

Γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία για τη β-Μεσογειακή Αναιμία και τη Δρεπανοκυτταρική Νόσο με επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs): Οι νέοι ορίζοντες

Ειρήνη Παπαπέτρου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Τα τελευταία χρόνια, καινοτομίες στην έρευνα των ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (human pluripotent stem cells, hPSCs), ήτοι ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός και η ανάπτυξη προηγμένων τεχνολογιών γενετικής μηχανικής, άνοιξαν νέους ορίζοντες για την κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία. Η προοπτική χρήσης των hPSCs, είτε αυτόλογων είτε ιστοσυμβατών, ως κυττάρων-στόχων για γενετική τροποποίηση και παράλληλα η χρήση των διαφοροποιημένων απογόνων τους σαν κυτταρικά προϊόντα για μεταμόσχευση, αποτελεί μία νέα προσέγγιση στην αναγεννητική ιατρική, με τεράστιες δυνατότητες για τη θεραπεία διαταραχών του αίματος όπως της β-Μεσογειακής Αναιμίας (β-MA) και της Δρεπανοκυτταρικής νόσου (ΔΝ). Παρ' όλη την ταχεία πρόοδο και τα αισιόδοξα μηνύματα του πεδίου, πολλά εμπόδια παραμένουν προτού η κλινική εφαρμογή αποτελέσει υλοποιήσιμο στόχο. Στην παρούσα ανασκόπηση, αναλύουμε τα θεωρητικά πλεονεκτήματα των κυτταρικών θεραπειών που χρησιμοποιούν παράγωγα των hPSC, τις πρόσφατες μελέτες που τεκμηριώνουν τις βασικές αρχές της τεχνολογίας και τις κύριες προκλήσεις που αντιμετωπίζουμε για την εφαρμογή της τεχνολογίας σε κλινικό επίπεδο.

Haema 2016; 7(1): 100-110 Copyright EAE

I. Γιατί επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC);

Η γονιδιακή θεραπεία για τη β-MA χρησιμοποιώντας Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα (AAK) εφαρμόζεται ήδη σε κλινικό επίπεδο^{1,2}, και παρόλο που η απόδοση και η ασφάλειά της είναι ακόμα υπό αξιολόγηση, έχει επιδείξει ευοίωνα αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένου κλινικού οφέλους σε ένα ασθενή¹. Μπορούμε λοιπόν να αναρωτηθούμε: Γιατί να εξετάσουμε εναλλακτικές στρατηγικές; Θα αναλύσουμε πρώτα τις προκλήσεις και τους περιορισμούς των σύγχρονων γονιδιακών θεραπειών που βασίζονται στα AAK για τη θεραπεία της β-Μεσογειακής Αναιμίας (β-MA) και της Δρεπανοκυτταρικής Νόσου (ΔΝ) και τα δυνητικά οφέλη που προσφέρουν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSC) έναντι εκείνων των AAK.

Περιορισμοί των γονιδιακών θεραπειών που βασίζονται στα AAK

Οι σύγχρονες προσεγγίσεις της κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας για τη β-MA και την ΔΝ, όπως και όλες οι σχετικές προσεγγίσεις για γενετικές διαταραχές του αιμοποιητικού συστήματος, χρησιμοποιούν τα AAK ως στόχο για απομόνωση, γονιδιακή τροποποίηση και μεταμόσχευση στον εκάστοτε ασθενή (Εικόνα 1). Το μείζον πλεονέκτημα αυτής της στρατηγικής είναι ότι εκμεταλλεύεται την αξιοσημείωτη ικανότητα των AAK να ανασυστήσουν το αιμοποιητικό σύστημα στο σύνολό του ενώ επωφελείται από την εκτενή τεχνολογία που προέρχεται από το πεδίο της μεταμόσχευσης των AAK. Η συγκεκριμένη εμπειρία του πεδίου έδωσε βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα και τυποποιημένες τεχνικές για την κινητοποίηση, την απομόνωση, τον *ex vivo* χειρισμό, την κρυοσυντήρηση και την χορήγηση των AAK στον ασθενή. Υιοθετώντας αυτές τις τεχνικές, οι ειδικοί στη γονιδιακή θεραπεία, μπορούν να απομονώσουν αιμοποιητικά κύτταρα, να εμπλουτίσουν τον πληθυσμό των AAK σε αυτά, να μεταφέρουν το θεραπευτικό γονίδιο (στα περισσότερα

Departments of Oncological Sciences, Hematology and Medical Oncology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA

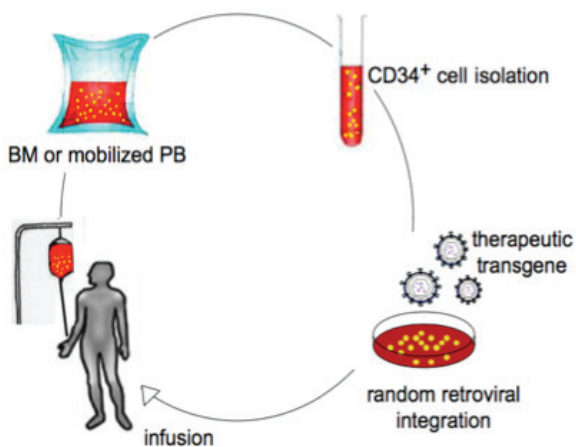
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Ειρήνη Παπαπέτρου, M.D., Ph.D., e-mail: eirini.papapetrou@mssm.edu

από αυτά) μετά από ένα σύντομο διάστημα καλλιέργειας, και να επιστρέψουν τα κύτταρα στον ασθενή (Εικόνα 1).

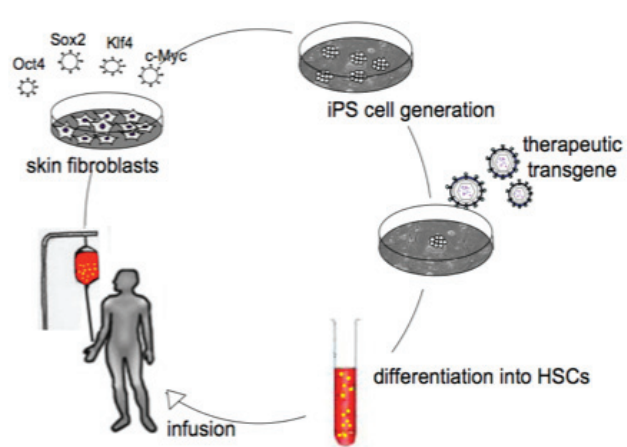
Παρ' όλη την αξιοσημείωτη πρόοδο, τη μερική επιτυχία και το μελλοντικό της δυναμικό, αυτή η εφαρμογή υπόκειται σε έναν σημαντικό περιορισμό, εγγενή στη χρήση των AAK ως στόχων. Ο περιορισμός συνίσταται στην αδυναμία να διατηρηθούν τα AAK *ex vivo* παρά μόνο για μια σύντομη περίοδο (τυπικά έως 72 ώρες). Παρά τις κοπιώδεις προσπάθειες, δεν έχουν ακόμα τυποποιηθεί οι συνθήκες καλλιέργειας που επιτρέπουν τον εμπλουτισμό ή τη διατήρηση των AAK *ex vivo* σε κατάσταση πλειοδυναμίας χωρίς απώλεια της ικανότητας για μεταμόσχευση. Η ανάγκη για βραχείς *ex vivo* χειρισμούς των AAK, επιβάλλει σημαντικούς περιορισμούς στις στρατηγικές γενετικής τροποποίησης: περιορίζει την επιλογή μεθόδων μεταγωγής, την δυνατότητα ποιοτικού ελέγχου των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων και αποκλείει τη δυνατότητα εφαρμογής σταδίων επιλογής ή απόρριψης. Είναι εύλογο λοιπόν, ότι τεχνολογίες που επιτρέπουν αρκετά υψηλό ποσοστό γενετικά τροποποιημένων AAK επί του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού, είναι η μόνη ρεαλιστική επιλογή για μια αγωγή γονιδιακής θεραπείας με θεραπευτικό δυναμικό. Ιικοί φορείς προερχόμενοι αρχικά από την οικογένεια των γάμα ρετροϊών (κυρίως από τον ιό της λευχαιμίας των επίμων, MLV) και στη συνέχεια από την οικογένεια των λεντιϊών (κυρίως από

τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, HIV-1), έχουν προς το παρόν αποτελέσει τις μοναδικές τεχνολογίες μεταφοράς γονιδίων, που είναι αρκετά αποδοτικές, ώστε να επιτρέπουν την έκφραση του διαγονιδίου στο αιμοποιητικό σύστημα σε επίπεδα που έχουν θεραπευτική δράση. Η αποδοτική μεταφορά γονιδίων μέσω ρετροϊκών και λεντικών φορέων βασίζεται στην τυχαία (ή περίπου τυχαία) ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γονιδίωμα, η οποία είναι εκτενώς καταγεγραμμένο ότι προκαλεί διεισδυτική μεταλλαξιγένεση (insertional mutagenesis). Η τελευταία αποτελεί σοβαρό κίνδυνο καρκινικής εξαλλαγής, συνήθως λόγω ενεργοποίησης της έκφρασης ενός ογκογονιδίου από τον υποκινητή ή ενισχυτή του φορέα ή σπανιότερα λόγω αλλοίωσης (που οδηγεί σε σύντηξη ή σε ανώμαλα ματισμένα γονιδιακά προϊόντα) ογκογονιδίων που εδράζονται στο σημείο ενσωμάτωσης του φορέα στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου. Η λευχαιμογένεση λόγω διεισδυτικής μεταλλαξιγένεσης συνιστά προς το παρόν, το πιο σοβαρό και ανησυχητικό πρόβλημα της γονιδιακής θεραπείας με στόχο τα AAK. Παρόλο που η επικινδυνότητα της μεθόδου πρόκειται να μειωθεί αισθητά πιθανότατα σε κλινικά ανεκτά επίπεδα χρησιμοποιώντας τους αυτό-αδρανοποιούμενους φορείς (self-inactivating, SIN), ο κίνδυνος της ογκογένεσης θα παραμείνει υπολογίσιμος. Η αποφυγή της τυχαίας ένθεσης του εξωγενούς DNA στα AAK θα μπορούσε ίσως να

Genetic modification of HSCs



Genetic modification of iPSCs



Εικόνα 1. Κυτταρική και Γονιδιακή θεραπεία με τη χρήση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK ή HSC αριστερά) ή επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων (iPSCs δεξιά). Αριστερά: Η σύγχρονη τεχνολογία κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας του αιμοποιητικού συστήματος περιλαμβάνει την απομόνωση AAK από το περιφερικό αίμα ή από το ΜΟ, απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων, διαμόλυνση με το θεραπευτικό φορέα (ρετροϊό ή λεντιϊό) και έγχυση των κυττάρων στον ασθενή. Δεξιά: Η μελλοντική χρήση iPSC αντί HSC θα περιλαμβάνει: α) απομόνωση σωματικών κυττάρων (π.χ. ινοβλάστες δέρματος, κύτταρα του αίματος, λιποκύτταρα και κερατινοκύτταρα), β) επαναπρογραμματισμό και απομόνωση 1-2 iPSC κλώνων, γ) γενετική τροποποίηση για την επιδιόρθωση του προβλήματος (στην εικόνα φαίνεται ένας ρετροϊός αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε άλλη τεχνολογία) και δ) διαφοροποίηση σε AAK και έγχυση στον ασθενή.

γίνει εφικτή μέσω προσεγγίσεων γονιδιακής διόρθωσης, οι οποίες χρησιμοποιούν ενδονουκλεάσες με συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης, όπως οι νουκλεάσες δακτυλίου ψευδαργύρου ZFN. Οι τελευταίες έχει προσφάτως αποδειχτεί ότι μπορούν να είναι δυνητικά αρκετά αποδοτικές, τουλάχιστον σε ορισμένες εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας. Παρόλα αυτά, δεδομένα για τις ZFN σε κλινικό επίπεδο εκκρεμούν. Μείζονος σημασίας εμπόδιο για την εφαρμογή των ZFN, αποτελεί ο κίνδυνος γεγονότων εξαλλαγής των AAK μέσω εκτοπικών θραύσεων της διπλής αλυσίδας του DNA (double strand breaks, DSB) στο γονιδίωμα, ο οποίος προς το παρόν δεν έχει αξιολογηθεί επαρκώς και αποτελεί σημαντικό λόγο ανησυχίας.

Στην επόμενη παράγραφο θα αναλύσουμε το μείζον πλεονέκτημα των iPSCs ως στόχων για συνδυασμένη γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία: η γενετική τροποποίηση εφαρμόζεται σε κύτταρα (iPSC) που μπορούν να διατηρηθούν *ex vivo* και να χαρακτηριστούν εκτενώς για την πιστότητα και την ακρίβεια τις γενετικής διόρθωσης αλλά και να ελεγχθούν για επιπλέον παραμέτρους ασφαλείας, όπως κρίνεται απαραίτητο. Τα κύτταρα που περνούν επιτυχώς τον ποιοτικό έλεγχο αυτό, χαρακτηρίζονται ταυτοχρόνως επαρκή για να επιφέρουν θεραπευτικό αποτέλεσμα αλλά και ασφαλή για να καλλιεργηθούν σε κλινική κλίμακα ώστε ακολούθως να διαφοροποιηθούν στον επιθυμητό κυτταρικό τύπο για μεταμόσχευση.

iPSCs: Χαρακτηριστικά και καταβολές

Σε μια πρωτοποριακή μελέτη που ανακοινώθηκε το 2006, ο Yamanaka στο Πανεπιστήμιο του Κιότο, κατόρθωσε την απευθείας παραγωγή κυττάρων από σωματικά κύτταρα επίμυος με χαρακτηριστικά πλειοδυναμίας, μέσω παροδικής έκφρασης μόνο τεσσάρων γονιδίων: των *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* και *c-Myc*³. Σε λιγότερο από ένα χρόνο αργότερα οι ίδιοι ερευνητές και η ομάδα του Jamie Thomson από το Πανεπιστήμιο του Wisconsin, αναπαρήγαγαν το αποτέλεσμα αυτό σε ανθρώπινα κύτταρα^{4,5}. Αυτή η καταπληκτική ανακάλυψη, η οποία έκανε εφικτή για πρώτη φορά τη δημιουργία αυτόλογων πλειοδυναμών βλαστοκυττάρων (human pluripotent stem cells, hPSCs) από κάθε άνθρωπο, βασίστηκε σε προηγούμενα ευρήματα: στις αρχές του επαναπρογραμματισμού των κυττάρων του Hal Weintraub (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA)⁶, στην επαγωγή πλειοδυναμίας σε σωματικά κύτταρα αμφιβίων (δεκαετία του 1950, John Gurdon, Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης) και προβάτων (Ian Wilmut, δεκαετία του 90, Πανεπιστήμιο του Εδιμβούργου)^{7,8} και στις τεχνικές εξελίξεις στην απομόνωση ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστοκυττάρων (EB) από τον Jamie Thomson, επίσης τη δεκαετία του '90⁹. Δύο μοναδικά χαρακτηριστικά των hPSCs τα καθιστούν εξαιρετικά εργαλεία για έρευνα και θεραπευτική εφαρμογή: α)

η ικανότητα απεριόριστης αυτό-ανανέωσης *in vitro*, η οποία επιτρέπει τη διατήρηση των κυττάρων αυτών σαν κυτταρικές σειρές και β) η (θεωρητική) δυνατότητα για κατευθυνόμενη διαφοροποίηση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του ανθρώπινου σώματος. Πρακτικά, το τελευταίο εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των κατάλληλων μεθόδων διαφοροποίησης *in vitro* για ένα δεδομένο κυτταρικό τύπο. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, τα hPSCs (συμπεριλαμβανομένων των iPSCs) προσφέρουν την δυνατότητα για γενετικό χειρισμό, που κανένας άλλος ανθρώπινος πρωτογενής κυτταρικός τύπος δεν παρουσιάζει. Έτσι, στα κύτταρα αυτά: 1) μπορούν να εφαρμοστούν μη αποδοτικές, αλλά ακριβείς μέθοδοι γενετικής τροποποίησης και 2) γίνεται εφικτή η επιλογή και ο ποιοτικός έλεγχος κυτταρικών κλώνων που είναι φορείς μιας επιθυμητής και καμμίας άλλης γενετικής τροποποίησης.

Στις αρχικές μελέτες παραγωγής iPSCs χρησιμοποιήθηκαν οι μόνιμα εντιθέμενοι στο DNA γάμμα-ρετροϊκοί ή λεντιϊκοί φορείς για να εκφραστούν οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού (τυπικά οι OCT4, SOX2, KLF4 και c-MYC, ή συνδυασμός άλλων παραγόντων). Παρά το γεγονός ότι τα γονίδια που εκφράζουν τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού σταματούν να εκφράζονται όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού, η μόνιμη ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα των iPSC μπορεί να προκαλέσει κάποια προβλήματα: α) ακόμα και χαμηλά επίπεδα υπολειμματικής έκφρασης των παραγόντων μπορεί να τροποποιήσει τα μοριακά και πιθανώς τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών iPSC, β) πιθανή επανενεργοποίηση της έκφρασης των παραγόντων μπορεί να αναστείλει τη διαφοροποίηση ή να προάγει την ογκογονικότητα και γ) είναι γνωστό ότι η τυχαία ενσωμάτωση των ρετροϊκών φορέων προκαλεί μεταλλαξιγένεση λόγω ένθεσης όπως αναφέρθηκε.

Η παρατήρηση ότι η έκφραση των παραγόντων μετά το πέρας του επαναπρογραμματισμού δεν είναι απαραίτητη^{4,10-12} και η ανάγκη να κινηθεί το ερευνητικό πεδίο προς την ανάπτυξη μεθόδων για κλινική εφαρμογή, οδήγησε πολλούς ερευνητές να διερευνήσουν τεχνικές παραγωγής iPSC χωρίς μόνιμη ενσωμάτωση των διαγονιδίων στο DNA του κυττάρου. Η πρώτη γενιά φορέων που παρέκαμπταν την μόνιμη ενσωμάτωση των διαγονιδιακών παραγόντων ήταν εκτεμνόμενοι (excisable). Πρόκειται για φορείς, πλασμιδιακούς ή λεντιικούς^{13,14-18}, οι οποίοι αρχικά εντίθενται στο γονιδίωμα και στη συνέχεια μπορούν να αποκοπούν, μέσω των συστημάτων Cre/loxP ή του piggyBac τρανσποζονίου και τρανσποζάσης^{13,19,20}. Το μείζον πλεονέκτημα των εκτεμνόμενων συστημάτων, ειδικά των λεντιικών, είναι ότι διατηρούν την υψηλή απόδοση επαναπρογραμματισμού των εντιθέμενων φορέων. Ένα μειονέκτημά τους είναι η ανάγκη για ένα επιπλέον στάδιο παροδικής εξωγενούς έκφρασης της ρεκομπινάσης (ή τρανσποζάσης) και επιλογής κλώνων με εξακρι-

βωμένη πλήρη εκτομή του φορέα, γεγονός που παρατείνει τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ακόμα ένα αξιοσημείωτο μειονέκτημα είναι ότι οι εκτεμνόμενοι μέσω Cre φορείς αφήνουν μετά την αποκοπή τους, ένα αποτύπωμα 30 νουκλεοτιδίων (μία αλληλουχία loxP) και θα πρέπει να βεβαιωθούμε ότι αυτό δεν επηρεάζει το γονιδίωμα του κυττάρου κατά κάποιον τρόπο. Έχει προταθεί ότι μια υπολειμματική περιοχή loxP μπορεί να θεωρηθεί «ακίνδυνη» εάν εδρεύει εκτός κωδικοποιουσών αλληλουχιών²¹. Εναλλακτικά, τα συστήματα τρανσποζάσης μπορούν να πραγματοποιήσουν μη υπολειμματική εκτομή, αλλά η πιθανότητα μετάθεσης σε άλλη γονιδιακή αλληλουχία θα πρέπει να αποκλειστεί.

Ακολούθως, αναπτύχθηκαν μέθοδοι άνευ ένθεσης για την παραγωγή iPSC από ανθρώπινα κύτταρα ή κύτταρα επίμυος, ελεύθερα από την παρουσία διαγονιδίων²². Αυτές περιλαμβάνουν: α) μη-εντιθέμενους (επισωματικούς) φορείς DNA και β) μεθόδους ελεύθερες από DNA. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι αδενοϊοί²³, τα συμβατικά πλασμίδια²⁴, τα oriP/EBNA1 επισώματα²⁵ και τα mini-κυκλικά DNA²⁶. Παρόλο που όλες αυτές οι μέθοδοι έχουν τη δυνατότητα παραγωγής γενετικά μη τροποποιημένων iPSC, το κύριο μειονέκτημά τους είναι η γενικά χαμηλή απόδοση επαναπρογραμματισμού, η οποία είναι συχνά τάξεις μεγέθους χαμηλότερη σε σχέση με εκείνη των εντιθέμενων φορέων και για το λόγο αυτό ανεπαρκής για την παραγωγή iPSC από βιοψίες ασθενών. Δευτερευόντως, τα iPSC που προκύπτουν από αυτές τις μεθόδους πρέπει να διερευνηθούν για έλλειψη εξωγενούς DNA και μπορεί να φέρουν τυχαία εντεθειμένα θραύσματα του φορέα, τα οποία να διαφεύγουν της διακριτικής ικανότητας των κλασικών τεχνικών PCR. Οι μέθοδοι χωρίς τη χρήση DNA, βασίζονται στη μεταγωγή μορίων RNA μέσω φορέων του ιού Sendai²⁷ ή μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων διαμόλυνσης (transfection) με τροποποιημένα μόρια mRNA²⁸ ή μέσω της εφαρμογής πρωτεϊνών ή κυτταρικών εκχυλισμάτων^{29,30}. Το μείζον πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η παραγωγή iPSC με πλήρη απουσία ένθεσης εξωγενούς DNA στο γονιδίωμά τους. Όμως, η εξαιρετικά χαμηλή αποδοτικότητα και η ελειμματική επαναληψιμότητα του επαναπρογραμματισμού με τη χρήση πρωτεϊνών, καθιστά τη χρήση τους μη ρεαλιστική επιλογή προς το παρόν. Αντίθετα, η χρήση RNA, προσφέρει επαρκή αποδοτικότητα επαναπρογραμματισμού αλλά απαιτεί επαναλαμβανόμενους κύκλους διαμόλυνσης που είναι αρκετά κοπιώδης και ακατάλληλη για τα αιμοποιητικά κύτταρα. Η εμπορική διαθεσιμότητα ιών Sendai που εκφράζουν τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού του Yamanaka έχουν κάνει την τεχνολογία αυτή ευρέως προσβάσιμη και ολοένα και πιο δημοφιλή. Τέλος, γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης μεθόδων, που δεν απαιτούν κανενός είδους γονιδιακό χειρισμό των κυττάρων, μέσω της χρήσης μικρών μορίων³¹.

II. Πρωτοποριακές μελέτες της χρήσης iPSC για γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία της β-MA και της ΔΝ

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν τις πιο εκτενώς μελετημένες μονογονιδιακές κληρονομικές διαταραχές του ανθρώπινου πληθυσμού και η «διόρθωσή» τους μέσω γονιδιακής θεραπείας έχει εμπνεύσει γενιές ερευνητών για πολλές δεκαετίες. Ήταν εύλογο λοιπόν που η ΔΝ επιλέχθηκε να γίνει η πρώτη μελέτη απόδειξης των αρχών λειτουργίας (proof-of-principle) του συνδυασμού γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας με αυτόλογα iPSC. Ο Jacob Hanna, όντας μεταδιδακτορικός ερευνητής στο εργαστήριο του Rudolph Jaenisch, πραγματοποίησε μια μελέτη «σταθμό» που δημοσιεύτηκε μόλις 16 μήνες αργότερα από την αρχική μελέτη του Yamanaka³². Χρησιμοποιώντας σαν μοντέλο ένα «εξανθρωπισμένο» επίμυ που έπασχε από ΔΝ, οι Hanna et al παρουσίασαν το γενικό σχεδιασμό γονιδιακής θεραπείας βασισμένης στα αυτόλογα iPSC, η οποία περιλαμβάνει: 1) επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων (συγκεκριμένα, ινοβλαστών της ουράς) σε iPSC, 2) γενετική διόρθωση *in situ* μέσω «κλασσικού» ομόλογου ανασυνδυασμού, 3) *in vitro* διαφοροποίηση σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και 4) μεταμόσχευση. Παρόλο που αυτή η μελέτη παρείχε ξεκάθαρη απόδειξη της αρχής λειτουργίας των iPSC, πολλές πλευρές της την καθιστούν κλινικά μη εφαρμόσιμη: χρησιμοποιήθηκαν μόνιμα εντιθέμενοι στο γονιδίωμα ρετροϊκοί φορείς για την έκφραση τριών από τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού, οι κλώνοι iPSC ελέγχθηκαν ελάχιστα μόνο για την παρουσία γενετικών ανωμαλιών, και το σημαντικότερο όλων, δεν αποδείχθηκε η μακρόχρονη ανασύσταση όλου του αιμοποιητικού συστήματος.

Μετά από την πρώτη παραγωγή ανθρώπινων iPSC, μερικές ομάδες ερευνητών παρήγαγαν iPSC από ασθενείς με ΔΝ³³⁻³⁷ και μείζονα β-MA με ποικίλους γονοτύπους β⁰/β⁰ ή β⁰/β⁺^{21,38-41}. Η πρώτη μελέτη γενετικής διόρθωσης iPSC ανθρώπου από τους Papapetrou et al πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του M. Sadelain²¹. Η μελέτη αυτή πρότεινε μια νέα στρατηγική γενετικής διόρθωσης, χρησιμοποιώντας προσθήκη γονιδίου (εν αντιθέσει με την *in situ* γονιδιακή διόρθωση) και επιλογή κλώνων που έχουν διορθωθεί γενετικά και φέρουν μόνο ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο της β-σφαιρίνης που έχει εντεθεί σε θέση του ανθρώπινου γονιδιώματος χαρακτηριζόμενη ως “ασφαλής λιμένας” (safe harbour). Η μέθοδος αυτή αποτελεί δυνητικά μια κλινικά εφαρμόσιμη και καθολική προσέγγιση στην γονιδιακή θεραπεία με αυτόλογα κύτταρα για τη β-MA. Μια εναλλακτική και πιο ακριβής στρατηγική για την γονιδιακή διόρθωση είναι η εκμετάλλευση του ομόλογου ανασυνδυασμού του DNA για να επιδιορθωθεί η μεταλλαγή στον ενδογενή γενετικό τόπο. Αυτή η στρατηγική εκμεταλλεύεται τον ενδογενή μηχανισμό επιδιόρ-

θωσης του DNA, ο οποίος ενεργοποιείται σε θραύση της διπλής αλυσίδας (double strand break, DSB) και χρησιμοποιεί εργαλεία γονιδιακής στόχευσης σύμφωνα με τις αρχές που αναπτύχθηκαν για την δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών τις δύο προηγούμενες δεκαετίες. Αν και απλή σαν σύλληψη, η *in situ* γενετική διόρθωση στα ανθρώπινα κύτταρα έχει αποδειχθεί πιο δύσκολη σε σχέση με εκείνη των βλαστοκυττάρων του ποντικού χωρίς οι λόγοι για το φαινόμενο αυτό να είναι πλήρως κατανοητοί. Πιο πρόσφατες εξελίξεις κατέστησαν τη γονιδιακή στόχευση στα hPSCs εφικτή και σχετικά αποδοτική. Στις εξελίξεις περιλαμβάνονται: α) η βελτίωση στις συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίες επιτρέπουν την επιβίωση κλωνικών hPSCs χωρίς την παρουσία υποστηρικτικού στρώματος κυττάρων όπως με τη χρήση ικρωμάτων και του αναστολέα Rock Y-27632⁴², β) η βελτίωση στις μεθόδους μεταγωγής και γ) η κατασκευή ενδονουκλεασών που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες, οι οποίες αυξάνουν σημαντικά την αποδοτικότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού⁴³. Στην τελευταία περιλαμβάνονται οι νουκλεάσες με δάκτυλο ψευδαργύρου (Zn²⁺)⁴⁴, οι μεγανουκλεάσες⁴⁵, οι νουκλεάσες TALE, και το σύστημα CRISPR-Cas⁹⁴⁷.

Πέντε (5) μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία 3 χρόνια, ανέφεραν στρατηγικές βασισμένες στον ομόλογο ανασυνδυασμό για τη γενετική διόρθωση μεταλλαγών σε iPSC που προέρχονταν από ασθενείς με ΔN^{36,37,48} και β-MA^{39,41}. Παρόλο που η αποκατάσταση της έκφρασης του αλληλομόρφου στόχου σε φυσιολογικά επίπεδα μένει ακόμα να αποδειχθεί και πρέπει να οριστεί ένας βελτιστοποιημένος σχεδιασμός του φορέα στόχευσης, αυτές οι μελέτες αποτελούν απόδειξη της αρχής λειτουργίας ότι ο γενετικός τόπος της β-σφαιρίνης μπορεί να στοχευθεί στα ανθρώπινα iPSC. Τα εμπόδια που παραμένουν για την κλινική εφαρμογή των iPSC θα αναπτυχθούν περαιτέρω.

III. Δυνατότητες και προκλήσεις των iPSC για τη γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία της β-MA και της ΔN

Παρά το δυναμικό των iPSC να προσφέρουν νέες μορφές κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας για τη β-MA και τη ΔN, πολλά εμπόδια για την κλινική εφαρμογή τους παραμένουν και πρέπει να αντιμετωπιστούν.

A. Προβλήματα κοινά σε όλες τις θεραπείες που βασίζονται στα iPSC

A1. Παραγωγή και ποιοτικός έλεγχος των κυτταρικών σειρών iPSC

Αρχικά, οι σειρές iPSC που προορίζονται για κλινική

χρήση θα χρειαστεί να παραχθούν με μεθόδους και διαδικασίες που πληρούν επιστημονικά και νομικά κριτήρια. Τα κύρια ζητήματα που πρέπει να επιλυθούν είναι: 1) ποια είναι η επιθυμητή μέθοδος επαναπρογραμματισμού, 2) ποιος είναι ο καταλληλότερος αρχικός κυτταρικός τύπος και 3) τι είδους ποιοτικός έλεγχος είναι απαραίτητος ώστε μια κυτταρική σειρά iPSC να χαρακτηριστεί κατάλληλη για κλινική χρήση. Όσον αφορά τον επαναπρογραμματισμό, οι μέθοδοι που είναι ελεύθερες από την παρουσία DNA και βασίζονται στο RNA φαίνονται προς το παρόν να κερδίζουν έδαφος, καθώς συνδυάζουν ασφάλεια και σχετική αποδοτικότητα. Καθώς επιπλέον νέες μέθοδοι είναι πιθανόν να εμφανιστούν, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπ' όψιν η επαρκής απόδοση, όχι μόνον από άποψη χρόνου αλλά και κόστους για την παραγωγή επαρκούς αριθμού iPSC για να καλυφθούν όλες οι ανάγκες, συμπεριλαμβανομένης και της παραγωγής από σπάνιους δότες. Ίσως όμως πιο σημαντικό είναι η μέριμνα για την αποφυγή επιλογής σπάνιων κυττάρων με ακραία ικανότητα επαναπρογραμματισμού που είναι παρόντα στον αρχικό κυτταρικό πληθυσμό. Αυτό αναφέρεται γιατί υπάρχουν ενδείξεις ότι η ακραία ικανότητα επαναπρογραμματισμού μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο δυναμικό εξαλλαγής, γεγονός που δημιουργεί ανησυχία ότι τέτοια κύτταρα μπορεί να έχουν αυξημένη πιθανότητα να δημιουργήσουν ένα κακοήγη θυγατρικό κλώνο μετά από την μεταμόσχευση. Πράγματι, εκτιμάται ολόένα και περισσότερο ότι ο βαθμός του γενετικού μωσαϊκισμού στα σωματικά κύτταρα είναι σημαντικός και ότι οι σωματικές μεταλλαγές μπορεί να ασκούν ισχυρή θετική ή αρνητική επιρροή στην ικανότητα επαναπρογραμματισμού του κυττάρου⁴⁹⁻⁵¹.

Ο προβληματισμός αυτός εμπλέκεται και στην επιλογή του καταλληλότερου αρχικού κυτταρικού τύπου. Το ιδανικό σωματικό κύτταρο για την παραγωγή iPSC πρέπει να είναι εύκολα προσβάσιμο (π.χ. δέρμα ή αίμα), να επαναπρογραμματίζεται αποδοτικά και να είναι λιγότερο πιθανόν να φέρει προϋπάρχουσες γενετικές αλλοιώσεις. Έρευνες που συνδυάζουν τον επαναπρογραμματισμό κυττάρων με υψηλής ανάλυσης γονιδιωματική θα χρειαστούν ώστε να προσδιοριστεί ο βαθμός του μωσαϊκισμού στους διάφορους ανθρώπινους ιστούς και να καταγραφούν μεταλλαγές σε γονίδια που έχουν επιπτώσεις στην απόδοση επαναπρογραμματισμού και που μπορεί να προδιαθέτουν σε καρκινογένεση. Λιγότερο ξεκάθαρα είναι τα κριτήρια που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για να χαρακτηριστεί μία σειρά iPSC ως γενετικά φυσιολογική. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι κυτταρικές σειρές iPSC συχνά φέρουν γενετικές αλλοιώσεις, υπό τη μορφή χρωμοσωμικών ανωμαλιών, όπως επίσης τις πιο δυσδιάκριτες αλλαγές αριθμού αντιγράφων (copy number variations, CNV) και υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων (single nucleotide variants, SNV)⁵²⁻⁵⁵, οι περισσότερες από τις οποίες, αν όχι όλες,

προϋπάρχουν στα αρχικά κύτταρα^{56,57}. Συγκεντρώνοντας δεδομένα από μεγάλες μελέτες όπως το «1000 Genomes Project», το «The Cancer Genome Atlas» και άλλες, θα γίνει εφικτή μέσα στα επόμενα χρόνια η καλύτερη ταξινόμηση των μεταλλαγών που προσδίδουν αυξημένη πιθανότητα νοσημάτων. Οι σειρές iPSC που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε κυτταρικές θεραπείες, είναι πιθανόν να πρέπει να εξετάζονται με τεχνικές υψηλής ανάλυσης, όπως η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Επιπλέον, οι κυτταρικές σειρές iPSC που προορίζονται για θεραπευτική χρήση οφείλουν να είναι συμβατές με τα πρότυπα GMP (good manufacturing practice) και κατάλληλες για έγκριση από τον FDA ή άλλο ανάλογο φορέα (για το λόγο αυτό θα πρέπει να συμμορφώνονται με τα πρότυπα του FDA για τη δωρεά ιστών). Τέλος, στις διαδικασίες παραγωγής, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη αυτοματοποιημένων χειρισμών και καλλιεργειών μεγάλης κλίμακας σε βιοαντιδραστήρες.

A2. Αυτόλογα έναντι ιστοσυμβατών iPSC

Η παραγωγή νέων σειρών iPSC είναι χρονοβόρα και κοπιώδης, καθιστώντας την προοπτική της κυτταρικής θεραπείας με αυτόλογα iPSC απαγορευτικά ακριβή και έτσι απίθανο να γίνει ιατρική πρακτική ρουτίνας. Μία εναλλακτική και πιο ρεαλιστική λύση θα ήταν η δημιουργία κυτταρικών τραπεζών με αλλογενείς κυτταρικές σειρές iPSC που θα ήταν συμβατές με την πλειοψηφία του πληθυσμού^{58,59}. Για το σκοπό αυτό, θα απαιτείται τουλάχιστον μερική συμβατότητα ως προς το σύστημα HLA. Η μεταμόσχευση AAK προερχόμενων από iPSCs πιθανώς να χρειάζεται υψηλότερη συμβατότητα HLA από ότι η μεταμόσχευση άλλων ιστών όπως υποδεικνύει η τρέχουσα πρακτική μεταμόσχευσης συμπαγών οργάνων. Μια ρεαλιστική προσέγγιση είναι η παραγωγή iPSC από δωρητές ομόζυγους για κοινούς (συχνούς) HLA απλοτύπους. Εκτιμάται ότι 78% των Βορειο-Ευρωπαίων, 63% των Ασιατών, 52% των Λατίνων και 45% των Αφρικανών θα ήταν συμβατοί με κάποια σειρά, εάν παράγονταν 100 ομόζυγες για το HLA κυτταρικές σειρές από τους πληθυσμούς αυτούς. Μία εναλλακτική λύση είναι η δημιουργία μέσω γενετικής μηχανικής μιας iPSC σειράς με χαρακτηριστικά «παγκόσμιου δότη» για να παραχθούν είτε ομόζυγα για το HLA είτε αρνητικά για τα HLA τάξης I και II αντιγόνα, μέσω π.χ. απομάκρυνσης αμφοτέρων των αλληλομόρφων του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης, απαραίτητης για τα HLA-I⁶⁰.

Όλες αυτές οι διαφορετικές επιλογές θα πρέπει να απαντηθούν μέσω ερευνών που θα αφορούν την αντιγονικότητα των αυτόλογων ή ιστοσυμβατών iPSC και των προϊόντων τους καθώς και της ευπάθειάς τους σε ανοσολογική απόρριψη, προβλήματα που παραμένουν προς

το παρόν μερικώς κατανοητά^{61,62}. Η αντίδραση που επάγεται από την έκφραση νεο-αντιγόνων λόγω της *in vitro* καλλιέργειας, είναι επίσης ένα θέμα που απαιτεί την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης. Γενικά, υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα όπως ο βαθμός ιστοσυμβατότητας που απαιτείται, η βέλτιστη στρατηγική για τη δημιουργία κυτταρικών τραπεζών και η ανάγκη ανοσοκαταστολής μετά τη μεταμόσχευση. Οι τράπεζες κυττάρων αποτελούν μια ελκυστική επιλογή, ειδικά σε περιοχές με εθνική και φυλετική ομοιογένεια (π.χ. στην Ιαπωνία). Μία βιομηχανοποιημένη θεραπεία, συνδυασμένη με κάποιο επίπεδο ανοσοκαταστολής φαίνεται προς το παρόν να είναι το πιθανότερο σενάριο για ευρεία εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής.

A3. Ο σχηματισμός τερατώματος και η ογκογονικότητα

Ένας σημαντικός λόγος ανησυχίας για τη μεταμόσχευση των κυτταρικών προϊόντων που προέρχονται από iPSCs είναι η πιθανότητα ανάπτυξης όγκων^{63,64}. Υπάρχουν τρία σενάρια που αποτελούν κίνδυνο. (i) Υπολειμματικά πολυδύναμα κύτταρα που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη διαφοροποίηση μπορεί να παραμείνουν σε ένα κυτταρικό μόσχευμα και να δημιουργήσουν τερατώματα μετά από μεταμόσχευση. (ii) Μερικώς διαφοροποιημένα αρχέγονα κύτταρα μπορεί να είναι παρόντα στο μόσχευμα και να προκαλέσουν ανώμαλο πολλαπλασιασμό. Ακόμα και αν αυτοί οι όγκοι είναι καλοήθεις, μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα, ειδικά αν εντοπίζονται σε περιοχές του σώματος, όπως το ΚΝΣ ή το μυοκάρδιο. (iii) Πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα μπορεί να υποστούν απο-διαφοροποίηση και εξαλλαγή. Υπάρχουν ορισμένα λιγοστά στοιχεία που υποστηρίζουν ότι τα θυγατρικά κύτταρα των iPSC μπορεί να διαθέτουν αυξημένη ικανότητα εξαλλαγής. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις συγκεντρωμένες γενετικές ανωμαλίες, που τα προδιαθέτουν για καρκινογένεση ή σε ασταθή επιγενετικά σημεία που μπορεί να ενισχύουν την απο-διαφοροποίηση και/ή την εξαλλαγή. Η ογκογονική τάση μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προήλθαν τα iPSC⁶⁵. Παρόλο που είναι αντιληπτό ότι βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα διαφοροποίησης μπορούν να ελαχιστοποιήσουν την πιθανότητα να συμβούν τα δύο πρώτα σενάρια, κάποιες επιπλέον μέθοδοι εκκαθάρισης υπολειμματικών αδιαφοροποίητων κυττάρων⁶⁶ και/ή η θετική επιλογή των διαφοροποιημένων θυγατρικών κυττάρων^{67,68} μπορεί να αποδειχθεί ευεργετική, τουλάχιστον σε ορισμένες εφαρμογές. Επιπλέον, γονιδιακοί διακόπτες ασφαλείας όπως τα γονίδια αυτοκτονίας⁶⁹ μπορεί να εισαχθούν στις κυτταρικές σειρές των iPSCs, για την επιλεκτική τους καταστροφή όταν αυτό απαιτηθεί.

Β. Συχνά προβλήματα των κυτταρικών θεραπειών του αιμοποιητικού που βασίζονται στα iPSCs

B1. Παραγωγή AAK με ικανότητα μεταμόσχευσης

Δύο γενικά συστήματα καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για να επάγουν τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων iPSC σε αιμοποιητικό ιστό: συγκαλλιέργεια επί στρωματικών κυττάρων (συνήθως επί της σειράς OP9), και ο σχηματισμός των λεγόμενων εμβρυοειδών σωματίων. Παρόλο που τα αρχέγονα και τα περισσότερα διαφοροποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν να προκύψουν από τη διαφοροποίηση των hPSCs, αποδοτική παραγωγή AAK (όπως ορίζονται από την ικανότητα μακρόχρονης αιμοποίησης μετά από μεταμόσχευση) δεν έχει καταστεί δυνατή μέχρι σήμερα.

Η αδυναμία της διαφοροποίησης των ανθρώπινων hPSCs (iPSCs και ESC) σε AAK κατάλληλα για μεταμόσχευση αποτελεί ίσως τη μεγαλύτερη τροχοπέδη της εφαρμογής της κυτταρικής θεραπείας για διαταραχές του αίματος⁷⁰. Πράγματι, η παραγωγή AAK από ανθρώπινα hPSCs αποδείχθηκε πολύ δυσκολότερη σε σχέση με το αναμενόμενο και παραμένει σχεδόν αδύνατη παρά τις σημαντικές προσπάθειες που κατέβαλε ένας μεγάλος αριθμός εργαστηρίων. Μελέτες προερχόμενες από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες έδειξαν κατά κανόνα πολύ χαμηλή (λιγότερη από 2%) ή μηδαμινή εγκατάσταση σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (NSG) ενώ περιοριζόταν κυρίως στην παραγωγή κυττάρων της μυελικής σειράς⁷¹⁻⁷⁴. Ενδομηριαία έγχυση και μεταμόσχευση σε νεογνά NSG δεν έφερε κάποια βελτίωση. Παρά το ότι η αποδοτική *in vitro* παραγωγή AAK από ανθρώπινα hPSCs παραμένει ανέφικτη, είναι ξεκάθαρο ότι αυτό αποτελεί τεχνικό εμπόδιο και δεν σημαίνει ότι τα ανθρώπινα PSCs δεν διαθέτουν το εγγενές βιολογικό δυναμικό της παραγωγής AAK^{75,76}. Πολλοί λόγοι μπορεί να ευθύνονται για αυτό. Στα σύγχρονα μοντέλα ξено-μεταμόσχευσης μπορεί να υπάρχουν τεχνικοί λόγοι που εμποδίζουν την μακροχρόνια εγκατάσταση των AAK που προέρχονται από ανθρώπινα PSCs. Επίσης, μπορεί να απουσιάζουν συστατικά του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος, απαραίτητα για τη διαφοροποίηση ή την εγκατάσταση των κυττάρων αυτών. Αιμοποιητικά κύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινα PSCs, κατ' αναλογία και με άλλα κύτταρα που προέρχονται από PSCs, έχουν ένα πιο εμβρυονικό ή αρχέγονο φαινότυπο. AAK προερχόμενα από τον λευκίτιο σάκο στερούνται εγγενώς της ικανότητας εγκατάστασης σε ενήλικους λήπτες και πολλές έρευνες έδειξαν ότι τουλάχιστον ένα ποσοστό των αιμοποιητικών κυττάρων που προέρχονται από καλλιέργειες ανθρώπινων PSCs (συνήθως το πρώιμο κύμα) μοιάζουν με αυτόν τον τύπο αρχέγονων κυττάρων, αν και αυτές έχει αποδειχθεί ότι παράγουν και πλήρως διαφο-

ροποιημένους τύπους αιμοποιητικών κυττάρων. Τέλος, ανεπαρκής γνώση των κατάλληλων συνθηκών καλλιέργειας, περιορίζει την ικανότητά μας να απομονώσουμε, να συντηρήσουμε και να πολλαπλασιάσουμε τον πληθυσμό των AAK, τα οποία μπορούν να εμφανιστούν παροδικά σε αυτές τις καλλιέργειες. Η κατανόηση της οντογένεσης του αιμοποιητικού συστήματος των θηλαστικών από το πεδίο της αναπτυξιακής αιμοποίησης⁷⁷ και η διερεύνηση των συνθηκών καλλιέργειας, των αυξητικών παραγόντων και της διακυτταρικής σηματοδότησης πιθανώς τελικά θα ευδοδώσουν τον επί μακρόν επιδιωκόμενο στόχο της παραγωγής AAK από ανθρώπινα PSCs.

B2. Στρατηγικές γονιδιακής επιδιόρθωσης

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, τα iPSCs επιτρέπουν περισσότερους γενετικούς χειρισμούς σε σχέση με τα AAK. Κυρίως δύο προσεγγίσεις γενετικής επιδιόρθωσης συζητήθηκαν προηγουμένως, οι οποίες περιλαμβάνουν την γονιδιακή προσθήκη σε «ασφαλείς λιμένες» και την γονιδιακή επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Η γονιδιακή προσθήκη σε «ασφαλείς λιμένες» παρέχει ίσως μια καθολική προσέγγιση στην αντιμετώπιση νοσημάτων που προκαλούνται από μειωμένη ή μηδαμινή έκφραση ενός γονιδίου και επιτρέπει την ταυτόχρονη έκφραση υπεράριθμων γονιδίων, όπως τα γονίδια αυτοκτονίας ή γονίδια αντοχής σε φαρμακευτικές ουσίες. Μπορούμε να οραματιστούμε, ένα σχεδόν παρόμοιο με αυτό που προτάθηκε από τους Parapetrou et al, όπου κλώνοι με τυχαίες ενθέσεις αναλύονται προοπτικά ή εναλλακτικά οι ενθέσεις στοχεύουν σε μία εξαρχής επιλεγμένη θέση ασφαλείας (safe harbor). Παρόλο που οι θέσεις ασφαλείας παρέχουν ένα σημείο εκκίνησης, επιπλέον δεδομένα θα χρειαστούν για να καθιερώσουν καθολικές θέσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Η εξελισσόμενη ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος και η καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση των σύγχρονων κριτηρίων, για παράδειγμα με την ενσωμάτωση της γνώσης των αλληλεπιδράσεων της χρωματίνης σε μεγάλες αποστάσεις, των μη-κωδικών RNA και του ρυθμιστικού DNA.

Η επιδιόρθωση του ενδογενούς γονιδίου της β-σφαιρίνης *in situ* είναι επίσης μια επιθυμητή προσέγγιση και πολλές μελέτες δείχνουν ότι είναι εφικτή. Η β-MA προκαλείται από ένα πολύ μεγάλο αριθμό διαφορετικών μεταλλαγών που καλύπτουν όλο το γονίδιο, αλλά το γονίδιο της β-σφαιρίνης περιλαμβάνει μόνο τρία μικρά εξόνια και δύο μικρά ιντρόνια που καλύπτουν περίπου 1.6 kb. Επομένως, είναι δυνατόν να φανταστούμε την ανάπτυξη ενός στοχευμένου φορέα για επιδιόρθωση, κατάλληλου για τις περισσότερες μεταλλαγές, αν και η απόδοσή του θα ποικίλε μεταξύ των ασθενών με διαφορετικούς γονότυπους και με πιθανούς πολυμορφισμούς στις ομόλογες περιοχές. Η γονιδιακή επιδιόρθωση μόνο του ενός αλληλομόρφου

θα ήταν επαρκής για να βελτιώσει το φαινότυπο, αρκεί ο επιδιορθωμένος γονιδιακός τύπος να εκφράζεται στα επίπεδα του φυσιολογικού αλληλόμορφου. Ένας σημαντικός όγκος δουλειάς θα απαιτούνταν, όπου θα εμπλεκόταν η συστηματική σύγκριση διαφορετικών φορέων με ή χωρίς την επαγωγή θραύσης της διπλής αλυσίδας του DNA από ενδονουκλεάσες και διαφορετικές στρατηγικές για την διαμόλυνση του εξωγενούς DNA (donor DNA), όπως επίσης επιπλέον δεδομένα για την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των διάφορων νουκλεασών. Οι ZFN (zinc finger nucleases) προηγούνται των άλλων τεχνολογιών στην κλινική εφαρμογή αλλά η στόχευση βλαστοκυττάρων, αντί διαφοροποιημένων κυττάρων, επιβάλλει αποδείξεις για πολύ μεγαλύτερα περιθώρια ασφαλείας. Παράλληλα, δοκιμασίες για την γενοτοξικότητα που επάγεται από τις ενδονουκλεάσες, κυρίως λόγω έκτοπης κατάτμησης του DNA, θα χρειαστεί να καθιερωθούν και να τυποποιηθούν.

Εφόσον τα iPSCs είναι δυνατόν να κλωνοποιηθούν και να πολλαπλασιαστούν, η παραγωγή ενός μόνον ή λίγων γενετικά επιδιορθωμένων κλώνων με τεκμηριωμένα ασφαλή γενετικό υπόστρωμα επαρκεί για την κλινική εφαρμογή της τεχνολογίας. Ανεξαρτήτως της στρατηγικής γονιδιακής επιδιόρθωσης, είναι σημαντικό να αποφευχθεί η παρατεταμένη καλλιέργεια, καθώς αυτό μπορεί να αυξήσει την συχνότητα απόκτησης γενετικών ανωμαλιών⁷⁸. Παρόλα αυτά ο γενετικός χειρισμός θα επιβάλλει αναπόφευκτα την παρατεταμένη καλλιέργεια των σειρών iPSCs. Έτσι, δοκιμασίες για την επαλήθευση της γονιδιακής ακεραιότητας, όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο εδάφιο, θα είναι απαραίτητες.

Γ. Προβλήματα ειδικά για τις κυτταρικές θεραπείες της β-MA και της ΔN που βασίζονται στα iPSCs. Προϊόντα αίματος προερχόμενα από τα iPSCs

Πολλοί ασθενείς που πάσχουν από β-MA και ΔN θα επωφελούνταν επίσης από την ανάπτυξη προϊόντων αίματος από iPSCs. Αν και αυτή η προσέγγιση δεν θα παρείχε μακροχρόνια θεραπεία, αυτόλογα ή συμβατά ερυθρά θα ήταν πολύτιμα για τους ασθενείς με αλλο-αντισώματα, κάτι που συμβαίνει συχνά λόγω των πολλαπλών μεταγίσεων. Μεταγίσεις με ερυθρά αιμοσφαίρια προερχόμενα από ανθρώπινα PSCs αντιπροσωπεύουν μια από τις πιο θελκτικές βραχυπρόθεσμες στρατηγικές κυτταρικής θεραπείας με παράγωγα PSCs. Παρόλο που τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν εκφράζουν αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA, εκφράζουν έναν αριθμό επιφανειακών αντιγόνων

και έχουν περιγραφεί αντισώματα έναντι όλων (σχεδόν 400 αντιγόνα) τα οποία ανήκουν σε 30 οικογένειες. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολο να φανταστούμε τράπεζες με iPSCs που να είναι συμβατά με όλους τους συνδυασμούς, αλλά μπορούμε να φανταστούμε μία κύρια τράπεζα με μερικές μόνο σειρές οι οποίες θα είναι αρνητικές για τα αντιγόνα Rhesus καθώς και για όσο το δυνατόν περισσότερα ελάσσονα αντιγόνα.

Πολλές μελέτες έχουν επιδείξει την δυνατότητα παραγωγής κυττάρων της ερυθράς σειράς από ανθρώπινα ESCs και iPSCs *in vitro* με διαφορετικά πρωτόκολλα^{21,79-81}. Είναι ξεκάθαρο από τις μελέτες αυτές ότι τα κύτταρα που προκύπτουν εκφράζουν κυρίως την εμβρυική (ε), τη νεογνική (γ) και πρακτικά καθόλου τη β-αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης. Παρόλο που μπορεί στο μέλλον να αναπτυχθούν πρωτόκολλα *in vitro* για να επάγουν και τη β-αλυσίδα, μία ενδιαφέρουσα ιδέα είναι να χρησιμοποιήσουμε αυτήν την αναπτυξιακή τους “αωρότητα” για να πάρουμε φαινοτυπικά επιδιορθωμένα κύτταρα από ασθενείς με β-MA και ΔN χωρίς την ανάγκη γενετικής τροποποίησης μέσω γενετικής μηχανικής. Τέλος, θα απαιτηθούν μελέτες που να αξιολογούν τη λειτουργικότητα και την αντιγονικότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων που παράγονται *in vitro*, όπως επίσης και πρόοδος στην μαζική παραγωγή των κυττάρων⁸². Μια ενδιαφέρουσα προοπτική είναι η παραγωγή από τα iPSCs, προγονικών κυτταρικών σειρών που θα ανήκουν στην ερυθρά σειρά και θα είναι ικανές για τελική διαφοροποίηση. Αυτές θα μπορούν να εκπτυχθούν και να φυλαχθούν σε τράπεζες, αυξάνοντας τους υποψήφιους λήπτες και εξοικονομώντας χρόνο και κόστος⁸³.

Επίλογος

Η τεχνολογία των iPSC βρίσκεται στο επίκεντρο της επιστημονικής κοινότητας και των μέσων ενημέρωσης και είναι πολλά υποσχόμενη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών επιλογών για τη β-MA, τη ΔN και πολλών άλλων κληρονομικών και επίκτητων διαταραχών του αιμοποιητικού ιστού. Κάποιες από τις εφαρμογές της στην αναγεννητική ιατρική, όπως η παραγωγή παραγώγων αίματος, φαίνεται να είναι επικείμενες. Άλλες, όπως η παραγωγή AAK για μεταμόσχευση, φαίνονται πιο απομακρυσμένες στο μέλλον. Καινοτομίες σε πολλά μέτωπα, όπως στην παραγωγή iPSC υψηλής ποιότητας και στην ανάπτυξη καλύτερων πρωτοκόλλων διαφοροποίησης, προτύπων για τη διασφάλιση της ποιότητας, νομικών πλαισίων και οικονομικά αποδοτικών διαδικασιών παραγωγής, θα είναι απαραίτητες για να κινηθούμε από την έρευνα αυτής της συναρπαστικής τεχνολογίας στην κλινική εφαρμογή της.

Gene and cell therapy for beta-thalassemia and sickle cell disease with induced pluripotent stem cells (iPSCs): the next frontier

by Eirini P. Papapetrou

Departments of Oncological Sciences, Hematology and Medical Oncology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA

ABSTRACT: In recent years, breakthroughs in human pluripotent stem cell (hPSC) research, namely cellular reprogramming and the emergence of sophisticated genetic engineering technologies, have opened new frontiers for cell and gene therapy. The prospect of using hPSCs, either autologous or histocompatible, as targets of genetic modification and their differentiated progeny as cell products for transplantation, presents a new paradigm of regenerative medicine of potential tremendous value for the treatment of blood disorders, including SCD and BT. Despite advances at a remarkable pace and great promise, many roadblocks remain before clinical translation can be realistically considered. Here we discuss the theoretical advantages of cell therapies utilizing hPSC derivatives, recent proof-of-principle studies and the main challenges towards realizing the potential of hPSC therapies in the clinic.

Βιβλιογραφία

1. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature*. 2010; 467:318-322.
2. Sadelain M, Riviere I, Wang, X Boulad, F, et al. Strategy for a multicenter phase I clinical trial to evaluate globin gene transfer in beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1202:52-58.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126:663-676.
4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131:861-872.
5. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318:1917-1920.
6. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1987; 51:987-1000.
7. Gurdon JB. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006; 22:1-22.
8. Wilmut I, Schnieke A.E, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385:810-813.
9. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282:1145-1147.
10. Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, et al. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:12759-12764.
11. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007; 448:313-317.
12. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007; 448:318-324.
13. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 2009; 458:771-775.
14. Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, et al. Polycistronic lentiviral vector for «hit and run» reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009; 27:1042-1049.
15. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009; 136:964-977.
16. Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, et al. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells*. 2010; 28:64-74.
17. Somers A, Jean JC, Sommer CA, et al. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*. 2010; 28:1728-1740.
18. Papapetrou EP, Sadelain M. Generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells with an excisable single polycistronic vector. *Nat Protoc*. 2011; 6:1251-1273.
19. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009; 458:766-770.
20. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods*. 2009; 6:363-369.
21. Papapetrou EP, Lee G, Malani N, et al. Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011; 29:73-78.

22. Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet.* 2011; 12:231-242.
23. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science.* 2008; 322:945-949.
24. Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc.* 2010; 5:418-428.
25. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science.* 2009; 324:797-801.
26. Narsinh KH, Jia F, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protocols.* 2011; 6:78-88.
27. Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, et al. Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem.* 2011; 286:4760-4771.
28. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010; 7:618-630.
29. Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009; 4:381-384.
30. Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell.* 2009; 4:472-476.
31. Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science.* 2013; 341:651-654.
32. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSCs generated from autologous skin. *Science.* 2007; 318:1920-1923.
33. Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu, et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells.* 2008; 26:1998-2005.
34. Mali P, Chou BK, Yen J, et al. Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells.* 2010; 28:713-720.
35. Chou BK, Mali P, Huang X, et al. Efficient human iPSC cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res.* 2011; 21:518-529.
36. Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, et al. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells.* 2011; 29:1717-1726.
37. Li M, Suzuki K, Qu J, et al. Efficient correction of hemoglobinopathy-causing mutations by homologous recombination in integration-free patient iPSCs. *Cell Res.* 2011; 21:1740-1744.
38. Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:9826-9830.
39. Wang Y, Zheng CG, Jiang Y, et al. Genetic correction of beta-thalassemia patient-specific iPSCs and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell Res.* 2012; 22:637-648.
40. Fan Y, Luo Y, Chen X, Li Q, Sun X. Generation of human beta-thalassemia induced pluripotent stem cells from amniotic fluid cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *J Reprod Dev.* 2012; 58:404-409.
41. Ma N, Liao B, Zhang H, et al. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free beta-thalassemia induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem.* 2013; 288:34671-34679.
42. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007; 25:681-686.
43. Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.* 1996; 12:224-228.
44. Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 2005; 23:967-973.
45. Paques F, Duchateau P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2007; 7:49-66.
46. Boch J. TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol.* 2011; 29:135-136.
47. Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013; 339:823-826.
48. Zou J, Mali P, Huang X, Doney SN, Cheng L. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPSCs derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood.* 2011; 118:4599-4608.
49. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature.* 2009; 460:1132-1135.
50. Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPSCs. *Nature.* 2009; 460:1145-1148.
51. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009; 460:53-59.
52. Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011; 471:63-67.
53. Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, et al. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2011; 29:313-314.
54. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 7:521-531.
55. Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature.* 2011; 471:58-62.
56. Abyzov A, Mariani J, Palejev D, et al. Somatic copy number

- mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature*. 492:438-442.
57. Young MA, Larson DE, Sun CW, et al. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012; 10:570-582.
 58. Turner M, Leslie S, Martin NG, et al. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell*. 2013; 13:382-384.
 59. Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, Bradley JA, Bolton EM. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell*. 2012; 11:147-152.
 60. Rioloobos L, Hirata RK, Turtle CJ, et al. HLA engineering of human pluripotent stem cells. *Mol Ther*. 2013; 21:1232-1241.
 61. Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013; 494:100-104.
 62. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 474:212-215.
 63. Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, et al. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford)*. 2003; 42:162-165.
 64. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J*. 2007; 21:1345-1357.
 65. Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2009; 27:743-745.
 66. Ben-David U, Gan QF, Golan-Lev T, et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen. *Cell Stem Cell*. 2013; 12:167-179.
 67. Yuan SH, Martin J, Elia J, et al. Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2011; 6:e17540.
 68. Dubois NC, Craft AM, Sharma P, et al. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011; 29:1011-1018.
 69. Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a «suicide» gene. *Stem Cells*. 2003; 21:257-265.
 70. Slukvin II. Hematopoietic specification from human pluripotent stem cells: current advances and challenges toward de novo generation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2013; 122:4035-4046.
 71. Lu SJ, Feng Q, Caballero S, et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat Methods*. 2007; 4:501-509.
 72. Wang L, Menendez P, Shojaei F, et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J Exp Med*. 2005; 201:1603-1614.
 73. Tian X, Woll PS, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. *Stem Cells*. 2006; 24:1370-1380.
 74. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:85-98.
 75. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, et al. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther*. 2013; 21:1424-1431.
 76. Amabile G, Welner RS, Nombela-Arrieta C, et al. In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood*. 2013; 121:1255-1264.
 77. Sturgeon CM, Ditad A, Clarke RL, Keller G. Defining the path to hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2013; 31:416-418.
 78. Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol*. 2011; 29:1132-1144.
 79. Lu SJ, Feng Q, Park JS, et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood*. 2008; 112:4475-4484.
 80. Qiu C, Olivier N, Velho M, Bouhassira EE. Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. *Blood*. 2008; 111:2400-2408.
 81. Chang KH, Huang A, Hirata RK, Wang PR, Russell DW, Papayannopoulou T. Globin phenotype of erythroid cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Blood*. 2010; 115:2553-2554.
 82. Chang KH, Bonig H, Papayannopoulou T. Generation and characterization of erythroid cells from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells: an overview. *Stem Cells Int*. 2011:791604.
 83. Hirose S, Takayama N, Nakamura S, et al. Immortalization of erythroblasts by c-MYC and BCL-XL enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2013; 1:499-508.