

Bioengineering of novel 3D scaffolds for cell-based therapy in heart failure and diabetes mellitus

Citation for published version (APA):

Sondermeijer, H. P. (2019). *Bioengineering of novel 3D scaffolds for cell-based therapy in heart failure and diabetes mellitus*. Ridderprint. <https://doi.org/10.26481/dis.20190517hs>

Document status and date:

Published: 01/01/2019

DOI:

[10.26481/dis.20190517hs](https://doi.org/10.26481/dis.20190517hs)

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

Summary in English.

ENGLISH SUMMARY

Cell-based therapy and bioengineering are relatively novel therapeutic concepts to treat tissue degenerative diseases such as heart failure (HF) and insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). In preclinical small and large animal models, the results of such therapeutic interventions have been successful; cardiac function in HF and glucose control in IDDM could both be reversed in model systems, respectively.

Subsequently, cell-based therapy and bioengineering for HF and IDDM has been attempted in clinical settings and is being actively pursued in clinical trials. It is presumed and thoroughly tested prior to their use that such cells are functional and will not convert to uncontrolled or neoplastic proliferation.

In the case of HF, (stem) cells were injected, depending on the clinical trial design, either directly into myocardial infarcts, infused directly into blocked coronary arteries, or systemically infused through a venous route. The mechanistic hypotheses were that such cells would migrate/home into the damaged tissue to form new cardiac muscle or new cardiac blood vessels, resulting in improved cardiac function.

In the case of IDDM, isolated pancreatic islets were infused into the portal vein in order to create well vascularized cell pockets inside the hepatic microvasculature that would respond to increasing glucose levels by secreting insulin.

Both aforementioned strategies have been hampered by low allograft cell survival due to 1) low local oxygen and low local nutrient supply through the native recipient vasculature, 2) low cell retention due to lack of cell adhesion and retention, and 3) immune rejection of implanted cells, and therefore overall limited long term effects on cardiac function (HF) or glucose control (IDDM). These problems are reviewed in **chapter 1**, and underlie the motivation for the work that is described in this thesis.

In order to improve the effectiveness of cell transplantation in HF and IDDM, several different cell-based therapy and bioengineering approaches were developed and tested in preclinical models, taking into account 1) the optimal design of a 3D base platform that can be used for the transplantation of different kinds of (stem) cell types, 2) enhancing local cell survival of implanted cells by binding of specific cell surface receptors to local extracellular matrix prosurvival factors, 3) enhancing local cell survival by increasing the local supply of oxygen and nutrients by a patent vasculature, 4) enhancing the effect of biomaterial implantation by exploring different anatomical sites (i.e. intramuscular, subcutaneous, or even intraperitoneal) of implantation, 5) modulating the local cytokine environment pharmacologically in order to improve (stem) cell homing to damaged tissue, and 6) minimizing the immune response that ensues against foreign cells or against foreign materials/tissues/organs upon implantation.

In order to design an optimal “general”

base platform suitable for cell transplantation, we evaluated and tested several different biomaterials such as biological blood or protein derived products (i.e. fibrin glue, Matrigel), synthetic materials (i.e. peptide nanofibers, PNIPAAm), and others. Ultimately, we decided the polysaccharide sodium alginate (NaA) to be the most optimal because 1) it is algae-derived, minimizing the risk of pathogen (i.e. prion) transfer, 2) it contains modifiable carboxyl(-COOH) groups (1 per NaA monomer) and thus allows for covalent attachment of prosurvival factors to the NaA polymer, 3) NaA is cheap, 4) has low toxicity, and 5) has the ability to assume a highly porous 3D structure that permits vascular ingrowth of arterioles and capillaries using simple and affordable techniques.

Because NaA contains potentially immunogenic contamination, we describe in **chapter 2** a novel purification protocol that effectively removes immunogenic contaminants and thus generates a highly biocompatible material. This purified “base” material was subsequently used in all further in vitro and in vivo studies employing covalent modification, growth factor addition, 3D scaffold generation, and cell transplantation.

Chapter 3 describes the generation of covalent modification of previously mentioned purified NaA using the prosurvival peptide cyclic RGDfK. This peptide binds with high affinity to cell surface integrin receptors and enhances cell survival. Porous 3D scaffolds fabricated using this modified NaA enhance cell survival, as we show with neonatal rat cardiomyocytes and fibroblasts, and human mesenchymal precursor cells (hMPCs). Such scaffolds could be used to transplant hMPCs as a patch to the left ventricular (LV) scar area of infarcted hearts and improve cardiac function following acute myocardial infarction (AMI).

We also evaluated the 3D scaffold approach to transplant pancreatic islets in models of IDDM. Using a modified protocol, we were able to generate 3D hydrogel scaffolds using cyclic RGDfK modified NaA loaded with vascular growth factors (vascular endothelial growth factor and platelet derived growth factor-BB) to generate an intramuscular vascular bed that facilitated the implantation of isolated pancreatic islets to cure streptozotocin-induced IDDM, as shown in **chapters 4 & 5**. We could visualize live islets in situ using an islet specific marker and positron emission tomography (PET). The addition of vascular growth factors to the implanted scaffolds preimplantation markedly enhanced the effectiveness of the treatment and normalized glucose control in 100% of diabetic animals.

Following intravenous injection without scaffolds, (stem) cells need to find their way to damaged tissue in a process called “homing”. The identification of specific cytokines and chemokines that are released following tissue injury and that subsequently attract or repel certain specific cell types offers the possibility of manipulating the homing capacity of such cells and direct them to specific sites of tissue injury. We have evaluated the

modulation of these cytokine and chemokine pathways using direct injection and/or blocking of their receptors in order to “trick” human bone marrow derived hematopoietic CD34⁺ stem cells to find their way to the site of injury and create new blood vessels in the infarcted myocardium. We could show in **chapters 6 & 7** that modulating these pathways in an acute myocardial infarct (AMI) model is beneficial for the recovery of LV function following an AMI injury.

In parallel studies (**appendices 1-2**), we provide evidence that non-hematopoietic hMPCs upon direct injection into the cardiac muscle following AMI prevent cardiac remodelling by formation of new blood vessels within the infarcted heart. Mechanistically, we showed that effects on cardiac function may be dependent on certain chemokines and cytokines that hMPCs secrete, since intramyocardial injection of a concentrated cocktail of chemokines and cytokines that are secreted by hMPCs following ex vivo culture are sufficient to exert a similar effect on remodelling and cardiac function following MI.

In an alternative T-cell-based immunomodulatory approach (**appendix 3**) aimed at enhancing the survival of transplanted cells or organs, we show that adoptive transfer of expanded regulatory T-cells (i.e. T_{regs}) induced hematopoietic bone marrow chimerism (i.e. the co-existence of both donor and recipient hematopoietic stem cells in the bone marrow). It was shown that hematopoietic chimerism could prevent allograft rejection in a non-human primate (NHP) model of bone marrow stem cell and kidney transplantation without the use of *any* long-term immunosuppression.

In summary, this thesis provides an outline of several specific approaches in small animal models to both improvement of cardiac function following an MI and to achieving normoglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus using stem cell technology combined with novel types of NaA scaffolds impregnated with cell survival and angiogenic factors. In NHPs it was shown that further enhancing allograft survival could be facilitated by the adoptive transfer of autologous T_{reg}-cells. It is my hope that these efforts can be repeated and eventually combined in additional large animal models and human trials facilitated by a close collaboration between academia, clinic and commercial parties.

Chapter 10

Samenvatting in het Nederlands
(Dutch summary).

NEDERLANDSE SAMENVATTING (DUTCH SUMMARY)

Celtherapie en *bioengineering* zijn relatief nieuwe benaderingen om weefseldegeneratieve aandoeningen als hartfalen (HF) en insuline afhankelijke diabetes mellitus (IDDM) te behandelen. De resultaten van deze interventies zijn in proefdiermodellen met kleine én grote proefdieren succesvol gebleken; hartspierfunctie en het reguleren van suikerspiegels in respectievelijk HF en IDDM kunnen door deze behandelingen vrijwel worden genormaliseerd.

Dientengevolge is getracht interventies gebaseerd op (stam)celtherapie en bioengineering toe passen in klinische settings en deze actief in te zetten in patiëntenstudies, waarbij aangenomen wordt dat grondig geteste (stam)cellen niet zullen uitgroeien tot neoplasmen met ongecontroleerde groei (e.g. kanker).

Afhankelijk van het soort klinische trial worden (stam)cellen in het geval van HF óf direct in de hartspier geïnjecteerd, óf door middel van een catheter geïnfundeerd in een verstopte kransslagader, óf met een infuus via een perifere bloedvat in de circulatie gebracht. Mechanistisch is de hypothese dat deze cellen hun weg vinden in en naar de beschadigde hartspier om daar nieuw hartspierweefsel of nieuwe bloedvaten te vormen, resulterend in verbeterde hartspierfunctie.

In geval van IDDM worden geïsoleerde eilandjes van Langerhans geïnfundeerd in de portale vaten van de lever om zo in de microcirculatie van de lever goed gevasculariseerde “pockets” te creëren die zouden reageren op toename van glucosespiegels door productie van insuline.

Beide strategieën worden in de praktijk gehinderd door beperkte overleving van de geïnjecteerde cellen t.g.v. 1) lage lokale zuurstofspanning en beperkte initiële toevoer van voedingsstoffen door lokaal vaatweefsel, 2) lage celretentie door beperkte aanhechting/verankering van geïnjecteerde cellen en 3) immuunafstoting van de geïnjecteerde cellen. Deze celdood leidt uiteraard tot slechts beperkte positieve lange termijn effecten op hartspierfunctie (HF) en glucosecontrole (IDDM). Deze problemen worden besproken in **hoofdstuk 1**, en zijn de onderliggende motivatie geweest voor het werk dat is beschreven in dit proefschrift.

In een poging om de effectiviteit van celtransplantatie in HF en IDDM te verbeteren worden verschillende hypothesen op basis van (stam)celtransplantatie en bioengineering ontwikkeld en getest in preklinische modellen met kleine en grote proefdieren, waarin continu rekening wordt gehouden met 1) optimaal ontwerp van het 3D biomateriaal platform dat gebruikt kan worden voor de transplantatie van verschillende soorten (stam)cellen, 2) verbetering van lokale overleving van geïmplanteerde cellen door binding van bepaalde oppervlaktereceptoren op de celmembraan met de extracellulaire matrix (ECM), 3) verbetering van lokale overleving van geïmplanteerde cellen door vergroten van de lokale

toevoer van zuurstof en voedingsstoffen door functioneel vaatweefsel, 4) verbetering van het effect van (bio)materiaalimplantatie door exploratie van verschillende locaties voor implantatie (intramusculair, subcutaan of zelfs intraperitoneaal), 5) farmacologisch moduleren van het cytokinemilieu om migratie van (stam)cellen naar beschadigd weefsel te vergroten, en 6) modulatie van de immunorespons die optreedt tegen lichaamsvreemde cellen en/of (bio)materialen/weefsels/organen na implantatie.

Voor het ontwerp van een optimaal “gestandaardiseerd” 3D platform dat geschikt is voor (stam)celtransplantatie worden verschillende biomaterialen getest, waaronder biologische bloed- of eiwitproducten (fibrin glue, Matrigel), synthetische biomaterialen (peptide nanofibers, PNIPAAm), en andere. Uiteindelijk is gekozen voor het polysaccharide natrium alginaat (NaA) omdat deze een aantal voordelen heeft ten opzichte van andere biomaterialen: 1) NaA wordt gewonnen uit algen waardoor het risico op infecties van het gastorganisme met pathogenen (e.g. virussen, prionen) miniem is, 2) de aanwezigheid van carboxyl(-COOH) groepen (1 per NaA monomeer) maakt NaA polymeren modificeerbaar door impregnatie en/of covalente aanhechting van (groei)factoren met amino(-NH₂) groepen via chemische cross-linking, 3) NaA is goedkoop, 4) heeft lage toxiciteit, en 5) heeft de eigenschap dat het onder milde condities kan worden omgevormd tot hoogporeuze 3D matrices die vaatingroei (arteriolen, capillairen) mogelijk maakt.

Omdat NaA potentiële immunogene verontreiniging bevat wordt in **hoofdstuk 2** een nieuw gepatenteerd purificatieprotocol omschreven dat effectief het grootste deel van de immunogene contaminatie verwijdert resulterend in een sterk biocompatibel materiaal. Dit gepurificeerde basismateriaal wordt vervolgens gebruikt voor alle *in vitro* en *in vivo* studies, inclusief covalente modificatie, groeifactoradditie, 3D materiaal generatie, en celtransplantatie.

Hoofdstuk 3 beschrijft de generatie van covalente modificatie van het eerder genoemde gepurificeerde NaA met het synthetische celoverlevingspeptide cyclisch RGDfK. Dit peptide bindt met hoge affiniteit aan celoppervlaktereceptoren (integrinen) die op de meeste zoogdiercellen voorkomen, en vergroot hierdoor celoverleving. Hoogporeuze 3D matrices die worden gefabriceerd met behulp van cyclisch RGDfK gemodificeerd NaA vergroten celoverleving zoals wordt aangetoond met cardiomyocyten en fibroblasten uit neonatale rattenharten, en met menselijke mesenchymale precursor beenmergcellen (hMPC's). Deze 3D matrices zijn vervolgens toegepast voor de transplantatie van hMPCs als levende “pleister” op geïnfarceerde linkerhartspier (LV) na acuut myocardinfarct (MI) waardoor hartspierfunctie significant verbetert.

Met een aangepast protocol is het mogelijk om van hetzelfde cyclisch RGDfK-gemodificeerde NaA 3D hydrogels te fabriceren die worden geladen

met vasculaire groeifactoren (*vascular endothelial growth factor* en *platelet derived growth factor-BB*) waarmee een intramusculair vaatbed kan worden regeneroerd, waarin vervolgens geïsoleerde eilandjes van Langerhans worden geïnjecteerd en streptozotocin-geïnduceerde (STZ) IDDM is genezen, zoals beschreven in **hoofdstukken 4 & 5**. De levende eilandjes kunnen vervolgens worden gevisualiseerd met een specifieke merker door middel van *positron emission tomography* (PET). Het toevoegen van vasculaire groeifactoren vergroot de effectiviteit van de geïmplanteerde eilandjes op glucosecontrole naar 100% van de behandelde proefdieren.

Stamcellen die intraveneus worden geïnjecteerd zonder gebruik te maken van een drager(bio)materiaal moeten hun weg vinden naar beschadigd weefsel door middel van een proces dat “*homing*” wordt genoemd. De identificatie van specifieke cytokinen en chemokinen die vrijkomen na weefselbeschadiging en vervolgens bepaalde celtypen aantrekken of afstoten biedt de mogelijkheid tot manipulatie van de *homing* capaciteit van zulke cellen om ze naar specifieke locaties te dirigeren. Modulatie van verscheidene interacties van cytokinen en chemokines met menselijke CD34⁺ hematopoietische beenmergstamcellen wordt geëvalueerd in een model voor hartfalen door middel van directe injectie van cytokines of blokkade van cytokinereceptoren om (stam)cellen zo te “foppen” dat ze hun weg naar beschadigd hartspierweefsel (in plaats van beenmerg) kunnen vinden. In **hoofdstukken 6 & 7** wordt aangetoond dat het moduleren van specifieke cyto- en chemokines een voordelig effect heeft op vaatgroei en het herstel van hartspierfunctie na MI.

In parallelle studies (**appendices 1-2**) wordt bewijs geleverd dat niet-hematopoietische hMPC's na directe injectie in de geïnfarceerde hartspier *remodeling* van het hart verbeteren door het vormen van nieuwe bloedvaten. Mechanistisch wordt aangetoond dat zulke effecten op zijn minst afhankelijk zijn van de cytokinen en chemokinen die lokaal worden uitgescheiden door hMPC's, aangezien directe injectie van een *ex vivo* door hMPC geproduceerde en geconcentreerde cytokinecocktail in de geïnfarceerde hartspier vergelijkbare effecten heeft op de functie van het geïnfarceerde hart.

In aanvullende studies (**appendix 3**) met een focus op immunomodulatie wordt in non-humane primaten aangetoond dat acceptatie van getransplanteerd lichaamsvreemd beenmerg in combinatie met een niertransplantatie kan worden verbeterd door intraveneuze infusie van *ex vivo* geëxpandeerde lichaamseigen immunosuppressieve regulatorische T-cellen (zgn. T_{regs}). Hierdoor ontstaat zgn. hematopoietisch chimerisme (het naast elkaar bestaan in het beenmerg van zowel donor als ontvanger hematopoietisch stamcellen) en kunnen zowel beenmerg- als nier-afstoting worden

voorkomen, zonder lange termijn gebruik van immunosuppressiva.

Samenvattend verschaft dit proefschrift concepten voor specifieke benaderingen voor de verbetering van hartfunctie na infarct en voor behandeling van STZ-geïnduceerde IDDM in kleine proefdieren, gebruik makend van (stam)celtransplantatie gecombineerd met nieuwe gemodificeerde typen van NaA geïmpregneerd met celoverlevings- en proangiogene factoren. Verdere acceptatie en overleving van lichaamsvreemde cellen, weefsels en/of organen na implantatie kan worden bewerkstelligd door co-infusie met lichaamseigen T_{reg} cellen. In de toekomst is de hoop dat deze strategieën kunnen worden gecombineerd in aanvullende modellen voor grote proefdieren en/of in klinische *trials*, in goede samenwerking tussen academische, klinische en commerciële partijen.