

DOI: 10.13376/j.cblls/2025115

文章编号: 1004-0374(2025)09-1192-11

· 情报研究 ·

基于专利数据的RNA编辑技术研究进展

田 颖, 马艳林*

(国家知识产权局专利局专利审查协作北京中心, 北京 100160)

摘 要: RNA 编辑是靶向转录后 RNA 序列的基因编辑技术, 因其高度的安全性和灵活性, 成为当前基因编辑领域备受瞩目的研究热点。本文通过分析 RNA 编辑技术专利, 包括专利申请人和各技术分支具有代表性的专利来总结该技术的发展趋势。本综述旨在从专利情报视角为研究人员提供信息和启示, 推动 RNA 编辑在生命科学与医学领域的持续进步。

关键词: RNA 编辑; 基因编辑; Cas13; 专利技术

中图分类号: Q78; G255.53 **文献标志码:** A

Research progress in RNA editing technology based on patents data

TIAN Ying, MA Yan-Lin*

(Patent Examination Cooperation (BEIJING) Center of the Patent Office, CNIPA, Beijing 100160, China)

Abstract: RNA editing is a gene-editing technology that targets post-transcriptional RNA sequences. Due to its high safety and flexibility, RNA editing has gradually become a popular research topic in the field of gene editing. This article analyses the patent trends, summarizes key applicants, important patents, and representative patents in each technical branches. This review aims to provide researchers with new insights from the perspective of patent intelligence, promoting the continued advancement of RNA editing in the fields of life sciences and medicine.

Key words: RNA editing; gene editing; Cas13; patent technology

2013 年以来, CRISPR-Cas9 介导的 DNA 编辑技术在基础研究、基因治疗、农业育种、生物合成领域展现出了广阔的应用前景和非凡的潜力, 然而其脱靶效应和可能导致的基因组永久性改变引发了安全性和伦理性考量, 成为 DNA 编辑技术运用于临床治疗的制约因素。鉴于此, 研究人员积极探索其他不涉及基因组永久性改变的编辑策略, 如表观编辑和 RNA 编辑技术。

RNA 作为将 DNA 的遗传信息传递给蛋白质的信息载体, 在生物体中天然存在调控机制。自然过程下的 RNA 编辑现象指转录后对 RNA 核苷酸序列的修改, 包括碱基替换、核苷酸的插入和删除等过程^[1]。哺乳动物细胞中广泛存在腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase acting on RNA, ADAR), 催化位点特异性的 A (腺嘌呤核苷) 到 I (肌苷, 功能性模拟鸟嘌呤核苷) 变化。在高等植物的线粒体和叶

绿体 mRNA, 以及有袋动物和大鼠的 tRNA 中均观察到 C (胞嘧啶) 到 U (尿嘧啶) 的碱基替换^[2-3]。锥虫等低等生物中多出现 U 的插入和删除, 使得 RNA 序列移码^[4]。

工程化的 RNA 编辑技术利用蛋白质或核酸实现 RNA 序列的改变, 包括单碱基编辑和外显子编辑^[5]。单碱基编辑对应于自然状态下的 RNA 编辑, 即 RNA 序列上单碱基的替换、核苷酸插入或删除, 不包括 RNA 剪接和聚腺苷酸化等过程^[1]。外显子编辑主要包括反式剪接^[6-7]和外显子跳跃技术^[8]。RNA 编辑技术能够通过单碱基编辑或外显子编辑改变 RNA 序列, 治疗由 RNA 突变引起的疾病, 补偿致病突变, 保证正常蛋白质得以合成。

收稿日期: 2024-12-27; 修回日期: 2025-03-27

*通信作者: E-mail: mayanlin@cnipa.gov.cn

相较于 DNA 编辑, RNA 编辑是转录后水平的、不可遗传的, 在基因治疗方面具有明显的安全性优势。目前, 多个 RNA 编辑疗法已进入临床试验阶段, 突显了该技术在基因治疗中的巨大潜力。新加坡 Wave Life Sciences 公司与葛兰素史克合作研发了治疗 α -1 抗胰蛋白酶缺乏症的 RNA 编辑疗法 WVE-006, 已于 2023 年 10 月公布临床数据。美国 Ascidian Therapeutics 公司研发的治疗 Stargardt 病的 RNA 外显子编辑疗法 ACDN-01, 于 2024 年 1 月获新药研究批准。我国辉大(上海)生物科技有限公司研发的治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的 RNA 编辑疗法 HG202、治疗儿科罕见病 MECP2 重复综合征的 HG204, 分别在 2023 年 9 月和 2024 年 12 月进入临床阶段。除此之外, 美国 RNA 编辑公司 Shape Therapeutics 与罗氏合作, 荷兰 ProQR 公司与礼来合作, 积极开发 RNA 编辑疗法的新药; 国内的博雅辑因生物科技有限公司、时夕(广州)生物科技有限公司以及锐正基因(苏州)有限公司等, 均积极推进 RNA 编辑疗法的研究与开发。这些合作与研发活动不仅彰显了 RNA 编辑技术在遗传性疾病治疗中的潜力, 也突显了全球范围内对于该领域创新疗法的迫切需求和积极布局。

本文聚焦于靶向 RNA 的编辑技术, 从专利文

献角度进行大数据分析和技术进展综述。

1 专利文献数据可视化分析

1.1 数据来源

本文中的专利数据来自北京合享智慧 incoPat 数据库^[9], 通过 RNA 编辑、外显子编辑、反式剪接等关键词在数据库中对相关专利文献进行检索, 人工清洗排除噪声后共获得 740 条专利(合并简单同族)。需要说明的是, 检索结果中的部分专利技术涉及针对靶 RNA 序列进行核酸酶切割、裂解、敲降或沉默的技术, 属于传统意义上的 RNA 调控技术而非 RNA 编辑技术, 故并未被纳入本文所聚焦的“RNA 编辑”范畴。对 740 条专利逐一浏览, 按技术分支进行标引。数据获取日期截至 2024 年 12 月 6 日。由于专利文献的公开相对于申请具有一定的时间滞后性, 因此 2023—2024 年申请量少于实际申请量。

1.2 专利文献分析

1.2.1 申请趋势

经分析, 全球范围内 RNA 编辑技术相关专利申请的趋势如图 1 所示。目前, RNA 编辑技术的研究仍处于上升阶段, 其发展分为萌芽期、初步增长期、快速增长期三个阶段。

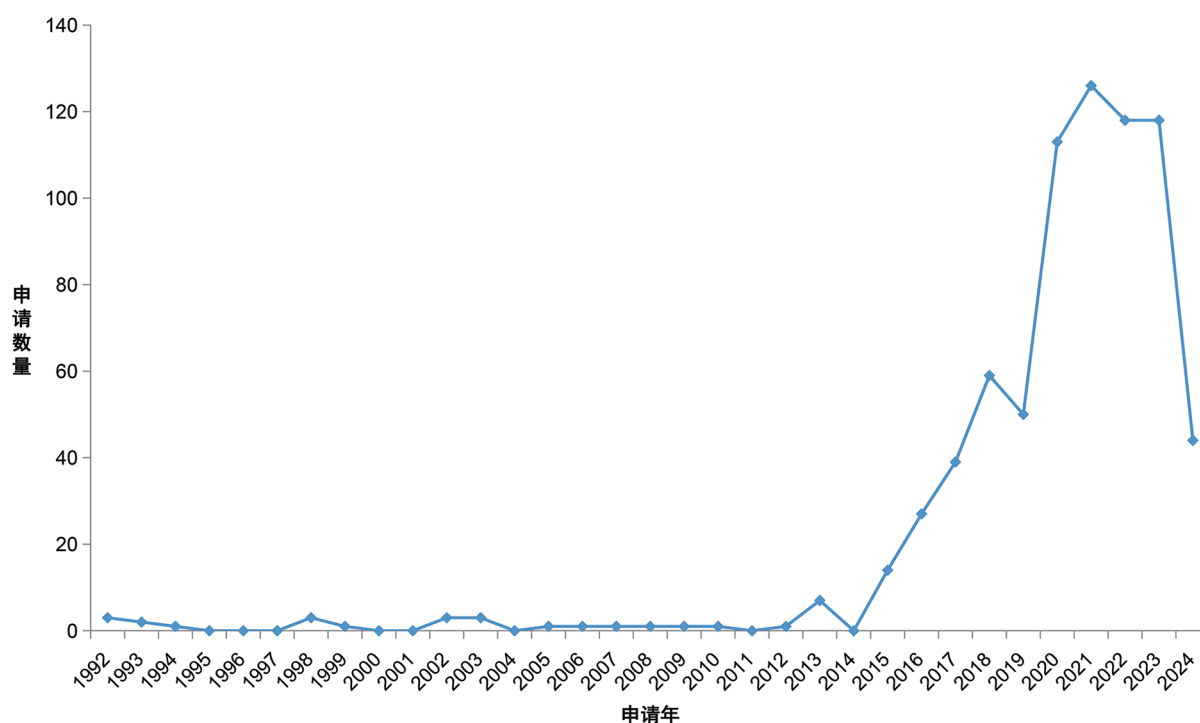


图1 RNA编辑领域全球专利申请趋势

第一个阶段为 1992—2014 年的萌芽期, 年均申请数量均在个位数, 零星涉及改变 RNA 序列的工具。专利 CA2100068A1 (1992 年申请) 设计了自催化反式剪接的核酶, 能够以高度精确的方式将新的外显子序列有效剪接到任何靶 RNA 中。专利 US5389514A (1992 年申请) 从细胞核中提取出能够特异性将 RNA 靶序列中的 U 转化为 C 的 RNA 编辑组分。之后又有介导 RNA 碱基 A-I 转化的 ADAR 酶 (WO2010064231A1, 2010 年申请)、外显子置换与稳定化的人工 RNA (WO2014011050A1, 2013 年申请) 等专利申请, 为基于 ADAR 酶的单碱基编辑和基于反式剪接的外显子编辑技术奠定了基础。专利 US9650627B1 (2013 年申请) 通过外源引入 ADAR 酶定位至靶 RNA 序列实现了 A-I 的定点编辑。

第二个阶段为 2014—2019 年的初步增长期, 申请数量明显提升。随着一系列靶向 RNA 的 Cas 蛋白的发现, 如 WO2016106236A1 (2015 年申请) 的新杀手弗朗西斯菌 Cas9 (*Francisella novicida* Cas9, FnCas9)、WO2016205764A1 (2016 年申请) 的 Cas13 (C2c2)、US20170145394A1 (2016 年申请) 的化脓性链球菌 Cas9 等, 涌现出大量基于 CRISPR-Cas 技术的 RNA 编辑系统的专利申请。同时, 由于 RNA 编辑技术备受关注, 多种不依赖 CRISPR 将 ADAR 酶定位或招募至靶序列的途径也成为研究的新方向, 使得非基于 CRISPR-Cas 实现 RNA 编辑的技术同样得到拓展。

第三个阶段为 2020 年至今的快速增长期, 随着 CRISPR-Cas13a 系统的发展和应用 RNA 编辑技术在疾病治疗领域的新探索, 相关专利申请的数量出现了爆发式增长。针对第二阶段所开发出的种种平台技术或 Cas 工具进行改进、升级、优化, 以及将之应用于具体适应证治疗的专利申请大量出现, 同时针对外显子编辑的技术发展迅速, 与单碱基编辑共同构成 RNA 编辑应用于临床治疗的两种主要机制。

1.2.2 国家/区域分析

图 2 展示 RNA 编辑领域的申请人国家分布情况。美国、中国的申请数量遥遥领先于他国, 分别占比 47%、19%。技术来源国排名第三、四、五位的国家是英国、新加坡、荷兰。其中, 荷兰的专利申请量主要由荷兰 ProQR 公司贡献, 新加坡的专利申请量主要由 Wave Life Science 公司贡献, 两者均为 RNA 编辑领域的重要企业。

图 3 显示了全球主要地区间技术流向, 左侧为

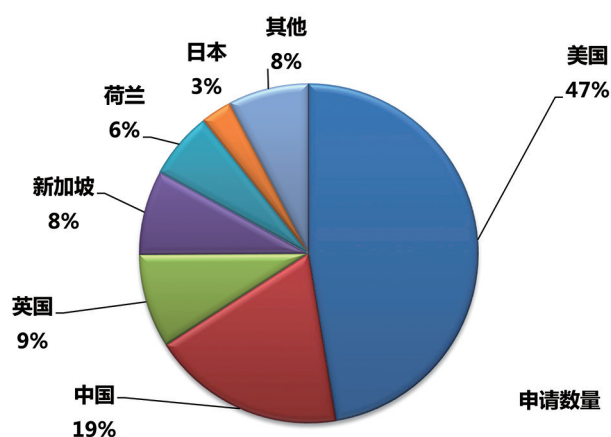


图2 RNA编辑领域技术来源国分布

主要技术来源国, 右侧为专利公开国/地区, 反映了主要技术来源地和主要布局市场之间的技术流向。可以看出, 主要的技术来源国是美国、中国、荷兰、英国。美国申请人除向美国专利商标局 (US) 递交申请外, 一半以上通过 PCT 途径向世界知识产权组织 (WO) 递交申请, 同时在加拿大 (CA)、中国 (CN、HK)、日本 (JP) 均有布局。中国申请人也有部分进行海外布局, 主要为世界知识产权组织 (WO) 和美国 (US)。

1.2.3 主要申请人

对专利申请数量在 10 件以上的 17 位全球主要申请人分析, 结果见图 4。从图中可以看出, 荷兰的 ProQR 公司 (ProQR Therapeutics II B.V) 拥有最多的专利申请量, 随后依次是麻省理工学院、博德研究所 (Broad 研究所)、Wave Life Sciences Ltd 公司等, 而中国的博雅辑因排名第五。从前 17 位申请人和申请量的情况可以看出, RNA 编辑的原研机构集中在美国、荷兰和中国的生物制药公司和大学研究机构, 其中制药公司超过半数, 说明 RNA 编辑技术研究成果转化迅速, 在医药领域有良好的市场前景。

图 5 显示出领域内申请人类别的变化趋势, 可以看出, 2014—2019 年间, 初期申请人以企业和学校或科研机构为主, 后期学校和科研机构申请人的数量明显上升, 表明这一阶段的研发主要停留在开发工具层面, 尚未大批量进入应用领域。而在 2020—2024 年间, RNA 编辑技术所展现出的巨大潜力和商业价值开始驱动商业化公司的发展, 此阶段申请人呈多元化且快速增加的趋势, 其中, 企业的数量激增并远超学校或科研机构, 各类基因编辑公司走上发展快车道。Intellia Therapeutics 公司于

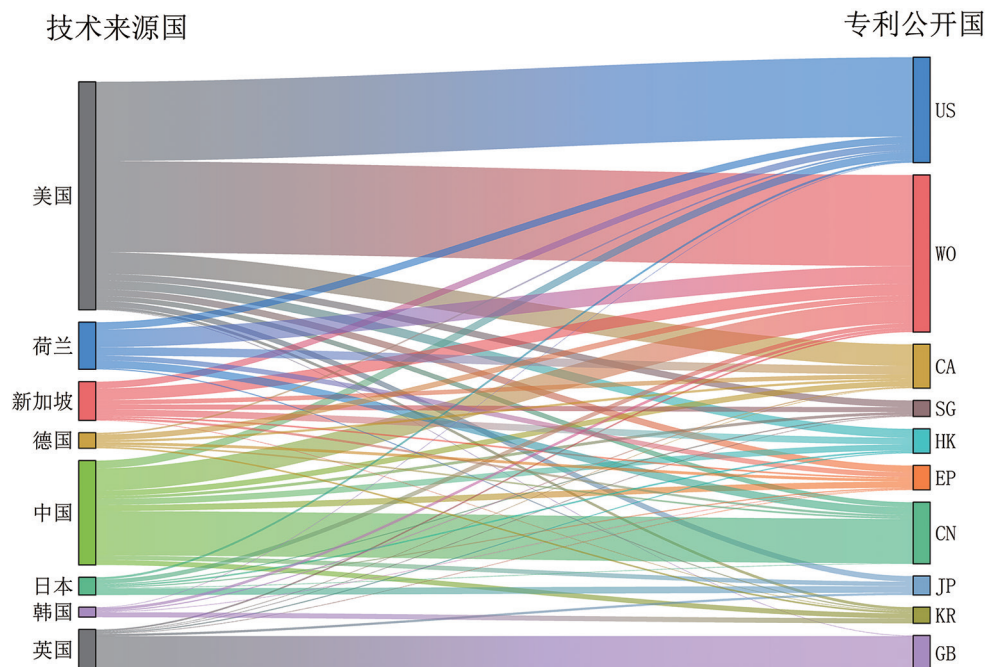


图3 RNA编辑领域专利申请全球主要地区间技术流向

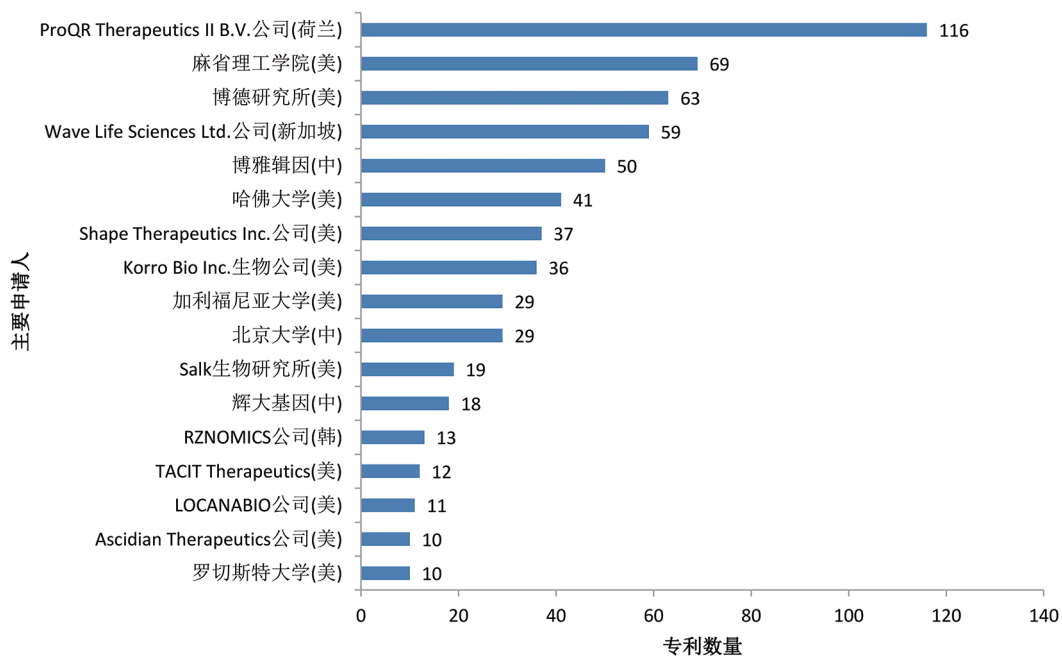


图4 RNA编辑领域全球重点申请人

2021 年首次证明 CRISPR 基因编辑可以直接在人体内发挥作用, 多家基因编辑公司因此股价上涨, 还有许多公司在探索新型基因编辑技术。其中, ProQR 公司、博雅辑因、Shape Therapeutics 公司和 Wave Life Sciences Ltd 公司在基于 ADAR 的 RNA 编辑疗法上都研发了自己的编辑系统平台, 并有系列专利授权, 具有领先的技术优势。Ascidian Therapeutics

公司在反式剪切领域具有突破性进展, 也已经进入临床阶段。ProQR 公司、Shape Therapeutics 和博雅辑因于 2021 年与礼来、罗氏 (Roche) 等公司先后达成高额融资合作。

1.2.4 国内主要申请人

图 6 显示出我国专利申请数量排名前十位的主要申请人, 既有高校和科研院所, 也有生物技术

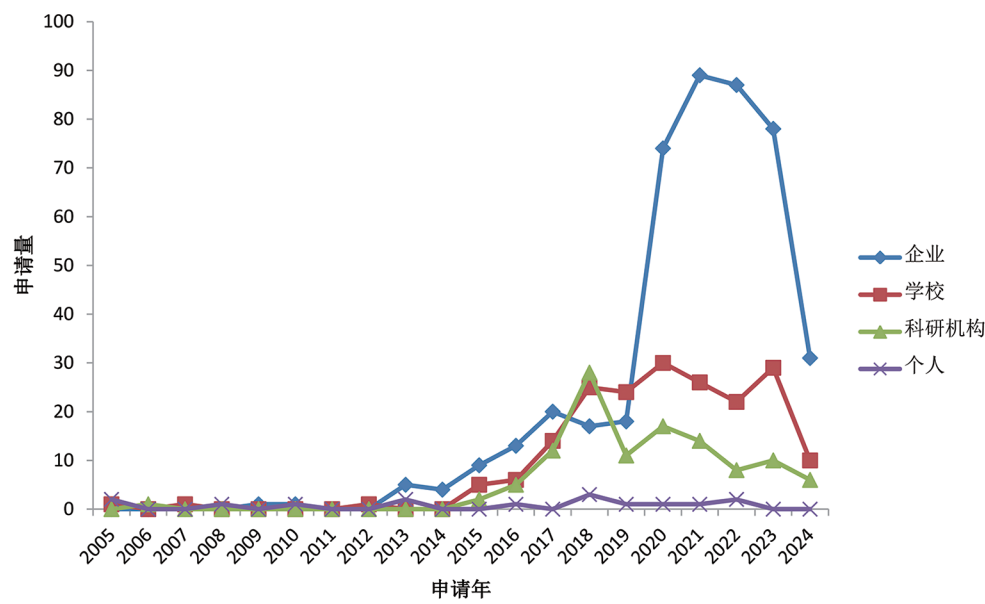


图5 RNA编辑领域申请人类型趋势

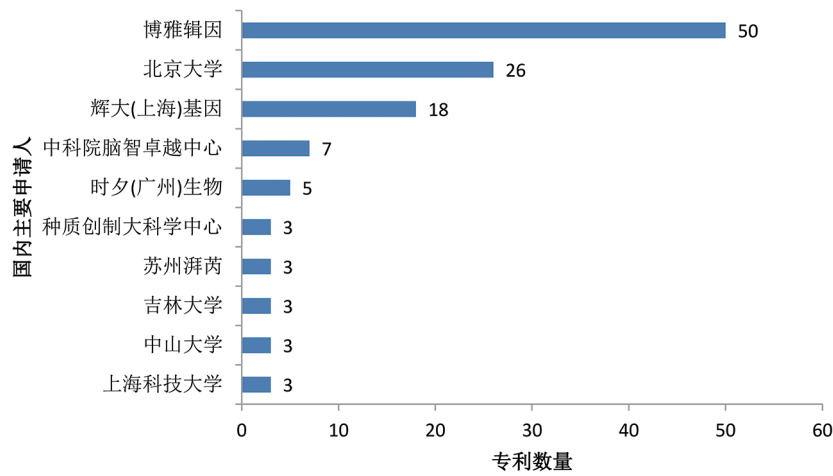


图6 RNA编辑领域国内重点申请人

公司。

以北京大学、中国科学院为代表的高校或科研机构，在开发和优化 RNA 编辑工具方面拥有平台性技术，并相继得到授权和转化。例如北京大学开发的 LEAPER (long-term efficient and precise RNA editing) 技术，通过工程化的环状 RNA 招募细胞内源脱氨酶实现精准的 RNA 编辑，避免了递送困难和脱靶编辑问题。中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心 (简称中科院脑智卓越中心) 开发了小尺寸 Cas13X/Y，极大地提高了系统的递送效率。

生物技术公司的主要创新优势在于转化应用。博雅辑因以 LEAPER 核心技术为平台，提出一系列基于 LEAPER 在靶细胞中进行 RNA 编辑

实现治疗的专利，授权专利包括 CN113122524B、CN113631708B、CN113528582B 等；尚未审结的专利申请包括 CN113122577A、CN116515814A 等，该公司 2020 年已将 RNA 编辑技术转化到临床，开发了治疗 β 地中海贫血的基因编辑疗法，并在 2022 年分别与波士顿儿童医院和北京大学肿瘤医院等单位进行合作，将该疗法产业化。辉大 (上海) 生物科技有限公司基于 Cas13X/Y 优化 RNA 碱基编辑器，提高靶向编辑效率，授权专利包括 CN116096875B、CN115427561B 等；尚未审结的专利申请包括 CN118109438A、CN118159662A、CN1164-90615A、CN118749029A 等。该公司的授权专利已经进行了临床转化，其 HG202、HG204 疗法走出

国门,已获得美国FDA和欧洲EMA的孤儿药认证。时夕(广州)生物科技有限公司聚焦于靶向RNA编辑的单链反义寡核苷酸ASO、开发ADAR底物候选序列结构的技术,申请专利CN118737260A、CN118853661A等。目前该公司针对神经系统疾病的治疗技术,已完成前期分子的研究,正在临床前阶段。

2 技术进展

基于定位机制,将RNA编辑技术分为基于CRISPR-Cas和非基于CRISPR-Cas两个技术分支。每个技术分支下进一步划分二级分支,具体分解如表1所示,每个分支列举出重点的代表性技术。

2.1 基于CRISPR-Cas系统的RNA编辑

CRISPR-Cas是近年来DNA基因组编辑领域的主流技术,起源于细菌对外来病毒的防御机制,后经人工改造,使得Cas蛋白在sgRNA的引导下找到目标靶序列,随后Cas核酸酶对靶序列进行切割。使用专门靶向RNA的Cas蛋白与不同类型的效应物结合,即可设计基于CRISPR-Cas的RNA编辑工具。

2.1.1 靶向RNA的Cas蛋白

继Cas9的DNA编辑技术在治疗遗传疾病、农业育种等多个领域展现出巨大应用潜力后,CRISPR的创始人加州大学Doudna团队、Broad研究所张锋团队,以及世界各国多家研究团队,均进一步开发了专用于RNA靶向的Cas家族成员。

加州大学于2016年发现专门靶向RNA的Cas9蛋白(RNA-targeting Cas9, RCas9),其设计了一种被称为PAMmer的短寡核苷酸来提供RCas9识别的PAM基序,使RCas9定向识别并结合到单链RNA分子的特定位点上编辑^[10]。

Broad研究所开发了一系列RNA靶向Cas蛋白,在2015年申请FNCas9专利^[11]和Cas13a专利^[12],2016年申请Cas13b专利^[13]。Cas13能够与成熟的crRNA形成复合物,在不借助tracrRNA的情况下与单链RNA结合,而crRNA则会与类似PAM序列的PFS序列结合,并对单链RNA切割。传统的Cas13a、Cas13b通常约1200aa,尺寸较大,2020年,Broad研究所又发现了超小型的长900aa以内的Cas13bt^[14]。

中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心的

表1 技术分解表和代表性技术

一级分支	二级分支	重点技术	创新主体
基于CRISPR-Cas	靶向RNA的Cas蛋白	FNCas9、Cas13a/b/c/d	Broad研究所
基于CRISPR-Cas	靶向RNA的Cas蛋白	NCas9	加州大学
基于CRISPR-Cas	靶向RNA的Cas蛋白	Cas13X/13Y	中科院脑智卓越中心
基于CRISPR-Cas	A to I 定点编辑	REPAIR (v1/v2版本)	Broad研究所
基于CRISPR-Cas	A to I 定点编辑	REPAIRx	上海科技大学
基于CRISPR-Cas	A to I 定点编辑	xABE、mxABE	中科院脑智卓越中心
基于CRISPR-Cas	C to U 定点编辑	RESUCE、RESCUE-S	Broad研究所
基于CRISPR-Cas	C to U 定点编辑	CURE (C/N/X三版本)	上海科技大学
基于CRISPR-Cas	C to U 定点编辑	xCBE、mxCBE	中科院脑智卓越中心
基于CRISPR-Cas	反式剪接	Cas13介导反式剪接	Broad研究所
非基于CRISPR-Cas	外源ADAR酶介导	ADAR-λN	美国波多黎各大学
非基于CRISPR-Cas	外源ADAR酶介导	ADAR-SNAP	德国杜宾根大学
非基于CRISPR-Cas	内源ADAR酶介导	RESTORE、CLUSTER	德国杜宾根大学
非基于CRISPR-Cas	内源ADAR酶介导	含靶向区、招募区的gRNA	ProQR公司
非基于CRISPR-Cas	内源ADAR酶介导	招募区为双链结构gRNA	ADARx Pharmaceuticals
非基于CRISPR-Cas	内源ADAR酶介导	环化gRNA	加州大学圣地亚哥分校
非基于CRISPR-Cas	内源ADAR酶介导	AIMer	Wave Life
非基于CRISPR-Cas	内源ADAR酶介导	单链反义核苷酸AON	ProQR公司I
非基于CRISPR-Cas	内源ADAR酶介导	LEAPER1.0/2.0	北京大学/博雅辑因
非基于CRISPR-Cas	反式剪接	RNA exon editing platform	Ascidian Therapeutics
非基于CRISPR-Cas	反式剪接	RNA replacement enzyme	Rznomics公司
非基于CRISPR-Cas	外显子跳跃	外显子跳跃	Wave Life公司
非基于CRISPR-Cas	其他编辑方法	CIRTS	美国芝加哥大学

杨辉研究组在 2020 年申请专利^[15], 涉及尺寸极小的、不超过 900 aa 的 Cas13X/ 或 Cas13e、Cas13Y/ 或 Cas13f, 不仅便于 AAV 包装, 同时在与核定位系统 (NLS) 联用时具有非常高的靶向敲除 RNA 活性。

浙江大学杭州国际科创中心姚远团队于 2023 年申请专利^[16], 报道其采用 BT-IT 融合技术, 通过智能挖掘算法对微生物宏基因组数据进行大规模挖掘, 发现极小型 Cas13j 蛋白可进行高效的体内 RNA 编辑, 长度可达 500 aa 以下。

目前, Cas13 家族是 RNA 靶向系统中的常用工具, 而 Cas13a、Cas13b 等蛋白的尺寸较大, 易成为 AAV 病毒载体包装和递送的制约因素, 挖掘更小尺寸的 Cas13 蛋白可以为这一瓶颈提供新的解决方案。

2.1.2 A to I 定点编辑

动植物体中天然存在的 ADAR 酶可实现 RNA 特异性位点的 A to I 编辑, 因此在 CRISPR-Cas 系统中用 ADAR 脱氨酶活性域取代 Cas 的切割酶活性域, 即可实现 A to I 的定点编辑。

基于这一机制, Broad 研究所于 2017 年提出一种基于 CRISPR-Cas13 的 RNA 编辑系统^[17], 命名为 REPAIR (RNA editing for programmable A to I replacement)。REPAIR 系统由 Cas13-ADAR 融合蛋白和 gRNA 组成, 将切割酶活性域失活的 Cas13 与人 ADAR2 脱氨酶结构域融合, gRNA 与 Cas13 蛋白形成复合物, 引导所述复合物结合至靶 RNA 形成 RNA 双链体, 其中向导序列在对应 A 的位置设置为错配的 C, 随后 ADAR 脱氨酶催化所述 RNA 双链体中的所述 A 脱氨转化为 I。REPAIR 发布了 2 个版本, REPAIRv1 的 ADAR2 酶具有 E488Q 突变; 优化后的 REPAIRv2 具有 E488Q/T375G 双突变, 相较于 REPAIRv1 降低了脱靶率, 但同时也极大地影响了编辑效率, 仍然存在不容忽视的弊端。

REPAIR 系统的弊端之一是所使用的 Cas13 自身体积较大, 不利于 AAV 载体的包装和递送。上海科技大学刘亚京团队于 2019 年申请专利^[18], 在 REPAIR 的基础上将其中的 Cas13b 替换为另一种较小型的 RNA 靶向酶 CasRx, 优化得到 REPAIRx。CasRx 只有 954 个氨基酸, 是当时已知的最小 Cas 蛋白。REPAIRx 系统将 ADAR 融合在 dCas13Rx 蛋白中间位置, 融合蛋白在 gRNA 的引导下定位至目的位点, 并且, 包裹在 ADAR 蛋白两端的 dCasRx 能够阻碍 ADAR 对非靶向 RNA 的结合, 从而降低非靶向性的脱靶效应, 精确且高效。不同长度的

gRNA 和 spacer 靶向 mRNA 或核内 RNA 时, REPAIRx 都优于其他的 REPAIR 版本。

循着尺寸越小越有助于包装递送思路, 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心杨辉团队与辉大 (上海) 生物公司基于 Cas13X.1 开发了 A to I 的碱基编辑器 xABE 和迷你版 mxABE, 将 dCas13X.1 (775 aa) 与 mini dCas13X.1 (445 aa) 与 ADAR 融合即形成 xABE/mxABE。辉大 (上海) 生物公司基于其自主研发的 RNA 碱基编辑器治疗 Q829X 突变相关的儿童听力损失疗法已获得美国 FDA 的孤儿药和儿科罕见病药物资格双认定。

2.1.3 C to U 定点编辑

天然的 ADAR 酶仅介导 A to I 单碱基转化, 无法实现其他类型的碱基转化。为拓展 RNA 定点编辑的碱基类型, Broad 研究所于在 2018 年申请专利^[19-20], 推出新一代 ADAR 脱氨酶, 在保留 A to I 编辑活性的同时兼具 C to U 编辑活性, 以此为核心的编辑技术被命名为 RESCUE (RNA editing for specific C to U exchange), 具备了更为广泛的应用场景。为降低 RESCUE 的脱靶率, 发明人进一步改造 ADAR 酶以提升催化特异性, 将系统升级为 RESCUE-S^[21], 后者的 ADAR 酶因具有 S375A 突变而获得了降至 1/10 的 A to I 脱靶率, 同时在 C to U 活性方面与 RESCUE 相当, 甚至超过 RESCUE。

除了对 ADAR 酶改造以获得 C to U 编辑活性, 该类型的碱基转化还可依赖于 APOBEC3A 酶 (胞嘧啶脱氨酶, 简称 A3A)。上海科技大学池天团队在 2020 年基于人 A3A 酶与 dCas13 融合制备了特异性 C to U 编辑器, 命名为 CURE (C-to-U RNA editor) 系统^[22]。CURE 系统使用非常规 gRNA 诱导靶点形成短环以模仿自然的靶点结构, 以实现针对 C 的定点编辑。CURE 系统专一作用于 C 而不影响 A, 且在某些位点上的 C 编辑效率比 RESCUE-S 更高, 具有独特的优势。

中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心与辉大 (上海) 生物公司作为 Cas13X.1 发明人, 于 2020 年基于 Cas13X.1 和具有 C to U 活性的 ADAR 融合开发了 C to U 编辑器 xCBE/mxCBE^[23]。xCBE/mxCBE 相较于 RESCUE-S 系统, 不仅具有 Cas13X.1 所带来的尺寸优势, 同时在内源性靶点中也显示出更高的编辑效率和降低的脱靶率, 在 AAV 递送的基因疗法中具有较大的应用潜力。

2.1.4 反式剪接

反式剪接 (trans-splicing) 与转录中常见的顺式

剪接 (cis-splicing) 过程不同。顺式剪接在同一条 pre-mRNA 分子内部切除内含子, 从而将外显子拼接形成成熟 mRNA; 而反式剪接将两个或两个以上的前 mRNA (pre-mRNA) 分子剪接形成一个成熟的 mRNA, 从而产生含有不同来源外显子的嵌合 RNAs。利用反式剪接技术, 可实现 RNA 外显子的大范围编辑或重写。针对那些外显子大范围突变而导致蛋白质翻译异常的疾病, RNA 反式剪接技术能够去除含有突变的外显子, 用健康的外显子取代它们。

Broad 研究所基于其掌握的众多 CRISPR-Cas 核心技术的优势, 于 2021 年开发了 CRISPR-Cas 介导的反式剪接技术^[24], 对前体 mRNA 进行序列编辑, 该编辑系统包含无切割酶活性的 Cas 蛋白和反式剪接供体构建体, 所述反式剪接供体构建体包含一个 guide、内含子、剪接受体 (SA)、供体 (SD) 和 polyA 尾。dCas13b 经由 crRNA 的靶向指导与靶前体 mRNA 结合, 实现针对 mRNA 的反式剪接。

CRISPR-Cas 介导的反式剪接结合了 CRISPR 的靶向能力和反式剪接的特性, 具有特异、灵活的独特优点, 但仍需要解决反式剪接效率不高、设计复杂、存在细菌源免疫原性等问题。

2.2 非基于CRISPR/Cas的RNA编辑

早在 CRISPR-Cas 技术面世之前, 已有人工设计的 RNA 编辑工具出现, 并在 CRISPR-Cas 面世之后得到催化。CRISPR-Cas 的相对较大尺寸递送困难、源自细菌的 Cas 蛋白可能引发的免疫原性问题等, 也限制其在某些场景中的应用, 因此, 研究人员积极开发一系列非基于 CRISPR-Cas 系统的 RNA 编辑工具, 以期拓展 RNA 编辑的应用范围。

2.2.1 外源ADAR酶介导的定点编辑

ADAR 酶包括 N 端的 dsRNA 识别结构域 (dsRNA binding domain, dsRBD) 与 C 端的脱氨酶结构域 (deaminase domain, DD), dsRBD 负责识别 RNA 序列及结构, DD 负责脱氨反应。在不使用 CRISPR-Cas 的情况下, 关键技术手段就是如何解除 ADAR 的 dsRBD 识别限制, 使之能根据需要定位到靶 RNA 位点。

美国波多黎各大学的 Rosenthal 团队 2013 年提出将 ADAR 与 λ N 肽 (λ 噬菌体 RNA 结合蛋白) 结合, 构建 ADAR- λ N 融合蛋白^[25]。 λ N 肽能特异性识别具有特定结构的 RNA 序列 boxB, 在靶 mRNA 的 3' 端添加 boxB 序列, 则成功实现靶 RNA 的定点突变。

德国杜宾根大学的 Stafforst 团队 2014 年构建了 ADAR 与 SNAP-tag 融合的蛋白并设计 5' BG-gRNA (guide RNA), 利用 SNAP-tag 与 BG (苄基鸟嘌呤) 的共价连接形成 gRNA-ADAR 的化学偶联物, 实现编辑^[26]。这一技术的缺点是携带 SNAP- 标签的 ADAR 酶和 5'-BG 修饰的 RNA 均非天然存在的, 需要在体外制备后才能转染到细胞中, 流程费时费力且递送困难, 仍需进一步探索利用细胞内源性 ADAR 的技术。

2.2.2 招募内源ADAR的定点编辑

Ribozyme 公司早在 1995 年即报道了一种 RNA 编辑技术, 利用长度为 25~52 nt 的反义 RNA 寡核苷酸招募内源性 ADAR, 实现 RNA 的 A to I 编辑^[27]。然而该编辑严重缺乏特异性, 与反义寡核苷酸互补的靶 RNA 链中的几乎所有 A 均被编辑。如此低的特异性并不符合临床需求, 在接下来的长达 20 年间, 利用核酸分子招募内源 ADAR 这条路几乎无人问津。

2015 年, ProQR 公司再次提出基于寡核苷酸构建体招募内源性 ADAR^[28]。所述寡核苷酸构建体包含与靶 RNA 互补的靶向部分和结合细胞内天然存在的 ADAR 酶的招募部分, 从而实现定点编辑。为了防止非特异性的编辑, 寡核苷酸构建体中与靶序列相对位置处的核苷包含 2'- 甲氧基化学修饰。为进一步提高编辑效率, ProQR 公司还研究了一系列更复杂的化学修饰方案^[29-31]。

无独有偶, Stafforst 团队在 2015 年提出了类似的利用引导 RNA 招募内源性 ADAR 的技术^[32], 2018 年优化使引导 RNA 具有密集的化学修饰, 大大提高编辑效果, 命名为 RESTORE (recruiting endogenous ADAR to specific transcripts for oligonucleotide-mediated RNA editing) 技术^[33]。2021 年, RESTORE 技术进一步升级, 增加了 3~10 个募集序列簇, 具有更高的编辑效率和精确性, 被称作 CLUSTER^[34]。团队还专门设计了一套电脑程序 Recommunation Cluster Finder (RCF), 用于筛选招募部分序列。

针对引导 RNA 的设计与改进策略展现出了多样化的研究方向。ADARx Pharmaceuticals 公司在 2021 年申请的专利^[35]中描述了由靶向区和募集区组成的 gRNA, 其中募集区是由双链 RNA 互补形成的分子间结构, 靶向区和募集区包含大量化学修饰。同年, 加州大学圣地亚哥分校 Mali 团队发现, 使用共价闭环结构的 cadRNA 能够保护其不受核酸外切酶影响、提高 RNA 编辑效率^[36]。Wave Life

Sciences Ltd 公司提出靶向 A 碱基的寡核苷酸(AIMer), 使得 ADAR 酶被引导到特定的靶 RNA 上, 实施定点编辑^[37]。

招募内源性 ADAR 的 RNA 编辑技术不需要表达任何外源蛋白, 只需要表达一条短短数十个核苷酸长度的反义 RNA 即可, 这一独特的优势吸引了越来越多的研究人员的目光。我国的科研机构在该技术领域作出了重大贡献, 推动了该领域的发展。北京大学/博雅辑因的魏文胜团队于 2019 年提出一种 LEAPER (leveraging endogenous ADAR for programmable editing of RNA) 的 RNA 编辑系统, 使用特殊设计的 arRNA 招募内源性 ADAR, 实现 A to I 的定点编辑^[38]。LEAPER 系统能通过质粒、病毒和电穿孔等多种方法进行递送, 且效率高、脱靶率低, 在递送和免疫原性方面均具有优势。LEAPER 在遗传疾病治疗领域的作用也得到充分验证, 如 Usher 症^[39]、MPS IH 症^[40]、Hurler 综合征^[41]。2022 年, LEAPER 平台升级至 2.0 版本, 使用环状的 arRNA 来招募 ADAR, 使得 arRNA 稳定性更高, 提高了编辑效率, 同时在 arRNA 中引入了特殊设计的错配, 降低了脱靶编辑。LEAPER 2.0 的平均编辑效率相比于前一版本提升了超过 3 倍, 并且可维持长达近半个月的有效编辑^[42]。

2.2.3 反式剪接

专注于 RNA 疗法的美国初创公司 Ascidian Therapeutics 在 2019 年申请的专利^[43]中开创了基于 RNA 反式剪接的外显子编辑技术, 利用这一技术校正了 ABCA4 基因的致病突变, 治疗 Stargardt 病。该公司的平台可以重写外显子, 从而提供更强大和通用的 RNA 编辑。

韩国 Rznomics 公司于 2019 年提出一种基于 RNA 替代酶 (RNA replacement enzyme) 的 RNA 替换技术, 基于 RNA 替代酶的反式核酶活性, 通过两次连续的转酯反应, 将靶标 RNA 序列替换为治疗性 RNA 分子^[44]。

2.2.4 外显子跳跃

Wave Life Sciences 于 2018 年提出基于外显子跳跃的 RNA 编辑疗法^[45-46]。杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 的致病机理之一是 DMD 基因的外显子突变导致第 51 号外显子不能与第 53 号外显子连接。该公司在研的外显子跳跃疗法, 可跳过缺陷外显子, 恢复阅读框, 以产生较短但至少部分功能性的 DMD 蛋白。外显子跳跃疗法的核心在于通过设计的立体 ASO 与需要跳

读的外显子 (例如 51 号或 53 号) 附近的 RNA 序列相结合, 阻止其被包在成熟 mRNA 中, 从而跳过特定的外显子, 改变剪接过程。

2.2.5 其他编辑方法

除此之外, 阅读专利文献可发现若干不能明确归属于上述技术分支的 RNA 编辑方法。

早在 1992 年, Fox Chase Cancer Center 就从细胞核中发现 RNA 编辑组分, 其能够将靶 RNA 中的尿苷转化为胞苷^[47]。该技术选择合适靶序列的标准是: (1) 它包括“可编辑的”片段, 该片段中具有至少一个尿苷; (2) 可编辑片段在任一侧包含侧翼序列, 侧翼序列具有至少 5 个核苷酸。满足上述标准使得靶序列可以与互补的核苷酸序列杂交, 从而形成核提取物的 RNA 编辑组分活性所必需的双链结构。使用果蝇提取物与其设计的 RNA 靶序列孵育时, 最高可达到 60% 的 U to C 转化率。Fox Chase Cancer Center 技术虽然实现了 RNA 的定点编辑, 但是并未深入研有所述 RNA 编辑组分的结构和作用原理, 尚不能视作一种成熟的可应用的编辑工具。

美国芝加哥大学 Bryan C. Dickinsons 团队在 CRISPR-Cas 技术启发下, 开发了一套并不依赖于 CRISPR-Cas 元件的 CIRT (CRISPR-Cas inspired RNA targeting system) RNA 编辑系统^[48]。CIRT 包含 3 个核心部分: (i) RNA 发夹结合结构域; (ii) RNA 靶向分子, 其包含 RNA 靶向区和至少一个发夹结构, 所述发夹结构特异性结合 (i) 部分; (iii) RNA 调节结构域, 也即效应蛋白, 对目标 RNA 进行切割、去甲基化、甲基化、激活翻译、抑制翻译等操作。CIRT 的尺寸远小于 Cas 蛋白, 便于 AAV 载体包装, 且 CIRT 的成分完全来自人源蛋白, 不易引起机体免疫排斥, 在治疗方面具有极大的优势。

以上列举的不同分支代表性技术, 在图 7 中列出了发展路线。

3 结语

RNA 编辑技术相关专利申请量自 2013 年以来逐年增加, 相应的编辑工具在科学研究、农业育种、疾病治疗多方面均可应用, 目前已有治疗遗传疾病或肿瘤的 RNA 编辑疗法进入临床试验阶段, 未来应用潜力巨大。然而, 其总体数量仍然低于 DNA 编辑领域, 并且在编辑效率、编辑特异性、递送等方面仍需进一步研究, 期望获得更高特异性、低脱靶的 RNA 编辑工具。

本文从 RNA 编辑技术相关专利申请的数量和

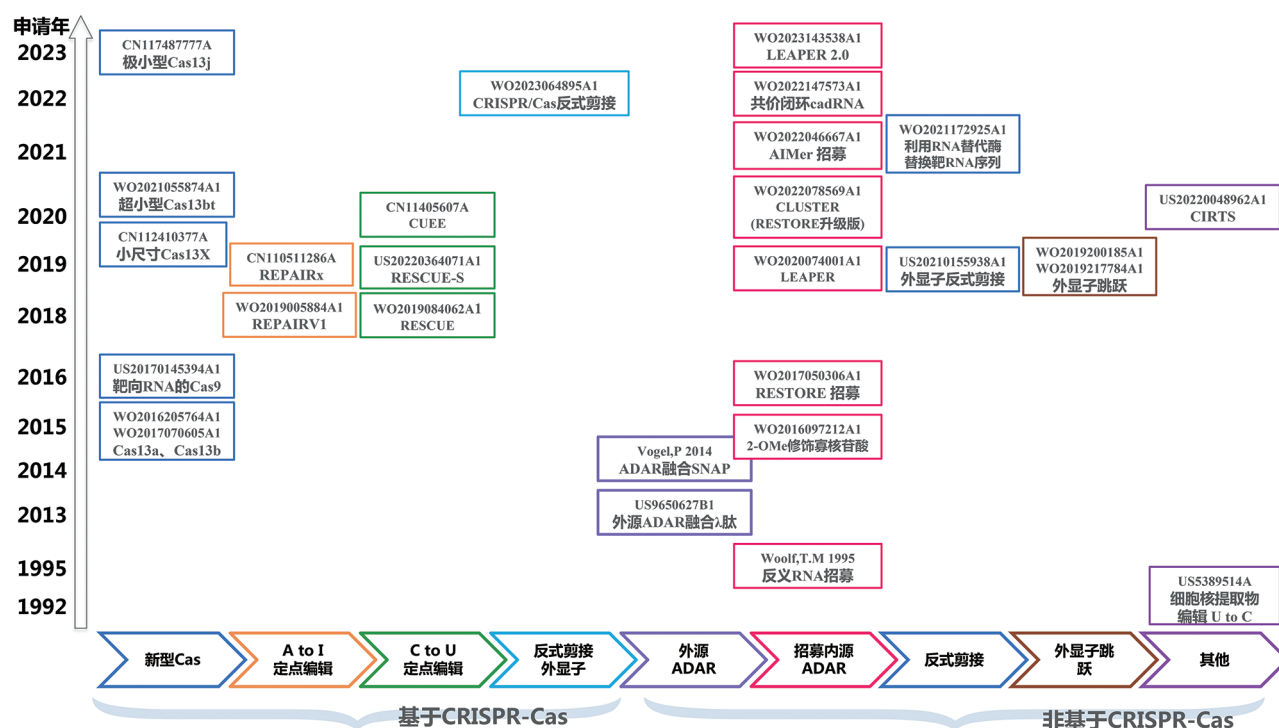


图7 RNA编辑领域代表性技术的技术路线图

技术分析中可以看出, RNA 编辑技术正在进入研发的黄金期, 专利申请在未来几年都将迅猛增长, 在多个技术分支都取得了显著的进展, 继 Cas13 后的新型 RNA 靶向 Cas 蛋白相继被开发出来, 并朝着更小尺寸、更易于包装的方向优化; 基于 CRISPR-Cas 的 A to I 或 C to U 单碱基编辑器逐步升级以提高特异性和编辑效率; 2019 年以来已有药企进入外显子编辑赛道, 拓宽了 RNA 编辑适用的疾病治疗范围; 更多的生物技术企业将研究方向聚焦于招募内源性 ADAR 酶的引导核酸的设计和修饰。我国的研发团队目前尚未进军外显子编辑领域, 但在单碱基编辑领域已积累较好的成果, 例如辉大公司与中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心基于 Cas13X/Y 碱基编辑器的临床研究、博雅辑因与北京大学基于 LEAPER 的一系列临床前研究, 已形成完整的协同创新生态系统。可以预见, 如果临床应用获得积极的结果, 将吸引更多资金和技术投入 RNA 编辑领域的研发, 加速 RNA 编辑疗法的转化, 为本领域的技术发展带来更大的推进。

[参 考 文 献]

- [1] Gott JM, Emeson RB. Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu Rev Genet*, 2000, 34: 499-531
- [2] Visomirski-Robic LM, Gott JM. Accurate and efficient insertional RNA editing in isolated *Physarum* mitochondria. *RNA*, 1995, 1: 681-91
- [3] Vu LT, Tsukahara T. C-to-U editing and site-directed RNA editing for the correction of genetic mutations. *Biosci Trends*, 2017, 11: 243-53
- [4] Tang W, Fei Y, Page M. Biological significance of RNA editing in cells. *Mol Biotechnol*, 2012, 52: 91-100
- [5] Lenharo M. Move over, CRISPR: RNA-editing therapies pick up steam. *Nature*, 2024, 626: 933-4
- [6] Doi A, Delaney C, Tanner D, et al. RNA exon editing: splicing the way to treat human diseases. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2024, 35: 102311
- [7] Schmitt-Ulms C, Kayabolen A, Manero-Carranza M, et al. Programmable RNA writing with trans-splicing. *bioRxiv* [Preprint]. 2024 Feb 1:2024.01.31.578223
- [8] Miskalis A, Shirguppe S, Winter J, et al. SPLICER: a highly efficient base editing toolbox that enables *in vivo* therapeutic exon skipping. *Nat Commun*, 2024, 15: 10354
- [9] 北京合享智慧. incoPat数据库[DB/OL]. <https://www.incopat.com/>
- [10] The Regents of the University of CALIFORNIA, Tracking and manipulating cellular RNA via nuclear delivery of CRISPR/Cas9 [P]. 美国: US20170145394A1, 2017
- [11] The Broad Institute, INC. RNA-targeting system [P]. 世界知识产权组织: WO2016106236A1, 2016
- [12] The Broad Institute, INC. Novel CRISPR enzymes and systems [P]. 世界知识产权组织: WO2016205764A1, 2016
- [13] The Broad Institute, INC. Type VI-B CRISPR enzymes and systems [P]. 世界知识产权组织: WO2017070605A1, 2017

- [14] The Broad Institute, INC. Novel type VI CRISPR enzymes and systems [P]. 世界知识产权组织: WO2021055874A1, 2021
- [15] 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心. VI-E型和VI-F型CRISPR-Cas系统及用途 [P]. 中国: CN112410-377A, 2021
- [16] 浙江大学杭州国际科创中心. 一种VI-J型CRISPR-Cas13基因编辑系统及其应用 [P]. 中国: CN117487777A, 2024
- [17] The Broad Institute, INC. CRISPR/Cas-adenine deaminase based compositions, systems, and methods for targeted nucleic acid editing [P]. 世界知识产权组织: WO201900-5884A1, 2019
- [18] 上海科技大学. 一种RNA碱基编辑分子 [P]. 中国: CN110511286A, 2019
- [19] The Broad Institute, INC. Systems, methods, and compositions for targeted nucleic acid editing [P]. 世界知识产权组织: WO2019084062A1, 2019
- [20] The Broad Institute, INC. Systems, methods, and compositions for targeted nucleic acid editing [P]. 世界知识产权组织: WO2019084063A1, 2019
- [21] The Broad Institute, INC. Novel CRISPR enzymes and systems [P]. 美国: US20220364071A1, 2022
- [22] 上海科技大学. 一种用于C到U碱基编辑的融合蛋白及其制备方法和应用 [P]. 中国: CN114058607A, 2022
- [23] 辉大(上海)生物科技有限公司. 经改造的胞嘧啶碱基编辑器及其应用 [P]. 中国: CN113249362A, 2021
- [24] The Broad Institute, INC. RNA-guided trans-splicing of RNA [P]. 世界知识产权组织: WO2023064895A1, 2023
- [25] Rosenthal JJC. Site-directed RNA editing [P]. 美国: US9650627B1, 2017
- [26] Vogel P, Schneider MF, Wettengel J, et al. Improving site-directed RNA editing *in vitro* and in cell culture by chemical modification of the guideRNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53: 6267-71
- [27] Woolf TM, Chase JM, Stinchcomb DT. Toward the therapeutic editing of mutated RNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 8298-302
- [28] PROQR Therapeutics II B.V. Targeted RNA editing [P]. 世界知识产权组织: WO2016097212A1, 2016
- [29] PROQR Therapeutics II B.V. Single-stranded RNA-editing oligonucleotides [P]. 世界知识产权组织: WO2017220751A1, 2017
- [30] PROQR Therapeutics II B.V. Chemically modified single-stranded RNA-editing oligonucleotides [P]. 世界知识产权组织: WO2018041973A1, 2018
- [31] PROQR Therapeutics II B.V. Stereospecific linkages in RNA editing oligonucleotides [P]. 世界知识产权组织: WO2019219581A1, 2019
- [32] Eberhard Karls Universität Tübingen. Methods and substances for directed RNA editing [P]. 世界知识产权组织: WO2017050306A1, 2017
- [33] Eberhard Karls Universität Tübingen. Artificial nucleic acids for RNA editing [P]. 世界知识产权组织: WO2020001793A1, 2020
- [34] Eberhard Karls Universität Tübingen. Artificial nucleic acids for RNA editing [P]. 世界知识产权组织: WO2022078569A1, 2022
- [35] ADARx pharmaceuticals, INC. ADAR dependent editing compositions and methods of use thereof [P]. 世界知识产权组织: WO2022026928A1, 2022
- [36] The regents of the university of CALIFORNIA. Programmable RNA editing in vivo via recruitment of endogenous ADARS [P]. 世界知识产权组织: WO2022147573A1, 2022
- [37] Wave life sciences LTD. Cells and non-human animals engineered to express ADAR1 and uses thereof [P]. 世界知识产权组织: WO2022046667A1, 2022
- [38] 北京大学. Methods and compositions for editing RNAs [P]. 世界知识产权组织: WO2020074001A1, 2020
- [39] 博雅辑因(北京)生物科技有限公司. 一种治疗Usher综合征的方法和其组合物 [P]. 世界知识产权组织: WO2021136404A1, 2021
- [40] 博雅辑因(北京)生物科技有限公司. 一种基于LEAPER技术治疗MPS IH的方法和组合物 [P]. 中国: CN113122580A, 2021
- [41] 博雅基因(北京)生物科技有限公司. 一种治疗赫勒氏综合征的方法和药物 [P]. 世界知识产权组织: WO2021209010A1, 2021
- [42] 北京辑因医疗科技有限公司. 基于LEAPER技术处理MPS I的方法和组合物 [P]. 世界知识产权组织: WO2023143538A1, 2023
- [43] Ascidian Therapeutics INC. Trans-splicing molecules [P]. 美国: US20210155938A1, 2021
- [44] Rnzymics INC. Trans-splicing ribozyme specific to APOE4 RNA and use thereof [P]. 世界知识产权组织: WO2021172925A1, 2021
- [45] Wave life sciences LTD. Oligonucleotide compositions and methods of use thereof [P]. 世界知识产权组织: WO2019200185A1, 2019
- [46] Wave life sciences LTD. Oligonucleotide compositions and methods of use thereof [P]. 世界知识产权组织: WO2019217784A1, 2019
- [47] Fox Chase Cancer Center. Method for specifically altering the nucleotide sequence of RNA [P]. 美国: US5389514A, 1995
- [48] The University of Chicago. Systems and methods for modulating RNA [P]. 美国: US20220048962A1, 2022