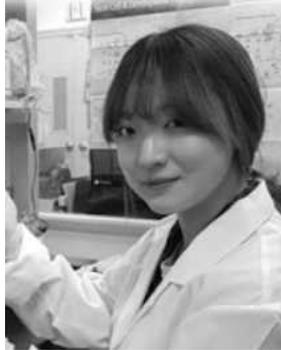


## RNAi-based Gene Therapy (상)



이바다 박사과정 연구원  
최진우 교수

경희대학교 약학대학

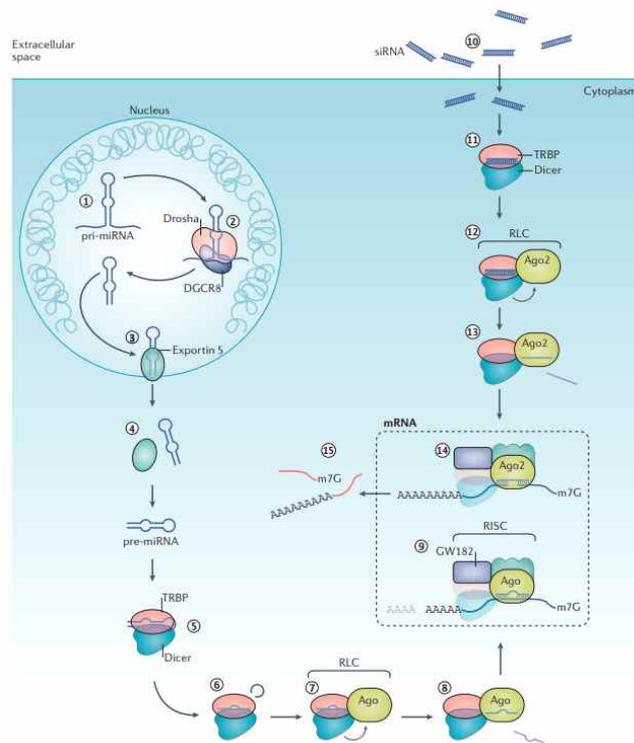
연속되는 2편의 기고문을 통해 RNAi를 이용한 신약개발의 현황을 알아보겠습니다. 세포내 전달의 기술적 해결 방안, CRISPR-CAS9 과의 차별성, 앞으로 넘어야 할 문제점 등에 대해 다룰 것이며, 이 글은 그 중 첫번째 기고문입니다.

### Abstract

RNA 간섭(RNA interference, RNAi)은 특정 유전자를 침묵(silencing)하여 mRNA의 안정성 및 단백질 번역(translation)을 조절하는 메커니즘이다. 이중가닥(double strand)으로 이루어진 작은 RNA 분자를 이용하면 특정 유전자의 침묵(silencing)을 효과적으로 유도할 수 있으나, 이를 치료적으로 적용하기에는 안전성 및 효능과 관련된 수많은 한계점이 존재한다. 하지만 2018년 8월 미국 Food and Drug Administration (FDA)가 처음으로 RNAi 기반 약물(Onpattro®)을 승인하면서 RNAi 치료제 분야에 새로운 가능성이 제시되었다.

본 글에서는 RNAi의 작용 기전 및 치료제로서의 개발 역사를 살펴보고 최근까지 개발된 RNAi의 치료적 장점 및 한계점을 비교하며, RNAi 분자 전달 방식을 비바이러스적 및 바이러스적 방식으로 분류하여 비교하고자 한다. 또한 현재 유전자 치료제 분야에서 각광받고 있는 CRISPR/Cas9시스템과 비교하여 RNAi 기술의 장단점 및 필요성을 시사하고, 마지막으로 최근 진행되고 있는 RNAi 관련 임상시험을 각 전달 방식에 기반하여 정리하고 최근 RNAi 기술의 연구 동향을 분석하고자 한다.

## RNAi 치료의 개념 및 역사



**Figure 1 포유류 동물 세포에서 miRNA의 생합성 및 RNAi 처리(processing), 침묵(silencing) 과정**  
(출처: *Nat Rev Drug Discov*, 2019, Setten, R. L. et al.)

1998년, Andrew Fire와 Craig Mello는 *Caenorhabditis elegans*에서 전사 후 유전자 침묵(post-transcriptional gene silencing, PTGS)을 유도할 수 있는 이중가닥 RNA(double-strand RNA, dsRNA)를 처음 관찰하였고 이 현상을 RNAi라 명명하였다<sup>1</sup>. 포유류 동물 세포에서 RNAi 침묵이 일어나는 과정을 보면(Figure 1)<sup>2,3</sup>, 먼저 miRNA의 초기 형태인 primary microRNA (miRNA) transcript (pri-miRNA)가 핵 내에서 전사된 후 microprocessor complex (Drosha–DGCR8)에 의해 pre-miRNA라 불리는 30 뉴클레오타이드(neucleotide, nt) 내외의 짧은 헤어핀 RNA (short-hairpin RNA, shRNA)로 잘린다. Pre-miRNA는 핵 표면의 exportin 5에 결합하여 세포질로 이송되고, 이후 exportin 5에서 분리되어 RNase III enzyme인 Dicer와 그 결합 파트너인 tar-binding protein (TRBP)와 결합한다. 이 복합체에서 Dicer는 pre-miRNA의 말단 루프(terminal loop)를 잘라 21~25nt의 RNA 조각을 만들어내고 Argonaute (Ago1–Ago4) protein과 추가로 결합하여 RNA-induced silencing complex (RISC)-loading complex (RLC)를 형성한다. 그 다음 운송가닥(passenger strand (sense))가 제거되고 표적가닥(guide strand (antisense))이 Ago1–Ago4 protein에 실리면 guide strand에 specific한 mRNA가 RLC에 결합하여 분해되는 과정을 거치며 해당 mRNA가 침묵된다.

RNAi의 발견으로 식물 및 곰팡이 등 여러 생물종에서 일어나는 불명확한 유전자 침묵 현상을 설명할 수 있게 되었고, 짧은 서열(sequence)의 비번역 RNA(non-coding RNA, ncRNA)가 유전자 발현의 핵심적인 역할을 할 수 있다는 사실이 밝혀졌다. 3년 후, Elbashir<sup>4</sup> 및 Caplen<sup>5</sup>의 연구결과에서 21~22nt 단위의 dsRNA가 포유류 동물 세포에서 비특이적 간섭 반응(non-specific interference response)을 일으키지 않고 유전자 침묵을 유도할 수 있음을 밝혀냈다. 이러한 짧은 간섭 RNA (small interference RNA, siRNA)의 개념이 새롭게 받아들여지면서 RNAi는 유용한 생물학적 수단으로 자리 잡게 되었다.

단순하고 짧은 RNA 서열만으로 특정한 타겟 유전자를 효과적으로 억제할 수 있는 RNAi 기술은 새로운 약을 개발하는 과학자들에게 있어서 그 적용 가능성 및 잠재력이 매우 높은 매력적인 소재로 다가왔으며, 2003년까지 세계의 여러 회사가 RNAi 치료제를 개발하기 위해 설립되었다. 그러나 2000년대 후반 siRNA를 사용한 첫번째 임상시험에서 면역 반응과 관련된 독성이 보고되면서 RNAi 치료제로의 사용 가능성이 재고되었다<sup>5,6</sup>. 2010년, siRNA 나노입자(nanoparticle)를 전신적으로 투여한 임상시험에서는 인간에서 RNAi 치료가 효과를 보임을 최초로 증명하였으나 용량 제한적인 독성이 관찰되었고 치료적 효과가 불충분해 그 한계점이 드러났다<sup>6</sup>. 이에 따라 주요 제약사들은 2010년대 초반 RNAi 치료제 개발에서 중도하차 하기 시작하였다.

RNAi 치료제 개발에 많은 난관이 있었음에도 불구하고 소규모의 RNAi 회사들과 연구자들은 이전의 실패한 임상시험 결과를 발판 삼아 서열 디자인, 제제 최적화 및 전달 메커니즘을 개선하기 위해 힘썼다. 이러한 노력으로 2018년 10월, 최초로 미국 FDA의 승인을 받은 RNAi 치료제가 개발되었다<sup>7</sup>. 간에 작용하는 siRNA인 Onpattro® (patisiran)은 유전성 트랜스타이레틴 아밀로이드증(hereditary transthyretin amyloidosis, hATTR) 환자에게 적용 가능한 치료제로, 간에서 트랜스타이레틴(transthyretin, TTR)의 발현을 억제해 TTR이 응축되어 심장, 신경, 위장관 등의 조직에 쌓이는 것을 억제한다<sup>7</sup>. Onpattro®가 승인을 받으면서 희귀 질환인 hATTR으로 고통받고 있는 환자들에게 새로운 치료적 희망이 열리게 되었고, RNAi 치료제 분야의 잠재력이 다시 주목받기 시작하였다. 현재 간, 신장, 시력 적응증 등에서 다양한 RNAi 치료제 후보군들의 임상 1~3상 시험이 진행되고 있으며, 향후 5년 이내 새로운 전달 경로 및 강화된 효능을 가진 첨단 RNAi 기술이 개발될 것이라 기대된다.

## RNAi의 치료적 적용의 장점 및 한계점

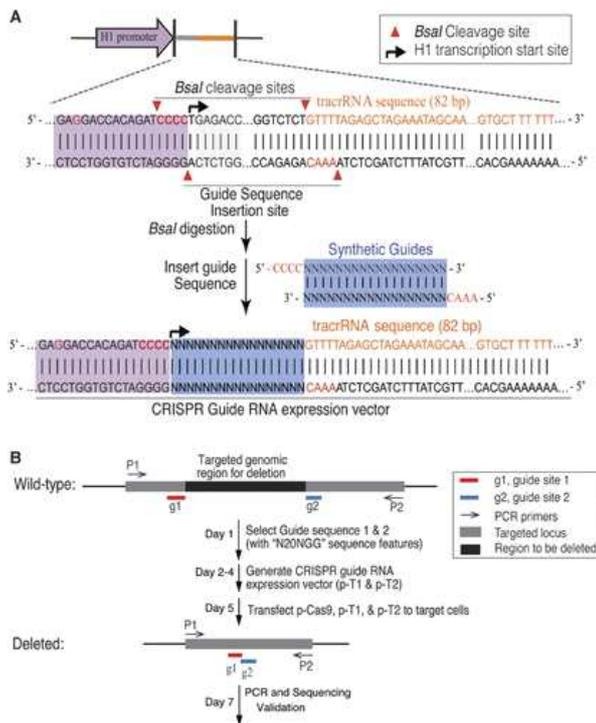
다른 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)를 이용한 대부분의 시스템과는 달리, RNAi는 보다 적은 양의 핵산으로도 세포에 전달될 수 있다. 실제로 siRNA는 일반적으로 피코몰라(picomolar) 농도에서도 강력한 활성을 보이며, 세포 당 2,000개 이하의 siRNA 분자로 특정 유전자의 발현을 녹다운(knockdown)하기에 충분한 것으로 밝혀졌다<sup>8</sup>. 또한 기술의 발전에 따라 인간의 genome 지도가 완벽히 밝혀지고 *in silico* 기법을 이용한 siRNA 디자인 도구가 개발되면서 목표로 하는 유전자에 대한 siRNA를 쉽게 찾을 수 있기 때문에 다른 화합물 치료제와 비교했을 때 상대적으로 경제적이며 효과적인 과정으로 개발할 수 있다. mRNA에 작용하여 목표한 유전자를 억제하기 때문에 단백질 수준에서 억제하는 치료제가 존재하지 않거나 개발이 불가능한 유전자를 대상으로 하기에 매우 적합한 기술이다. 예를 들어, 활성 결합 부위(active binding site)가 존재하지 않는 단백질의 경우 기존의 약리학적 접근 방식으로는 억제제를 개발하기 어려우나, mRNA를 타겟으로 하는 RNAi는 이러한 한계점을 극복할 수 있다. 또한 RNAi는 점 돌연변이(point mutation)와 같이 단백질 수준의 억제제가 구분할 수 없는 돌연변이(예: ADO II<sup>9</sup>, KRAS<sup>G12D</sup> 돌연변이<sup>10</sup>)를 반영하여 디자인할 수 있어 보다 타겟 특이적인 치료제로 개발하기에 용이하다.

RNAi 기술은 단백질을 코딩(coding)하고 있는 유전체(genome) 이외에 비번역 유전체(non-coding genome)를 대상으로 하여 이를 억제하는 데에도 효과적으로 이용될 수 있다. 인간 유전체의 70~90%가 단백질을 코딩하고 있지 않음에도 길거나 짧은 서열의 RNA로 전사되고 있으며, 이러한 ncRNA가 인간의 생리학 및 질병에 많은 기여를 한다는 것이 잘 입증되어 있다<sup>11</sup>. 특히 암에서 이러한 ncRNA를 타겟으로 하는 RNAi 치료에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 2017년 Di Chen의 연구 결과에 따르면 1기 비소세포폐암(stage I non-small cell lung cancer) 환자에서 발현이 높은 것으로 알려진 긴 비번역 RNA (long non-coding RNA, lnc RNA)의 일종인 metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT-1)를 siRNA로 억제했을 때 위암의 생체 외(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*) 모델에서 암세포의 침습(invasion) 및 전이(metastasis)를 억제할 수 있음을 보여 주었다<sup>12</sup>. 비슷한 맥락에서, 2018년 Peixin Dong의 연구에서는 lncRNA인 nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (NEAT1)이 여러 암 종에서 높게 발현하고 있으며, NEAT1이 대장암을 포함한 여러 암 종에서 생체표지자(biomarker)로 사용될 수 있음은 물론, NEAT1 특이적 RNAi를 화학요법(chemotherapy) 또는 방사선요법(radiotherapy)과 함께 적용하였을 때 더욱 큰 치료적 효과를 보일 수 있음을 보고하였다<sup>13</sup>.

한편, RNAi는 지속적이 아닌 일시적으로만 작용할 수 있다는 단점이 있으며, 세포가 분열하면서 RNAi 분자가 희석되기 때문에 시간이 지날수록 그 효능이 점차 감소하는 한계점이 존재 한다<sup>14</sup>. 그러나 siRNA의 경우 세포 내 환경에서 매우 안정된 형태로 존재하기 때문에 세포 내에서의 불안정성에 대한 이슈는 크게 문제되지 않는 것으로 보이며<sup>15</sup>, 운송가닥에 화학적 변형(chemical modification)을 도입하여 siRNA의 반감기 등을 정밀하게 조절하여 안정성을 더욱 향상시키는 연구도 광범위하게 진행되고 있다<sup>16,17</sup>.

하지만 siRNA를 정맥으로 전신투여 경우 핵산분해효소(nuclease)에 의한 분해로 혈액 내에서의 반감기가 수 분 정도로 매우 짧고, 음전하를 띠며 분자량이 너무 커서(약 13kDa) 세포벽을 통과하기 어려운 한계점이 존재 한다<sup>18</sup>. 또한 앞서 언급한 바와 같이 RNAi로 인한 비특이적 독성에 관한 문제가 가장 큰 난제로 작용하고 있다.

RNAi 치료제를 임상적으로 적용하는 데에 영향을 미치는 독성의 주요 원인은 다음 네 가지이다. 첫째로 외부에서 유입된 dsRNA를 인식해 활성화되는 선천성 면역 센서(innate immune sensor)에 의한 영향으로, 이는 주로 PKR, TLR43, TLR7과 같은 면역세포 수용체(immune cell receptor)에 의해 발생 한다<sup>19</sup>. 두번째로 RNAi 투여 시 함께 사용되는 화학 첨가 물질에 대한 면역 반응에 대한 문제로, 특히 나노입자를 이용하여 RNAi를 전달하는 경우 여러 임상시험 결과에서 투여 용량에 의존적으로 독성이 증가하며, 분해 과정에서 대사체 또한 독성을 일으킬 수 있음을 입증하였다<sup>20</sup>. 세번째로 RNAi의 부정확한 영향(off-target effect)으로 인한 부작용을 꼽을 수 있는데, 이는 표적 가닥이 의도하지 않은 서열에 결합함으로써 발생 한다<sup>21</sup>. 현재 사용되는 siRNA 디자인 도구 및 인간 유전자 서열을 제공하는 BLAST와 같은 도구를 이용해 간접적으로 부정확한 영향을 예측할 수 있으나 임상적 실험을 통해서만 그 안전성을 입증할 수 있다. 마지막으로 RNAi가 목표로 하지 않은 다른 조직 및 장기에서 예상 활성(on-target effect)을 나타내는 경우이다. 특히 RNAi를 전신적으로 투여할 때 타겟 조직을 포함한 다른 조직 및 장기에서도 유전자 침묵이 일어날 수 있는데, 예를 들어 암 조직에서 억제될 시 암세포의 증식을 막을 수 있는 MYC과 같은 유전자를 타겟으로 했을 때 MYC을 활발히 발현하는 다른 정상 조직에서 원치 않는 부작용이 나타날 수 있다<sup>22</sup>.



**Figure 2 CRISPR/Cas9 시스템에 의한 타겟 유전자 제거(deletion)**

(출처: *Biotechniques*, 2014, Zheng, Q. *et al.*)

그러나 유전자 치료제 분야에서 최근 각광받고 있는 크리스퍼/카스9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR—associated protein 9, CRISPR/Cas9) 시스템과 비교했을 때 RNAi는 CRISPR/Cas9 시스템이 가지는 유전적 안전성과 관련된 문제를 회피할 수 있다는 장점이 있다<sup>14</sup>. CRISPR/Cas9은 원핵생물 내에 자연적으로 존재하는 면역 시스템으로, 외부에서 유입된 유전자를 타겟하여 분해시키는 역할을 한다<sup>23</sup>. 특정 유전자를 제거(deletion)하는 목적으로 CRISPR-Cas9 시스템을 사용할 때 타겟 서열 특이적인 안내RNA (guide RNA, gRNA)가 유전자 상의 타겟 서열에 상보적으로 결합하면서 핵산중간분해효소 활성(endonuclease activity)을 가진 Cas9이 타겟 서열의 특정 부분에 이중가닥손상(double-strand break, DSB)을 일으키고, 세포 내의 nonhomologous end-joining (NHEJ)-매개 DNA 복구 과정을 통해 타겟 유전자를 유전체 상에서 영구적으로 제거(deletion)시키거나 삽입-결실(indel)을 도입하여 녹아웃(knockout)시킬 수 있게 된다(Figure 2)<sup>24</sup>. CRISPR/Cas9 시스템은 gRNA 서열을 조작함으로써 손쉽게 타겟 특이성을 증가시킬 수 있기 때문에 유전자 치료제 분야에서 바이러스 감염, 유전 질환, 암 등의 질환에 활발하게 적용되고 있다<sup>25</sup>. 예를 들어, 바이러스가 감염된 세포에 바이러스의 특정 유전자를 타겟으로 하는 gRNA를 Cas9과 함께 도입하면 바이러스 유전체를 강력하게 불활성화하거나 제거할 수 있다. 여러 종류의

병원성 바이러스와 연관된 실험(HIV<sup>26,27</sup>, hepatitis B virus<sup>28</sup>, human papillomavirus<sup>29</sup>, Epstein-Barr virus<sup>30</sup>)에서 그 효과가 입증되었다. 다른 방식으로, 숙주 세포 유전체 내에 코딩되어 있는 바이러스 특이적 수용체를 타겟으로 하여 바이러스의 감염 자체를 억제할 수도 있다. 실제로 CRISPR/Cas9을 이용하여 숙주 세포 유전체에서 HIV의 코어 수용체(core receptor) (예: CCR5)를 제거(deletion)한 결과, HIV의 감염을 효과적으로 억제할 수 있었다<sup>31</sup>. 하지만 RNAi와 마찬가지로 타겟 특이성이 RNA의 서열에 의존하기 때문에 CRISPR/Cas9 또한 부정확한 효과(off-target effect)를 배제할 수 없다. 여기서 가장 큰 쟁점은 dsDNA만을 인식하는 Cas9의 특성 때문에, CRISPR/Cas9 시스템은 mRNA가 아닌 대상 세포 내의 유전체 수준에서 영구적인 변형을 일으켜 RNAi보다 훨씬 심각하고 비가역적인 부정확한 효과(off-target effect)를 나타낼 수 있다는 점이다<sup>32</sup>. 위에서 언급한 바와 같이 RNAi의 효능에 대한 한계점은 명백히 존재하나 유전자 치료제로 사용될 때 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하는 것 보다 더욱 정밀하고 안전하게 유전자 침묵을 유도할 수 있음은 분명하다.

실질적으로 RNAi가 발견된 지 20여년이 지난 지금까지도 siRNA를 효과적으로 전달하는 방법이 뚜렷하게 정립되지 않아 이와 관련한 연구가 요구되는 실정이다. 현재까지 RNAi를 임상적인 범위에서 효과적으로 전달하기 위한 많은 방법들이 연구되어 왔으며, 이를 크게 바이러스 및 비바이러스 전달 시스템으로 분류할 수 있다. 이후 기술할 내용에서는 각각의 RNAi 전달 메커니즘 및 효과에 대해 서술하고자 한다.

## 비바이러스성 전달방식을 이용한 RNAi 기반 유전자 치료

앞서 언급한 바와 같이 RNAi를 전신적으로 투여하는 경우 임상적으로 유효한 효과를 보이기 어렵기 때문에 비바이러스적 전달 시스템에 관한 연구는 국소 투여 방식에 초점을 맞추게 되었으며, 이는 정맥 투여 방식과 비교해 비교적 개선된 효과를 보이며 RNAi의 비바이러스적 전달에 큰 성과를 낼 수 있었다. 2009년 Jian Jiang의 연구에서 노인황반변성(age-related macular degeneration, AMD)와 같이 안구 혈관신생(ocular angiogenesis)에 의해 발생하는 안구 질환을 타겟으로 생체 내 혈관신생(*in vivo* retinal neovascularization) 마우스 모델에서 HIF-1 $\alpha$  및 VEGF siRNA를 유리체 내 투여(intravitreal injection)함으로써 혈관신생을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다<sup>33</sup>. 또한 2014년 Vikas Hedge의 연구에서는 생체 내에서 각질세포(keratinocyte) 특이적 단백질인 fillagrin(*FLG*)를 타겟으로 하는 siRNA를 국소용 연고에 혼합하여 피부에 도포할 수 있는 새로운 제형을 개발하였으며, 고통을 수반하지 않는 비침습적인 방법으로도 피부 질환을 타겟으로 하는 RNAi를 전달할 수 있음을 보여주었다<sup>34</sup>.

투여 방식을 변경하는 것 이외에 RNAi 분자에 화학적 변형을 도입하거나 다양한 운반체(carrier)를 적용하여 비바이러스적 전달 방식의 단점을 보완하기 위한 연구도 꾸준히 진행되어 왔는데, 이러한 연구는 RNAi를 분해 시스템으로부터 보호하고 RNAi의 타겟 특이성을 높이며, RNAi가 세포질 내로 효과적으로 방출되는 것을 목적으로 하고 있다. 따라서 carrier 변경 또는 화학적 변형을 통해 RNAi에 의해 체내에서 dsRNA를 인식하는 내인성 면역 센서(endogenous immune sensor)가 활성화되는 것을 방지할 수 있으며<sup>35</sup>, 핵산중간분해효소(endonuclease) 및 핵산외부가수분해효소(exonuclease)에 의해 분해되는 현상을 회피해 RNAi의 효력을 크게 향상시킬 수 있다<sup>36</sup>. 또한 화학적 변형을 통해 RISC에 실리는 표적가닥의 선택성을 높일 수 있고<sup>37</sup>, 타겟 서열 특이성을 개선하여 부정확한 효과(off-target effect)를 감소시킬 수 있으며<sup>21</sup>, RNAi 분자의 물리적 및 화학적 특성을 정밀하게 변경하여 세포 내로의 전달력을 향상시킬 수 있다<sup>38</sup>.

혈액 내에 존재하는 핵산중간분해효소는 siRNA가 투여 후 혈중에서 분해되는데 가장 큰 원인을 차지한다. 특히 리보핵산가수분해효소(ribonuclease)는 siRNA의 노출된 말단 부분을 공격하여 이중가닥을 분리시키고 결국 siRNA를 분해 한다<sup>39</sup>. 이로부터 siRNA를 보호하기 위해 siRNA에 컨주게이션(conjugation)할 수 있는 중합체(polymer) 중 대표적으로 atelocollagen과 chitosan 등이 있다. Chitosan은 점막접착적(mucoadhesive) 특성을 가져 점막에 잘 부착할 수 있어 RNAi를 비강내 투여(intranasal administration)를 통해 기관지 상피세포(bronchiolar epithelial cell)로 전달하는 데에 적용된 바가 있다<sup>40</sup>. 마우스<sup>41</sup> 및 인간이 아닌 영장류<sup>42</sup>에서 이를 적용한 전달방식으로 respiratory syncytial virus의 상부 호흡기 감염을 효과적으로 억제한 연구 결과 또한 보고되었다. 단핵포식세포계(mononuclear phagocytic system, MPS; 또는 reticuloendothelial system, RES)를 통해서도 혈중에서 siRNA가 분해될 수 있는데, 특히 나노입자를 운반체로 사용할 경우 더욱 중요하게 작용 한다<sup>43</sup>. siRNA 및 다른 작은 분자(<8 nm)는 신장에서 제거되는 반면, 상대적으로 크기가 큰 나노입자의 경우 간, 비장, 폐 등과 같은 주요 장기의 대식세포에 의해 분해 된다<sup>44,45</sup>. 이를 극복하기 위해서 분자 크기, 모양, 분자 표면의 화학적 특성, 표면 극성 등의 분자 특성을 변형시킬 수 있다. 그 예로 Zimmermann의 연구에서 인간이 아닌 영장류에게 폐길레이션(PEGylation)된 APOB-targeted siRNA를 투여한 결과, 단일 정맥 투여만으로도 gene silencing 효과가 11일 이상 지속되었으며 90% 이상의 녹다운 효과를 보임과 동시에 독성은 관찰되지 않았다<sup>46</sup>. RNAi 타겟 조직이 혈관 벽에서 멀리 떨어져 있는 경우에는

RNAi 분자가 혈관 내 공간(lumen)에서 타겟 위치까지 조직을 침투하며 이동해야 하는데, siRNA의 높은 음이온성으로 인해 음전하를 띠는 세포막과 반발 작용이 일어나게 된다. 이러한 특성은 siRNA가 혈관 내 공간에서 혈관 밖으로 유출되는 데에 한계로 작용할 뿐만 아니라 siRNA가 혈관내피세포(endothelial cell)의 내부 또는 세포 사이 공간으로 확산되어 siRNA가 청소(clearance)를 거치는 데에 방해 요인으로 작용한다. 이는 나노입자를 운반체로 사용함으로써 어느 정도 극복할 수 있으나, 모세혈관의 공극 크기(pore size)(60–80 nm)를 통과하지 못하는 크기의 나노입자의 경우에는 적용하기 어렵다<sup>47</sup>.

일단 siRNA가 타겟 세포에 도달하면 세포 내로 들어가는 과정을 거쳐야 한다. 하지만 앞서 언급한 바와 같이 siRNA는 높은 음전하를 띠기 때문에 일반적으로 그 자체로는 세포막을 통과할 수 없다. 현재까지 다양한 연구를 통해 올리고뉴클레오타이드 특이적인 수용체 또는 수송 단백질(transporter)이 밝혀졌으나, 아직까지 siRNA 수송에 있어서 완전하게 검증된 바는 없다<sup>48</sup>. 일반적으로 RNAi와 같은 입자가 cell 내부로 들어갈 수 있는 방법은 내포 작용(endocytosis)을 통해서인데, 이를 통해 siRNA가 탑재된 운반체는 내포성 소포(endosomal vesicle)에 싸여 초기 엔도솜(early endosome, pH 6-6.5)부터 후기 엔도솜(late endosome, pH 5-5.5)을 거쳐 리소좀(lysosome, pH4.5-5)와 결합하여 분해 된다<sup>49</sup>. 이를 회피하기 위해 마이셀(micelle)로 이루어진 지질 나노입자(lipid nanoparticle)를 운반체로 이용한 연구가 활발히 진행되었다. 지질 나노입자는 비교적 합성하기 쉬우며, 원하는 기능에 따라 지질의 구성을 변경하기 편리하다는 장점이 있다<sup>50</sup>. 하지만 지질 나노입자를 운반체로 사용한 연구에서 세포 내로 유입된 siRNA의 약 70%가 처음 24시간 이내에 배설되었으며, 전체 siRNA의 1-2%만이 초기 엔도솜으로 부터 빠져나와 세포질(cytosol)에 분비되었음을 보여주었다<sup>51</sup>. 지질 나노입자 이외에도 다양한 나노입자가 적용되었으나 siRNA를 세포질 내로 효과적으로 전달시킨 경우는 거의 없으며, 일반적으로 내포 작용 경로에 의해 불활성화되는 siRNA가 어느 정도인지 파악하기가 어려운 실정이다<sup>50</sup>.

이를 극복하기 위해 내포성 탈출(endosomal escape)을 용이하게 하거나 내포 작용을 우회하는 나노입자 운반체를 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 내포성 탈출을 용이하게 하는 방법 중 가장 많이 연구된 방법은 “양성자 스펀지(proton sponge)” 가설이라 불리는 메커니즘을 이용하는 것이다<sup>52,53</sup>. 초기 엔도솜이 후기 엔도솜을 거쳐 리소좀과 결합하는 과정에서 소포(vesicle) 내 pH가 점점 낮아지면서 내부의 물질이 분해되는데, 히스티딘이 풍부한 물질(histidine-rich molecule)이나 poly (amido amine) polymer와 같은 분자가 소포 내에 실리게 되면 낮은 pH가 중화되고 H<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, 물 분자

를 지속적으로 유입시켜 세포 내의 삼투압이 높아지고, 결국 세포가 부풀어 오른 후 터지면서 내부의 물질이 세포질로 빠져나올 수 있게 된다<sup>47,48,54</sup>. 세포막 작용을 우회하는 대표적인 메커니즘으로는 수용체 매개 세포막 투과(receptor-mediated membrane penetration) (예: scavenger receptor<sup>55</sup>), 세포막 직접 투과(direct membrane penetration) 등이 있다. TAT, penetratin 등의 세포 투과성 펩타이드(cell penetrating peptides, CPPs)는 세포막을 통과하여 세포질에 직접 침투할 수 있는 펩타이드로, 정확한 메커니즘이 아직 밝혀지지 않았으나 이를 운반체로 적용한 siRNA 전달 방식이 효과가 있음이 입증되었다<sup>56,57</sup>. 생물학적으로 안전한 용량에서 이러한 펩타이드를 조직 특이적 펩타이드와 함께 적용하였을 때 시너지 효과를 낼 수 있음이 입증되었다. Conde 외의 연구진들은 PEGylated c-myc targeting siRNA를 RGD tumor-targeting 펩타이드와 TAT 펩타이드로 구성된 나노입자에 탑재한 전달 방식을 사용하였을 때 생체 외 및 생체 내에서 각각 70%, 65.2%의 유전자 침묵 효과를 보임을 증명하였다<sup>58</sup>.

전반적으로 비바이러스적 전달 방식을 이용한 RNAi 치료제에 대한 연구는 조직 특이적 투여 경로를 개발하고 체내 siRNA의 안정성을 높이거나 조직 특이적으로 전달하기 위한 방법을 중점적으로 이루어지고 있다. 특히 최근 몇 년 간 학계에서 출판되고 있는 siRNA 전달 시스템에 관한 논문의 수가 점차 감소함에도 불구하고 임상시험의 흐름은 나노입자를 이용한 siRNA 전달 시스템을 적용하는 방향으로 나아가고 있다. 이는 RNAi의 비바이러스적 전달 방식 분야에서 치료제를 개발하기 위해서는 더 효과적인 전달 물질을 개발하는 것이 중요함을 시사하고 있다.

- 1 Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811, doi:10.1038/35888 (1998).
- 2 Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 509-524, doi:10.1038/nrm3838 (2014).
- 3 Setten, R. L., Rossi, J. J. & Han, S. P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 421-446, doi:10.1038/s41573-019-0017-4 (2019).
- 4 Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498, doi:10.1038/35078107 (2001).
- 5 Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. & Morgan, R. A. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9742-9747, doi:10.1073/pnas.171251798 (2001).
- 6 DeVincenzo, J. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8800-8805, doi:10.1073/pnas.0912186107 (2010).

- 7 Adams, D. *et al.* Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* **379**, 11-21, doi:10.1056/NEJMoa1716153 (2018).
- 8 Wittrup, A. *et al.* Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol* **33**, 870-876, doi:10.1038/nbt.3298 (2015).
- 9 Maurizi, A. *et al.* RNA interference therapy for autosomal dominant osteopetrosis type 2. Towards the preclinical development. *Bone* **110**, 343-354, doi:10.1016/j.bone.2018.02.031 (2018).
- 10 Zorde Khvalevsky, E. *et al.* Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20723-20728, doi:10.1073/pnas.1314307110 (2013).
- 11 Kung, J. T., Colognori, D. & Lee, J. T. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* **193**, 651-669, doi:10.1534/genetics.112.146704 (2013).
- 12 Chen, D. *et al.* The role of MALAT-1 in the invasion and metastasis of gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* **52**, 790-796, doi:10.1080/00365521.2017.1280531 (2017).
- 13 Dong, P. *et al.* Long Non-coding RNA NEAT1: A Novel Target for Diagnosis and Therapy in Human Tumors. *Front Genet* **9**, 471, doi:10.3389/fgene.2018.00471 (2018).
- 14 Bartlett, D. W. & Davis, M. E. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* **34**, 322-333, doi:10.1093/nar/gkj439 (2006).
- 15 Hoerter, J. A., Krishnan, V., Lionberger, T. A. & Walter, N. G. siRNA-like double-stranded RNAs are specifically protected against degradation in human cell extract. *PLoS One* **6**, e20359, doi:10.1371/journal.pone.0020359 (2011).
- 16 Dar, S. A., Thakur, A., Qureshi, A. & Kumar, M. siRNAMod: A database of experimentally validated chemically modified siRNAs. *Sci Rep* **6**, 20031, doi:10.1038/srep20031 (2016).
- 17 Foster, D. J. *et al.* Advanced siRNA Designs Further Improve In Vivo Performance of GalNAc-siRNA Conjugates. *Mol Ther* **26**, 708-717, doi:10.1016/j.ymthe.2017.12.021 (2018).
- 18 Layzer, J. M. *et al.* In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* **10**, 766-771, doi:10.1261/rna.5239604 (2004).
- 19 Kleinman, M. E. *et al.* Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* **452**, 591-597, doi:10.1038/nature06765 (2008).
- 20 Zuckerman, J. E. & Davis, M. E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 843-856, doi:10.1038/nrd4685 (2015).
- 21 Janas, M. M. *et al.* Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. *Nat Commun* **9**, 723, doi:10.1038/s41467-018-02989-4 (2018).
- 22 Soucek, L. *et al.* Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice. *Genes Dev* **27**, 504-513, doi:10.1101/gad.205542.112 (2013).
- 23 Pickar-Oliver, A. & Gersbach, C. A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 490-507, doi:10.1038/s41580-019-0131-5 (2019).
- 24 Zheng, Q. *et al.* Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *Biotechniques* **57**, 115-124, doi:10.2144/000114196 (2014).
- 25 Wang, H., La Russa, M. & Qi, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev*

- Biochem* **85**, 227-264, doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014607 (2016).
- 26 Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y. & Koyanagi, Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep* **3**, 2510, doi:10.1038/srep02510 (2013).
- 27 Hu, W. *et al.* RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 11461-11466, doi:10.1073/pnas.1405186111 (2014).
- 28 Liu, X., Hao, R., Chen, S., Guo, D. & Chen, Y. Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome. *J Gen Virol* **96**, 2252-2261, doi:10.1099/vir.0.000159 (2015).
- 29 Zhen, S. *et al.* In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. *Biochem Biophys Res Commun* **450**, 1422-1426, doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.014 (2014).
- 30 Wang, J. & Quake, S. R. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13157-13162, doi:10.1073/pnas.1410785111 (2014).
- 31 Li, C. *et al.* Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *J Gen Virol* **96**, 2381-2393, doi:10.1099/vir.0.000139 (2015).
- 32 Wu, X., Kriz, A. J. & Sharp, P. A. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol* **2**, 59-70, doi:10.1007/s40484-014-0030-x (2014).
- 33 Jiang, J. *et al.* Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1alpha and VEGF. *J Cell Physiol* **218**, 66-74, doi:10.1002/jcp.21566 (2009).
- 34 Hegde, V. *et al.* In vivo gene silencing following non-invasive siRNA delivery into the skin using a novel topical formulation. *J Control Release* **196**, 355-362, doi:10.1016/j.jconrel.2014.10.022 (2014).
- 35 Robbins, M. *et al.* 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol Ther* **15**, 1663-1669, doi:10.1038/sj.mt.6300240 (2007).
- 36 Bramsen, J. B. *et al.* A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. *Nucleic Acids Res* **37**, 2867-2881, doi:10.1093/nar/gkp106 (2009).
- 37 Snead, N. M., Escamilla-Powers, J. R., Rossi, J. J. & McCaffrey, A. P. 5' Unlocked Nucleic Acid Modification Improves siRNA Targeting. *Mol Ther Nucleic Acids* **2**, e103, doi:10.1038/mtna.2013.36 (2013).
- 38 Hamil, A. S. & Dowdy, S. F. Synthesis and Conjugation of Small Interfering Ribonucleic Neutral SiRNAs. *Methods Mol Biol* **1364**, 1-9, doi:10.1007/978-1-4939-3112-5\_1 (2016).
- 39 Iversen, F. *et al.* Optimized siRNA-PEG conjugates for extended blood circulation and reduced urine excretion in mice. *Theranostics* **3**, 201-209, doi:10.7150/thno.5743 (2013).
- 40 Howard, K. A. *et al.* RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther* **14**, 476-484, doi:10.1016/j.ymthe.2006.04.010 (2006).
- 41 Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* **11**, 50-55, doi:10.1038/nm1164 (2005).

- 42 Li, B. J. *et al.* Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* **11**, 944-951, doi:10.1038/nm1280 (2005).
- 43 Longmire, M., Choyke, P. L. & Kobayashi, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)* **3**, 703-717, doi:10.2217/17435889.3.5.703 (2008).
- 44 Falsini, S., Ciani, L., Ristori, S., Fortunato, A. & Arcangeli, A. Advances in lipid-based platforms for RNAi therapeutics. *J Med Chem* **57**, 1138-1146, doi:10.1021/jm400791q (2014).
- 45 Xu, X., Li, Z., Zhao, X., Keen, L. & Kong, X. Calcium phosphate nanoparticles-based systems for siRNA delivery. *Regen Biomater* **3**, 187-195, doi:10.1093/rb/rbw010 (2016).
- 46 Zimmermann, T. S. *et al.* RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* **441**, 111-114, doi:10.1038/nature04688 (2006).
- 47 Tatiparti, K., Sau, S., Kashaw, S. K. & Iyer, A. K. siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments. *Nanomaterials (Basel)* **7**, doi:10.3390/nano7040077 (2017).
- 48 Juliano, R. L. & Carver, K. Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* **87**, 35-45, doi:10.1016/j.addr.2015.04.005 (2015).
- 49 Hu, Y. B., Dammer, E. B., Ren, R. J. & Wang, G. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* **4**, 18, doi:10.1186/s40035-015-0041-1 (2015).
- 50 Kim, B., Park, J. H. & Sailor, M. J. Rekindling RNAi Therapy: Materials Design Requirements for In Vivo siRNA Delivery. *Adv Mater* **31**, e1903637, doi:10.1002/adma.201903637 (2019).
- 51 Sahay, G. *et al.* Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol* **31**, 653-658, doi:10.1038/nbt.2614 (2013).
- 52 Du, L. *et al.* The pH-Triggered Triblock Nanocarrier Enabled Highly Efficient siRNA Delivery for Cancer Therapy. *Theranostics* **7**, 3432-3445, doi:10.7150/thno.20297 (2017).
- 53 Wojnilowicz, M., Glab, A., Bertucci, A., Caruso, F. & Cavalieri, F. Super-resolution Imaging of Proton Sponge-Triggered Rupture of Endosomes and Cytosolic Release of Small Interfering RNA. *ACS Nano* **13**, 187-202, doi:10.1021/acsnano.8b05151 (2019).
- 54 Dong, Y., Siegwart, D. J. & Anderson, D. G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* **144**, 133-147, doi:10.1016/j.addr.2019.05.004 (2019).
- 55 Yang, M. *et al.* Efficient cytosolic delivery of siRNA using HDL-mimicking nanoparticles. *Small* **7**, 568-573, doi:10.1002/smll.201001589 (2011).
- 56 Wang, J., Lu, Z., Wientjes, M. G. & Au, J. L. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J* **12**, 492-503, doi:10.1208/s12248-010-9210-4 (2010).
- 57 Gooding, M., Browne, L. P., Quinteiro, F. M. & Selwood, D. L. siRNA delivery: from lipids to cell-penetrating peptides and their mimics. *Chem Biol Drug Des* **80**, 787-809, doi:10.1111/cbdd.12052 (2012).
- 58 Conde, J. *et al.* Design of multifunctional gold nanoparticles for in vitro and in vivo gene silencing. *ACS Nano* **6**, 8316-8324, doi:10.1021/nn3030223 (2012).