

Форма «Т». Титульный лист заявки в Российский научный фонд  
Конкурс 2021 года «Проведение фундаментальных научных исследований и  
поисковых научных исследований отдельными научными группами»

Название проекта <b>Перманентный экзон-скиппинг для лечения пояснично-конечностной мышечной дистрофии, тип 2B</b>		Номер проекта <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">21-15-00410</div> <div style="text-align: center;">  </div>	
		Код типа проекта: <b>ОНК(2021)</b>	
		Отрасль знания: <b>05</b>	
		Основной код классификатора: <b>05-401</b> Дополнительные коды классификатора: <b>05-402 05-101</b>	
		Код ГРНТИ <b>34.15.23, 76.03.39</b>	
Фамилия, имя, отчество (при наличии) руководителя проекта: <b>Лавров Александр Вячеславович</b>		Контактные телефон и e-mail руководителя проекта: <b>+79161139047, avlavrov@yandex.ru</b>	
Полное и сокращенное наименование организации, через которую должно осуществляться финансирование проекта: <b>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова"</b> <b>ФГБНУ "МГНЦ"</b>			
Объем финансирования проекта в 2021 г. <b>6000</b> тыс. руб.		Год начала проекта: <b>2021</b>	Год окончания проекта: <b>2023</b>
Фамилии, имена, отчества (при наличии) основных исполнителей (полностью)	<div style="margin-bottom: 5px;"><b>Анучина Арина Артуровна</b></div> <div style="margin-bottom: 5px;"><b>Деев Роман Вадимович</b></div> <div style="margin-bottom: 5px;"><b>Иванова Алиса Владимировна</b></div> <div style="margin-top: 5px;"><i>(руководитель проекта в данной графе не указывается)</i></div>		
Гарантирую, что при подготовке заявки не были нарушены авторские и иные права третьих лиц и/или имеется согласие правообладателей на представление в Фонд материалов и их использование Фондом для проведения экспертизы и для обнародования (в виде аннотаций заявок).			
Подпись руководителя проекта  _____/А.В. Лавров/		Дата регистрации заявки <b>10.11.2020 г.</b>	
Подпись руководителя организации* <small>* Либо уполномоченного представителя, действующего на основании доверенности или распорядительного документа. В случае подписания формы уполномоченным представителем организации (в т.ч. – руководителем филиала) к печатному экземпляру заявки прилагается копия распорядительного документа или доверенности, заверенная печатью организации. Непредставление копии распорядительного документа или доверенности в случае подписания формы уполномоченным представителем организации, а также отсутствие расшифровки подписи, является основанием недопуска заявки к конкурсу.</small>  _____/_____/		Печать (при наличии) организации	

# Форма 1. Сведения о проекте

## 1.1. Название проекта

*на русском языке*

Перманентный экзон-скиппинг для лечения поясно-конечностной мышечной дистрофии, тип 2В

*на английском языке*

Permanent exon skipping for the treatment of limb girdle muscular dystrophy type 2B

## 1.2. Приоритетное направление развития науки, технологий и техники в Российской Федерации, критическая технология

Указывается согласно перечню (Указ Президента Российской Федерации от 7 июля 2011 года №899) в случае, если тематика проекта может быть отнесена к одному из приоритетных направлений, а также может внести вклад в развитие критических технологий Российской Федерации.

4. Науки о жизни.

5. Геномные, протеомные и постгеномные технологии.

**Направление из Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (утверждена Указом Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации») (при наличии)**

Н3 Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)

## 1.3. Ключевые слова (приводится не более 15 терминов)

*на русском языке*

Дисферлин, дисферлинопатия, транс-дифференцировка, фибробласты, миобласты, ген DYSF, геномное редактирование, CRISPR/Cas9, поясно-конечностная мышечная дистрофия

*на английском языке*

Dysferlin, Dysferlinopathy, myoblasts, DYSF gene, genome editing, CRISPR/Cas9, Limb-girdle muscular dystrophy, LGMD

## 1.4. Аннотация проекта (объемом не более 2 стр.; в том числе кратко – актуальность решения указанной выше научной проблемы и научная новизна)

Данная информация может быть опубликована на сайте Фонда в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет».

*на русском языке*

Дисферлинопатия — это наследственное заболевание, прогрессирующая мышечная дистрофия, вызванная мутацией в гене, кодирующем мышечный белок дисферлин. Дисферлин — цитоплазматический белок из семейства ферлин-1-подобных белков, играющий важную роль в миогистогенезе, формировании миотуб, репарации мембран мышечных клеток. Эффективной терапии заболевания не существует. Между тем, появление методов геномного редактирования потенциально может вести к разработке этиотропной терапии практически любого заболевания. Дисферлинопатия - моногенное заболевание, обусловленное мутациями лишь в одном гене - DYSF. При этом для дисферлинопатий характерно разнообразие мутаций в гене DYSF, что затрудняет разработку универсального подхода к геномному редактированию. При подобной молекулярно-генетической структуре заболевания может быть оправданным пропуск отдельных экзонов с мутациями. Эффективность метода была показана для дистрофинопатий (миодистрофия Дюшенна), а принципиальная возможность по пропуску некоторых экзонов DYSF уже описана в литературе. Один из методов разработки терапии дисферлинопатии – геномное редактирование легко доступных для биопсии и изоляции фибробластов и их трансдифференцировка в миобласты. Геномное редактирование клеток с мутациями может быть проведено как до, так и после трансдифференцировки. Сам процесс дифференцировки может зависеть от наличия дисферлина, экспрессируемого в норме в фибробластах. Остается неизвестной возможность использования усеченных методом пропуска экзонов форм дисферлина. Также интерес представляют морфофункциональные свойства миобластов и миотуб, полученных в результате трансдифференцировки после геномного редактирования. Проект направлен на изучение возможности и эффективности перманентного пропуска экзонов 3-4 и 26-27 в гене DYSF с помощью CRISPR/Cas9, а также изучение функциональных свойств дисферлина с пропущенными экзонами и оценку возможного влияния геномного редактирования фибробластов при дисферлинопатии на транс-дифференцировку в миобласты и их морфофункциональные свойства. В ходе исследования будет произведена сравнительная оценка экспрессии и распределения отредактированного природного дисферлина в фибробластах и миотубах, оценка степени репарации клеточных мембран после редактирования ДНК. Полученные результаты обогатят

наши знания о функционировании дисферлина и лягут в основу разработок технологий генно-клеточной терапии мышечных заболеваний и их моделирования.

*на английском языке*

Dysferlinopathy is a hereditary disease, progressive muscular dystrophy, caused by the mutations in the gene, coding dysferlin protein. Dysferlin is a cytoplasmic protein related to the family ferlin-1-like proteins, it is important in myogistogenesis, myotubes formation and reparation of muscle cells' membranes. There is no effective therapy for the disease. Meanwhile, the emergence of genome editing methods can potentially lead to the development of etiotropic therapy for almost any disease. Dysferlinopathy is a monogenic disease caused by mutations in only one gene - DYSF. Lack of the major mutations and their diversity prevent development of the universal tool for treating different genetic forms of dysferlinopathies. In this situation exon skipping may be considered to target any mutations in the skipped exons. Such an approach was shown reasonable in Duchenne dystrophy for example and the fundamental possibility of skipping some DYSF exons has already been described in the literature. Genome editing and transdifferentiation of easily available for biopsy and isolation fibroblasts into myoblasts may be considered as one of the methods for the treatment of dysferlinopathies. Genome editing of mutated cells can be performed both before and after transdifferentiation. Notably, the process of trans-differentiation itself may depend on the presence of dysferlin in fibroblasts. The functional applicability of the exon-skipped dysferlyn remains questionable. The project is focused on the functional analysis of the exon-skipped forms of dysferlin (with 3-4 and 25-26 exons skipped) by CRISPR/Cas9 method both in the differentiated myotubes and in the process of trans-differentiation. Dysferlin expression (RNA and protein), protein localization and function in reparation of damage cell membranes will be analyzed. New knowledge will contribute to both understanding dysferlin function and development of therapeutic methods.

**1.5. Ожидаемые результаты и их значимость (указываются результаты, их научная и общественная значимость (соответствие предполагаемых результатов мировому уровню исследований, возможность практического использования ожидаемых результатов проекта в экономике и социальной сфере))**

Данная информация может быть опубликована на сайте Фонда в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет».

*на русском языке*

Ожидается разработать систему целевого перманентного пропуска экзонов гена DYSF и показать, что усеченные формы дисферлина сохраняют правильную внутриклеточную локализацию и свою функциональную роль в процессе трансдифференцировки и формирования миотуб, а также репарации клеточной мембраны миогенных клеток после нанесения повреждения. Кроме того, в настоящее время неизвестно, восстановления какой доли аллелей дисферлина будет достаточно для восстановления его функции в мышечном волокне, и наши результаты с изучением экспрессии усеченных форм дисферлина после геномного редактирования и пропуска экзонов позволят получить ответ на этот вопрос. Результаты, полученные в ходе выполнения НИР, в будущем могут лечь в основу разработок технологий генной и клеточной терапии заболеваний мышечной ткани.

*на английском языке*

It is expected to develop a system of targeted permanent skipping of exons of the DYSF gene and to show that truncated forms of dysferlin retain the correct intracellular localization and their functional role in the process of transdifferentiation and formation of myotubes, as well as in the repair of the cell membrane of myogenic cells after damage. In addition, it is currently unknown what proportion of dysferlin alleles will be sufficient to restore its function in muscle fiber, and our results with the study of the expression of truncated forms of dysferlin after genomic editing and exon skipping will provide an answer to this question. The results obtained in the course of research and development may in the future form the basis for the development of technologies for gene and cell therapy for muscle tissue diseases.

**1.6. В состав научного коллектива будут входить (указывается планируемое количество исполнителей в течение всего срока реализации проекта):**

Несоответствие состава научного коллектива (в том числе отсутствие информации в соответствующих полях формы) требованиям пункта 12 конкурсной документации является основанием недопуска заявки к конкурсу.

**9** исполнителей проекта (включая руководителя),

В соответствии с требованиями пункта 12 конкурсной документации от 4 до 10 человек. Вне зависимости от того, в трудовых или гражданско-правовых отношениях исполнители состоят с организацией.

в том числе

**7** исполнителей в возрасте до 39 лет включительно,

из них:

**1.7. Планируемый состав научного коллектива с указанием фамилий, имен, отчеств (при наличии) членов коллектива, их возраста на момент подачи заявки, ученых степеней, должностей и основных мест работы, формы отношений с организацией (трудовой договор, гражданско-правовой договор) в период реализации проекта**

*на русском языке*

1. Лавров Александр Вячеславович, 42 года, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор
2. Деев Роман Вадимович, 41 год, кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, договор гражданско-правового характера
3. Анучина Арина Артуровна, 25 лет, научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», аспирант, трудовой договор
4. Иванова Алиса Владимировна, 26 лет, младший научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор
5. Зайнитдинова Миляуша Иршатовна, 25 лет, научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор
6. Кочергин-Никитский Константин Сергеевич, 38 лет, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор
7. Яковлев Иван Антонович, 30 лет, младший научный сотрудник, ФГАОУ ВО КФУ, договор гражданско-правового характера
8. Кондратьева Екатерина Владимировна, 36 лет, научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор
9. Ясиновский Матвей Ильич, 21 год, лаборант-исследователь лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», студент, трудовой договор

*на английском языке*

1. Lavrov Alexander Vyacheslavovich, 42 years old, MD, PhD, leading researcher of the Laboratory of Genome Editing of the FSBSI "RCMG", employment contract
2. Deev Roman Vadimovich, 41 year old, MD, PhD, head of the department, NWSMU named after I.I. Mechnikov, civil contract
3. Anuchina Arina Arturovna, 25 years old, researcher of the Laboratory of Genome Editing of the FSBSI "RCMG", employment contract
4. Ivanova Alisa Vladimirovna, 26 years old, junior researcher of the Laboratory of Genome Editing of the FSBSI "RCMG", employment contract
5. Zainitdinova Milyausha Irshatovna, 25 years old, scientific researcher of the Laboratory of Genome Editing of the FSBSI "RCMG", employment contract
6. Kochergin-Nikitsky Konstantin Sergeevich, 38 years old, PhD, senior researcher of the Laboratory of Genome Editing of the FSBSI "RCMG", employment contract
7. Yakovlev Ivan Antonovich, 30 years old, junior researcher, civil contract
8. Kondrateva Ekaterina Vladimirovna, 36 years old, scientific researcher of the Laboratory of Genome Editing of the FSBSI "RCMG", employment contract
9. Yasinovsky Matvey Ilyich, 21 years old, laboratory assistant of the Laboratory of Genome Editing of the FSBSI "RCMG", a fifth-year student of the preventive medicine faculty of the Sechenov First Moscow State Medical University, employment contract

**Соответствие профессионального уровня членов научного коллектива задачам проекта**

*на русском языке*

Основной тематикой лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ» является разработка эффективных методов коррекции мутаций, приводящих к моногенным наследственным заболеваниям (работы проводятся в рамках государственного задания Минобрнауки России, Программы фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» 2018-2020 гг. и в рамках завершенного недавно гранта РНФ). Начиная с 2016 года коллективом авторов опубликовано 14 статей в российских и зарубежных журналах в области редактирования генома, в том числе 2 в журнале Q1. Коллектив авторов сделал 34 доклада на научных конференциях по редактированию генома за последние 3 года, в том числе 25 устных (3 из них на зарубежных конференциях) и 9 постерных (6 на зарубежных конференциях). Вся работа по редактированию мутаций проводится на клеточных культурах HEK293T, CFTE29o- и ИПСК. У научного коллектива имеется большой опыт создания плазмид. За последние несколько лет сотрудники лаборатории клонировали несколько десятков плазмид. В прошлом году начата

работа с AAV векторами и показаны хорошие результаты. Члены научного коллектива много лет работают с разными клеточными культурами, такими как мезенхимные стромальные клетки, ИПСК, лимфоциты, миобласты, HEK293T, HeLa, A549, CFTE290-. Есть большой опыт получения и дифференцировки ИПСК. У членов научного коллектива есть большой опыт проведения проточной цитофлуориметрии и иммуногистохимического анализа. Таким образом, коллектив исполнителей обладает всеми необходимыми навыками для успешного выполнения молекулярно-генетической и клеточной части работы.

*на английском языке*

The main subject of the Laboratory of Genome Editing of the FSBSI "RCFM" is the development of effective methods for the correction of mutations leading to monogenic hereditary diseases (work is carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation, the Basic Research Program of the Presidium of the Russian Academy of Sciences "Basic Research for Biomedical Technologies" 2018-2020 and by Russian Science Foundation).

Since 2016, the research team published 14 articles in Russian and foreign journals in the field of genome editing, including the journal Q1. The team of authors made 34 reports at scientific conferences on genome editing over the past 3 years, including 25 oral (3 of them at foreign conferences) and 9 poster presentations (6 at foreign conferences). All mutation editing work is performed in HEK293T, CFTE290- and iPSC cell cultures. The research team has extensive experience in creating plasmids. Over the past few years, laboratory staff have cloned dozens of plasmids. Last year, work with AAV vectors was started and good results were shown. The team members have been working with various cell cultures for many years, such as mesenchymal stromal cells, iPSCs, lymphocytes, myoblasts, HEK293T, HeLa, A549, CFTE290-. Scientific team has extensive experience in obtaining and differentiating iPSCs. Members of the research team have extensive experience in conducting flow cytometry and immunohistochemical analysis. Thus, the team of performers has all the necessary skills for the successful implementation of the molecular genetic and cellular parts of the work.

#### **1.8. Планируемый объем финансирования проекта Фондом по годам (указывается в тыс. рублей):**

2021 г. - 6000 тыс. рублей,

2022 г. - 6000 тыс. рублей,

2023 г. - 6000 тыс. рублей.

Несоответствие планируемого объема финансирования проекта (в том числе отсутствие информации в соответствующих полях формы) требованиям пункта 10 конкурсной документации является основанием недопуска заявки к конкурсу.

#### **1.9. Научный коллектив по результатам проекта в ходе его реализации предполагает опубликовать в рецензируемых российских и зарубежных научных изданиях не менее**

Приводятся данные за весь период выполнения проекта. Уменьшение количества публикаций (в том числе отсутствие информации в соответствующих полях формы) по сравнению с порогом, установленным в пункте 16.2 конкурсной документации, является основанием недопуска заявки к конкурсу.

В случае представления публикации в изданиях, индексируемых в базе данных «Сеть науки» (Web of Science Core Collection) или «Скопус» (Scopus), входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных <http://www.scimagojr.com/>), данная статья учитывается как две публикации.

8 публикаций,

из них

8 в изданиях, индексируемых в базах данных «Сеть науки» (Web of Science Core Collection) или «Скопус» (Scopus).

**Информация о научных изданиях, в которых предполагается опубликовать результаты проекта, в том числе следует указать в каких базах индексируются данные издания - «Сеть науки» (Web of Science Core Collection), «Скопус» (Scopus), РИНЦ, иные базы, а также указать тип публикации - статья, обзор, тезисы, монография, иной тип**

Сложно предсказать, в каких в итоге журналах будут опубликованы статьи по проекту. Большие экспериментальные статьи и хорошие обзоры мы, безусловно, будем подавать в журналы, индексируемые в Web of Science и входящие в Q1 (Molecular therapy. Nucleic acids; Scientific reports; Stem Cell Research & Therapy; Stem Cell Research; Journal of Cystic Fibrosis; Human Genetics; American Journal of Human Genetics; Protein & Cell). Многие из них распространяются по подписке, поэтому бесплатны. Средний импакт-фактор этой группы журналов составляет 5,8 (от 3,9 до 9,9). У нас есть опыт публикации в такого рода журналах. В случае неудачи будем подавать статьи в журналы Q2 (PLoS One; Stem Cells and Development; Molecular Diagnosis & Therapy; European Journal of Human Genetics; Molecular Medicine). Средний импакт-фактор этой группы журналов составляет 3,1 (от 2,8 до 3,7). В последнюю очередь будем ориентироваться на журналы Q3-4 (Current gene therapy; BMC Medical Genomics; Molecular Biology Reports; Transgenic Research; Biotechnology Letters; BMC Biotechnology; Molecular Biotechnology). Средний импакт-фактор этой группы журналов составляет 2,1 (от 1,7 до 2,6). Небольшие обзорные и экспериментальные статьи планируем подавать в российские журналы, входящие в Web of Science и/или Scopus: Вестник РГМУ, Генетика, Гены и клетки, Бюллетень

экспериментальной биологии и медицины. Традиционно коллектив исполнителей участвует в нескольких европейских конференциях, тезисы которых публикуются в приложениях журналов, входящих в Web of Science (Q2-3): European Journal of Human Genetics; Journal of Cystic Fibrosis; FEBS Open Bio. Монографии и другие типы публикаций не планируем.

#### **Иные способы обнародования результатов выполнения проекта**

Сотрудники лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ» активно сотрудничают со СМИ и регулярно дают интервью о текущих проектах и достижениях. Для примера можно ознакомиться с информацией, размещенной на сайте РНФ <http://rscf.ru/ru/node/genetikam-mediko-geneticheskogo-nauchnogo-tsentra-udalos-s-vysokoy-effektivnostyu-ispraviv-mutatsiyu>

#### **1.10. Число публикаций членов научного коллектива, опубликованных в период с 1 января 2016 года до даты подачи заявки,**

**102**, из них

**69** – опубликованы в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection или в Scopus.

#### **1.11. Планируемое участие научного коллектива в международных коллаборациях (проектах) (при наличии)**

не планируется

Руководитель проекта подтверждает, что

- все члены научного коллектива (в том числе руководитель проекта) удовлетворяют пунктам 6, 7, 13 конкурсной документации;
- на весь период реализации проекта он будет состоять в трудовых отношениях с организацией;
- при обнародовании результатов любой научной работы, выполненной в рамках поддержанного Фондом проекта, руководитель проекта и его научный коллектив будут указывать на получение финансовой поддержки от Фонда и организацию, а также согласны с опубликованием Фондом аннотации и ожидаемых результатов поддержанного проекта, соответствующих отчетов о выполнении проекта, в том числе в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»;
- помимо гранта Фонда проект не будет иметь других источников финансирования в течение всего периода практической реализации проекта с использованием гранта Фонда;
- проект не является аналогичным по содержанию проекту, одновременно поданному на конкурсы научных фондов и иных организаций;
- проект не содержит сведений, составляющих государственную тайну или относимых к охраняемой в соответствии с законодательством Российской Федерации иной информации ограниченного доступа;
- доля членов научного коллектива в возрасте до 39 лет включительно в общей численности членов научного коллектива будет составлять не менее 50 процентов в течение всего периода практической реализации проекта;
- в установленные сроки будут представляться в Фонд ежегодные отчеты о выполнении проекта и о целевом использовании средств гранта.

Подпись руководителя проекта \_\_\_\_\_/А.В. Лавров/

## Форма 2. Сведения о руководителе и основных исполнителях проекта

собираются автоматически (частично) на основе анкетных данных руководителя и исполнителей, подтвердивших свое участие. Список исполнителей формируется в "Форме Т"

### Форма 2. Сведения о руководителе

#### 2.1. Фамилия, имя, *отчество (при наличии)*

*на русском языке*

Лавров Александр Вячеславович

*на английском языке фамилия и инициалы*

Lavrov A.

#### WoS ResearcherID *(при наличии)*

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу [www.ResearcherID.com](http://www.ResearcherID.com).  
<https://publons.com/researcher/J-8203-2013/>

#### Scopus AuthorID *(при наличии)*

Scopus AuthorID формируется в базе данных Scopus автоматически при появлении у автора хотя бы одной статьи в данной базе. AuthorID указан в авторском профиле, который становится доступен, если при поиске автора в базе данных Scopus (Author Search) в результатах поиска нажать на фамилию автора.  
<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57195433184>

#### ORCID *(при наличии)*

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу [orcid.org](http://orcid.org).  
<https://orcid.org/0000-0003-4962-6947>

#### 2.2. Дата рождения *(указывается цифрами – число, месяц, год)*

04.05.1978

#### 2.3. Гражданство

РОССИЯ

#### 2.4. Ученая степень, год присуждения

В случае наличия нескольких ученых степеней, указывается та из них, которая наиболее соответствует тематике проекта.

Кандидат медицинских наук, 2004

#### 2.5. Награды и премии за научную деятельность, членство в ведущих научных сообществах *(при наличии)*, участие в редколлегиях ведущих рецензируемых научных изданий *(при наличии)*, участие в оргкомитетах или программных комитетах известных международных конференций, иной опыт организации международных мероприятий

ММА им. И.М. Сеченова, медаль имени Н.И. Пирогова «За лучшую студенческую научную работу», 2001

#### 2.6. Основное место работы на момент подачи заявки – должность, полное наименование организации *(сокращенное наименование организации)*

Руководитель проекта может на момент подачи заявки не являться работником организации, но, в случае победы в конкурсе, должен заключить с ней трудовой договор. В случае, если руководитель проекта не является гражданином Российской Федерации, организацией должны быть выполнены все процедуры, предусмотренные законодательством Российской Федерации при трудоустройстве иностранных граждан.  
ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова" (ФГБНУ "МГНЦ", г Москва)

#### 2.7. Область научных интересов – ключевые слова *(приводится не более 15 ключевых слов)*

*на русском языке*

анализ экзоста и транскриптома, строение и функция ядра, хронический миелоидный лейкоз, генетика рака, секвенирование следующего поколения, таргетная терапия, геномное редактирование

*на английском языке*

next gene sequencing, exome and transcriptome analysis, nuclear structure and function, chronic myeloid leukemia, cancer

## 2.8. Область научных интересов – коды по классификатору Фонда

04-208 04-210 05-401 05-402

## 2.9. Перечень публикаций руководителя проекта, опубликованных в период с 1 января 2016 года до даты подачи заявки, подтверждающий выполнение условия пункта 9 конкурсной документации

Для лиц, находившихся в указанный в настоящем пункте период в отпусках по беременности и родам, отпусках по уходу за ребенком, а также отпусках работникам, усыновившим ребенка, допускается наличие соответствующих публикаций также в период, предшествующий 1 января 2016 года, и равный продолжительности таких отпусков.

Достаточно привести ссылки на публикации в количестве, равном установленному в конкурсной документации порогу. В случае представления публикации в изданиях, индексируемых в базе данных «Сеть науки» (Web of Science Core Collection) или «Скопус» (Scopus), входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных <http://www.scimagojr.com/>), данная статья в настоящем пункте указывается как одна публикация, но учитывается как две публикации. При этом необходимо указать на принадлежность издания к Q1 и на год принадлежности издания к Q1. Несоответствие количества публикаций (в том числе отсутствие информации в соответствующих полях формы или отсутствие информации о принадлежности издания к Q1), приводимое в перечне и/или численно в строке ниже, требованиям пункта 9 конкурсной документации является основанием недопуска заявки к конкурсу в соответствии с подпунктом «е» пункта 21 конкурсной документации.

*на английском языке*

1. Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Gene therapy of hereditary diseases by CRISPR/Cas9 technology in vivo. Med Gen (Mosk). 2016; Vol. 15, N 9, p.: 3-11 (<http://www.medgen-journal.ru/jour/article/view/167>) ИФ РИНЦ 0,193
2. Smirnikhina S.A., Bannikov A.V., Anuchina A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Adilgereeva E.P., Lavrov A.V. Influencing factors for CRISPR/Cas9 efficacy for F508del mutation editing in cystic fibrosis. Med Gen (Mosk). 2017; Vol. 16, N 11 p.: 32-37. (<http://www.medgen-journal.ru/jour/article/view/345>) ИФ РИНЦ 0,193
3. Smirnikhina SA, Anuchina AA, Kochergin-Nikitsky KS, Adilgereeva EP, Yakushina VD, Lavrov AV. Experimental approaches to the target editing of the CFTR gene using CRISPR-Cas9. Bulletin of RSMU. 2018, №2, с. 15-20, doi: 10.24075/vrgmu.2018.022 (<https://vestnikrgmu.ru/archive/2018/2/2/abstract?lang=en>) ИФ РИНЦ 0,304
4. Smirnikhina SA, Anuchina AA., Lavrov AV. Ways of improving precise knock-in by genome editing technologies. Human Genetics, 2018, doi: 10.1007/s00439-018-1953-5 (<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00439-018-1953-5>) IF JCR 2017 4.637 Q1
5. Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Modern pathogenesis-based methods and development of new gene and cell-based methods for cystic fibrosis treatment. Genes & Cells, 2018, Vol XIV, №3, p. 22-31 (<http://genescells.ru/article/sovremennoepatogeneticheskoe-lechenie-i-razrabotka-novyih-metodov-gennoy-i-kletочноy-terapii-mukovistsidoza/>) ИФ РИНЦ 0,914
7. Kondrateva E.V., Adilgereeva E.P., Amelina E.L., Tabakov V.Yu., Anuchina A.A., Ustinov K.D., Yasinovsky M.I., Voronina E.S., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. Receiving induced pluripotent stem cells from fibroblasts of patients with cystic fibrosis. Siberian Medical Review. 2019;(2):95-101 (<https://pdfs.semanticscholar.org/960e/017996b38b51aa75de2d2011678416e0fa45.pdf>) ИФ РИНЦ 0,625
8. Smirnikhina SA, Anuchina AA, Lavrov AV. Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies. Hum Genet. 2019 Jan;138(1):1-19. doi: 10.1007/s00439-018-1953-5. Web of Science, Scopus, Q1 (2019)
9. Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Modern pathogenesis-based methods and development of new gene and cell-based methods for cystic fibrosis treatment. Genes & Cells, 2018, Vol XIV, №3, p. 23-31, DOI: 10.23868/201811029 (in Russian). Scopus
10. Zaynitdinova M.I., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A., Eremin I.I., Pulin A.A. Gene therapy approaches to the Duchenne muscular dystrophy treatment. Genes & Cells, 2019, Vol XIV, №4, p. 6-18. doi: 10.23868/201912026 (in Russian). Scopus
11. Anuchina A.A., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. TIRR: a potential front runner in HDR race – hypotheses and perspectives. Molecular Biology Reports, 47, 2371–2379 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05285-x>. Web of Science, Scopus
12. Slesarenko Y.S., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. Clinical trials for the treatment of hereditary diseases by genome editing. Genes & Cells, 2020, Vol XV, №2, 51-57 p. doi: 10.23868/202004023 (in Russian). Scopus
13. Smirnikhina S. A., Kondrateva E. V., Anuchina A. A., Zaynitdinova M. I., Lavrov A. V. Modeling of cystic fibrosis in HEK293T cell culture and development of a method for the correction of F508del mutation. Medical News of North Caucasus. (In Russ.) 2020, 15(2): 158-162. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15038> (in Russian) Scopus
14. Kondrateva E, Adilgereeva E, Amelina E, Tabakov V, Demchenko A, Ustinov K, Yasinovsky M, Voronina E, Lavrov A, Smirnikhina S. Generation of induced pluripotent stem cell line (RCMGi001-A) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with p.F508del mutation. Stem Cell Research, 2020, 48, 101933 doi: 10.1016/j.scr.2020.101933 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506120302348>. Web of Science, Scopus, Q1 (2020)

Для русскоязычных названий сведения приводятся на русском языке и в переводе на английский язык. При этом должно быть понятно, что речь идет об одном и том же документе (например, добавляйте слово «перевод»).



Перечень содержит 14 публикаций в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection, Scopus.

Перечень содержит 3 публикации в изданиях, входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных <http://www.scimagojr.com/>).

**2.10. Основные научные результаты руководителя проекта за период с 1 января 2016 года (результаты должны подтверждаться сведениями из заявки, например - публикациями)**

*на русском языке*

Проведен глубокий молекулярный анализ строения вируса простого герпеса человека методом массового параллельного секвенирования (11). Выявлены потенциальные прогностические маркеры у больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) в результате полноэкзомного секвенирования (1, 2, 5). Показана несостоятельность экспрессионного профилирования с целью поиска различий и маркеров у больных ХМЛ с оптимальным и неоптимальным ответом (7, 12). Разработан дизайн диагностической панели для диагностики рака щитовидной железы методами высокопроизводительно параллельного секвенирования (14 и ожидание патента). Разработаны подходы к полноэкзому анализу при диагностике умственной отсталости и обследовано более 100 человек (15). Разработаны методы геномного редактирования с помощью нескольких геномных редакторов на основе CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций при муковисцидозе и десминопатии (3, 6, 8, 9, 10). Получены пациентспецифичные ИПСК от больных муковисцидозом (13).

*на английском языке*

Characterization of the HSV using next generation sequencing (11). Found potential prognostic markers in CML patients using exome sequencing (1,2,5). Expression profiling and miRNA analysis are shown to be non-informative for diagnostic and prognostic purposes both in determining outcome in newly diagnosed CML patients and in deep responders to make decision about therapy cessation (12). We developed a comprehensive panel to analyse both point mutations, CNVs and fusions in thyroid cancer (14 + patent pending). This panel is suitable for both diagnostic purposes on clinical samples and for the research purposes in wide spectrum of cancers. We developed and implemented diagnostic approaches to molecular diagnostics of hereditary intellectual disorders using high throughput methods including exome sequencing and molecular karyotyping which allowed dramatically increase the diagnostic yield in this patients (15). We developed several approaches to genome editing in hereditary diseases using different modifications of CRISPR/Cas9 technology and developed all necessary steps to organize first preclinical study in Russia of the genome editing and cell transplantation method for treating hereditary disorders (3,6,8,9,10,13).

**2.11. Общее число публикаций за период с 1 января 2016 года, 81, из них:**

**35 - опубликовано в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection или Scopus,**

**в том числе 5 публикаций в изданиях, входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных <http://www.scimagojr.com/>).**

**2.12. Дополнительный список публикаций руководителя проекта с 1 января 2016 года (монографии, результаты интеллектуальной деятельности, имеющие правовую охрану, публикации в ведущих рецензируемых научных изданиях, публикации в изданиях, индексируемых в системах цитирования Web of Science Core Collection, Scopus, приводится не более 10 публикаций, при наличии публикации в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» указывается ссылка на нее (обязательно для публикаций в индексируемых изданиях), указывается, при наличии, импакт-фактор научного издания (по JCR Science Edition, JCR Social Sciences Edition или SJR))**

Пункт не является обязательным к заполнению. Могут приводиться публикации, свидетельствующие о научной квалификации и достижениях руководителя проекта, за исключением публикаций, указанных в п. 2.9 настоящей формы.

*на английском языке*

**2.13. Опыт выполнения научных проектов (указываются наименования фондов (организаций), их местонахождение (страна), форма участия, номера, названия проектов и сроки выполнения за последние 5 лет)**

*на русском языке*

*на английском языке*

**В том числе проектов, финансируемых РНФ (при наличии):**

Являлся исполнителем проекта № 17-75-20095, 2017-2019 гг.

**2.14. Планируемое участие в научных проектах (в любом качестве) в 2021 году**

Общее количество – 4, из них:

руководство – 1, участие в качестве исполнителя – 3,

а именно:

Три темы НИР, финансируемые из госзадания ФГБНУ "МГНЦ", и данный проект в случае его поддержки.

(указываются в том числе грантодатели или заказчики проектов и источник финансирования, например – государственное задание учредителя, гранты РФФИ, ФПИ, РНФ, иных фондов или иных организаций, государственный контракт (заказчик, программа), иной хозяйственный договор, иные гранты и субсидии).

**2.15. Доля рабочего времени, которую планируется выделить на руководство данным проектом в случае победы в конкурсе Фонда -**

25 процентов.

Имеется в виду – от полной занятости в рамках трудовых или гражданско-правовых правоотношений, т.е. занятость в свободное от основной работы время также должна учитываться.

**2.16. Предполагаемая форма трудовых отношений с организацией, через которую будет осуществляться финансирование:**

*Организация будет являться основным местом работы (характер работы – не дистанционный):* **да;**

*Трудовой договор по совместительству (характер работы – не дистанционный):* **нет;**

*Трудовой договор о дистанционной работе (место осуществления трудовой деятельности расположено\*\* на территории Российской Федерации):* **нет.**

*\*\*Трудовой кодекс Российской Федерации не предусматривает возможность заключения трудового договора о дистанционной работе с гражданином, проживающим и осуществляющим трудовую деятельность за пределами территории Российской Федерации.*

**2.17. Опыт образовательной деятельности за последние 5 лет (указывается информация о руководстве аспирантами, адъюнктами, интернами, ординаторами, разработке и чтении новых образовательных курсов в российских и зарубежных вузах)**

Доцент кафедры молекулярной и клеточной генетики, Медико-биологический факультет, ГБОУ ВПО РНИМУ им.

Н.И.Пирогова - 2016-2019

Разработка программы по генетике для Международного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова

Руководство аспирантами: 2008-2011 С.А. Смирнихина "Анализ трансфекции VEGF121 в МСК человека с использованием невирусных методов"; 2009 – 2012 Яна Вольдгорн, "Изучение особенностей положения хромосом 6, 12, 18 и X в ядрах мезенхимных стволовых клеток в зависимости от направления дифференцировки и сроков культивирования"; 2013 - н.в. Э.П. Адильгереева "Анализ выявленных полноэкзомным секвенированием прогностических маркеров ответа на таргетную терапию при хроническом миелоидном лейкозе"; 2017 - н.в. А.А. Анучина "Совершенствование эффективности геномной репарации при геномном редактировании"; 2019 - н.в. А.В. Иванова "Разработка методов геномного редактирования мутации в дисферлине методом кзонном скиппинга"

**2.18. Почтовый адрес**

115191, Татищева, 5-28

**2.19. Контактный телефон**

+79161139047

**2.20. Электронный адрес (E-mail)**

avlavrov@yandex.ru

**2.21. Участие в проекте:**

Руководитель проекта

**2.22. Файлы с дополнительной информацией (резюме, другая дополнительная информация, которая, по мнению**

*руководителя проекта, может быть полезна для принятия решения о целесообразности финансирования данного проекта)*

**В формате pdf, до 3 Мб.**

*на русском языке*

Файл, скачать

*на английском языке*

Файл (en), скачать

С условиями конкурса Фонда (в том числе, с пунктами 6 и 7 конкурсной документации) ознакомлен и согласен.  
Подтверждаю свое участие в проекте.

Фамилия, имя и отчество	Лавров Александр Вячеславович
Данные документа, удостоверяющего личность*** (серия, номер, сведения о дате и органе выдачи)	<div></div> <div></div> <div></div> <div>Внимание! Данное поле заполняется вручную в печатном экземпляре заявки. Заполнение обязательно!</div>
Адрес проживания	115191, Татищева, 5-28
Оператор персональных данных	Российский научный фонд

Я выражаю согласие\*\*\*\* на обработку указанным выше оператором персональных данных, внесенных в настоящую форму мною лично.

Обработка Российским научным фондом (адрес: г. Москва, ул. Солянка, д. 14, строение 3) указанных выше персональных данных может осуществляться **посредством** их сбора, систематизации, накопления, хранения, уточнения, использования, блокирования, распространения на официальном сайте Российского научного фонда, передачи и уничтожения **с целью** проведения экспертизы заявок на конкурсы, проводимые Российским научным фондом, экспертизы проектов и программ, финансируемых Российским научным фондом, подготовки аналитических материалов по конкурсам, долговременного сохранения документированной информации об участниках программ, получивших финансирование Российского научного фонда, общедоступного раскрытия информации о руководителях программ и проектов, финансируемых Российским научным фондом. Указанная обработка моих данных может осуществляться в течение 75 лет со дня заполнения настоящей формы в печатной форме. Хранение настоящей формы может быть поручено ООО «РАЙСВОЛФ» (107150, Москва, ул. Бойцовая, д. 22), оказывающему Российскому научному фонду услуги архивного хранения документов. Настоящее согласие может быть отозвано посредством направления на указанный выше адрес оператора персональных данных заявления с требованием о прекращении обработки персональных данных. Заявление должно содержать номер документа, удостоверяющего личность субъекта персональных данных; сведения о дате выдачи указанного документа и выдавшем его органе, а также собственноручную подпись субъекта персональных данных.

\*\*\* Непредставление данных документа, удостоверяющего личность, является основанием недопуска заявки к конкурсу.

\*\*\*\* Заполнение является обязательным в соответствии с требованиями Федерального закона от 27 июля 2006 г. №152-ФЗ «О персональных данных».

Подпись руководителя проекта \_\_\_\_\_/А.В. Лавров/

Дата подписания «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

## Форма 2. Сведения об основном исполнителе проекта

### 2.1. Фамилия, имя, отчество (при наличии)

*на русском языке*

Анучина Арина Артуровна

*на английском языке фамилия и инициалы*

Anuchina A.A.

### WoS ResearcherID (при наличии)

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу [www.ResearcherID.com](http://www.ResearcherID.com).

---

### Scopus AuthorID (при наличии)

Scopus AuthorID формируется в базе данных Scopus автоматически при появлении у автора хотя бы одной статьи в данной базе. AuthorID указан в авторском профиле, который становится доступен, если при поиске автора в базе данных Scopus (Author Search) в результатах поиска нажать на фамилию автора.

---

### ORCID (при наличии)

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу [orcid.org](http://orcid.org).

---

### 2.2. Дата рождения (указывается цифрами – число, месяц, год)

15.02.1995

### 2.3. Гражданство

РОССИЯ

### 2.4. Ученая степень, год присуждения

В случае наличия нескольких ученых степеней, указывается та из них, которая наиболее соответствует тематике проекта.

### 2.5. Награды и премии за научную деятельность, членство в ведущих научных сообществах (при наличии), участие в редколлегиях ведущих рецензируемых научных изданий (при наличии)

### 2.6. Основное место работы на момент подачи заявки – должность, полное наименование организации (сокращенное наименование организации)

научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова" (ФГБНУ "МГНЦ", г Москва)

### 2.7. Область научных интересов – ключевые слова (приводится не более 15 ключевых слов)

*на русском языке*

генетика человека, медицинская генетика, редактирование генома, генная терапия, CRISPR-Cas9

*на английском языке*

Human genetics, medical genetics, gene editing, gene therapy, CRISPR-Cas9

### 2.8. Область научных интересов – коды по классификатору Фонда

04-104 04-201 04-208 04-209 04-210

### 2.9. Общее число публикаций за период с 1 января 2016 года, 17, из них:

9 - опубликовано в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection или Scopus.

2.10. Список публикаций основного исполнителя проекта с 1 января 2016 года (монографии, результаты интеллектуальной деятельности, имеющие правовую охрану, публикации в ведущих рецензируемых научных изданиях, публикации в изданиях, индексируемых в системах цитирования Web of Science Core Collection, Scopus, приводится не более 10 публикаций, при наличии публикации в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» указывается ссылка на нее (обязательно для публикаций в индексируемых изданиях), указывается, при наличии, импакт-фактор

научного издания (по JCR Science Edition, JCR Social Sciences Edition или SJR))

Пункт не является обязательным к заполнению. Могут приводиться публикации, свидетельствующие о научной квалификации и достижениях.  
на английском языке

2020 TIRR: a potential front runner in HDR race-hypotheses and perspectives

A. A. Anuchina, A. V. Lavrov & S. A. Smirnikhina

в журнале Molecular Biology Reports

2019 ePS1.01 F508del correction in iPSCs obtained from patient with cystic fibrosis by CRISPR/Cas9

S. Smirnikhina, A. Anuchina, E. Adilgereeva, E. Amelina, E. Kondrateva, K. Ustinov, M. Yasinovsky, K. Kochergin-Nikitsky, M. Zainitdinova, I. Mozgovoy, A. Lavrov

в журнале Journal of Cystic Fibrosis 18:S39

2019 Receiving induced pluripotent stem cells from fibroblasts of patients with cystic fibrosis

E. V. Kondrateva, E. P. Adilgereeva, E. L. Amelina, V. Yu. Tabakov, A. A. Anuchina, K. D. Ustinov, M. I. Yasinovsky, E. S. Voronina, A. V. Lavrov, S. A. Smirnikhina

в журнале Siberian Medical Review (2):95-101.

2018 Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies

Svetlana Smirnikhina, Arina Anuchina, Alexander V. Lavrov.

в журнале Human Genetics

2018 Development of effective method for F508del mutation correction using CRISPR/Cas9

Svetlana Smirnikhina, Arina Anuchina, Elmira P. Adilgereeva, Konstantin Kochergin-Nikitsky, Alexander V. Lavrov.

в журнале Journal of Cystic Fibrosis

2018 Experimental approaches to the target editing of the CFTR gene using CRISPR-Cas9

S. Smirnikhina, A. Anuchina, K. Kochergin-Nikitsky, E. Adilgereeva, V.D. Yakushina, A. Lavrov.

в журнале Bulletin of RSMU, №2, с. 15-21

2017 Genetics of migraine - is there any progress?

Eugene Klimov, Natalia Kondratieva, Arina Anuchina, Kirill Skorobogatykh, Julia Azimova, Alexey Sergeev, Elena Naumova, Olga Rudko, Zarema Kokaeva, Anna Soboleva, Vladimir Sobolev, Gyuzyal Tabeeva

в журнале Journal of Neurology & Stroke, издательство MedCrave Group (Edmond), том 7, № 4, с. 1-9

2016 Biomarkers of migraine: Part 1 – Genetic markers

Kondratieva N., Azimova J., Skorobogatykh K., Sergeev A., Naumova E., Kokaeva Z., Anuchina A., Rudko O., Tabeeva G., Klimov E.

в журнале Journal of the Neurological Sciences, издательство Elsevier BV (Netherlands), том 369, с. 63-76 DOI

Для русскоязычных названий сведения приводятся на русском языке и в переводе на английский язык. При этом должно быть понятно, что речь идет об одном и том же документе (например, добавляйте слово «перевод»).

**2.11. Опыт выполнения научных проектов** (указываются наименования фондов (организаций), их местонахождение (страна), форма участия, номера, названия проектов и сроки выполнения за последние 5 лет)  
на русском языке

РФФИ: 19-34-90130 (Аспиранты) Подходы к повышению эффективности направленной гомологичной репарации при геномном редактировании, 2019-2021

РФФИ: 19-29-04044 (мк) Создание клеточных моделей на основе культивируемых клеток больных врожденным буллезным эпидермолизом и выявления механизмов патологических процессов с применением генетической модификации как средства лечения, 2019-2021

РНФ: 17-75-20095 Разработка эффективного способа коррекции мутации F508del при муковисцидозе с помощью геномного редактирования, 2017-2020

## 2.12. Планируемое участие в научных проектах (в любом качестве) в 2021 году

Общее количество – 3, из них:

руководство – 0, участие в качестве исполнителя – 3,

а именно:

РФФИ: 19-34-90130 (Аспиранты) Подходы к повышению эффективности направленной гомологичной репарации при геномном редактировании, 2019-2021

РФФИ: 19-29-04044 (мк) Создание клеточных моделей на основе культивируемых клеток больных врожденным буллезным эпидермолизом и выявления механизмов патологических процессов с применением генетической модификации как средства лечения, 2019-2021

РНФ: Перманентный экзон-скиппинг для лечения поясно-конечностной мышечной дистрофии, тип 2B, 2021-2023

(указываются в том числе грантодатели или заказчики проектов и источник финансирования, например – государственное задание учредителя, гранты РФФИ, ФПИ, РНФ, иных фондов или иных организаций, государственный контракт (заказчик, программа), иной хозяйственный договор, иные гранты и субсидии).

## 2.13. Доля рабочего времени, которую планируется выделить на участие в данном проекте в случае победы в конкурсе Фонда -

20 процентов.

Имеется в виду – от полной занятости в рамках трудовых или гражданско-правовых правоотношений, т.е. занятость в свободное от основной работы время также должна учитываться.

## 2.14. Участие в образовательной деятельности (указывается информация о руководстве аспирантами, адъюнктами, интернами, ординаторами, разработке и чтении новых образовательных курсов в российских и зарубежных вузах)

## 2.15. В 2019 или в 2020 годах участвовал в качестве руководителя проекта, финансируемого Фондом, или исполнителя проекта, финансируемого Фондом, в следующих проектах (при наличии):

Являлся исполнителем проекта № 17-75-20095, 2017-2019 гг.

## 2.16. Контактный телефон, электронный адрес (E-mail)

+79163960574, arinate@mail.ru

## 2.17. Участие в проекте:

Основной исполнитель проекта

С условиями конкурса Фонда (в том числе, с пунктами 7 и 8 конкурсной документации) ознакомлен и согласен.  
Подтверждаю свое участие в проекте.

Фамилия, имя и отчество	Анучина Арина Артуровна
Данные документа, удостоверяющего личность*** (серия, номер, сведения о дате и органе выдачи)	<div></div> <div></div> <div></div> <div>Внимание! Данное поле заполняется вручную в печатном экземпляре заявки. Заполнение обязательно!</div>
Адрес проживания	Россия, 117303, ул. Каховка, 5к2
Оператор персональных данных	Российский научный фонд

Я выражаю согласие\*\*\*\* на обработку указанным выше оператором персональных данных, внесенных в настоящую форму мною лично.

Обработка Российским научным фондом (адрес: г. Москва, ул. Солянка, д. 14, строение 3) указанных выше персональных данных может осуществляться **посредством** их сбора, систематизации, накопления, хранения, уточнения, использования, блокирования, распространения на официальном сайте Российского научного фонда, передачи и уничтожения **с целью** проведения экспертизы заявок на конкурсы, проводимые Российским научным фондом, экспертизы проектов и программ, финансируемых Российским научным фондом, подготовки аналитических материалов по конкурсам, долговременного сохранения документированной информации об участниках программ, получивших финансирование Российского научного фонда, общедоступного раскрытия информации о руководителях программ и проектов, финансируемых Российским научным фондом. Указанная обработка моих данных может осуществляться в течение 75 лет со дня заполнения настоящей формы в печатной форме. Хранение настоящей формы может быть поручено ООО «РАЙСВОЛФ» (107150, Москва, ул. Бойцовая, д. 22), оказывающему Российскому научному фонду услуги архивного хранения документов. Настоящее согласие может быть отозвано посредством направления на указанный выше адрес оператора персональных данных заявления с требованием о прекращении обработки персональных данных. Заявление должно содержать номер документа, удостоверяющего личность субъекта персональных данных; сведения о дате выдачи указанного документа и выдавшем его органе, а также собственноручную подпись субъекта персональных данных.

\*\*\* Непредставление данных документа, удостоверяющего личность, является основанием недопуска заявки к конкурсу.

\*\*\*\* Заполнение является обязательным в соответствии с требованиями Федерального закона от 27 июля 2006 г. №152-ФЗ «О персональных данных».

Подпись исполнителя проекта \_\_\_\_\_/А.А. Анучина/

Дата подписания «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.



## Форма 2. Сведения об основном исполнителе проекта

### 2.1. Фамилия, имя, отчество (при наличии)

*на русском языке*

Деев Роман Вадимович

*на английском языке фамилия и инициалы*

Deev R.

### WoS ResearcherID (при наличии)

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу [www.ResearcherID.com](http://www.ResearcherID.com).

<https://publons.com/researcher/L-1658-2015/>

### Scopus AuthorID (при наличии)

Scopus AuthorID формируется в базе данных Scopus автоматически при появлении у автора хотя бы одной статьи в данной базе. AuthorID указан в авторском профиле, который становится доступен, если при поиске автора в базе данных Scopus (Author Search) в результатах поиска нажать на фамилию автора.

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorid=6506120085>

### ORCID (при наличии)

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу [orcid.org](http://orcid.org).

<https://orcid.org/0000-0001-8389-3841>

### 2.2. Дата рождения (указывается цифрами – число, месяц, год)

12.01.1979

### 2.3. Гражданство

РОССИЯ

### 2.4. Ученая степень, год присуждения

В случае наличия нескольких ученых степеней, указывается та из них, которая наиболее соответствует тематике проекта.

Кандидат медицинских наук, 2006

### 2.5. Награды и премии за научную деятельность, членство в ведущих научных сообществах (при наличии), участие в редколлегиях ведущих рецензируемых научных изданий (при наличии)

Главный редактор журнала "Гены и клетки"

### 2.6. Основное место работы на момент подачи заявки – должность, полное наименование организации (сокращенное наименование организации)

заведующий кафедрой, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, г Санкт-Петербург)

### 2.7. Область научных интересов – ключевые слова (приводится не более 15 ключевых слов)

*на русском языке*

регенеративная медицина, клеточная биология, гистология, патогистология, костная ткань, мышечная ткань, хрящ, генная терапия

*на английском языке*

regenerative medicine, cell biology, histology, histopathology, bone tissue, muscle tissue, cartilage, gene therapy,

### 2.8. Область научных интересов – коды по классификатору Фонда

05-101 05-102 05-103

### 2.9. Общее число публикаций за период с 1 января 2016 года, 188, из них:

12 - опубликовано в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection или Scopus.

**2.10. Список публикаций основного исполнителя проекта с 1 января 2016 года** (монографии, результаты интеллектуальной деятельности, имеющие правовую охрану, публикации в ведущих рецензируемых научных изданиях, публикации в изданиях, индексируемых в системах цитирования *Web of Science Core Collection*, *Scopus*, приводится не более 10 публикаций, при наличии публикации в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» указывается ссылка на нее (обязательно для публикаций в индексируемых изданиях), указывается, при наличии, импакт-фактор научного издания (по *JCR Science Edition*, *JCR Social Sciences Edition* или *SJR*))

Пункт не является обязательным к заполнению. Могут приводиться публикации, свидетельствующие о научной квалификации и достижениях.  
на английском языке

1. Deev, R.V., Bozo, I.Y., Mzhavanadze, N.D., (...), Shvalb, P.G., Isaev, A.A. PCMV- vegf165 Intramuscular Gene Transfer is an Effective Method of Treatment for Patients with Chronic Lower Limb Ischemia. 2015 Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics. 20(5), p. 473-482. [Q2]
2. Deev, R.V., Drobyshev, A.Y., Bozo, I.Y., Isaev, A.A. Ordinary and Activated Bone Grafts: Applied Classification and the Main Features. 2015 BioMed Research International 2015,365050. [Q2]
3. Bozo, I.Y., Deev, R.V., Drobyshev, A.Y., Isaev, A.A., Eremin, I.I. World's First Clinical Case of Gene-Activated Bone Substitute Application. 2016 Case Reports in Dentistry. 2016, 8648949. [Q3]
4. Khaiboullina, S.F., Martynova, E.V., Bardakov, S.N., (...), Deev, R.V., Rizvanov, A.A. Serum Cytokine Profile in a Patient Diagnosed with Dysferlinopathy. 2017 Case Reports in Medicine. 2017, 3615354. [Q3]
5. Zorin, V., Zorina, A., Cherkasov, V., Deev R.V., Kopnin, P., Isaev, A. Clinical-instrumental and morphological evaluation of the effect of autologous dermal fibroblasts administration. 2017 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 11(3), p. 778-786. [Q1]
6. Umakhanova, Z.R., Bardakov, S.N., Mavlikeev, M.O., (...), Isaev, A.A., Deev, R.V. Twenty-year clinical progression of dysferlinopathy in patients from Dagestan. 2017 Frontiers in Neurology 8(MAR),77. [Q2]
7. Deev, R., Plaksa, I., Bozo, I., Isaev, A. Results of an International Postmarketing Surveillance Study of pl-VEGF165 Safety and Efficacy in 210 Patients with Peripheral Arterial Disease. 2017 American Journal of Cardiovascular Drugs. 17(3), p. 235-242 [Q1]
8. Isaev, A.A., Deev, R.V., Kuliev, A., (...), Bozo, I.Y., Afanasyev, B.V. First experience of hematopoietic stem cell transplantation treatment of Shwachman-Diamond syndrome using unaffected HLA-matched sibling donor produced through preimplantation HLA typing. 2017 Bone Marrow Transplantation, 52(9), p. 1249-1252. [Q1]
9. Deev RV, Bardakov SN, Mavlikeev MO, Yakovlev IA, Umakhanova ZR, Akhmedova PG, Magomedova RM, Chekmaryeva IA, Dalgatov GD, Isaev AA. Glu20Ter Variant in PLEC 1f Isoform Causes Limb-Girdle Muscle Dystrophy with Lung Injury. Front Neurol. 2017 Jul 31;8:367. doi: 10.3389/fneur.2017.00367. [Q2]
10. Mavlikeev M, Titova A, Saitburkhanova R, Abyzova M, Sayfutdinov I, Gizzatullina N, Kotov I, Plaksa I, Isaev A, Abdulkhakov S, Kiyasov A, Deev R. Caroli syndrome: a clinical case with detailed histopathological analysis. Clin J Gastroenterol. 2019 Apr;12(2):106-111. doi: 10.1007/s12328-018-0917-6. [Q3]
11. Zhuravleva M, Gilazieva Z, Grigoriev TE, Shepelev AD, Kh Tenchurin T, Kamyshinsky R, Krashennnikov SV, Orlov S, Caralogli G, Archipova S, Holterman MJ, Mavlikeev M, Deev RV, Chvalun SN, Macchiarini P. In vitro assessment of electrospun polyamide-6 scaffolds for esophageal tissue engineering. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2019 Feb;107(2):253-268. doi: 10.1002/jbm.b.34116. [Q2]
12. Novikova OA, Nazarkina ZK, Cherepanova AV, Laktionov PP, Chelobanov BP, Murashov IS, Deev RV, Pokushalov EA, Karpenko AA, Laktionov PP. Isolation, culturing and gene expression profiling of inner mass cells from stable and vulnerable carotid atherosclerotic plaques. PLoS One. 2019 Jun 26;14(6):e0218892. doi: 10.1371/journal.pone.0218892. [Q1]
13. Solovyeva VV, Chulpanova DS, Tazetdinova LG, Salafutdinov II, Bozo IY, Isaev AA, Deev RV, Rizvanov AA. In Vitro Angiogenic Properties of Plasmid DNA Encoding SDF-1 $\alpha$  and VEGF165 Genes. Appl Biochem Biotechnol. 2019 Sep 7. doi:

14. Smirnov I.V., Deev R.V., Bozo I.I., Fedotov A.Y., Gurin A.N., Mamonov V.E., Kravchuk A.D., Popov V.K., Egorov A.A., Komlev V.S. Octacalcium phosphate coating for 3D printed cranioplastic porous titanium implants. Surface and Coatings Technology. 2019; <http://doi.org/10.106/j.surfcoat.2019.125192>. [Q1]

15. Bozo IY, Deev RV, Smirnov IV, Fedotov AY, Popov VK, Mironov AV, Mironova OA, Gerasimenko AY, Komlev VS. 3D Printed Gene-activated Octacalcium Phosphate Implants for Large Bone Defects Engineering. Int J Bioprint . 2020 Jun 3;6(3):275. doi: 10.18063/ijb.v6i3.275. [Q1]

Для русскоязычных названий сведения приводятся на русском языке и в переводе на английский язык. При этом должно быть понятно, что речь идет об одном и том же документе (например, добавляйте слово «перевод»).

**2.11. Опыт выполнения научных проектов** (указываются наименования фондов (организаций), их местонахождение (страна), форма участия, номера, названия проектов и сроки выполнения за последние 5 лет)  
на русском языке

- 2013-2015 – договор (контракт) №12184 р/23097 с ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по проекту № 23097 от 23 августа 2013 года «Разработка синтетических остеопластических материалов с регулируемой биоактивностью для замещения и регенерации костной ткани» (ключевой член команды проекта).
- 2014-2016 – грант Российского научного фонда №14-25-00166 «Слизистая оболочка десны как альтернативный источник получения миобластов - изучение морфо-функциональных свойств и возможностей их применения в регенеративной медицине» (ключевой член команды проекта).
- 2015-2017 – грант Российского научного фонда №15-13-00108 «Персонализированные генно-инженерные конструкции для регенерации костных тканей» (ключевой член команды проекта).
- 2015-2017 – грант Российского фонда фундаментальных исследований №16-34-00440 «Исследование молекулярных и межклеточных взаимодействий в ходе раннего этапа репаративного остеогенеза при травматическом повреждении костей» (участник команды проекта)..
- 2016-2017 – договор (контракт) №1622 ГС1/24341 с ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по проекту №24341 от 21 октября 2016 года «Разработка и внедрение оптимизированных ген-активированных материалов для костной пластики» (участник команды проекта)..
- 2017-2020 гг. – грант Российского научного фонда №17-75-30066 «Возможности использования стромальных клеток десны в регенеративной медицине» (участник команды проекта).

на английском языке

- 2013-2015 - contract (contract) No. 12184 p / 23097 with the FGBU Fund for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere to carry out research and development work under Project No. 23097 of August 23, 2013, "Development synthetic osteoplastic materials with regulated bio-activity for replacement and regeneration of bone tissue "(key member of the project team).
- 2014-2016 - grant of the Russian Scientific Foundation No. 14-25-00166 "Mucous membrane of the gum as an alternative source for obtaining myoblasts - study of morpho-functional properties and possibilities of their application in regenerative medicine" (key member of the project team).
- 2015-2017 - the grant of the Russian Scientific Foundation No. 15-13-00108 "Personalized genetic engineering structures for the regeneration of bone tissue" (key member of the project team).
- 2015-2017 - grant of the Russian Foundation for Basic Research No. 16-34-00440 "Investigation of molecular and intercellular interactions during the early stage of reparative osteohistogenesis in traumatic bone injuries" (member of the project team) ..
- 2016-2017 - contract (contract) No. 1622 ГС1 / 24341 with FGBU "Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Scientific and Technical Sphere" for performing research and development work on Project No. 24341 of October 21, 2016 "Development and the introduction of optimized gene-activated materials for bone grafting "(project team member) ..
- 2017-2020 - grant of the Russian Scientific Foundation No. 17-75-30066 "Possibilities of using stromal gum cells in regenerative medicine" (participant of the project team).

## **2.12. Планируемое участие в научных проектах (в любом качестве) в 2021 году**

Общее количество – 1, из них:

руководство – 0, участие в качестве исполнителя – 1,

а именно:

Перманентный экзон-скиппинг для лечения поясно-конечностной мышечной дистрофии, тип 2В

(указываются в том числе грантодатели или заказчики проектов и источник финансирования, например – государственное задание учредителя, гранты РФФИ, ФПИ, РНФ, иных фондов или иных организаций, государственный контракт (заказчик, программа), иной хозяйственный договор, иные гранты и субсидии).

## **2.13. Доля рабочего времени, которую планируется выделить на участие в данном проекте в случае победы в конкурсе Фонда -**

25 процентов.

Имеется в виду – от полной занятости в рамках трудовых или гражданско-правовых правоотношений, т.е. занятость в свободное от основной работы время также должна учитываться.

## **2.14. Участие в образовательной деятельности** *(указывается информация о руководстве аспирантами, адъюнктами, интернами, ординаторами, разработке и чтении новых образовательных курсов в российских и зарубежных вузах)*

Заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО "Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова" Минздрава России

## **2.15. В 2019 или в 2020 годах участвовал в качестве руководителя проекта, финансируемого Фондом, или исполнителя проекта, финансируемого Фондом, в следующих проектах (при наличии):**

## **2.16. Контактный телефон, электронный адрес (E-mail)**

+79651471364, romdey@gmail.com

## **2.17. Участие в проекте:**

Основной исполнитель проекта

С условиями конкурса Фонда (в том числе, с пунктами 7 и 8 конкурсной документации) ознакомлен и согласен.  
Подтверждаю свое участие в проекте.

Фамилия, имя и отчество	Деев Роман Вадимович
Данные документа, удостоверяющего личность*** (серия, номер, сведения о дате и органе выдачи)	<div></div> <div></div> <div></div> <div>Внимание! Данное поле заполняется вручную в печатном экземпляре заявки. Заполнение обязательно!</div>
Адрес проживания	192174 Санкт-Петербург, пр. Обуховской обороны, д. 197, кв. 131
Оператор персональных данных	Российский научный фонд

Я выражаю согласие\*\*\*\* на обработку указанным выше оператором персональных данных, внесенных в настоящую форму мною лично.

Обработка Российским научным фондом (адрес: г. Москва, ул. Солянка, д. 14, строение 3) указанных выше персональных данных может осуществляться **посредством** их сбора, систематизации, накопления, хранения, уточнения, использования, блокирования, распространения на официальном сайте Российского научного фонда, передачи и уничтожения **с целью** проведения экспертизы заявок на конкурсы, проводимые Российским научным фондом, экспертизы проектов и программ, финансируемых Российским научным фондом, подготовки аналитических материалов по конкурсам, долговременного сохранения документированной информации об участниках программ, получивших финансирование Российского научного фонда, общедоступного раскрытия информации о руководителях программ и проектов, финансируемых Российским научным фондом. Указанная обработка моих данных может осуществляться в течение 75 лет со дня заполнения настоящей формы в печатной форме. Хранение настоящей формы может быть поручено ООО «РАЙСВОЛФ» (107150, Москва, ул. Бойцовая, д. 22), оказывающему Российскому научному фонду услуги архивного хранения документов. Настоящее согласие может быть отозвано посредством направления на указанный выше адрес оператора персональных данных заявления с требованием о прекращении обработки персональных данных. Заявление должно содержать номер документа, удостоверяющего личность субъекта персональных данных; сведения о дате выдачи указанного документа и выдавшем его органе, а также собственноручную подпись субъекта персональных данных.

\*\*\* Непредставление данных документа, удостоверяющего личность, является основанием недопуска заявки к конкурсу.

\*\*\*\* Заполнение является обязательным в соответствии с требованиями Федерального закона от 27 июля 2006 г. №152-ФЗ «О персональных данных».

Подпись исполнителя проекта \_\_\_\_\_/Р.В. Деев/

Дата подписания «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

## Форма 2. Сведения об основном исполнителе проекта

### 2.1. Фамилия, имя, отчество (при наличии)

*на русском языке*

Иванова Алиса Владимировна

*на английском языке фамилия и инициалы*

Ivanova A.V.

### WoS ResearcherID (при наличии)

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу [www.ResearcherID.com](http://www.ResearcherID.com).

---

### Scopus AuthorID (при наличии)

Scopus AuthorID формируется в базе данных Scopus автоматически при появлении у автора хотя бы одной статьи в данной базе. AuthorID указан в авторском профиле, который становится доступен, если при поиске автора в базе данных Scopus (Author Search) в результатах поиска нажать на фамилию автора.

---

### ORCID (при наличии)

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу [orcid.org](http://orcid.org).

<https://orcid.org/0000-0002-8954-7330>

### 2.2. Дата рождения (указывается цифрами – число, месяц, год)

16.06.1994

### 2.3. Гражданство

РОССИЯ

### 2.4. Ученая степень, год присуждения

В случае наличия нескольких ученых степеней, указывается та из них, которая наиболее соответствует тематике проекта.

### 2.5. Награды и премии за научную деятельность, членство в ведущих научных сообществах (при наличии), участие в редколлегиях ведущих рецензируемых научных изданий (при наличии)

### 2.6. Основное место работы на момент подачи заявки – должность, полное наименование организации (сокращенное наименование организации)

младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова" (ФГБНУ "МГНЦ", г Москва)

### 2.7. Область научных интересов – ключевые слова (приводится не более 15 ключевых слов)

*на русском языке*

медицинская генетика, CRISPR/Cas9, редактирование генома, молекулярная биология, мышечные дистрофии, генная терапия

*на английском языке*

medical genetics, CRISPR/Cas9, genome editing, molecular biology, muscular dystrophies, gene therapy

### 2.8. Область научных интересов – коды по классификатору Фонда

05-402

### 2.9. Общее число публикаций за период с 1 января 2016 года, 0, из них:

0 - опубликовано в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection или Scopus.

2.10. Список публикаций основного исполнителя проекта с 1 января 2016 года (монографии, результаты интеллектуальной деятельности, имеющие правовую охрану, публикации в ведущих рецензируемых научных изданиях, публикации в изданиях, индексируемых в системах цитирования Web of Science Core Collection, Scopus, приводится не более 10 публикаций, при наличии публикации в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» указывается

*ссылка на нее (обязательно для публикаций в индексируемых изданиях), указывается, при наличии, импакт-фактор научного издания (по JCR Science Edition, JCR Social Sciences Edition или SJR))*

Пункт не является обязательным к заполнению. Могут приводиться публикации, свидетельствующие о научной квалификации и достижениях.

*на английском языке*

Для русскоязычных названий сведения приводятся на русском языке и в переводе на английский язык. При этом должно быть понятно, что речь идет об одном и том же документе (например, добавляйте слово «перевод»).

**2.11. Опыт выполнения научных проектов** *(указываются наименования фондов (организаций), их местонахождение (страна), форма участия, номера, названия проектов и сроки выполнения за последние 5 лет)*

*на русском языке*

*на английском языке*

## **2.12. Планируемое участие в научных проектах (в любом качестве) в 2021 году**

Общее количество – 2, из них:

руководство – 0, участие в качестве исполнителя – 2,

а именно:

госзадание, данная заявка РНФ

(указываются в том числе грантодатели или заказчики проектов и источник финансирования, например – государственное задание учредителя, гранты РФФИ, ФПИ, РНФ, иных фондов или иных организаций, государственный контракт (заказчик, программа), иной хозяйственный договор, иные гранты и субсидии).

**2.13. Доля рабочего времени, которую планируется выделить на участие в данном проекте в случае победы в конкурсе Фонда -**

35 процентов.

Имеется в виду – от полной занятости в рамках трудовых или гражданско-правовых правоотношений, т.е. занятость в свободное от основной работы время также должна учитываться.

**2.14. Участие в образовательной деятельности** *(указывается информация о руководстве аспирантами, адъюнктами, интернами, ординаторами, разработке и чтении новых образовательных курсов в российских и зарубежных вузах)*

**2.15. В 2019 или в 2020 годах участвовал в качестве руководителя проекта, финансируемого Фондом, или исполнителя проекта, финансируемого Фондом, в следующих проектах (при наличии):**

**2.16. Контактный телефон, электронный адрес (E-mail)**

+79164964612, bioyoghurtneo@yandex.ru

**2.17. Участие в проекте:**

Основной исполнитель проекта

С условиями конкурса Фонда (в том числе, с пунктами 7 и 8 конкурсной документации) ознакомлен и согласен.  
Подтверждаю свое участие в проекте.

Фамилия, имя и отчество	Иванова Алиса Владимировна
Данные документа, удостоверяющего личность *** (серия, номер, сведения о дате и органе выдачи)	<div></div> <div></div> <div></div> <div>Внимание! Данное поле заполняется вручную в печатном экземпляре заявки. Заполнение обязательно!</div>
Адрес проживания	109451, гор. Москва, ул. Братиславская, д. 14, кв. 543
Оператор персональных данных	Российский научный фонд

Я выражаю согласие\*\*\*\* на обработку указанным выше оператором персональных данных, внесенных в настоящую форму мною лично.

Обработка Российским научным фондом (адрес: г. Москва, ул. Солянка, д. 14, строение 3) указанных выше персональных данных может осуществляться **посредством** их сбора, систематизации, накопления, хранения, уточнения, использования, блокирования, распространения на официальном сайте Российского научного фонда, передачи и уничтожения **с целью** проведения экспертизы заявок на конкурсы, проводимые Российским научным фондом, экспертизы проектов и программ, финансируемых Российским научным фондом, подготовки аналитических материалов по конкурсам, долговременного сохранения документированной информации об участниках программ, получивших финансирование Российского научного фонда, общедоступного раскрытия информации о руководителях программ и проектов, финансируемых Российским научным фондом. Указанная обработка моих данных может осуществляться в течение 75 лет со дня заполнения настоящей формы в печатной форме. Хранение настоящей формы может быть поручено ООО «РАЙСВОЛФ» (107150, Москва, ул. Бойцовая, д. 22), оказывающему Российскому научному фонду услуги архивного хранения документов. Настоящее согласие может быть отозвано посредством направления на указанный выше адрес оператора персональных данных заявления с требованием о прекращении обработки персональных данных. Заявление должно содержать номер документа, удостоверяющего личность субъекта персональных данных; сведения о дате выдачи указанного документа и выдавшем его органе, а также собственноручную подпись субъекта персональных данных.

\*\*\* Непредставление данных документа, удостоверяющего личность, является основанием недопуска заявки к конкурсу.

\*\*\*\* Заполнение является обязательным в соответствии с требованиями Федерального закона от 27 июля 2006 г. №152-ФЗ «О персональных данных».

Подпись исполнителя проекта \_\_\_\_\_/А.В. Иванова/

Дата подписания «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.



## Форма 3. Сведения об организации

собираются автоматически на основе регистрационных данных организации, через которую будет осуществляться финансирование ("Форма Т")

### 3.1. Полное наименование *(приводится в соответствии с регистрационными документами)*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова"

### 3.2. Сокращенное наименование

ФГБНУ "МГНЦ"

### 3.3. Наименование на английском языке

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics"

### 3.4. Организационно-правовая форма *(указывается по ОКОПФ)*

Федеральные государственные бюджетные учреждения

### 3.5. Форма собственности *(указывается по ОКФС)*

Федеральная собственность

### 3.6. Ведомственная принадлежность

Министерство науки и высшего образования РФ

### 3.7. ИНН, КПП, ОГРН, ОКТМО

7724181700, 772401001, 1027739609480, 45917000

### 3.8. Адрес

115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

### 3.9. Фактический адрес

115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

### 3.10. Субъект Российской Федерации

г Москва

### 3.11. Должность, фамилия, имя, отчество *(при наличии) руководителя организации*

Директор, Куцев Сергей Иванович

### 3.12. Контактный телефон

4996128607

### 3.13. Электронный адрес *(E-mail)*

mgnc@med-gen.ru

### Руководитель организации подтверждает, что:

- ознакомлен с условиями конкурса Фонда и согласен на финансирование проекта, в случае его поддержки, через организацию;
- согласен с пунктами 8, 14, 33, 35, 36 конкурсной документации, иными условиями конкурса;
- подтверждает сведения о руководителе проекта, изложенные в данной заявке;
- организация исполняет обязательства по уплате налогов в бюджеты всех уровней и обязательных платежей в государственные внебюджетные фонды, платежеспособна, не находится в процессе ликвидации, не признана несостоятельной (банкротом), на ее имущество не наложен арест и ее экономическая деятельность не приостановлена;
- в случае признания заявки победителем организация берет на себя следующие обязательства:
  - заключить с членами научного коллектива гражданско-правовые или трудовые (срочные трудовые) договоры;  
Если таковые не заключены ранее. В случае, если член научного коллектива не является гражданином Российской Федерации, организацией должны быть выполнены все процедуры, предусмотренные законодательством Российской Федерации при трудоустройстве иностранных граждан.
  - по поручению руководителя проекта выплачивать членам научного коллектива вознаграждение за

- выполнение работ по проекту;
- ежегодно в установленные сроки представлять отчет о целевом использовании гранта Российского научного фонда.

**Руководитель организации гарантирует, что:**

- вознаграждение за выполнение работ по реализации проекта будет ежегодно получать каждый член научного коллектива;  
Лица, не являющиеся налоговыми резидентами Российской Федерации, могут осуществлять работы по Проекту на безвозмездной основе (за исключением руководителя проекта).
- общий размер ежегодного вознаграждения члена научного коллектива не будет превышать 30 процентов от суммы ежегодного вознаграждения всем членам научного коллектива;  
Включая установленные законодательством Российской Федерации гарантии, отчисления по страховым взносам на обязательное пенсионное страхование, на обязательное медицинское страхование, на обязательное социальное страхование на случай временной нетрудоспособности и в связи с материнством, на обязательное социальное страхование от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний.
- общий размер ежегодного вознаграждения членов научного коллектива в возрасте до 39 лет включительно не будет меньше 35 процентов от суммы ежегодного вознаграждения всех членов научного коллектива;
- общее число членов научного коллектива (вместе с руководителем проекта) не будет превышать 10 человек, при этом членом научного коллектива не будет являться работник организации, в непосредственном административном подчинении которого находится руководитель проекта;
- научному коллективу будет предоставлено помещение и обеспечен доступ к имеющейся экспериментальной базе для осуществления научного исследования.

**Подпись руководителя организации** (уполномоченного представителя, действующего на основании доверенности или распорядительного документа), **печать** (при ее наличии) **организации.**

В случае подписания формы уполномоченным представителем организации (в т.ч. – руководителем филиала) к печатному экземпляру заявки прилагается копия распорядительного документа или доверенности, заверенная печатью организации.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
М.П.

## Форма 4. Содержание проекта

### 4.1. Научная проблема, на решение которой направлен проект

*на русском языке*

Дисферлинопатия — это наследственное заболевание, прогрессирующая мышечная дистрофия, вызванная мутацией в гене, кодирующем мышечный белок дисферлин. Дисферлин — цитоплазматический белок из семейства ферлин-1-подобных белков, играющий важную роль в миогистогенезе, формировании миотуб, репарации мембран мышечных клеток. Один из методов разработки терапии дисферлинопатии — геномное редактирование легко доступных для биопсии и изоляции фибробластов и их трансдифференцировка в миобласты. Геномное редактирование клеток с мутациями может быть проведено как до, так и после трансдифференцировки. При этом для дисферлинопатии характерно разнообразие мутаций, что затрудняет разработку универсального подхода к геномному редактированию. При подобной молекулярно-генетической структуре заболевания может быть оправданным пропуск отдельных экзонов с мутациями. Эффективность метода была показана для дистрофинопатий (миодистрофия Дюшенна). Остается неизвестной возможность использования сокращенных методом пропуска экзонов форм дисферлина. Проект направлен на изучение возможности и эффективности перманентного пропуска экзонов с помощью геномного редактирования, а также изучение функциональных свойств дисферлина с пропущенными экзонами и оценку возможного влияния геномного редактирования фибробластов при дисферлинопатии на транс-дифференцировку в миобласты и их морфофункциональные свойства.

*на английском языке*

Dysferlinopathy is an inherited condition, progressive muscular dystrophy caused by a mutation in the gene that encodes the muscle protein dysferlin. Disferlin is a cytoplasmic protein from the family of ferlin-1-like proteins that plays an important role in myohistogenesis, the formation of myotubes, and the repair of muscle cell membranes. One of the methods of therapy for dysferlinopathy is genomic editing of fibroblasts readily available for biopsy and isolation and their transdifferentiation into myoblasts. Genomic editing of cells with mutations can be performed both before and after transdifferentiation. At the same time, dysferlinopathy is characterized by a variety of mutations, which makes it difficult to develop a universal approach to genomic editing. With a similar molecular genetic structure of the disease, it may be justified to skip individual exons with mutations. The effectiveness of the method has been shown for dystrophinopathies (Duchenne muscular dystrophy). The possibility of using exon skipping forms of dysferlin remains unknown. The project is aimed at studying the possibility and efficiency of permanent exon skipping using genomic editing, as well as studying the functional properties of dysferlin with skipped exons and assessing the possible effect of genomic editing of fibroblasts in dysferlinopathy on trans-differentiation into myoblasts and their morphofunctional properties.

### 4.2. Научная значимость и актуальность решения обозначенной проблемы

*на русском языке*

Дисферлинопатия - это наследственная неуклонно прогрессирующая мышечная дистрофия, вызванная мутацией в гене, кодирующем мышечный белок дисферлин, приводящая к инвалидности в трудоспособном возрасте. На сегодняшний день нет зарегистрированных препаратов для этиологического лечения заболевания. Кроме этого, и функция белка дисферлина недостаточно ясна. Исследование предполагает разработку нового метода лечения дисферлинопатии на основе перманентного пропуска экзонов, и призвано уточнить функциональность дисферлина в условиях отсутствия нескольких участков белка.

*на английском языке*

Dysferlinopathy is a hereditary, steadily progressive muscular dystrophy caused by a mutation in the gene encoding the muscle protein dysferlin, leading to disability in working age. To date, there are no registered drugs for the etiological treatment of the disease. In addition, the function of the dysferlin protein is not clear enough. The study involves the development of a new method for the treatment of dysferlinopathy based on permanent exon skipping, and is intended to clarify the functionality of dysferlin in the absence of several protein regions.

### 4.3. Конкретная задача (задачи) в рамках проблемы, на решение которой направлен проект, ее масштаб и комплексность

*на русском языке*

Цель:

Разработать метод пропуска экзонов в гене DYSF и оценить функцию укороченных форм дисферлина, получаемых методом геномного редактирования с целью лечения дисферлинопатии

Задачи:

1. Разработать CRISPR-опосредованный экзон скиппинг 3 и 4, 26 и 27 экзонов DYSF.
2. Выполнить трансдифференцировку и получить миотубы из фибробластов пациента с мутацией в экзоне 26 гена DYSF, фибробластов здорового донора и фибробластов, экспрессирующих дисферлин без экзонов 3-4 и 26-27.
3. Оценить экспрессию, внутриклеточное распределение и функцию DYSF без экзонов 3-4 и 26-27 в фибробластах и миотубах после CRISPR-опосредованного экзон скиппинга.

*на английском языке*

Goal:

To develop a method for exon skipping in the DYSF gene and to evaluate the function of truncated forms of dysferlin obtained by genomic editing for the treatment of dysferlinopathy

Tasks:

1. Develop CRISPR-mediated exon skipping of 3 and 4, 26 and 27 DYSF exons.
2. Perform transdifferentiation and obtain myotubes from fibroblasts of a patient with a mutation in exon 26 of the DYSF gene, fibroblasts of a healthy donor and fibroblasts expressing dysferlin without exons 3-4 and 26-27.
3. To assess the expression, intracellular distribution and function of DYSF without exons 3-4 and 26-27 in fibroblasts and myotubes after CRISPR-mediated exon skipping.

#### **4.4. Научная новизна исследований, обоснование достижимости решения поставленной задачи (задач) и возможности получения предполагаемых результатов**

*на русском языке*

На сегодняшний день отсутствуют данные о функциональности дисферлина с делециями части доменов C2A и "Dysf", что ограничивает возможность применения подходов, связанных с исключением экзонов ДНК в терапевтических целях. Кроме этого, возможность удаления экзонов, несущих мутации на уровне ДНК в качестве терапевтического подхода к лечению дисферлинопатии изучена не была. Мы проанализируем влияние перманентного пропуска экзонов 3-4 и 26-27 гена DYSF на функциональность белка дисферлина (его локализацию в мембране, процессы транс-дифференцировки и формирования миотуб, репарации мембраны).

Методы геномного редактирования с использованием CRISPR/Cas9 хорошо освоены в лаборатории, как и культивирование различных типов клеток, включая получение и культивирование ИПСК. У членов научного коллектива есть опыт дифференцировки миотуб и их морфофункциональной характеристики.

Поставленные задачи представляются достижимыми, запланированные результаты будут получены к концу выполнения проекта.

*на английском языке*

To date, there are no data on the functionality of dysferlin with deletions of part of the C2A and "Dysf" domains, which limits the applicability of approaches associated with the exclusion of DNA exons for therapeutic purposes. In addition, the possibility of removing exons carrying mutations at the DNA level as a therapeutic approach to the treatment of dysferlinopathy has not been studied. We will analyze the effect of permanent skipping of exons 3-4 and 26-27 of the DYSF gene on the functionality of the dysferlin protein (its localization in the membrane, the processes of trans-dysdifferentiation and myotube formation, membrane repair).

Genomic editing methods using CRISPR / Cas9 are well mastered in the laboratory, as is the cultivation of various types of cells, including the production and cultivation of iPSCs. The members of the research team have experience in the differentiation of myotubes and their morphological and functional characteristics.

The tasks set seem to be achievable, the planned results will be obtained by the end of the project.

#### **4.5. Современное состояние исследований по данной проблеме, основные направления исследований в мировой науке и научные конкуренты**

*на русском языке*

Дисферлинопатии — фенотипически гетерогенная группа нервно-мышечных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, при которых происходит утрата или нарушение функции белка дисферлина в скелетной

мышечной ткани, что обусловлено мутациями в гене DYSF [5].

К дисферлинопатиям относят миопатию Миоши, поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2Б (ПКМД2Б), дистальную миопатию переднего ложа голени (ДМПЛГ), а также вторичные дисферлинопатии, возникающие вследствие развития кавеолино- и кальпаинопатий [6]. Считается, что ПКМД2Б и миопатия Миоши являются аллельными формами гена с одной и той же мутацией, с чем связаны фенотипические различия [8, 10].

К основным клиническим проявлениям этих заболеваний относятся слабость и атрофия мышц, воспалительные процессы в мышечной ткани, встречаются такие симптомы, как кардиомиопатия. Тяжесть симптоматики сильно варьирует от практически бессимптомного течения с изолированным увеличением КФК в крови до тяжёлых инвалидизирующих форм.

Для дисферлинопатий характерен высокий уровень КФК в крови, как правило, превышающий норму в десятки раз (на ранних стадиях 50—100 раз), сохраняющийся на протяжении всего заболевания.

Уровень дисферлина оценивают в биоптатах мышечной ткани больного, однако для этих целей можно использовать и CD14+ моноциты периферической крови, так как было показано, что DYSF в них также экспрессируется [24].

Дисферлин относится к семейству ферлин-1 подобных белков, в которую также входят отоферлин, миоферлин и др. Ферлин-1-подобные белки имеют гомологию с белком FER-1 нематоды *Caenorhabditis elegans*. У человека кодируется геном DYSF, расположенным на второй хромосоме в локусе 2p13.2. Ген содержит 55 экзонов, его длина в геноме составляет около 150 000 пар нуклеотидов, длина кодирующей последовательности - 6243 пары нуклеотидов. Белок дисферлин, размером 237кДа, представлен в широком диапазоне тканей, преимущественно экспрессируется в мышечных тканях, а также в кардиомиоцитах, моноцитах периферической крови [25], а также в клетках префронтальной коры головного мозга, плаценты и костного мозга (по данным BioGPS). Дисферлин в организме присутствует в различных изоформах, но локализуется преимущественно в саркомере, а также ассоциирован с цитоплазматическими везикулами.

Основной функцией дисферлина является его участие в репарации плазматической мембраны [28]. При повреждении мембраны внеклеточный кальций проникает в мышечные волокна, образуя зону с высоким содержанием кальция. Клеточные везикулы, содержащие дисферлин на поверхности своей мембраны, в месте образовавшегося повреждения и в присутствии повышенной концентрации кальция сливаются друг с другом и с плазматической мембраной, образуя своеобразную «заплатку» [29]. В этом процессе дисферлин играет свою роль на этапе слияния, облегчая везикулярный докинг и собственно слияние с плазматической мембраной, путём взаимодействия с другими молекулами дисферлина на мембране и везикулах, а также с аннексинами и некоторыми другими белок-связывающими партнёрами.

Поиск мутаций гена DYSF является сложной задачей из-за большого размера гена и отсутствия мутационных «горячих точек». При миопатиях встречаются миссенс-мутации, короткие делеции и дупликации, распределённые по гену [15, 17-18, 20, 37].

На сегодняшний день описано более 450 различных мутаций в гене, большинство из которых являются однонуклеотидными заменами. Более 330 патогенных мутаций были идентифицированы в экзонах или вблизи экзон-интронных соединений [37].

На сегодняшний день активно разрабатываются и тестируются множество терапевтических методов. Существует несколько подходов, направленных на лечение дисферлинопатий. К ним относятся такие, как иммуномодулирующая терапия, использование стволовых клеток, заместительная и лекарственная терапия, а также генотерапевтические методы [17, 26].

Иммуномодулирующая терапия включает использование препаратов, подавляющих воспаление, чтобы иммунный ответ пациента на дегенеративные процессы в мышцах не вызывал дополнительную гибель мышечных клеток. Терапия стволовыми клетками включает доставку пациентам новых мышечных стволовых клеток, несущих нормальные копии гена DYSF, так что эти стволовые клетки дифференцируются в новые мышечные волокна, которые могут продуцировать функциональный белок дисферлин. Хотя считалось, что индуцированные стволовые клетки обладают ограниченной способностью к дифференцировке, то есть они генерируют клетки из ткани, из которой они были получены, с конца 1990-х годов различные исследования показали, что при некоторых условиях стволовые клетки, полученные из ткани взрослого человека проявляют так называемую пластичность. Группа исследователей охарактеризовала популяцию периваскулярных стволовых клеток из скелетных мышц, называемых мышечными MAPCs [41]. Мышечные MAPCs, трансплантированные внутримышечно мышам mdx (мышинной модели мышечной дистрофии Дюшенна), показали значительный вклад в регенерацию мышц. Таким образом, MAPCs в качестве источника стволовых клеток могут иметь много преимуществ по сравнению с сателлитными клетками: их можно легко изолировать, они могут быть выращены *in vitro* в больших количествах, легко трансдуцированы, могут быть трансплантированы внутривенно и внутриартериально, обеспечивая широкое биораспределение и, что наиболее важно, могут быть изолированы из аллогенных и аутологичных источников. Исследование применения MAPCs для терапии дисферлинопатий

продолжается.

Существуют исследования, подтверждающие, что укороченный белок дистрофин с восстановленной рамкой считывания сохраняет свою функциональность. Подобные исследования, направленные на восстановление рамки считывания в гене DYSF, также показали, что укороченный дисферлин сохраняет функциональность. Таким образом, в качестве примера возможных методов генной терапии для лечения дисферлинопатий имеет смысл рассмотреть несколько современных методик, некоторые из которых уже используются в терапии миодистрофии Дюшенна. Эта патология встречается чаще, чем дисферлинопатии, и на данный момент для неё уже разработаны различные методы терапии.

В генотерапевтических исследованиях существует два основных подхода – *in vivo* и *ex vivo*. Генная терапия *in vivo* подразумевает редактирование генов или введение их нормальных копий непосредственной в организм, тогда как *ex vivo* подразумевает генетическую модификацию клеток в лаборатории с их последующей трансплантацией.

В зависимости от характера мутации, вызвавшей генетическую патологию, и от предполагаемого результата терапии возможно использовать различные методы манипуляции с геном. К ним относится, например метод прохождения стоп-кодона [43, 44], который используют для восстановления рамки считывания. Некоторые из антибиотиков позволяют клетке игнорировать преждевременные стоп-мутации при синтезе белка, таким образом, в результате синтезируется полноценный белок. Этот метод, к сожалению, показал достаточно низкую эффективность при терапии миодистрофии Дюшенна.

Большое количество патогенных мутаций в гене DYSF приводят к сдвигу рамки считывания. У некоторых пациентов с протяженными делециями DYSF наблюдается облегчённая симптоматика дисферлинопатии, что позволяет предположить, что некоторые участки гена могут быть удалены без значительного влияния на функцию белка. Экзон-скиппинг с помощью антисмысловых олигонуклеотидов на данный момент является из передовых методов терапии мышечной дистрофии Дюшенна [45].

Было показано, что дисферлин с протяженной делецией может сохранять свою функциональность. В исследовании М. Крана с соавторами описана больная с миопатией Миоши с гомозиготной делецией экзонов 2-40 гена DYSF 2-40. В возрасте 44 лет пациентка испытывала проблемы с ходьбой, но тем не менее не использовала трость. Было показано, что укороченный дисферлин функционирует и приводит к развитию относительно мягкого фенотипа миодистрофии с поздним началом [6].

Экзон-скиппинг предполагает пропуск экзона, в котором находится нонсенс-мутация, с помощью связывания антисмысловых олигонуклеотидов или использования системы CRISPR, благодаря чему синтезируется функциональный белок неполной длины. На данный момент известно, что этот метод используется для терапии миодистрофии Дюшенна и существуют исследования, согласно которым метод подходит и для дисферлинопатий, например, доказано, что после пропуска экзона 32 белок дисферлин сохраняет свою функциональность [46], также было показано, что пропуск экзонов 26-27 и 28-29 позволяет получить функциональный дисферлин [27]. Исследования, направленные на анализ структуры белка дисферлина и определение возможных мишеней для терапевтического экзон-скиппинга, продолжаются [45].

Перманентный экзон-скиппинг с использованием технологии CRISPR, является перспективным методом в современных доклинических исследованиях миодистрофии Дюшенна. В надежде добиться клинического успеха параллельно с миодистрофией Дюшенна, пропуски экзонов и модуляция сплайсинга также изучаются при других мышечных дистрофиях, таких как ПКМД2Б, ДМПЛГ, миотоническая дистрофия и мерозин-дефицитная врожденная мышечная дистрофия типа 1А (ВМД1А) [47].

В исследовании, посвящённом мультиэкзон-скиппингу в гене DYSF, описали не только первый в истории успешный эксперимент по многократному пропуску экзонов в гене DYSF, но и идентифицировали две новых потенциальных мишени для экзон-скиппинга в целях терапии дисферлинопатий. Результаты исследования показали, что делеции экзонов DYSF 26–27 и 28–29 не критичны для репарации клеточной мембраны, таким образом, эти экзоны можно считать многообещающими терапевтическими мишенями для экзон-скиппинга, тогда как экзоны 19–21, 20–21 и 46–48 необходимы для правильного регенеративного процесса, так что, они не смогут стать перспективными целями для такого вида генной терапии [27].

Экзон-скиппинг посредством АОН имеет некоторые недостатки. В качестве наиболее значимого можно выделить временный характер терапевтического эффекта. АОН – это короткие олигонуклеотиды, которые быстро разрушаются в клетке, поэтому их действие ограничено по времени, таким образом, для постоянного поддержания эффекта необходимо их еженедельное введение.

Метод сплайсосо-опосредованного транс-сплайсинга, также известный как SMaRT (spliceosome-mediated RNA trans-splicing) используют в разработке терапии муковисцидоза, гемофилии А, спинальной мышечной атрофии и некоторых других наследственных патологий, в том числе миодистрофии Дюшенна [48]. В 2015 году группа исследователей осуществила замену экзонов (31–55, 32–55, 36–55, 37–55) с помощью 3' сплайсосо-опосредованного транс-

сплайсинга на миоблестах от пациентов с диагностированной ПКМД2Б, а также на мышинной модели. С помощью флуоресцентного иммуноокрашивания на поперечных срезах мышц исследователи обнаружили в сарколемме устойчивую экспрессию дисферлина [51].

Классическая генная терапия подразумевает внесение полного гена либо мини-гена в клетку для того, чтобы с этой матрицы синтезировался функциональный белок.

Возможность переноса в клетку функционального гена дикого типа с целью восстановления функции белка является перспективным методом генной терапии мышечных дистрофий. Для создания генетических конструкций представляют интерес аденоассоциированные векторы (AAV), способные доставлять ДНК как в делящиеся, так и в неделящиеся клетки, а также обеспечивают достаточный уровень экспрессии трансгенов [27]. Однако, у данной технологической платформы есть недостатки, требующие более тщательного изучения, в частности, AAV трансдуцируют мышечную ткань с низкой эффективностью, а их введение связано с возникновением гуморального иммунного ответа и формированием пула специфических антител [52]. Также, в случае с мышечными дистрофиями, недостатком AAV можно считать ограниченный размер трансгена (приблизительно 4700 пар нуклеотидов), что не позволяет использовать полный ген из-за большого размера кодирующей последовательности гена DYSF (6243 п.н.).

Существуют различные исследования, связанные с гиперэкспрессией гомологичных дисферлину белков при его дефиците. Одним из таких исследований является анализ экспрессии миоферлина у пациентов с дисферлинопатией [57]. Авторы сделали вывод, что гиперэкспрессия миоферлина не компенсирует отсутствие дисферлина в мышцах с дисферлинопатией.

Ссылки вынесены в файл с дополнительной информацией.

#### *на английском языке*

Dysferlinopathies are a phenotypically heterogeneous group of neuromuscular diseases with an autosomal recessive mode of inheritance, in which there is a loss or dysfunction of the dysferlin protein in skeletal muscle tissue, which is caused by mutations in the DYSF gene [5].

Dysferlinopathies include Mioshi myopathy, girdle-limb muscular dystrophy type 2B (PCMD2B), distal myopathy of the anterior leg bed (DMPLH), as well as secondary dysferlinopathies arising from the development of caveolino and calpainopathies [6]. It is believed that PKMD2B and Mioshi myopathy are allelic forms of the gene with the same mutation, which is associated with phenotypic differences [8, 10].

The main clinical manifestations of these diseases include muscle weakness and atrophy, inflammation in muscle tissue, and symptoms such as cardiomyopathy. The severity of symptoms varies greatly from an almost asymptomatic course with an isolated increase in CPK in the blood to severe disabling forms.

Dysferlinopathies are characterized by a high level of CPK in the blood, as a rule, exceeding the norm by tens of times (in the early stages 50-100 times), which persists throughout the disease.

The level of dysferlin is assessed in biopsies of the patient's muscle tissue; however, CD14 + monocytes of peripheral blood can also be used for these purposes, since it was shown that DYSF is also expressed in them [24].

Dysferlin belongs to the family of ferlin-1-like proteins, which also includes otoferlin, myoferlin, and others. Ferlin-1-like proteins have homology with the FER-1 protein of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In humans, it is encoded by the DYSF gene located on the second chromosome at the 2p13.2 locus. The gene contains 55 exons, its length in the genome is about 150,000 base pairs, the length of the coding sequence is 6243 base pairs. The protein dysferlin, 237 kDa, is present in a wide range of tissues, predominantly expressed in muscle tissues, as well as in cardiomyocytes, peripheral blood monocytes [25], as well as in cells of the prefrontal cortex of the brain, placenta, and bone marrow (according to BioGPS data). Dysferlin in the body is present in various isoforms, but is localized mainly in the sarcolemma, and is also associated with cytoplasmic vesicles.

The main function of dysferlin is its participation in the repair of the plasma membrane [28]. When the membrane is damaged, extracellular calcium enters the muscle fibers, forming a zone with a high calcium content. Cellular vesicles containing dysferlin on the surface of their membrane merge with each other and with the plasma membrane at the site of damage and in the presence of increased calcium concentration, forming a kind of "patch" [29]. In this process, dysferlin plays a role at the fusion stage, facilitating vesicular docking and proper fusion with the plasma membrane, by interacting with other dysferlin molecules on the membrane and vesicles, as well as with annexins and some other protein-binding partners.

Finding mutations in the DYSF gene is challenging due to the large gene size and the absence of mutational hotspots. In myopathies, missense mutations, short deletions and duplications distributed over the gene occur [15, 17-18, 20, 37]. To date, more than 450 different mutations in the gene have been described, most of which are single nucleotide substitutions. More than 330 pathogenic mutations have been identified in exons or near exon-intron junctions [37]. Today, many therapeutic methods are being actively developed and tested. There are several approaches to treating dysferlinopathies. These include such as immunomodulatory therapy, the use of stem cells, substitution and drug therapy, as

well as gene therapy methods [17, 26].

Immunomodulatory therapy involves the use of drugs that suppress inflammation so that the patient's immune response to muscle degeneration does not cause additional muscle cell death.

Stem cell therapy involves delivering new muscle stem cells to patients that carry normal copies of the DYSF gene, so that these stem cells differentiate into new muscle fibers that can produce the functional protein dysferlin. Although induced stem cells were thought to have limited differentiation capacity, that is, they generate cells from the tissue from which they were derived, since the late 1990s various studies have shown that under certain conditions, stem cells derived from adult tissue exhibit so-called plasticity. A group of researchers characterized a population of perivascular stem cells from skeletal muscle called muscle MAPCs [41]. Muscle MAPCs transplanted intramuscularly into mdx mice (a mouse model of Duchenne muscular dystrophy) have shown a significant contribution to muscle regeneration. Thus, MAPCs as a source of stem cells can have many advantages over satellite cells: they can be easily isolated, they can be grown in vitro in large numbers, they can be easily transduced, they can be transplanted intravenously and intra-arterially, providing broad biodistribution and that most importantly, it can be isolated from allogeneic and autologous sources. Research into the use of MAPCs for the treatment of dysferlinopathies is ongoing.

There are studies showing that the frame-restored dystrophin truncated protein retains its functionality. Similar studies aimed at restoring the reading frame in the DYSF gene also showed that truncated dysferlin retains functionality. Thus, as an example of possible methods of gene therapy for the treatment of dysferlinopathies, it makes sense to consider several modern methods, some of which are already used in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. This pathology is more common than dysferlinopathies, and at the moment, various methods of therapy have already been developed for it.

There are two main approaches in gene therapy research - in vivo and ex vivo. Gene therapy in vivo involves editing genes or introducing their normal copies directly into the body, while ex vivo implies genetic modification of cells in the laboratory with their subsequent transplantation.

Depending on the nature of the mutation that caused the genetic pathology, and on the expected result of therapy, it is possible to use various methods of gene manipulation. These include, for example, the stop codon passing method [43, 44], which is used to restore the reading frame. Some of the antibiotics allow the cell to ignore premature stop mutations during protein synthesis, thus producing a complete protein as a result. This method, unfortunately, showed a rather low efficiency in the treatment of Duchenne muscular dystrophy.

A large number of pathogenic mutations in the DYSF gene lead to a shift in the reading frame. Some patients with extended DYSF deletions have mild dysferlinopathy symptoms, suggesting that some gene regions could be deleted without significantly affecting protein function. Exon skipping using antisense oligonucleotides is currently one of the most advanced methods of therapy for Duchenne muscular dystrophy [45].

It has been shown that dysferlin with an extended deletion can retain its functionality. In a study by M. Krana et al., A patient with Mioshi's myopathy with a homozygous deletion of exons 2-40 of the DYSF 2-40 gene was described. At the age of 44, the patient had problems walking but still did not use a cane. It has been shown that truncated dysferlin functions and leads to the development of a relatively mild phenotype of myodystrophy with late onset [6].

Exon skipping involves skipping the exon containing the nonsense mutation by binding antisense oligonucleotides or using the CRISPR system, thereby synthesizing a functional incomplete protein. At the moment, it is known that this method is used for the treatment of Duchenne muscular dystrophy, and there are studies according to which the method is also suitable for dysferlinopathies, for example, it has been proved that after skipping exon 32, the dysferlin protein retains its functionality [46], it has also been shown that exon skipping 26-27 and 28-29 provide functional dysferlin [27]. Studies aimed at analyzing the structure of the dysferlin protein and determining possible targets for therapeutic exon skipping are ongoing [45].

Permanent exon skipping using CRISPR technology is a promising method in modern preclinical studies of Duchenne muscular dystrophy. In the hopes of achieving clinical success in parallel with Duchenne muscular dystrophy, exon skipping and modulation of splicing are also being studied in other muscular dystrophies such as PCMD2B, DMPLH, myotonic dystrophy, and merosine-deficient congenital muscular dystrophy type 1A (AMD1A) [47].

The DYSF multiple exon skipping study not only described the first ever successful DYSF multiple exon skipping experiment, but also identified two new potential targets for exon skipping for the treatment of dysferlinopathies. The results of the study showed that deletions of DYSF exons 26-27 and 28-29 are not critical for cell membrane repair, thus, these exons can be considered promising therapeutic targets for exon-skipping, while exons 19-21, 20-21, and 46- 48 are necessary for the correct regenerative process, so that they cannot be promising targets for this type of gene therapy [27]. Exon skipping with caller ID has some disadvantages. The most significant is the temporary nature of the therapeutic effect. AON are short oligonucleotides that are rapidly degraded in the cell, therefore, their action is limited in time, therefore, their weekly administration is necessary for constant maintenance of the effect.

The method of spliceosome-mediated trans-splicing, also known as SMaRT (spliceosome-mediated RNA trans-splicing), is used in the development of therapy for cystic fibrosis, hemophilia A, spinal muscular atrophy, and some other hereditary



pathologies, including Duchenne muscular dystrophy [48]. In 2015, a group of researchers performed the replacement of exons (31–55, 32–55, 36–55, 37–55) using 3' spliceosome-mediated trans-splicing on myoblasts from patients diagnosed with PCMD2B, as well as in a mouse model. Using fluorescent immunostaining on muscle cross sections, the researchers found stable dysferlin expression in the sarcolemma [51].

Classical gene therapy involves the introduction of a complete gene or a mini-gene into a cell so that a functional protein is synthesized from this matrix.

The possibility of transferring a functional wild-type gene into a cell in order to restore protein function is a promising method of gene therapy for muscular dystrophies. For the creation of genetic constructs, adeno-associated vectors (AAV) are of interest, which are capable of delivering DNA to both dividing and non-dividing cells, as well as providing a sufficient level of transgenic expression [27]. However, this technological platform has drawbacks that require more careful study, in particular, AAV transduce muscle tissue with low efficiency, and their introduction is associated with the emergence of a humoral immune response and the formation of a pool of specific antibodies [52]. Also, in the case of muscular dystrophies, the limited size of the transgene (approximately 4700 base pairs) can be considered a disadvantage of AAV, which does not allow the use of the complete gene due to the large size of the coding sequence of the DYSF gene (6243 bp).

There are various studies related to the overexpression of proteins homologous to dysferlin in its deficiency. One of such studies is the analysis of myoferlin expression in patients with dysferlinopathy [57]. The authors concluded that myoferlin overexpression did not compensate for the lack of dysferlin in muscles with dysferlinopathy.

Used reference are available in the supplementary file.

#### **4.6. Предлагаемые методы и подходы, общий план работы на весь срок выполнения проекта и ожидаемые результаты (объемом не менее 2 стр.; в том числе указываются ожидаемые конкретные результаты по годам; общий план дается с разбивкой по годам)**

*на русском языке*

В ходе работы будут получены фибробласты кожи пациента с мутацией DYSF NM\_003494.3 c.2779delG (Ala927LeufsTer21) (полное отсутствие экспрессии дисферлина в результате образования преждевременного стоп-кодона в экзоне 26) и NM\_003494.3 c.200\_201delTGinsAT (p.Val67Asp) в экзоне 3. Фибробласты будут immortalizированы посредством нокаута гена p53 по отработанной ранее в коллективе технологии. Будет проведена их дифференцировка в миобласты (с помощью лентивирусного вектора, кодирующего MyoD, а также белок-репортера для оценки эффективности трансдифференцировки) и в дальнейшем в миотубы посредством культивирования в среде с пониженным содержанием лошадиной сыворотки (2%) (Cheng CS et al., 2013). Аналогичным образом будут получены культуры immortalizированных фибробластов, миобластов и миотуб от здорового донора. Также будет получена культура миобластов и миотуб из immortalizированных фибробластов после их геномного редактирования (удаления экзонов 3-4 и 26-27).

Для разработки CRISPR-опосредованного пропуска экзонов будут подобраны sgRNA для SpCas9 и SaCas9, в зависимости от наличия и расположения PAM последовательности вблизи целевых локусов. Cas9 и обе sgRNA будут клонированы в единую плазмиду. Предварительно будет создана целевая плазида, несущая фрагмент DYSF с мутацией c.2779delG для отработки оптимальных условий экзон-скиппинга. Обе плазмиды будут ко-трансфицированы в разных соотношениях в клеточную культуру HEK293T с помощью липофекции (Lipofectamine 2000). Эффективность CRISPR-редактирования будет оценена на уровне ДНК – анализ гетеродуплексов в местах разрезов и последующей репарации ДНК и/или секвенирование по Сэнгеру (метод TIDE <https://tide.deskgen.com/>)/NGS/цифровая ПЦР в зависимости от величины эффекта и методологической доступности одной из технологий.

Лучшие конструкции/условия будут использованы для геномного редактирования фибробластов. После их селекции и трансдифференцировки в миобластах будет выполнена транскрипционная активация гена дисферлина с помощью системы CRISPR/Cas9-SAM по ранее отработанному нами протоколу (Shaimardanova et al., 2018)

В полученных миотубах (с мутацией и без неё, а также без экзонов 3 и 4, 26 и 27) будет оценена экспрессия DYSF с помощью RT-PCR и белка DYSF с помощью вестерн-блота. Будет определена локализация DYSF в клетке с помощью иммуноцитохимического исследования с последующей визуализацией на конфокальном микроскопе.

Функционирование белка DYSF будет оценено с использованием теста на репарацию мембран по отработанному нашими коллегами протоколу (Kosheleva NV et al. 2016).

A.A. Shaimardanova, I.G. Starostina, V.V. Solovyeva, D.R. Agliullina, I.A. Yakovlev, A.A. Isaev, R.V. Deev, A.A. Rizvanov  
Transcriptional activation of mutant dysferlin gene expression in human skin fibroblasts using CRISPR/Cas9 SAM technology.  
HUMAN GENE THERAPY 27 (November 2018) Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/hum.2018.29077.abstract  
Cheng CS, El-Abd Y, Bui K, et al. Conditions that promote primary human skeletal myoblast culture and muscle differentiation

in vitro. Am J Physiol Cell Physiol. 2013;306(4):C385-95.

Kosheleva NV, Ilina IV, Zurina IM, et al. Laser-based technique for controlled damage of mesenchymal cell spheroids: a first step in studying reparation in vitro. Biol Open. 2016;5(7):993-1000. Published 2016 Jun 22. doi:10.1242/bio.017145

#### План работ

##### Первый год

Получить культуры immortalized фибробластов кожи пациента с мутацией DYSF c.2779delG, c.200\_201delTGinsAT, а также от здорового донора.

Создать плазмиды для CRISPR-опосредованного пропуска экзонов 3-4 и 26-27 экзонов гена DYSF.

Отработать протоколы трансфекции фибробластов, и их последующей селекции и транс-дифференцировки.

Получить и наработать плазмиды для транскрипционной активации дисферлина.

Написать обзорную статью по теме проекта.

Предполагается выступить минимум на одной зарубежной и одной российской конференции по теме проекта.

Написание промежуточного отчета.

##### Второй год

Провести CRISPR-опосредованный экзон-скиппинг 3-4 и 26-27 экзонов гена DYSF в фибробластах пациента с дисферлинопатией и оценить эффективность геномного редактирования.

Дифференцировать фибробласты от больного после геномного редактирования и от здорового донора в миоциты и в дальнейшем в миотубы.

Выполнить в миоцитах транскрипционную активацию дисферлина.

Будет написана статья с результатами первого этапа работы по проекту.

Предполагается выступление минимум на одной зарубежной и одной российской конференции по теме проекта.

Написание промежуточного отчета.

##### Третий год

Оценить экспрессию, распределение и функцию дисферлина без экзонов 3-4 и 26-27 в фибробластах и миотубах после CRISPR-опосредованного пропуска экзонов.

Изучить возможность геномного редактирования с целью пропуска экзонов непосредственно на миотубах. Оценить эффективность такого редактирования.

Написать статью с результатами работы по проекту.

Выступить минимум на одной зарубежной и одной российской конференции по теме проекта.

Написание итогового отчета.

#### Ожидаемые результаты по годам

##### Первый год

Получены культуры immortalized фибробластов кожи пациента с мутацией DYSF c.2779delG, c.200\_201delTGinsAT, а также от здорового донора.

Созданы плазмиды для CRISPR-опосредованного пропуска экзонов 3-4 и 26-27 экзонов гена DYSF.

Работающие протоколы трансфекции фибробластов, и их последующей селекции и транс-дифференцировки.

Наработаны плазмиды для транскрипционной активации дисферлина.

Подана в печать обзорная статья по теме проекта.

Выступления на одной зарубежной и одной российской конференции по теме проекта.

Годовой отчет.

##### Второй год

Проведены эксперименты по CRISPR-опосредованному экзон-скиппингу 3-4 и 26-27 экзонов гена DYSF в фибробластах пациента с дисферлинопатией и получены данные об эффективности геномного редактирования.

Из фибробластов от больного и от здорового донора после геномного редактирования получены миоциты и в дальнейшем миотубы.

В миоцитах проведена транскрипционная активация дисферлина.

Поданы/опубликованы 3 статьи с результатами работы по проекту.

Результаты доложены на как минимум на одной зарубежной и одной российской конференции по теме проекта.

Промежуточный отчет.

Третий год

Данные по экспрессии, распределению и функции дисферлина без экзонов 3-4 и 26-27 в фибробластах и миотубах после CRISPR-опосредованного пропуска экзонов.

Данные об эффективности геномного редактирования с целью пропуска экзонов непосредственно на миотубах.

4 статьи приняты в журнал(ы) с результатами работы по проекту.

Результаты доложены минимум на одной зарубежной и одной российской конференции по теме проекта.

Итоговый отчет.

*на английском языке*

During the work, skin fibroblasts of a patient with the DYSF NM\_003494.3 c.2779delG (Ala927LeufsTer21) mutation (complete absence of dysferlin expression as a result of the formation of a premature stop codon in exon 26) and NM\_003494.3 c.200\_201delTGinsAT (p.Val67Asp) in exon 3. Fibroblasts will be immortalized by knockout of the p53 gene according to the technology worked out earlier in the team. They will be differentiated into myoblasts (using a lentiviral vector encoding MyoD, as well as a reporter protein for assessing the efficiency of transdifferentiation) and further into myotubes by culture in a medium with a reduced horse serum content (2%) (Cheng CS et al., 2013). In a similar way, cultures of immortalized fibroblasts, myoblasts, and myotubes will be obtained from a healthy donor. Also, a culture of myoblasts and myotubes will be obtained from immortalized fibroblasts after their genomic editing (removal of exons 3-4 and 26-27). To develop CRISPR-mediated exon skipping, sgRNAs will be matched for SpCas9 and SaCas9, depending on the presence and location of the PAM sequence near the target loci. Cas9 and both sgRNAs will be cloned into a single plasmid. A target plasmid carrying the DYSF fragment with the c.2779delG mutation will be created in order to develop optimal conditions for exon skipping. Both plasmids will be co-transfected in different ratios into HEK293T cell culture by lipofection (Lipofectamine 2000). The efficiency of CRISPR editing will be assessed at the DNA level - analysis of heteroduplexes at the sites of cuts and subsequent DNA repair and / or Sanger sequencing (TIDE method <https://tide.deskgen.com/>)/NGS/digital PCR depending on the magnitude of the effect and methodological availability of one of the technologies.

The best constructs / conditions will be used for genomic editing of fibroblasts. After their selection and transdifferentiation in myoblasts, transcriptional activation of the dysferlin gene will be performed using the CRISPR / Cas9-SAM system according to our previously developed protocol (Shaimardanova et al., 2018)

In the obtained myotubes (with and without mutation, as well as without exons 3 and 4, 26 and 27), the expression of DYSF using RT-PCR and DYSF protein using a Western blot will be assessed. The localization of DYSF in the cell will be determined using immunocytochemical studies followed by visualization on a confocal microscope. The function of the DYSF protein will be assessed using a membrane repair test according to the protocol developed by our colleagues (Kosheleva NV et al. 2016).

A.A. Shaimardanova, I.G. Starostina, V.V. Solovyeva, D.R. Agliullina, I.A. Yakovlev, A.A. Isaev, R.V. Deev, A.A. Rizvanov  
Transcriptional activation of mutant dysferlin gene expression in human skin fibroblasts using CRISPR / Cas9 SAM technology. HUMAN GENE THERAPY 27 (November 2018) Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089 / hum.2018.29077.abstract  
Cheng CS, El-Abd Y, Bui K, et al. Conditions that promote primary human skeletal myoblast culture and muscle differentiation in vitro. Am J Physiol Cell Physiol. 2013; 306 (4): C385-95.  
Kosheleva NV, Ilina IV, Zurina IM, et al. Laser-based technique for controlled damage of mesenchymal cell spheroids: a first step in studying reparation in vitro. Biol Open. 2016; 5 (7): 993-1000. Published 2016 Jun 22.doi: 10.1242 / bio.017145

Work plan

First year

Obtain cultures of immortalized skin fibroblasts from a patient with the DYSF mutation c.2779delG, c.200\_201delTGinsAT, as well as from a healthy donor.

Create plasmids for CRISPR-mediated skipping of exons 3-4 and 26-27 of DYSF gene.

Work out protocols for transfection of fibroblasts, and their subsequent selection and trans-differentiation.

Obtain and develop plasmids for the transcriptional activation of dysferlin.

Write a review article on the topic of the project.

It is supposed to speak at at least one foreign and one Russian conference on the topic of the project.

Writing an interim report.

#### Second year

Carry out CRISPR-mediated exon-skipping of 3-4 and 26-27 exons of the DYSF gene in fibroblasts of a patient with dysferlinopathy and evaluate the efficiency of genomic editing.

Differentiate fibroblasts from a patient after genomic editing and from a healthy donor to myoblasts and then to myotubes. Perform transcriptional activation of dysferlin in myoblasts.

An article will be written with the results of the first stage of the project.

It is supposed to speak at at least one foreign and one Russian conference on the topic of the project.

Writing an interim report.

#### Third year

To assess the expression, distribution and function of dysferlin without exons 3-4 and 26-27 in fibroblasts and myotubes after CRISPR-mediated exon skipping.

Explore the possibility of genomic editing for exon skipping directly on myotubes. Assess the effectiveness of such editing.

Write an article with the results of the project.

Speak at at least one foreign and one Russian conference on the topic of the project.

Final report writing.

#### Expected results by year

##### First year

Cultures of immortalized skin fibroblasts of a patient with mutations DYSF c.2779delG, c.200\_201delTGinsAT, as well as from a healthy donor were obtained.

Plasmids for CRISPR-mediated skipping of exons 3-4 and 26-27 of DYSF gene have been created.

Working protocols for transfection of fibroblasts, and their subsequent selection and trans-differentiation.

Developed plasmids for the transcriptional activation of dysferlin.

A review article on the project has been submitted for publication.

Presentations at one foreign and one Russian conference on the topic of the project.

Annual report.

##### Second year

Experiments on CRISPR-mediated exon-skipping of 3-4 and 26-27 exons of the DYSF gene in fibroblasts of a patient with dysferlinopathy were carried out, and data on the efficiency of genomic editing were obtained.

After genomic editing, myoblasts and later myotubes were obtained from fibroblasts from a patient and from a healthy donor.

Transcriptional activation of dysferlin was performed in myoblasts.

Submitted / published 3 articles with the results of the project.

The results were reported at at least one foreign and one Russian conference on the project topic.

Interim report.

##### Third year

Data on the expression, distribution and function of dysferlin without exons 3-4 and 26-27 in fibroblasts and myotubes after CRISPR-mediated exon skipping.

Evidence on the efficiency of genomic editing for exon skipping directly on myotubes.

4 articles were accepted into the journal (s) with the results of the project.

The results were reported at at least one foreign and one Russian conference on the project topic.

Final report.

#### **4.7. Имеющийся у научного коллектива научный задел по проекту, наличие опыта совместной реализации проектов (указываются полученные ранее результаты, разработанные программы и методы)**

В ходе предварительных исследований:

Выполнен дизайн и синтез плазмидных конструкций, кодирующих кодон-оптимизированный ген дисферлина (не природный человеческий) без экзонов 3-4 и 26-27 для использования в качестве контроля.

Выполнен дизайн и синтез плазмидных конструкций, кодирующих полный ген дисферлина, в том числе с репортерными белками GFP и FusionRed для использования в качестве контроля.

Подобраны и протестированы условия для оценки экспрессии разных форм как нативного, так и кодон-

оптимизированного DYSF для контрольной оценки эффектов мутаций и пропуска экзонов.

У коллектива имеется опыт по использованию CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций при разных наследственных заболеваниях. В частности, редактирование CFTR p. F508del при муковисцидозе, нокаут мутантных аллелей в DES для лечения наследственной кардиомиопатии и др.

Есть опыт использование функциональной модели оценки репарации клеточных мембран при применении лазера для повреждения мышечных волокон.

#### **4.8. Перечень оборудования, материалов, информационных и других ресурсов, имеющихся у научного коллектива для выполнения проекта (в том числе – описывается необходимость их использования для реализации проекта)**

Коллектив исполнителей имеет доступ к следующему оборудованию:

1. Для молекулярно-генетической части работы есть все необходимое оборудование, включая генетические анализаторы (для секвенирования ДНК по Сэнгеру), термоциклеры (для проведения ПЦР), в том числе и для проведения ПЦР в реальном времени (для оценки экспрессии), проточный цитометр (для иммунофенотипирования клеток), световые и инвертированные флуоресцентные микроскопы (для визуализации клеток и экспрессии GFP), термостаты, ПЦР-боксы, морозильники, холодильники, вентексы, шейкеры, центрифуги, электрофорезное оборудование, аналитические весы, компьютеры для обработки и анализа результатов, боксы для клонирования и работы с прокариотами.
2. Для клеточной части работы: шкаф ламинарный II класса биологической безопасности (для обеспечения асептических условий при работе с клеточными культурами), автоматический CO<sub>2</sub>-инкубатор (для обеспечения контролируемых условий для культивирования *in vitro*), люминесцентный инвертированный микроскоп с устройством документирования (для наблюдения фиксированных объектов и прижизненное наблюдение объектов с помощью фазового контраста, переменного рельефного контраста, DIC-контраста и люминесценции, с возможностью документирования), орбитальный шейкер (для ротационного перемешивания биологических жидкостей и растворов), центрифуга лабораторная (для программируемого центрифугирования), микроцентрифуга Mini spin (для программируемого центрифугирования малых объемов), низкотемпературный медицинский морозильник (для хранения биообразцов при температуре от -50° до -90°С); конфокальный микроскоп (для углубленного анализа экспрессии маркеров клеток).

#### **4.9. План работы на первый год выполнения проекта (в том числе указываются запланированные командировки (экспедиции))**

*на русском языке*

Получить культуры immortalized фибробластов кожи пациента с мутацией DYSF c.2779delG, c.200\_201delTGinsAT, а также от здорового донора.

Создать плазмиды для CRISPR-опосредованного пропуска экзонов 3-4 и 26-27 экзонов гена DYSF.

Отработать протоколы трансфекции фибробластов, и их последующей селекции и транс-дифференцировки.

Получить и наработать плазмиды для транскрипционной активации дисферлина.

Написать обзорную статью по теме проекта.

Предполагается выступить минимум на одной зарубежной и одной российской конференции по теме проекта.

Написание промежуточного отчета.

*на английском языке*

Obtain cultures of immortalized skin fibroblasts from a patient with the DYSF mutation c.2779delG, c.200\_201delTGinsAT, as well as from a healthy donor.

Create plasmids for CRISPR-mediated skipping of exons 3-4 and 26-27 of DYSF gene.

Work out protocols for transfection of fibroblasts, and their subsequent selection and trans-differentiation.

Obtain and develop plasmids for the transcriptional activation of dysferlin.

Write a review article on the topic of the project.

It is supposed to speak at at least one foreign and one Russian conference on the topic of the project.

Writing an interim report.

#### **4.10. Планируемое на первый год содержание работы каждого основного исполнителя проекта (включая руководителя проекта)**

Лавров А.В. (общее руководство): написание статей по теме проекта, анализ конкурентов, дизайн всех экспериментов

(создание плазмид, геномное редактирование, трансдифференцировка), администрирование работ по гранту, в т.ч. поэтапный контроль и обеспечение взаимодействия между участниками работ; разработка детального плана работ на второй этап.

Иванова А.В. (молекулярно-генетическая работа): дизайн и создание плазмид, анализ полученных плазмид, отработка методов оценки экспрессии различных изоформ дисферлина, планирование, контроль и анализ экспериментов по культивированию и трансфекции, написание статей по проекту.

Анучина А.А. (молекулярно-генетическая работа): дизайн и создание плазмид, отработка методов оценки экспрессии различных изоформ дисферлина, написание статей по проекту.

Деев Р.В. (клеточная работа): разработка и контроль отработки протоколов трансдифференцировки фибробластов и морфофункциональной характеристики миоцитов и миотуб, написание статей по проекту.

Все – подготовка годового отчета.

Если будет возможность, то планируем принять участие в нескольких конференциях, в том числе зарубежных.

#### **4.11. Ожидаемые в конце первого года конкретные научные результаты (форма изложения должна дать возможность провести экспертизу результатов и оценить степень выполнения заявленного в проекте плана работы)**

*на русском языке*

За первый этап реализации проекта будут получены и наработаны генетические конструкции для редактирования генома фибробластов, транскрипционной активации гена дисферлина, выполнения транс-дифференцировки. Будет осуществлена оценка экспрессии белка после исключения экзонов в структуре гена. Также, будет оценена локализация белка DYSF в клетке с помощью иммуноцитохимического исследования с последующей визуализацией на конфокальном микроскопе.

Если будет возможность, то участие в нескольких конференциях, в том числе зарубежных.

*на английском языке*

During the first stage of the project, genetic constructs will be obtained and developed for editing the fibroblast genome, transcriptional activation of the dysferlin gene, and performing trans-differentiation. The assessment of protein expression will be carried out after exclusion of exons in the gene structure. Also, the localization of the DYSF protein in the cell will be assessed using immunocytochemical studies followed by visualization on a confocal microscope.

If possible, then participation in several conferences, including foreign ones.

#### **4.12. Перечень планируемых к приобретению за счет гранта оборудования, материалов, информационных и других ресурсов для выполнения проекта (в том числе – описывается необходимость их использования для реализации проекта)**

Реагенты для генно-инженерных работ:

Наборы для выделения ДНК, плазмид и РНК ;

Наборы для ПЦР;

Олигонуклеотиды ПЦР и секвенирования;

Реагенты для культивирования прокариот;

Реагенты и расходные материалы для электрофореза нуклеиновых кислот;

Реактивы и расходные материалы (стрипы, наконечники для пипеток);

Эндонуклеазы рестрикции, нуклеазы Cas;

Общелабораторный пластик (пробирки, наконечники для пипеток);

Плазмиды.

Расходные материалы для культуральных работ:

Культуральные среды, растворы и добавки культуральной чистоты для выделения, наращивания и криоконсервации культур клеток;

Лабораторный пластик (культуральная посуда, серологические пипетки, наконечники для дозаторов и т.д.);

Реагенты для культивирования эукариот;

Ростовые и дифференцировочные факторы для культивирования и направленной дифференцировки клеток;

Антитела для иммунофенотипирования миоцитов и миотуб;

Реагенты для трансфекции.

#### **4.13. Файл с дополнительной информацией 1**

С графиками, фотографиями, рисунками и иной информацией о содержании проекта. Один файл в формате pdf, до 3 Мб.

Скачать...

Текст в файлах с дополнительной информацией должен приводиться на русском языке. Перевод на английский язык требуется в том случае, если руководитель проекта оценивает данную информацию существенной для эксперта.

#### **4.14. Файл с дополнительной информацией 2 (если информации, приведенной в файле 1, окажется недостаточно)**

С графиками, фотографиями, рисунками и иной информацией о содержании проекта. Один файл в формате pdf, до 3 Мб.

---

Подпись руководителя проекта \_\_\_\_\_ /А.В. Лавров/

## Форма 5. Запрашиваемое финансирование на 2021 год

### 5.1. Планируемые расходы по проекту

№ п.п.	Направления расходования средств гранта	Сумма расходов (тыс.руб.)
	<b>ВСЕГО</b>	6000
	Вознаграждение членов научного коллектива (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды, без лиц категории «вспомогательный персонал»)	2500
	Вознаграждение лиц категории «вспомогательный персонал» (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)	0
1	Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)	2500
2	Оплата научно-исследовательских работ сторонних организаций, направленных на выполнение научного проекта (не более 15 процентов от суммы гранта)	0
3	Расходы на приобретение оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования (включая обучение работников, монтажные, пуско-наладочные и ремонтные**** работы) **** Не связанные с осуществлением текущей деятельности организации.	0
4	Расходы на приобретение материалов и комплектующих для проведения научного исследования	2500
5	Иные расходы для целей выполнения проекта	400
6	Накладные расходы организации (не более 10 процентов от суммы гранта)	600

### 5.2. Расшифровка планируемых расходов

№ п.п.	Направления расходования средств гранта, расшифровка
1	<p>Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)</p> <p>(указывается сумма вознаграждения (включая руководителя, основных исполнителей и иных исполнителей, привлекаемых к выполнению работ по проекту), включая установленные законодательством Российской Федерации гарантии, отчисления по страховым взносам на обязательное пенсионное страхование, на обязательное медицинское страхование, на обязательное социальное страхование на случай временной нетрудоспособности и в связи с материнством, на обязательное социальное страхование от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний)</p> <p>Лавров Александр Вячеславович, 340 000</p> <p>Иванова Алиса Владимировна, 320 000</p> <p>Анучина Арина Артуровна, 320 000</p> <p>Деев Роман Вадимович, 320 000</p> <p>Зайнитдинова Миляуша Иршатовна, 280 000</p> <p>Яковлев Иван Антонович, 250 000</p> <p>Кондратьева Екатерина Владимировна, 270 000</p> <p>Кочергин-Никитский Константин Сергеевич, 260 000</p> <p>Ясиновский Матвей Ильич, 140 000</p>
2	<p>Оплата научно-исследовательских работ сторонних организаций, направленных на выполнение научного проекта</p> <p>(приводится перечень планируемых договоров (счетов) со сторонними организациями с указанием предмета и суммы каждого договора)</p> <p>0</p>
3	<p>Расходы на приобретение оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования</p> <p>(представляется перечень планируемых к закупке оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования (в</p>



соответствии с п. 4.12 формы 4))

0

- 4 Расходы на приобретение материалов и комплектующих для проведения научного исследования  
(представляется расшифровка запланированных материалов и комплектующих (в соответствии с п. 4.12 формы 4))  
2500

Реагенты для генно-инженерных работ (1 300 000 руб.):

Наборы для выделения ДНК, плазмид и РНК – 200 000;

Наборы для ПЦР – 150 000;

Олигонуклеотиды ПЦР и секвенирования – 150 000;

Реагенты для культивирования прокариот – 100 000;

Реагенты и расходные материалы для электрофореза нуклеиновых кислот – 100 000;

Реактивы и расходные материалы (стрипы, наконечники для пипеток) – 150 000;

Эндонуклеазы рестрикции, нуклеазы Cas – 150 000;

Общелабораторный пластик (пробирки, наконечники для пипеток) – 200 000;

Плазмиды - 100 000.

Расходные материалы для культуральных работ (1 400 000):

Культуральные среды, растворы и добавки культуральной чистоты для выделения, наращивания и криоконсервации культур клеток – 450 000

Лабораторный пластик (культуральная посуда, серологические пипетки, наконечники для дозаторов и т.д.) – 200 000

Реагенты для культивирования эукариот – 150 000

Ростовые и дифференцировочные факторы для культивирования и направленной дифференцировки клеток – 150 000

Антитела для иммунофенотипирования миобластов и миотуб – 100 000

Реагенты для трансфекции - 350 000

- 5 Иные расходы для целей выполнения проекта

(приводятся иные затраты на цели выполнения проекта, в том числе на командировки, оплату услуг связи, транспортных услуг, расходы не расшифровываются)

400 000

Подпись руководителя проекта \_\_\_\_\_/А.В. Лавров/

**Подпись руководителя организации** (уполномоченного представителя, действующего на основании доверенности или распорядительного документа), **печать** (при ее наличии) **организации.**

В случае подписания формы уполномоченным представителем организации (в т.ч. – руководителем филиала) к печатному экземпляру заявки прилагается копия распорядительного документа или доверенности, заверенная печатью организации.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
М.П.