



신진홍·김대성

양산부산대학교병원 신경과

Innovative Therapeutic Approaches of Genetic Muscle Disease

Jin-Hong Shin, MD, PhD, Dae-Seong Kim, MD, PhD

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

With Duchenne muscular dystrophy on top, the lines in the list of genetic muscle diseases are ever-increasing, accelerated by the recent advent of exome sequencing. Steroid therapy with supportive care has remarkably improved the patients' life expectancy as well as quality of life, though the outcome is yet far from satisfactory. Innovative therapeutic approaches have been under research for the past decades, some of which have finally entered clinical trial phase. Exon skipping, read-through, and virus-mediated gene transfer are the most advanced techniques for Duchenne muscular dystrophy, while many other approaches are following. However, recent series of clinical trial proved to be disappointing contrary to the high expectation. It warns us against the hype for the gene therapy and calls for steady and unbiased research activity to face unpredicted obstacles.

Key Words: Muscular dystrophy; Gene therapy; Exon skipping; Readthrough

두센 근육디스트로피(Duchenne muscular dystrophy; DMD)

DMD는 X염색체에 있는 디스트로핀(dystrophin) 유전자의 이상으로 인해 점진적인 횡문근 약화를 일으키는 치명적인 질환이다. 3-5살경 운동 발달이 가속되는 시기에 주로 진단되는데, 혈청 creatine kinase치 상승으로 인해 무증상 시기에 발견되기도 한다. 평균 9.5살, 늦어도 13살 이전에 보행이 불가능하게 되는데, 16살 이후까지 보행이 가능한 경우는 경한 형태의 베커 근육디스트로피(Becker muscular dystrophy; BMD)로 분류한다.

DMD는 남아 3,600-6,000명 당 한 명 꼴로 발생하여 근육 디스트로피 질환군 중에 가장 환자 수가 많고, 의학사적으로도 일찍부터 기술되어 근육디스트로피의 원형으로 꼽힌

다. 치료 연구의 측면에서도 다른 근육 질환군에 비해 단연 앞서 있어 근육질환의 혁신적 치료를 논하자면 DMD로부터 시작하는 것이 바람직하다.

현재 유일하게 인정되는 약물 치료는 경구 스테로이드로, prednisone 0.75 mg/kg 또는 deflazacort 0.9 mg/kg의 용량으로 매일 투여를 원칙으로 한다. 스테로이드 치료는 근력 저하를 둔화시켜 척추 변형을 방지하고 호흡기능 보전에 주며, 심기능을 호전시키는 효과가 있다.¹ 또한 호흡 보조, 심기능 관리, 보조기 착용, 심리 치료를 비롯한 다면적 치료 접근은 DMD 환자의 삶의 질을 비약적으로 향상시켰을 뿐 아니라 10대 중반이었던 기대 수명을 20대 후반까지 연장시켰다.² 하지만 장기간의 스테로이드 치료는 많은 부작용을 동반하는 반면, 보행 기간 연장 효과는 2년 정도에 불과하다.

디스트로핀 변이의 엑손 스킵핑(exon skipping)

다른 유전질환들의 경우와 달리 DMD의 질환 변이 중 80%는 하나 또는 수 개의 엑손 결실 또는 중복에 의한다. 특정 엑손의 결실에 의해 핵산 3개가 아미노산 1개로 번역

Jin-Hong Shin, MD, PhD

Department of Neurology, Pusan National University Yangsan Hospital, Department of Neurology, Pusan National University Yangsan, Hospital, Guemoro, Yangsan, Korea
TEL: +82-55-360-2122 FAX: +82-55-360-2152
E-mail: shinzh@gmail.com

되는 읽기틀(reading frame)이 망가지게 되면 이후 부분의 번역이 모두 영향을 받아 디스트로글리칸과의 결합 부분을 비롯해 핵심 구조가 유실되므로 심한 임상형을 나타내게 된다. 한편 결실된 엑손이 3의 배수 개의 핵산으로 구성되어 읽기틀을 망가트리지 않는다면, 결실된 엑손 부분의 아미노산 서열 정보만 사라질 뿐 대부분의 아미노산 서열은 정상 디스트로핀과 동일한 상태로 보존된다.

결실된 디스트로핀 엑손 부분을 채워 넣는 유전자 조작은 쉽지 않지만, 유전자 이상의 전후에 추가적인 결실을 만들어서 유전자 이상 부분 이후의 아미노산 서열을 회복시키고자 하는 것이 엑손 스킵핑의 원리이다. 다시 말해 DMD의 변이를 가진 유전자로부터 BMD에서 보이는 형태의 디스트로핀 단백을 만들어 내도록 하는 것이다.³

두 회사가 각기 다른 핵산 유사 골격을 가진 역배열 올리고사슬(anti-sense oligo; ASO)을 개발하였는데, 두 회사 모두 디스트로핀 호발 결실 자료에 기초하여 가장 많은 수의 환자(약13%)에 적용할 수 있는 엑손51을 첫 표적으로 하여 임상시험을 시작하였다. 디스트로핀 변이 마우스⁴와 개⁵ 실험에서의 성과가 매우 고무적이었으므로, 엑손 스킵핑의 임상시험은 시작부터 많은 주목을 받았다.

2'-O-methyl phosphorothioate (2MePS) 골격을 사용한 Drisapersen (Prosensa/GSK)은 제2상 임상시험 결과에서 좋은 효과를 보였으나⁶ 정작 186명의 환자가 포함된 대규모 위약 대조 제3상 임상시험에서는 일차지표인 6분 걷기검사(6-minute walk test; 6MWT) 상 통계적으로 의미 있는 치료효과를 증명하지 못하여 충격을 안겨주었다. 실패의 원인 규명을 위해 DMD의 질환 자연 경과를 재조사하고 임상시험 참여자의 아군 분석을 통한 재평가를 진행하고 있다. 한편 DMD 치료제의 임상시험 효과 판정에 있어 6MWT가 과연 최선의 지표인가에 대한 반론도 제기되고 있다.⁷

Eterplirsen (Sarepta)은 phosphorodiamidate morpholino (PMO)를 골격으로 사용하는 ASO 약품으로, 표적 서열은 Drisapersen과 거의 같으나 신독성이 적어 8배 정도의 고농도로 매주 정맥 투여를 통해 제2상 임상시험이 진행되었다. 10명의 피험자가 48주까지 참여하여 위약 후 자연치료군에 비해 치료군이 6MWT에서 67 m를 더 걸어 통계적으로 의미 있는 차이를 보여 주었으며, 근육 생검을 통해 스킵된 디스트로핀의 발현이 확인되었다. 이후 120주까지 계속된 연장 임상시험에서도 6MWT의 차이가 유지되고 있어 매우 희망적인 상태로, 올해 제3상 임상시험이 예정되어 있다.

엑손 스킵핑에 사용되는 각 ASO는 특정 변이에 대해서만

적용할 수 있어, 엑손51 스킵에 적용되지 않는 디스트로핀 변이에 대해서는 별도의 ASO를 개발해야 한다. 엑손44, 엑손45, 엑손53에 대한 엑손 스킵은 각각 6-8% 정도의 환자를 치료할 수 있을 것으로 예상되며, 이에 대한 연구 및 임상시험이 진행 중이다.⁸ 가능한 모든 종류의 엑손 스킵이 개발되더라도 20% 정도의 DMD 환자는 치료 대상이 되지 못한다.

디스트로핀 정지변이의 넘어읽기(read-through)

DMD 증례의 13% 정도는 정지 점변이(nonsense point mutation)에 의해 발생한다. 정지 변이가 있더라도 생리적인 넘어읽기를 통해 정상 발현량의 1% 가량의 단백질이 생산된다. 아미노글리코사이드계 항생제를 사용하면 번역 오류를 유도하여 넘어읽기 현상을 항진시킬 수 있으며, 고용량 겐타마이신을 사용한 임상시험에서 정지변이를 가진 DMD환자의 디스트로핀 발현을 증가시킬 수 있었다. 다만 겐타마이신은 신독성과 이독성이 있어 장기간 사용할 수 없고, 정맥 투여가 필요하다는 단점이 있다.

넘어읽기를 효율적으로 일으키면서도 독성이 없고 경구 투여가 가능한 약물을 찾기 위해, 화합물 라이브러리를 이용한 고효율 탐색이 수행되었고, 최종 선정된 약물 ataluren (Translarna)을 이용하여 전임상 및 임상시험이 수행되었다. 그런데 제2상 임상시험에서 저용량군은 6MWT로 의미 있는 치료 효과를 보인 반면, 오히려 고용량군은 위약군과 차이를 보이지 않았다.⁹ 해석하기 힘든 이 결과를 두고 유럽 약품청은 정지변이 DMD에 대해 조건부 사용 승인하였으나, 미국 식품의약국은 승인을 불허하였다.¹⁰ 이에 220명의 피험자가 포함된 대규모 이중맹검의 제3상 임상시험이 진행 중에 있어 그 결과가 주목된다.¹¹

넘어읽기는 질환 유전자의 종류와 무관하게 정지변이에 대해서는 이론적으로 모두 적용 가능하여, ataluren의 치료 효과가 증명될 경우 많은 질환에서 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 정지변이는 각종 유전질환 변이의 5-70%를 차지하는 것으로 알려져 있으며, 서양인에 빈발하는 섬유성 낭종증 증례의 약10%가 이에 해당한다. 정지변이 섬유성 낭종증에 대한 제3상 시험 결과가 최근 발표되었으나 좋은 결과를 얻지는 못하였다.¹²

바이러스 매개 유전자치료

바이러스를 이용해 결손된 유전자를 직접 세포 내로 전달

하는 방법은 가장 고전적인 형태의 유전자 치료이며, 가장 다양한 질환에 적용 가능한 방법이다. 근육조직과 같이 세포분열이 많지 않은 조직의 유전자 치료 시에는 치료유전자가 유전체에 통합될 필요가 없다. 하지만 체중의 40%에 달하는 근육 전체에 전달될 수 있을 만큼 근육 조직에 높은 친화력을 가져야 하며, 면역 반응을 일으켜 치료유전자가 제거되는 일이 없이 오랫동안 발현이 지속되어야 한다. 또한 감염 후 세포독성을 일으키거나, 증식하여 체내 또는 체외 전염을 일으켜서는 안 된다.

재조합 아데노유반 바이러스(recombinant adeno-associated virus; rAAV)는 위 모든 조건을 충족시켜 근육질환 치료에 이상적인 매개체라고 할 수 있다.¹³ 다만 전달할 수 있는 치료유전자의 크기가 제한되어, 디스트로핀과 같은 거대 유전자를 직접 전달할 수는 없으나, 필수 기능요소만 모아 최소 크기로 만든 마이크로 디스트로핀은 전달 가능하다.¹⁴ 마이크로 디스트로핀을 이용한 rAAV 유전자 치료는 디스트로핀 변이 마우스¹⁵와 개¹⁶ 실험에서 안전성과 기능회전 측면 모두 좋은 성과를 보여주고 있으며, 특히 엑손 스킵핑으로 구현이 어려운 심근의 치료에도 효과적이다.¹⁷

개 모델에서 rAAV 매개 전신 유전자 전달이 성공하면서 전신 유전자 치료의 가능성에 한 발짝 더 다가섰지만,¹⁸ 바이러스를 인체에 전신 투여하여 유전자 이상을 영구적으로 치료한다는 개념은, 투여 후 일정 시간이 지나면 자연 배출되는 여느 약물 치료와는 다른 차원의 안전성이 요구된다. 하지만, 최초의 성공적인 유전자 치료로 꼽히는 Leber congenital amaurosis도 rAAV의 망막하 투여를 이용하였으며,¹⁹ 단일유전자질환에 있어 최초로 임상 사용 승인을 받은 유전자 치료제인 Glybera (alipogene tiparvovec, Unicare)²⁰ 역시 결핍된 lipoprotein lipase 유전자를 rAAV 매개로 근육에 전달한다는 점에서, 근육질환 유전자 치료제로서 rAAV의 임상 진입 가능성은 매우 높다.

유전성 근육질환 치료에 대한 다른 연구들

혈관유래 줄기세포인 mesangioblast의 이식을 통한 DMD 치료가 개 모델에서 좋은 성과를 내었으며,²¹ 현재 제1상 임상 시험을 진행 중이다. 새로운 약물 개발도 꾸준히 이루어지고 있어서 기존의 스테로이드를 개량한 VBP15는 DMD에 대한 스테로이드 치료 효과를 유지하면서도 부작용을 최소화 할 수 있을 것으로 기대된다.²² PDE5A 억제제인 sildenafil (Viagra, Pfizer)은 전혀 다른 목적으로 개발되었지만 NO-cGMP

경로를 활성화하여 DMD에서 근육병리를 호전시키는 것으로 알려졌으며 효능의 평가를 위해 임상시험 중에 있다.²³

근긴장성 근디스트로피(myotonic dystrophy)는 유병률에 있어 DMD에 버금가는 정도로, 성인에서 가장 많은 근육디스트로피이다. DMPK 유전자 3' 비번역 말단 CTG 반복서열이 과다 확장하는 유전변이에 의해 발생하는데, 동물모델에서 이 비정상 mRNA를 파괴하는 ASO를 투여함으로써 치료 효과가 확인된 바 있다.²⁴

Distal myopathy with rimmed vacuole (DMRV)는 20대 전후로 발병하여 유병기간 10년 정도에 보행불가에 이르는 진행성 근육병으로, 한국과 일본을 비롯한 특정 인종 지역에서 빈발한다. GNE 유전자의 과오변이에 의해 근육막 당단백의 씨알산화 저하(hyposialylation)가 원인으로 알려져 있다. 마우스 질환 모델에서 씨알산 또는 전구체인 ManNAc을 과량 경구 투여하여 치료효과를 보이는 것이 알려져, 이에 대한 임상 시험이 진행 중이다.²⁵

Collagen Q (COLQ) 결핍에 의한 선천성 근무력증후군(congenital myasthenic syndrome)은 발생 빈도는 매우 낮으나, rAAV 매개 COLQ 유전자 전달에 의해 해당 질환 동물모델에서 뛰어난 치료효과를 가져온 점, 나아가 acetylcholine esterase-collagen Q 복합체의 근육 주사로도 같은 효과를 재현했다는 점에서 기대를 모으고 있다.²⁶

맺음말

살펴본 바와 같이 유전성 근육병에 대한 많은 치료 연구가 진행되고 있으며, 기술의 발전과 함께 새로운 기술들이 계속 유입되고 있다.²⁷ 차세대 서열분석이 보급되면서 근육질환의 유전자 변이 발견이 가속화 되고, 분자 병리학적 지식이 축적되면서 DMD 이외의 다른 질환에도 치료 연구가 확대될 것으로 기대된다. 과거 어느 때보다 유전성 근육병의 근본적 치료에 접근해 있는 것은 사실이나, 최근 큰 관심을 모았다가 기대에 미치지 못하는 결과를 낸 임상 시험들을 되짚어 보면, 아직도 우리가 미처 예상하지 못했던 장벽이 있지 않나 고민하게 된다. 깊고 꾸준한 연구와 선입견 없는 평가를 통해서만 다음 단계의 치료적 접근을 달성할 수 있을 것이다.

References

1. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of duchenne muscular dystrophy, part 1: Diagnosis,

- and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):77-93.
2. Passamano L, Taglia A, Palladino A, et al. Improvement of survival in duchenne muscular dystrophy: Retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myol.* 2012;31(2):121-125.
3. 신진홍. 유전성 근육질환의 유전자 치료. *대한임상신경생리학 회지.* 2012;14(2):53-58.
4. Alter J, Lou F, Rabinowitz A, et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression body-wide and improves dystrophic pathology. *Nat Med.* 2006;12(2):175-177.
5. Yokota T, Lu QL, Partridge T, et al. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol.* 2009;65(6):667-676.
6. Voit T, Topaloglu H, Straub V, et al. Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): An exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol.* 2014.
7. Lu QL, Cirak S, Partridge T. What can we learn from clinical trials of exon skipping for DMD? *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3:e152.
8. Anthony K, Arechavala-Gomez V, Ricotti V, et al. Biochemical characterization of patients with in-frame or out-of-frame DMD deletions pertinent to exon 44 or 45 skipping. *JAMA Neurol.* 2014;71(1):32-40.
9. Bushby K, Finkel R, Wong B, et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve.* 2014.
10. Hoffman EP, Connor EM. Orphan drug development in muscular dystrophy: Update on two large clinical trials of dystrophin rescue therapies. *Discov Med.* 2013;16(89):233-239.
11. Ryan NJ. Ataluren: First global approval. *Drugs.* 2014.
12. Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, et al. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* 2014;2(7):539-547.
13. Shin JH, Yue Y, Duan D. Recombinant adeno-associated viral vector production and purification. *Methods Mol Biol.* 2012;798:267-284.
14. Lai Y, Thomas GD, Yue Y, et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest.* 2009;119(3):624-635.
15. Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Chamberlain JS. Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic mdx mice. *Mol Ther.* 2008;16(4):657-664.
16. Shin JH, Pan X, Hakim CH, et al. Microdystrophin ameliorates muscular dystrophy in the canine model of duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 2013;21(4):750-757.
17. Wasala NB, Shin JH, Duan D. The evolution of heart gene delivery vectors. *J Gene Med.* 2011;13(10):557-565.
18. Hakim CH, Yue Y, Shin JH, et al. Systemic gene transfer reveals distinctive muscle transduction profile of tyrosine mutant AAV-1, -6, and -9 in neonatal dogs. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2014;1:14002.
19. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 2008;358(21):2231-2239.
20. Ferreira V, Twisk J, Kwikkers K, et al. Immune responses to intramuscular administration of alipogene tiparvec (AAV1-LPL(S447X)) in a phase II clinical trial of lipoprotein lipase deficiency gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2014;25(3):180-188.
21. Sampaioles M, Blot S, D'Antona G, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature.* 2006;444(7119):574-579.
22. Heier CR, Damsker JM, Yu Q, et al. VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO Mol Med.* 2013;5(10):1569-1585.
23. Percival JM, Whitehead NP, Adams ME, Adamo CM, Beavo JA, Froehner SC. Sildenafil reduces respiratory muscle weakness and fibrosis in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *J Pathol.* 2012;228(1):77-87.
24. Wheeler TM, Leger AJ, Pandey SK, et al. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature.* 2012;488(7409):111-115.
25. Nishino I, Carrillo-Carrasco N, Argov Z. GNE myopathy: Current update and future therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014.
26. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci.* 2014;53(3):359-361.
27. Berardi E, Annibali D, Cassano M, Crippa S, Sampaioles M. Molecular and cell-based therapies for muscle degenerations: A road under construction. *Front Physiol.* 2014;5:119.