

基于环状 RNA 开发核酸药物研究进展

郭士琳^{1,2}, 李常昆^{1,2}, 吕得场^{1,2}, 陈骐^{1,2*}

1 福建师范大学 南方生物医学研究中心, 福建 福州 350117

2 福建省天然免疫生物学重点实验室, 福建 福州 350117

郭士琳, 李常昆, 吕得场, 陈骐. 基于环状 RNA 开发核酸药物研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1421-1430.
GUO Shilin, LI Changkun, LV Deyang, CHEN Qi. Research advances in nucleic acid drugs developed based on circular RNAs[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1421-1430.

摘要: 核酸药物是继化学药物和蛋白质药物之后的第三代药物, 其中 mRNA 疫苗在抗击新型冠状病毒中发挥了重要作用。mRNA 疫苗因其开发周期短, 制备工艺成熟, 在应对病毒变异、支持全球供应上具有显著优势。相比 mRNA, 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类具有更稳定的结构、更长的半衰期、更弱免疫原性等优点的分子, 并且已被证实可以高效表达蛋白产物, 由此可见环状 RNA 药物的开发前景更为广阔。虽然环状 RNA 的生物学功能有大量研究, 但基于环状 RNA 开发核酸药物的研究还很少。本文概述了环状 RNA 的基本信息, 总结了环状 RNA 的合成路径及作用机制, 并讨论了该领域的发展方向, 希望为环状 RNA 药物的研发提供一些启示和帮助。

关键词: 环状 RNA; 核酸药物; 内部核糖体进入位点; 脂质纳米颗粒; 外泌体

Research advances in nucleic acid drugs developed based on circular RNAs

GUO Shilin^{1,2}, LI Changkun^{1,2}, LV Deyang^{1,2}, CHEN Qi^{1,2*}

1 Biomedical Research Center of South China, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, Fujian, China

2 Fujian Key Laboratory of Innate Immune Biology, Fuzhou 350117, Fujian, China

Abstract: The development and clinical application of nucleic acid drugs has been a trendy field. One of the notable examples is mRNA vaccines, which have been used in the fighting against SARS-CoV-2. With short development cycles and mature preparation processes, mRNA vaccines demonstrate advantages in the global supply and in response to virus mutations. Circular RNAs

资助项目: 国家自然科学基金(U22A20326)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U22A20326).

*Corresponding author. E-mail: chenqi@fjnu.edu.cn

Received: 2023-11-28; Accepted: 2024-02-12; Published online: 2024-02-27

(circRNAs) are a group of nucleic acid molecules with more stable structure, longer half-life, and weaker immunogenicity than mRNAs. Studies have proven that circRNAs can efficiently express protein products, indicating their potential in drug development. Despite extensive studies on the biogenesis and biological functions of circRNAs, there is limited research on developing nucleic acid drugs based on circRNAs. This article provides an overview of circRNAs, including their basic information, synthesis routes, and mechanisms, and discusses the future development directions of this field, hoping to provide inspiration for the research and development of drugs based on circRNAs.

Keywords: circular RNA; nucleic acid drugs; internal ribosome entry site; lipid nanoparticle; exosomes

环状 RNA (circular RNA, circRNA)是在转录过程中或转录后通过反向剪接形成的一类共价闭合的单链 RNA, 广泛存在于多种生物体中, 具有多种生物学功能, 并与多种疾病的发生发展有关。环状 RNA 最早发现于植物类病毒中, 是一种具有高热稳定性、协同性和自互补性的天然棒状结构大分子^[1]。1979 年, 有学者首次通过电子显微镜观察到真核细胞中有环状 RNA 存在^[2]。此后, 多种环状 RNA 转录本相继在人源细胞、小鼠细胞和果蝇细胞中被发现^[3-5]。随着高通量测序技术的迅猛发展, Salzman 等发现环状 RNA 在真核细胞中普遍存在并且进化保守^[6]。2013 年, *Nature* 杂志重磅发文, 揭示了环状 RNA 在生物体内重要的调节功能^[7-8], 环状 RNA 的相关研究随之引起了广泛关注。环状 RNA 虽然缺乏真核生物翻译所需要的帽子结构, 但是当添加内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 序列或者使用 N6-甲基腺嘌呤修饰核苷酸合成的环状 RNA 也具有编码与表达蛋白的能力^[9-10]。随着体外环化技术的发展, 比 mRNA 多方面更具优势的环状 RNA 已成为核酸药物领域的新秀。

1 环状 RNA 合成工艺

环状 RNA 在体内合成的方式主要是依赖

Alu 反向互补序列和 RNA 结合蛋白的反向剪接作用^[11-13]。环状 RNA 的体外合成是通过体外转录获得线性 RNA 前体, 随后通过多种方法使得 RNA 环化。目前 RNA 环化的方式主要有化学合成法、酶促连接法以及借助内含子与外显子重排 (permuted intron-exon, PIE) 策略等, 每种方法各有优劣, 示意图见图 1。

化学法合成环状 RNA 是指利用溴化氰或 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC] 在体外合成环状 RNA, 但因其连接效率低、容载片段短、毒性较大等缺点, 已基本不采取这种策略^[14]。

酶促连接是借助 T4 DNA/RNA 连接酶将线性 RNA 游离的两端连接起来。因为 T4 DNA/RNA 连接酶只能识别线性 RNA 分子 5' 端的单磷酸基团^[15-17], 在体外转录产生线性 RNA 后, 还需使用焦磷酸酶或限制性内切酶处理后才可连接。在不使用夹板序列辅助连接时, 会出现 RNA 分子间连接的副产物, 而使用夹板序列辅助连接时, 在连接位点处往往会出现碱基残留, 其连接效率也会受夹板序列的变化而改变^[16]。T4 连接酶环化策略因为相对低效的连接效率和比较昂贵的成本, 很难实现工业化制备。

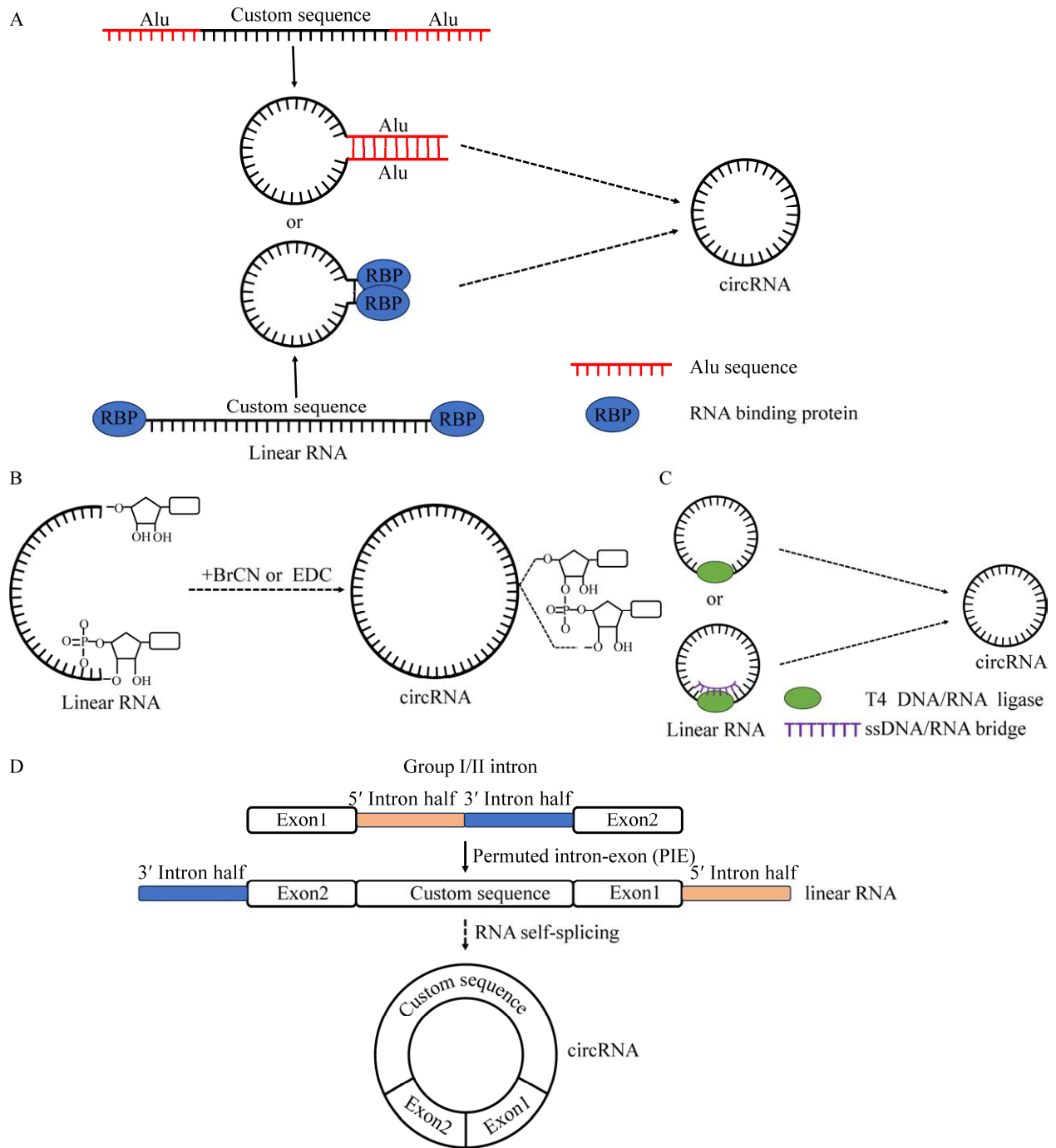


图 1 4 种 RNA 环化方式 A: 体内合成法. B: 化学法. C: 酶促连接法. D: PIE 法

Figure 1 Synthesis of circRNA by four major ways. A: *In vivo* RNA circularization. B: *In vitro* RNA circularization by chemical strategies. C: Circularization by T4 DNA/RNA ligases. D: Circularization by PIE.

PIE 策略是基于内含子的自剪接作用, 重排 RNA 序列使其自剪接环化, 又可细分为基于 I 类

内含子的 PIE 策略和基于 II 类内含子的 PIE 策略。此方案不需要在反应体系中添加蛋白酶, 但

是需要提供鸟苷酸为I类内含子的自剪接反应提供底物,以及较高温度的反应体系^[18-19]。遗憾的是此种方法合成的环状RNA也会存在几十甚至上百个碱基的外显子序列残留,有研究表明残留的外源序列可能会引起生物体内的免疫反应^[20]。2022年,苏州科锐迈德生物医药科技有限公司在基于I类内含子的PIE策略的基础上研发了Clean-PIE成环策略,该策略的巧妙之处是通过筛选蛋白编码区或者IRES序列找到最优的成环位点,实现了无外源序列引入的环化方案,而且环化效率也更高^[21]。而基于II类内含子的PIE策略中经过筛选优化后的II类内含子可以使RNA高效自剪接成环且无外显子序列残留,而且该反应无需额外提供鸟苷酸和高温亦可进行^[22-23],这种方案简化了环状RNA的成环反应过程以及原料使用,降低了工业成本,是理想的工业级别的环状RNA体外合成方案。

2 环状RNA纯化方案

体外环化反应大多需要添加金属离子及升高温度来提升反应效率,这也会导致反应液中的RNA骨架发生随机的非特异性切割^[24],从而产生副产物开环RNA和弥散产物。目前大规模纯化环状RNA的方式多采用蛋白酶处理与高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC)联用的方法。RNase R来源于大肠杆菌RNR超家族,可以从3'端到5'端方向切割降解RNA,能够降解几乎所有的线性RNA分子,但不易降解环状RNA、套索结构或3'末端少于7 nt的双链RNA分子^[25]。磷酸酶可以消除体外转录后线性RNA分子5'端的焦磷酸基团。使用RNase R和磷酸酶处理环化反应后的RNA混合物,能有效除去混合物中的线性RNA,再使用高效液相色谱仪辅以排阻色谱柱可以将RNA碎片、开环RNA、双链RNA、残

留蛋白等杂质和副产物与环状RNA分离^[19,26-27],获得的环状RNA,可通过冷冻干燥或沉淀法浓缩保存。

3 环状RNA鉴定方式

环状RNA与其线性形式相对分子量、碱基分布等基本一致,仅空间结构有所差别。环状RNA的形成主要是通过使用发散引物(divergent primers)进行RT-PCR反应后使用Sanger测序加以鉴定^[7,19];而RNase R和RNase H的消化反应,可以用来评估形成的环状RNA的纯度^[19]。通过分析Urea PAGE凝胶电泳中线性RNA带和环状RNA带的灰度值,可以基本确定该反应的连接效率^[28]。有研究表明, ThermoFisher Scientific公司推出的E-Gel EX电泳系统中,环状RNA的迁移速率低于前体RNA以及开环RNA,但是迁移速率也会受上样缓冲液、染料、电压等因素影响,因此还需要联合Northern blotting、RNase酶切反应和高效液相色谱分析做确认分析^[29]。

4 环状RNA可表达蛋白

在真核生物中,mRNA 5'端甲基化的帽子结构被认为是翻译起始必要的元件^[30],环状RNA与mRNA相比,虽然缺少翻译所需要的帽子结构,但在1995年有学者发现通过添加某些病毒的IRES序列可以介导环状RNA翻译蛋白^[9]。在2017年,另有学者发现使用N6-甲基腺嘌呤修饰核苷酸的环状RNA也可以结合核糖体从而驱动环状RNA的翻译^[10]。但是有学者发现使用N1-甲基假尿苷替换尿嘧啶会抑制I类内含子的剪切活性,阻断环化反应的发生,也会使环状RNA丧失蛋白表达的能力^[31]。2018年Wesselhoeft等^[19]在体外合成的环状RNA可以在真核细胞中高效表达蛋白,且表达量和表达周期均优于相同序列的线性RNA。2022年,北京大学的魏文胜教授

团队首次研发出针对新冠肺炎病毒的环状 RNA 疫苗, 该环状 RNA 在动物体内表达新冠抗原可以有效引起细胞免疫及体液免疫, 从而为宿主提供广谱保护; 且保存在 4、25、37 °C 的环境下, 环状 RNA 疫苗表达抗原蛋白的能力均优于同类 mRNA 疫苗^[26], 这也进一步表明了环状 RNA 的稳定性要优于线性 RNA, 基于环状 RNA 开发的疫苗相比 mRNA 疫苗在运输费用和储藏费用上都存在着极大优势。同年, 斯坦福大学的 Chen 等^[32]通过优化环状 RNA 的拓扑结构、非编码区、内部核糖体进入位点序列和核酸适配体等, 极大提高了环状 RNA 在真核细胞中表达蛋白的效率, 为环状 RNA 核酸药物替代蛋白药物提供了可能。

5 生物信息学的作用

稳定的二级结构会提升 RNA 分子在胞质中的稳定性^[15], 与 mRNA 相似, 环状 RNA 的碱基序列和二级结构也会影响编码蛋白的能力, 因此可以通过优化 RNA 序列来增强环状 RNA 的稳定性、成环效率与表达蛋白的效率。2020 年, 百度团队针对 mRNA 折叠稳定性和密码子两个方面, 对 mRNA 序列最小自由能(minimum free energy, MFE) 和 密码子 适应 指数 (codon adaptation index, CAI) 进行优化, 仅需几分钟就可以预测到既稳定又能够高效翻译的 mRNA 序列^[33]。2023 年 7 月, 中国药科大学张亮教授和 Coderna.AI 创始人黄亮教授在“LinearDesign”的基础上, 进一步推出了针对环状 RNA 结构预测与序列设计算法平台“circDesign”, 该算法除了对 MFE 和 CAI 进行优化外, 还评估了开放阅读框对 IRES 折叠的影响。动物实验表明, 基于该算法设计的两款环状 RNA 疫苗在小鼠体内的稳定性和翻译效率均有提升^[34]。

IRES 序列是环状 RNA 翻译蛋白质的关键

调节元件, 此前研究的 IRES 序列多是从病毒基因组中发掘^[9,32]。2023 年, 浙江大学智能创新药物研究院周展教授团队研发了一个专门用于预测环状 RNA 的 IRES 序列工具“DeepCIP”^[35], 这将更好地帮助我们研究环状 RNA 的编码潜力以及提升环状 RNA 药物的设计能力。这些生物信息学软件和工具对环状 RNA 核酸药物开发都起到重要的推动作用, 对挖掘药物潜力、节约药物研发时间、降低开发成本、提高药物开发成功率等都有重要意义。

6 环状 RNA 的安全性

环状 RNA 安全性一直存在着争议。2017 年, Chen 等^[36]最早报道使用 I 类内含子环化, RNase R 和磷酸酶纯化的环状 RNA 会引发强烈的天然免疫反应。2019 年, Wesselhoeft 等^[36]通过 RNase R 处理、磷酸酶处理及 HPLC 纯化得到的同样是基于 I 类内含子体外合成环状 RNA 却不会触发机体产生天然免疫反应。同年, Chen 等^[37]又发文称外源的环状 RNA 进入哺乳动物体内会引发天然免疫反应, 使用 N6-甲基腺嘌呤修饰核苷酸会降低环状 RNA 的免疫原性。2022 年, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心的陈玲玲教授团队报道通过 I 类内含子自我剪接产生的环状 RNA 因其引入外源序列或产生双链 RNA 结构具有免疫原性, 但是通过 T4 连接酶产生的环状 RNA 不具有免疫原性^[20]。另外, 体外转录产物通常包含部分不完整转录物及双链 RNA。当双链 RNA 进入细胞时, 受体细胞会将其感知为入侵病毒而引起细胞因子风暴, 这也是环状 RNA 引起免疫原性的另一重要原因。对此, Moderna 公司研究团队设计开发了一种新型 T7 RNA 聚合酶, 相比野生型 T7 RNA 聚合酶, 突变体可以简化体外转录的生产过程, 在不降低产量的情况下, 显著减少免疫刺激性副产物双链 RNA

的产生,进一步降低了环状 RNA 药物激发免疫的可能^[38]。

此外,2022年,苏州大学支巧明团队发现由内源基因衍生的环状 RNA 与 miRNA 结合后会异常激活下游通路而导致炎症加重,并且可能引起癌症发生^[39]。无独有偶,2023年6月,澳大利亚弗林德斯大学的 Qadir 等^[40]发现部分内源环状 RNA 可能会与染色体结合形成 circR-loops 结构导致转录暂停、染色质易位和 DNA 修复异常,从而参与癌症的发生。因此,环状 RNA 的临床应用可能存在安全风险。

7 环状 RNA 药物的递送

递送系统是保证核酸药物有效性和安全性的关键,其在保护 RNA 结构、增强靶向能力、热稳定性和减少不良反应等方面起到重要作用。最早各种病毒载体被应用于在生物体内递送核酸药物,但因其潜在的生物安全问题且难以大规模制备等因素,现已不再是核酸药物体内递送的首选^[41]。相比之下,类病毒载体因其毒性低、免疫反应低、载体容量大、材料来源广泛、易于大量制备且所携带的基因不整合至宿主细胞基因组等优势在递送领域受到强烈关注^[42-43]。在目前进入临床阶段的药物管线中,脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)是核酸药物最常应用的递送包裹材料。脂质纳米颗粒对大多数细胞几乎没有毒性,但在 LNP 配方中使用聚乙二醇可能导致过敏反应^[44-45]。另外临床研究表明 LNP 具有肝外组织靶向传递的特异性^[46-47],尽管有学者已研发出能够靶向其他组织的新型 LNP^[48-49],依然迫切需要能够将环状 RNA 靶向递送且无毒副作用的新型载体。

在此背景下,细胞来源的囊泡结构,如外泌体(exosomes),因其良好的生物相容性、细胞特异性和跨越生理屏障功能,在核酸药物递送领域

受到越来越多的关注。近年,东南大学姚红红教授团队发现从外泌体中分离得到的 EV-circSCMH1 能够有效促进缺血性脑卒中模型小鼠与恒河猴脑血管修复^[50-51]。虽然外泌体目前还不能大规模应用于体外转录环状 RNA 的递送,但其在递送领域仍有巨大潜力。

8 环状 RNA 药物的应用现状和未来趋势

环状 RNA 相对于线性 RNA 的显著稳定性和低免疫原性,其翻译蛋白质和提供调节功能的能力使这种分子具有巨大的潜在应用价值。2018年,Wesselhoeft 等^[19]通过优化 PIE 系统和筛选 IRES 序列,实现了环状 RNA 在哺乳动物细胞内高效稳定表达蛋白质。该文的通讯作者 Anderson 教授也基于该项技术创立了世界首家利用环状 RNA 开发新疗法的公司 Orna Therapeutics,并在第 25 届美国基因与细胞治疗学会年会上公布了其已经成功构建了能够编码杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)所缺乏的肌营养不良蛋白的长达 12 000 nt 的超长环状 RNA 及可以在体内编码抗原嵌合受体的环状 RNA,为实现生物体内原位 CAR-T 细胞疗法提供了可能性。2022年,北京大学魏文胜团队制备得到的环状 RNA 可以表达针对 SARS-CoV-2 的中和抗体并可以在小鼠和恒河猴中引发特异性免疫反应^[26]。2022年,清华大学林欣和喻国灿团队设计了编码肿瘤抗原的环状 RNA 疫苗,在动物模型中有优秀的抗肿瘤疗效^[52]。同年,汉诺威医学院 Lu 等^[53]发文称人工制备的环状 RNA 模拟物 Circ-INSR 可预防和逆转阿霉素介导的心肌细胞死亡,并改善心脏功能。

环状 RNA 作为一种新兴生物学分子,在核酸药物领域已经崭露头角,除了直接发挥环状 RNA 的调节作用,还可长效表达蛋白,替代蛋

白药物,并且在 RNA 疫苗、体内原位 CAR-T 细胞疗法等领域也有建树。体外合成环状 RNA 技术将成为科研与工业领域的热门,目前国内外已建立了 Orna Therapeutics、Chimerna Therapeutics、Laronde、Circio、Circode (环码生物)、Therorna (圆因生物)、吉赛生物、科锐迈德、耀海生物等程序化环状 RNA 药物研发平台。随着研发模式和工程体系的完善,待解决安全性及靶向递送的难题后,环状 RNA 会在核酸药物领域发挥更大作用。

9 讨论与展望

核酸药物因其开发周期短、药物成本低、药效显著成为临床用药和新药研发的热点。其中,环状 RNA 作为一类携带遗传信息的生物大分子,既可以发挥其内在功能调控转录与基因表达,也可以通过表达蛋白来治疗因某些蛋白质功能丧失而引起的疾病。环状 RNA 的高稳定性、低免疫原性、便于大规模合成和纯化、不易在细胞中引起基因突变等优点,使其具有巨大的医学应用潜力。与 mRNA 药物相比,环状 RNA 药物有着诸多优势:一方面,环状 RNA 是共价闭合的环状结构,没有游离的末端,因此对 RNA 外切酶的耐受程度更高,使其稳定性更高,其半衰

期及蛋白表达周期也更长,一次给药即可发挥长效作用;另一方面,体外合成环状 RNA 不需要加帽酶、加尾及使用假尿苷修饰即可表达蛋白且免疫原性较低,其药物成本也相对低廉,环状 RNA 与 mRNA 药物的对比情况见表 1。近年来,随着研究的深入,环状 RNA 也暴露出一些问题:(1) 部分内源环状 RNA 因含有与基因组 DNA 高度互补的序列,会与染色体结合导致 DNA 双链打开,单链 DNA 更易发生断裂。基因组 DNA 断裂后在环状 RNA 的干扰下会产生错误修复,导致产生致癌基因及染色体易位的情况。体外构建环状 RNA 药物也应充分考虑该潜在风险。(2) 环状 RNA 由于其独特的空间结构,并非所有蛋白序列都可以很好地在细胞中得到表达。为适应蛋白翻译需要,需要对其 IRES 序列进行高通量筛选,导致药物开发难度增加。(3) 在合成环状 RNA 的过程中,机械应力和金属离子可能导致 RNA 环状结构开环,降低了目的产物得率,增加了纯化难度及引发免疫的可能性。(4) 目前大规模纯化环状 RNA 主要是通过液相色谱层析技术,在规模和纯度上具有一定的局限性。(5) 目前国际上关于环状 RNA 还没有统一的质量标准,主要参考 mRNA 药物的标准进行评估,不利于相关药物研发。(6) 环状 RNA 的递送主要

表 1 环状 RNA 药物与 mRNA 药物对比表

Table 1 Comparison between circRNA and mRNA drugs

Item	circRNA	mRNA	References
Preparation	IVT, circularization	IVT, cap and poly(A) tail design	[20]
Purification	RNase R digestion, SEC-HPLC, IP-RP-HPLC	Affinity purification (oligo-dT resin), ion exchange chromatography	[26,54]
Capping	Not required	Required	[26,55]
Pseudouridine	Not required	Required	[26,55]
Codon optimizations	Required	Required	[33]
Half-life	108-144 h	36-48 h	[19,26,31]
Storage	RNase free, non-cryopreservation or fewer freezing condition	under RNase free, ultra-cold condition	[26]
Delivery	LNP, exosomes	LNP, exosomes	[42,51]

仍依托于 LNP, 具有一定的局限性, 而细胞外囊泡等新型递送载体仍需深入研究。

综上所述, 环状 RNA 作为一种新型的生物分子, 具有成为新一代核酸药物的潜力, 但仍旧有许多挑战需要解决。继续深入研究, 对于加快环状 RNA 的应用具有重要作用。

REFERENCES

- [1] SANGER HL, KLOTZ G, RIESNER D, GROSS HJ, KLEINSCHMIDT AK. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1976, 73(11): 3852-3856.
- [2] HSU MT, COCA-PRADOS M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells[J]. Nature, 1979, 280: 339-340.
- [3] NIGRO JM, CHO KR, FEARON ER, KERN SE, RUPPERT JM, OLINER JD, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Scrambled exons[J]. Cell, 1991, 64(3): 607-613.
- [4] CAPEL B, SWAIN A, NICOLIS S, HACKER A, WALTER M, KOOPMAN P, GOODFELLOW P, LOVELL-BADGE R. Circular transcripts of the testis-determining gene *Sry* in adult mouse testis[J]. Cell, 1993, 73(5): 1019-1030.
- [5] KOZAK M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs[J]. Nucleic Acids Research, 1987, 15(20): 8125-8148.
- [6] SALZMAN J, GAWAD C, WANG PL, LACAYO N, BROWN PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30733.
- [7] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, TORTI F, KRUEGER J, RYBAK A, MAIER L, MACKOWIAK SD, GREGERSEN LH, MUNSCHAUER M, LOEWER A, ZIEBOLD U, LANDTHALER M, KOCKS C, Le NOBLE F, RAJEWSKY N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature, 2013, 495: 333-338.
- [8] HANSEN TB, JENSEN TI, CLAUSEN BH, BRAMSEN JB, FINSEN B, DAMGAARD CK, KJEMS J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495: 384-388.
- [9] CHEN CY, SARNOW P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs[J]. Science, 1995, 268(5209): 415-417.
- [10] YANG Y, FAN XJ, MAO MW, SONG XW, WU P, ZHANG Y, JIN YF, YANG Y, CHEN LL, WANG Y, WONG CC, XIAO XS, WANG ZF. Extensive translation of circular RNAs driven by N⁶-methyladenosine[J]. Cell Research, 2017, 27(5): 626-641.
- [11] WANG Y, WANG ZF. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs[J]. RNA, 2015, 21(2): 172-179.
- [12] JECK WR, SORRENTINO JA, WANG K, SLEVIN MK, BURD CE, LIU JZ, MARZLUFF WF, SHARPLESS NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2): 141-157.
- [13] CONN SJ, PILLMAN KA, TOUBIA J, CONN VM, SALMANIDIS M, PHILLIPS CA, ROSLAN S, SCHREIBER AW, GREGORY PA, GOODALL GJ. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. Cell, 2015, 160(6): 1125-1134.
- [14] DOLINNAYA NG, SOKOLOVA NI, ASHIRBEKOVA DT, SHABAROVA ZA. The use of BrCN for assembling modified DNA duplexes and DNA-RNA hybrids; comparison with water-soluble carbodiimide[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(11): 3067-3072.
- [15] LEPPEK K, BYEON GW, KLADWANG W, WAYMENT-STEELE HK, KERR CH, XU AF, KIM DS, TOPKAR VV, CHOE C, ROTHSCCHILD D, TIU GC, WELLINGTON-OGURI R, FUJII K, SHARMA E, WATKINS AM, NICOL JJ, ROMANO J, TUNGUZ B, DIAZ F, CAI H, et al. Combinatorial optimization of mRNA structure, stability, and translation for RNA-based therapeutics[J]. Nature Communications, 2022, 13: 1536.
- [16] MOORE MJ, QUERY CC. Joining of RNAs by splinted ligation[J]. Methods in Enzymology, 2000, 317: 109-123.
- [17] MOORE MJ. Joining RNA molecules with T4 DNA ligase[J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 118: 11-19.
- [18] KRUGER K, GRABOWSKI PJ, ZAUG AJ, SANDS J, GOTTSCHLING DE, CECH TR. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena[J]. Cell, 1982, 31(1): 147-157.
- [19] WESSELHOEFT RA, KOWALSKI PS, ANDERSON DG. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J]. Nature Communications, 2018, 9: 2629.
- [20] LIU CX, GUO SK, NAN F, XU YF, YANG L, CHEN LL. RNA circles with minimized immunogenicity as

- potent PKR inhibitors[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(2): 420-434.e6.
- [21] QIU Z, HOU Q, ZHAO Y, ZHU J, ZHA M, LI D, LI Y, LIU C, LI N, CAO Y, YANG J, SUN Z, ZUO C. Clean-PIE: a novel strategy for efficiently constructing precise circRNA with thoroughly minimized immunogenicity to direct potent and durable protein expression[EB/OL]. [2023-11-15] <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.06.20.496777v2>.
- [22] MIKHEEVA S, HAKIM-ZARGAR M, CARLSON D, JARRELL K. Use of an engineered ribozyme to produce a circular human exon[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 5085-5094.
- [23] PETKOVIC S, MÜLLER S. RNA circularization strategies *in vivo* and *in vitro*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(4): 2454-2465.
- [24] LI YF, BREAKER RR. Kinetics of RNA degradation by specific base catalysis of transesterification involving the 2'-hydroxyl group[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(23): 5364-5372.
- [25] CHENG ZF, DEUTSCHER MP. Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(24): 21624-21629.
- [26] QU L, YI ZY, SHEN Y, LIN LR, CHEN F, XU YY, WU ZG, TANG HX, ZHANG XX, TIAN F, WANG CH, XIAO X, DONG XJ, GUO L, LU SY, YANG CY, TANG C, YANG Y, YU WH, WANG JB, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1728-1744.e16.
- [27] YANG JL, ZHU JF, SUN JJ, CHEN YY, DU YR, TAN YL, WU LP, ZHAI MT, WEI LX, LI N, HUANG K, HOU QB, TONG ZB, BECHTHOLD A, TIAN H, SUN ZH, ZUO CJ. Intratumoral delivered novel circular mRNA encoding cytokines for immune modulation and cancer therapy[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2022, 30: 184-197.
- [28] BEAUDRY D, PERREAU JP. An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(15): 3064-3066.
- [29] ABE BT, WESSELHOEFT RA, CHEN R, ANDERSON DG, CHANG HY. Circular RNA migration in agarose gel electrophoresis[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(9): 1768-1777.e3.
- [30] MUTTACH F, MUTHMANN N, RENTMEISTER A. Synthetic mRNA capping[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2017, 13: 2819-2832.
- [31] WESSELHOEFT RA, KOWALSKI PS, PARKER-HALE FC, HUANG YX, BISARIA N, ANDERSON DG. RNA circularization diminishes immunogenicity and can extend translation duration *in vivo*[J]. *Molecular Cell*, 2019, 74(3): 508-520.e4.
- [32] CHEN R, WANG SK, BELK JA, AMAYA L, LI ZJ, CARDENAS A, ABE BT, CHEN CK, WENDER PA, CHANG HY. Engineering circular RNA for enhanced protein production[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41: 262-272.
- [33] ZHANG H, ZHANG L, LIN A, XU CC, LI ZY, LIU KB, LIU BX, MA XP, ZHAO FF, JIANG HL, CHEN CX, SHEN HF, LI HW, MATHEWS DH, ZHANG YJ, HUANG L. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity[J]. *Nature*, 2023, 621: 396-403.
- [34] XU C, ZHANG L, WANG W, TANG Y, WANG Q, AN J, XU H, GE Y, ZHU H, WANG H, LI B, WANG X, QIU X, SHEN M, CHEN G, SHEN H, HUANG L, LI H. Improving the circularization efficiency, stability and translatability of circular RNA by circDesign[EB/OL]. [2023-11-15] <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.07.09.548293v2>.
- [35] ZHOU YX, WU JC, YAO SH, XU YL, ZHAO WB, TONG YG, ZHOU Z. DeepCIP: a multimodal deep learning method for the prediction of internal ribosome entry sites of circRNAs[J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2023, 164: 107288.
- [36] CHEN YG, KIM MV, CHEN XQ, BATISTA PJ, AOYAMA S, WILUSZ JE, IWASAKI A, CHANG HY. Sensing self and foreign circular RNAs by intron identity[J]. *Molecular Cell*, 2017, 67(2): 228-238.e5.
- [37] CHEN YG, CHEN R, AHMAD S, VERMA R, KASTURI SP, AMAYA L, BROUGHTON JP, KIM J, CADENA C, PULENDRAN B, HUR S, CHANG HY. N6-methyladenosine modification controls circular RNA immunity[J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(1): 96-109.e9.
- [38] DOUSIS A, RAVICHANDRAN K, HOBERT EM, MOORE MJ, RABIDEAU AE. An engineered T7 RNA polymerase that produces mRNA free of immunostimulatory byproducts[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41: 560-568.
- [39] WAN DW, WANG ST, XU ZH, ZAN XQ, LIU F, HAN Y, JIANG M, WU AR, ZHI QM. PRKAR2A-derived circular RNAs promote the malignant transformation of colitis and distinguish patients with colitis-associated colorectal cancer[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2022, 12(2): e683.
- [40] QADIR J, WEN SY, YUAN H, YANG BB. CircRNAs regulate the crosstalk between inflammation and tumorigenesis: the bilateral association and molecular mechanisms[J]. *Molecular Therapy*, 2023, 31(6):

- 1514-1532.
- [41] YIN H, KANASTY RL, ELTOUKHY AA, VEGAS AJ, DORKIN JR, ANDERSON DG. Non-viral vectors for gene-based therapy[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15: 541-555.
- [42] LING SK, YANG SQ, HU XD, YIN D, DAI Y, QIAN XQ, WANG DW, PAN XY, HONG JX, SUN XD, YANG H, PALUDAN SR, CAI YJ. Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a Vegfa-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021, 5: 144-156.
- [43] YIN D, LING SK, WANG DW, DAI Y, JIANG H, ZHOU XJ, PALUDAN SR, HONG JX, CAI YJ. Targeting herpes simplex virus with CRISPR-Cas9 cures herpetic stromal keratitis in mice[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39: 567-577.
- [44] ZHU ZY, GAO P, HU Y, WANG JY, WANG HJ, YANG JF, HUANG LF, JI C, NI YH, FANG L. PEGylated versus non-PEGylated drugs: a cross-sectional analysis of adverse events in the FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) database[J]. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2020, 58(6): 332-342.
- [45] CASTELLS MC, PHILLIPS EJ. Maintaining safety with SARS-CoV-2 vaccines[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(7): 643-649.
- [46] AKINC A, QUERBES W, DE S, QIN JE, FRANK-KAMENETSKY M, JAYAPRAKASH KN, JAYARAMAN M, RAJEEV KG, CANTLEY WL, DORKIN JR, BUTLER JS, QIN LL, RACIE T, SPRAGUE A, FAVA E, ZEIGERER A, HOPE MJ, ZERIAL M, SAH DW, FITZGERALD K, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms[J]. *Molecular Therapy*, 2010, 18(7): 1357-1364.
- [47] DILLIARD SA, SIEGWART DJ. Passive, active and endogenous organ-targeted lipid and polymer nanoparticles for delivery of genetic drugs[J]. *Nature Reviews Materials*, 2023, 8: 282-300.
- [48] CHENG Q, WEI T, FARBIAK L, JOHNSON LT, DILLIARD SA, SIEGWART DJ. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing[J]. *Nature Nanotechnology*, 2020, 15(4): 313-320.
- [49] QIU M, TANG Y, CHEN JJ, MURIPH R, YE ZF, HUANG CF, EVANS J, HENSKE EP, XU QB. Lung-selective mRNA delivery of synthetic lipid nanoparticles for the treatment of pulmonary lymphangioliomyomatosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(8): e2116271119.
- [50] YANG L, HAN B, ZHANG ZT, WANG SG, BAI Y, ZHANG Y, TANG Y, DU LL, XU L, WU FF, ZUO L, CHEN XF, LIN Y, LIU KZ, YE QQ, CHEN BL, LI B, TANG TC, WANG Y, SHEN L, et al. Extracellular vesicle-mediated delivery of circular RNA SCMH1 promotes functional recovery in rodent and nonhuman primate ischemic stroke models[J]. *Circulation*, 2020, 142(6): 556-574.
- [51] LI B, XI W, BAI Y, LIU X, ZHANG Y, LI L, BIAN L, LIU CC, TANG Y, SHEN L, YANG L, GU XC, XIE J, ZHOU ZQ, WANG Y, YU XY, WANG JH, CHAO J, HAN B, YAO HH. FTO-dependent m6A modification of Plpp3 in circSCMH1-regulated vascular repair and functional recovery following stroke[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 489.
- [52] LI HJ, PENG K, YANG K, MA WB, QI SL, YU XY, HE J, LIN X, YU GC. Circular RNA cancer vaccines drive immunity in hard-to-treat malignancies[J]. *Theranostics*, 2022, 12(14): 6422-6436.
- [53] LU DC, CHATTERJEE S, XIAO K, RIEDEL I, HUANG CK, COSTA A, CUSHMAN S, NEUFELDT D, RODE L, SCHMIDT A, JUCHEM M, LEONARDY J, BÜCHLER G, BLUME J, GERN OL, KALINKE U, WEN TAN WL, FOO R, VINK A, van LAAKE LW, et al. A circular RNA derived from the insulin receptor locus protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *European Heart Journal*, 2022, 43(42): 4496-4511.
- [54] LEE KH, KIM S, SONG J, HAN SR, KIM JH, LEE SW. Efficient circular RNA engineering by end-to-end self-targeting and splicing reaction using *Tetrahymena* group I intron ribozyme[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2023, 33: 587-598.
- [55] STAROSTINA EV, SHARABRIN SV, ANTROPOV DN, STEPANOV GA, SHEVELEV GY, LEMZA AE, RUDOMETOV AP, BORGOPYAKOVA MB, RUDOMETOVA NB, MARCHENKO VY, DANILCHENKO NV, CHIKAEV AN, BAZHAN SI, ILYICHEV AA, KARPENKO LI. Construction and immunogenicity of modified mRNA-vaccine variants encoding influenza virus antigens[J]. *Vaccines*, 2021, 9(5): 452.

(本文责编 郝丽芳)