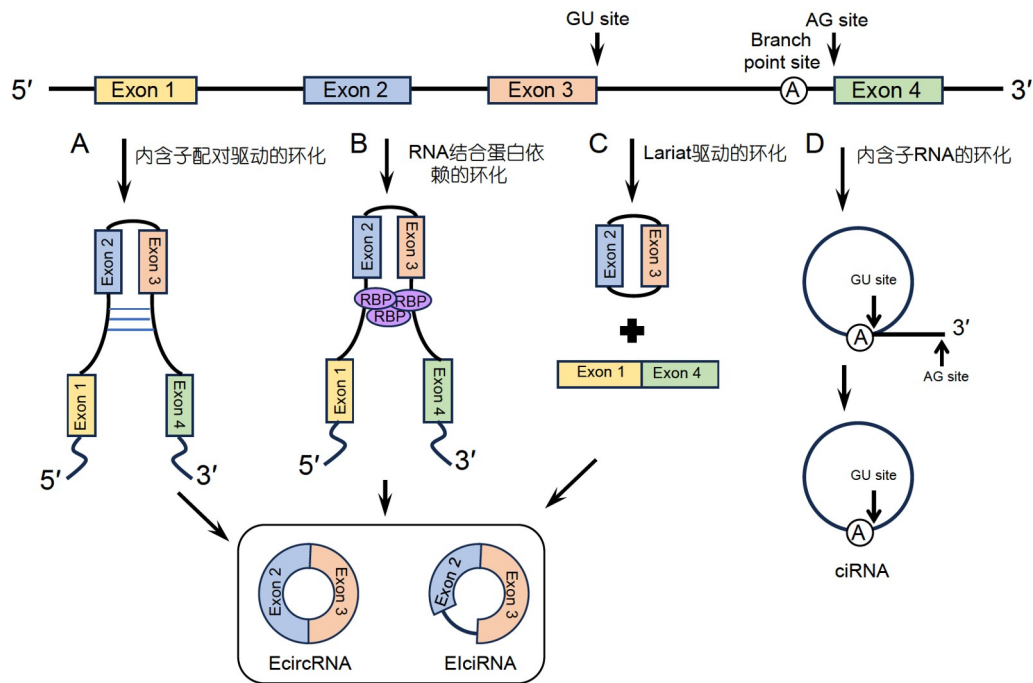


图 2 环形RNA的形成机制. A: 内含子配对驱动的内化; B: RNA结合蛋白依赖的内化; C: Lariat驱动的内化; D: 内含子RNA的内化

Figure 2 Formation mechanism of circular RNA. A: Intron-pairing-driven circularization; B: RNA-binding protein-dependent cyclization; C: Lariat-driven cyclization; D: cyclization of intron

实现待环化序列的上下游切割, 然后借助于内源的RNA连接酶RtcB实现目的RNA序列的环化. 该过程所用的核酶部分为经过筛选的Twister核酶对(5'端来自Twister P1, 3'端来自Twister P3 U2A), 其切割速度可以与内源RtcB的连接速度相匹配. Tornado环形RNA过表达体系具有自动剪切, 自动环化, 表达高效且可实现适配体体内过表达的优点, 为环形RNA的在体过表达开辟新途径.

3 环形RNA的翻译调控

与线性RNA不同, 环形RNA呈环形封闭结构, 因此也就不能依赖5'末端的帽结构来驱动翻译^[31]. 最初在1995年, Chen和Sarnow^[32]通过体外实验证明, 人工合成的环形RNA与细胞裂解液混合后, 可以通过内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)驱动翻译(图3A). 该实验证明环形RNA的翻译在化学上是可行的, 但是其生物学意义还未进行深入探究. 2014年, 本团队第一次证明细胞体内生成的环形RNA可以通过IRES进行翻译^[33]. 2017年, 多个研究组几乎

同时发现, 内源环形RNA可以在细胞中进行翻译^[34-36]. 此外, 研究结果还显示, 除IRES可以驱动环形RNA翻译外, 环形RNA内部的m⁶A修饰^[36]与一些类IRES短序列^[37]也可以驱动环形RNA翻译.

3.1 通过IRES方式翻译

早期研究结果显示, 大多数内源性环形RNA并不与核糖体结合^[16,38], 因此, 在相当长一段时间里学术界普遍认为内源环形RNA不具有翻译功能. 直到2017年, 多个独立的研究组发现其中一部分内部带有IRES序列的环形RNA可以被翻译, 例如circZNF609^[34], circMbl^[35]及后续发现的circFGFR1^[39](图3A). 这种翻译机制是通过18S核糖体RNA的互补性和IRES上的结构化的RNA元件来实现^[39].

在正常条件下, 非帽结构的翻译效率较低^[34,35,39], 因此内源环形RNA翻译出的产物较少. 然而, 在饥饿^[35]或者热休克^[36,40]等压力条件下, 非帽结构的翻译提高^[39]. 例如, circFGFR1是由成纤维细胞生长因子受体1(fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1)的第2到第7外显子反向剪接形成, 并可翻译为circFGFR1p. 该

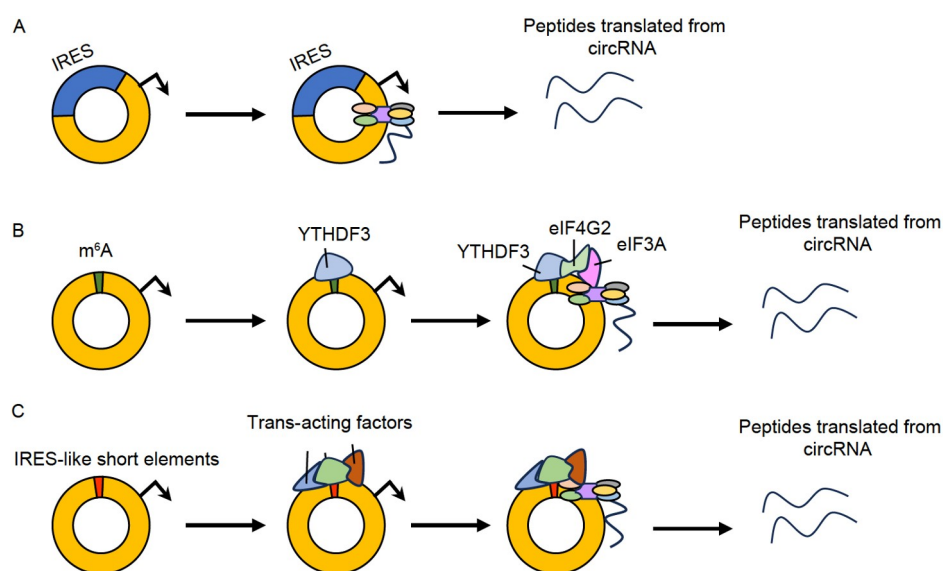


图 3 环形RNA的翻译机制. A: 内部带有IRES序列的环形RNA翻译机制; B: 内部带有m⁶A修饰的环形RNA的翻译机制; C: 内部带有类IRES短序列的环形RNA的翻译机制

Figure 3 Translation mechanism of circular RNA. A: Circular RNA translation with IRES sequence; B: m⁶A modifications initiate the translation of circular RNA; C: IRES-like short elements initiate the translation of circular RNA

肽段是FGFR1的一种截短体, 具有完整的FGF1配体结合位点, 但缺乏胞内的FGFR1酪氨酸激酶结构域. circFGFR1p可通过一种显性负效应与FGFR1相互作用, 从而在热休克期间抑制细胞增殖^[39]. 不过, 在细胞压力的条件下, 帽依赖性的线性mRNA翻译也会同时会被抑制^[41,42], 所以IRES驱动的翻译增加也可能是由于游离的翻译因子和核糖体浓度提高而产生的被动效果.

3.2 通过m⁶A修饰翻译

几乎与发现内源带有IRES序列的环形RNA可被翻译的同时, 本团队发现m⁶A修饰也可以通过m⁶A修饰识别蛋白YTHDF3来招募翻译启动因子eIF4G2, 进而推动环形RNA的非帽依赖翻译^[36](图3B). 例如, 在雄性生殖细胞的生理条件下, 环形RNA中跨越反向剪接位点的序列可以翻译编码数百个肽段, 这些可能都是由以m⁶A修饰来驱动的多肽翻译^[43].

与IRES驱动的翻译类似, 正常条件下m⁶A修饰所驱动的翻译效率较低. 但是在热休克压力条件下, 该机制所驱动的翻译效率会增加^[36]. 这种由m⁶A修饰来驱动的环形RNA翻译在其他的系统中也被验证. 例如, circARHGAP35是一种具有3867个核苷酸的大型致癌环状RNA, 是由肿瘤抑制基因ARHGAP35的第2和第3

外显子反向剪接产生的, 其内部带有一个m⁶A修饰的起始密码子^[44]. 它的表达上调与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)患者的不良生存率相关^[44]. 在HCC中, 由ARHGAP35 mRNA编码的ARHGAP35蛋白通过降低胞质中RhoA的活性来抑制细胞迁移和侵袭; 而circARHGAP35则是编码一个缺少与Rho GTPase激活蛋白(GTPase-activating protein, GAP)相互作用结构域的截短型ARHGAP35, 导致其定位在细胞核中, 在激活通用转录因子II-I (general transcription factor II-I)的同时促进肿瘤进展^[44].

3.3 通过类IRES短序列方式翻译

2022年, 本团队^[37]首次报道环形RNA可由类IRES短序列(IRES-like short elements)驱动翻译的新机制. 本团队通过对随机序列进行筛选, 系统性鉴定出多个可用于驱动环形RNA翻译的类IRES短序列元件, 并进一步通过质谱数据分析, 发现体内近千个可翻译的内源性环形RNA, 其中相当一部分可通过滚环翻译的形式来合成超大分子量的蛋白^[37](图3C). 此研究也表明在人的转录组中存在普遍的非帽依赖性翻译.

在最近的关于非编码序列翻译调控的新机制研究中, 来自哥伦比亚大学的吴雪兵研究组^[45]发现人类细

胞降解所有类型非常规翻译产生的蛋白的统一机制。他们发现, 原先非编码序列翻译所产生的新型蛋白的C端都是由非编码序列翻译而来的。该研究组通过大规模并行分析上万个个人源非编码序列和数百万随机序列, 确认大部分未经过进化的非编码序列和随机序列都倾向于翻译带有C端疏水区的蛋白或多肽^[45]。与此同时, 翻译所得的C端疏水区会导致蛋白被BAG6膜蛋白质量监控系统特异性地识别, 进而导致蛋白降解^[45]。该研究结果可能部分解释为何在细胞内存在大量可翻译环形RNA的情况下, 能被检测到的翻译产物却非常少。

总的来说, 大量的细胞内实验结果表明, 一部分环形RNA可以作为翻译的模板, 并由多种机制驱动翻译。然而, 由于它们具有不同的大小、构象和相互作用因子, 很难总结出可翻译环形RNA的共同特征。因此, 对环形RNA的翻译机制有必要进行更全面与深入的研究以更好地解其生理作用。

4 环形RNA 的体外合成

目前, 环形RNA的体外合成有如下几种策略: 化学方法、连接酶方法与核酶方法。下面将分别予以详细阐述。

4.1 化学方法合成环形RNA

1988年, Shabarova团队^[46]首次将化学手段用于连接核酸链。他们使用溴化氰(BrCN)以及2-(N-吗啉基)-乙烷磺酸(MES)等吗啉衍生物, 将携带有5'-羟基和3'-磷酸酯基团的两条DNA链连接在一起(图4)。这种化学连接策略也可用于RNA环化实验, 但前体是需要将线性核酸链的两个末端靠近^[47]。这通常可以通过加入寡核苷酸夹板(oligonucleotide splint)拉近两个末端距离, 进而帮助实现核酸链的环化。

与DNA相比, RNA的化学连接还伴随着一个更严重的副反应, 即形成2',5'-磷酸二酯键, 而不是自然的3',5'-磷酸二酯键。为解决这个问题, 通常在要环化的寡核苷酸的3'-末端使用带有2'-脱氧糖基的寡核苷酸^[48]。

在1999年, Micura^[49]报道一种固相合成2~21个核苷酸长度的环状RNA的方法。该方法综合链组装过程中的标准磷酸酰胺反应和环闭合的磷酸三酯反应。该方法的关键要素是起始核苷酸通过3'-磷酸二酯键与

聚合物支撑物连接在一起。在链组装完成后, 最后进行去三噻基化反应生成一个5'-羟基基团, 用于亲核攻击3'-磷酸二酯键, 实现环化。该方法使得环状RNA的平均产率约为15%^[49]。

4.2 连接酶方法合成环形RNA

1992年, 诺贝尔生理学或医学奖获得者Philp Sharp的实验室^[50]首创利用T4 DNA连接酶介导的RNA连接, 此后该方法被广泛使用。目前, 有三种不同的核酸连接酶经常被用于连接单链和/或双链RNA中的缺口, 即T4 DNA连接酶(T4 DNA ligase)、T4 RNA连接酶1(T4 RNA ligase 1)和T4 RNA连接酶2(T4 RNA Ligase 2)(图5)。这三种连接酶均来自T4噬菌体^[51], 可以催化DNA或RNA中5'-磷酸(供体)和3'-羟基(受体)末端基团之间的磷酸二酯键的形成。该连接反应是一种ATP依赖的反应。

(1) T4 DNA连接酶。T4 DNA连接酶也同时有连接RNA的活力, 但当使用该酶对RNA进行连接时, 需要特殊处理。因为它对单链区域无法进行连接, 因此需要确保连接点位于核酸的双链区域内。为提供这一反应条件, 可以使用寡核苷酸夹片(splint)来创建所需的双链区域环境, 从而催化RNA中5'-磷酸和3'-羟基末端的连接^[52](图5A)。使用T4 DNA连接酶进行核酸链环化时, 其具体的反应条件需要针对每个底物进行优化以提高反应效率, 包括温度、反应物用量和夹片长度等。该方法最具代表性的案例是将长度为453个核苷酸的RNA在体外进行环化, 并在体外成功进行翻译, 这也是科学家们第一次证明环形RNA具有可翻译的特性^[32]。

(2) T4 RNA连接酶1。使用T4 RNA连接酶直接环化线性RNA是1995年就被开发出来的经典方法^[53]。与T4 DNA连接酶不同, T4 RNA连接酶1可以在单链RNA分子中催化形成3'-5'磷酸二酯键(图5B)。在1970年代, 已有研究利用该酶催化带有3'-羟基和5'-磷酸基末端的线性RNA环化生成单链环状产物^[54]。因为T4 RNA连接酶1所介导的连接反应是非特异性的, 所以会发生分子间连接与分子内连接(环化)的竞争。使用优化过的反应条件可以使环化成为主要反应, 如加入夹片DNA(图5B)。T4 RNA连接酶1在连接位点对供体和受体核苷酸具有不同的偏好: 对于3'-末端核苷酸受体, $A > G \geq C > U$, 对于5'-末端磷酸化核苷酸供体,

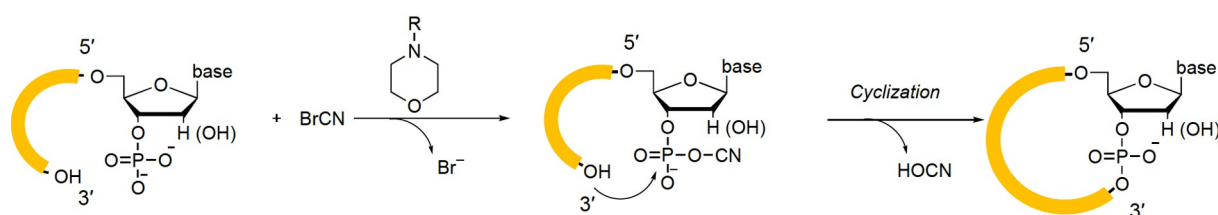


图4 化学方法合成环形RNA的原理

Figure 4 The principle of chemical synthesis for circular RNA

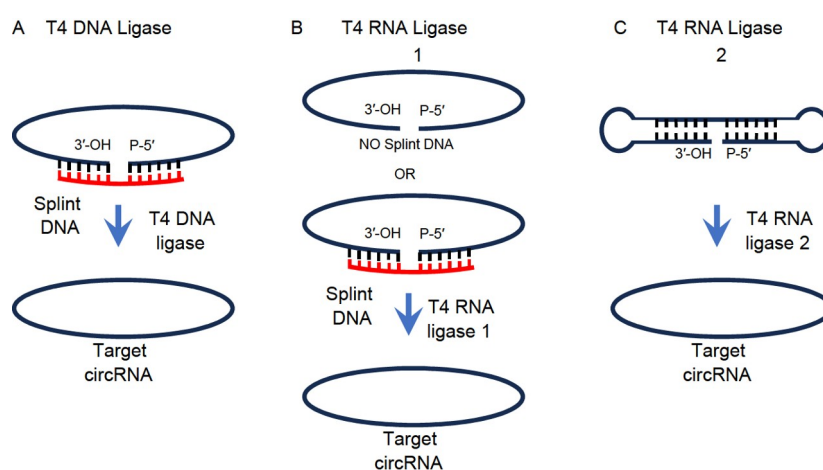


图5 连接酶方法合成环形RNA的原理示意图. A: T4 DNA连接酶合成环形RNA; B: T4 RNA连接酶1合成环形RNA; C: T4 RNA连接酶2合成环形RNA

Figure 5 Schematic diagram of the ligase method for synthesizing circular RNA. A: T4 DNA ligase synthesizes circular RNA; B: T4 RNA ligase 1 synthesizes circular RNA; C: T4 RNA ligase 2 synthesizes circular RNA

pC>pU>pA>pG^[55,56]. T4 RNA连接酶1在许多应用中被用于将短RNA和长RNA作为底物进行环化。

(3) T4 RNA连接酶2. 2022年, Ho和Shuman^[57]对T4 RNA连接酶2的分子间和分子内(环化)连接活性进行详细研究. 与T4 RNA连接酶1相比, RNA连接酶2可以更高效地连接dsRNA底物上的缺口, 而不是连接ssRNA的末端(图5C)^[58]. 利用这一特性, RNA连接酶2常被用来对由内部二级结构将供体和受体末端拉近的特定构型RNA进行环化^[59]. 含有249个氨基酸残基的截短版T4 RNA连接酶2能够在无ATP的情况下将经过酶法或化学修饰的DNA或RNA的5'-末端与RNA的3'-末端连接起来^[57,60], 因此也可以用于环化反应。

在体外, 无论是通过化学制备还是酶法制备, RNA的5'-末端都需要进行磷酸化从而进行连接反应. 5'-末端的磷酸化可以通过化学方法或酶法进行^[61], 然后直接进行环化反应. 然而, 对于由酶法所制备获得的

RNA, 必须在经过体外转录后将其5'-末端的三磷酸基团去除, 再通过核苷酸激酶进行磷酸化, 步骤较为繁琐. 为简化去磷酸化和再磷酸化两个步骤, 可以在体外使用T7 RNA聚合酶转录时使用GMP取代GTP, 从而使得体外转录所获的RNA产物均是5'-单磷酸化的线性RNA^[62], 可直接用于后续的RNA环化^[32]. 该方法可以生成没有外源性片段的环形RNA, 从而使其免疫原性最小化^[63]. 然而, 这种连接过程常需要夹片序列来连接自由末端以提高连接的效率. 因此, 这种方法在大规模生产方面存在技术挑战. 此外, 连接酶的使用会增加产品纯化的复杂性, 因此该策略主要在研究实验室中使用。

目前, 使用T4 DNA连接酶或RNA连接酶介导环化的方法主要适用于较短的RNA(<500 nt), 对较长RNA序列进行环化时, 其副反应较强, 所以使用其他策略可能是更好的选择。

4.3 核酶方法合成环形RNA

目前, 研究最热的RNA环化方法是基于内含子剪接的核酶法. 经过多年的发展, 可主要分为两大类方法, 分别是基于 I 型内含子自剪接(group I self-splicing introns)与 II 型内含子自剪接(group II self-splicing introns)(图6). 还有一些方法, 则是在这两类方法上的一些改进与创新. 不同种类的内含子会在剪接时具有不同的机理, 从而在连接条件与连接效率上有所差异.

(1) I 型内含子自剪接. 1992年, 杜克大学的Puttaraju和Been^[64]首先提出利用 I 型内含子自剪接获得环形RNA的策略, 该方法也叫做置换的内含子-外显子元件(permuted introns and exons, PIE). 他们基于鱼腥藻(*Anabaena*)的 I 型内含子, 通过构建 I 型内含子-外显子置换系统, 实现核酶催化的RNA体外自剪接环化(图6A). 该方法需要添加GTP和 Mg^{2+} 作为辅因子来进行催化环化过程. 在反应过程中, 所加入的游离状态的GTP将会攻击下游内含子5'末端的剪接位点, 使其断开. 而外显子(exon 1, E1)末端产生的3'-羟基又会去攻击上游内含子3'末端的剪接位点, 使得两个外显子以3'-5'磷酸二酯键的形式直接相连, 形成环形RNA, 多余的内含子同时被剪切下来. 这种方法所得环化产物的均一性高, 但是最终产物中会保留外显子两端的序列(通常是细菌或噬菌体来源), 有可能引发较大的

免疫反应^[63]. 而且由于受到RNA长度与结构的限制, 其对底物RNA的长度有较大的限制(<500 nt).

2018年, MIT的Daniel. G. Anderson研究组^[65]通过工程化改造鱼腥藻 I 型内含子实现体外长编码RNA的环化. 他们通过在内含子上增加同源臂(homology arm), 使得剪接位点在空间上拉近, 提高环化效率. 同时, 考虑到3'内含子的剪接位点离IRES元件较近, 且两个序列都是呈高度保守结构化的. 为避免二者在空间上互相影响, 又设计添加一段间隔序列(spacer), 用于保护这两者的结构. 由此, 研究者们解决长链RNA序列成环的难题, 并且能够得到较好的成环效率. 在此技术中, 由于外显子序列较长, 因此需要增加的外源序列也较长, 达到186 nt. 在此研究中, 他们也首次证明工程化得到的体外环形RNA可在真核细胞中稳定、高效表达蛋白, 也印证环形RNA是线性mRNA的有效替代品. 基于此技术所成立的Orna Therapeutics也是目前领先的环形RNA公司.

北京大学魏文胜研究组^[66]在2022年同时使用PIE与T4 RNA ligase的成环策略, 所得的环形RNA产物circ-arRNA均能对内源ADAR进行招募, 从而实现A-to-G的RNA编辑. 同时, 该实验室使用Daniel. G. Anderson研究组^[67]的成环策略, 成功制备新冠病毒RBD疫苗, 并在恒河猴身上取得成功, 该环形RNA疫苗体现出优秀的新冠病毒保护能力.

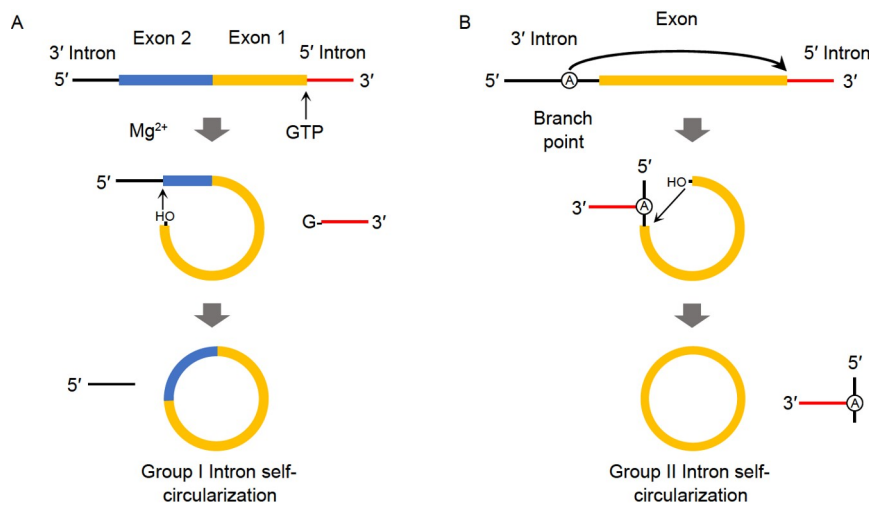


图6 核酶方法合成环形RNA示意图. A: Group I Intron自剪接环化示意图; B: Group II Intron自剪接环化示意图

Figure 6 Schematic diagram of the ribozyme method for synthesizing circular RNA. A: Schematic diagram of self-splicing cyclization of Group I Intron; B: schematic diagram of self-splicing cyclization of Group II Intron

2022年6月, 苏州科锐迈德公司^[68]在预印本平台bioRxiv上公开一种新型Clean-PIERNA成环策略。在研究中, 作者们巧妙地通过筛选目的蛋白编码区或者IRES区, 找到最优的成环位点, 实现无外源序列引入的RNA精准高效成环(环化率>90%)。此外, 该研究还建立IRES元件的高效筛选系统, 得到多条表达性能优于CVB3的IRES序列。该Clean-PIE策略所得的环形RNA具有高表达效率、低免疫原性以及持续表达时间长的优点, 为进一步的量产与临床应用奠定基础。

(2) II型内含子自剪接。与I类内含子类似, II类内含子也可用于合成环形RNA, 其主要通过修改II类内含子来实现逆剪接反应以生成环形RNA^[69,70]。这种剪接反应涉及将外显子末端的5'剪接位点与同一外显子的3'剪接位点连接在一起(图6B)。1997年, Mikheeva^[70]通过修改酵母线粒体基因组内II型内含子 $\alpha 15 \gamma$ 的一个衍生物, 在体外催化形成一个环形的人类外显子。在该反应中, 需要同时将外显子连续排列、分支点位点置于上游以及内含子序列放置在外显子的上游和下游, 如此设计才能通过逆剪接形成RNA环(图5B)。这种设计会在两个转酯化反应中导致外显子环化, 并除去前体RNA底物中所有内含子序列^[70]。因此, 这种方法可以实现更准确的线性RNA前体连接。与II类内含子策略相比, II类内含子催化策略中, 由于有逆剪接反应的存在, 对外显子序列无特殊要求。这种方法在内含子的连接位点上会形成2',5'-磷酸酯键, 而不是自然的3',5'-磷酸酯键^[71~73]。

2022年6月, 环码生物^[74]在预印本平台bioRxiv发布最新的基于Group II Intron的环化技术(Group II Intron PIE)。在此策略中, 研究者通过更好地模拟真核生物的RNA剪接过程, 设计出人工RNA环化核酶。此环化过程不需要像Group I Intron策略那样加入额外的GTP功能, 可以在仅保留外显子结合序列(exon binding sites, EBS)所识别的内含子结合序列(intron binding site, IBS)的情况下, 极大的缩短E1与E2的长度。进一步, 还可将编码区的一部分序列作为IBS序列, 同时对内含子的EBS序列进行相应突变与改造, 从而可以在保证高环化效率的同时, 降低环化中引入外源序列带来的免疫原性增加的问题。而且, 此策略反应条件温和, 可以以体外转录共环化的形式进行, 大大简化生产工艺。

5 环形RNA的递送

5.1 LNP

脂质纳米颗粒(lipid Nanoparticle, LNP)是目前研究和使用的最广泛的mRNA递送载体, 也可用于环形RNA的递送。LNP配方通常包括可电离脂质、磷脂、胆固醇和PEG脂质四种组分^[75]。带正电荷的阳离子脂质能够和RNA形成复合物并且促进其进入多种细胞。然而, 单独的阳离子脂质能够和细胞内的一些酶比如蛋白激酶C等结合影响其功能, 其在体内体外实验中均表现出较高的细胞毒性。此外, 阳离子脂质也有较高的免疫原性, 静脉注射阳离子脂质体会促进I型和II型干扰素的释放从而刺激免疫反应^[76]。因此, 目前主要使用可电离脂质来构建纳米脂质体递送mRNA。可电离脂质的亲水头部会随pH值改变其电荷, 其在酸性环境带正电荷, 促进与mRNA结合形成阳离子脂质体。当在体内环境时, 其呈现中性, 从而降低毒性和免疫原性, 延长体内存在时间^[77]。随着LNP被细胞吞噬, 在内体环境下重新呈现正电荷从而促进mRNA释放。目前常用的有SM-102, ALC-0315等多种可电离脂质^[75]。磷脂能够促进LNP稳定性以及其和细胞膜与细胞内体膜的融合, 促进LNP被细胞内吞并在细胞内释放RNA。目前LNP配方最常用的磷脂有DSPC等。胆固醇能有效增强LNP稳定性, 并促进LNP和细胞膜的融合。PEG主要是包裹在LNP外形成亲水屏障, 一方面抑制LNP聚集, 一方面通过阻止血液中的蛋白和LNP结合来降低免疫原性, 延长LNP在体内的半衰期^[78]。

5.2 聚合物纳米颗粒

阳离子聚合物构成的纳米颗粒会表现出和阳离子脂质体纳米颗粒类似的特性, 但也一样会表现出高细胞毒性。最近的研究更多关注于生物相容性更好的聚合物纳米颗粒比如PBAE等^[79]。另一种可变电荷聚合物纳米颗粒(charge-altering releasable transporter, CART), 可以利用颗粒内电荷重排以释放mRNA进入细胞, 同样很有应用前景^[80]。

5.3 脂质多聚体(LPP)

LPP(lipopolyplex)纳米递送平台是一种以聚合物包载mRNA为内核、磷脂包裹为外壳的双层结构^[81]。其将目的RNA包裹在磷脂所包被的双层壳中, 以避免

核心结构中的mRNA分子被RNase降解^[82]。作为一种非病毒递送载体, LPP具备聚合物和脂质体的优点, 表现出较好的稳定性、细胞毒性与基因转染效率, 并且其中包裹的mRNA分子会随着聚合物的降解而缓慢释放。例如, 国内斯微生物就试图利用LPP平台优异的树突状细胞靶向性, 以更好地通过抗原递呈激活T细胞的免疫反应, 从而达到理想的免疫治疗效果^[82]。

5.4 无机纳米颗粒

相较于聚合物纳米颗粒, 无机纳米颗粒具备易合成、尺寸可控、高生物相容性与基础性质研究完备等优势。目前, 金纳米颗粒因其优异的安全性与结构稳定性, 已经被广泛用于DNA^[83]与siRNA^[84]递送。

目前, 已经有学者利用高分子修饰的金纳米颗粒^[85]、聚乙烯亚胺修饰的石墨烯量子点^[86]、硒纳米颗粒^[87]尝试进行mRNA的递送。虽然这些无机纳米颗粒展示出优异的mRNA递送能力, 但由于mRNA是通过在纳米颗粒表面进行递送, 导致其装载效率较低。为克服这个问题, 美国威斯康星大学麦迪逊分校的宫绍琴研究组构建可用于mRNA递送的多功能硅纳米粒, 其具有高mRNA包装率、小尺寸、多样性的表面修饰能力、高效的内涵体逃逸和释放特性^[88]。

然而, 无机纳米材料在生物体内的长期非特异性积累可能会导致毒性, 从而阻碍其大规模临床应用, 因此还需要对这种递送策略进行详细的毒理学评估。除此以外, 开发新的可生物降解或可清除的无机纳米材料也是解决这一问题的方向。

最近, 国家纳米科学中心孟幻团队与中国科学院杭州医学研究所刘湘圣团队^[89]合作, 通过体内、体外迭代筛选, 设计可用于体内mRNA递送且可生物降解的有机无机杂合纳米颗粒(阳离子聚合物包被的介孔二氧化硅纳米颗粒(mesoporous silica nanoparticles, MSNP))。在这项最新研究中, 研究团队将目的mRNA与聚乙烯亚胺(PEI)等阳离子聚合物预混, 然后通过静电作用将它们结合到MSNP表面, 所得的颗粒能够在体外和体内都具备非常优异的mRNA转染效率。

5.5 基于蛋白质的类病毒颗粒

基于病毒的递送载体通常使用两种质粒转染细胞, 一种是表达病毒衣壳蛋白的质粒, 其能在细胞中表达病毒衣壳蛋白并自组装, 同时衣壳蛋白融合某种特

定的RNA结合蛋白, 另一种质粒用来转录目标RNA, 该目标RNA上需要有上述RNA结合蛋白的目标结合序列, 依靠该结合序列和病毒衣壳上的RNA结合蛋白(如MS2/MCP系统), 目标RNA可以被装载到病毒中去^[90]。从而可以利用内部带有目的RNA序列的类病毒颗粒实现对目的RNA的递送。在最近的研究中, 康奈尔大学的Samie R Jaffrey研究组^[91]利用此递送策略, 实现对Tornado表达系统产生的环形RNA的细胞特异性递送。但该系统也存在着非特异性包裹的问题, 还需要进行优化研究。

2021年, MIT的张锋研究组^[92]开发一种利用人源蛋白向细胞递送分子的新方法SEND(selective endogenous encapsidation for cellular delivery)。该系统利用人体内形成病毒样颗粒并可结合RNA的天然蛋白质(PEG10)进行递送, 理论上具有更小的免疫源性。这个系统可以通过编程来包装和运输不同的RNA, 为基于RNA的基因治疗提供一个新的内源性递送载体。

5.6 外泌体

外泌体是细胞分泌的、100nm左右的胞外囊泡^[93]。与基于病毒的载体制备方式类似, 在细胞中同样转入两种质粒, 一种质粒用于表达外泌体膜蛋白(比如CD63, 该蛋白需要融合某种RNA结合蛋白), 另一种质粒用于转录含有对应RNA结合蛋白结合序列的目标RNA, 最终通过外泌体膜蛋白结合富集目标RNA, 并通过外泌体分泌到细胞外^[94]。该类型制备方法可以利用病毒以及外泌体的靶向性和生物相容性优势, 但是体内富集方式可能会导致载体内的RNA纯度不如体外制备方法, 且难以准确测定其中的RNA组分。

除作为mRNA药物载体外, 外泌体的表面功能化还可以实现靶向给药^[95]。修饰的外泌体可以精确地将mRNA分子递送到靶细胞或器官^[96]。总的来说, 外泌体具有高度的生物相容性, 具有巨大的临床应用潜力, 为mRNA药物传递开辟新的途径。

5.7 水凝胶

和纳米尺度的递送载体不同, 水凝胶作为一种拥有类似细胞外基质特性和水膨胀特性的亲水高分子聚合物链网络材料, 同样可以作为一种RNA递送载体。其能够装载裸RNA, 也可以装载纳米颗粒包裹的RNA, 同时具有向局部组织缓释RNA的特性。其缓释

特性甚至可以长达数周。目的RNA可以通过被动扩散, 以及随着水凝胶降解和膨胀缓释到临近组织细胞中, 其可以通过调控水凝胶的分子质量、基质浓度、交联密度、孔径分布等参数以及RNA-水凝胶分子偶联方式来调控其缓释RNA的速率。另一方面可以通过调整水凝胶配方, 构建刺激响应型RNA释放水凝胶。例如对应不同的pH值或者通过酶调控以及光调控等方式释放RNA。水凝胶作为RNA递送载体, 目前在肿瘤治疗、骨再生、心脏修复及愈伤等方面都有应用^[97]。

6 环形RNA 疗法的应用

6.1 可翻译环形RNA的应用

鉴于环形RNA能够依靠IRES序列通过非5'帽子依赖途径在细胞内进行翻译, 因此其可以被视作一种特殊的mRNA, 应用于mRNA疗法。作为一种特殊的mRNA, 环形RNA可以用作为mRNA疫苗和mRNA药物应用于多种领域。本文将对其应用场景做一个简要总结, 更详细的描述可参考魏欢欢等人^[98]近期的综述。

针对近几年严重的新冠疫情, 魏文胜研究组^[67]在2022年利用环形RNA表达新冠病毒棘突蛋白的受体结合域, 研发一种基于环形RNA的新冠(SARS-CoV-2)疫苗。研究者发现该环形RNA能在小鼠及恒河猴体内引发有效的中和抗体和基于Th1细胞偏好性的免疫反应, 同时研究表明, 环形RNA相比含有修饰碱基的线性mRNA能更高效和持久的表达抗原。类似的, 有研究者利用环形RNA表达肿瘤抗原以到达比线性mRNA更有效和长久的免疫治疗效果^[99]。

蛋白替代疗法, 顾名思义即是指利用mRNA重新在体内表达缺陷或者丢失的蛋白以治疗疾病。此前这类研究多是使用线性mRNA, 还未见使用环形RNA的表达形式。但是, 目前的研究表明环形RNA拥有比线性RNA更好的稳定性和耐降解能力以及更低的免疫原性, 这使得环形RNA比线性RNA在蛋白表达时间以及药物保存稳定性上更具优势^[100]。同时, 凭借不同IRES序列需要的翻译起始辅助因子的不同, 不同的IRES的使用使环形RNA拥有在不同细胞特异性翻译的可能性。最近, 清华大学谢震研究组^[101]开发一种IRES的工程改造技术PROMITAR(programmable miRNA-responsive IRES translation activation and repression), 实现用环形RNA分子感应多种细胞内源微小

RNA(miRNA)信号, 从而控制IRES元件在特定细胞中的翻译活性, 初步实现环形RNA的选择性翻译。

因此, 本团队可以预见环形RNA在蛋白替代疗法领域将有着非常巨大的应用潜力。通过编码不同功能的蛋白, 可翻译环形RNA可以应用在罕见病、代谢疾病以及癌症等多种领域, 对其应用的详细总结可参考近期的其他综述^[98]。

6.2 非编码环形RNA的应用

由于环形RNA同样也是存在于生物体内的RNA分子, 随着近年来对体内环形RNA分子机制的不断深入了解, 利用内源环形RNA本身功能以达到治疗目的的研究也越来越广泛。例如, 利用内源环形RNA或者人工设计环形RNA竞争性结合miRNA或者蛋白来达到调控基因表达以治疗疾病。

2018年, Liu等人^[102]体外合成内源环形RNA以竞争性结合microRNA-21, 抑制胃癌细胞增值。同年, Jost等人^[103]利用环形RNA竞争性结合microRNA-122(一种能够结合乙肝病毒RNA并增强其稳定性的miRNA), 实现抑制乙肝病毒复制。更进一步的, 在2020年, Lavenniah等人^[104]利用人工设计环形RNA竞争性结合miRNA-132和-212以治疗主动脉缩窄模型小鼠的心脏疾病。几乎同时, Schreiner等人^[105]同样成功利用人工设计富含CA连续序列的环形RNA达到竞争性结合hnRNP蛋白的目的。

研究者还可以利用环形RNA的稳定性优势, 在体内表达荧光探针以达到生物成像及诊断的目的。Samie R Jaffrey研究组^[30]发现, 相对于线性RNA, 基于环形RNA的荧光探针拥有更强更持久的荧光信号。

此外, 凭借更佳稳定性, 环形RNA也同样可以更好地去完成其他的线性RNA的应用, 比如设计反义环形RNA抑制SARS-CoV-2冠状病毒增殖^[106], 或者Guide RNA招募ADAR以完成RNA编辑^[66]。同时, 研究者还发现环形RNA在低免疫原性的同时, 还可以抑制PKR蛋白(一种双链RNA激活的蛋白激酶), 有望后续用于PKR异常表达造成的自身免疫性疾病^[63,107]。

7 总结

经过近30年的技术积累和突破, 以及COVID19的加压催化, 基于环形RNA翻译的疗法目前才有望开展

临床应用. 这也意味着虽然该疗法思路简单直接, 但是从基础研究到临床应用需要多方面的技术积累和优化, 任何部分技术的缺失就可能导致整体疗效不理想. 这其中包括疾病的选择、环形RNA的设计与生产、载体选择与制备以及给药方式的选择等.

首先, 由于基于环形RNA翻译的疗法并不能很精准的控制蛋白体内表达水平, 因此需要选择合适的由于蛋白缺失所导致的疾病, 并且人体对该缺失蛋白的表达量有一定范围的耐受. 其次, 鉴于目前所发展的各种递送方法对不同器官靶向递送能力有较大差别, 所以, 部分器官比如脑部、肾脏、脾脏等可能较难作为靶向递送的靶点, 这些器官的相关疾病的疗法研发

难度也就随之升高. 再次是需要对目标蛋白构建合适的、可高表达的环形RNA序列, 并以恰当的合成与生产策略将其大量纯化生产. 目前来看, 环形RNA凭借更好的稳定性和免疫原性, 更加有利于蛋白替代疗法. 同时, 针对不同的目的环形RNA序列, 对负责翻译启动的IRES序列进一步筛选和优化有望在将来增强环形RNA的翻译效率, 并赋予环形RNA在不同细胞类型内特异性表达的能力. 最后, 需要针对不同的治疗器官选择合适的递送载体和给药方式, 而递送载体的研究进展必然会进一步促进环形RNA疗法的发展. 总体来看, 更高的递送效率、更高的表达效率和更低的免疫原性将会是未来环形RNA技术发展的重点方向.

参考文献

- Higgs P G, Lehman N. The RNA world: molecular cooperation at the origins of life. *Nat Rev Genet*, 2015, 16: 7–17
- Mulligan M J, Lyke K E, Kitchin N, et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*, 2020, 586: 589–593
- Jackson L A, Anderson E J, Roupael N G, et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2—preliminary report. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1920–1931
- Milligan J F, Groebe D R, Witherell G W, et al. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucl Acids Res*, 1987, 15: 8783–8798
- Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, et al. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl) GpppG and 7-methyl (3'-deoxy) GpppG. *RNA*, 2001, 7: 1486–1495
- Kariko K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 2005, 23: 165–175
- Nallagatla S R, Bevilacqua P C. Nucleoside modifications modulate activation of the protein kinase PKR in an RNA structure-specific manner. *RNA*, 2008, 14: 1201–1213
- Lorentzen C L, Haanen J B, Met Ö, et al. Clinical advances and ongoing trials of mRNA vaccines for cancer treatment. *Lancet Oncol*, 2022, 23: e450–e458
- Zangi L, Lui K O, von Gise A, et al. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 898–907
- Nilsen T W, Graveley B R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 2010, 463: 457–463
- Moore M J, Proudfoot N J. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*, 2009, 136: 688–700
- Zhang X O, Dong R, Zhang Y, et al. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res*, 2016, 26: 1277–1287
- Vo J N, Cieslik M, Zhang Y, et al. The landscape of circular RNA in cancer. *Cell*, 2019, 176: 869–881.e13
- Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti N R, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2014, 56: 55–66
- Starke S, Jost I, Rossbach O, et al. Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Rep*, 2015, 10: 103–111
- Jeck W R, Sorrentino J A, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 2013, 19: 141–157
- Zhang X O, Wang H B, Zhang Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 2014, 159: 134–147
- Chen L L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 205–211
- Ebbesen K K, Kjems J, Hansen T B. Circular RNAs: identification, biogenesis and function. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859: 163–168
- Barrett S P, Wang P L, Salzman J. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor. *eLife*, 2015, 4: e07540
- Conn S J, Pillman K A, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*, 2015, 160: 1125–1134

- 22 Kramer M C, Liang D, Tatomer D C, et al. Combinatorial control of *Drosophila* circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins. *Genes Dev*, 2015, 29: 2168–2182
- 23 Liang D, Tatomer D C, Luo Z, et al. The output of protein-coding genes shifts to circular RNAs when the pre-mRNA processing machinery is limiting. *Mol Cell*, 2017, 68: 940–954.e3
- 24 Fei T, Chen Y, Xiao T, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies HNRNPL as a prostate cancer dependency regulating RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E5207–E5215
- 25 Khan M A F, Reckman Y J, Aufiero S, et al. RBM20 regulates circular RNA production from the titin gene. *Circ Res*, 2016, 119: 996–1003
- 26 Errichelli L, Dini Modigliani S, Laneve P, et al. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. *Nat Commun*, 2017, 8: 14741
- 27 Qi Y, Han W, Chen D, et al. Engineering circular RNA regulators to specifically promote circular RNA production. *Theranostics*, 2021, 11: 7322–7336
- 28 Zhang Y, Zhang X O, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 2013, 51: 792–806
- 29 Petkovic S, Müller S. RNA circularization strategies *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 2454–2465
- 30 Litke J L, Jaffrey S R. Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 667–675
- 31 Wang W T, Chen Y Q. Noncoding RNAs regulate protein translation and disease occurrence (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 1527–1545 [王文涛, 陈月琴. 非编码RNA调控蛋白翻译与疾病发生. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1527–1545]
- 32 Chen C Y, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science*, 1995, 268: 415–417
- 33 Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *RNA*, 2015, 21: 172–179
- 34 Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell*, 2017, 66: 22–37.e9
- 35 Pamudurti N R, Bartok O, Jens M, et al. Translation of circRNAs. *Mol Cell*, 2017, 66: 9–21.e7
- 36 Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N^6 -methyladenosine. *Cell Res*, 2017, 27: 626–641
- 37 Fan X, Yang Y, Chen C, et al. Pervasive translation of circular RNAs driven by short IRES-like elements. *Nat Commun*, 2022, 13: 3751
- 38 Guo J U, Agarwal V, Guo H, et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol*, 2014, 15: 409
- 39 Chen C K, Cheng R, Demeter J, et al. Structured elements drive extensive circular RNA translation. *Mol Cell*, 2021, 81: 4300–4318.e13
- 40 Komar A A, Hatzoglou M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem*, 2005, 280: 23425–23428
- 41 Merrick W C. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene*, 2004, 332: 1–11
- 42 Bresson S, Shchepachev V, Spanos C, et al. Stress-induced translation inhibition through rapid displacement of scanning initiation factors. *Mol Cell*, 2020, 80: 470–484.e8
- 43 Tang C, Xie Y, Yu T, et al. m^6A -dependent biogenesis of circular RNAs in male germ cells. *Cell Res*, 2020, 30: 211–228
- 44 Li Y, Chen B, Zhao J, et al. HNRNPL circularizes ARHGAP35 to produce an oncogenic protein. *Adv Sci*, 2021, 8: 2001701
- 45 Kesner J S, Chen Z, Shi P, et al. Noncoding translation mitigation. *Nature*, 2023, 617: 395–402
- 46 Sokolova N I, Ashirbekova D T, Dolinnaya N G, et al. Chemical reactions within DNA duplexes Cyanogen bromide as an effective oligodeoxyribonucleotide coupling agent. *FEBS Lett*, 1988, 232: 153–155
- 47 Dolinnaya N G, Blumenfeld M, Merenkova I N, et al. Oligonucleotide circularization by template-directed chemical ligation. *Nucl Acids Res*, 1993, 21: 5403–5407
- 48 Wang S, Kool E T. Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 2326–2333
- 49 Micura R. Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solid-phase synthesis. *Chem Eur J*, 1999, 5: 2077–2082
- 50 Moore M J, Sharp P A. Site-specific modification of pre-mRNA: the 2'-hydroxyl groups at the splice sites. *Science*, 1992, 256: 992–997
- 51 Miller E S, Kutter E, Mosig G, et al. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 86–156
- 52 Lohman G J S, Tabor S, Nichols N M. DNA ligases. *Curr Protoc Mol Biol*, 2011, 94
- 53 Beadudry D, Perreault J P. An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 3064–3066
- 54 Silber R, Malathi V G, Hurwitz J. Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 3009–3013

- 55 England T E, Uhlenbeck O C. Enzymic oligoribonucleotide synthesis with T4 RNA ligase. [Biochemistry](#), 1978, 17: 2069–2076
- 56 Romaniuk E, McLaughlin L W, Romaniuk E, Romaniuk P J, et al. The effect of acceptor oligoribonucleotide sequence on the T4 RNA ligase reaction. [Eur J Biochem](#), 1982, 125: 639–643
- 57 Ho C K, Shuman S. Bacteriophage T4 RNA ligase 2 (gp24.1) exemplifies a family of RNA ligases found in all phylogenetic domains. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2002, 99: 12709–12714
- 58 Nandakumar J, Ho C K, Lima C D, et al. RNA substrate specificity and structure-guided mutational analysis of bacteriophage T4 RNA ligase 2. [J Biol Chem](#), 2004, 279: 31337–31347
- 59 Petkovic S, Muller S. RNA self-processing: formation of cyclic species and concatemers from a small engineered RNA. [FEBS Lett](#), 2013, 587: 2435–2440
- 60 Ho C K, Wang L K, Lima C D, et al. Structure and mechanism of RNA ligase. [Structure](#), 2004, 12: 327–339
- 61 Rezaian MA. Synthesis of infectious viroids and other circular RNAs. *Curr Issues Mol Biol.* 1999, 1: 13–20
- 62 Schindewolf C, Braun S, Domdey H. *In vitro* generation of a circular exon from a linear pre-mRNA transcript. [Nucleic Acids Res](#), 1996, 24: 1260–1266
- 63 Liu C X, Guo S K, Nan F, et al. RNA circles with minimized immunogenicity as potent PKR inhibitors. [Mol Cell](#), 2022, 82: 420–434.e6
- 64 Puttaraju M, Been M. Group I permuted intron-exon (PIE) sequences self-splice to produce circular exons. [Nucl Acids Res](#), 1992, 20: 5357–5364
- 65 Wesselhoeft R A, Kowalski P S, Anderson D G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. [Nat Commun](#), 2018, 9: 2629
- 66 Yi Z, Qu L, Tang H, et al. Engineered circular ADAR-recruiting RNAs increase the efficiency and fidelity of RNA editing in vitro and in vivo. [Nat Biotechnol](#), 2022, 40: 946–955
- 67 Qu L, Yi Z, Shen Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants. [Cell](#), 2022, 185: 1728–1744.e16
- 68 Qiu Z, Zhao Y, Hou Q, et al. Clean-PIE: a novel strategy for efficiently constructing precise circRNA with thoroughly minimized immunogenicity to direct potent and durable protein expression. *bioRxiv.* 2022, 2022: 496777
- 69 Jarrell K A. Inverse splicing of a group II intron. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1993, 90: 8624–8627
- 70 Mikheeva S. Use of an engineered ribozyme to produce a circular human exon. [Nucleic Acids Res](#), 1997, 25: 5085–5094
- 71 Petkovic S, Muller S. Synthesis and engineering of circular RNAs. *Methods Mol Biol.* 2018, 1724: 167–180
- 72 Muller S, Appel B. *In vitro* circularization of RNA. [RNA Biol](#), 2017, 14: 1018–1027
- 73 Obi P, Chen Y G. The design and synthesis of circular RNAs. [Methods](#), 2021, 196: 85–103
- 74 Chen C, Wei H, Zhang K, et al. A flexible, efficient, and scalable platform to produce circular RNAs as new therapeutics. *bioRxiv.* 2022, 2022: 494115
- 75 Jeong M, Lee Y, Park J, et al. Lipid nanoparticles (LNPs) for *in vivo* RNA delivery and their breakthrough technology for future applications. [Adv Drug Deliver Rev](#), 2023, 200: 114990
- 76 Ma Z, Li J, He F, et al. Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. [Biochem Biophys Res Commun](#), 2005, 330: 755–759
- 77 Semple S C, Klimuk S K, Harasym T O, et al. Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures. [Biochim Biophys Acta](#), 2001, 1510: 152–166
- 78 Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. [Nat Rev Mater](#), 2021, 6: 1078–1094
- 79 Neshat S Y, Chan C H R, Harris J, et al. Polymeric nanoparticle gel for intracellular mRNA delivery and immunological reprogramming of tumors. [Biomaterials](#), 2023, 300: 122185
- 80 Benner N L, McClellan R L, Turlington C R, et al. Oligo(serine ester) charge-altering releasable transporters: organocatalytic ring-opening polymerization and their use for *in vitro* and *in vivo* mRNA delivery. [J Am Chem Soc](#), 2019, 141: 8416–8421
- 81 Chen W, Li H, Liu Z, et al. Lipopolyplex for therapeutic gene delivery and its application for the treatment of parkinson's disease. [Front Aging Neurosci](#), 2016, 8: 68
- 82 Persano S, Guevara M L, Li Z, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination. [Biomaterials](#), 2017, 125: 81–89
- 83 DeLong R, Dr. Adam Wanekaya R, Mr. Chris Reynolds R, et al. Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of

- therapeutic DNA, RNA, and other biological macromolecules. *NSA*, 2010, 3: 53–63
- 84 Lytton-Jean A K R, Langer R, Anderson D G. Five years of siRNA delivery: spotlight on gold nanoparticles. *Small*, 2011, 7: 1932–1937
- 85 Mbatha L S, Maiyo F, Daniels A, et al. Dendrimer-coated gold nanoparticles for efficient folate-targeted mRNA delivery *in vitro*. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 900
- 86 Liu Y, Zhao C, Sabirsh A, et al. A novel graphene quantum dot-based mRNA delivery platform. *ChemistryOpen*, 2021, 10: 666–671
- 87 Maiyo F, Singh S. Folate-targeted mRNA delivery using chitosan-functionalized selenium nanoparticles: potential in cancer immunotherapy. *Pharmaceutics*, 2019, 12: 164
- 88 Wang Y, Shahi P K, Wang X, et al. *In vivo* targeted delivery of nucleic acids and CRISPR genome editors enabled by GSH-responsive silica nanoparticles. *J Control Release*, 2021, 336: 296–309
- 89 Dong S, Feng Z, Ma R, et al. Engineered design of a mesoporous silica nanoparticle-based nanocarrier for efficient mRNA delivery *in vivo*. *Nano Lett*, 2023, 23: 2137–2147
- 90 Horns F, Martinez J A, Fan C, et al. Engineering RNA export for measurement and manipulation of living cells. *Cell*, 2023, 186: 3642–3658.e32
- 91 Unti M J, Jaffrey S R. Highly efficient cellular expression of circular mRNA enables prolonged protein expression. *Cell Chem Biol*, 2023
- 92 Segel M, Lash B, Song J, et al. Mammalian retrovirus-like protein PEG10 packages its own mRNA and can be pseudotyped for mRNA delivery. *Science*, 2021, 373: 882–889
- 93 Liao S J, Yan Z Q, Zhao W L, et al. Engineered extracellular vesicles and cancer therapy (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 367–379 [廖舒捷, 颜梓淇, 赵文龙, 等. 工程化细胞外囊泡与癌症治疗. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 367–379]
- 94 O’Grady T, Njock M S, Lion M, et al. Sorting and packaging of RNA into extracellular vesicles shape intracellular transcript levels. *BMC Biol*, 2022, 20: 72
- 95 Cheng Q, Shi X, Han M, et al. Reprogramming exosomes as nanoscale controllers of cellular immunity. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 16413–16417
- 96 Limoni S K, Moghadam M F, Moazzeni S M, et al. Engineered exosomes for targeted transfer of siRNA to HER2 positive breast cancer cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 187: 352–364
- 97 Zhong R, Talebian S, Mendes B B, et al. Hydrogels for RNA delivery. *Nat Mater*, 2023, 22: 818–831
- 98 Wei H H, Zheng L, Wang Z. mRNA therapeutics: new vaccination and beyond. *Fundamental Res*, 2023, 3: 749–759
- 99 Li H, Peng K, Yang K, et al. Circular RNA cancer vaccines drive immunity in hard-to-treat malignancies. *Theranostics*, 2022, 12: 6422–6436
- 100 Wesselhoeft R A, Kowalski P S, Parker-Hale F C, et al. RNA circularization diminishes immunogenicity and can extend translation duration *in vivo*. *Mol Cell*, 2019, 74: 508–520.e4
- 101 Ning H, Liu G, Li L, et al. Rational design of microRNA-responsive switch for programmable translational control in mammalian cells. *Nat Commun*, 2023, 14: 7193
- 102 Liu X, Abraham J M, Cheng Y, et al. Synthetic circular RNA functions as a miR-21 sponge to suppress gastric carcinoma cell proliferation. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13: 312–321
- 103 Jost I, Shalamova L A, Gerresheim G K, et al. Functional sequestration of microRNA-122 from Hepatitis C Virus by circular RNA sponges. *RNA Biol*, 2018, 15: 1032–1039
- 104 Lavenniah A, Luu T D A, Li Y P, et al. Engineered circular RNA sponges act as miRNA inhibitors to attenuate pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Mol Ther*, 2020, 28: 1506–1517
- 105 Schreiner S, Didio A, Hung L H, et al. Design and application of circular RNAs with protein-sponge function. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 12326–12335
- 106 Pfafenrot C, Schneider T, Müller C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 coronavirus proliferation by designer antisense-circRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 12502–12516
- 107 Yang J E, Xie C, Li L Q, et al. Multidimensional regulatory networks of noncoding RNAs and hepatocellular carcinoma. *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 1626 [杨金娥, 谢忱, 黎兰奇, 等. 非编码RNA多维调控网络与肝细胞癌. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1626–1642]

Circular RNA translation and its application in drug development

MAO MiaoWei^{1,3}, ZHANG ZheYu³, WEI YanHuan³ & WANG ZeFeng^{2,3}

1 Shanghai Institute of Immunity and Infection, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2 School of Life Sciences, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China;

3 Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

mRNA vaccine has played an important role in the COVID-19 epidemic, which marks the beginning of mRNA therapy. In the post-pandemic era, the application of mRNA therapy continues to expand. With a higher stability and lower innate immunogenicity, the circular RNAs (circRNAs) are expected to provide a larger therapeutic window than mRNA. Therefore, it has potential to serve as a new platform technology for the next generation of mRNA therapy. Meanwhile, there are many technical features and challenges in the target selection, sequence design, production and delivery of circRNA drugs. This review briefly summarizes and discusses various aspects of circRNAs as potential therapeutic, including the synthesis, translational regulation, delivery and application. We aim to provide brief introduction to readers who are concerned about the application of circular RNA technology. We also discussed the future of circular RNA technology, which will be improved towards a higher expression efficiency, higher delivery efficiency and lower innate immunogenicity.

mRNA therapy, circular RNA, non-canonical translation, RNA delivery

doi: [10.1360/SSV-2023-0315](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0315)