

# СТАДИЯ ТЕРМОЦИКЛИРОВАНИЯ В ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА

Е. В. Бlynская, С. В. Тишков, К. В. Алексеев, С. В. Минаев

ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Контакты: Сергей Валерьевич Тишков sergey-tishkov@ya.ru

**Введение.** В технологии лиофилизации стадия замораживания играет ключевую роль: она определяет время первичной сублимации, вторичной десорбции и зачастую внешний вид лиофилизата. Длительность лиофилизации связана с составом и условиями замораживания через параметр сопротивления массопереносу, который зависит от размера кристаллов льда.

**Цель исследования** — осуществить подбор температурных режимов термоциклирования («отжига») для получения наиболее паропроницаемого сублимационного слоя, рассчитать значение сопротивления массопереносу воды и выбрать оптимальный режим лиофилизации для приготовления лиофилизата ГК-2 для приготовления растворов для инъекций.

**Материалы и методы.** Субстанция: ГК-2 (гексаметиленамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) (ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова», Россия); вспомогательные вещества, предназначенные для парентерального применения: лиопротектор — сахароза (CompriSugar®) (CristalUnion, Франция), криопротектор — полиэтиленгликоль 4000 (ПЭГ, макрогол) (Polyglykol® 4000, Panreac, Испания). Леофильная сушилка Edwards EF-6 (Италия); микроскоп Nikon Eclipse E200; цифровая камера Nikon DS-Ri2; конфокальный микроскоп LEXT OLS 4100. В работе использованы различные режимы замораживания, лиофилизации, прямая оптическая микроскопия в холодной камере, лазерная микроскопия и математические формулы для определения значений сопротивления массопереносу водяного пара модельных лиофилизатов.

**Результаты.** Рассмотрены возможности оптимизации этапа замораживания и соответственно всего цикла лиофилизации путем введения промежуточной стадии термоциклирования, приведены расчеты коэффициента сопротивления массопереносу состава при различных условиях замораживания и размерах кристаллов льда.

**Заключение.** Определено упрощенное уравнение расчета коэффициента сопротивления массопереносу для модельных растворов ГК-2 на основе корреляционной зависимости. Осуществлен подбор режимов замораживания и «отжига» исходя из наиболее важных показателей, таких как производительность и время лиофилизации.

**Ключевые слова:** стадия замораживания, лиофилизация, размеры кристаллов льда, термоциклирование, «отжиг»

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-87-94

## THERMAL CYCLING STAGE IN THE OPTIMIZATION OF THE FREEZING PROCESSES IN THE TECHNOLOGY OF DRUG LYOPHILIZED

E. V. Blynskaya, S. V. Tishkov, K. V. Alekseev, S. V. Minaev

V. V. Zakusov Research Institute of Pharmacology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

**Introduction.** In the lyophilization technology, the freezing stage plays a key role in determining the time of primary sublimation, secondary desorption, and often the appearance of the lyophilisate. The duration of lyophilization is related to the composition and freezing conditions through the parameter resistance to mass transfer, which depends on the size of ice crystals.

**Objective:** to select temperature regimes of thermal cycling (“annealing”) to obtain the most vapor-permeable sublimation layer, calculate the value of resistance to mass transfer of water and select the most optimal lyophilization mode for preparing lyophilisate GK-2 for preparing solutions for injections.

**Materials and methods.** Substance: GK-2 (hexamethyleneamide bis-(N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine)) (V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Russia); excipients intended for parenteral use: lyoprotector — sucrose (CompriSugar®) (CristalUnion, France), cryoprotector — polyethylene glycol 4000 (PEG, macrogol) (Polyglykol® 4000, Panreac, Spain). Edwards EF-6 Lyophilic Dryer (Italy); microscope Nikon Eclipse E200; digital camera Nikon DS-Ri2; confocal microscope LEXT OLS 4100. Various freezing, lyophilization, direct optical microscopy in a cold chamber, laser microscopy and mathematical formulas were used to determine the values of resistance to mass transfer of water vapor from model lyophilisates.

**Results.** This article discusses the possibilities of optimizing the freezing stage and, accordingly, the entire lyophilization cycle by introducing an intermediate thermal cycling stage, provides calculations of the mass transfer coefficient of the composition under different freezing conditions and ice crystal sizes.

**Conclusion.** A simplified equation for calculating the coefficient of resistance to mass transfer for model solutions of GK-2 based on the correlation dependence was determined. The selection of freezing and “annealing” modes was carried out on the basis of the most important indicators, such as productivity and time of lyophilization.

**Key words:** freezing stage, lyophilization, ice crystal size, thermocycling, “annealing”

## Введение

Одним из самых распространенных методов стабилизации фармацевтических субстанций (ФС) пептидной природы при разработке инъекционных препаратов является лиофилизация [1, 2]. В связи с тем, что в процессе лиофилизации происходит удаление растворителя из замороженного состояния, не происходит термической деструкции молекул пептидной природы, в то же время полученная готовая лекарственная форма (ЛФ) обладает устойчивостью к гидролизу и может храниться более длительное время, чем традиционные жидкие ЛФ [3–5]. Поэтому лиофилизация выбрана в качестве метода получения готовой ЛФ при разработке состава и технологии ЛФ для инъекционного применения нейропротекторного действия с ФС, разработанной в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» под руководством Т.А. Гудашевой в отделе химии лекарственных средств и имеющей шифр ГК-2 [6]. Лيوфилизация, несмотря на преимущества, обеспечиваемые ЛФ, является сложным, многоэтапным, экономически затратным процессом, при котором необходим тщательный подбор не только состава, количества растворителя, но и режимов лиофилизации, особенно стадии замораживания, поскольку она определяет скорость всех последующих процессов.

На стадии замораживания определяются размер кристаллов льда, их расположение, гомогенность, что в свою очередь будет характеризовать размер пор, извилистость и в конечном итоге паропроницаемость или обратное значение, сопротивление массопереносу.

Представленные значения имеют особую важность, поскольку определяют длительность дальнейших стадий лиофилизации, первичной сублимации и десорбции. А в связи с длительностью и энергозатратностью процесса особое значение имеют технологические приемы по уменьшению удельного сопротивления массопереносу и соответственно времени сублимации и десорбции. К наиболее распространенным методам относится подбор температурных режимов замораживания, т. е. оптимизация скорости замораживания для получения более крупных кристаллов, однако из-за стохастической природы процесса образования кристаллов льда возникает негомогенная морфология и более мелкие кристаллы льда сосредотачиваются в верхней и нижней частях флакона. Поэтому все более часто в тех-

нологии лиофилизации начинает использоваться промежуточная стадия «отжига», или термоциклирования, которую проводят после замораживания раствора для укрупнения и гомогенизации кристаллов льда, уменьшения сопротивления массопереносу и времени сублимации.

«Отжиг», или термоциклирование, составляет процесс, в котором происходит постепенное нагревание и подплавление образовавшихся кристаллов льда и затем по достижении определенной температуры повторная заморозка лиофилизата, при которой кристаллы льда замораживаются вокруг оставшихся замороженными центров кристаллизации. К тому же обработка «отжигом» часто уменьшает феномен агрегации белков и пептидов и увеличивает коэффициент восстановления активности белков и пептидов [7, 8], а также уменьшает время регидратации лиофилизатов.

Поэтому основная **цель** настоящей **работы** – подобрать температурные режимы «отжига» для получения наиболее паропроницаемого сублимационного слоя, рассчитать значение сопротивления массопереносу воды и выбрать наиболее оптимальный режим лиофилизации для приготовления ЛФ.

## Материалы и методы

### Используемые материалы

Субстанция: ГК-2 (гексаметиленамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) (ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Россия); вспомогательные вещества, предназначенные для парентерального применения: лиопротектор – сахароза (CompriSugar®) (CristalUnion, Франция), криопротектор – полиэтиленгликоль 4000 (ПЭГ, макрогол) (Polyglykol® 4000, Panreac, Испания).

Эксперименты по замораживанию проводили с использованием модельного состава ГК-2:сахароза: ПЭГ 4000 в соотношении 1:20:80 мг во флаконах из дроба объемом 5 мл с диаметром 16 мм и средней толщиной дна в самой узкой части 1,1 мм (ВИП-С-МЕД, Россия). Каждый флакон заполняли 1 мл композиции, что приводило к высоте заполнения 8 мм для всех циклов лиофилизации.

### Используемое оборудование

Леофильная сушилка Edwards EF-6 (Италия); микроскоп Nikon Eclipse E200; цифровая камера Nikon DS-Ri2; конфокальный микроскоп LEXT OLS 4100.

### Используемые методики

**Режимы замораживания.** Флаконы подвергали замораживанию в 2 режимах:

- замораживание до  $-45^{\circ}\text{C}$  при скорости  $0,383^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (режим 1);
- замораживание с предварительно охлажденными полками до  $-45^{\circ}\text{C}$  при  $1,15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (режим 2).

Затем заполненные флаконы помещали внутрь лабораторной лиофильной сушики и для каждой скорости замораживания использовали 3 режима «отжига»:

- «отжиг» в течение 3 ч при  $-20^{\circ}\text{C}$  (режим «отжига» 1);
- «отжиг» в течение 1 ч при  $-10^{\circ}\text{C}$  (режим «отжига» 2);
- двойной «отжиг» в течение 1,5 ч на каждую температурную точку при температурах  $-20$  и  $-10^{\circ}\text{C}$  (режим «отжига» 3).

**Цикл лиофилизации.** Для определения взаимосвязи между морфологией кристаллов льда, морфологией лиофилизатов и временем первичной сублимации цикл сублимационной сушики проводили в лабораторном лиофилизаторе.

Партию в 50 флаконов загружали на полку сублимационной сушики и применяли следующий цикл лиофилизации: охлаждение до  $-45^{\circ}\text{C}$ , в зависимости от режима замораживания занимающее 1–3 ч ( $0,383$  и  $1,15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ), и изотермическое плато в течение 2 ч; сублимация при температуре полки  $-26^{\circ}\text{C}$  и общем давлении газа  $P = 6,8\text{--}8,0 \times 10^{-2}$  мбар для этапа первичной сублимации; вторичная стадия десорбции при температуре полки  $8^{\circ}\text{C}$  (длительность определялась в зависимости от времени первичной сублимации) и общем давлении газа  $P = 5,9\text{--}6,0 \times 10^{-2}$  мбар.

**Прямая оптическая микроскопия в холодной камере.** Выбранный метод характеристики структуры кристаллов льда — прямая оптическая микроскопия в холодной камере — зарекомендовал себя в фармацевтической технологии. Этот метод предпочтительнее криоСЭМ из-за его низкой стоимости, простоты реализации, а также потому, что он лучше сохраняет исходную структуру замороженного материала. При этом не требуется никаких крепежных средств или криосодержащих агентов для подготовки образца и, в отличие от метода криоСЭМ, нет необходимости в высушивании образцов [9].

Особенности методики в том, что замороженный образец подготавливали микротомом (прибор для приготовления тонких срезов для микроскопического исследования), а затем его наблюдали под микроскопом в холодной камере, поддерживаемой при  $-30^{\circ}\text{C}$ . Изображения, полученные цифровой камерой, записаны, обработаны и проанализированы с помощью программ Visilog и Scion. Значения среднего диаметра рассчитывали путем оценки поверхности эквивалентного круга, который имел ту же поверх-

ность, что и одна частица, схематизированная как многоугольник правильной формы. Для получения приемлемой воспроизводимости распределения средних диаметров кристаллов льда образцы исследовали сверху, в средней части и на дне.

**Лазерная микроскопия и построение 3D-модели поверхности лиофилизата.** Для оценки результатов оптической микроскопии значения диаметров кристаллов льда сравнивали со значениями среднего диаметра пор, оцененными по параметрам структуры лиофилизата, а именно пористости. Высушенные лиофилизаты исследовали лазерной микроскопией, в результате которой строилась 3D-модель срезов и структура образовавшихся ячеек сравнивалась с морфологией кристаллов льда.

Проницаемость лиофилизата в конце периода первичной сушики также оценивали по экспериментальным средним скоростям сублимации и строили корреляционную кривую со средними диаметрами кристалла льда, ранее определенными с помощью оптической микроскопии.

**Определение сопротивления массопереносу.** Экспериментальные значения сопротивления массопереносу водяного пара через сухой слой, обозначенного  $R_p$ , рассчитывали по скоростям сублимации и по средним значениям температуры продукта путем применения следующего соотношения:

$$R_p = \frac{A_s(P_i - P_{\text{chamber}})}{\dot{m}}, \quad (1)$$

где  $m$  — средняя скорость сублимации для одного флакона;  $P_i$  — давление водяного пара на фронте сублимации, предполагаемое в равновесии с оценкой температуры в этой точке;  $P_{\text{chamber}}$  — общее давление газа в камере, измеренное датчиком общего давления (давление воды в камере считалось равным общему давлению);  $A_s$  — площадь сублимации для одного флакона, равная внутренней прямой площади поверхности флакона. Значения  $P_i$  рассчитывались по средней температуре продукта. Средняя скорость сублимации для одного флакона  $m$  определялась из общей потери массы флакона и полного времени сублимации, указанного гигрометром по средней точке резкого снижения давления воды.

Более того, из теории молекулярной диффузии в режиме Кнудсена теоретические значения сопротивления массопереносу водяного пара определялись следующим соотношением:

$$R_p = \frac{RTe'_{c,s}}{M_{\text{water}} D_{k,e}} + R_{p0} = \frac{1,5e_{c,s}}{d_p} \left( \frac{T}{\varepsilon} \right) \sqrt{\left( \frac{\pi RT}{2M_{\text{water}}} \right)} + R_{p0}, \quad (2)$$

где  $T$  — средняя температура продукта при сублимации, равная  $-26^{\circ}\text{C}$ ;  $\varepsilon = 0,9$  для пористости

лиофилизата;  $\tau$  — коэффициент извитости, значение которого было найдено равным 1,5 по данным литературы для подобных составов [9];  $R_{p0}$  — поправочный член, интерпретируемый как сопротивление массопереносу в нулевом пористом слое ( $e_{cs} = 0$ ) из-за поверхностных эффектов.

## Результаты и обсуждение

### Влияние режимов «отжига»

Основной задачей «отжига», помимо дополнительной кристаллизации лиофилизируемой смеси, является увеличение размера кристаллов (пор) при лиофилизации, соответствующая оптимизация про-

цесса и уменьшение времени цикла сублимации, поэтому для подбора оптимального режима лиофилизации ГК-2 использовали «отжиг» в сочетании с 2 режимами замораживания: «быстрым» и «медленным».

На рис. 1 и 2 представлены интегральные кривые усредненных значений кристаллов льда при распределении в верхней части образца, на его дне и в средней части для 3 режимов «отжига»: 1-й — при  $-10^\circ\text{C}$  в течение 1 ч, 2-й — при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 3 ч, 3-й режим использовал двойную систему «отжига» — при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 1,5 ч и при  $-10^\circ\text{C}$  в течение 1,5 ч. Данные, полученные с помощью режимов замораживания 1 и 2,

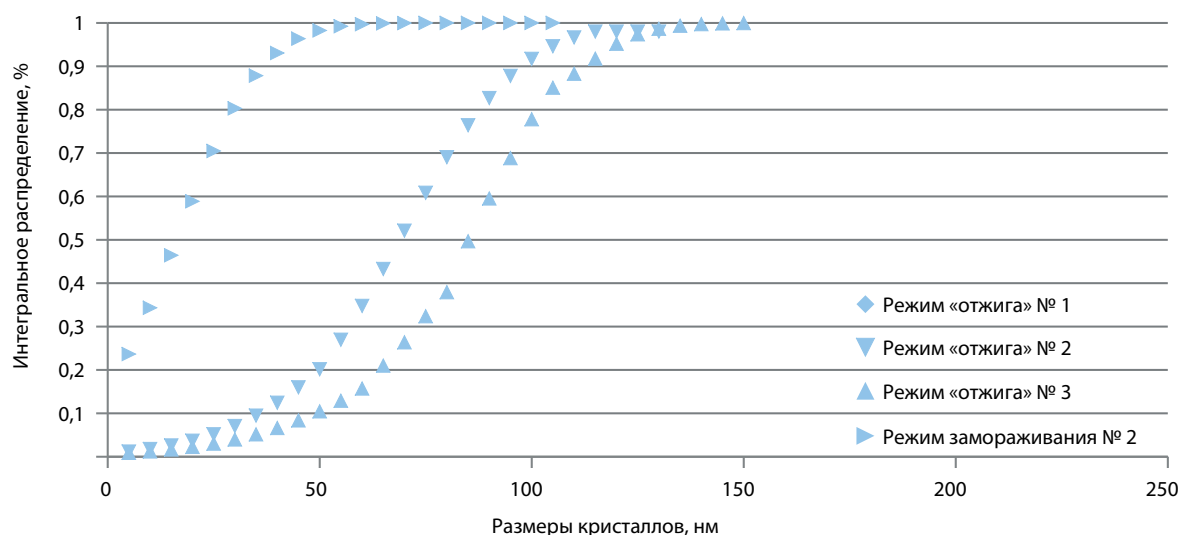


Рис. 1. Интегральные кривые распределения средних размеров кристаллов льда при режиме замораживания 1 и различных режимах «отжига»; флаконы из джута по 5 мл

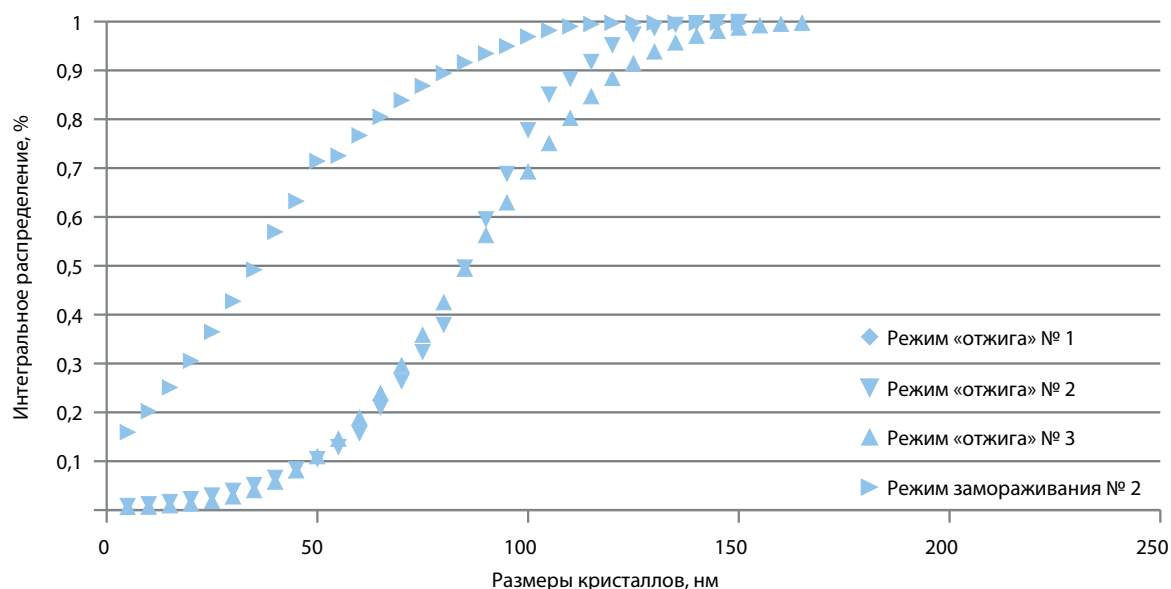
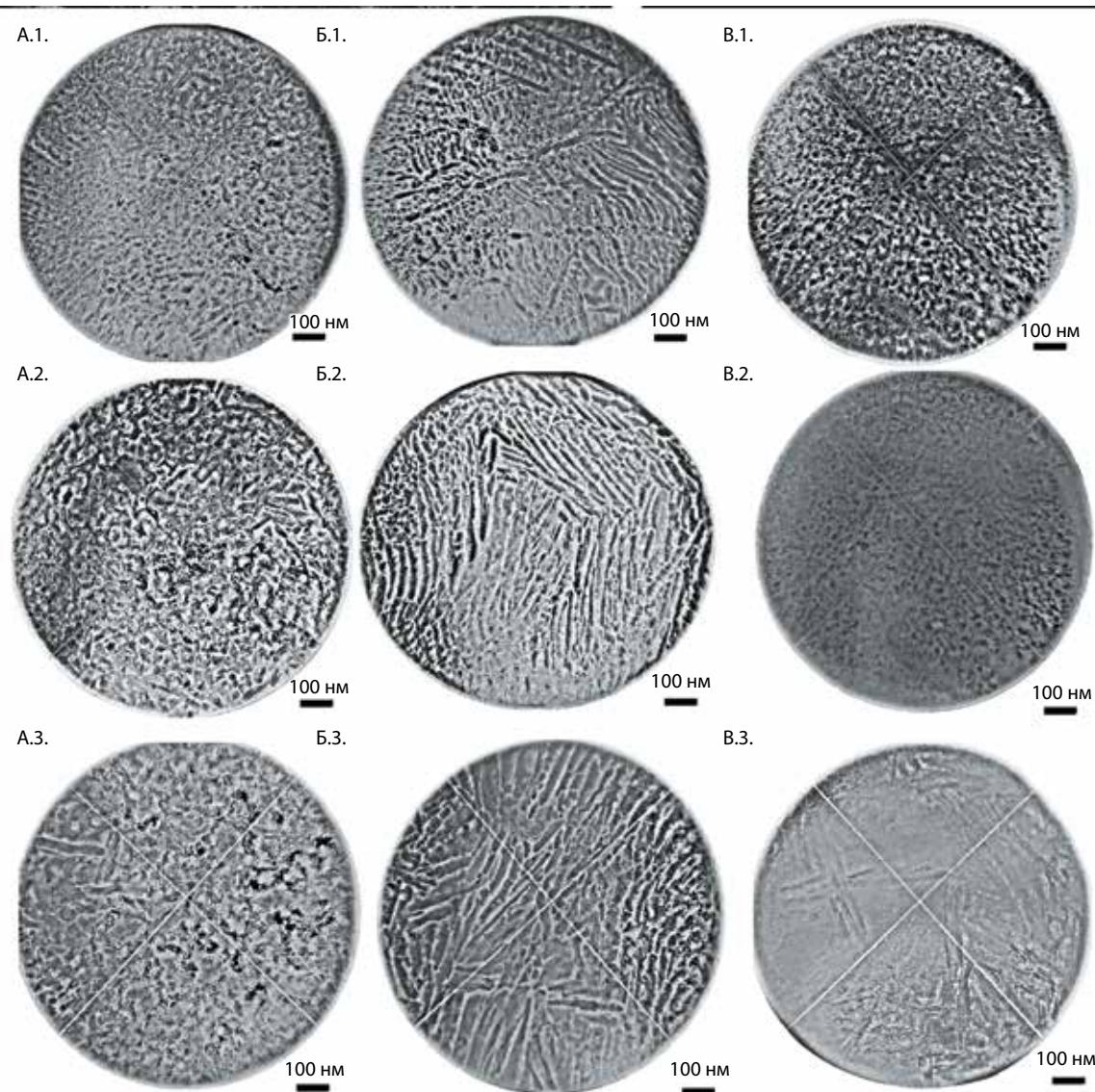


Рис. 2. Интегральные кривые распределения средних размеров кристаллов льда при режиме замораживания 2 и различных режимах «отжига»; флаконы из джута по 5 мл





**Рис. 3.** Влияние режимов «отжига» на структуру кристаллов льда: А — режим «отжига» 2 и «быстрый» режим замораживания; Б — режим «отжига» 2 и «медленный» режим замораживания; В — «медленный» режим замораживания без «отжига»; 1, 2, 3 — соответственно верхняя, средняя и нижняя часть флакона

показывают, что «отжиг» оказывает пропорциональное воздействие на размеры кристаллов льда при обоих режимах замораживания и соответственно при разных размерах кристаллов льда. Поэтому для выбора режима «отжига» необходимо опираться только на сравнительные данные.

Таким образом, в среднем для условий «отжига» проиллюстрировано (рис. 3) увеличение средних размеров кристаллов льда на 30 мкм и значительный эффект гомогенизации ледовой морфологии по всей высоте флакона, причем этот рост был выше в нижней части флакона (50 мкм), чем в верхней (20 мкм) (см. рис. 3 (1, 3)). Эффект гомогенизации и увеличения размеров кристаллов льда наиболее существенно проявлен при 3-м режиме «отжига» вне зависимости

от режимов замораживания, поэтому для оптимизации режима замораживания можно рекомендовать двойной «отжиг» (1,5 ч при  $-20^{\circ}\text{C}$  и 1,5 ч при  $-10^{\circ}\text{C}$ ), однако ввиду длительности и трудоемкости самого процесса двойного «отжига» и оптимального результата, полученного при режиме 2, необходимо провести сравнение времени первичной и вторичной сублимации, а также времени и производительности лиофилизации для всех режимов замораживания и «отжига» (см. таблицу).

При подборе режима замораживания учитывали эффект гомогенизации, оказывающий благоприятное влияние на проницаемость высушенного слоя и, наконец, на время сублимации, однако на основе представленных данных сделан вывод о предпочтительном

Средние размеры кристаллов льда и корреляция с временем сублимации и производительностью флаконов с лиофилизатом

Режимы замораживания	Режимы «отжига»	Основной размер кристаллов льда, нм	Скорость сублимации, мг/(м <sup>2</sup> с)	Среднее время первичной сублимации, ч	Средняя общая длительность цикла лиофилизации, ч	Производительность флаконов за цикл лиофилизации в час, фл/ч
Режим 1	Режим 1	147 ± 5,88	226,07 ± 9,04	5,5 ± 0,22	25 ± 1,00	20 ± 0,80
	Режим 2	165 ± 6,60	248,68 ± 9,95	5 ± 0,20	22 ± 0,88	22,72 ± 0,91
	Режим 3	208 ± 8,32	310,85 ± 12,43	4 ± 0,16	23 ± 0,92	21,73 ± 0,87
Режим 2	Режим 1	123 ± 4,92	191,30 ± 7,65	6,5 ± 0,26	25 ± 1,00	20 ± 0,80
	Режим 2	134 ± 5,36	207,23 ± 8,29	6 ± 0,24	22 ± 0,88	22,72 ± 0,91
	Режим 3	163 ± 6,52	248,68 ± 9,95	5 ± 0,20	23 ± 0,92	21,73 ± 0,8692
Режим 1	—	113 ± 4,52	177,63 ± 7,11	7 ± 0,28	24 ± 0,96	20,83 ± 0,83
Режим 2	—	99 ± 3,96	155,42 ± 6,22	8 ± 0,32	24 ± 0,96	20,83 ± 0,83

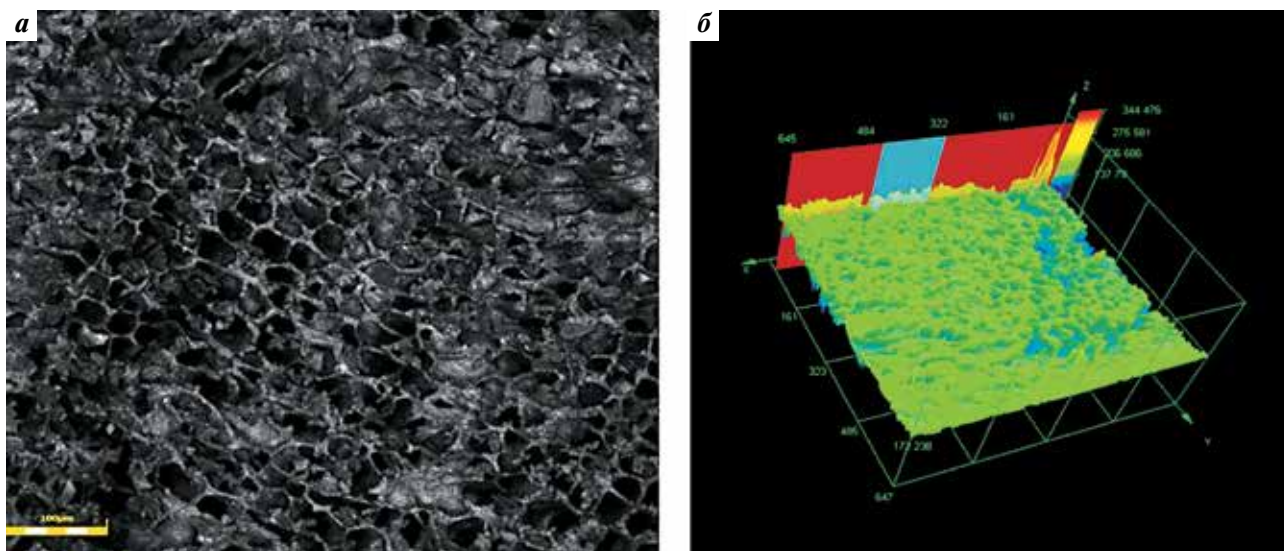


Рис. 4. Лазерная оптическая микроскопия лиофилизата (а), компьютерная 3D-модель структуры пор среза (б)

использовании при лиофилизации режима «отжига» 2 в комбинации с различными режимами замораживания, поскольку данный режим обеспечивает наилучшую производительность лиофилизации при наименьших затратах времени на охлаждение, несмотря на различные скорости замораживания.

#### Морфология лиофилизированного слоя. Интерпретация и моделирование массопереноса воды

Характеристики морфологии лиофилизированной матрицы влияют на устойчивость к переносу массы водяного пара, обозначаются  $R_p$  и определяются уравнением (1), обратно пропорциональным проницаемости высушенного слоя. Данное заключение исходило из наблюдавшегося равенства между средними размерами пор в лиофилизате, которые

вычисляли путем построения компьютерной 3D-модели на основе лазерной микроскопии (рис. 4), и средними размерами ледяного кристалла. Значения сопротивления массопереносу водяного пара для различных условий замораживания оценивали по средним значениям скорости сублимации, вычисленным по формуле (1), и средним размерам кристаллов льда, полученным с помощью оптической микроскопии в холодной камере.

Представленные данные, которые соответствуют максимальной толщине сухого слоя, равной 8 мм, в конце периода сублимации, нанесены на инверсию средних размеров кристаллов льда на рис. 5. Таким образом, на графике показана линейная зависимость между этими 2 параметрами, которые могут быть скоррелированы следующим уравнением (единицы СИ):

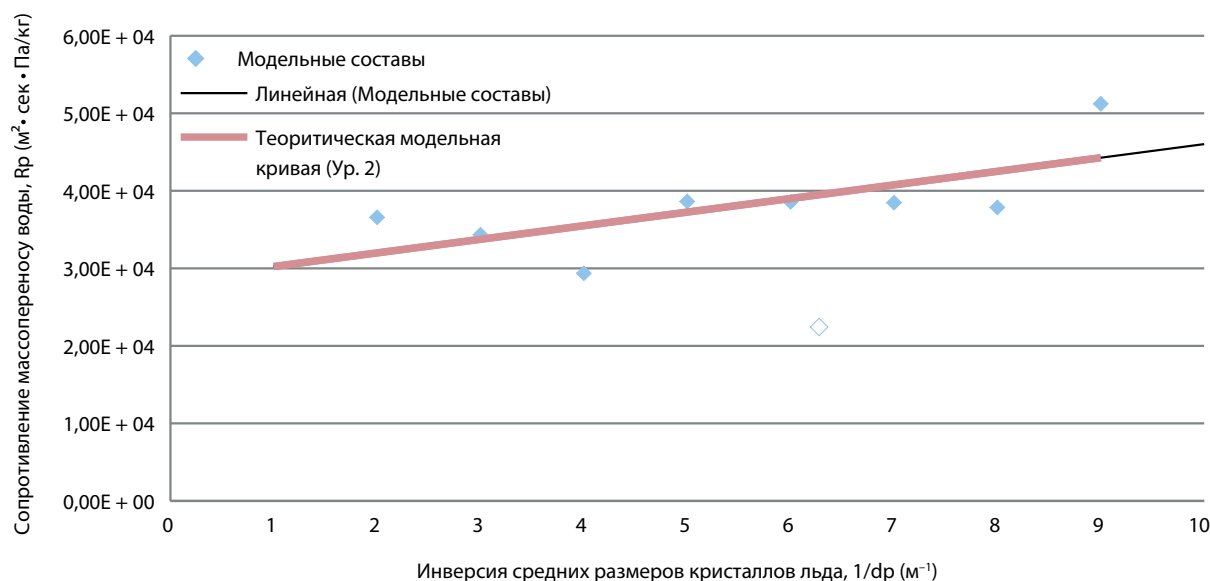


Рис. 5. Зависимость средних значений сопротивления массопереносу водяного пара от среднего диаметра пор. Экспериментальные и теоретические значения по формуле (2) (сплошная линия)

$$R_p = \frac{0,0309}{d_p} + 15500, (3)$$

где  $R_p$  выражается в м<sup>2</sup>·с·Па/кг и средний диаметр пор  $d_p$  в м. Эмпирическая корреляция соответствует толщине лиофилизированного слоя ( $h = 8$  мм), подтверждает пропорциональность экспериментальных значений сопротивления массопереносу водяного пара с инверсией средних диаметров кристаллов льда, т. е. обратно пропорциональна средним значениям диаметров пор. Представленное уравнение позволяет рассчитать значения сопротивления массопереносу в случае изменений размеров кристаллов льда при переносе технологии на другое производственное оборудование и корректировании температурных режимов замораживания лиофилизатов.

### Заключение

Проведены исследования и оптимизация этапа замораживания в цикле лиофилизации ЛФ для парентерального применения с ФС ГК-2. Получены усредненные значения размеров кристаллов льда для разных режимов замораживания и «отжига», рассчитаны значения сопротивления массопереносу и соответствующее время сублимации образцов. Осуществлен подбор режимов замораживания и «отжига» исходя из наиболее важных показателей, таких как производительность и время лиофилизации. Рассчитано уравнение на основе построенной эмпирической корреляционной зависимости для данного модельного состава, позволяющее корректировать технологию лиофилизации при использовании оборудования разных типов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гулякин И.Д., Хашем А., Николаева Л.Л. и др. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолакарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(2):55–60. [Gulyakin I.D., Hashem A., Nikolaeva L.L. et al. Development of a new technology for the preparation of a dosage form for the intravenous administration of an indole carbazole derivative LHS-1208. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(2):55–60. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60.
2. Аршинова О.Ю., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2013;(2):20–5. [Arshinova O.Yu., Oborotova N.A., Sanarova E.V. Auxiliary substances in the technology of lyophilization of drugs. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Development and Registration of Medicines 2013;(2):20–5. (In Russ.)].
3. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В., Марахова А.И. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков. Фармация 2017;66(1):14–8. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V., Marakhova A.I. Auxiliary substances in the technology of lyophilization of peptides and proteins. Farmatsiya = Pharmacy 2017;66(1):14–8. (In Russ.)].
4. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных

- лекарственных препаратов. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(1):6–11. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. Technological approaches to improving the process of lyophilization of protein and peptide drugs. Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(1):6–11. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11.
5. Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В., Минаев С. В. Математическое моделирование этапа замораживания в технологии лиофилизированных лекарственных форм. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(2):15–21. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V., Minaev S.V. Mathematical modeling of the freezing stage in the technology of lyophilized drug forms. Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(2):15–21. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-15-21.
6. Поварнина П. Ю., Воронцова О. Н., Гудашева Т. А. и др. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции в крысиных моделях болезни Альцгеймера. Acta Naturae (русскоязычная версия) 2013;5(3):48–52. [Povarnina P.Yu., Vorontsova O.N., Gudasheva T.A. et al. The original dipeptide mimetik of the nerve growth factor GK-2 restores impaired cognitive functions in rat models of Alzheimer's disease. Acta Naturae (Russian version) 2013;5(3):48–52. (In Russ.)].
7. Hottot A., Vessot S., Andrieu J. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 2007;46(7):666–74. DOI: 10.1016/j.cep.2006.09.003.
8. Serp D., Mueller M., von Stockar U., Marison I.W. Low-temperature electron microscopy for the study of polysaccharide ultrastructures in hydrogels. II. Effect of temperature on the structure of Ca<sup>2+</sup>-alginate beads. Biotechnol Bioeng 2002;79(3):253–9. DOI: 10.1002/bit.10287. PMID: 12115413.
9. Caillet A., Cogné C., Andrieu J. et al. Characterization of ice cream structure by direct optical microscopy. Influence of freezing parameters. LWT-Food Science and Technology 2003;36(8):743–9. DOI: 10.1016/S0023-6438(03)00094-X.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

С. В. Тишков/S.V. Tishkov <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.