



신 진 홍

양산부산대학교병원 신경과

## Genetic therapies for the neuromuscular disorders

Jin-Hong Shin

Department of Neurology, Pusan National University Yangsan Hospital, Yangsan, Korea

It has long been a challenge to manipulate the gene to cure the diseases since the advent of molecular biology. Many trials of gene therapy have been discouraged before several strategies have finally reached clinical approval. Exon skipping restores reading frame by concealing an out-of-frame exon in the process of splicing. Skipping of dystrophin exon 51, utilizing anti-sense oligonucleotide has been approved in the US. In patients with spinal muscular atrophy, nusinersen increases the production of functional SMN2 genes with exon 7. Two kinds of anti-sense oligonucleotides have been approved for familial amyloid neuropathy, utilizing cleavage-based destruction of transthyretin mRNA. Gene replacement is a most classic way of gene therapy, and an intuitive way to cure a recessive genetic disorders with defective gene. Using recombinant adeno-associated virus as the vector, gene replacement therapies entered clinical stage. SMN1 gene delivery for spinal muscular atrophy has been approved in US. One time injection of the virus leads to life-long expression of the transgene. Research of virus-mediated gene therapy is expanding to the treatments for systemic muscle diseases. Small molecule drugs are reclaiming their position in gene modulation. Ataluren promote readthrough of nonsense mutation. It is approved for nonsense-mediated Duchenne muscular dystrophy in European countries, and expanding its indication. Repurposing of existing drugs is an extreme where classic chemistry meets gene medicine. Research of genetic therapy is accelerating as several products finally enters clinical stage. The techniques and experiences in these early products are propagating to the development of therapies for other diseases.

**Key Words:** Genetic therapy, Antisense oligonucleotides, Neuromuscular diseases, Drug repositioning

### 서 론

분자생물학을 통해 질환 유전자 변이가 발견된 이래, 이를 교정하여 질환을 치료해 내는 것은 인류의 염원이었다. 실험동물에 적용하는 직관적인 논리로 구현 가능할 것 같았던 유전자 치료는 수차례의 실패를 거쳐야 했으나,<sup>1</sup> 마침내 임상 사용 승인 약물이 시판되기 시작되면서 연구가 가속화 되고 있다.<sup>2</sup> 신경근육질환에 대해서는 두센 근디스트로피의 일부와 척수근위축에 사용할 수 있는 약물이 출시

되었으며, 후속 약물들이 활발히 연구되고 있다.

### 본 론

#### 1. 안티센스 요법 (antisense therapy)

특정 RNA 정보에 대한 안티센스 서열을 담은 핵산(antisense oligonucleotide; ASO) 또는 그 유도체를 투여하여 유전자 발현을 조절하는 방법이다.<sup>3</sup> 각 질환의 유전적 변이 특징에 적용할 수 있는 다양한 방법이 개발되어 있다.<sup>4</sup>

##### 1) 두센 근디스트로피(Duchenne muscular dystrophy)

엑손 스킵핑은 두센 근디스트로피의 80%가 대량 결실 또는 중복 때문에 발생하며, 틀림기이동(frameshift)이 일어나지 않는 경우에는 증상이 가벼운 베커 근디스트로피의

Jin-Hong Shin

Department of Neurology, Pusan National University Yangsan Hospital, 20 Geumoro, Yangsan, 50612, Republic of Korea  
Tel: +82-55-360-2122 Fax: +82-55-360-2152  
E-mail: shinzh@gmail.com

**Table 1.** Dystrophin deletions amenable to most advanced exon skipping techniques

|                       | Deleted dystrophin exons                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| exon 51 skip-amenable | 3-50, 4-50, 5-50, 6-50, 9-50, 10-50, 11-50, 13-50, 14-50, 15-50, 16-50, 17-50, 19-50, 21-50, 23-50, 24-50, 25-50, 26-50, 27-50, 28-50, 29-50, 30-50, 31-50, 32-50, 33-50, 34-50, 35-50, 36-50, 37-50, 38-50, 39-50, 40-50, 41-50, 42-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-58, 52-61, 52-63, 52-64, 52-66, 52-76, 52-77                    |
| exon 53 skip-amenable | 3-52, 4-52, 5-52, 6-52, 9-52, 10-52, 11-52, 13-52, 14-52, 15-52, 16-52, 17-52, 19-52, 21-52, 23-52, 24-52, 25-52, 26-52, 27-52, 28-52, 29-52, 30-52, 31-52, 32-52, 33-52, 34-52, 35-52, 36-52, 37-52, 38-52, 39-52, 40-52, 41-52, 42-52, 43-52, 45-52, 47-52, 48-52, 49-52, 50-52, <b>52</b> , <b>54-58</b> , 54-61, 54-63, 54-64, 54-66, 54-76, 54-77 |
| exon 45 skip-amenable | 7-44, 12-44, 18-44, <b>44</b> , <b>46</b> , 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53, 46-55, 46-57, 46-59, 46-60, 46-67, 46-69, 46-75, 46-78                                                                                                                                                                                                                  |

형태로 나타난다는 것에 착안한 방법이다.<sup>5</sup> 결실된 엑손을 더해 넣는 것은 현재의 의학기술로 쉽지 않은 일이지만, pre-mRNA의 특정 엑손을 ASO로 차폐하여 잘라이음(splicing) 과정에서 빼내는 것은 가능하기 때문이다.

같은 디스트로핀의 변이라도 결실 변이가 일어난 자리에 따라 각각의 ASO를 만들어야 하는 것이 단점이다. 두센 근디스트로피의 호발 결실 변이 조사를 통해, 전체 환자의 13%에 적용할 수 있는 51번 엑손 스킵핑이 우선적으로 연구되었으며,<sup>6</sup> 임상시험을 거쳐 미국에서 eteplirsen이 사용 승인되었다.<sup>7</sup> 사용할 수 있는 결실 변이의 종류는 50, 49-50, 48-50, 47-50, 45-50, 43-50 등의 제50번 엑손으로 끝나는 결실 중 일부와, 52번 엑손에서 시작되는 결실 변이 중 일부이다(Table 1)

51번 엑손 스킵핑은 51번 엑손을 잘라이음 과정에서 빼내 읽기틀(reading frame)을 회복시켜서 결실 변이 이후의 유전정보를 되살려 주지만, 결실된 엑손들의 정보를 넣어 주는 것은 아니기에 디스트로핀의 기능이 완전히 회복되지는 않는다.<sup>8</sup> 51번 엑손 스킵핑 다음으로 적용가능 환자 수가 많은 53번 엑손 스킵핑과 45번 엑손 스킵핑에 대해 별도의 임상 시험이 진행되고 있으며,<sup>9</sup> 전달 효율을 올리고 심근에도 전달이 되는 변형 ASO도 임상 시험 중이다.<sup>10</sup>

## 2) 척수근위축 (spinal muscular atrophy)

SMN1 유전자 결실에 의한 척수근위축은 상동유전자(homolog)인 SMN2 유전자의 복사본이 몇 개 남아 있는가에 따라 증상의 경중이 정해진다. 대부분의 경우 SMN2 유전자는 2본 이상이 남아 있으며, SMN1과 동일한 단백질을 만들어 낼 수 있으나, 엑손 7번에 있는 한 개의 변이 때문에 잘라이음 과정에서 엑손 7번이 탈락하는 경우가 85%에 달해 충분한 양의 SMN 단백질을 만들어 내지 못한다.<sup>11</sup> 척수

근위축의 치료에 사용되는 nusinersen은 인트론 7번의 잘라이음 억제자리를 가려 hnRNP가 붙지 못하게 하고, 이를 통해 엑손 7번이 잘라이음에 포함되도록 작용한다.<sup>12</sup>

Nusinersen은 영아형 척수근위축에 뛰어난 치료효과가 증명되어, 미국, 유럽, 일본과 함께 우리나라에서도 사용 허가되었다.<sup>13</sup> 발병 및 진행이 느린 척수근위축에 대해서도 효과를 보이는 연구결과가 축적되고 있다.<sup>14</sup>

## 3) 가족성 아밀로이드 여러신경병 (familial amyloid polyneuropathy)

두 종류의 ASO 치료가 TTR 단백질과 연관된 가족성 아밀로이드 여러신경병의 치료로 개발되어 있다.<sup>15</sup> ASO가 특정 RNA에 결합하여 이중선 구조를 만들 때 세포내 기구에 의해 부서지는 원리를 이용한다. Inotersen (Tegsedi)은 분해되지 않는 2'-O-(2-methoxyethyl)의 양단 사이에 세포내 핵산분해효소(ribonuclease)와 작용할 수 있는 DNA 서열이 들어 있는 gapmer형태를 가진다.<sup>16</sup> Patisiran (Onpattro)은 성숙 mRNA에 결합하여 RNA 간섭(RNA interference; RNAi)을 유도한다.<sup>17</sup> Inotersen은 핵 안에서, patisiran은 세포질에서 각각 TTR mRNA를 파괴하며, 야생형과 변이형 TTR mRNA를 가리지 않고 작용하여 체내 TTR 단백질 생성을 억제한다.

이와 같이 특정 유전자 발현을 감소시키는 형태의 ASO 요법은 이론적으로 독성기능증가(toxic gain of function)에 의해 발생하는 다른 우성 유전 질환에도 적용 가능하다.<sup>18</sup> 과도한 발현 억제로 인해 오히려 증상 발현이 예기되는 경우에는 질환 변이에 특이적으로 결합하는 ASO를 제작하여 영향을 최소화하는 방법도 시도되고 있다.<sup>19</sup>

## 2. 유전자 대체요법 (gene replacement)

유전자 대체요법은 가장 고전적인 형태의 유전자 치료로 오랜 역사를 가지고 있다.<sup>20</sup> 병원성이 없고, 번식하지 않는 재조합 아데노 유반 바이러스(recombinant adeno-associated virus; rAAV)가 유전자 전달의 매개체로 널리 쓰이게 되면서 임상 연구에 큰 진전이 있었다. 2012년 마침내 lipoprotein lipase (LPL) 결핍증의 치료법으로 변종 LPL을 rAAV를 통해 근육내 전달하는 alipogene tiparvovec (Glybera)이 유럽에서 승인되었다.<sup>21</sup> 상업적으로는 성공하지 못하였으나 희귀유전질환에 대한 최초의 유전자 치료제로서 의미를 가진다. 이어 2017년 RPE65 유전자 이상에 의한 레버 선천흑암증(Leber's congenital amaurosis)에 대해 voretigene neparvovec (Luxturna)이 미국에서 승인되었다.<sup>22</sup>

신경근육질환에 대해서는 척수근위축에 대해 onasemnogene abeparvovec (Zolgensma)가 2019년 미국에서 승인되었다.<sup>23</sup> 이 약물은 rAAV9를 사용하여 SMN1 유전자를 전달하며, 정맥으로 주사된 재조합 바이러스는 척수를 포함한 전신에 분포하여 SMN1 유전자를 발현하게 된다. ASO를 사용하는 치료법에 비해 단 한번의 투여로 평생 치료효과가 유지되는 것은 큰 장점이나, 아직 사람에게 장기 치료 경험이 없으며, 면역반응이나 유전독성 등의 부작용 발생해도 전달된 유전자를 되돌릴 수 없는 것은 불안 요소로 남아 있다.

두센 근디스트로피의 경우, 전달해야 하는 디스트로핀 유전자의 크기가 rAAV의 포장 한계를 2.5배 이상 넘어서기에 직접 유전자 전달에 어려움이 있다. 하지만 디스트로핀의 가운데 부분을 차지하는 반복 구조는 대부분 유실되어도 기능 소실이 크지 않다는 것이 베커 근디스트로피 증례와 실험동물 연구를 통해 증명되었다.<sup>24</sup> 이에 rAAV로 전달할 수 있는 마이크로 디스트로핀이 제작되었으며, 이를 이용한 유전자 치료 임상연구가 활발히 진행 중이다.

바이러스를 이용한 근육내 유전자 전달에 대한 경험도 쌓이면서 팔다리근 근디스트로피에 대한 초기 임상 연구도 시작되고 있다.<sup>25</sup> 바이러스 매개 유전자 치료는 이론적으로 유전자 결핍에 의한 모든 질환에 적용 가능하며, 각 조직에 대한 바이러스 친화력 및 조직특이 발현 조절이 가능해 지면 더욱 우수한 치료제가 될 것이다. 바이러스 매개 유전자 전달은 유전자편집 유전자를 전달할 수도 있어 다양한 응용이 가능하다.

## 3. 유전자 발현 조절 저분자 약물

정지변이를 무시하고 단백질 전사가 계속되는 넘어읽기

(readthrough) 현상은 세포내 번역기구의 자연적인 오류로 낮은 수준에서 발생하고 있으며, 겐타마이신과 같은 아미노글리코시드계 항생제에 의해 증강된다. Ataluren (Translarna)는 정지변이 넘어읽기를 촉진하는 저분자 약물로 고효율 탐색을 통해 발굴되었다.<sup>26</sup> 겐타마이신과 같은 독성이 없고 경구 복용이 가능하여 장기 투여가 가능한 것이 장점이다. 정지변이를 가진 두센 근디스트로피에 대해 치료효과가 인정되어 유럽에서 조건부 승인되었다.<sup>27</sup> 한편 이론적으로는 정지변이에 의한 어떤 질환에도 적용가능하기 때문에 적응증을 확대할 수 있을 것으로 기대된다.

Risdiplam은 척수근위축에서 SMN2 유전자의 잘라이움에 작용하여 엑손 7이 들어있는 SMN2 유전자의 발현을 증가시킨다.<sup>28</sup> 경구 투여 초기 임상시험에서 혈중 SMN2 발현량 증가가 확인되어 임상적 효과가 기대되는 약물이다.<sup>29</sup>

약물재창출(drug repositioning)은 고전 약물학과 유전 의학이 만나는 접점에 있다.<sup>30</sup> PMP22 중복 변이에 의한 사르코-마리-투스병에서 baclofen, naltrexone, D-sorbitol의 조합으로 PMP22의 발현량을 낮추는 것이 좋은 예이며,<sup>31 32</sup> 근디스트로피와 운동신경원질환에도 다양한 약물이 시험되고 있다.

## 결론

유전자 치료 연구는 많은 난관을 뚫고 마침내 일부 질환에서 임상 사용 수준에 이르렀다. 초기 유전자 치료 약제들의 경험은 다른 약제 개발 또는 다른 질환 치료제 개발로 연결되면서 신약 개발의 새로운 시대가 올 것이 예상된다. 한편 희귀유전질환 치료제로서의 신약들에 대한 천문학적 인 비용은 사회적인 문제로 떠오르고 있다.<sup>33</sup>

## References

1. Wilson JM. Bulls, bubbles, and biotech. *Hum Gene Ther* 2013;24:715-716.
2. Scott LJ. Alipogene tiparvovec: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. *Drugs* 2015;75:175-182.
3. Scoles DR, Minikel EV, Pulst SM. Antisense oligonucleotides: A primer. *Neurol Genet* 2019;5:e323.
4. Talbot K, Wood MJA. Wrangling RNA: Antisense oligonucleotides for neurological disorders. *Sci Transl Med* 2019;11.
5. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation

- types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006;34:135-144.
6. Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, Ginjaar I, van Deutekom J, van Ommen GJ, et al. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* 2009;30:293-299.
7. Eteplirsen treatment for Duchenne muscular dystrophy: Exon skipping and dystrophin production. *Neurology* 2018;91:637.
8. Aartsma-Rus A, Straub V, Hemmings R, Haas M, Schlosser-Weber G, Stoyanova-Beninska V, et al. Development of Exon Skipping Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy: A Critical Review and a Perspective on the Outstanding Issues. *Nucleic Acid Ther* 2017;27:251-259.
9. Komaki H, Nagata T, Saito T, Masuda S, Takeshita E, Sasaki M, et al. Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 2018;10.
10. Echevarria L, Aupy P, Goyenvall A. Exon-skipping advances for Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2018;27:R163-R172.
11. Farrar MA, Kiernan MC. The Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Progress and Challenges. *Neurotherapeutics* 2015; 12:290-302.
12. Rigo F, Hua Y, Krainer AR, Bennett CF. Antisense-based therapy for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 2012;199:21-25.
13. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsa J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 2016;388:3017-3026.
14. Darras BT, Chiriboga CA, Iannaccone ST, Swoboda KJ, Montes J, Mignon L, et al. Nusinersen in later-onset spinal muscular atrophy: Long-term results from the phase 1/2 studies. *Neurology* 2019;92:e2492-e2506.
15. Buxbaum JN. Oligonucleotide Drugs for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* 2018;379:82-85.
16. Benson MD, Waddington-Cruz M, Berk JL, Polydefkis M, Dyck PJ, Wang AK, et al. Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* 2018;379:22-31.
17. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, Yang CC, Ueda M, Kristen AV, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* 2018;379:11-21.
18. Buijsen RAM, Toonen IJA, Gardiner SL, van Roon-Mom WMC. Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias. *Neurotherapeutics* 2019;16:263-286.
19. Bolduc V, Zou Y, Ko D, Bonnemant CG. siRNA-mediated Allele-specific Silencing of a COL6A3 Mutation in a Cellular Model of Dominant Ullrich Muscular Dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e147.
20. High KA, Roncarolo MG. Gene Therapy. *N Engl J Med* 2019; 381:455-464.
21. Yla-Herttuala S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther* 2012;20:1831-1832.
22. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358:2231-2239.
23. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 2017;377:1713-1722.
24. Duan D. Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther* 2018;26:2337-2356.
25. Crudele JM, Chamberlain JS. AAV-based gene therapies for the muscular dystrophies. *Hum Mol Genet* 2019.
26. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007;447:87-91.
27. McDonald CM, Campbell C, Torricelli RE, Finkel RS, Flanigan KM, Goemans N, et al. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;390:1489-1498.
28. Poirier A, Weetall M, Heinig K, Bucheli F, Schoenlein K, Alsenz J, et al. Risdiplam distributes and increases SMN protein in both the central nervous system and peripheral organs. *Pharmacol Res Perspect* 2018;6:e00447.
29. Kletzl H, Marquet A, Gunther A, Tang W, Heuberger J, Groeneveld GJ, et al. The oral splicing modifier RG7800 increases full length survival of motor neuron 2 mRNA and survival of motor neuron protein: Results from trials in healthy adults and patients with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2019;29:21-29.
30. Clout AE, Della Pasqua O, Hanna MG, Orlu M, Pitceathly RDS. Drug repurposing in neurological diseases: an integrated approach to reduce trial and error. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019.
31. Attarian S, Vallat JM, Magy L, Funalot B, Gonnaud PM, Lacour A, et al. An exploratory randomised double-blind and placebo-controlled phase 2 study of a combination of baclofen, naltrexone and sorbitol (PXT3003) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:199.
32. Chumakov I, Milet A, Cholet N, Primas G, Boucard A, Pereira Y, et al. Polytherapy with a combination of three repurposed drugs (PXT3003) down-regulates Pmp22 overexpression and improves myelination, axonal and functional parameters in models of CMT1A neuropathy. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:201.
33. Gellad WF, Kesselheim AS. Accelerated Approval and Expensive Drugs - A Challenging Combination. *N Engl J Med* 2017;376:2001-2004.