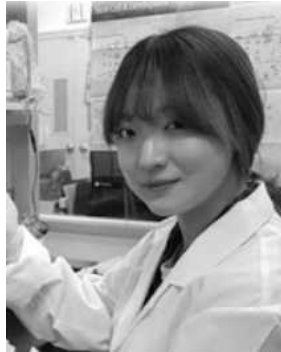


RNAi-based Gene Therapy (하)



이바다 박사과정 연구원
최진우 교수

경희대학교 약학대학

연속되는 2편의 기고문을 통해 RNAi 를 이용한 신약개발의 현황을 알아보고자 합니다. 세포내 전달의 기술적 해결 방안, CRISPR-CAS9 과의 차별성, 앞으로 넘어야할 문제점 등에 대해 다룰 것이며, 이 글은 그 중 두번째 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.

바이러스 기반 RNAi 치료제

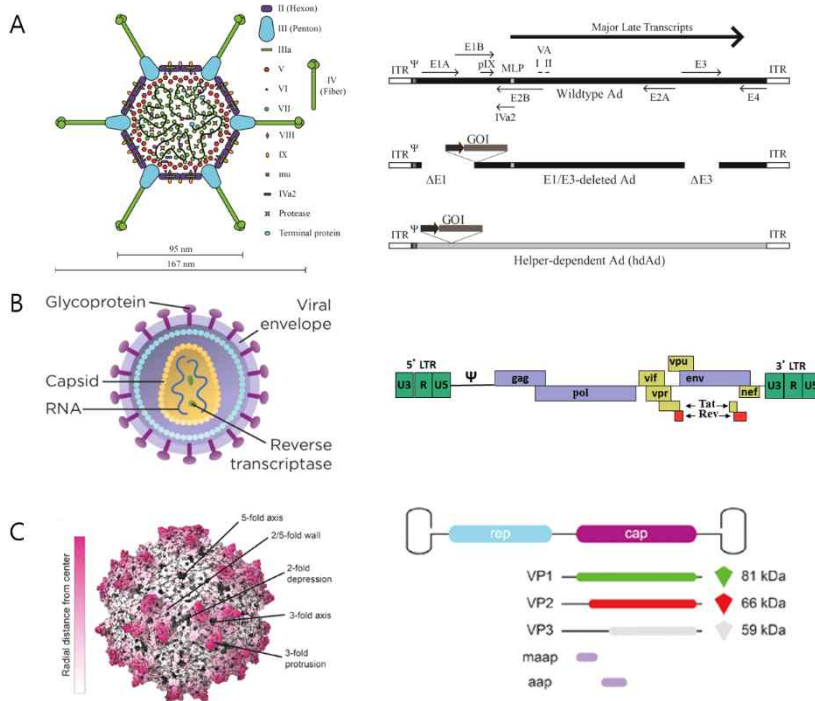
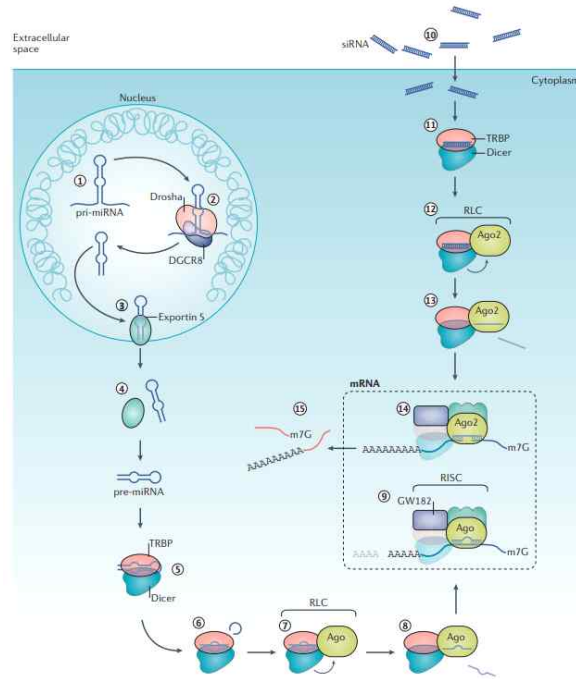


Figure 3 아데노바이러스(A), human immunodeficiency virus type 1(B), adeno-associated virus(C)의 구조 및 유전체 모식도

(출처: (A)Viruses, 2014, Saha, B. et al. (B)Nursing Times, 2020, Wilkins, T., Biomedicines, 2014, Shaw, A. et al. (C)BioRxiv, 2020, Wörmer, P. et al.)

앞서 언급했던 것과 같이 생체 내에서 siRNA를 투여하는 경우 체내 전달 방식이 비효율적이며 반감기가 짧아 지속적인 효과를 기대하기 어려운 등 많은 한계점에 봉착한다. 이를 개선하기 위한 여러 시도들 중 특히 지속적인 효과를 보이는 RNAi 시스템을 개발하는 데 집중한 많은 연구들에서 siRNA가 플라스미드 DNA(plasmid DNA) 시스템을 통해 shRNA를 거쳐 발현될 수 있음이 밝혀졌다^{1,2}. shRNA는 일반적으로 RNA pol III 프로모터(promoter)에 의해 발현되며, 21-25nt 길이의 짧은 말단 루프를 가지는 RNA 서열이다. Pre-miRNA와 유사하게, shRNA는 exportin 5에 의해 핵으로부터 빠져 나가며, 이후 Dicer에 의해 분해되어 siRNA의 구조를 가지게 된다³. shRNA의 메커니즘이 밝혀짐으로써 RNAi 치료제 분야에 바이러스 벡터를 기반으로 한 전달 방법이 새로이 개발될 수 있었다. 바이러스 벡터를 이용하면 기존의 비바이러스적 RNAi 전달 방식에 있어서 주요한 두 가지 단점인 비효율적인 체내 전달과 지속적이지 못한 유전자 침묵 효과를 개선할 수 있었다. RNAi 치료제 연구에서 바이러스 벡터를 이용한 대부분의 생체 내 실험은 주로 아데노바이러스(Ad), adeno-associated virus (AAV) 및 렌티바이러스(LV)의 벡터(vector)를 사용하여 시행되었으며, 주로 암, 심장병, 안구 질환, 신경 퇴행성 질환, 병원성 바이러스 감염 등과 같은 질병에 적용되어 왔다⁴. 이 바이러스 벡터 시스템은 기존까지 이용되었던 바이러스 중 생물체 내에서 매우 안전한 것으로 잘 입증되어 있으며, 바이러스 표면 (렌티바이러스의 경우 외막(envelope) 표면)단백질의 구조와 결합 타겟이 많은 연구를 통해 뚜렷하게 밝혀져 있어 이를 조작함으로써 조직 특이적으로 전달하기 용이하기 때문에 RNAi 치료에 가장 많이 이용되고 있다⁴.

아데노바이러스는 Adenoviridae 과(family)에 속하는 비외막형 바이러스(non-enveloped virus)(Figure 3A)로, 실험적 유전자 치료에 자주 이용된다. 2010년까지만 하더라도 임상 유전자 치료 실험의 25%가 아데노바이러스를 이용한 것이었다⁵. 아데노바이러스는 비교적 큰 크기 (26-45 kb)의 선형 이중가닥 DNA(linear double-stranded DNA)를 유전체로 가지기 때문에 약 8-30kb의 전이유전자(transgene)를 탑재할 수 있다⁶. 또한 아데노바이러스는 분열하는 세포 및 분열하지 않는 세포에도 감염될 수 있고, 높은 수준으로 전이유전자를 발현하며, 생체 외에서 높은 역가(titer)로 증식하는 특성을 가져 바이러스 벡터로 사용하기에 적합하다⁶. 아데노바이러스는 매우 다양한 혈청형(serotype)을 가지나 인간에서는 53종의 혈청형이 발견되었고, 일반적으로 전체 인구 중 80%가 최소 한 번 이상 아데노바이러스에 감염되며 혈청형 특이적 면역 반응을 보인다⁷⁻⁹. 아데노바이러스가 숙주 세포 내로 들어가기 위해서는 먼저 바이러스 표면의 바이러스 섬유 단백질(viral fiber protein)이 세포 표면의 수용체와 결합해야 하는데, 아데노바이러스의 혈청형 별로 결합할 수 있는 수용체에 약간의 차이가 있으나 혈청형 별로 감염되는 조직이 뚜렷하게 구분되어 있지는 않다⁶(예: group B

human 아데노바이러스 혈청형과 CD46, 다른 아데노바이러스 혈청형과 coxsackievirus adenovirus receptor (CAR)). 이 초기 결합 이후 아데노바이러스 표면의 penton base protein이 숙주 세포 표면의 integrin과 추가로 결합하면서 바이러스가 세포 내로 들어가게 된다¹⁰.

지금까지 아데노바이러스 벡터에 shRNA를 탑재하여 타겟 세포에 전달하는 방법은 생체 외에서 흔하게 사용되어 왔다. 여러 연구들을 통해 생체 내에서 또한 아데노바이러스를 RNAi 치료에 효과적으로 적용할 수 있다고 보고하고 있다⁶. 이와 관련된 생체 내 연구는 2002년에 처음 입증되었는데¹¹, 마우스 특이적 β -glucuronidase를 타겟으로 하는 shRNA를 탑재한 아데노바이러스를 정맥투여(IV injection)했을 때 간 조직에서 해당 단백질의 발현이 줄어든 것을 확인함으로써 아데노바이러스를 이용한 RNAi 치료의 가능성을 확인하였다. 또한 2007년 VEGF 특이적 shRNA를 탑재한 아데노바이러스를 생체내 마우스 모델에 적용한 결과 암세포의 혈관신생 및 증식을 억제할 수 있음을 보여주었다¹².

하지만 RNAi 치료에서 아데노바이러스를 이용할 때 가장 큰 문제점 중 하나는 반복 투여 시 숙주에게 강한 면역반응이 유도될 수 있다는 것이다⁶. 아데노바이러스 벡터는 보체 경로(complement pathways)의 매개체(mediator), 혈액 응고 인자, toll-like receptors (TLRs) 등과의 상호작용을 통해 숙주의 선천성 면역 체계(innate immune system)를 활성화시킨다¹³. 고용량의 아데노바이러스 벡터에 노출될 경우 숙주 체내의 아데노바이러스 항체(antibody)의 존재 유무와 상관없이 보체 경로가 강력하게 활성화되어 생명까지 위협할 수 있다¹⁴. 또한 TLR2 및 TLR9은 아데노바이러스와 연관된 인자들을 인식하여 MAPK 및 NF- κ B 경로를 활성화시키고, 그 결과 염증유발 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)과 케모카인 반응(chemokine response)이 유도된다^{15,16}.

렌티바이러스는 Retroviridae 과(family)에 속하는 외막형 바이러스(enveloped virus)(Figure 3B)로, 양성-극성단일가닥 RNA(positive-sense single-stranded RNA)를 유전체로 가진다¹⁷. 렌티바이러스의 일종으로 잘 알려진 HIV-1의 유전체에는 최소 15개의 고유 단백질을 코딩하는 9개의 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)과 바이러스의 생활 주기(life cycle) 유지에 필요한 여러 cis-acting element(long terminal repeats (LTRs), TAT activation region (TAR), primer binding site (PBS), splice donor 및 acceptor sites, packaging 및 dimerization signal, Rev-responsive element (RRE), central 및 terminal polypurine tracts (PPT) 등)가 포함되어 있다¹⁷. 렌티바이러스는 숙주 세포 내에 감염된 후 RNA 유전체를 이중가닥 형태의 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)로 복제하여 이를 숙주 세포의 유전체 내에 통합(integration)시키는 특성

을 가지고 있다¹⁷. 이러한 독특한 메커니즘 덕분에, 렌티바이러스에 RNAi를 탑재할 경우 숙주 세포의 유전체와 함께 복제되면서 지속적인 유전자 침묵 효과가 유지될 수 있다¹⁸. 또한 렌티바이러스는 분열하지 않는 세포 뿐만 아니라 분열하고 있는 세포에도 효과적으로 감염되며¹⁸, *in vivo* 연구에서 뇌, 눈, 간, 조혈 세포 등 다양한 조직에 존재하는 비분열 세포에 활발히 감염될 수 있음이 확인되었다¹⁹. 특히 렌티바이러스가 비분열 세포 중 하나인 신경세포(neuron)에 잘 감염될 수 있다는 특성을 이용하면 정위주사(stereotactic injection)과 같은 뇌 국소적 투여 방법과 함께 응용하여 뇌 특정 질환에 대한 효과적인 치료제로 사용할 수 있다²⁰. 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)와 같은 신경퇴행성질환의 경우 amyloid- β 펩타이드를 형성시키는 β -secretase (BACE1)를 타겟으로 하는 연구가 가장 많이 진행되었다. 실제로 AD 마우스 모델에서 BACE1를 타겟으로 하는 shRNA를 탑재한 렌티바이러스를 투여한 결과, 다른 부작용 없이 BACE1의 발현을 성공적으로 낮추어 AD의 치료 가능성을 제시하였다²¹.

그러나 네이티브(native) 렌티바이러스의 경우 숙주에서 심각한 질병을 유발할 수 있기 때문에 현재 유전자 치료에는 불필요한 유전자를 모두 제거하고 바이러스 입자 생성 및 감염, 유전체 통합에 필수적인 trans-acting element와 cis-acting element를 각각 다른 벡터로 분리한 비복제성(non-replicating) 렌티바이러스 벡터를 사용한다¹⁷. 3세대 렌티바이러스의 경우 독립적인 4개의 플라스미드가 혼합된 형태로, 유전체 통합 및 전이유전자를 탑재할 수 있는 1개의 벡터와 바이러스의 패키징(packaging)에 관련된 인자들이 코딩된 3개의 플라스미드로 구성되어 있다. 이 4개의 플라스미드를 HEK293T cell에 형질주입(transfection)한 결과, 바이러스 입자가 높은 역가(일반적으로 $10^8 \sim 10^{10}$ infectious unit/ml)로 배양액에 축적되었음을 확인했다¹⁷.

AAV는 parvovirus 과(family)에 속하며 약 4.8 킬로베이스(kilobase, kb) 크기의 비외막형, 단일가닥 DNA 바이러스이다(Figure 3C)²². AAV는 영장류에 자연적으로 감염되고 그 자체로는 병원성을 띠지 않으며, 아데노바이러스와 함께 감염되었을 시에만 증식이 가능하다²². AAV의 유전체에는 Rep(replication), Cap(capsid), aap(assembly)의 3가지 유전자가 코딩되어 있는데, 이 유전자들은 각각 3종류의 프로모터, alternative translation start site, splicing에 의해 최소 9가지의 유전자 산물이 만들어질 수 있다²². 이 서열들은 유전체 복제 및 패키징에 필요한 헤어핀 구조의 inverted terminal repeats (ITRs) 서열 사이에 끼어 들어가 있다²². Rep 유전자는 유전체 복제 및 패키징에 관여하는 4종류의 단백질(Rep78, Rep68, Rep52, and Rep40)을 코딩하고 있다²³. Cap 유전자의 경우 3종류의 바이러스 캡시드 단백질(viral capsid protein)(VP1, 2, 3)이 만들어질 수 있으며, 총 60개의 VP 단백질이 일정 비율 (VP1:VP2:VP3=1:1:10)로 결합하여 이십면체(icosahedral) 구조를 이루면서 캡시드를 형성한다²³. aap 유전자는 assembly-activating

protein (AAP)를 코딩하고 있으며, 이 핵단백질은 캡시드 조립 시에 스캐폴드(scaffold) 기능을 하는 것으로 생각된다²³. AAV는 크게 11종의 혈청형(AAV1-11)으로 분류되며, 각 혈청형마다 종 및 조직에 대한 감염 특이성이 다르기 때문에 치료제 개발 시 타겟 조직에 특이적인 AAV를 선택할 수 있다²². 치료제로 사용되는 AAV 벡터의 경우 바이러스성 유전자가 빠진 재조합형 AAV (recombinant AAV, rAAV)를 뼈대로 사용하며, 이는 본질적으로 세포막을 쉽게 통과하도록 설계되었다. Rep 단백질이 없는 rAAV 벡터의 경우 유전체의 ITR 사이에 타겟 서열이 끼어 들어가 있는 닫힌 원형(closed-circular) 벡터의 형태로 만들 수 있다²⁴. 또한 AAV는 기본적으로 숙주세포의 유전체에 끼어 들어가는 확률이 아주 낮은 특성을 가지고 있다(신생아 마우스의 경우 0.05%, 인간을 포함한 영장류의 경우 0.01% 이하)²⁵⁻²⁷. rAAV 벡터의 경우 원형 형태를 가지기 때문에 숙주세포의 유전체에 끼어 들어가는 확률은 더욱 낮아지며, 숙주 세포가 분열할 때마다 희석되어 시간이 지남에 따라 그 효과가 떨어질 수 있다²². 또한 rAAV 벡터는 상대적으로 크기가 작기 때문에 전체 서열을 포함해야 하는 유전자 대체용 벡터 설계 시에는 뼈대로 사용하기 어려울 수 있으나, 일반적으로 5kb 이내의 타겟 서열은 충분히 탑재할 수 있기 때문에 RNAi를 적용하는 데에는 문제가 없다²⁸.

AAV2는 11종의 혈청형 중 서열 및 특성이 가장 처음 밝혀진 혈청형이며, 가장 오래 연구되어왔기 때문에 현재까지 대부분의 rAAV의 설계에 AAV2의 ITR이 이용되고 있다²². ITR 사이에 배치되는 타겟 서열은 일반적으로 포유류 동물 유래 프로모터, RNAi 서열, terminator 서열로 구성되어 있으며, 전신적인 감염을 목적으로 하는 경우 항상 높은 수준으로 일관되게 발현하는 프로모터를 사용하며 그 예로 CMV (cytomegalovirus), EF1a (elongation factor 1a), SV40 (simian virus 40), chicken β -actin, CAG (CMV, chicken β -actin, rabbit β -globin) 등의 프로모터가 있다²⁹. 목적에 따라 특정 조직 또는 특정 질환에서만 발현하는 프로모터를 도입하는 것 또한 가능하다. 예를 들어 골격근에서만 높게 발현하는 muscle creatine kinase와 desmin 프로모터를 도입하면 골격근 특이적 RNAi 효과를 유도할 수 있다²⁹.

AAV는 타겟 세포 표면의 시알산(sialic acid), 갈락토스(galactose), 황산헤파린 (heparin sulfate)과 같은 탄수화물(carbohydrate)과 일차적으로 상호작용하여 세포에 침투하도록 진화했다^{30,31}. 따라서 캡시드 서열의 차이로 인해 결합할 수 있는 탄수화물의 종류가 미묘하게 달라진다³². 예를 들어 AAV9에 포함된 특유의 캡시드 서열은 갈락토스와 일차적 결합을 선호하게 된다³³. 이로 인해 AAV9은 다른 혈청형들과 비교했을 때 혈액뇌장벽(blood-brain barrier, BBB)를 잘 통과하여 일차 신경세포(primary neuron)를 포함한 중추 신경 계통(central nerve system, CNS)에 감염이 더욱 잘 되는 특성을 가지는 것이라 사료된다^{34,35}. 탄수화물과의 일차적 결합 외에 AAV가 세포 및

조직 특이적으로 결합하는 데에 기여하는 이차적 수용체의 존재 또한 연구를 통해 밝혀졌다. AAV2의 경우 fibroblast/hepatocyte growth factor 수용체 및 integrins $\alpha V\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ 등을 이용하며, AAV6의 경우 epidermal growth factor 수용체를, AAV5의 경우 platelet-derived growth factor 수용체를 이용한다²². rAAV 설계 시 AAV 혈청형 별 탄수화물 및 수용체 선호도를 고려하면 RNAi의 타겟 세포 및 조직 특이적 전달 효율을 더욱 높일 수 있다.

이에 그치지 않고 rAAV의 타겟 세포 및 조직 특이성을 향상시키기 위한 연구가 계속 진행되었으며, 인간 및 영장류의 조직에서 새로운 AAV 변형체(variants)를 찾아내려는 노력 끝에 독특한 캡시드 서열이 다수 발견되었다³⁶. 또한 capsid shuffling, direct evolution, random peptide library insertion 등의 재조합 기술을 적용하여 기존에 알려진 AAV 혈청형의 단점을 보완한 다양한 변형체를 만들어내었다³⁷.

최근 들어 레베르 선천성 흑암시(Leber's congenital amaurosis, LCA)³⁸, B형 혈우병(hemophilia B)³⁹, 지질단백 지질분해효소 결핍증(lipoprotein lipase deficiency)⁴⁰ 등의 질환의 임상 시험에서 rAAV를 치료제로 이용하여 좋은 치료적 성과를 보이고 있어 그 안전성과 효능이 더욱 주목받고 있다. 그러나 2006년 shRNA에 의한 간 독성 문제가 대두되었고, AAV8-shRNA를 고용량 투여한 마우스가 사망하는 실험 결과도 보고된 바 있다⁴¹. shRNA의 독성은 장기 또는 생물종에 특정되지 않는다. Elhert 외 연구진들에 의하면 AAV1-shRNA를 사용하였을 때 마우스에서 신경 독성이 관찰되었으며 바이러스 투여 용량을 줄이거나 효율이 낮은 혈청형을 사용하면 신경 독성이 완화됨을 보여주었다⁴². 당시에 AAV가 이러한 독성을 보이는 이유는 세포 내 shRNA의 농도가 과하게 높아짐에 따라 Dicer 및 RISC를 통한 처리(processing)과정이 shRNA의 처리에 포화되게 되고, 같은 경로로 처리되는 내인성(endogenous) miRNA는 상대적으로 적게 처리되어 세포 독성이 발생하는 것으로 여겨졌다(Figure 1)⁴³. 실제로 하위 인자인 Ago 2 또한 RNAi 경로에서 포화된다는 사실이 밝혀짐에 따라 AAV로 인해 나타나는 세포 독성의 메커니즘이 입증되었다⁴⁴.

비바이러스적 전달 방식에서 언급했던 내용과 유사하게, AAV를 이용한 RNAi 치료에서도 부정확한 영향(off-target effect)으로 인한 독성이 발생할 수 있다. AAV-shRNA로 인한 부정확한 영향의 원인 중 하나는 Dicer에 의한 비표준적 shRNA 절단(noncanonical shRNA cleavage)으로, 이 경우 5' 와 3' 절단 위치(cleavage site) 및 siRNA 길이가 달라지게 되어 벡터에 탑재한 서열과는 다른 불균질(heterogenous)한 siRNA 풀(pool)이 만들어지게 된다⁴⁵. 하지만 이러한 부산물이 실제로 부정확한 영향을 일으킬 수 있는지에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. 그럼에도 불구하고 이를 방지하

기 위해 shRNA의 절단 위치의 서열을 변형하거나 Dicer를 우회하는 등의 다양한 연구가 시행되었다⁴⁶. 특히 기존의 shRNA보다 짧은 17-19nt 길이의 shRNA (AgoshRNA라 명명됨)는 Dicer를 거치지 않고 바로 RISC에 결합하여 이후 과정이 진행될 수 있다⁴⁷. 위에서 언급한 바와 같이, 충분한 유전자 침묵 효과를 보이는 최소 용량의 AAV를 투여하는 것 또한 부정확한 영향의 범위를 줄이기 위한 방법으로 고려할 수 있다⁴⁸.

RNAi 전달 벡터로 사용할 AAV를 선택할 때에는 타겟 세포 또는 조직의 유형, 전달될 RNAi의 효과와 관련된 안전성, 전달 범위(전신 또는 국소), 도입할 프로모터의 발현 유형(지속적 또는 타겟 특이적) 등의 사항을 고려해야 한다. 비바이러스적 전달 방식과는 다르게 바이러스 벡터를 통한 전달 방식은 RNAi 분자보다는 바이러스의 특성에 크게 의존한다. 아직 바이러스에 의한 독성 문제 및 타겟 특이적 발현에 대한 한계점들이 존재하지만 적용 가능성이 무궁무진한 바이러스 시스템이 미래의 전도유명한 RNAi 치료제로 자리잡을 것이다.

결론

RNAi 메커니즘이 처음 밝혀진 후 약 20여년 간 전 세계의 많은 연구진들은 이를 다양한 질병(특히 완치가 불가능한 난치병)을 치료하기 위한 수단으로 개발하기 위해 많은 노력을 해왔다. RNAi는 약리학 및 독성학적 관점에서 다양한 장점을 가지기 때문에 광범위한 질병에서 치료제로서 선호되어 왔으나 효능 저하, 비특이적 부작용 발생, 독성, 면역반응, 생체 내 안정성 문제 등의 한계점으로 인해 초기에 시행된 대부분의 임상 시험이 성공하지 못했다. 현재 이를 극복하기 위해 투여 방식을 국소적으로 변경하거나 체내 안정성을 높이는 방법을 도입하는 등의 다양한 연구가 진행되고 있다.

Pubmed에 따르면 현재 게재된 10만개 이상의 siRNA와 관련된 논문 중 대다수는 실험실 수준 및 전임상 수준에서의 연구이다. 1998년부터 초기 몇 년 동안은 매우 낮은 수준에서 시작하여 최근 10년동안 임상 연구에 관한 논문의 수가 꾸준히 증가했으나 임상적으로 사용 가능한 RNAi 치료제는 현저히 적은 실정인데, 앞서 언급한 한계점들로 인해 아직까지는 임상으로의 적용에 많은 어려움이 남아있음을 보여준다. 하지만 현재 진행 중인 임상 시험의 수를 고려했을 때 근래에는 더 많은 RNAi 치료제가 승인될 것이라 기대한다. 장기적인 관점에서, RNAi는 약물 개발이 매우 어렵거나 완치가 불가능한 질환에 있어 매우 획기적이고 혁명적인 치료제가 될 수 있다. RNAi가 발견되고 첫 시판 약물(Onpattro®)이 나오기까지 20년이 걸렸지만 다가오는 미래에는 더 많은 RNAi 치료제가 보다 짧은 기간 안에 개발될 수 있을 것이다.

- 1 Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553, doi:10.1126/science.1068999 (2002).
- 2 Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. & Conklin, D. S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948-958, doi:10.1101/gad.981002 (2002).
- 3 Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**, 3011-3016, doi:10.1101/gad.1158803 (2003).
- 4 Couto, L. B. & High, K. A. Viral vector-mediated RNA interference. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 534-542, doi:10.1016/j.coph.2010.06.007 (2010).
- 5 Relph, K. L., Harrington, K. J. & Pandha, H. Adenoviral strategies for the gene therapy of cancer. *Semin Oncol* **32**, 573-582, doi:10.1053/j.seminoncol.2005.09.001 (2005).
- 6 Sliva, K. & Schnierle, B. S. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology* **7**, 248, doi:10.1186/1743-422X-7-248 (2010).
- 7 Harvey, B. G., Worgall, S., Ely, S., Leopold, P. L. & Crystal, R. G. Cellular immune responses of healthy individuals to intradermal administration of an E1-E3- adenovirus gene transfer vector. *Hum Gene Ther* **10**, 2823-2837, doi:10.1089/10430349950016555 (1999).
- 8 Xiang, Z. *et al.* Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. *Emerg Infect Dis* **12**, 1596-1599, doi:10.3201/eid1210.060078 (2006).
- 9 Bangari, D. S. & Mittal, S. K. Porcine adenoviral vectors evade preexisting humoral immunity to adenoviruses and efficiently infect both human and murine cells in culture. *Virus Res* **105**, 127-136, doi:10.1016/j.virusres.2004.05.003 (2004).
- 10 Wu, E. & Nemerow, G. R. Virus yoga: the role of flexibility in virus host cell recognition. *Trends Microbiol* **12**, 162-169, doi:10.1016/j.tim.2004.02.005 (2004).
- 11 Xia, H., Mao, Q., Paulson, H. L. & Davidson, B. L. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* **20**, 1006-1010, doi:10.1038/nbt739 (2002).
- 12 Yoo, J. Y. *et al.* VEGF-specific short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus elicits potent inhibition of angiogenesis and tumor growth. *Mol Ther* **15**, 295-302, doi:10.1038/sj.mt.6300023 (2007).
- 13 Ahi, Y. S., Bangari, D. S. & Mittal, S. K. Adenoviral vector immunity: its implications and circumvention strategies. *Curr Gene Ther* **11**, 307-320, doi:10.2174/156652311796150372 (2011).
- 14 Cichon, G. *et al.* Complement activation by recombinant adenoviruses. *Gene Ther* **8**, 1794-1800, doi:10.1038/sj.gt.3301611 (2001).
- 15 Appledorn, D. M. *et al.* Complex interactions with several arms of the complement system dictate innate and humoral immunity to adenoviral vectors. *Gene Ther* **15**, 1606-1617, doi:10.1038/gt.2008.114 (2008).
- 16 Cerullo, V. *et al.* Toll-like receptor 9 triggers an innate immune response to helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* **15**, 378-385, doi:10.1038/sj.mt.6300031 (2007).
- 17 Singer, O. & Verma, I. M. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr Gene Ther* **8**, 483-488, doi:10.2174/156652308786848067 (2008).
- 18 Manjunath, N., Wu, H., Subramanya, S. & Shankar, P. Lentiviral delivery of short hairpin

RNAs. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 732-745, doi:10.1016/j.addr.2009.03.004 (2009).

- 19 Wiznerowicz, M. & Trono, D. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends Biotechnol* **23**, 42-47, doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.001 (2005).
- 20 Naldini, L. *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-267, doi:10.1126/science.272.5259.263 (1996).
- 21 Singer, O. *et al.* Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* **8**, 1343-1349, doi:10.1038/nn1531 (2005).
- 22 Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., 3rd & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**, 317-334, doi:10.1007/s40259-017-0234-5 (2017).
- 23 Samulski, R. J. & Muzyczka, N. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu Rev Virol* **1**, 427-451, doi:10.1146/annurev-virology-031413-085355 (2014).
- 24 Choi, V. W., McCarty, D. M. & Samulski, R. J. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing. *J Virol* **80**, 10346-10356, doi:10.1128/JVI.00841-06 (2006).
- 25 Inagaki, K., Piao, C., Kotchey, N. M., Wu, X. & Nakai, H. Frequency and spectrum of genomic integration of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vector in neonatal mouse liver. *J Virol* **82**, 9513-9524, doi:10.1128/JVI.01001-08 (2008).
- 26 Nowrouzi, A. *et al.* Integration frequency and intermolecular recombination of rAAV vectors in non-human primate skeletal muscle and liver. *Mol Ther* **20**, 1177-1186, doi:10.1038/mt.2012.47 (2012).
- 27 Kaepfel, C. *et al.* A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med* **19**, 889-891, doi:10.1038/nm.3230 (2013).
- 28 Dong, B., Nakai, H. & Xiao, W. Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Mol Ther* **18**, 87-92, doi:10.1038/mt.2009.258 (2010).
- 29 Powell, S. K., Rivera-Soto, R. & Gray, S. J. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med* **19**, 49-57 (2015).
- 30 Asokan, A., Schaffer, D. V. & Samulski, R. J. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol Ther* **20**, 699-708, doi:10.1038/mt.2011.287 (2012).
- 31 Wu, Z., Asokan, A. & Samulski, R. J. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* **14**, 316-327, doi:10.1016/j.ymthe.2006.05.009 (2006).
- 32 Agbandje-McKenna, M. & Kleinschmidt, J. AAV capsid structure and cell interactions. *Methods Mol Biol* **807**, 47-92, doi:10.1007/978-1-61779-370-7_3 (2011).
- 33 Bell, C. L., Gurda, B. L., Van Vliet, K., Agbandje-McKenna, M. & Wilson, J. M. Identification of the galactose binding domain of the adeno-associated virus serotype 9 capsid. *J Virol* **86**, 7326-7333, doi:10.1128/JVI.00448-12 (2012).
- 34 Merkel, S. F. *et al.* Trafficking of adeno-associated virus vectors across a model of the blood-brain barrier; a comparative study of transcytosis and transduction using primary human brain endothelial cells. *J Neurochem* **140**, 216-230, doi:10.1111/jnc.13861 (2017).
- 35 Zhang, H. *et al.* Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. *Mol Ther* **19**, 1440-1448, doi:10.1038/mt.2011.98 (2011).

- 36 Limberis, M. P., Vandenberghe, L. H., Zhang, L., Pickles, R. J. & Wilson, J. M. Transduction efficiencies of novel AAV vectors in mouse airway epithelium in vivo and human ciliated airway epithelium in vitro. *Mol Ther* **17**, 294-301, doi:10.1038/mt.2008.261 (2009).
- 37 Buning, H., Huber, A., Zhang, L., Meumann, N. & Hacker, U. Engineering the AAV capsid to optimize vector-host-interactions. *Curr Opin Pharmacol* **24**, 94-104, doi:10.1016/j.coph.2015.08.002 (2015).
- 38 Cideciyan, A. V. *et al.* Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **361**, 725-727, doi:10.1056/NEJMc0903652 (2009).
- 39 Nathwani, A. C. *et al.* Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood* **100**, 1662-1669, doi:10.1182/blood-2002-02-0589 (2002).
- 40 Gaudet, D. *et al.* Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther* **20**, 361-369, doi:10.1038/gt.2012.43 (2013).
- 41 Grimm, D. *et al.* Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**, 537-541, doi:10.1038/nature04791 (2006).
- 42 Ehlert, E. M., Eggers, R., Niclou, S. P. & Verhaagen, J. Cellular toxicity following application of adeno-associated viral vector-mediated RNA interference in the nervous system. *BMC Neurosci* **11**, 20, doi:10.1186/1471-2202-11-20 (2010).
- 43 Grimm, D. *et al.* Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *J Clin Invest* **120**, 3106-3119, doi:10.1172/JCI43565 (2010).
- 44 Grimm, D. The dose can make the poison: lessons learned from adverse in vivo toxicities caused by RNAi overexpression. *Silence* **2**, 8, doi:10.1186/1758-907X-2-8 (2011).
- 45 Borel, F., Kay, M. A. & Mueller, C. Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference. *Mol Ther* **22**, 692-701, doi:10.1038/mt.2013.285 (2014).
- 46 Gu, S. *et al.* The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell* **151**, 900-911, doi:10.1016/j.cell.2012.09.042 (2012).
- 47 Liu, Y. P., Schopman, N. C. & Berkhout, B. Dicer-independent processing of short hairpin RNAs. *Nucleic Acids Res* **41**, 3723-3733, doi:10.1093/nar/gkt036 (2013).
- 48 Jackson, A. L. *et al.* Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* **12**, 1179-1187, doi:10.1261/rna.25706 (2006).