· 药咖论坛 ·

环状 RNA 技术及其在生物医药领域的研发进展

胡江，杨赟 *

（上海环码生物医药有限公司，上海 200131）

[摘要] 环状核糖核酸（circRNA）是一种单链闭环 RNA 分子，因其高稳定性、低免疫原性及广阔应用前景而备受关注。简介天然 circRNA 的生物学功能，探讨 circRNA 在药物研发中的多样化应用，特别是在开发核酸适配体、海绵 circRNA、向导 circRNA、circRNA 疫苗和 circRNA 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法（chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy，CAR-T）等方面的最新研究动态。同时，详细介绍 circRNA 的体外合成技术（包括化学合成和酶促合成），并深入分析 circRNA 药物开发过程中所面临挑战。展望 circRNA 技术的未来发展前景，强调其在疫苗开发和治疗性药物领域的巨大潜力。

[关键词] 环状 RNA 药物；环状 RNA 疫苗；RNA 环化技术；非编码 RNA；编码 RNA

[中图分类号] Q522 [文献标志码] A [文章编号] 1001-5094（2025）10-0829-09

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.20250071

Circular RNA Technology and Its Research and Development Progress in Biomedical Field

HU Jiang, YANG Yun

(Shanghai Circode Biomed Co., Ltd., Shanghai 200131, China)

[Abstract] Circular RNAs (circRNAs), single-stranded covalently closed RNA molecules characterized by unique topological structures, have emerged as pivotal tools in biomedical research due to their exceptional biostability, low immunogenicity, and therapeutic versatility. This review briefly introduces the biological functions of endogenous circRNA and discusses their expanding applications in drug development, with a focus on the latest trends in the development of circRNA aptamers, circRNA sponge, guide circRNA, circRNA-based vaccines and circRNA-based CAR-T immunotherapies. Besides, it comprehensively analyzes the *in vitro* synthesizing methodologies, including chemical and enzymatic strategies, and analyzes in depth the challenges in circRNA drug development, The review concludes by exploring future directions for circRNA technology and its transformative potential in advancing the development of vaccines and therapeutics.

[Key words] circular RNA drug; circular RNA vaccine; RNA circularization technology; non-coding RNA; coding RNA

环状核糖核酸（circular RNA，circRNA）是一类具有单链闭环结构的 RNA 分子，无游离 5′末端和 3′末端，因此不易被核酸外切酶降解，比线性 RNA 更稳定，从而在细胞内得以长时间存在。近年来，circRNA 凭借其独特的结构特征和生物学特性，已逐渐成为生物医学研究和药物研发领域的热点方向之一。

早在 1976 年，科学家首次在植物类病毒中鉴定出 circRNA 的存在[1]。随后，研究人员通过电子显微镜在 HeLa 细胞中观察到具有圆环形态的转录本，首次报道了真核细胞中的 circRNA[2]。然而，受限于当时的技术手段，仅有少量 circRNA 被发现，其功能及形成机制也未得到充分阐释。

接受日期：2025-06-03

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No. 91753135, No. 31870814）

* 通信作者：杨赟，博士，研究员

研究方向：RNA 生物学和 RNA 药物研发

E-mail：yangyun@circodebio.com

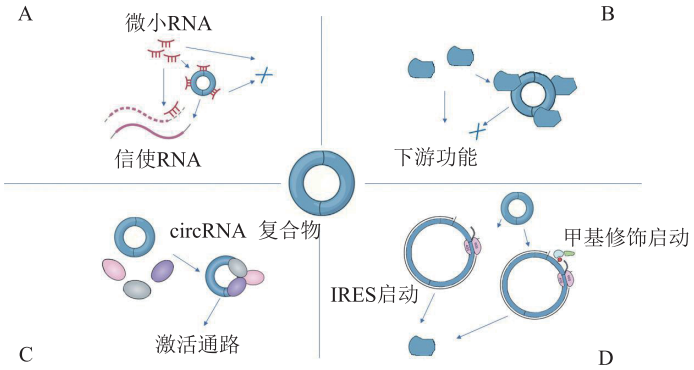
随着高通量测序技术的广泛应用，研究人员在多种生物体中陆续发现了大量 circRNA 的存在。2013 年，*Nature* 同期发表的 2 篇关于 circRNA 的研究文章，首次揭示了其可作为一种非编码 RNA，具有调控微小 RNA（microRNA，miRNA）的功能[3-4]。自此，circRNA 迅速成为生物医学领域的前沿研究热点。

研究显示，circRNA 广泛存在于真核生物中，从人和小鼠等哺乳动物到果蝇、线虫等较低等动物以及水稻、拟南芥等植物，甚至在酵母等单细胞生物中均发现大量 circRNA 存在[3,5-11]。在人体内，circRNA 种类繁多，数量达数十万种，凸显了其在分子和细胞生物学层面上的多样性与复杂性。

近年来，随着对 circRNA 翻译机制研究的深入[12]及体外合成技术的发展[13-14]，其作为一种新型信使 RNA（messager RNA，mRNA）药物开发平台受到广泛关注。本文将从 circRNA 的生物学功能切入，系统阐述 circRNA 技术的研究进展、应用及挑战。

1 circRNA 的生物学功能

circRNA 因缺乏 5′末端和 3′末端，无法通过经典的帽依赖性翻译机制产生蛋白质，因而长期被认为是一种非编码 RNA，其主要生物学功能包括：1）作为 miRNA 的分子海绵；2）作为 RNA 结合蛋白的分子海绵；3）形成具有功能活性的 RNA-蛋白复合物。然而，越来越多的研究表明，circRNA 可以通过非帽依赖性翻译方式产生蛋白质，这进一步拓展了其在细胞生物学中的功能多样性（见图 1）。



A：微小 RNA 海绵；B：蛋白海绵；C：功能性复合物；D：翻译蛋白；IRES：（internal ribosome entry site）内部核糖体进入位点

图 1 环状 RNA 的生物学功能 [15]

Figure 1 The biological functions of circular RNA

1.1 miRNA 海绵

circRNA 通过互补配对吸附 miRNA 并中和其活性，从而影响 mRNA 翻译和降解。例如 ciRS-7 上有超过 70 个 miR-7 的结合位点，能够高效且特异地结合 miR-7，并通过此方式调控 miR-7 下游靶基因的表达。这种机制在细胞内形成了一种复杂的调控网络，广泛影响多种生物学过程，如细胞增殖、分化和凋亡等。此外，ciRS-7 还可以通过吸附 miR-7 来调控神经元的发育和功能，显示出其在神经系统中的重要作用 [15]。

1.2 RNA 结合蛋白海绵

与 miRNA 海绵类似，circRNA 通过吸附特定蛋白调控其功能，进而影响 mRNA 剪接、稳定性、翻译及分子信号传导。例如，肌盲（muscleblind，MBL）蛋白可以与 circMbl 结合，形成一种反馈调控机制，影响 *MBL* 基因的表达和功能 [15]。

1.3 功能性 RNA-蛋白复合物

circRNA 不仅可通过作为蛋白质海绵来调节信号通路，还能通过直接与特定蛋白质结合，改变其功能或定位，从而形成具有特定生物学功能的 circRNA-蛋白复合物。以细胞核内的调控机制为例，circRNA 可通过与 U1 核微小核糖核蛋白颗粒（small nuclear ribonucleoprotein particle，U1 snRNP）、RNA 聚合酶Ⅱ以及基因启动子区域的相互作用来调控基因的转录。此外，circEIF3J 和 circPAIP2 已被证实可促进其亲本基因的转录，进一步凸显了 circRNA 在基因表达调控中的重要作用 [16]。

1.4 编码蛋白

除了作为非编码 RNA 发挥调控功能外，circRNA 还展现出编码蛋白质的潜力。研究表明，circRNA 能够采用非帽依赖的机制进行翻译，通过内部核糖体进入位点（internal ribosome entry site，IRES）序列或 N^6-甲基腺苷（N^6-methyladenosine，m^6A）RNA 修饰等元件招募核糖体启动 circRNA 翻译。例如，circZNF609、circE7 以及其他 circRNAs 上的 m^6A 修饰能够促进其自身的翻译过程 [17-18]。这种翻译机制在细胞内形成了一种新的蛋白质生成途径，为细胞提供了额外的蛋白质多样性。

circRNA 的生物学功能研究不仅有助于加深对生物体内 RNA 调控和功能的理解，也为利用 circRNA 技术开发新型治疗药物提供了理论基础。

2 circRNA 技术的应用

随着对 circRNA 功能和作用机制研究的不断深入，该领域已逐步从基础科学研究拓展至产业应用，尤其在药物研发方面展现出巨大潜力（见图 2）。在药物研发过程中，circRNA 主要分为非编码 RNA 和编码 RNA 两个研究方向。

在非编码 RNA 的应用领域，circRNA 不仅可作为核酸适配体（aptamers）调节细胞内信号传导，还能充当 miRNA 或蛋白质的分子海绵，调控相应分子的功能，并作为向导 RNA（guide RNA）在基因编辑中发挥重要作用。

在编码 RNA 的应用领域，circRNA 能够编码

具有不同功能的蛋白，因而在疫苗开发、在体嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法（chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy，CAR-T）、再生医学以及蛋白替代疗法等领域具有巨大潜力和广阔应用前景。

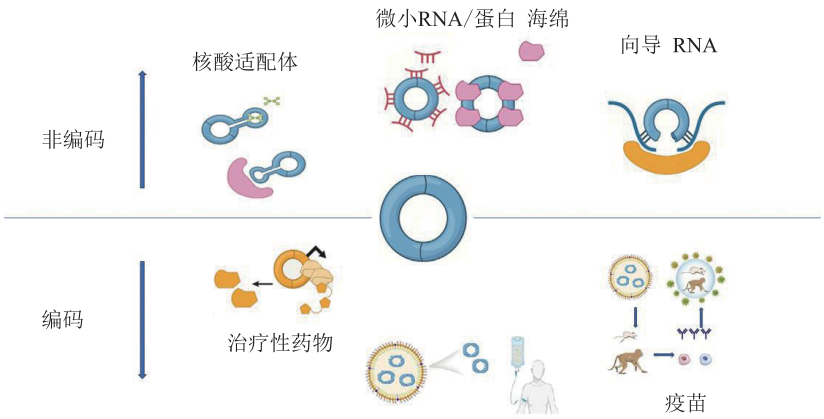


图 2 circRNA 在医药领域的应用 [15]

Figure 2 Applications of circRNA in medicine

2.1 circRNA 适配体

适配体是在细胞内表达的由短链 DNA 或 RNA 分子组成的结构，具有结合特定靶标分子并调节细胞内信号传导过程的能力 [19]。然而，RNA 适配体应用面临的主要挑战是难以将其持续稳定地表达至足够高的浓度以发挥有效作用 [20]。circRNA 的高稳定性为基于 RNA 适配体的应用提供了切实可行的解决方案。例如，通过 Tornado 系统表达的 circRNA 荧光传感器在活细胞中结合小分子时，其荧光强度比线性 RNA 高近 200 倍 [21]。通过将核因子 κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB）适配体构建成 circRNA，在抑制 NF-κB 信号通路方面，其比具有相同结构的线性 RNA 更有效 [22]。此外，研究人员将 S- 腺苷甲硫氨酸（S-adenosylmethionine，SAM）和西兰花荧光（Broccoli）适配体嵌入 circRNA 结构，构建了一种高灵敏度的代谢物生物传感器，能够持续动态检测细胞内 SAM 水平变化 [21]，展示了 circRNA 适配体在调节细胞内信号传导方面的应用潜力。

2.2 海绵 circRNA

circRNA 可作为细胞内 miRNA 的海绵，通过吸附特定的 miRNA，抑制其对靶 mRNA 的调控作用，该机制被称为竞争性内源 RNA（competing endogenous RNA，ceRNA）调控模式。通过体外合成或体内表达含有与 miRNA 部分互补结合位点的稳定 circRNA，可有效降低疾病相关 miRNA 的活性，显示出一定的治疗潜力。例如，针对丙型肝炎病毒的 miRNA-122 设计的 circRNA 海绵，比现有的锁核酸（locked nucleic acid，LNA）反义寡核苷酸更有效地抑制病毒蛋白产生 [23]。在设计 circRNA 海绵时，需要注意的是，完全互补的 miRNA 结合位点可能会引发真核翻译起始因子 2C2（eukaryotic translation initiation factor 2C subunit 2，EIF2C2；又称 argonaute2，Ago2）介导的海绵降解，因此设计时应避免使用完全互补的结合位点 [24]。

circRNA 还可通过工程化设计特定 RNA 结合位点，实现对特定蛋白质的吸附并调节其活性。例如，异质核核糖核蛋白 L（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L，hnRNP L）通过与 mRNA 前体中的 CA 重复序列结合来调节剪接过程，而携带这些 CA 重复序列的 circRNA 能够显著降低 hnRNP L 在细胞核内的分布，影响其剪接功能 [25]。长链非编码 RNA 如 DNA 损伤激活的非编码 RNA（non-coding RNA activated by DNA damage，NORAD）通过其序列中含有的多个 Pumilio 家族（Pumilio family member，PUM）反应元件（Pumilio response elements，PREs）来阻止 PUM 蛋白与细胞周期调控因子的 mRNA 结合，而工程化 circRNA 能够模拟 NORAD 的功能，通过吸附 PUM 蛋白来维持基因组稳定性 [26]。

circRNA 海绵不仅能针对病理性积累的 miRNA 进行中和，还能调节细胞内 RNA 结合蛋白的活性，为相关疾病的治疗提供新方向，也显示了其作为治疗工具的潜力。

2.3 向导 circRNA

在基因编辑领域，向导 RNA（guide RNA）作为序列定位元件，在编辑效率和精准性方面起至关重要的作用。将向导 RNA 改造为 circRNA 可显著提高其编辑效率和精准性。2022 年，*Nature*

Biotechnology 同期发表的 2 项研究表明，通过向导 circRNA 招募 RNA 特异性腺苷脱氨酶 1（adenosine deaminase acting on RNA 1，ADAR1），可在体外和体内实现高效且可编程的腺苷到肌酐（adenosine to inosine，A-I）RNA 编辑。由于向导 circRNA 的特殊结构，其可避免核酸外切酶的切割，显著提升体外和体内编辑的效率和精准性，并基本消除了双链 RNA 区域内目标转录本上的脱靶编辑问题 [27-28]。

此外，向导 circRNA 亦可应用于成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白 9（clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein9，CRISPR-Cas9）基因编辑系统。研究表明，在人源胚胎肾细胞（HEK）293 细胞模型中使用向导 circRNA 相较于线性向导 RNA 能够减少脱靶效应，但伴随编辑效率有所下降 [29]。值得关注的是，通过在向导 circRNA 中引入连接子（linker）序列，其在大肠埃希菌中的编辑效率相较于天然的线性向导 RNA 提高了 2 倍 [30]。因此，通过优化向导 circRNA 的结构设计，不仅可提高编辑效率，还能降低脱靶风险，为基因编辑提供更为精准的“导航系统”，在遗传性疾病治疗领域具有广阔的应用前景。

2.4 circRNA 疫苗

circRNA 具备编码抗原蛋白的能力，因此可用于开发相应疫苗。2022 年，*Cell* 期刊首次报道 circRNA 新型冠状病毒疫苗的研究成果。研究人员采用 IRES 序列和编码刺突蛋白的受体结合结构域（receptor binding domain，RBD）序列制备 circRNA，并通过脂质纳米颗粒（lipid nanoparticle，LNP）包被 circRNA，成功开发针对新型冠状病毒感染（COVID-19）毒株的 circRNA 疫苗。在小鼠模型中，该疫苗以 10 和 50 μg 的剂量免疫后，相较于 mRNA 疫苗，可诱导更高比例的中和抗体与显著的辅助性 T 细胞 1（T helper cell 1，Th1）偏斜免疫反应。在猴子模型中开展的进一步攻毒实验显示，免疫组的肺部病毒载量、肺损伤程度和肺部浸润性炎症细胞数量均显著降低。此外，针对 COVID-19 德尔塔（Delta）变体和奥密克戎 BA1（Omicron BA1）变体的 circRNA 疫苗实验进一步证实了疫苗的广谱活性与高稳定性 [31-32]。

另一个研究团队基于Ⅱ类自剪接内含子技术制备了一种 COVID-19 circRNA 疫苗。在小鼠免疫实验中，该疫苗能引发强烈的 RBD 特异性记忆 B 细胞反应和辅助性 T 细胞 1/2（T helper cell type1/type 2，Th1/Th2）细胞免疫反应。与线性 mRNA 疫苗免疫的小鼠相比，使用 circRNA 疫苗免疫的小鼠血清免疫球蛋白 G（immunoglobulin G，IgG）滴度高了 10 倍。此外，该 circRNA 疫苗对严重急性呼吸综合征冠状病毒 2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）假病毒展现出良好的中和活性，并能有效阻断野生型、Delta、Omicron 3 种 RBD 突变体与 293T 细胞上的人类血管紧张素转化酶 2（human angiotensin-converting enzyme 2，hACE2）受体的结合 [33]。

circRNA 在猴痘病毒疫苗开发中亦取得重要突破。中国科学院武汉病毒研究所联合上海环码生物医药有限公司（以下简称“环码生物”）及中国科学技术大学研究团队成功制备了针对猴痘病毒的混合 circRNA 疫苗，研究选取了 A29L、A35R、B6R、M1R 4 种猴痘病毒抗原，通过体外合成相应的 circRNA，并采用经典的商业化 LNP 包封工艺制成疫苗。实验结果显示，同时含 4 种抗原的混合 circRNA 疫苗可在小鼠体内诱导针对 4 种抗原的血清结合抗体，且中和抗体滴度较高，尤以 M1R 抗原对应的免疫应答最为显著。攻毒实验显示，经 circRNA 疫苗免疫的小鼠展现出良好的免疫保护效果，病毒载量显著降低，尤其是混合疫苗组（同时含有 4 种抗原）。综上所述，该疫苗在小鼠体内触发了强烈的体液免疫和细胞免疫反应，可有效保护小鼠免受猴痘病毒攻击 [34]。

2.5 在体 circRNA CAR-T

CAR-T 细胞疗法作为新型的癌症治疗手段，通过改造患者自身的 T 细胞来识别并攻击肿瘤细胞，被视作癌症治疗领域的革命性突破。然而，该疗法仍面临生产成本高昂、临床合规性限制和潜在二次致癌风险等挑战。为提高 CAR-T 细胞疗法的可及性和安全性，研究人员正探索创新技术与方法。其中，利用 mRNA 技术在体内生成 CAR-T 细胞的策略，有望降低治疗成本并提高患者的临床接受度。值得关注的是，circRNA 凭借其独特的生物学特性，在该领域亦显示出巨大的应用潜力。

北京大学与环码生物研究团队联合开发了一种新型拟心磷脂磷酰胺（cardiolipin-mimetic phosphoramide，CAMP）LNP，其在 T 细胞的靶向性方面展现出显著优势，该 LNP 的形态、高刚性和核心化学结构（哌嗪中心基团）可能是其对 T 细胞具有偏好趋向性的关键。该研究团队利用这种特制 LNP，成功递送了编码针对衰老和炎症相关抗原——尿激酶型纤溶酶原激活剂受体（urokinase-type plasminogen activator receptor，uPAR）的 CAR circRNA，有效减轻了与 uPAR 相关的肝纤维化和类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis，RA）症状，展现了 circRNA 在在体 CAR-T 领域的应用前景 [35]。

此外，复旦大学章旭耀研究员联合美国宾夕法尼亚大学华先欣教授基于置换内含子-外显子（permuted intron-exon，PIE）技术制备抗 CD19（anti-CD19）CAR circRNA，并通过电转技术将 circRNA 转导至 T 细胞，从而制备出 anti-CD19 CAR-T 细胞。研究结果表明，将上述经改造的 CAR-T 细胞注射至相关肿瘤模型小鼠体内，能够有效抑制肿瘤的生长[36]。

2.6 circRNA 药物的临床研究

2024 年 9 月，环码生物在 circRNA 药物研发领域取得了突破性进展。该公司与上海交通大学附属瑞金医院心脏外科赵强教授合作，成功开展了全球首个 circRNA 药物 HM2002 注射液的首次人体研究。该项具有里程碑意义的研究者发起的探索性研究（investigator-initiated trial，IIT），旨在评估 HM2002 注射液在冠状动脉旁路移植术（coronary artery bypass grafting，CABG）手术中的可行性与安全性，并重点监测其治疗反应。2025 年 1 月，HM2002 注射液成为首个获得国家药品监督管理局（National Medical Products Administration，NMPA）新药临床试验申请（investigational new drug，IND）批准用于治疗缺血性心脏病的药物。这一进展标志着 circRNA 类药物正式迈入人体临床试验的新阶段，为该领域后续的研发奠定了坚实的基础。

2024 年 10 月，RiboX Therapeutics 公司宣布其研发的 circRNA 药物 RXRG001 获美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）IND 批准。RXRG001 通过将功能性 circRNA 递送到患者体内，旨在替代或补充缺失或功能异常的基因。该药物展现出潜在的稳定性和持久性及较低免疫原性，使其成为具有吸引力的治疗选择。

3 circRNA 的体外合成

circRNA 在治疗领域的应用与发展，得益于体外合成技术的持续创新和方法的不断优化。目前，circRNA 的体外合成主要分为化学合成和酶促合成两大类。其中，酶促合成又可进一步细分为蛋白连接酶合成、自剪接核酶合成和发夹状核酶合成等方法。

3.1 化学合成法

circRNA 的化学合成技术主要基于磷酰胺化学和固相合成方法，以核苷三磷酸酯衍生物作为合成的起始原料。该方法能够实现 3′, 5′- 磷酸二酯键的连接，并有效去除保护性基团，从而避免副反应的产生。然而，目前化学合成技术仅能合成长度为 70～80 个核苷酸的 circRNA，这限制了其在长片段 circRNA 合成中的应用潜力[14]。

3.2 酶促连接法

酶促连接法合成 circRNA 通常涉及体外转录（*in vitro* transcription，IVT）反应制备前体线性 RNA。该步骤需要 DNA 模板、适宜的反应缓冲液及噬菌体 RNA 聚合酶的共同作用。由于成本相对较低且能够合成较长的 RNA 分子，酶促连接法已成为目前主流的体外 RNA 合成技术。在完成体外转录后，通过使用 T4 RNA 连接酶（T4 RNA ligase，T4 Rnl）或核酶催化的反应，可将线性 RNA 前体转化为 circRNA。

3.2.1 T4 连接酶法　T4 连接酶家族包括 T4 DNA 连接酶（T4 DNA ligase，T4 Dnl）、T4 Rnl 1 和 T4 Rnl 2，能够促使线性 RNA 前体的 3′-OH 受体区域与 5′单磷酸供体区域连接，其在催化 RNA 连接反应中发挥关键作用。因此，在 IVT 反应中或反应结束后，需使前体 RNA 的 5′末端形成单磷酸结构。T4 Dnl 主要用于双链 DNA 或 DNA/RNA 杂交链的连接，而 T4 Rnl 1 和 T4 Rnl 2 则更适用于单链 RNA 或双链 RNA 的连接[14]。

为提高酶法连接的效率，通常会设计夹板序列与前体 RNA 的 5′末端和 3′末端形成配对，或将前体 RNA 的 5′末端和 3′末端设计成配对结构，以拉近 2 个末端的距离，从而提高 T4 连接酶的连接效率。

3.2.2 核酶法　核酶法制备 circRNA 主要依赖于Ⅰ型和Ⅱ型内含子的自剪接反应，或发夹核酶（hairpin ribozyme，HPR）切割前体 RNA 形成中间体的 5′-OH 和 2′, 3′-环状磷酸盐的自发连接反应。核酶法仅需核酸分子自身参与，无需额外的蛋白催化，因而比较适合于工艺放大。

Ⅰ型内含子自剪接系统（见图 3）是目前体外合成 circRNA 的常用技术。基于Ⅰ型内含子自剪接特性改造的体外合成系统被称为 PIE 法，仅需鸟苷三磷酸（guanosine triphosphate，GTP）和镁离子（Mg^{2+}）即可实现 RNA 的环化。在 PIE 法中，通常采用源自鱼腥草（*Anabaena*）tRNA *Leu* 基因或 T4 噬菌体的胸苷酸合成酶（thymidylate synthase，*TS*）基因的Ⅰ型内含子序列，这 2 种Ⅰ型内含子均被证实能够高效促进 RNA 环化。与化学合成法和 T4 连接酶法相比，PIE 法更适合于较大片段线性 RNA 前体的环化，且其反应条件和纯化过程相对简单。因此，PIE 法已成为目前研究最广泛和使用最多的 RNA 环化技术。PIE 法的局限性：前体 RNA 的长度和复杂二级结构导致不同 RNA 序列的成环效率存在显著差异；外源外显子序列的引入可能改变 circRNA 的二级结构，这对 circRNA 的活性和免疫原性会产生不利影响[14,37-38]。

当前采用Ⅰ型内含子自剪接系统的公司有 Orna 公司的鱼腥草来源的Ⅰ型内含子自剪接系统，科瑞迈德公司的 T4 td 基因来源的Ⅰ型内含子自剪接系统 Clean-PIE。

Ⅱ型自剪接内含子设计改造后通过反向剪接（见图 3），把外显子末端的 5′剪接位点与该外显子上游的 3′剪接位点相连接，从而形成 circRNA。与Ⅰ型内含子不同，Ⅱ型内含子催化的反向剪接不需要额外的 GTP 辅助，就能够实现线性 RNA 的环化[14]。环码生物研发团队通过对破伤风杆菌表层蛋白（*Clostridium tetani* surface layer protein）来源的Ⅱ型自剪接内含子的不同结构域进行精确分割，构建了一系列包含特定外显子和 2 个分割内含子的环化系统[33]。Ⅱ型内含子的自剪接过程仅需适量 Mg^{2+} 即可进行，因其在 IVT 条件下即可完成线性 RNA 的环化，故非常适合工艺放大[39-41]。然而，关于Ⅱ型自剪接内含子的研究相对较少，目前仅有少数研究团队采用该技术进行 circRNA 制备。

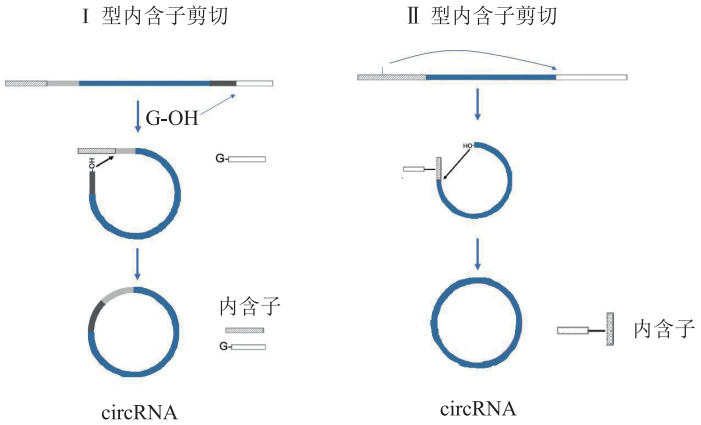


图 3 Ⅰ型和Ⅱ型自剪切内含子成环示意图

Figure 3 Schematic diagram of circularization of type Ⅰ and type Ⅱ self-splicing introns

HPR 能够利用单链环状 DNA 作为模板，通过滚圈（rolling circle）反应和自剪切机制合成 circRNA。在这一过程中，携带 HPR 的线性 RNA 前体折叠成 2 种具有切割活性的构象，对前体 RNA 进行切割，生成 RNA 中间体的 5′-OH 基团和 2′, 3′-环状磷酸盐，然后通过自发连接反应形成 circRNA。该方法适用于高效制备较短的 circRNA 分子。然而，该方法也存在一定局限性：HPR 催化的裂解和连接反应处于动态平衡状态，可能导致生成的 circRNA 稳定性不足；由于生成的 circRNA 中含有 HPR 的部分序列，可能对 circRNA 的功能产生不利影响[39]。

综合来看，基于自剪接核酶技术的 circRNA 合成方法，无论是采用Ⅰ型还是Ⅱ型内含子自剪接系统，均凭借其反应条件简便、合成长度无限制及产物稳定性高等显著优势，在科研领域和工业生产中得到广泛应用（见表 1）。

表 1 circRNA 的不同环化技术比较

Table 1 Differences in various circularization techniques of circRNA

环化方法	优势	劣势
化学连接法	适用于短片段（100 nt 以下）	可能导致 2′, 5′-磷脂键的形成
T4 DNA 连接酶 1	序列相对较长产生精确序列的 circRNA，借助或不借助夹板	需优化夹板序列酶周转率低，用量大
T4 RNA 连接酶 1		环化率依赖于线性 RNA 二级结构，对末端核酸具有核苷酸偏好性
T4 RNA 连接酶 2		环化率依赖于线性 RNA 二级结构
PIE 系统-Ⅰ型内含子	长度适用范围广（100 ~ 10 000 nt）	保留 PIE 结构中辅助外显子
PIE 系统-Ⅱ型内含子	产生精确序列的 circRNA，长度适用范围广（100~ 10 000 nt）	-
发夹核酶	适用于短片段（50 ~ 150 nt）	包含核酶序列，潜在核酶活性

PIE：permuted intron-exon（置换内含子-外显子）

4 circRNA 成药性挑战

在 circRNA 药物开发进程中，制备工艺、体内递送和质量标准这 3 个关键领域所面临的技术难题和科研障碍尤为突出。这些挑战不仅直接影响 circRNA 药物的有效性和安全性，而且对于其商业化进程和临床应用的实现构成重要障碍。

4.1 circRNA 药物的制备工艺

circRNA 药物的生产涉及一系列精细且复杂的

步骤，共同确保药物的质量和有效性。circRNA 药物的制备过程始于利用质粒模板通过体外转录合成线性 RNA 分子。该过程包括质粒的获取、处理和纯化，具体涉及发酵、细菌收获、裂解、澄清、超滤和色谱纯化等步骤，以确保质粒的高纯度和超螺旋结构[31]。随后，通过体外转录合成线性 RNA 分子，并利用脱氧核糖核酸酶Ⅰ（deoxyribonuclease Ⅰ，DNase Ⅰ）去除 DNA 模板，再进行超滤纯化。关键的 RNA 环化步骤主要通过内含子剪接法或 T4 RNA 连接酶法实现，其中内含子剪接法因无需额外酶而更受青睐。最终，circRNA 被封装在如 LNP 之类的递送系统中，经过填充和封盖后，形成最终的产品。

在 circRNA 药物的生产过程中，对杂质的严格控制对于确保药物的安全性和有效性至关重要。杂质主要包括未环化的线性 RNA 前体分子、内含子序列、酶及其他副产品。这些杂质可能引发不必要的免疫反应，影响药物的免疫原性和药效，甚至触发强烈的先天免疫反应，导致不良后果。因此，优化制备工艺以降低这些杂质的水平，对于减少免疫原性风险及提高药物的活性、安全性和可靠性至关重要。

为了实现上述目标，需对生产过程中产生的各类杂质实施精确检测和控制。线性 RNA 前体分子的检测通常借助高效液相色谱（high-performance liquid chromatography，HPLC）或核糖核酸酶 R（ribonuclease R，RNase R）消化法[30]，但因其与 circRNA 分子的相对分子质量相近，致使分离和检测变得复杂。此外，当使用 T4 RNA 连接酶法时，还需通过酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）来检测和去除残留的 T4 RNA 连接酶。同时，双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）的含量也需通过特定的抗原-抗体结合方法进行测定，以评估其可能引起的免疫刺激[42]。这些检测步骤对于识别和降低生产过程中的潜在风险至关重要，确保最终药物的质量符合监管要求，避免患者受不良反应的影响。

然而，由于 circRNA 技术是近年来发展起来的新兴技术，当前的工艺生产和检测分析主要沿用已有的仪器设备和试剂耗材，但部分设备和耗材并不适合 circRNA 的检测。例如，dsRNA 是 IVT 过程中易产生的杂质，也是 circRNA 产品的重要质控指标。然而，目前尚未开发出适用于大规模生产的 dsRNA 高效去除工艺，仅能通过控制 IVT 反应条件以减少 dsRNA 生成。同时，现有分析手段主要是基于抗体的 ELISA 检测，该方法具有一定的序列和长度偏好性。因此，需要产业界上下游从仪器设备和试剂耗材等不同维度出发，共同推动整个产业技术水平的提升，开发出安全有效且患者可负担的 circRNA 药物。

4.2 circRNA 药物的递送

circRNA 作为新兴治疗手段，虽具有高稳定性和低免疫原性等优点，但在递送方面仍面临多重挑战。目前，LNPs 是应用最广泛且高效的 circRNA 递送工具，具有成本低、规模化生产等优势。然而，当需要将 circRNA 递送至肝脏以外的组织时，LNPs 的递送效果会受到极大限制，因其天然具有肝脏积累的倾向[43]。

其他递送系统也可用于 circRNA 的递送，但各有优缺点。例如，外泌体具有良好的生物相容性和低免疫原性，但细胞来源的外泌体具有高度异质性，其内容物和功能取决于亲本细胞，这使得分离纯化后缺乏标准化表征方法与可行质量控制体系。病毒样颗粒虽然转染效率高、靶向性好，但生产成本高、免疫原性强，且存在病毒基因组整合至宿主细胞基因组的潜在风险。此外，基于不同递送方式的 circRNA 药代动力学特征和生物分布尚不明确，增加了确定最佳剂量和给药方案的难度。因此，通过进一步的研究和技术开发以克服上述挑战，进而充分发挥 circRNA 在疾病治疗中的应用潜力[44]。

4.3 circRNA 药物的质量标准

circRNA 技术正迅速成为研发焦点之一，吸引众多企业布局，为该领域注入创新活力，加速推动前沿成果转化。然而，不同机构采用多样化的技术平台和生产工艺，导致 circRNA 产品质量参差不齐。这种不一致性给产品的生物活性和安全性评估带来挑战，也对行业的标准化和质量控制提出更高要求。因此，构建一套科学统一的质量标准规范对促进整个行业规范化发展至关重要。

circRNA 药物质量标准的建立是一个复杂过程，涉及多个关键方面：确保高效的环化效率、严格控制关键残留杂质、制定明确的质量属性与标准、精确的粒径质量控制以及应对独特的测试项目和检测方法的挑战。这些标准的制定需要参考国际和国家监管机构技术指南，如世界卫生组织（World Health Organization，WHO）、美国药典（United States Pharmacopeia，USP），及 NMPA 药品评审中心（Center for Drug Evaluation，CDE）发布的技术指南，以此保障 circRNA 药物的安全性、有效性和生产工艺的一致性[44]。

此外，色谱技术（尤其是尺寸排阻色谱和反相色谱）在 circRNA 的纯化和质量检测中发挥关键

作用，有助于分离并分析 circRNA 中 nicked RNA 和前体线性 RNA 等杂质，从而确保最终产品的质量 [44]。

5 结语与展望

circRNA 技术在制药行业的前景备受期待，尽管目前仍面临诸多挑战。这类独特的 circRNA 分子因其在细胞内的稳定性和持久的生物活性，在疫苗开发和治疗药物领域展现出巨大潜力。

在技术和应用创新方面，circRNA 疫苗相较于 mRNA 疫苗，展现出更优的稳定性和更低的免疫原性，尤其在 COVID-19 疫苗的研发中显示出巨大发展潜力，有望成为未来应对新型重大传染病的强有力工具。在治疗性应用领域，circRNA 在蛋白替代、再生医学、癌症免疫疗法和自身免疫性疾病治疗等方面具有广泛的应用前景。

尽管 circRNA 技术的工业化生产流程已初步构建，但仍需克服一系列挑战，包括高效生产工艺的开发和递送系统的优化。未来研究将聚焦于提高前体 RNA 的环化效率和表达水平、改进 circRNA 的靶向递送技术，并探索 circRNA 的新用途，以进一步挖掘其治疗潜力。

随着环码生物和 RiboX Therapeutics 公司的 circRNA 新药临床许可获批，预示着 circRNA 药物正式进入临床阶段。技术进步将促使全球监管机构更新指南并建立国际或国家参考标准，这对于确保 circRNA 药物的质量控制标准化和推动整个行业的发展具有重要意义。

[参考文献]

[1] Sanger H L, Klotz G, Riesner D, *et al*. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73(11): 3852–3856.

[2] Hsu M T, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells[J]. *Nature*, 1979, 280(5720): 339–340.

[3] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, *et al*. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333–338.

[4] Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, *et al*. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384–388.

[5] Fan X, Zhang X, Wu X, *et al*. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos[J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 148.

[6] Guo J U, Agarwal V, Guo H, *et al*. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(7): 409.

[7] Ivanov A, Memczak S, Wyler E, *et al*. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals[J]. *Cell Rep*, 2015, 10(2): 170–177.

[8] Jeck W R, Sorrentino J A, Wang K, *et al*. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141–157.

[9] Salzman J, Gawad C, Wang P L, *et al*. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733.

[10] Ye C Y, Chen L, Liu C, *et al*. Widespread noncoding circular RNAs in plants[J]. *New Phytol*, 2015, 208(1): 88–95.

[11] Zhang X O, Wang H B, Zhang Y, *et al*. Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. *Cell*, 2014, 159(1): 134–147.

[12] Hwang H J, Kim Y K. Molecular mechanisms of circular RNA translation[J]. *Exp Mol Med*, 2024, 56(6): 1272–1280.

[13] Chen X, Lu Y. Circular RNA: biosynthesis *in vitro*[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 787881.

[14] Obi P, Chen Y G. The design and synthesis of circular RNAs[J]. *Methods*, 2021, 196: 85–103.

[15] Liu C X, Chen L L. Circular RNAs: characterization, cellular roles, and applications[J]. *Cell*, 2022, 185(12): 2016–2034.

[16] Li Z, Huang C, Bao C, *et al*. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256–264.

[17] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, *et al*. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22–37.e9.

[18] Zhao J, Lee E E, Kim J, *et al*. Transforming activity of an oncoprotein-encoding circular RNA from human papillomavirus[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2300.

[19] Dunn M R, Jimenez R M, Chaput J C. Analysis of aptamer discovery and technology[J]. *Nat Rev Chem*, 2017, 1: 76.

[20] Filonov G S, Kam C W, Song W, *et al*. In-gel imaging of RNA processing using broccoli reveals optimal aptamer expression strategies[J]. *Chem Biol*, 2015, 22(5): 649–660.

[21] Litke J L, Jaffrey S R. Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(6): 667–675.

[22] Wurster S E, Maher L J 3rd. Selection and characterization of anti-NF-kappaB p65 RNA aptamers[J]. *RNA*, 2008, 14(6): 1037–1047.

[23] Jost I, Shalamova L A, Gerresheim G K, *et al*. Functional sequestration of microRNA-122 from hepatitis C Virus by circular RNA sponges[J]. *RNA Biol*, 2018, 15(8): 1032–1039.

[24] 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[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(6): 1506–1517.
[25] Schreiner S, Didio A, Hung L H, *et al*. Design and application of circular RNAs with protein-sponge function[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(21): 12326–12335.
[26] Elguindy M M, Mendell J T. NORAD-induced Pumilio phase separation is required for genome stability[J]. *Nature*, 2021, 595(7866): 303–308.
[27] 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*[J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(6): 946–955.
[28] Katrekar D, Yen J, Xiang Y, *et al*. Efficient *in vitro* and *in vivo* RNA editing *via* recruitment of endogenous ADARs using circular guide RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(6): 938–945.
[29] Wang M, Xu J, Meng J, *et al*. Synthetic circular gRNA mediated biological function of CRISPR-(d)Cas9 system[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 863431.
[30] Liu L, Li W, Li J, *et al*. Circular guide RNA for improved stability and CRISPR-Cas9 editing efficiency *in vitro* and in bacteria[J]. *ACS Synth Biol*, 2023, 12(2): 350–359.
[31] Qu L, Yi Z, Shen Y, *et al*. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1728–1744.e16.
[32] Seephetdee C, Bhukhai K, Buasri N, *et al*. A circular mRNA vaccine prototype producing VFLIP-X spike confers a broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by mouse sera[J]. *Antiviral Res*, 2022, 204: 105370.
[33] Chen C, Wei H, Zhang K, *et al*. A flexible, efficient, and scalable platform to produce circular RNAs as new therapeutics[PP/OL]. bioRxiv(2022-05-31)[2024-12-31]. http://doi.org/10.1101/2022.05.31.494115.
[34] Zhou J, Ye T, Yang Y, *et al*. Circular RNA vaccines against monkeypox virus provide potent protection against vaccinia virus infection in mice[J]. *Mol Ther*, 2024, 32(6): 1779–1789.
[35] Zhang Z, Ma B, Li B, *et al*. Cardiolipin-mimic lipid nanoparticles without antibody modification delivered senolytic *in-vivo* CAR-T therapy for inflamm-aging[PP/OL]. bioRxiv(2024-11-21)[2024-12-31]. http://doi.org/10.1101/2024.11.21.624667.
[36] Hu Q, Zhao H, Zhou K, *et al*. Scarless circular mRNA-based CAR-T cell therapy elicits superior anti-tumor efficacy[PP/OL]. bioRxiv(2022-08-05)[2024-12-31]. http://doi.org/10.1101/2024.08.05.606578.
[37] Lee C H, Han S R, Lee S W. Group I intron-based therapeutics through trans-splicing reaction[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2018, 159: 79–100.
[38] Lee K H, Kim S, Song J, *et al*. Efficient circular RNA engineering by end-to-end self-targeting and splicing reaction using *Tetrahymena* group I intron ribozyme[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, 33: 587–598.
[39] Pyle A M. Group II intron self-splicing[J]. *Annu Rev Biophys*, 2016, 45: 183–205.
[40] Belfort M, Lambowitz A M. Group II intron RNPs and reverse transcriptases: from retroelements to research tools[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(4): a032375.
[41] Lambowitz A M, Zimmerly S. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(8): a003616.
[42] Nelson J, Sorensen E W, Mintri S, *et al*. Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(26): eaaz6893.
[43] Huang D, Zhu X, Ye S, *et al*. Tumour circular RNAs elicit anti-tumour immunity by encoding cryptic peptides[J]. *Nature*, 2024, 625(7995): 593–602.
[44] Loan Young T, Wang K C, James Varley A, *et al*. Clinical delivery of circular RNA: lessons learned from RNA drug development[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, 197: 114826.



[专家介绍] 杨赟：博士，上海环码生物医药有限公司联合创始人、董事长兼首席技术官。先后在浙江大学获得生物信息学学士学位、分子生物学和生物化学专业博士学位，在美国北卡罗莱纳大学教堂山分校和加州大学洛杉矶分校完成博士后研究工作。

拥有近 20 年 RNA 研究经历，研究高等真核生物的 RNA 加工和翻译调控，围绕中心法则揭示在 RNA 水平上扩增蛋白质多样性的分子机制并解析其生理功能，从而为相关疾病的机制研究和药物开发提供理论依据，并开展相关技术的应用转化。在 RNA 二级结构介导的 RNA 编辑和可变剪接领域，解析了 RNA 二级结构决定位点特异性 A-to-I RNA 编辑的机制，揭示了竞争性 RNA 互补配对结构介导 mRNA 互斥可变剪接的分子机制及其普适性。在环状 RNA 领域，首次揭示了体内环状 RNA 翻译的分子机制，并开发了环状 RNA 翻译优化体系和体外合成方法，为环状 RNA 药物的研发提供了理论基础和技术平台。

自 2007 年以来在 *Nat Struct Mol Biol*, *Nat Commun*, *Cell Res*, *Nucleic Acids Res*, *J Clin Invest* 等杂志发表研究论文近 30 篇，参与编撰专著 2 部。中科院青年创新促进会会员，曾任中科院上海营养与健康研究所副研究员。曾主持国家基金委面上项目、重大研究计划培育项目和上海市科委的项目多项，并获得上海市科技启明星、张江生命健康产业年度新锐奖等多项荣誉。

（责任编辑：康银花）