

RNA 치료제의 개요와 전망



RNA 치료제는 질병을 치료하거나 예방하는 것을 목적으로 하는 RNA molecule 을 기반으로 하는 약물이다. 최근에 코로나 19 를 극복하는데 도움이 된 mRNA 기반 백신은 "RNA"를 일반적인 이름으로 만들었을 뿐 만 아니라 RNA 치료제에 대한 연구 관심을 촉진했다. 또한 RNA 기능과 질병에서의 역할에 대한 이해가 높아지면서 지금까지 " 약물이 없는" 단백질, 전사체 및 유전자에 선택적으로 기능하는 RNA 의 치료제 적용이 점차 확대된다. 여러가지 RNA 기반 약물이 임상용으로 승인되었지만 아직은 개발 단계이거나 전임상 시험 중이다. RNA 기반 치료제 개발에 있어서 상당한 어려움에도 불구하고 RNA 의 세포내 수송 및 대사 안정성을 촉진하기 위해서 다양한 기술이 연구되고 있다. 지금부터 RNA 기반 치료법에 대한 내용과 RNA-Seq 의 활용에 대해 서술하고자 한다.

RNA 기반 치료제 현황

- 1) 소분자 및 항체 치료제는 인간 게놈의 0.05%만을 타겟하고 있으며, 대부분 질병 타겟에 대해 소분자 치료제가 결합하는 active site 에 대한 정보가 부족하다.
- 2) 풍부한 RNA 는 단백질, 전사체, 유전자에 선택적으로 작용하여 약물의 표적 범위를 넓힌다. 알려진 서열 정보를 이용하여 RNA 약물을 쉽게 디자인할 수 있다.
- 3) 다수의 RNA 약물이 임상승인 되었으며, 여러 질병에 대해서 추가적으로 임상시험 진행중에 있다.

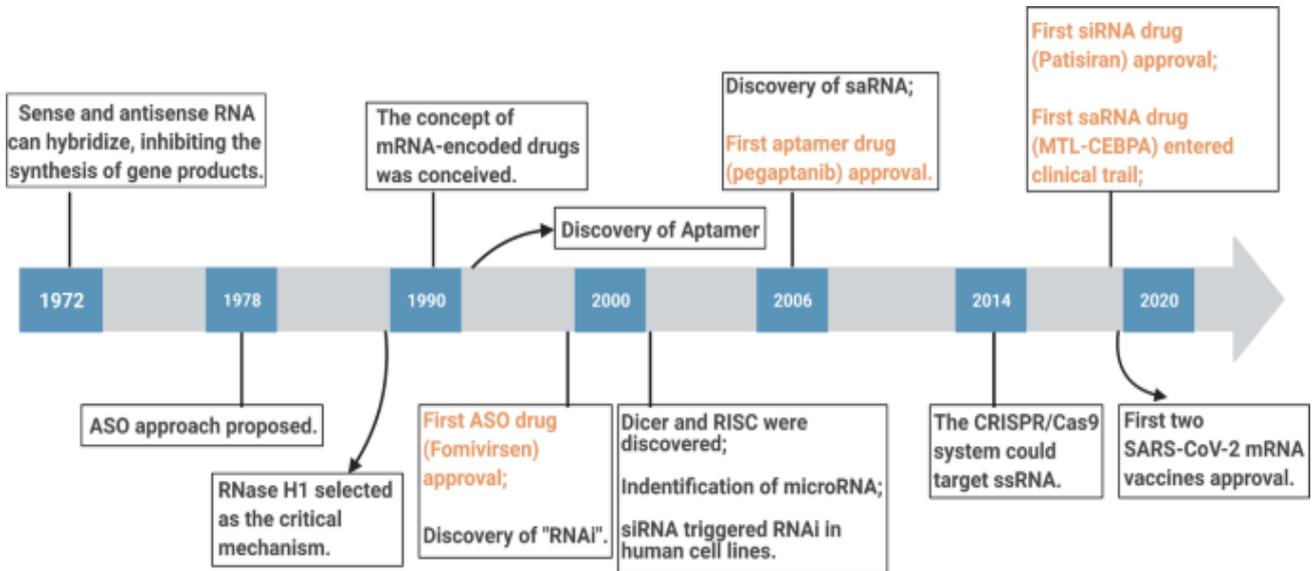


그림 1. RNA-Targeting 분야의 주요 개발 개요 [1]

RNA-Targeting 분야

1980년대 초 단백질 합성을 억제하는 안티센스 올리고 뉴클레오타이드 (ASO)는 RNA 기반 치료법의 급속한 발전을 촉진했다[2]. 2000년대에 인간 유전자를 silencing 하는 small interfering RNA (siRNA)의 사용으로 인해 RNA 치료제에 대한 투자가 증가했다[3]. 다른 RNA 분자를 조절하거나 관련 메커니즘의 특성화 하여 연구하고 있다. 현재까지 다수의 승인된 RNA 기반 약물이 있으며, 추가적으로 임상 3상 연구가 진행되고 있는 RNA 치료제도 있다.[4].

RNA 치료제는 기존에 단백질이나 DNA를 표적하는 약물과 비교하여 물리화학 및 생리학적 특성으로 인해 사용이 편리하다[5]. RNA는 필수적인 생물학적 요소인 DNA, RNA, 단백질을 조절한다 siRNA, microRNA (miRNA)와 같은 RNA는 직접적으로 mRNA와 non-coding RNA (ncRNA)를 표적하여 작용한다. 따라서 RNA는 이론적으로 RNA를 표적하여 작용하기 때문에 모든 관심유전자를 표적으로 삼을 수 있지만 인간 게놈의 대부분의 DNA 서열이 non-coding 전사물로 전사되기 때문에 인간 게놈의 0.05%만이 현재 승인된 단백질 표적 치료제이다. 또한 in vitro transcript((IVT) mRNA는 세포질에 삽입 후 단백질 대체 치료제로 적용될 수 있다.[6] IVT mRNA 치료제는 DNA-기반 치료제가 가지고 있는 단점을 극복할 수 있다. DNA-기반 치료제의 가장 큰 단점은 게놈 상에 삽입되어 게놈의 변화를 영구적으로 일으킬 위험성이 있다는 것이다. 반면에 CRISPR (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeat) 기반 게놈 편집은 표적 RNA 서열을 직접 수정하여 특정 장애를 치료할 수 있으며[7], RNA 앵타머(Aptamer)는 소분자 억제제 및 항체와 유사하게 단백질 활성을 차단할 수 있다[8]. 따라서 RNA 기반 치료법은 약물화 가능한 표적의 범위를 넓힐 수 있는 가장 매력적인 표적 치료 방법이다.

RNA 기반 치료제의 종류와 작용 방식

RNA 치료제는 안티센스 올리고 뉴클레오타이드 (ASO), siRNA, microRNA, RNA 앵타머, mRNA 등 5가지 종류가 있다.

1. 안티센스 올리고 뉴클레오타이드 (ASO)

ASO는 특정 mRNA의 상보적인 서열과 일치하는 짧은 단일가닥 DNA 조각으로, 단백질 생성을 저하시키거나 변경하는데 사용할 수 있는 작은 분자이다. 단백질은 대부분의 세포과정을 관리한다. 단백질 생성은 일반적으로 두 단계로 이루어진다. 특정 단백질을 코딩하는 유전자가 핵내에서 mRNA로 전사되며, 해당 유전자 정보를 가지고 있는 mRNA 세포질로 이동하여 세포질에서 단백질로 번역된다. ASO는 특정 mRNA의 상보적인 서열과 일치하는 짧은 단일 가닥 DNA 조각이다. ASO의 구조에 따라서 ASO는 두가지 다른 영향을 미칠 수 있다. 일부 변형된 ASO는 mRNA의 분해를 유발하며, 해당 단백질이 손실된다. 다른 변형은 특정 부분만 가려서 단백질의 변형을 일으킬 수 있다.

현재까지 뉴시너센, 에테플러센, 테그세디 세가지 ASO 기반 약물은 FDA 승인을 받았다. 뉴시너센은 척수성 근위축증(SMA) 치료용으로 승인되었다. 척수성 근위축증은 골격근과 호흡근의 약화 및 위축을 유발하는 치명적인 질병이다. 이 질병은 SMN1 유전자의 돌연변이로 인해 SMN 단백질이 결여되어 발생한다. 상동 유전자인 SMN2는 엑손 스킵핑 (exon skipping) 스플라이싱되어 소량의 SMN 단백질의 생산을 강화하고 척수성 근위축증 환자의 운동 기능을 크게 개선한다[9]. 에테플러센은 뒤센느 근이영양증의 치료에 사용되며 뉴시너센과 유사하게 디스트로핀

유전자의 pre-mRNA 의 스플라이싱을 변형하여 판독 프레임을 복원하고 기능성 단백질의 생산을 유도하도록 설계했다[10].

Transthyretin(TTR) 유전자의 돌연변이로 인한 가족성 아밀로이드 다발신경병증 치료를 위해 개발된 테그세디는 뉴시너센이나 에테플러센과는 다른 메커니즘으로 작용한다. 돌연변이가 된 TTR 유전자의 발현은 질병을 일으키는 비정상적인 단백질을 생성하는데, 테그세디는 장기 내 TTR 축적을 막기 위해 TTR 전사체의 3' UTR 과 hybridize 하는 방식으로 설계되었다[11].

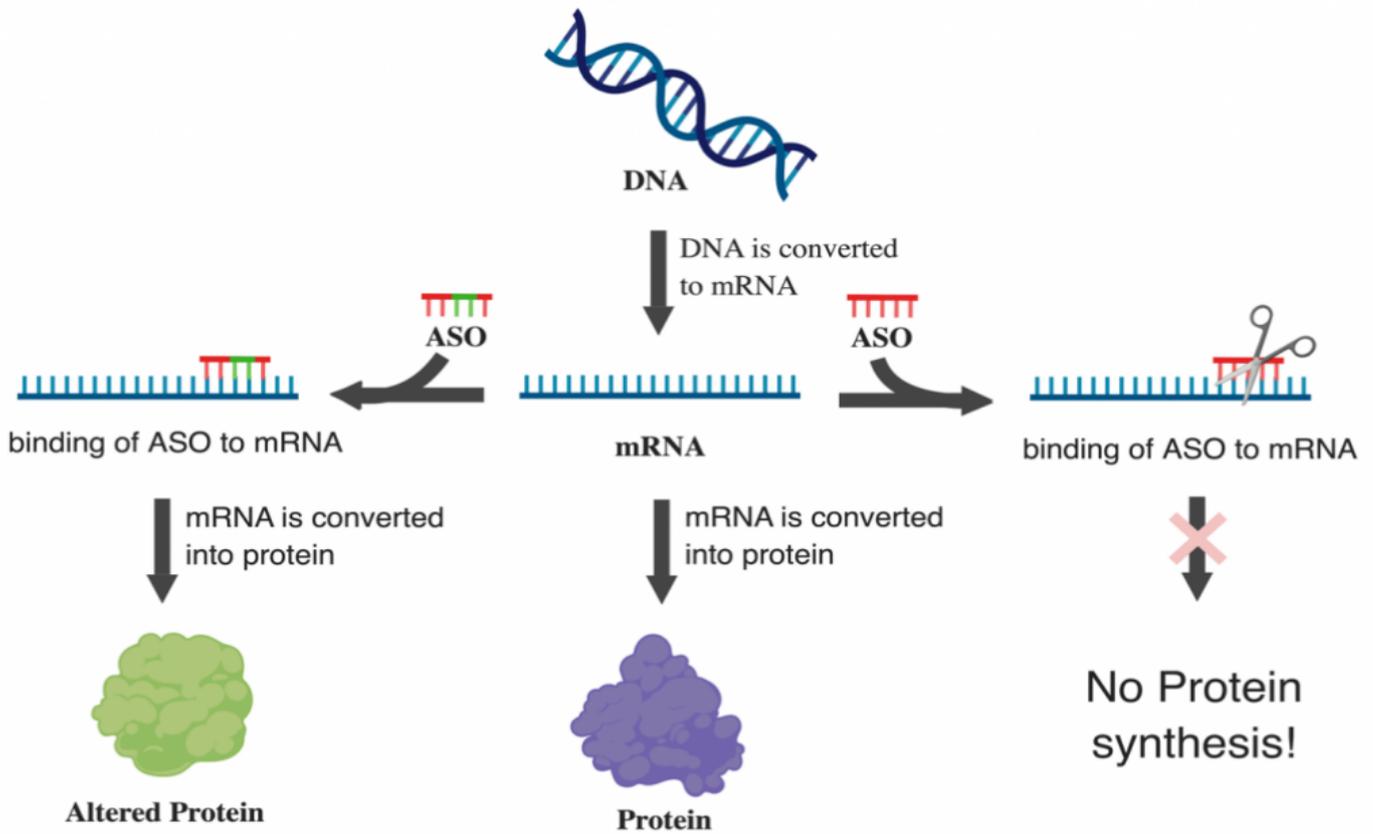


그림 2. 안티센스 올리고 뉴클레오타이드 (ASO) 작용 예시[12]

2. siRNA

RNAi (RNA interference)란 siRNA 라고 불리는 짧은 가닥의 dsRNA 에 의해 서열 특이적으로 유전자 발현이 억제되는 현상이다. siRNA 는 이중 가닥에 독특한 구조를 가진 20-24 개의 뉴클레오타이드로 구성된 dsRNA 이다. siRNA 는 포유동물 세포에서 타겟 RNA 의 발현을 조절한다. siRNA 는 세포질에서 활성화 상태의 RNA 를 구별하여 유전자를 silencing 시키는 역할 이외에도 프로모터 영역에 결합하여 핵에서 염색질 리모델링 및 히스톤 변형을 유발하여 전사 자체에서 silencing 을 초래할 수도 있다. 연구자들은 이러한 메커니즘을 이용하여 유전자 기능을 연구하고 질병 치료제에 대한 약물을 개발한다.

현재 시판중인 siRNA 치료제는 아밀로이드 다발신경병증 치료에 사용되는 파티시란, 급성간성 포르피린증 치료에 사용되는 기보시란, 원발성 고옥살산뇨증 치료에 사용되는 루마시란, 2021 년 LDL 콜레스테롤 수치를 낮추어 죽상동맥경화성 심혈관 질환치료에 승인된 인클리시란이 있다[15,16].

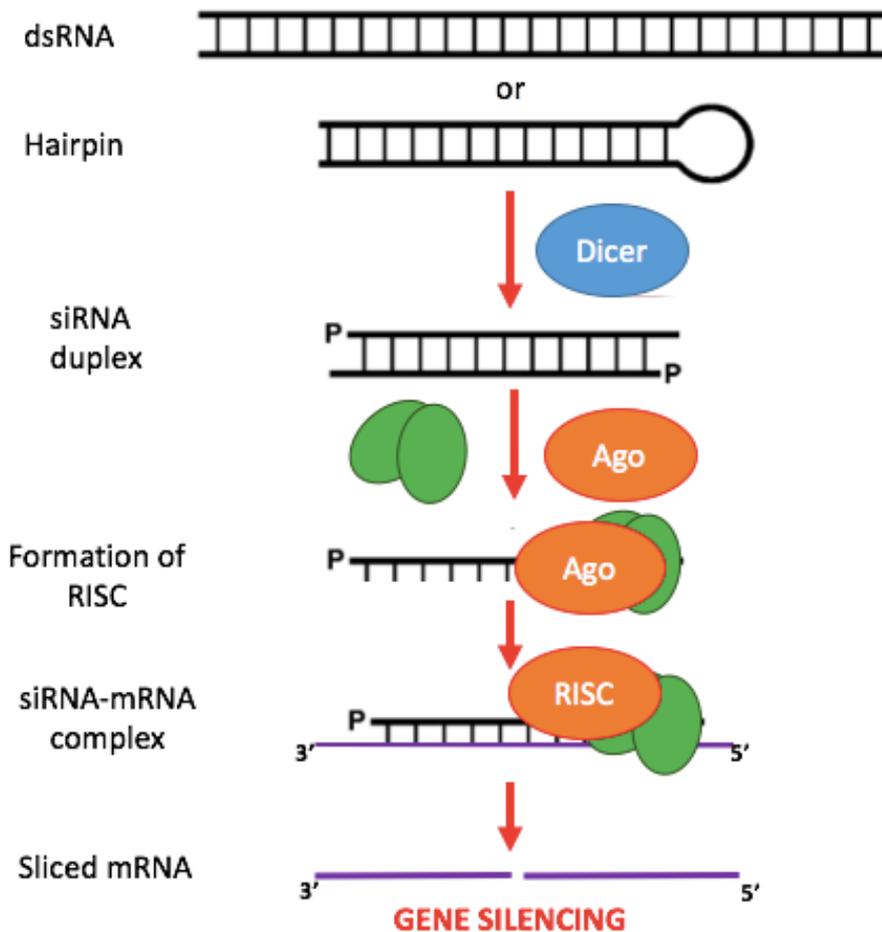


그림 3. siRNA 메커니즘[17]

3. miRNA

miRNA는 번역을 차단하거나 표적 전사체의 분해를 촉진하여 전체 mRNA 발현을 조절하는 자연적으로 발생하는 작은 non-coding RNA 분자이다. miRNA의 표적화 능력은 치료제로서 굉장한 잠재성을 가지고 있다. miRNA 치료제는 자연적으로 발생하는 세포 내인성 분자이기 때문에 다른 합성 치료제에 비해 miRNA 치료제는 면역원성 반응 가능성도 적다[16]. miRNA 기반 치료제는 miRNA 모방체와 miRNA 억제제 두 가지 유형으로 분류될 수 있다. 모방체는 내인성 miRNA 이중 가닥과 서열이 동일한 miRNA를 모방하는 dsRNA 분자로, 이는 표적 mRNA를 억제하고 단백질 수준을 감소시키는 반면, miRNA 억제제는 단일 가닥 RNA 서열로, RNA miRNA를 방해하여 단백질 합성을 회복하도록 설계되었다. 아직 FDA 승인 치료제는 아니지만 다수가 임상 개발 단계에 있다[18].

4. mRNA

mRNA는 그 자체로도 질병을 치료할 수 있는 잠재성이 있다. 예를 들면, 지질 나노입자를 통해 세포 내로 전달된 외인성 mRNA도 기능성 단백질로 번역되기 때문이다. mRNA는 대체 또는 보충 요법으로 사용될 수 있으며 결함이 있는 유전자/단백질을 보충하거나 효소 대체의 경우와 같이 치료 단백질을 공급한다[15].

항원을 암호화하는 mRNA는 감염성 질병에 대한 보호 면역을 유도하거나 치료 백신으로 암과 싸우기 위해 면역 체계를 활용하기 위한 백신으로 사용될 수 있다. 개발 중인 모든 코로나 19 백신 중에서 FDA의 긴급 사용 승인을 받은 처음 두 개는 RNA 기반 백신이었기 때문에 코로나 19 예방접종을 위한 RNA 기술의 장점을 보여준다[16,18,26]. 코로나 19는 매우 짧은 기간에 대유행을 일어났기 때문에 효과적인 백신의 개발이 시급했다. mRNA 백신은 개발 과정이 상대적으로 짧고, 오랫동안 mRNA 백신을 연구했기 때문에 빠르게 적용할 수 있었다[15].

mRNA 백신은 특정 종양을 표적으로 맞춤형 의약품으로도 사용할 수 있다. 종양 돌연변이의 특이성을 확인 후 mRNA 백신을 제작한다. 제작된 전사체는 돌연변이 항원을 가지고 있는 세포를 표적으로 하여 특정 면역 반응을 유도하여 신체 내에서 특정 세포를 표적으로 작용할 수 있다[15].

현재 FDA 승인을 받은 mRNA 기반 백신은 2개(코로나 19 백신)이며, 추가적으로 두 개가 더 임상 시험 중에 있다. 하나는 임상 3상에서 코로나 19 백신이며 다른 하나는 1 단계로 광견병 예방용으로 승인되었다. 낭포성 섬유증 및 진행성 흑색종에 대한 치료법을 포함한 치료법은 임상 시험 중이다[16]

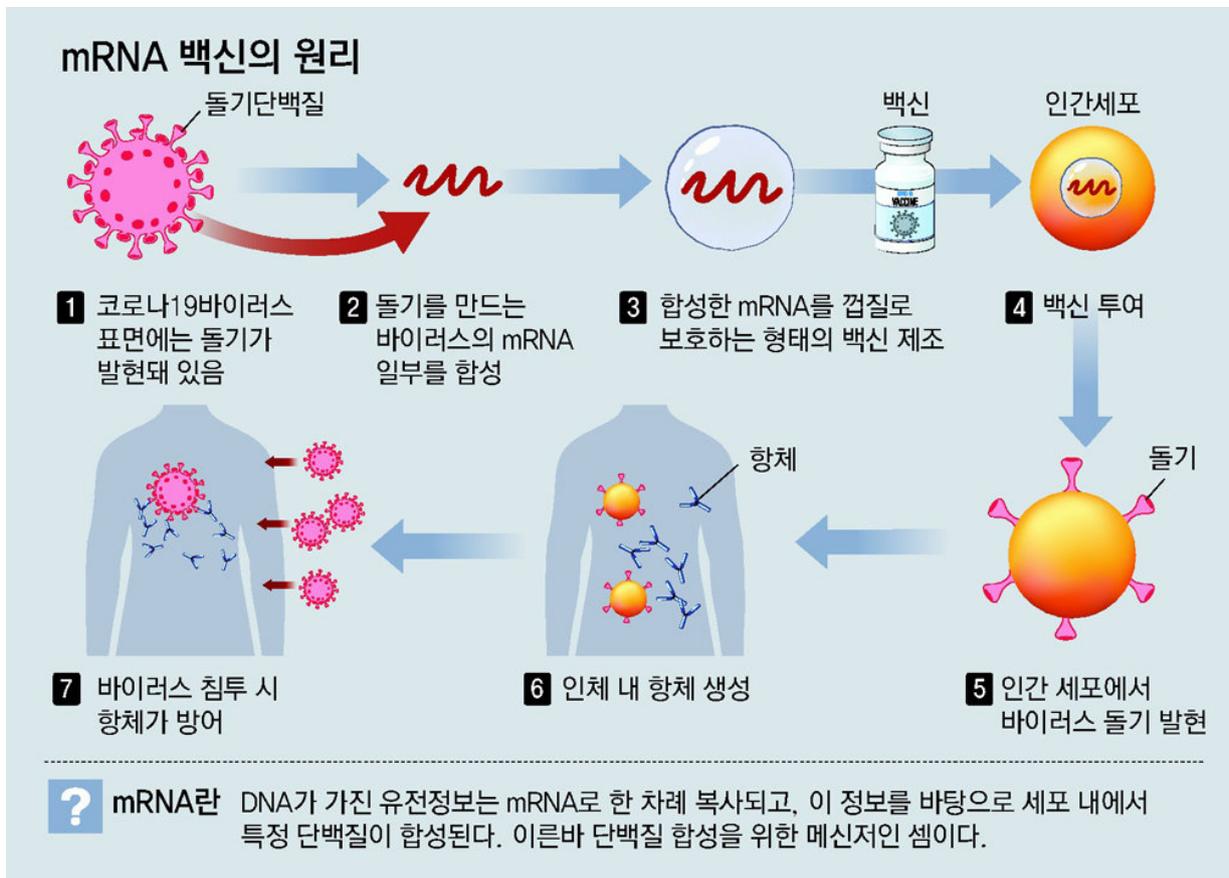


그림 4. mRNA 백신의 원리[19]

RNA 기반 치료제와 RNA-Seq

RNA 치료제는 여러가지 기능을 가지고 있으며, 다양한 메커니즘을 이용하여 지금까지 치료할 수 없었던 많은 인간 질병을 치료하고 예방할 수 있다. 물론 세포 특이적 전달과 같은 RNA 치료제에 대한 몇 가지 문제점이 있기는 하지만 기존 치료법보다 개발이 더 쉽고 빠르기 때문에 현재 현대 과학에서 학제간 접근법과 발전이 주목받고 있는 점을 고려하면, 앞으로 몇 년 안에 더 많은 승인된 RNA 치료법을 보게 될 것이다.

모든 종류의 치료법을 개발할 때, 잘 정립된 방법을 사용하여 활성, 안전성, 효율성에 대한 모든 테스트와 확인을 수행하는 것이 필수적이다. 발견 과정과 RNA 기반 치료법의 활동 및 효과 평가에서 RNA-Seq은 매우 중요하며 여러가지 장점이 있다. RNA-seq은 유전자 발현 수준을 측정하고 샘플링 순간에 존재하는 세포와 조직 내 RNA 분자를 식별할 수 있는 최첨단 기술이다.

다른 약물과 마찬가지로 RNA 기반 치료제는 치료된 세포, 조직 및 유기체의 전사체에 변화를 유도한다. RNA-seq을 활용함으로써 RNA 치료학을 연구하는 연구자들은 게놈 전체의 유전자 발현 변화에 대한 RNA 치료학의 수많은 효과에 대해 포괄적인 이해를 얻을 수 있다. 이러한 이해는 특히 활동, 효율성 및 안전성을 측정할 때 필수적이다. RNA-seq의 RNA 치료학 분야에서 활용방법은 다음과 같다.

RNA 치료제 발견에서의 RNA-Seq

유전자 발현을 확인할 수 있는 마이크로어레이와 RNA-Seq은 질병 및 약물 표적의 바이오마커 발견을 촉진하기 위해 사용된다. RNA-Seq은 오픈시스템으로 마이크로어레이와 달리 알려지지 않은 전사체도 검출이 가능하다. 특히 새로운 표적유전자를 발견할 때 마이크로어레이에 비해 RNA-Seq이 유리하다.

또한, RNA-seq은 특정 조직이나 세포 유전자의 공간적, 시간적 발현을 연구하고 알려지지 않은 작은 RNA를 발견하는 데에도 사용될 수 있다. RNA-Seq은 높은 해상도, 빠른 처리속도, 높은 감도를 가지고 있기 때문에 질병 진단 및 약물 스크리닝에 매우 중요하다. 질병이 있는 조직과 건강간 조직을 RNA-Seq으로 비교함으로써 연구자들은 질병에 관련된 차별화된 유전자와 non-coding RNA를 식별할 수 있다[20].

한가지 예로 유전자 발현 프로파일링을 위한 RNA-Seq을 활용하여 20,000 개 이상의 원발성 암을 특성화하고 33 개 암 유형에 걸쳐 건강한 샘플을 일치시키는 대규모 암 유전체학 프로그램인 The Cancer Genome Atlas(TCGA)이다. 이 지식은 RNA 기반 치료법을 포함한 치료법의 새로운 표적을 밝히는 데 도움이 된다[21].

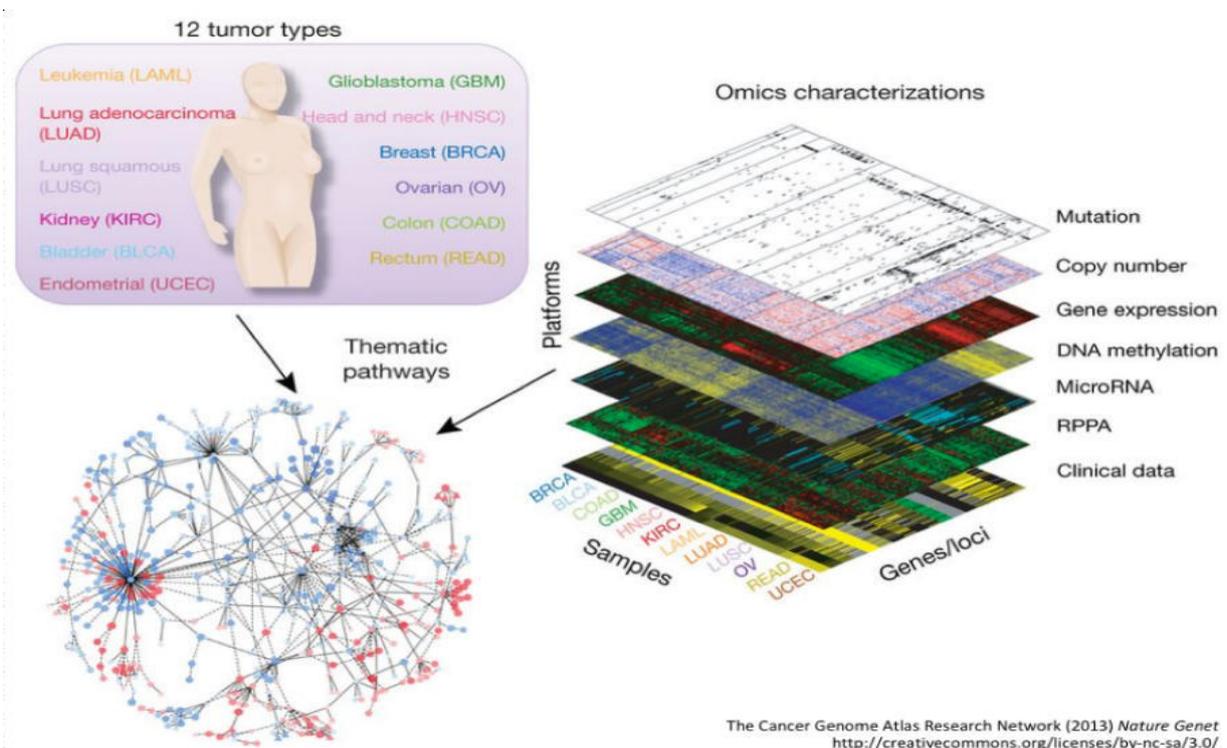


그림 4. Cancer Genome Atlas Research Network 2013 [22]

RNA 치료제의 안전성 최적화 및 평가를 위한 RNA-Seq

RNA-seq 은 RNA 기반 약물의 안전성을 평가하는 데에도 사용될 수 있다. 연구자들은 치료에 대한 유전자 발현의 변화를 분석함으로써 잠재적인 목표를 벗어난 효과나 치료의 의도하지 않은 결과를 식별할 수 있다. 세포 항상성을 방해하지 않고 siRNA(일반적인 RNA 기반 치료법)의 엔도솜 방출을 유도하는 메커니즘을 탐구한 연구에서 RNA-Seq 은 메커니즘이 세포 전사체에 미치는 영향을 이해하고 가능한 안전 문제를 감지하는 데 사용되었다. 다양한 조건에 대해 차별적 유전자 발현 분석이 수행되었으며, QuantSeq 을 사용하여 세포 lysis 에서 RNA-Seq 라이브러리를 제작했다[23].

RNA 치료제의 작용기전과 활성 확인

암이나 전염병과 같은 일부 질병의 복잡성으로 인해 약리학 산업에서는 오믹스 기반 접근 방식에 더 많은 관심을 기울이고 있다[20]. RNA-Seq 은 RNA 기반 치료법의 기초가 되는 메커니즘을 밝히는 데 중추적인 역할을 한다[18]. RNA-Seq (total RNA-Seq, mRNA-Seq, small RNA-Seq)을 활용하여 연구자는 유전자 발현, alternative splicing 및 non-coding RNA 조절에 대한 siRNA 및 ASO 와 같은 RNA 치료제 치료의 기능적 결과를 조사하고 결과에 대해서 확인한다. 예를 들어, Lexogen CORALL kit 를 활용하여 total RNA-Seq 을 수행하여 자궁경부암 세포의 종양 유전자에 대한 siRNA 의 항암 활성을 확인했다[24]. QuantSeq 은 피부 흑색종 유형의 종양 유전자인 Long non-coding RNA SAMMSON(survival-associated mitochondrial melanoma-specific oncogenic noncoding)을 침묵시키는 ASO 로 처리된 원발성 및 전이성 암 세포주의 시퀀싱에 사용되었다[25]. 이 연구의 후속 연구에서도 QuantSeq 은 mTOR 억제제를 사용한 RNA 치료의 시너지 효과의 기본 메커니즘을 밝히기 위한 방법으로 적절하게 활용되었다[25].

Ebiogen's RNA-Seq 서비스

이바이오젠에서는 다양한 RNA-Seq 서비스를 폭넓게 제공하고 있다. 시료의 전처리부터 library 제작, 데이터 도출 및 분석까지 제공하고 있으며, 연구자들의 효율적인 분석을 위해 직접 개발한 분석프로그램을 지원하고 있다.

Total RNA-Seq ; mRNA, Long non-coding RNA expression profiling

Sample requirement	>2ug total RNA
Library method	RiboCop rRNA Depletion + Lexogen CORALL Kit or NEBNext Ultra II Directional RNA kit
NGS run format	NovaSeq, PE100
Data yield	>6Gb/sample
Turnaround time	~4 weeks after RNA QC
Sample type	Tissue, Cell, Whole Blood(Paxgene), Plant, Fungi, etc.

mRNA-Seq ; mRNA expression profiling

Sample requirement	>2ug total RNA
Library method	Poly(A) RNA Selection + Lexogen CORALL Kit or NEBNext Ultra II Directional RNA kit
NGS run format	NovaSeq, PE100
Data yield	>4Gb/sample
Turnaround time	~4 weeks after RNA QC
Sample type	Tissue, Cell, Whole Blood(Paxgene), Plant, Fungi, etc.

QuantSeq 3'mRNA-Seq ; mRNA DEG(differentially expressed gene) 분석(미량이거나 degraded RNA 적용 가능)

Sample requirement	>10ng total RNA
Library method	QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD
NGS run format	NextSeq 500/550, SE 75bp
Data yield	>10M read/sample
Turnaround time	~3 weeks after RNA QC
Sample type	Tissue, Cell, Whole Blood(Paxgene), Plant, Fungi, FFPE, Sorted cell, etc.

Small RNA-Seq ; microRNA expression profiling

Sample requirement	>2ug total RNA (Tissue, Cell) >20ng RNA (Exosome, Body fluid)
Library method	NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Kit
NGS run format	NextSeq 500/550, SE 75bp
Data yield	>20M read/sample
Turnaround time	~4 weeks after RNA QC
Sample type	Tissue, Cell, Whole Blood(Paxgene), Serum, Plasma, Urine, Exosome, etc.

참고문헌

1. RNA-based therapeutics: an overview and prospectus, *Cell Death & Disease* volume 13, Article number: 644 (2022)
2. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978;75:280–4.
3. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494–8.
4. RNA therapeutics on the rise. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19:441–2.
5. RNA-targeted therapeutics. *Cell Metab*. 2018;27:714–39.
6. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:759–80.
7. Advances in CRISPR-Cas systems for RNA targeting, tracking and editing. *Biotechnol Adv*. 2019;37:708–29.
8. Aptamers: a review of their chemical properties and modifications for therapeutic application. *Molecules*. 2019;24:4229.
9. Nusinersen: A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG* 24, 194-203. DOI: 10.5863/1551-6776-24.3.194(2019).
10. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug design, development and therapy* 11, 533-545. DOI: 10.2147/DDDT.S97635(2017).
11. Inotersen for the Treatment of Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2176, 87-98. DOI: 10.1007/978-1-0716-0771-8_6 (2020).
12. <https://www.ataxia.org/scasourceposts/snapshot-what-is-an-antisense-oligonucleotide-aso-aon/>
13. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*. 2009;457:426–33.
14. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*. 2005;6:24–35.
15. (2022). RNA therapy: rich history, various applications and unlimited future prospects. *Experimental & molecular medicine* 54, 455-465. DOI: 10.1038/s12276-022-00757-5.
16. (2022). Current Advances in RNA Therapeutics for Human Diseases. *International journal of molecular sciences* 23. DOI: 10.3390/ijms23052736.
17. https://en.wikipedia.org/wiki/Small_interfering_RNA
18. (2022). RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. *Cell Death & Disease* 13, 644. DOI: 10.1038/s41419-022-05075-2.
19. <https://www.donga.com/news/It/article/all/20231002/121470425/1>
20. (2020). High-Throughput Transcriptome Profiling in Drug and Biomarker Discovery. *Frontiers in Genetics* 11, 19. DOI: 10.3389/fgene.2020.00019.
21. (2022). The long non-coding RNA SAMMSON is essential for uveal melanoma cell survival. *Oncogene* 41, 15-25. DOI: 10.1038/s41388-021-02006-x.
22. <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga/history/timeline-milestones>
23. (2020). Vapor nanobubble is the more reliable photothermal mechanism for inducing endosomal escape of siRNA without disturbing cell homeostasis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 319, 262-275. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.12.050.
24. (2021). AGO-accessible anticancer siRNAs designed with synergistic miRNA-like activity. *Molecular therapy. Nucleic acids* 23, 1172-1190. DOI: 10.1016/j.omtn.2021.01.018.
25. (2022). The long non-coding RNA SAMMSON is essential for uveal melanoma cell survival. *Oncogene* 41, 15-25. DOI: 10.1038/s41388-021-02006-x.
26. (2021). The Limitless Future of RNA Therapeutics. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 9, 628137. DOI: 10.3389/fbioe.2021.628137.