

Aanvraagnummer:

AVD XXXXXXXXXX 20198650

Lid 6. De ontvangst van de aanvraag tot een projectvergunning wordt zo snel mogelijk bevestigd door de centrale commissie dierproeven. Daarbij wordt de termijn vermeld waarbinnen een besluit over de aanvraag wordt genomen.

Lid 7. De beoordeling van een project vindt plaats in een mate van uitvoerigheid die past bij het soort project en nodig is om te beoordelen of het project voldoet aan de in artikel 10a2 genoemde criteria.

Lid 8. De centrale commissie dierproeven geeft haar oordeel en maakt dit bekend aan de aanvrager binnen veertig werkdagen na ontvangst van de aanvraag. Indien dat wordt gerechtvaardigd door de complexiteit of de multidisciplinaire aard van het project, kan deze termijn met ten hoogste een maal vijftien werkdagen worden verlengd. De verlenging en de duur daarvan worden met redenen omkleed en worden voor het verstrijken van de termijn ter kennis van de aanvrager gebracht.

Lid 9. Met toepassing van artikel 28, eerste lid, laatste zinsnede, van de Dienstenwet is paragraaf 4.1.3.3. van de Algemene wet bestuursrecht niet van toepassing op een aanvraag tot een projectvergunning als bedoeld in het eerste lid.

Lid 10. De projectvergunning is beperkt tot de dierproeven die onderdeel uitmaken van het projectvoorstel op basis waarvan de projectbeoordeling heeft plaatsgevonden en onverminderd artikel 10a5 tot de categorieën waarin deze dierproeven naar ernst zijn ingedeeld.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD1150020198344
2. Titel van het project : Targeting Senescence against Cancer and Aging
3. Titel van de NTS : Het aanpakken van senescence tegen kanker en veroudering
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer :
5. Contactgegevens DEC
 - Naam DEC : DEC Utrecht
 - Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
 - Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 04-07-2019
 - aanvraag compleet:
 - in vergadering besproken: 19-06-2019
 - anderszins behandeld:
 - termijnonderbreking(en) van / tot : 27-06-2019/28-07-2019
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 15-08-2019
7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.
8. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum: 19-06-2019
 - Plaats: Utrecht
 - Aantal aanwezige DEC-leden: 8
 - Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker + 2 overige onderzoekers
 - Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:

De onderzoeker heeft de DEC door de flowchart geleid. Verder is gesproken over de therapieën en de opzet van het onderzoek. De vragen die de DEC gesteld heeft, staan hieronder weergegeven en worden ook nog schriftelijk voorgelegd.
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 27-06-2019
 - Datum antwoord: 28-07-2019

- Gestelde vragen en antwoorden:

3.1 Achtergrond

- De DEC mist een referentielijst mist. Graag nog toevoegen.

Deze lijst is nu toegevoegd in de laatste sectie van het projectvoorstel.

- Over de therapieën bent u weinig concreet. Zijn dat de peptidomimetica? Graag aangeven wat u gebruikt, waarom het werkt en welke ervaring u ermee heeft. Indien er sprake is van IP property, bestaat de mogelijkheid om te gebruiken middelen en de ervaringen daarmee voor te leggen aan een van de commissieleden of de voorzitter die dan een advies uitbrengt.

De beoogde nieuwe therapieën zijn inderdaad met name peptidomimetica. De nadruk ligt vooralsnog op zogenaamde "Cell penetrating peptides (CPPs)". CPPs hebben in principe enkele belangrijke voordelen ten opzichte van kleine moleculen en in 2017 waren peptiden al de 3e klasse van stoffen die door de FDA zijn goedgekeurd als medicijn (na antilichamen en nucleide-gebaseerde stoffen). Er is dus een toename in de mogelijkheden en het wetenschappelijke begrip van hoe CPPs als medicijnen kunnen worden toegepast. Enkele voordelen zijn:

- a) CPPs kunnen in theorie binden aan grotere domeinen binnen eiwitstructuren. Dit in tegenstelling tot kleine moleculen en b.v. kinase remmers. De mogelijkheden om complexere interacties te blokkeren zijn daarmee groot.*
- b) CPPs kunnen we zeer specifiek een eiwit-eiwit interactie verbreken, zonder dat dit noodzakelijk de andere functies en bindingen van deze eiwitten verhindert. Ook dit is een voordeel ten opzichte van kinase remmers.*
- c) Er kunnen relatief veel variaties gemaakt worden op CPPs, wanneer er een goed basisproduct is. 10.1 c en 10.2 g*

Dit peptide zorgt hierdoor specifiek voor apoptose in senescent cellen en leidt tot gezondheidsverbeteringen in oude muizen. Ook in modellen voor melanoom hebben wij CPPs gemaakt, 10.1 c en 10.2 g En voor andere projecten in ons lab, dan wel met collega's hebben wij geheel nieuwe peptiden ontwikkeld, welke deels binnen dit project kunnen vallen.

Vergelijkbare peptiden als degene die wij ontwikkelen, bijvoorbeeld tegen de kinase JNK, zijn al met succes in klinische studies getest. We willen voornamelijk nieuwe CPPs testen in de beschreven dierproeven. De exacte structuur en de gedetailleerde moleculaire werking van deze peptiden is inderdaad vertrouwelijke informatie. Maar het principe is vergelijkbaar met de eerdere peptiden die we ontwikkeld hebben.

N.B.1: We gaan niet alléén maar peptidomimetica testen. Er zijn namelijk ook kleine moleculen en natuurlijke stoffen waarvan beweerd wordt dat deze senescente cellen doden, b.v. BCL remmers als Navitoclax, of de cocktail van Quercetine en Dasatinib. Binnen het redelijke, zullen deze op een gegeven moment wellicht ook als controle meegenomen

moeten worden als vergelijkingsmateriaal. Deze zijn echter niet onze "focus". Mochten er in de 5 jaar van dit project veelbelovende stoffen bijkomen, dan vragen wij de ruimte om deze ook te mogen testen (volgens de beslissingsboom in het voorstel).

N.B.2: In modellen om senescente cellen op een genetische wijze te doden middels een "kill-switch", zijn ook kleine moleculen nodig. Dit is bijvoorbeeld zo in het p16::3MR model, waar de stof Ganciclovir de kill switch in het 3MR construct activeert. Deze constructen zullen ook als controle gebruikt worden (voor proof-of-concept experimenten om te bepalen of senescente cellen an sich bijdragen aan het ziektebeeld).

- Wat zijn de primaire uitkomstparameters?

Een beschrijving van de primaire uitkomstparameters hebben we toegevoegd aan 3.4.2 (Hier worden deze ook wel 'measurable endpoints' genoemd). Deze zijn afhankelijk van het type proef (type appendix) en van het specifieke ziektebeeld.

In het algemeen zijn de primaire uitkomstparameters voor de verouderingsmodellen gezondheid. Hiermee bedoelen we dat er een afname op parameters voor gezondheid is, en dat we dan bepalen of met onze behandelingen deze verbeteren. Voor specifieke aandoeningen kan de nadruk anders zijn.

Concrete voorbeelden:

1) Biologische/fysiologische parameters:

- *Veranderingen in bloed-, urine- of feceswaarden voor algemene en orgaanspecifieke gezondheid (zoals bijvoorbeeld in ons Cell verhaal ook gedaan is). Zo is een verhoogde ureumconcentratie in het bloed bijvoorbeeld een indicatie voor nierschade en een verhoogde AST activiteit in het bloed een mate voor leverschade. Door deze waarden te meten kunnen we het effect van onze nieuwe therapieën op orgaanfunctie bestuderen.*
- *Veranderingen in fysieke gesteldheid. Er zullen functionele assays worden uitgevoerd, zoals renwielactiviteit en rotarod testen. Deze experimenten geven een indicatie over hoe gezond een dier is op bepaalde tijdstippen.*
- *Ziekte-specifieke parameters. Dit is zeer experiment afhankelijk. We geven enkele voorbeelden in het voorstel.*

In het geval van kanker:

- *primaire tumorgroei, metastasevorming*
- *Ziekte-vrije overleving, algehele overleving.*

2) Proces-specifieke parameters:

- *Veranderingen in de hoeveelheid senescence (subtypen) en stamceleigenschappen. De hoeveelheid senescence zal worden bepaald met behulp van imaging technieken (IVIS, FMT). Verder zullen deze technieken ook gebruikt worden om bijvoorbeeld senescence subtypes of stamcel eigenschappen te detecteren.*
- Is het mechanisme van een kankercel die met chemotherapie is aangepakt en senescent wordt anders dan een gezonde cel die senescent wordt?
Ja en nee. De definitie van senescence is dat de cellen niet meer kunnen delen. Kankercellen doen dit natuurlijk juist wel. Echter, en dat is het probleem met de definitie, kankercellen

kunnen wel degelijk "senescence"-eigenschappen ontwikkelen. We hebben aangetoond dat
10.1 c en 10.2 g

Wij vermoeden dat uw vraag voortkomt uit vrees dat anti-senescence middelen ook gewone cellen zullen doden wanneer deze senescent zijn geworden. Dit is een begrijpelijke en terechte vraag. Dit is uiteraard ook voor ons zeer belangrijk om te blijven onderzoeken voor nieuwe stoffen. Echter, deze vrees is ongegrond gebleken in eerdere experimenten in vitro en in vivo. Gewone cellen die beschadigd zijn, kunnen dit veelal weer repareren. Een deel wordt senescent en geeft problemen. Deze populatie willen we juist opruimen, net als de kankercellen die senescence-properties krijgen. Het risico voor "normale" gezonde cellen en voor gezonde cellen die slechts tijdelijk beschadigd zijn is nihil gebleken (zoals ook in ons Cell paper onderzocht).

- Wat doet u met de resultaten uit pilots die niet gebruikt worden in vervolgstappen, die niet in de "main appendix" belanden? Is het mogelijk om deze resultaten beschikbaar te maken voor de community?

Wij begrijpen dit argument maar al te goed en dit is onderdeel van een veel bredere discussie over wat te doen met negatieve onderzoeksdata. Wij zijn hier echter geen onomstotelijk voorstander van, vanwege het feit dat er doorgaans veel redenen zijn waarom een proef niet lukt. Terwijl optimaliseren van het protocol soms wonderen kan doen. Wanneer wij echter een negatief resultaat publiceren, dan zal dat laatste zeer bemoeilijkt worden. We staan er uiteraard voor open om goed gecontroleerde negatieve data op te nemen in onze manuscripten, maar dan wel uitgezet tegen andere, positieve, resultaten. We zijn wel bereid om de resultaten van pilot experimenten algemeen beschikbaar te stellen aan geïnteresseerden.

3.4 Onderzoeksstrategie

- De keuzecriteria in de flowchart zijn niet helder. Wat is de rationale op basis waarvan de keuzes gemaakt worden?

De keuzecriteria hangen af van de proef en de specifieke stof. Dit verschilt dus per scenario. We begrijpen echter de behoefte voor meer tastbare criteria. Om deze reden hebben we nu voorbeelden gegeven van concrete keuzecriteria onder de flowchart. Voorbeelden zijn (maar deze kunnen per proef natuurlijk verschillen):

Go/no-go 1: alleen stoffen die senescente cellen of kanker cellen doden in vitro zullen getest worden in dierproeven. De criteria die we hiervoor stellen zijn dat deze stoffen zowel een goede selectiviteit voor senescent of kankercellen moeten hebben (minstens drievoudige selectiviteit ten opzichte van gezonde cellen), als een lage EC50 (lager dan 20µM). Als deze criteria niet worden gehaald, zullen de stoffen dus niet in vivo getest worden. Als er

meerdere stoffen deze criteria halen, kiezen we per indicatie de stof met de hoogste selectiviteit en laagste EC50.

Go/no-go 2: Voor al onze proeven willen we het meest optimale model gebruiken voor de verouderingsaandoening of type kanker dat we willen bestuderen.

We willen ten eerste nieuwe modellen ontwikkelen die subtypes van senescence in beeld kunnen brengen en zullen alleen nieuwe stoffen testen in de modellen waarin senescence detectie mogelijk is. Als we bijvoorbeeld een nieuw model gebruiken waar we senescence induceren, maar dit niet detecteren m.b.v. bioluminescentie, zullen we niet doorgaan met dit model. Daarnaast willen we alleen bestaande verouderingsmodellen gebruiken die voldoende senescence laten zien, zodat we in staat zijn om te bepalen of we daadwerkelijk senescente cellen doden in vivo. Een model is bijvoorbeeld geschikt voor verdere experimenten als er minstens 20% meer senescence gedetecteerd wordt (m.b.v. bioluminescentie) ten opzichte van de controle. Daarnaast zijn we geïnteresseerd in specifieke ouderdomsziektes waarin senescence bijdraagt aan de pathologie. We willen eerst testen of we in een ziektemodel daadwerkelijk senescence detecteren. We zullen deze modellen alleen gebruiken als er minstens 20% meer senescence gedetecteerd wordt dan in controle dieren. Dit detecteren we m.b.v. bijvoorbeeld immunohistochemie of qPCR. Als dit niet het geval is, zullen we een ander model kiezen. Naast de hoeveelheid senescence die wordt gedetecteerd, is het ook belangrijk dat de verouderingssymptomen waarin we geïnteresseerd zijn daadwerkelijk in het model te meten zijn. We zullen bijvoorbeeld alleen modellen gebruiken die minimaal 10% verlies van botdichtheid laten zien op een CT scan of minimaal 25% verslechtering laten zien in ziekte gerelateerde bloedwaardes ten opzichte van controle muizen. Voor de kankermodellen willen we gebruik maken van kankercellijnen die een goede 'take rate' hebben, een optimale groei snelheid en voldoende metastases vormen (als metastasering bestudeerd moet worden). Een take rate is voldoende als meer dan 30% van de muizen die geïnjecteerd zijn met kankercellen daadwerkelijk een tumor vormt, waarbij het streven hoger ligt. De groeisnelheid is voldoende als er in een half jaar een werkbare tumor gevormd is, waarbij het streven korter is. De hoeveelheid metastases dat voldoende is, is minimaal 5. We gaan alleen verder met modellen die deze eigenschappen hebben.

Go/no-go 3: We zullen pilot experimenten uitvoeren in bestaande of geoptimaliseerde muismodellen. In deze experimenten zullen we nieuwe therapieën testen in een kleine groep dieren om te kunnen bepalen wat de optimale dosering en het optimale behandelingschema is. Uit deze experimenten zal blijken of een stof daadwerkelijk de potentie heeft om in vivo senescente cellen of kankercellen te doden in het model dat gebruikt wordt. Alleen als we een groot verschil zien in deze kleine groep muizen, zullen we de stof in een groter experiment verder bestuderen. Verschillen waar we in geïnteresseerd zijn in verouderingsmodellen zijn bijvoorbeeld de vermindering in het senescence signaal na behandeling, verbetering van bloedwaardes en de verbetering in botdichtheid of spiermassa. In kankermodellen zijn we bijvoorbeeld geïnteresseerd in verschillen in de tumor grootte of hoeveelheid metastases. Aan de hand van deze experimenten wordt de

groepsgrootte bepaald voor verdere experimenten. Verschillen zijn groot genoeg als we op basis van berekeningen uitkomen op groepen kleiner dan of gelijk aan 20 dieren. We streven echter naar groepen tussen 8 en 12 muizen. Een uitzondering is de groepsgrootte bij lifespan experimenten in verouderingsmodellen. Hiervan is bekend dat grotere groepen nodig zijn (maximaal 50 muizen).

Go/no-go 4: nieuwe therapieën die goede resultaten laten zien in pilot experimenten zullen worden getest in een grotere groep dieren. Als de stof in dit grotere experiment succesvol is in het doden van senescente cellen of kanker cellen en leidt tot significante gezondheidsverbeteringen in het geteste model, zal het verder worden getest in andere modellen. Als de therapie bijvoorbeeld in eerste instantie in een verouderingsmodel is getest, kan het verder worden bestudeerd in specifieke ziektemodellen. Als een therapie effectief is in een kankermodel, kan worden getest of het dezelfde werking heeft in meerdere kankermodellen. Over het algemeen geldt dat als primaire outcome parameters in 1 model significant verbeterd zijn, een therapie in een ander model getest mag worden.

Voorbeelden hiervan zijn een verbetering van 20% in lifespan extension, of een verbetering in bloedwaardes van 25%.

Go/no-go 5: Als een nieuwe therapie effectief is in 1 van de geteste modellen, kan het verder worden getest in pre-IND experimenten. Hier zal onder andere de biodistributie, toxiciteit en stabiliteit bepaald worden. We zullen hier alleen stoffen testen die significant laten zien senescente cellen of kanker cellen te doden en die voor gezondheidsverbeteringen zorgen in de geteste modellen. Als de stof getest is in een kankermodel, moet het de levensduur van de muizen significant verlengen.

Go/no-go 6: Alleen nieuwe therapieën die niet toxisch blijken en een goede biodistributie hebben in de pre-IND experimenten zullen overwogen worden voor klinische testen in mensen.

Alle bijlagen

- Wat zijn de criteria voor gebruik van de verschillende imaging technieken?
Voor veel proeven zijn de biologische en fysiologische parameters de meest belangrijke. Echter, we hopen inzicht te krijgen in het waar en wanneer (individuele subtypen van) senescence een rol spelen bij ziekteontwikkeling. Er zal voornamelijk gebruik worden gemaakt van IVIS, CT en FMT. Hier zijn in feite weinig beperkende criteria voor, behalve dat we weten dat de biologie van de muizen verandert door de narcose. Dit kan dus niet te vaak gebeuren. Verder is het ongerief niet groot, terwijl er zeer veel informatie mee te behalen valt. Deze technieken zijn relatief simpel en krachtig om de (groe) hoeveelheid senescence/kanker/stemness te kunnen bepalen vóór en ná een behandeling. Dit is dus een manier om in dezelfde muizen behandelings succes te meten (een vorm van verfijning en vermindering van de 3 V's).
 - IVIS wordt gebruikt om een bioluminescentie of fluorescentie signaal te meten, bijvoorbeeld om grofweg de hoeveelheid senescence te meten in een senescence

detectie model of om tumorgroei te bepalen (indien de kankercellen een luminescent of fluorescent label hebben).

- *FMT wordt ook gebruikt om fluorescentie te detecteren en heeft een hogere resolutie dan de IVIS. Voor deze techniek wordt gekozen als bijvoorbeeld de hoeveelheid senescence in een specifieke regio bepaald moet worden of als tumor progressie op een specifieke locatie bekeken moet worden.*
- *Met CT kan weefseldichtheid worden gemeten en we zijn van plan om dit toe te passen om bijvoorbeeld botdichtheid of spiermassa te meten als mate van gezondheid tijdens veroudering of na chemotherapie.*

De bovenstaande technieken zijn goed voor het detecteren van een collectief senescence/kanker/stemness signaal, maar ze zijn minder toereikend voor het detecteren van senescence subtypes. Met hoge resolutie intravital (2-photon) imaging kunnen we voor het eerst individuele senescente cellen bestuderen met behulp van reporter cellijnen. Ook kunnen we individuele kanker cellen volgen en bijvoorbeeld de interactie tussen senescente cellen en kanker cellen bestuderen. PET of SPECT zal worden gebruikt om de distributie of halfwaardetijd van een stof te bepalen. We zullen bijvoorbeeld een peptide labelen met een isotoop en zo met behulp van PET of SPECT bepalen welke organen het toegediende peptide opnemen. In een enkel geval kan een tracer gebruikt worden om het metabolisme van een tumor of weefsel te bepalen en zo te bepalen of deze een goede of slechte kandidaat is voor behandeling (en welk in gedeelte).

- *Bent u zich ervan bewust dat er aparte chirurgie nodig is voor de imaging window? Dit komt niet terug bij K. Classificatie van ongerief en bij I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen.*

Daar zijn we ons zeer zeker van bewust en daar denken we niet licht over. Op advies van de IvD hebben we bij 'K' het cumulatieve ongerief genoemd. Hoewel het een ingrijpende operatie is, is het ongerief tijdelijk en zal het cumulatieve ongerief niet hoger uitkomen dan nu beschreven. Bij de procedure wordt zowel anesthesie als analgesie toegepast.

Bijlage 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

- *De keuze voor het model dient nader onderbouwd te worden. Wat is het voordeel ten opzichte van andere verouderingsmodellen? Graag toelichten.*
De keuze voor een bepaald verouderingsmodel zal afhangen van de pathologie die we willen onderzoeken en de organen die veel senescence vertonen in elk specifiek model. We hebben bijvoorbeeld aangetoond dat de nieren van Trichothiodystrophy (TTD) muizen veel senescence vertonen en deze muizen hebben onder andere duidelijke verouderingssymptomen in de nieren, huid en spieren en zullen dus worden gebruikt voor onderzoek naar deze organen. Daarentegen hebben TTD muizen ook hun beperkingen, met name omdat ze ook relatief snel weer schade oplopen en omdat het een bepaalde reparatie-route is die is aangedaan. Als alternatief hebben we daarom twee andere concrete voorbeelden gegeven voor versnelde veroudering door DNA schade (Wrn en Blm)

en voor niet-DNA schade (Laminopathies). Deze hebben elk weer andere organen die zijn aangedaan. Verder vertonen muizen op een vet dieet veel senescence in de lever en hebben ze symptomen van diabetes. Dit model kan dus beter worden ingezet als leververoudering of diabetes willen bestuderen. De keuze voor een model zal dus gemaakt worden op basis van de verouderingspathologie die we willen bestuderen. Tenslotte zijn er de ziekte-specifieke modellen, zoals modellen voor ALS of andere vormen voor neurodegeneratie. Dit is een zeer dynamisch veld en er komen regelmatig nieuwe inzichten in welk model "beter" is. Daar houden we uiteraard rekening mee.

B. De dieren

- Met betrekking tot de weergave "senescence levels" vraagt de DEC zich af of kwantificering mogelijk is en hoe dan. Graag nader toelichten.
De hoeveelheid senescence wordt bepaald aan de hand van bioluminescentie, intravital imaging, of post-mortem weefselanalyse. In geval van het eerste wordt gebruik gemaakt van muismodellen die een senescence reporter bevatten. Het luminescentiesignaal kan gemeten worden op het IVIS systeem en geeft dus aan of een muis (subtypen van) senescente cellen bevat – afhankelijk van het type reporter. Omdat het signaal voor een vaste tijdsduur wordt gemeten in elke afzonderlijke muis, is de intensiteit van het luminescentie signaal een maat voor de hoeveelheid senescence (= senescence levels). Met intravital (2-photon) imaging kan in groot detail bepaald worden wat de hoeveelheid senescence is op een bepaalde locatie en tijdstip. Dit is zeer krachtig. Post-mortem kunnen we met reguliere immunocytochemie op sequentiele coupes, of via image-based mass cytometry op dezelfde coupes eveneens de hoeveelheid senescence/kanker/stemness bepalen.
 - IND-enabling assays zal onder GLP condities moeten en dan gelden andere criteria. Bent u hiervan op de hoogte?
Het grootste deel van de IND-enabling studies zullen we uitbesteden. We zijn van plan om zelf een aantal biodistributie proeven uit te voeren. In deze experimenten maken we bijvoorbeeld gebruik van isotoop of FITC gelabelde peptiden, waardoor we kunnen bepalen welke organen de peptiden opnemen. Voor deze metingen hebben we nog geen GLP omgeving nodig, omdat we eerst verschillende stoffen willen vergelijken en de stoffen die de beste distributie laten zien, zullen gebruiken voor verdere IND-enabling studies.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft meer dan voldoende samenhang. Het project is gericht op onderzoek naar het bestaan van verschillende (sub)types van senescence in diermodellen van veroudering en bij kanker. Senescente cellen zijn beschadigd in de mogelijkheid van celdeling en worden daardoor resistent voor fysiologische verwijdering/apoptose. Ze komen niet alleen voor bij veroudering of chronische ontsteking maar ook bij kanker. Op basis van recent onderzoek is gebleken dat de aanwezigheid van senescente cellen in tumoren kan leiden tot verergering van de aandoening en tot (chemo)therapie resistentie. Reeds eerder is vastgesteld dat verwijdering van senescente cellen in muizen (via genetische ablatie) leidt tot verlenging van de levensduur van de muis en verbeterde weefsel homeostase. De onderzoekers hebben als hypothese dat indien verschillende subtypes van senescente cellen inderdaad kunnen worden aangetoond de behandeling, hetgeen inhoudt het verwijderen van de senescente cellen, vraagt om specifieke behandeling gericht op het subtype dat is aangetroffen. Het project heeft derhalve naast een fundamenteel wetenschappelijk doel ook een translationeel doel namelijk verbeteren van de behandeling van symptomen van veroudering en van de behandeling van kanker. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen komt overeen met voorbeeld 1 uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project.'
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe wetenschappelijke doel van het project is onderzoek naar het bestaan van subtypes van senescence c.q. van senescente cellen in diermodellen van veroudering en bij kanker. Het uiteindelijke tevens translationele doel van het project, is verbetering van de behandeling van gevolgen van veroudering en van de therapie van kanker. Voor wat betreft behandelingsopties wordt gebruik gemaakt van peptidomimetica en met name de zgn. Cell Penetrating Peptides (CPPs) die worden ontworpen en gesynthetiseerd door de onderzoekers. De samenhang is evident, immers de onderzoeksfocus is het aantonen en verwijderen van (subtypes van) de senescente cel die voorkomt bij veroudering en bij kanker na chemotherapie. De DEC is derhalve van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel. Het targetten en verwijderen van senescente cellen bij veroudering en bij kanker wordt naar beste weten nog amper gebruikt in de klinische geneeskunde. Het onderzoek daaromtrent bevindt zich grotendeels in de preklinische fase. Gezien de goede verwachtingen is de DEC van mening dat het doel van dit onderzoek gerechtvaardigd is in de context van de visie dat behandeling van de gevolgen van veroudering en verbetering van de behandeling van kanker vooralsnog blijvend om aandacht vraagt.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de onderzoekers en het onderzoeksveld. Op de langere termijn spelen ook belangen van patiënten, die vragen om de meest effectieve en veilige behandelingsmogelijkheden voor de klinische gevolgen van veroudering en van kanker. De morele waarden die voor proefdieren in het geding zijn betreffen welzijn/stress en rechtvaardigheid door aantasting van welzijn en fysieke integriteit middels de handelingen die nodig zijn om de onderzoeksvragen te beantwoorden. De morele waarden die voor de onderzoekers gelden betreffen het verkrijgen van resultaten die publicabel zijn en mogelijk kunnen leiden tot patent/octrooi aanvragen voor succesvolle CPPs.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden. De onderzoeksgroep heeft jaren van vooronderzoek (zie publicaties) achter de rug en heeft daarbij onder meer aangetoond dat gezonde cellen niet worden beschadigd door de inwerking van CPPs. De DEC is van mening dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is qua strategie goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet, weergegeven in een flowchart, is op verzoek van de DEC voorzien van heldere go/no go momenten. Ook de uitkomst parameters zijn nader gespecificeerd en sluiten logisch aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak. Opzet en aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden in principe gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Echter tijdelijke individuele huisvesting zal worden toegepast indien "running wheel activity" bepaald wordt als parameter voor activiteit na behandeling. Muizen die snel verouderen en daardoor verzwakken kunnen agressief gedrag vertonen. Deze omstandigheid kan er toe leiden dat ze individueel gehuisvest dienen te worden.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het merendeel van de dieren, namelijk 75%, ondergaat matig ongerief, maximaal 10 % ernstig ongerief en 15% licht ongerief. De onderzoekers hebben in de categorie ernstig ongerief tevens meegenomen de muizen die t.g.v. de ingrepen overlijden voordat het humaan eindpunt wordt bereikt. Het ongerief van de muizen met het phenotype Veroudering worden door de onderzoekers ingeschat als matig vanwege het risico op co-morbiditeit.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek en mentaal aangetast. Mentale aantasting is vergelijkbaar met hetgeen zich voordoet bij mensen bij veroudering en bij patiënten tijdens behandeling voor kanker d.w.z., aantasting van welzijn, pijn, stress, gedrag, conditie/activiteit etc. Fysieke aantasting omvat operatie en anaesthesie, injecties en bloedafnames, imaging procedures, groei van (subcutane) tumoren.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlagen goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Zie ook punt C11.

3V's

14. Uitgebreid (in vitro) vooronderzoek van de onderzoekers heeft ertoe geleid dat nu een aantal peptidomimetica geselecteerd en voorhanden zijn om in vivo onderzoek te doen naar werkzaamheid en effectiviteit. Vooralsnog is er geen ex vivo alternatief voorhanden voor dit onderzoek. De aanvrager heeft dit voldoende duidelijk gemaakt.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie met go en no-go criteria en momenten om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Elk nieuw CPP zal eerst in een pilot worden getest met een beperkt aantal dieren alvorens de finale proef te doen. Waar mogelijk worden parallelle studies gedaan om het aantal benodigde controle groepen te beperken.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De pilots met een beperkt aantal proefdieren die worden ingezet bij het uittesten van nieuwe CPPs worden ook gebruikt om het protocol van behandeling te verfijnen hetgeen de kans op succes verhoogt en bijdraagt aan een beperking van het aantal benodigde dieren.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Het betreft preklinisch innovatief onderzoek in de frontlinie van het wetenschapsgebied.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De onderzoekers geven aan ernaar te streven om dieren van beide geslachten in " een goede mix " in te zetten voor het onderzoek.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood zulks om post mortem onderzoek te kunnen doen. Een deel van de uitkomstparameters kan pas na de dood van het dier worden verzameld. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment voor postmortem onderzoek.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk onderzoek naar het voorkomen van subtypen van senescentie c.q. senescente cellen bij veroudering en bij kanker, inclusief onderzoek naar de op het subtype van toepassing zijnde behandeling middels nieuwe Cell Penetrating Peptides (CPPs), de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met naar schatting licht (15%), matig (75%) en ernstig (maximaal 10 %) ongerief.
Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat inzicht is verkregen in het bestaan van subtypes van senescente cellen die verwijderd kunnen worden door een op het subtype toegesneden behandeling met CPPs. Deze relatief nieuwe benadering zal bij een succesvol verloop er toe leiden dat vervolg onderzoek nodig zal zijn om de translatie naar de klinische geneeskunde te maken. Voor wat betreft toepassing in de kliniek kan gedacht worden aan de behandeling van symptomen van veroudering, gebruik bij behandeling van chronische ontsteking en als adjuvant therapie bij kankerpatiënten met chemotherapie. Het is mede op grond van het vooronderzoek van de onderzoekers en nog beperkte meldingen in de literatuur aannemelijk dat zowel de fundamentele als translationele doelstelling behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor de individuele

onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat dit onderzoek niet alleen van wetenschappelijke waarde is maar ook een substantieel maatschappelijk belang dient, namelijk uitzicht op behandeling van symptomen van veroudering en van verbetering van de behandeling van patiënten met kanker. Wetenschappelijke waarde en maatschappelijk belang samen wegen op tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de muizen. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus..

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

10.1 c en 10.2 g

Postbus 80125

3508 TC Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Referentie

Aanvraagnummer

AVD1150020198344

Datum 27 september 2019

Betreft Besluit aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.1 c en 10.2 g

Op 14 juni 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Targeting Senescence against Cancer and Aging" met aanvraagnummer AVD1150020198344. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw aanvraag af. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna de Wet) niet is toegestaan het project "Targeting Senescence against Cancer and Aging" te starten. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen. Wij kunnen ons om onderstaande redenen niet vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (DEC) DEC Utrecht. Dit advies is ontvangen op 15 augustus 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de Wet.

Overwegingen

Wij kunnen ons om onderstaande redenen niet vinden in de inhoud van het advies van de DEC.

Doelstellingen te breed en onvoldoende samenhang

Conform artikel 10a2, tweede lid sub a van de Wet beoordeelt de CCD de doelstelling van het project. De uiteindelijke doelen zijn in het projectvoorstel als volgt beschreven: "*The main goal for this proposal is to test new therapies against senescence (subtypes) in mouse models for age-related pathologies and for cancer with the aim to generate new treatment options for humans.*"

De CCD is van oordeel dat deze doelstelling te breed is geformuleerd, waardoor niet wordt voldaan aan de definitie van een project conform artikel 1 sub b van de wet. In tegenstelling tot de DEC is de CCD van oordeel dat de relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen niet overeenkomt met voorbeeld 1 uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project', maar met voorbeeld 4A. Het hoofddoel is zeer ruim omschreven en de subdoelen zijn elk zelfstandige onderzoeksvragen. De onderlinge samenhang tussen de subdoelen is in de ogen van de CCD dermate beperkt dat de bijbehorende proeven in grote mate als onafhankelijke projecten gezien moeten worden. Derhalve beschouwt de CCD uw aanvraag als een breed

onderzoeksprogramma en niet als een individueel toetsbaar onderzoeksproject. Dit is één van de voornaamste redenen om de aanvraag af te wijzen.

Haalbaarheid project

De CCD is, in tegenstelling tot de DEC, niet overtuigd van de haalbaarheid van de aanvraag. Op voorhand bestaan nog veel onzekerheden betreffende de invulling en praktische uitvoering van het project. Zo worden in de aanvraag voorbeelden van mogelijke diermodellen en therapieën aangehaald, maar zijn er nauwelijks concrete startpunten en keuzecriteria benoemd. Zodoende is het voor de CCD niet navolgbaar hoe het verloop in het project zal zijn en valt onvoldoende te beoordelen of de doelstellingen van het project inderdaad binnen de aangevraagde looptijd behaald kunnen worden.

Onvoldoende informatie

Artikel 3, derde lid, van de Dierproevenregeling 2014 vereist dat de aanvrager voldoende informatie bij de aanvraag verstrekt om aan te kunnen tonen dat voldaan wordt aan de in de Wet gestelde eisen. De CCD is echter van mening dat de experimentele opzet voor de verschillende dierproeven niet voldoende is beschreven om hierover te kunnen oordelen.

Anders dan de DEC is de CCD van oordeel dat de keuzecriteria voor de go-/no-go momenten niet helder zijn omschreven. Met name op het gebied van de ontwikkeling en selectie van diermodellen (go/no-go moment 2 en 3), hier worden vaak enkel voorbeelden genoemd van mogelijke selectiecriteria. Ook bij go/no-go moment 4, waarin therapieën geselecteerd zullen worden voor meer uitgebreide in vivo experimenten, is onduidelijk wat men onder een 'goed resultaat' verstaat in een pilot en op basis waarvan andere modellen geselecteerd zullen worden om de compounds additioneel in te testen.

In tegenstelling tot de DEC, is voor de CCD niet navolgbaar waarop het aangevraagde aantal dieren is gebaseerd. De CCD mist de onderbouwing voor het aantal te testen groepen/modellen en de groepsgroottes. Hierdoor is op basis van de beschikbare informatie, voor de CCD, niet te beoordelen of het aantal aangevraagde dieren realistisch is ingeschat voor het behalen van de doelstellingen en of er aan de vereisten van vermindering is voldaan.

Naar oordeel van de CCD zijn de mogelijkheden tot verfijning, met name in bijlagen dierproeven 3.4.4.2 t/m 3.4.4.5, onvoldoende uitgewerkt. Doordat handelingen aan de dieren niet specifiek worden benoemd, kan de CCD niet beoordelen of aan de vereisten van verfijning is voldaan. Er wordt bijvoorbeeld niet beschreven hoe lang dieren individueel gehuisvest zullen worden voor de metingen van activiteit en fysieke gesteldheid. Het maximaal aantal imaging-momenten per dier is niet op voorhand vastgelegd. Hetzelfde geldt voor de collectie van bloed, urine en uitwerpselen. Ook zijn de specifieke handelingen voor aan het plaatsen van een imaging-window niet beschreven.

Niet toetsbare aanvraag

Conform artikel 10a lid 7 en artikel 10a2 tweede lid sub d van de Wet maakt de CCD een analyse van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachten resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. De aanvraag als geheel bevat een grote mate van onzekerheid, doordat op voorhand niet benoemd wordt welke subtypes en biomarkers van senescence zullen worden onderzocht en welke nieuwe subtype-specifieke behandelingen zullen worden onderzocht. Ook zijn de keuzecriteria, te gebruiken diermodellen en uit te voeren handelingen onvoldoende specifiek benoemd. Om deze redenen is het voor de CCD niet navolgbaar of het ongerief voor de proefdieren realistisch is ingeschat. Omdat daarnaast de haalbaarheid van de aanvraag onvoldoende te beoordelen is, is het maken van een zorgvuldige schade en baten analyse door de CCD niet mogelijk.

Voorts heeft de CCD er hierboven op gewezen dat uit het projectvoorstel onvoldoende blijkt of aan de vereisten betreffende verminderingen en verfijning is voldaan, zoals gesteld in artikel 1d van de Wet.

Op grond van het bovenstaande komt de CCD, in tegenstelling tot de DEC, tot de conclusie dat de aanvraag niet toetsbaar is.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

drs. F. Braunstahl

10.2 .e. en g

Bijlagen

- Weergave wet- en regelgeving
- DEC-advies

Weergave wet- en regelgeving

Wet op de Dierproeven, artikel 1 sub b.

1 Voor de toepassing van het bij of krachtens deze wet bepaalde wordt verstaan onder:

b. project: een werkprogramma met een welomschreven doel dat een of meer dierproeven omvat;

Wet op de Dierproeven, artikel 1d.

1 Een dierproef wordt slechts verricht wanneer het beoogde resultaat niet kan worden bereikt door middel van een wetenschappelijk verantwoorde methode of onderzoeksstrategie waarbij geen levende dieren worden gebruikt.

2 Het aantal dieren dat in projecten wordt gebruikt, wordt tot het minimum beperkt zonder dat de doelstellingen van het project in gedrang komen.

3 Het fokken, de huisvesting en de verzorging van dieren en de in dierproeven gebruikte methoden worden verfijnd, zodat elke vorm van pijn, lijden, angst en blijvende schade die de dieren kunnen ondervinden, wordt voorkomen of tot het minimum wordt beperkt.

4 Indien er een keuze tussen methoden als bedoeld in het eerste lid mogelijk is, vindt de keuze plaats overeenkomstig artikel 10, tweede lid.

Wet op de Dierproeven, artikel 10a, lid 1.

Het is verboden een project uit te voeren indien de centrale commissie dierproeven daarvoor geen projectvergunning heeft verleend.

Wet op de Dierproeven, artikel 10a, lid 3.

De centrale commissie dierproeven komt tot een oordeel over een projectvoorstel na advies van een op grond van artikel 18a erkende dierexperimentencommissie en op grondslag van de artikelen 2, tweede en derde lid, 9, 10, 10a2, 10a4, 10b, 10d tot en met 10h, 11, 13 en 13f.

Wet op de Dierproeven, artikel 10a, lid 7.

De beoordeling van een project vindt plaats in een mate van uitvoerigheid die past bij het soort project en nodig is om te beoordelen of het project voldoet aan de in artikel 10a2 genoemde criteria.

Wet op de Dierproeven, artikel 10a2.

1 De centrale commissie dierproeven verleent slechts een projectvergunning voor een project indien:

a. het project vanuit wetenschappelijk of onderwijskundig oogpunt verantwoord of wettelijk vereist is;

b. de doeleinden van het project het gebruik van dieren rechtvaardigen;

c. het project zo is opgezet dat de dierproeven zo humaan en milieuvriendelijk mogelijk kunnen worden uitgevoerd; en

d. het project is opgezet overeenkomstig artikel 9.

2 De projectbeoordeling omvat in het bijzonder:

a. een beoordeling van de doelstellingen van het project en de voorspelde wetenschappelijke opbrengsten of educatieve waarde;

b. een beoordeling van de vraag of het project in overeenstemming is met artikel 10;

c. een beoordeling van de indeling van het project naar de ernst van de dierproeven;

d. een analyse van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu;

e. een beoordeling van de motivering waarom wordt afgeweken van het bij of krachtens de artikelen 1e, eerste lid, 10e, tweede tot en met het vierde lid, 10f, eerste en vierde lid, 10g, eerste lid, 10h, eerste lid, 11, eerste lid, 13, derde lid, 13c, tweede lid, bepaalde, dan wel van de redenen, bedoeld in artikel 13f, tweede lid, onderdeel f;

f. een besluit over de vraag of, en zo ja wanneer, het project achteraf moet worden beoordeeld.

3 Wanneer op grond van artikel 10a1, eerste en derde lid, is besloten dat het project achteraf wordt beoordeeld, beoordeelt de centrale commissie dierproeven na advies van de dierexperimentencommissie die eerder advies heeft gegeven over het projectvoorstel, aan de hand van de door de gebruiker ingediende documentatie die de centrale commissie dierproeven heeft aangegeven, de volgende aspecten:

a. of de doelstellingen van het project werden bereikt;

b. de schade die de dieren hebben ondervonden, met inbegrip van de gebruikte aantallen en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven; en

c. eventuele elementen die kunnen bijdragen tot het verder in praktijk brengen van artikel 10.

Dierproevenregeling 2014, artikel 3, lid 3.

Bij de aanvraag verstrekt de aanvrager die informatie die nodig is om, voor zover relevant, aan te tonen dat wordt voldaan aan de regels gesteld bij of krachtens de artikelen 2, tweede en derde lid, 9, 10, 10a2, eerste lid, 10b en 13f van de wet. De aanvraag bevat in ieder geval de volgende gegevens:

- a. het belang als bedoeld in artikel 2, tweede en derde lid, van de wet waarop de dierproeven in het project gericht zijn;
- b. de doelstellingen van het project en de voorspelde wetenschappelijke opbrengsten of educatieve waarde van het project, of het wettelijk vereiste als bedoeld in artikel 10a2, eerste lid, onder a, van de wet;
- c. een beschrijving van de dierproeven, waaronder de beoogde behandeling van de dieren en de aard, de frequentie en de duur van de ingrepen waaraan het dier wordt onderworpen;
- d. de gebruiker die het project uitvoert;
- e. de persoon of personen die verantwoordelijk zijn voor de algemene uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met verleende projectvergunning;
- f. in voorkomend geval de inrichtingen waar het project zal worden uitgevoerd;
- g. indien van toepassing, de motivering bedoeld in artikel 10a2, tweede lid, onder e, van de wet;
- h. de gegevens opgenomen in bijlage 4 bij deze regeling.



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. University Medical Center Utrecht
- 1.3 Provide the title of the project. Targeting Senescence against Cancer and Aging

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Note: For a list of definitions and general background information, please see the text at the bottom of this section.

Targeting senescence against age-related pathologies

Due to physical decay and the associated development of one or more age-related diseases human healthspan declines over time (EU health indicators). Average global population age is on the rise, but many of these extra years are thus spent in poor health¹. This poses a growing individual, social and economic challenge for the future. For long, individual pathologies as frailty, cardiovascular diseases, dementia and cancer have been investigated individually. More recently, attention has gone to targeting the root of the majority of these problems, which is the aging process itself. In order to counter the negative consequences of organismal aging, it is important to understand the molecular and cellular basis first.

Each day, the cells in our bodies accumulate damage. This is largely repaired, but as with rust development on equipment, more and more is left behind over time². This can cause cells to become "senescent". Cellular senescence is a state of irreversible cell cycle arrest and, as such, senescence prevents the proliferation of damaged and transformed cells rendering it a potent tumor suppressive mechanism³. However, senescent cells are highly apoptotic resistant and secrete a multitude of factors. This Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) consists of (matrix-degrading) proteases, growth factors and pro-inflammatory cytokines that permanently interfere with signaling of their microenvironment⁴. Injection of senescent cells in young mice caused senescence in distant organs and accelerated aging⁵, establishing the SASP as bona fide driver of aging. Moreover, the genetic ablation of senescent cells in aged mice could prolong their healthspan⁶ and, to an extent, even restore tissue homeostasis⁷. Thus, senescent cells are a direct cause for aging and a range of age-associated health problems in vivo and their therapeutic removal poses a tremendous opportunity to improve healthspan of the elderly by targeting multiple problems at once.

Targeting senescence against progression, metastasis formation and therapy resistance in cancer

Another area where senescence plays a very important and validated role is that of cancer. Senescent cells have been shown to enhance cancer progression, metastasis formation and therapy resistance of late stage tumors (⁸ and unpublished by our group). Therapy resistance of metastatic lesions is the main cause of death of the majority of patients suffering from irresectable cancer, especially if this occurs in metastatic tumor cells. Therapy resistance may arise through both acquired genetic mutations and non-genetic mechanisms in cancer cells. Furthermore, the tumor micro-environment has a decisive role in whether a therapy will be successful. Chemo- or radiotherapy may alter this environment in favor of tumor growth and

metastasis formation. Overall, new treatments are required that target cancer cells without negatively affecting healthy tissue, or target unfavorable properties of the microenvironment. Ironically, it was found that chemo- and radiotherapy can trigger senescence and the SASP in vivo, which, in turn, were found to promote cancer growth, migration and therapy resistance⁹. This is indeed caused by the senescent cells, as co-injection of tumor cells with senescent, but not with non-senescent, cells cause a tremendous expansion of tumor growth and migration¹⁰. Also here, the opposite experiment showed that senescence clearance is favorable as the genetic ablation of the senescent cells that form after chemotherapy-exposure proved to inhibit metastasis formation in distant organs⁸. In addition, malignant cancer cells that have undergone chemo-/radiotherapy, but failed to die from it can develop senescence markers which makes them more metastatic and therapy resistant (our unpublished data). **Due to mutations in cell cycle arrest genes, cancer cells typically do not undergo a senescence-associated growth arrest.**

10.1 c en 10.2 g

[REDACTED], we now observe there to be several subtypes. We are working on better terminology to define the types of cells that our various classes of subtype-targeting drugs can eliminate. This project will be a major component of defining such terminology as it will be important to observe -and target0 these subtypes against various types of diseases in vivo. In conclusion, while chemotherapy targets cancer cells, it also induces (subtypes of) senescence in the tumor microenvironment and the surviving cancer cells and thereby ironically promotes treatment resistance.

In addition to enhancing the cancer progression free or overall survival, the majority of anti-cancer therapies -unfortunately- also induce off-target effects that impair the health of cancer patients. Therapeutic removal of senescent cells in mice exposed to varying types of chemotherapy performed substantially better^{7,9}. In other words, aside from posing a benefit against cancer progression, metastazation and therapy resistance, anti-senescence therapies are also attractive against chemotoxicity. This can be studied in parallel to investigating the on-target effects of the therapies on cancer.

Additional unique aspects to this proposal: senescence heterogeneity and the role of subtypes of senescence in different health problems

Thus far, most research has considered cellular senescence as one phenotype. However, there now is substantial evidence for heterogeneity in senescence phenotypes and the existence of specific senescence subtypes, which likely contribute to individual diseases and stages of cancer development (Unpublished and¹¹). Instead of developing a one-size-fits-all anti-senescence

therapy, it is much more important to develop tailored therapies that specifically target a subtype of senescence. *In vitro* there is evidence for the existence of such subtypes and the usefulness of individual therapies (our unpublished data). It is therefore all the more relevant to investigate both *in vivo*.

In conclusion, the weak spots of the various senescence pathways are ideal drug candidates in the quest to improve healthspan at old age and to overcome cancer therapy resistance. *In vitro pilot experiments indeed confirmed such therapies are feasible.* *In vivo* follow-up is now the necessary next step before clinical translation is feasible.

Based on these key pieces of background information, and as highlighted in more detail below, the scientific goal for this project proposal is to investigate the role of senescence in cancer and aging. By extrapolation, the translational goal is investigate and optimize the translational potential of new therapeutic options to target senescence and senescence-like cancer cells.

Definitions

Senescence: A permanent state of growth arrest, often associated with a persistent secretory phenotype, called the SASP³. Senescence can be invoked in cells that experience irreparable damage. There are four key observations senescence that are the basis this project proposal:

- 1) Genetic ablation of senescent cells extends lifespan and healthspan in fast aging¹² and naturally aging mice⁶.
- 2) Chemotherapy can trigger senescence in healthy tissues *in vitro* and *in vivo*, associated with a loss of function. Removal of senescent cells counteracts these deleterious effect⁸.
- 3) Chemotherapy can trigger senescence in cancer cells that survive the treatment (unpublished by our lab and¹³).
- 4) Senescent cells can trigger a stem-like response in neighboring cells, which in case of cancer promotes the development of cancer stem cells^{2,14,15}. Removal of these cells lowers pluripotency¹⁴

The SASP: Senescence-associated secretory phenotype¹⁶⁻¹⁸. The low-level, but persistent, secretion of (mostly) pro-inflammatory chemokines, cytokines, metalloproteases and growth factors by senescent cells. Injection of senescent cells into the fat of young mice causes aging in muscle and other distant organs^{5,19}. Thus, through the SASP, senescent cells are a direct cause for aging. Common SASP factors include the interleukins IL1, IL6 and IL8, the growth

factors IGFBP1/7, FGF, HGF, the Matrix Metalloproteases MMP1 and MMP3 and factors as TGFβ. Of course, these are not just regulated by senescent cells, but they are part of a SASP response.

DNA-SCARS: DNA **S**egments with **C**hromatin **A**lterations **R**einforcing **S**enescence. Persistent DNA damage foci only found in senescent cells – unlike smaller DNA damage foci found in acutely damaged cells²⁰. DNA-SCARS fuse with PML bodies in senescent, but not in acutely damaged, cells. This is a hallmark of senescence.

[REDACTED] 10.1 c en 10.2 g [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Summary of why these definitions are important and what we can do with the current lead compounds: 1) Break the TP53-FOXO4 interaction. 2) This dissociated the DNA-SCARS. 3) This eliminates senescent cells. This restores tissue function in mouse models for chemotoxicity and aging in vivo. For the evidence hereof, please see²⁶.

The most prominent class of compounds that will be investigated in the here proposed in vivo experiments are cell penetrating peptides (CPPs). CPPs have several benefits over e.g. small molecule inhibitors. Examples are:

- In contrast to small molecule inhibitors, CPPs are in theory able to bind larger domains within a protein. Thus, more complex protein interactions can be targeted.
- CPPs are able to inhibit specific protein-protein interactions without interfering with other functions or interactions of these proteins.
- When a base peptide proves to sufficiently bind a target protein, many variations can be produced to optimize interactions and biological effects. 10.1 c en 10.2 g [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

10.1 c en 10.2 g [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]. In addition, comparable CPPs have been successfully tested in the clinic, such as CPPs targeting the JNK kinase (clinical trial nr: NCT02561091).

De sequences and mode of action of our newly designed peptides that we expect to test in the proposed experiments are confidential.

General background information regarding our work and ambitions to progress anti-senescence therapies against cancer and aging towards the clinic:

Dokters van Morgen (Dutch):

https://www.youtube.com/watch?v=T0wvT_aK3H4&feature=youtu.be

RTL Late Night (Dutch):

https://www.youtube.com/watch?v=b_qmmKWuWWQ

Volkskrant - 1 year cover story (Dutch; also in English):

<https://www.volkskrant.nl/wetenschap/het-rotterdamse-experiment-met-de-muis-die-113-werd~bb29695a/>

Betweter Festival Tivoli Utrecht (Dutch):

https://www.youtube.com/watch?time_continue=4&v=6lce_YXX0rA

Aljazeera international (English):

<https://www.aljazeera.com/news/2018/05/dutch-scientists-test-anti-ageing-molecule-180520121659236.html>

Vrij Nederland (Dutch):

<https://www.vn.nl/langer-leven/>

KWF Kankerbestrijding (Dutch):

<https://www.kwf.nl/onderzoek/welk-onderzoek-krijgt-geld/Pages/Onderzoeker-van-de-week-Peter-de-Keizer.aspx>

TEDx talk (English):

<https://www.youtube.com/watch?v=HBhOooiAels>

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main goal for this proposal is to test new therapies against senescence (subtypes) in mouse models for age-related pathologies and for cancer with the aim to generate new treatment options for humans.

To address the scientific and translational goals, the project is broken down into the following subgoals and their respective objectives:

Subgoal 1: Understanding when and where particular subtypes of senescence form, in order to better understand their individual role in disease development. Objectives:

1a. Investigate and follow how (different subtypes of) senescence and senescence biomarkers develop in mouse models for accelerated and natural aging (Progeria models, DNA-repair deficient models and diet/treatment-induced aging models). Appendix 1+2.

1b. Investigate and follow how (different subtypes of) senescence and senescence biomarkers develop in mouse models for cancer progression, metastasis formation and therapy resistance. Appendix 3-5.

Subgoal 2: Understanding when specific anti-senescence (subtype) drugs are effective, and when not, against senescence-associated pathologies in aging and cancer. This is a major requirement before moving towards clinical translation. Objectives:

2a. Determine the efficacy of in vitro verified anti-senescence (subtype) drugs against aging and senescence-driven pathologies *in vivo*, such as physical decline, organ dysfunction, musculoskeletal dysfunction, frailty and certain forms of neurodegeneration. Appendix 1+2.

2b. Determine the efficacy of in vitro verified anti-senescence (subtype) drugs against chemotoxicity and, separately, against cancer progression, metastasis formation and therapy resistance. Appendix 3-5.

Features of senescence and the SASP can be induced *in vivo* by a variety of treatments, including cancer therapies - irrespective of the cancer type (our unpublished data and ²⁷). In addition, *in vitro* results indicate that anti-senescence therapies are broadly effective against cells that survive therapy in general, rather than being limited to a particular cancer subtype (our unpublished data). Similar to the recently FDA-approved immunotherapies, which have a broad target application, anti-senescence drugs can also be broadly applicable against a range of tumor types. We envision to find five new senescence subtypes for which we will develop unique subtypes-targeting peptidomimetic drugs. These will be extensively explored *in vitro* to see for which subtype they are, and for which they are not, effective. We expect the senescence subtype drugs to also show efficacy against a variety of tumor types. Once this is determined as much as possible *in vitro*, then, within reason and according to the strict go-/no-go schedule below,

these particular drugs will be tested against a those cancers in vivo (rather than just one particular type) under this application.

Feasibility - personnel

The proposal is meant to translate drugs that are under development for the benefit of patients suffering from a variety of pathologies. As such, it is vital part of several independent, but related, projects in our lab. We have several (senior) personnel on these to make sure the ambitions are feasible. At the moment, the grants/personnel include, next to primary funding/personnel:

- 1) A Dutch Cancer Society grant (**1x postdoc and 1x PhD student**). Here we investigate the causes of therapy resistance to chemo-radiotherapy. Therapy resistant cells can develop senescence-features and our drugs are very potent against these therapy-resistant cells in vitro. This poses a very exciting opportunity for in vivo translation and eventually the initiation of clinical trials (see <https://www.kwf.nl/onderzoek/welk-onderzoek-krijgt-geld/Pages/Onderzoeker-van-de-week-Peter-de-Keizer.aspx>). This is a grant solely awarded to our group.
- 2) A KiKa grant (**1x postdoc at UMCU**). Here we closely collaborate with the LUMC (1x group leader and 1x postdoc) on targeting congenital melanocytic nevi in children. These very often develop into melanoma and the ambition is to prevent this from happening by eliminating the - senescent- NRAS mutated nevi. At UMCU we would essentially do all the mouse work, focused on NRAS/BRAF mutant nevi and melanoma.
- 3) An EU COFUND grant together with the UU (**1x PhD student at UMCU**). Here, we collaborate with the veterinary pathology department of the UU to study the interplay between senescence and (induction of) stemness in surrounding cells. The goal is to see whether anti-senescence therapy can overcome the loss of tissue rejuvenation at old age. At UMCU, we would study the influence of anti-senescence subtype drugs on for instance liver regeneration in old vs. young mice, as well as the effects on hepatocellular or other types of liver cancer.
- 4) A ZonMW/Health Holland Grant together with LUMC/UMCG (**1x postdoc, 1x PhD student and 1x technician still to be appointed at UMCU**). This is part of a very large Dutch consortium of the Dutch Society for the Research on Aging. We mostly collaborate with UMCG/ERIBA on de development of new biomarkers of (subtypes of) senescence and the novel generation of peptidomimetics to eliminate these subtypes, similar to what we have shown before for FOXO4-p53 peptides, effective against one such subtype in vivo⁷. At the UMCU, we will test the senescence subtype drugs in the various senescence-detection and diseases models for musculoskeletal dysfunction and neurodegeneration. These would, in part, be imported from UMCG.

6) Department support. During peak moments, we can rely on other technicians at the Center for Molecular Medicine to aid (which we would do in return as well). This ensures we can perform with sufficient manpower for key moments in the experiments, such as during major operations/imaging or at moments of sacrifice when various tissues are to be collected.

Feasibility – Technological experience and scientific know-how

Not only in terms of personnel do we deem these plans feasible, but also in terms of our technological experience and scientific background. We published in vitro and in vivo data on senescence in models for chemotoxicity and both accelerated and fast aging^{24,26,28}. We now also obtained a range of in vitro evidence on the molecular hallmarks of senescence and the potency of new anti-senescence drugs. Thus, we possess the technological skills to perform the experiments, plus we gathered ample scientific know-how to make educated decisions on when to proceed and when not to (see also the go-/no-go decision moments in the schedule below) and the above-mentioned objectives are therefore, in principle, achievable. For instance, others and we have shown that senescence can be targeted in vivo and functional healthspan measures can be determined in models for age-related pathologies as well as models for cancer^{2,8,29}. Indeed, we master the required technology and have expanded our laboratory resources such that we have ample of personnel to lead and assist with the in vivo experiments. In addition, we have access to facilities that are required. More specifically, we are experienced with in vivo imaging (IVIS, CT) and functional aging-related assays, as well cancer-related assays in mice. All experiments will be performed by well-trained staff and optimized protocols are used to minimize the number of animals..

Path towards achieving the project objectives

To achieve the above mentioned, we have separated the experiments in five appendices, all of which contain a preliminary part during which model selection/optimization and pilot experiments will be performed.

For the aging-related projects, clinically relevant mouse models will be employed to determine the efficacy of novel treatment strategies. There are too many options and we may need some

flexibility to incorporate new models based on proceeding scientific knowledge. For now, we envision these mouse models to be included:

Appendix 1a) Accelerated aging. These will primarily contain the Nucleotide Repair-deficient model based on the syndrome "Trichothiodystrophy"(TTD)^{30,31}, which we have used before⁷. A second syndrome for which we expect favorable effects is based on Werner's syndrome (Wrn), which shows DNA damage-associated senescence, and we therefore also ask permission to use the Wrn progeria model. DNA damage can lead to senescence, especially in these mentioned pathologies, hence the choice for such models. Nonetheless, we would also need to test NON-DNA damage models for progeria. To this extent, Laminopathy-models (Progerin/ZMSTE)³² are often used. Laminopathies are diseases in which the nuclear lamina is fragile, leading to micronuclei and activation of the cGAS-STING pathways, which activates the SASP³³. Vice versa, loss of the nuclear lamina was shown to lead to senescence and LMNB1 loss is now one of the most potent senescence markers^{34,35}. We and others have shown before that these are valid senescence models^{26,36} and it makes sense to start with such models for new anti-senescence compounds.

Of course, we do not envision to use all models in parallel. Rather, we would employ stringent selection criteria to determine which model to start with. These include A) Investigation of which tissues are affected and phenotypes can be measured for improvement (most likely through readily existing tissues / blood samples), and B) to determine level and the subtype of senescence and stemness in those tissues. Then, within reason, different models can be used. But also we prefer to stick with a limited number.

As an illustrative example, we are most familiar with the TTD model and know its pros and cons for studying aging. It is a relatively slow progeria model with a lot of senescent cells. Therefore, anti-senescence can quite effectively be investigated. TTD is suitable for studying aging of the hair/skin, kidney, and some aspects of the musculoskeletal system. However, by far not all effects of aging were visible at least in the C57BL/6 background. So, we would include a version in the FVB background (no breeding with discomfort involved) and would explore secondary models. Candidates include models for Wrn³⁷, Xpg³⁸ or the like. Exploratory work would precede in vivo experiments.

Separately, we will explore the suitability of Progerin/ZMSTE, as one of the few NON-DNA damage-based progeria models³⁶.

Appendix 1b) Models for specific age-related pathologies, most notably musculoskeletal disorders as sarcopenia/cachexia³⁹ **10.1 c en 10.2 g**

10.1 c en 10.2 g. For musculoskeletal aging, we are part of a large consortium focused on

targeting senescence here. For this, we, and others, have evidence senescence is elevated (unpublished data) and in vitro experiments suggest a link with the disease phenotype. 10.1 c en 10 2 g

[REDACTED]

Appendix 1c) Naturally aging mouse models. These will be used to assess effects on aging as a whole as we have also done before for earlier drugs (²⁶ and mainstream media items above).

Appendix 2) Treatment-induced senescence. These models (can) include diet-induced senescence, such as high-fat/high-sucrose (western diet)-based models⁴², ischemia-reperfusion injury^{43,44}, for which we (unpublished) and others have shown senescence to be induced in for instance fat, kidney or liver. IRI mimics the tremendous problem of organ transplantation. High fat/sucrose diet causes senescence in adipose tissue^{45,46}. This, in turn, leads to elevated chances of cancer progression⁴⁶ and a metabolic syndrome⁴². Last, chemotherapy can induce senescence in (amongst others) heart, liver, kidney^{8,26}. In all these cases, the stimulus poses a common problem to human healthspan and was shown to induce senescence. Removal of (the right subtype of) senescence could thus pose tremendous health benefits.

For the cancer-directed part of this project, we will make use of the following models:

Appendix 3) Primary tumor models. Here we will transplant established cancer cells, 3D organoids or patient derived xenografts (PDX), e.g. for colorectal carcinoma, Glioblastoma multiforme, mammary carcinoma or melanoma). These will be grafted at their respective relevant site. This means breast cancer cells will be injected into the mammary fat pads, colorectal carcinoma in the intestine/colon, glioblastoma would be injected intracranially and melanoma would be placed subcutaneously to induce a primary tumor.

Appendix 4) Metastases models. Here, the cells would be injected into the tail vein or the spleen to promote accelerated metastasis formation – and then to study whether our anti-senescence drugs counter this from happening.

Appendix 5) Genetically Engineered Mouse Models (GEMMs). These will primarily be used to study oncogenic NRAS/BRAF-driven melanoma^{47,48}, malignant glioblastoma, late stage

colorectal carcinoma (APC, TP53, KRAS, SMAD4 mutant)⁴⁹ and mammary carcinoma (invasive lobular carcinoma⁵⁰.

In all experiments we will make use of the standard strains of mice: mainly C57BL/6j (and to a lesser extent FVB or Balb/c), or, in case of the immune compromised models NOD/SCID-gamma. Where mentioned, we will make use of senescence reporters in these (in the C57BL/6j models). These are used to temporally and spatially evaluate the effect of the therapeutic anti-senescence intervention.

For these models, we would rely on clinically relevant procedures to mimic the most relevant scenario for the patient population at risk. Here we will closely collaborate with clinicians and make sure the protocol we employ in vitro and in vivo are similar to what is used in the clinic – and where resistance occurs to. 10.1 c en 10.2 g

[REDACTED]

For melanoma, we would study mainly resistance to BRAF/MEK inhibition as this is clinically still the most problematic and we have ample of in vitro evidence that our compounds can overcome this resistance. Also here other drugs are becoming more relevant nowadays, such as CDK4/6 inhibitors and we would prefer to incorporate how our drugs may counter resistance to these as well. In this scenario also models for senescent naevi (moles) will be studied as part of a larger consortium grant on (childhood) naevi (KiKa; see above).

For colorectal carcinoma, we would rely on existing “tumor progression organoids” (TPOs) and patient-derived organoids to be implanted in the colon/intestine, where we would study the ability of anti-senescence drugs to overcome resistance to the main therapy 5-FU, of course with the option of expanding this to other relevant types of therapy.

Such techniques are established at the UMC Utrecht. Cancer growth and metastasis formation will be closely monitored using several imaging techniques. The technology and knowledge is available at the UMC Utrecht to perform these techniques. Furthermore, our research group has collaborations with other departments in the UMCU, as well as departments in other institutes,

giving us access to other cancer models and senescence reporter models as part of larger consortia we are part of (ZonMW/Health Holland; see above).

Our research group and the associated department have expertise in senescence research as well as extensive knowledge on multiple cancer types. Research lines are ongoing that are focused on melanoma, breast cancer and colon cancer, and on general processes relevant in a broad spectrum of cancers. Altogether, this allows for quick optimization of the employed *in vivo* models and reliable interpretation of the results.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Scientific relevance

The hallmarks of cellular senescence are still not fully understood. Whereas the definition "senescence" is often used as if this is one clear phenotype, we have evidence of the existence of subtypes. The *in vitro* experiments that precede this *in vivo* project will help understanding the molecular biology causing these subtypes. Moreover, *in vitro* experiments will aid in understanding how senescent cells may affect neighboring cells through their secretory phenotype. The subsequent goals of the current *in vivo* project is to get a better understanding in how senescence subtypes originate during aging/age-related diseases and cancer (treatment) and how these drive disease phenotypes by modulating neighboring cells.

More specifically, we envision to gain the following insights from this project:

- 1) An understanding -within reason- of which senescence subtypes form where and when (a) during the aging process and as (b) a consequence of cancer progression and anti-cancer treatment. Such knowledge is very relevant and desirable in order to develop better translational therapies to promote human healthspan. For instance, disease A may be caused by senescence type A and may require drug A, whereas for disease B this type of senescence and the associated drug may be ineffective and require their own. Likely there will be considerable redundancy, but clearly unique phenotypes exist and to may better on-target therapies know-how of the biology underlying these subtypes will be important. Thus, the development of tailored anti-senescence treatment can then become reality based on unique subtype markers expressed by specific senescent and therapy-resistant cancer cells (and not by the cancer type).
- 2) A better understanding of how anti-cancer strategies can cause off-target toxicity by inducing senescence in healthy tissues. Such an understanding will aid in developing better therapies to counter chemotoxicity.
- 3) an understanding of how senescent cells interact with their environment, for instance by triggering a "stem-lock" response, and how this may affect tissue renewal and (cancer) stemness.

4) An understanding of how the microenvironment affects anti-cancer treatment efficacy. Since chemotherapeutics induces senescence in non-cancer cells and senescence in the microenvironment is known to induce therapy resistance in cancer cells, targeting senescence in combination with traditional chemotherapy has the potential to greatly enhance the efficacy of these drugs.

Societal relevance

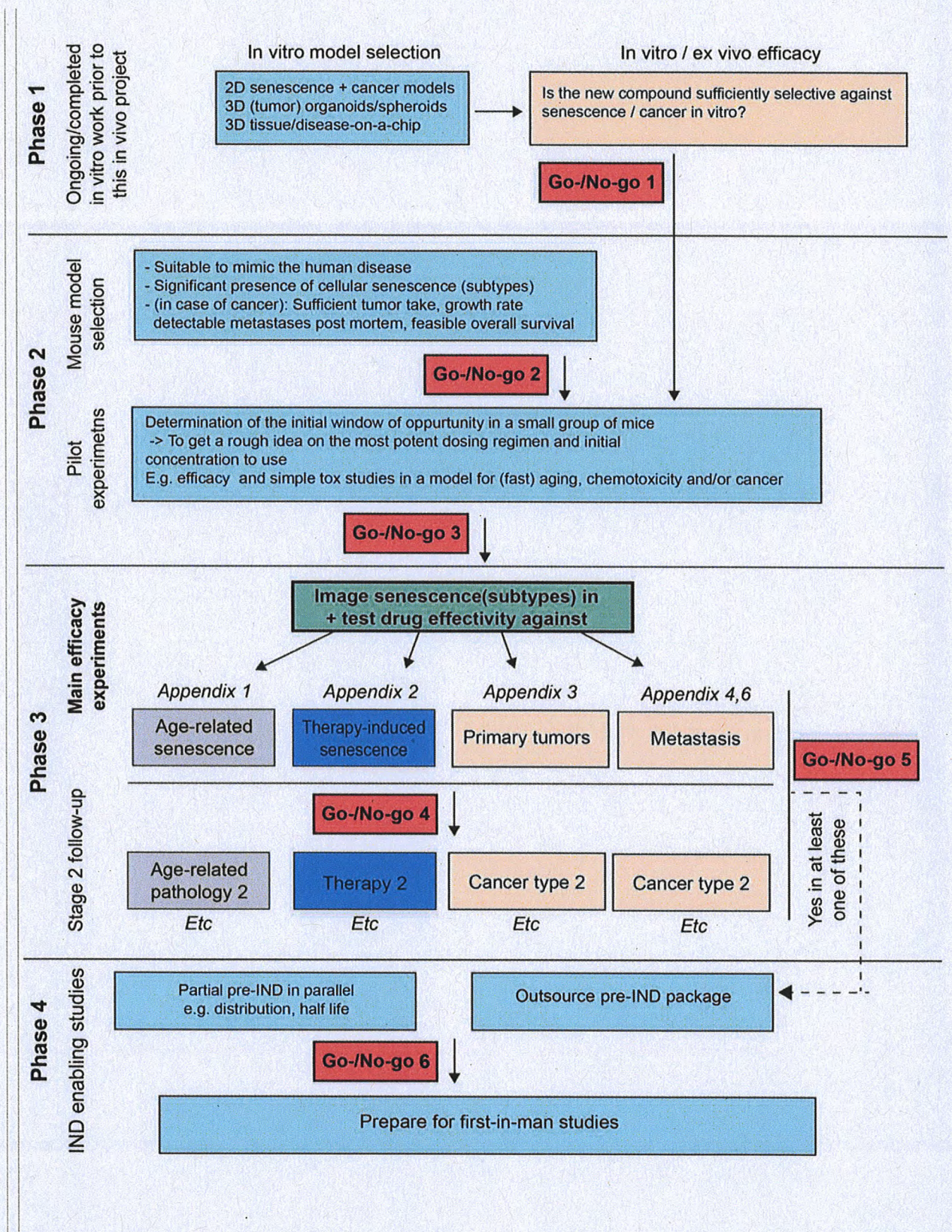
Aging is one of the main risk factors the broad-based development of diseases, including cancer. With a still aging population, better methods are urgently needed to ensure good healthspan at old age. As for cancer, therapy resistance is the main cause of death of cancer patients, especially when prevalent in metastatic tumor cells. Cellular senescence is a major driver of both aging/age-related pathologies, as well as cancer progression, metastazation and therapy resistance. Anti-senescence methods would thus have huge health benefits, especially when they can be tailored against specific senescence subtypes. The ultimate goal of our experiments is to identify novel therapeutics that can be translated to the clinic and we are in the process of obtaining funding to achieve this. Thus, we expect initial clinical translation to be achievable within the time frame of this project. Indeed, for our initial compounds the package to file for an "Investigational New Drug" (IND) with the American Food and Drug Authority (FDA) or the European Medical Authority (EMA) are already scheduled and can commence upon successes within this current in vivo project. This would then allow for first-in man studies. These would not be part of this in vivo project, but are reliant on the results obtained here.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Part of this project is to develop new models to detect senescence subtypes by bioluminescence or fluorescence and to allow for semi-genetic ablation of these by having these include kill switches. This has successfully been employed for CDKN2a (p16^{INK4a})-positive senescence^{12,51,52}, and together with the UMC Groningen, we are generating novel models based on markers we identified in our consortium (both in the ZonMW/Health Holland project, as well as through Cleara), such as TSPAN13⁵³ and other genes, such as the SASP genes IL1, IL6 and MMP3¹⁶. These models will need to be validated for senescence development, e.g. in a short-term experiment using chemotherapy or other stimuli.

De broad aim of the entire research, where this in vivo project is a crucial part of, is to develop ways to maintain and/or restore healthspan at old age and to overcome therapy resistance in cancer cells by targeting senescence subtypes. **The proposed strategy for the entire program looks as follows (where Phase 2+3 are the main parts of the in vivo project):**



Prior to initiation of the in vivo experiments of this project, we will perform extensive in vitro research to identify how senescence subtypes originate and under what conditions they manifest, as well as to test the potency and selectivity of our anti-senescence subtype drugs.

The **first go-/no-go** benchmark of the project (Phase 1) is to make sure for our compounds to be potent AND selective enough against senescence in vitro, to warrant in vivo follow up. [REDACTED]

[REDACTED]. In general, we expect this list to be far more extensive, but these would thus be our initial choices. This part will be performed prior to any in vivo work (forming the basis of the various grants and consortia mentioned above). [10.1 c en 10.2 g](#) [REDACTED]

[REDACTED]. Only compounds which sufficiently eliminate senescence subtype cells or senescence-like cancer cells, but not healthy control cells, will be allowed to pass (e.g. at least 3-fold selectivity index (SI) and an EC50 of below 20µM).

The **second go-/no-go** benchmark (Phase 2) is focused on setting up senescence-detection models and to select and optimize models for senescence-associated pathologies.

Part of this project is to develop new models to detect senescence subtypes by bioluminescence or fluorescence and to allow for semi-genetic ablation of these by having these include kill switches. This has successfully been employed for CDKN2a (p16^{INK4a})-positive senescence^{12,51,52}, and together with the UMC Groningen, we are generating novel models based on markers we identified in our consortium (both in the ZonMW/Health Holland project, as well as through Cleara), such as TSPAN13⁵³ and other genes, such as the SASP genes IL1, IL6 and MMP3¹⁶. These models will need to be validated for senescence development, e.g. in a short-term experiment using chemotherapy or other stimuli. **A senescence induction after such a stimulus is considered to be sufficient when the fluorescence or bioluminescence signal increases at least 20% compared to controls.** Only models that sufficiently allow for detection of senescent cells (or subtypes thereof) will be used further on.

In parallel, we will analyze disease models for which senescence is expected to be causative (see models mentioned in section 3.2 and the various appendices). Here, we will first analyze tissues of the human -and where available mouse - pathology for which we hypothesize senescence to play a causative role. The phenotype of choice should show enrichment of