

Gene transfer, immunomodulation, and bone healing

Citation for published version (APA):

de la Vega Amador, R. (2023). *Gene transfer, immunomodulation, and bone healing: Novel molecular approaches to bone regeneration in large osseous segmental defects*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20230621rv>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20230621rv](https://doi.org/10.26481/dis.20230621rv)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 9

Public Summary

Publieke Samenvatting

Public Summary

The main function of bones is to provide the structure on which muscles attach and move, and in some cases, like the skull and chest, protect the organs inside. Bone fractures occur when bones break, turning the once stable structure of the bones unable to provide their function. Fractures cause much pain and disability, for example, being unable to walk. This leads to inability to work or perform daily activities, and when one considers that there are over 170,000 bone fractures per year in the Netherlands alone, fractures are one of the leading causes of disability. Fortunately, bone is one of the few organs with a remarkable capacity to heal, returning to its original strength and shape. Unfortunately, there are complications to this fracture healing process called nonunions, where the fracture does not heal. This requires additional interventions by a medical team, prolong the disability period, and represent a burden on the social and economic aspects of society.

There is much interest to develop new therapies that can help heal difficult-to-heal bone fractures, like nonunions. One such therapy is bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). This potent protein capable of stimulating bone formation is currently available to surgeons for its use during surgery, but it has shown concerning side effects that limit its use, such as serious inflammation and uncontrolled bone formation. The studies presented in this thesis relied on the premise that by improving the form of administration of BMP-2, better bone can be formed to heal nonunions using less BMP-2 and reducing its side effects. We relied on the use of a rat model of a critical size bone defect, a form of bone nonunion, whereby a large piece of bone is removed from the thigh bone and stabilized with plates and screws, leaving a bone gap that is too large to heal by itself. This model provides a good approach to study new drugs, substances, or bone fillers in relation to bone nonunion.

The technology to administer BMP-2 used in our studies is called gene therapy. Gene therapy is based on the principle of introducing genes into cells. Genes are part of the normal DNA in cells and contain information on how to make proteins. By administering BMP-2 via gene therapy, cells are able to produce BMP-2 using their natural protein making abilities rather than administering the protein. This approach offers the advantage of BMP-2 production for much longer periods than if the BMP-2 protein were to be administered in surgery where it is rapidly washed away by blood, thereby requiring less BMP-2 to produce new bone.

Gene therapy has been traditionally performed using viruses containing the desired gene or small fragments of DNA. Viruses have been preferred because their nature makes them very good at getting inside cells and delivering genes. Our group has used a virus called adenovirus to deliver BMP-2 to rat bone defects because it is an efficient manner to achieve good production of BMP-2. We have used this

adenovirus either directly into the bone defect, in conjunction with stem cells that can make bone, or with muscle tissue rich in stem cells. We have observed good results with these approaches. The studies presented in this thesis were designed to answer questions regarding this particular approach.

In **Chapter 1**, we provide a general background on bone fractures, the process of fracture healing, the associated complications like nonunion, currently available clinical treatments, the problems presented by BMP-2 treatment, and how gene therapy might provide an alternative solution.

Chapter 2 consists of a review of the scientific publications regarding the use of gene therapy for bone healing. We provide a brief summary of gene therapy and different options to deliver genes using viruses. We then go back to the early years of gene therapy for bone healing in the 1990s, provide a perspective on how it has evolved, and how the immune system plays an important role when using viruses to deliver genes. We conclude this chapter by providing our opinion of future pathways for bone gene therapy to move forward, including the use of new molecules to deliver genes without the need to use viruses.

As mentioned previously, our group has had success using adenovirus BMP-2 to infect muscle tissue and then heal bone defects in rats. Because the fate of these implanted muscle tissue and cells was unknown, **Chapter 3** presents our study designed to answer this question. We used adenovirus BMP-2 to infect muscle tissue from donor rats that make a protein called GFP. We then implanted these BMP-2 muscle tissue into bone defects of rats that did not produce the GFP protein. After 8 weeks we looked for this protein within the bone defect, which allowed us to identify donor cells from the muscle tissue. We observed that these donor cells are able to transform into multiple cell types, including cartilage and bone cells, thereby directly contributing to the new bone formation. Also, we observed that bone defects healed better when we suppressed the immune system of the rats.

To investigate the possible role of FK506, the immune suppressing drug we had used for previous experiments, we performed the experiments described in **Chapter 4**. Adenovirus BMP-2 infected stem cells were implanted in rat bone defects, with or without FK506 treatment. We observed strong indications that FK506 served to block the immune system response to the adenovirus, resulting in improved bone formation.

Chapter 5 describes a study whereby we investigated if by blocking the DNA molecule called BRD4, we could use less adenovirus to produce the BMP-2 levels as in previous studies. We found that blocking BRD4 indeed allowed us to use lower doses of adenovirus and increase the amount of BMP-2 produced by stem cells. We also observed that blocking BRD4 prevented stem cells from making bone themselves, limiting the potential use of this approach.

In previous studies we had noted the importance of the immune system when using adenovirus to deliver BMP-2 to bone defects. We had also noted that very low quantities of BMP-2 were needed to heal bone defects when using gene therapy, unlike when using the protein available in the clinic. The study presented in **Chapter 6** was designed to use new molecules called chemically modified mRNA (cmRNA) as a new form of gene therapy. This is the same technology being used for the COVID-19 vaccines. We obtained very good results demonstrating that cmRNA BMP-2 was able to heal bone defects very efficiently, using low doses of BMP-2, quicker than the BMP-2 protein, and with better bone quality.

In **Chapter 7** discuss the results obtained by all our studies and present them in context between them and with the available scientific evidence on the subject. We then establish the conclusions of these studies taken together and provide future directions for this research.

Chapter 8 describes the main objectives and findings of this thesis and analyzed the impact they have in the scientific community and the general society.

In summary, this thesis came upon to investigate new methods for BMP-2 delivery to bone defects via the use of gene therapy. New treatments for nonunions are a pressing need for the scientific and clinical community, and society in general. Gene therapy is an efficient method to deliver BMP-2, stimulating healing of bone defects of good bone quality by using less BMP-2 than required with the BMP-2 protein. The immune system plays an important role in the healing of bone defects and should be accounted for in future studies. The use of new, non-viral molecules like cmRNA represent an exciting future for the field of gene therapy and bone healing.

Publieke Samenvatting

De hoofdfunctie van botten is een structuur te bieden aan spieren om zich te bevestigen en beweging mogelijk te maken. In sommige gevallen zoals bij de schedel en de borst beschermen ze ook de interne organen. Fracturen ontstaan als botten breken. Daarbij wordt de stabiele structuur van de botten beschadigd, waardoor ze niet meer in staat zijn hun functie uit te oefenen. Fracturen veroorzaken veel pijn en functiebeperking, waardoor lopen bijvoorbeeld onmogelijk wordt. Dit leidt ertoe dat werken of dagelijkse activiteiten uitvoeren niet mogelijk is. Wanneer men bedenkt dat er ongeveer 170.000 bot fracturen per jaar in Nederland zijn, is het begrijpelijk dat fracturen een van de hoofdoorzaken van functiebeperkingen zijn. Gelukkig is bot een van de weinige organen met een uitzonderlijke capaciteit om te genezen en daarbij zijn originele sterkte en vorm te herwinnen. Helaas kunnen er complicaties in het fractuurgenezingsproces optreden, waarbij zogenaamde non-unions ontstaan als de fractuur niet geneest. Dit maakt extra interventies door een medisch team noodzakelijk. Hierdoor is de periode met functiebeperking langer en het leidt tot extra sociale en economische last van de maatschappij.

Er bestaat een grote belangstelling om nieuwe therapieën te ontwikkelen, die kunnen helpen om moeilijk-genezende bot fracturen, zoals non-unions, te herstellen. Zo'n mogelijke therapie gebruikt bot morfogenetisch proteïne 2 (BMP-2). Dit sterkwerkende proteïne, dat bot-opbouw kan stimuleren, staat chirurgenaars ter beschikking om tijdens operaties te gebruiken. Maar er zijn verontrustende bijwerkingen zoals ernstige ontstekingsreacties of ongecontroleerde botvorming opgetreden, die de operatieve inzet van dit proteïne beperken. De studies, die in dit proefschrift gepresenteerd worden, berusten op de aanname, dat als de toedieningsvorm van het BMP-2 verbeterd wordt, er beter bot met minder BMP-2 gevormd kan worden om zodanig non-unions te genezen en bijwerkingen te verminderen. Hiertoe maakten wij gebruik van een diermodel met een botdefect van kritische grootte in de rat. Zo'n defect met kritische grootte is een vorm van non-union, waarbij een groot stuk bot uit het dijbeen verwijderd wordt, zodat er een gat in het bot ontstaat, dat niet uit zichzelf kan dichtgroeien. Om dit gat te stabiliseren, worden een plaat en schroeven gebruikt. Dit model is uitermate geschikt om nieuwe medicamenten, andere substanties of bot opvullers als mogelijke therapie voor non-unions uit te testen.

De technologie in onze studies om BMP-2 toe te dienen wordt genterapie genoemd. Genterapie baseert op het principe genen in cellen in te brengen. Genen maken deel uit van het normaal in cellen voorhanden zijnde DNA. Zij bezitten de informatie over hoe proteïne te maken. Door BMP-2 via genterapie toe te dienen, kunnen de cellen zelf BMP-2 produceren door middel van hun natuurlijke proteïne producerende mogelijkheden. Dit houdt in, dat het BMP-2 niet als proteïne toegediend hoeft te worden. Deze werkwijze biedt het voordeel, dat BMP-2 voor langere tijd geproduceerd wordt en dus langer aanwezig is dan het BMP-2 als proteïne dat tijdens de chirurgie toegediend wordt. Als BMP-2 als proteïne toegediend wordt,

wordt er veel door het bloed weggespoeld. Met de genterapie is er dus minder BMP-2 nodig om nieuw bot te produceren.

Genterapie werd traditioneel met virussen doorgevoerd, die het gewenste gen of kleine DNA-fragmenten bezitten. Er wordt vaak de voorkeur aan virussen gegeven, want zij zijn er van nature goed in cellen binnen te dringen en genen af te leveren. Ons team heeft een virus, genaamd adenovirus, gebruikt om BMP-2 af te geven aan botdefecten in ratten. Dit is een efficiënte manier om een goede productie van BMP-2 te krijgen. Wij hebben dit adenovirus op drie verschillende manieren gebruikt; direct in het botdefect, tezamen met stamcellen, die bot kunnen maken, of met spierweefsel, dat rijk is aan stamcellen. Met alle drie de benaderingen hebben we goede resultaten verkregen. De studies samengevat in dit proefschrift zijn ontworpen om de vragen met deze specifieke genterapeutische benadering te beantwoorden.

In **hoofdstuk 1** beschrijven we de algemene achtergrond van bot fracturen, het proces van fractuur genezing, de mogelijke complicaties zoals non-union, de hedendaagse beschikbare klinische behandelingen, de problemen optredend met BMP-2 behandelingen en hoe genterapie een mogelijke alternatieve oplossing kan zijn.

Hoofdstuk 2 is een overzicht van wetenschappelijke publicaties betreffende het gebruik van genterapie voor bot genezing. We beschrijven kort samengevat genterapie per se en de verschillende mogelijkheden om genen via virussen toe te dienen. Daaropvolgend gaan we terug naar de vroege jaren van genterapie voor botgenezing in de negentiger jaren. We beschrijven hoe het zich ontwikkelde en welke belangrijke rol het immuunsysteem speelt als virussen gebruikt worden om genen toe te dienen. Wij besluiten dit hoofdstuk met onze mening te geven over toekomstige mogelijkheden om genterapie in botten naar voren te brengen, inclusief het gebruik van nieuwe moleculen om genen toe te dienen zonder gebruik te maken van virussen.

Zoals voorheen beschreven, heeft ons team succesvol adenovirus BMP-2 gebruikt om spierweefsel te infecteren en zodoende botdefecten in ratten te genezen. Omdat niet duidelijk was, wat er met het geïmplanteerde spierweefsel en de zich daarin bevindende cellen gebeurt, hebben we de studie van **hoofdstuk 3** ontworpen om deze vraag te beantwoorden. Wij hebben adenovirus BMP-2 gebruikt om spierweefsel van donorratten te infecteren, die een proteïne genaamd GFP produceren. Vervolgens hebben we dit geïnfectede spierweefsel in botdefecten van ratten ingebracht, die dit GFP-proteïne niet kunnen maken. Na acht weken hebben wij gekeken of dit GFP-proteïne in het genezen botdefect aanwezig was. Dit stelde ons in staat om cellen van het donor spierweefsel te identificeren. Wij constateerden, dat deze donor cellen in verschillende cel types konden veranderen, waaronder kraakbeen- en botcellen. Dus op deze manier namen deze cellen direct deel aan de opbouw van het nieuwe bot. Bovendien viel ons op, dat botdefecten beter genezen als we het immuunsysteem van de ratten onderdrukten.

Het medicament om het immuunsysteem te onderdrukken was FK506. Om de mogelijke rol van FK506 in de botgenezing te onderzoeken, hebben wij de experimenten doorgevoerd, die in **hoofdstuk 4** uiteengezet worden. Stamcellen, die met adenovirus BMP-2 geïnfecteerd waren, werden in botdefecten geïmplant en FK506 werd wel of niet toegevoegd. De resultaten leverden sterke indicaties op, dat FK506 het immuunantwoord tegen het adenovirus onderdrukt en zo de nieuwe botaanmaak verbeterd.

Hoofdstuk 5 beschrijft een studie, waarbij wij onderzochten of het blokkeren van een DNA-molecuul genaamd BRD4 ertoe leidde, dat we minder adenovirus nodig zouden hebben om dezelfde hoeveelheid BMP-2 als in voorgaande studies te produceren. Wij konden inderdaad aantonen, dat door BRD4 te blokkeren er een lagere dosis adenovirus nodig was en er meer BMP-2 door stamcellen geproduceerd werd. Echter voorkwam de blokkade van BRD4 ook, dat stamcellen zelf bot konden maken, wat een limiterende factor voor deze therapeutische benadering is.

Wij hadden in de vorige studies ook het belang van het immuunsysteem gezien als we adenovirus gebruikten om het BMP-2 gen in te brengen. Verder constateerden wij, dat er bij de inzet van gentherapie slechts hele lage hoeveelheden BMP-2 nodig waren om botdefecten te helen. Dit was duidelijk minder dan de hoeveelheid proteïne, die in de kliniek gebruikt wordt. De studie in **hoofdstuk 6** onderzocht moleculen genaamd chemisch gemodificeerd mRNA (cmRNA) als een nieuwe vorm van gentherapie. Dit is dezelfde technologie, die gebruikt wordt in de COVID-19 vaccins. Wij verkregen uitstekende resultaten. De applicatie van cmRNA BMP-2 resulteerde in een efficiënte botgenezing met een lage dosis BMP-2, wat sneller was dan bij de therapie met BMP-2 proteïne. Bovendien was de botkwaliteit ook beter.

In **hoofdstuk 7** discussiëren wij alle resultaten van de gepresenteerde studies in dit proefschrift in de context met elkaar en met de voorhanden zijnde wetenschappelijke bewijzen. Aan de hand hiervan trekken wij onze overkoepelende conclusies en geven adviezen voor toekomstig onderzoek op dit gebied.

Hoofdstuk 8 omvat de hoofddoelen en resultaten van dit proefschrift, welke geanalyseerd worden betreffende hun impact op de wetenschappelijke gemeenschap en de maatschappij.

Samenvattend kan gezegd worden, dat dit proefschrift nieuwe methoden voor het toedienen van BMP-2 door middel van gentherapie bij botdefecten onderzocht heeft. Nieuwe therapiemogelijkheden bij non-unions zijn hard nodig voor de wetenschappelijke en klinische gemeenschap als ook voor de maatschappij. Gentherapie is een efficiënte methode om BMP-2 toe te dienen, waardoor de genezing van botdefecten gestimuleerd wordt met een goede botkwaliteit. Hierbij is minder BMP-2 nodig dan bij het gebruik van BMP-2 proteïne. Het immuunsysteem speelt een belangrijke rol in de botgenezing en daaraan moet meer

aandacht gegeven worden in toekomstige studies. Het gebruik van nieuwe, niet-virale moleculen zoals mRNA beloven een opwindende toekomst voor het veld van gentherapie en botgenezing.