

## Создание аппаратурно-технологической линии для культивирования модифицированных линий клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантные белки

И.А. Чуркин<sup>1</sup>, С.В. Борисевич<sup>1</sup>, Д.А. Кутаев<sup>1</sup>, В.Т. Лымарь<sup>1</sup>, Ю.И. Пащенко<sup>1</sup>,  
Е.В. Гордеев<sup>1</sup>, В.С. Кулиш<sup>1</sup>, Т.М. Плеханова<sup>1</sup>, Р.А. Хамитов<sup>2</sup>, Е.Н. Сауткина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«48 Центральный научно-исследовательский институт»  
Министерства обороны Российской Федерации,  
141306, Российская Федерация, г. Сергиев Посад, ул. Октябрьская, д. 11

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов», 117545, Российская Федерация, г. Москва,  
1-й Дорожный проезд, д. 1

Поступила 19.12.2016 г. Принята к публикации 02.03.2017 г.

Представлены данные по созданию аппаратурно-технологической линии для культивирования модифицированных линий клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантные белки. В ее состав входят три участка: участок для создания измененных линий клеток млекопитающих с применением современных молекулярно-биологических инструментов; участок для осуществления масштабируемого культивирования генетически модифицированных линий клеток млекопитающих; участок для выделения и очистки рекомбинантных полипептидов с использованием валидированных методов. В рамках экспериментального исследования осуществлено выращивание клеток линии СНО-S, продуцирующей рекомбинантный белок GP вируса Эбола, суспензионным способом в ферментерах волнового и перемешивающего типов. Установлено преимущество в накоплении биомассы клеток и целевого белка в ферментерах волнового типа. Из культуральной жидкости выделен и очищен рекомбинантный полипептид GP со степенью чистоты более 95 %. При изучении антигенной полноценности рекомбинантного белка GP методами ИФА и вестерн-блота установлено соответствие его структуры нативному гликопротеину возбудителя лихорадки Эбола.

*Ключевые слова:* аппаратурно-технологическая линия; культивирование; клетки млекопитающих; экспрессия; рекомбинантный белок.

*Библиографическое описание:* Чуркин И.А., Борисевич С.В., Кутаев Д.А., Лымарь В.Т., Пащенко Ю.И., Гордеев Е.В., Кулиш В.С., Плеханова Т.М., Хамитов Р.А., Сауткина Е.Н. Создание аппаратурно-технологической линии для культивирования модифицированных линий клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантные белки // Вестник войск РХБ защиты. 2017. Т. 1. № 1. С. 33–41.

Совершенствование и разработка средств и способов биологической защиты требуют постоянного внедрения достижений современных молекулярно-биологических,

генно-инженерных и биотехнологических методов.

К такому направлению относится работа, целью которой являлось создание аппаратур-



Рисунок 1 — Общая схема АТЛ КМКМ

но-технологической линии для культивирования модифицированных линий клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантные белки. Она проводилась в рамках четвертого приоритетного направления федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 27 октября 2008 г. № 791. Планом было предусмотрено проведение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ в интересах войск РХБ защиты ВС РФ по созданию новых технологий производства специальных средств диагностики, профилактики и лечения заболеваний, вызываемых воздействием опасных биологических агентов.

В последние годы рекомбинантные белки возбудителей вирусной и бактериальной природы нашли широкое применение в составе наборов реагентов различных модификаций. Основное предназначение рекомбинантных пептидов в таких наборах — выполнение роли калибратора в количественных методах исследований или положительного контроля при скрининге на наличие специфических антигенных детерминант возбудителей в биологических пробах. Кроме того, они используются в качестве антигена для сенсибилизации повер-

ностей лунок иммунологических планшетов в различных серологических тестах для определения специфических антител у людей и животных.

Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог практически любого отдельно взятого антигена. Для создания набора реагентов на основе рекомбинантного антигена необходимо из всего многообразия белков возбудителя выбрать тот, который был бы иммуногенен (т.е. в организме, например, человека должны вырабатываться антитела к этим антигенам) и высокоспецифичным (т.е. характерным лишь для данного возбудителя и, по возможности, не дающим перекрестные реакции с антителами к другим антигенам) [1–5].

По результатам состоявшегося открытого конкурса, объявленного Министерством обороны Российской Федерации, на основании протокола оценки и сопоставления заявок на участие в открытом конкурсе с организацией Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИгенетика») — организация исполнитель — был оформлен Государственный контракт на опытно-конструкторскую работу

(ОКР) с назначением по созданию аппаратурно-технологической линии для культивирования модифицированных линий клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантные белки (АТЛ КМКМ).

Научное сопровождение ОКР было осуществлено ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

Общая схема АТЛ представлена на рисунке 1.

Предполагалось в качестве рекомбинантного белка получить ген-эквивалент нативного белка возбудителя вирусной инфекции I группы патогенности. В последующем было уточнено, что в рамках ОКР целевым рекомбинантным белком должен стать гликопротеин GP вируса Эбола.

Совместно с организацией-исполнителем была создана и прошла апробацию АТЛ КМКМ как блочно-модульная биологическая лаборатория, состоящая из 3 участков.

#### Участок № 1

Позволяет получать и описывать ген-эквиваленты иммунологически значимых пептидов. Сконструированный вектор для проведения трансфекции клеточных линий млекопитающих обеспечивает получение стабильных линий клеток-продуцентов и высокий уровень экспрессии целевого белка, его правильную



Рисунок 2 — CO<sub>2</sub>-инкубатор с объемом 170 л и роллерная установка

сборку и соответствие нативной форме белка возбудителя вирусной, риккетсиозной и иной инфекции.

В исследовании использована линия клеток СНО — клетки яичника взрослого китайского хомячка.

На участке размещено следующее основное оборудование:

- станция выделения нуклеиновых кислот и белков на 12 образцов;
- электрофоретическая система;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор с объемом 170 л мультигазовый с электронным управлением, воздушной рубашкой, УФ-стерилизацией воздуха, ИК-сенсором CO<sub>2</sub>;
- ДНК-амплификатор в реальном времени Dtpriime, 5 каналов, формат 384 для количественной оценки уровня экспрессии;
- ламинарный шкаф.

Имеются наборы реагентов для проведения клонирования, выделения и очистки ДНК, проведения трансфекции в эукариотической системе и контроля качества проведенной трансфекции.

#### Участок № 2

Предназначен для осуществления масштабирования культивирования модифицированных линий клеток млекопитающих монослойным и суспензионным методами с использованием различных систем накопления.

На участке размещено следующее основное оборудование:

- для приготовления воды I, II и III типов;
- подготовки посуды, приготовления и стерилизации питательных сред и растворов;
- ламинарные шкафы для индивидуальной и парной работы;
- инвертированный микроскоп.

Для проведения монослойного культивирования предусмотрено наличие CO<sub>2</sub>-инкубатора с объемом 170 л и роллерной установки на 55 роллерных сосудов (рисунок 2).

Суспензионное культивирование может осуществляться в колбах с использованием шейкера-CO<sub>2</sub>-инкубатора MultitronCell (рисунок 3).

Оборудование для проведения масштабирования культивирования модифицированных линий клеток млекопитающих представлено двумя типами биореакторов:

- перемешивающего типа — CelliGen310, состоящего из основной и вспомогательной станции управления технологическим процессом. Основная станция оснащена сенсорным дисплеем и персональным компьютером с установленным программным обеспечением. Ферментеры обеспечены стеклянными культуральными сосудами с водяной рубашкой и с рабочим объемом заполнения в трех диапазонах:



**Рисунок 3** — Шейкер-СО<sub>2</sub>-инкубатор Multitron Cell



**Рисунок 4** — Система суспензионного культивирования на основе ферментеров перемешивающего типа – CelliGen310 (основная станция культивирования и культуральный сосуд с объемом заполнения 1,2 л)

от 0,8 до 1,7 л; от 2,0 до 5,5 л и от 3,0 до 10,0 л (рисунок 4);

- волнового типа — система культивирования клеток Wave 20/50 в составе: рабочая станция, блок перистальтических насосов, платформа для одноразовых мешков с вместимостью от 1 до 10 л, GeneralElectric (рисунок 5).

### Участок № 3

Предназначен для выделения и очистки рекомбинантных полипептидов и обеспечивает высокоэффективное выделение полипептидов с использованием различных видов жидкостной хроматографии низкого давления, а также получение конечного продукта со степенью чистоты не менее 95 %. Производительность системы позволяет максимально быстро выделить целевой продукт из культуральной жидкости и постоянное нахождение в захлаженном состоянии.

На участке размещено следующее основное оборудование:

- системы для проведения концентрирования — система тангенциальной фильтрации Sartoflow Slice 200 и установка для проведения ультрафильтрации и концентрирования целевого продукта АСФ-009, ЗАО «Владисарт»;

- хроматографическая система со скоростью потока не менее 150 мл/мин для получения высокоочищенных рекомбинантных полипептидов высокой степени чистоты в комплекте с колонками, сорбентами и другими расходными материалами;

- холодильник хроматографический для проведения процессов очистки при пониженных температурах.

После апробации АТЛ, составления соответствующих Программы и методик, были проведены государственные испытания АТЛ КМКМ.

В рамках экспериментального исследования осуществлено последовательное масштабируемое культивирование клеток линии CHO-S, продуцирующей рекомбинантный белок GP вируса Эбола, суспензионным способом в ферментерах волнового и перемешивающего типов.

Белок VGP (virus glycoprotein) в составе конструкции pCI-neo-VGP представляет собой участок поверхностного гликопротеина вируса Эбола (штамм Заир). Нуклеотидная последовательность VGP в составе конструкции кодирует участок 1–650 аминокислотных остатков и не содержит трансмембранный домен (т.е. полная последовательность поверхностного белка минус трансмембранный домен 651–676 аминокислотных остатков). Также к участку 1–650 аминокислотных остатков добавлено 6 остатков гистидина для облегчения последующей очистки белка при помощи аффинной хроматографии. Трансмембранный домен 651–676 аминокислотных остатков удален для осуществления внеклеточной экспрессии рекомбинантного белка в культуральную жидкость.

Для культивирования клеток в биореакторах в бессывороточную питательную среду Power CHO-2CD («Lonza») в качестве добавок вносили на 1 л среды 10 мл добавки НТ



**Рисунок 5** — Система культивирования клеток Wave 20/50 (платформа качалки с расположенным на ней одноразовым мешком объемом заполнения 5 л)

supplement (гипоксантин и тимидин) и 20 мл аланил-глутамина.

Размножение клеток с целью обеспечения требуемой посевной дозы клеток проводили в суспензионных условиях в колбах возрастающей вместимости: 125 мл, 250 мл и 1 л с объемом заполнения 30, 80 и 200 мл соответственно. Выращивание в колбах с навинчивающимися крышками осуществляли в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе с  $(5 \pm 1) \%$  содержанием  $\text{CO}_2$  в атмосфере, при влажности в пределах  $(70 \pm 5) \%$  и температуре  $37^\circ\text{C}$ . Колбы размещали на орбитальном шейкере, обеспечивая  $(100 \pm 5)$  об/мин. Посевная доза клеток для ферментеров в каждом опыте составляла  $0,3 \times 10^6$  кл/мл. Выращивание клеток в ферментерах продолжали в течение 7 сут. Рабочий объем заполнения составлял 1 л. С четвертого дня культивирования в жидкую фазу ферментера добавляли глюкозу до концентрации 7 г/л и подпитку с липидом А (Power Feed with lipid A, «Lonza») в количестве 50 мл/л.

По окончании цикла культуральную жидкость из ферментеров использовали для определения рекомбинантного белка.

Результаты культивирования клеток линии СНО-S представлены в таблицах 1 и 2.

Данные таблиц 1 и 2 свидетельствуют о росте клеток СНО-S — продуцента рекомбинантного белка GP вируса Эбола — в обоих биореакторах и показывают, что выход био-

массы клеток в волновом ферментере в 3 раза превышает таковой в ферментере перемешивающего типа.

Качественную оценку наличия экспрессии белка гликопротеина вируса Эбола продуцентом в культуральной жидкости проводили методом вестерн-блота, путем детекции окрашенных полос.

Результаты определения содержания рекомбинантного белка GP в культуральной жидкости методом иммуноферментного анализа (ИФА) показали, что по окончании культивирования его концентрация составляла для ферментера перемешивающего типа от 1,1 до 1,3 мг/л, а для волнового биореактора — от 1,7 до 2,0 мг/л.

После многостадийной хроматографической очистки на сорбентах с сочетанием методов ионообменной и гель-фильтрационной препаративной хроматографии чистота конечного продукта превышала уровень 95 %.

При изучении антигенной полноценности рекомбинантного белка GP методами ИФА и вестерн-блота установлено соответствие его структуры нативному гликопротеину возбудителя лихорадки Эбола.

#### Выводы

1. Создана аппаратно-технологическая линия по культивированию модифицирован-

ных линий клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантные белки, прошедшая Государственные испытания и принятая на снабжение в ВС РФ на основании приказа МО РФ № 385 от 25 декабря 2015 г.

2. Проведено культивирование модифицированных клеток линии CHO-S в ферментерах перемешивающего и волнового типов. Установлено преимущество в накоплении биомассы клеток и целевого белка в ферментерах волнового типа. Из культуральной жидкости выделен и очищен рекомбинантный полипептид GP со степенью чистоты более 95 %.

3. Результаты определения содержания рекомбинантного белка GP в культуральной жидкости методом ИФА показали, что по окончании культивирования его концентрация составляла для ферментера перемешивающего типа от 1,1 до 1,3 мг/л, а для волнового биореактора – от 1,7 до 2,0 мг/л.

4. Соответствие антигенной структуры рекомбинантного белка GP вируса Эбола нативному гликопротеину возбудителя подтверждено методами ИФА и вестерн-блота.

**Таблица 1** — Результаты выращивания культуры клеток CHO-S – продуцента белка GP вируса Эбола – в биореакторе перемешивающего типа (n=3)

Сутки культивирования	Концентрация клеток, 10 <sup>6</sup> кл/мл, $\chi \pm \sigma$	Доля жизнеспособных клеток, процент, $\chi \pm \sigma$	Концентрация глюкозы, C <sub>гл</sub> , г/л, $\chi \pm \sigma$	pH культуральной жидкости, $\chi \pm \sigma$	Количество вносимой подпитки, мл
0	0,30±0,02	99±1	НД	7,00±0,02	-
1	0,38±0,03	99±1	5,80±0,16	7,03±0,03	-
2	0,64±0,05	98±2	4,71±0,13	7,02±0,02	-
3	1,45±0,12	98±2	4,72±0,14	7,05±0,01	-
4	2,21±0,19	98±1	4,04±0,12	7,05±0,03	50+глюкоза
5	2,32±0,29	96±2	5,81±0,17	7,01±0,02	50+глюкоза
6	2,21±0,30	93±1	6,02±0,17	6,95±0,01	50+глюкоза
7	2,20±0,31	87±2	4,80 ±0,13	7,00±0,01	-

**Таблица 2** — Результаты выращивания культуры клеток CHO-S – продуцента белка GP вируса Эбола – в биореакторе волнового типа (n=3)

Сутки культивирования	Концентрация клеток, 10 <sup>6</sup> кл/мл, $\chi \pm \sigma$	Доля жизнеспособных клеток, процент, $\chi \pm \sigma$	Концентрация глюкозы, C <sub>гл</sub> , г/л, $\chi \pm \sigma$	pH культуральной жидкости, $\chi \pm \sigma$	Количество вносимой подпитки, мл
0	0,30±0,02	99±1	НД	7,00±0,01	-
1	0,55±0,03	99±1	5,81±0,16	6,99±0,02	-
2	1,31±0,11	99±1	5,50±0,15	6,99±0,01	-
3	1,96±0,19	98±1	4,71±0,14	7,01±0,02	50
4	3,82±0,36	99±2	4,32±0,12	6,94±0,01	50+глюкоза
5	5,94±0,48	97±3	4,72±0,14	6,95±0,01	50+глюкоза
6	7,12±0,68	89±2	4,34±0,13	6,95±0,01	50+глюкоза
7	5,23±0,42	79±3	4,21±0,13	7,01±0,02	-

### **Информация о конфликте интересов**

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

### **Сведения о рецензировании**

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

### **Список источников**

1. Егоров Н.С., Самуилов В.Д. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. Биотехнология. Кн. 2. М.: Высшая школа, 1988.
2. Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Основы фармацевтической биотехнологии. Ростов-на-Дону: Феникс, Томск: Издательство НТЛ; 2006.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир; 2002.
4. Глебов О.К. Генетическая трансформация соматических клеток // Методы культивирования клеток / Под ред. Пинаева Г.П. Л.: Наука; 1988. С. 205–221.
5. Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Hu W.S. Recombinant protein therapeutics from CHO cells — 20 years and counting // SBE Special Section. 2007. P. 40–47.

### **Об авторах**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. 141306, Российская Федерация, г. Сергиев Посад, ул. Октябрьская, д. 11.

*Чуркин Игорь Алексеевич.* Начальник отдела, канд. биол. наук.

*Борисевич Сергей Владимирович.* Начальник института, д-р биол. наук, проф, член-корр. РАН.

*Кутаев Дмитрий Анатольевич.* Заместитель начальника института по научно-исследовательской работе, канд. биол. наук.

*Лымарь Владимир Тимофеевич.* Старший научный сотрудник отдела, д-р мед. наук.

*Пащенко Юрий Иванович.* Ведущий научный сотрудник отдела, д-р биол. наук, проф.

*Гордеев Евгений Владимирович.* Заместитель начальника отдела.

*Кулиш Вячеслав Сергеевич.* Заместитель начальника отдела, канд. биол. наук.

*Плеханова Тамара Михайловна.* Старший научный сотрудник отдела, канд. биол. наук.

Федеральное государственное бюджетное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов». 117545, Российская Федерация, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1.

*Хамитов Равиль Авгатович.* Заместитель директора по стратегическому развитию, д-р мед. наук, проф.

*Сауткина Елена Николаевна.* Заведующая отделом медицинской биотехнологии, канд. хим. наук.

*Адрес для переписки:* Чуркин Игорь Алексеевич; 48cnii@mail.ru

# The Creation of Technological Lines for the Cultivation of Modified Lines of Mammalian Cells Expressing Recombinant Proteins

I.A. Churkin<sup>1</sup>, S.V. Borisevich<sup>1</sup>, D.A. Kutaev<sup>1</sup>, V.T. Lyman<sup>1</sup>, Yu.I. Pashchenko<sup>1</sup>,  
E.V. Gordeev<sup>1</sup>, V.S. Kulish<sup>1</sup>, T.M. Plekhanova<sup>1</sup>, R.A. Khamitov<sup>2</sup>, E.N. Sautkina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Oktyabrskaya Street 11, Sergiev Posad 141306, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Federal State Budgetary Institution «State Scientific-Research Institute of Genetics and Plant Breeding of Industrial Microorganisms», 1 Dorozhny Drive 1, Moscow 117545, Russian Federation*

The article presents data for creating technological line for the cultivation of modified lines of mammalian cells expressing recombinant proteins. This line is composed of three sections: for the creation of the modified lines of mammalian cells using modern molecular biological tools; for the implementation of scalable cultivation of genetically modified mammalian cells lines; for separation and purification of recombinant polypeptides using validated methods. Within the framework of the experimental study, the cells of CHO-S line, producing recombinant protein GP of the Ebola virus, have been grown up in the mixer reactor and in the wave-type fermenter with the use of suspension technology. It is established, that the wave-type fermenters have the advantage in the accumulation of cells and necessary protein. The recombinant polypeptide GP with purity exceeding 95 % has been isolated and purified from the cultural liquid. During the study of recombinant protein GP by ELISA and Western blot methods, it was detected that it's structure coincides with that of the native glycoprotein of the Ebola virus causative agent.

*Keywords: technological line; cultivation; mammalian cells; expression; recombinant protein.*

*For citation: I.A. Churkin, S.V. Borisevich, D.A. Kutaev, V.T. Lyman, Yu.I. Pashchenko, E.V. Gordeev, V.S. Kulish, T.M. Plekhanova, R.A. Khamitov, E.N. Sautkina. The Creation of Technological Lines for the Cultivation of Modified Lines of Mammalian Cells Expressing Recombinant Proteins // Journal of NBC Protection Corps. 2017. V. 1. № 1. P. 33–41.*

### *Conflict of interest statement*

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

### *Peer review information*

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.



### References

1. Yegorov N.S., Samuilov V.D. Modern methods of creating industrial strains of microorganisms. Biotechnology. Book 2. Moscow: Graduate School, 1988 (in Russian).
2. Prishchep T.P., Chuchalin W.S., Zaikov K.L., Mihaleva L.K., Belova L.S. Basics of pharmaceutical biotechnology. Rostov-na-Donu: Phoenix, Tomsk: NT, 2006 (in Russian).
3. Glick B., Pasternak J. Molecular biotechnology. Principles and application. Moscow: Mir, 2002 (in Russian).
4. Glebov O.K. Genetic transformation of somatic cells // Techniques for cultivation of cells / Ed. Pinaev G.P.; Leningrad: Nauka, 1988. P. 205–221 (in Russian).
5. Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Hu W.S. Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting // SBE Special Section. 2007. P. 40–47.

### Authors

Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific-Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Oktyabrskaya Street 11, Sergiev Posad 141306, Russian Federation.

*Churkin I.A.* Chief of the Department. Candidate of Biological Sciences.

*Borisevich S.V.* Chief. Doctor of Biological Sciences, Professor, Corr. Member RAS.

*Kutaev D.A.* Deputy Chief for Scientific and Research Work. Candidate of Biological Sciences.

*Lymar V.T.* Senior Researcher. Doctor of Medical Sciences.

*Pashchenko Yu.I.* Leading Researcher. Doctor of Biological Sciences, Professor.

*Gordeev E.V.* Deputy Chief of the Department.

*Kulish V.S.* Deputy Chief of the Department. Candidate of Biological Sciences.

*Plekhanova T.M.* Senior Researcher. Candidate of Biological Sciences.

Federal State Budgetary Institution «State Scientific-Research Institute of Genetics and Plant Breeding of Industrial Microorganisms». 1 Dorozhny Drive 1, Moscow 117545, Russian Federation.

*Khamitov R.A.* Vice Director for Strategic Development. Doctor of Medical Sciences, Professor.

*Sautkina E.N.* Chief of the Department of Medical Biotechnology. Candidate of Chemical Sciences.

*Address:* Churkin Igor Alekseevich; 48cnii@mail.ru