

Dissertation Lena Marie Spindler

Entwicklung und Charakterisierung einer partikulären
biobasierten Wirkstoffformulierung zur kontrollierten
Freisetzung an der *Regio olfactoria*

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart zur Erlangung
der Würde einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Lena Marie Spindler

aus Schwäbisch Gmünd

Hauptberichter: Prof. Dr. Günter E. M. Tovar
Mitberichter Fakultät: Prof. Dr. Roland Kontermann
Externe Mitberichterin: Prof. Dr. Katharina Schindowski Zimmermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. September 2022

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP
der Universität Stuttgart

2022

***Gehe nicht, wohin der Weg führen mag, sondern dorthin,
wo kein Weg ist und hinterlasse eine Spur.***

Jean Paul

Danksagung

Während meiner Dissertation habe ich viele neue Erfahrungen, interessante Erkenntnisse und tolle Menschen gewinnen können, die diesen besonderen Abschnitt meines Lebens bereichert und mich begleitet haben. Bei allen, die mich in unterschiedlichen Situationen und Abschnitten dieses Wegs unterstützt haben, oder von Anfang an, an mich geglaubt und mitgefiebert haben möchte ich mich von Herzen bedanken.

Für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP schreiben zu dürfen, möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater und Betreuer **Prof. Dr. Günter E. M. Tovar** bedanken. Vielen Dank für deine Unterstützung, die bereits vor dem offiziellen Start meiner Promotion mit der Stipendienbewerbung begonnen hat und insbesondere in den letzten Wochen bei der Erstellung dieser Dissertationsschrift und meinen Publikationsmanuskripten sehr wertvoll war. Vielen Dank für die allzeit inspirierenden Diskussionen und deine Bestärkung in meinem wissenschaftlichen Tun.

Bei meiner Betreuerin **Dr. Carmen Gruber-Traub** möchte ich mich für die Möglichkeit im Rahmen des *N2B-patch* Projektes promovieren zu dürfen und für die allzeit gute Betreuung herzlich bedanken. Danke, dass du mich vom ersten Tag an unterstützt und gefördert hast. Ich bin sehr dankbar für alle Erlebnisse und Erfahrungen, beispielsweise während diversen Meetings im In- und Ausland sowie digital. Dein mehrmals wöchentlicher Zuspruch und dein Vertrauen haben mich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich gestärkt.

Bei meiner externen Gutachterin **Prof. Dr. Katharina Zimmermann** möchte ich mich besonders für die Unterstützung und den wissenschaftlichen Austausch im Forschungsbereich des *Nose-to-Brain* Transports sowie für die Übernahme des zusätzlichen Gutachtens bedanken. Vielen Dank, dass ich im Labor der Hochschule Biberach Methoden lernen durfte. Ein großer Dank gilt dafür auch **Simone Ladel** und **Frank Maigler**. Darüber hinaus haben die vielen konstruktiven und unterhaltsamen Diskussionen meine Doktorarbeit sehr bereichert.

Bei **Prof. Dr. Roland Kontermann** bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes möchte ich für die finanzielle und ideelle Unterstützung während meines Promotionsstipendiums danken, sowie insbesondere **Dr. Peter Antes** und **Prof. Dr. Michael Nagel** für die vielseitige und gute Betreuung.

Dem **Projektkonsortium des N2B-patch Projektes** möchte ich für die allzeit offene Diskussion und produktive Arbeitsatmosphäre sowie für die Unterstützung durch verschiedene Labormaterialien danken. Insbesondere danke ich meinen Co-Autorinnen und Co-Autoren für die konstruktive Zusammenarbeit.

Bei **Dr. Michaela Müller**, **Dr. Achim Weber** und **Dr. Kirsten Borchers** möchte ich mich für die Unterstützung am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB ganz besonders bedanken. Vielen Dank für euren Zuspruch und die Möglichkeit als Wissenschaftlerin bei Fraunhofer aktiv mitarbeiten zu können und dennoch jederzeit genügend Freiraum für meine eigenen wissenschaftlichen Fragestellungen und Aufgaben der Dissertation zu haben.

Für die Nutzung von Geräten und Laboren an den Fraunhofer-Instituten für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB und für Produktionstechnik und Automatisierung IPA möchte ich mich bei **Dr. Michaela Müller**, **Dr. Achim Weber**, **Dr. Anke Burger-Kentischer**, **Prof. Dr. Peter Loskill** und **Heinz Greisiger** bedanken.

Dr. Alexander Southan und **Dr. Linus Stegbauer** möchte ich herzlich danken für die Eingliederung in die Doktorandengruppe der Uni, sowie für viele hilfreiche Diskussionen, die

wissenschaftliche Unterstützung und die Nutzung von Laboren und Geräten des Instituts für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP.

Meinen Doktorandenkolleginnen und –Kollegen **Jana Grübel, Andre Michele, Paul Reichle, Dr. Silke Keller, Dr. Lisa Rebers, Oliver Gorke, Nils von Seggern, Anastasia Tsianaka, Beatrice di Lelio** und **Erik Taylor** möchte ich für den persönlichen Austausch, die tolle und unterhaltsame Arbeitsatmosphäre sowie die Unterstützung mit Materialien und Messungen herzlich danken.

Für die tatkräftige und unermüdliche Unterstützung, wissenschaftliche Neugier und die persönliche Bereicherung meines Alltags am Institut möchte ich mich von Herzen bei meinen Studierenden **Rick Wiegand, Andreas Feuerhake, Sarah Gmünder, Jan Bröckel, Lisa Böhler, Alexander Schütz, Tim Völkerath** und **Julian Vogelwaid** bedanken.

Bei allen Mitarbeitenden der Innovationsfelder Funktionale Oberflächen und Materialien, Membranen und Zell- und Gewebetechnologie sowie den Gruppen Chemisch-Physikalische Grenzflächen und Chemie bio-inspirierter Strukturmaterialien möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, insbesondere bei **Melanie Dettling, Regina Buck, Sarah Schmidt, Veronika Schönhaar, Tobias Götz, Sarah Übele, Lisa Prestel, Ann-Sophie Schwemmler, Jan Hinnerk Henze, Jürgen Schmucker** und **Monika Riedl**.

Bei meinen Freunden, ganz besonders bei **Jana, Rahel, Pia, Ira, Laura, Katrin** und **Lennart** möchte ich mich bedanken für eine tolle und abwechslungsreiche Zeit während, neben oder außerhalb der Uni! Ihr seid großartig und ich bin sehr froh, dass ich euch habe!

Meiner Familie, ganz besonders **meinen Eltern** möchte ich von Herzen danken, dass ihr jederzeit ein offenes Ohr für mich habt, immer an mich glaubt und mich unterstützt. Nicht nur während meiner Doktorarbeit, sondern seit ich denken kann, immer für mich da seid, mich bestärkt und mir alles gebt was ich brauche! Ohne euch hätte ich es nicht bis hierhin geschafft!

Mein perfektes Puzzleteil **Jan**, vielen Dank für deine großartige Liebe und Geborgenheit, die du mir jeden Tag aufs Neue schenkst und die mir Flügel verleiht!

Inhaltsverzeichnis

<i>Danksagung</i>	<i>I</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>Kurzzusammenfassung</i>	<i>IX</i>
<i>Abstract</i>	<i>XI</i>
1. Einleitung	1
1.1 Neurologische Erkrankungen	1
1.1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.2 Die Behandlung von Multipler Sklerose	3
1.2 <i>Nose-to-Brain</i> Transport	5
1.2.1 Die Anatomie der Nasenhöhle	6
1.2.2 Extrazelluläre und intrazelluläre Mechanismen der <i>Regio olfactoria</i>	8
1.2.3 <i>In vitro</i> Testsysteme für die intranasale Applikation	9
1.3 Biobasierte Polymere	10
1.3.1 Das Biopolymer Polylactid-co-Glycolid	11
1.3.2 Das Biopolymer Chitosan	11
1.3.3 Das Biopolymer Hyaluronsäure	12
1.4 <i>Drug Delivery</i> Systeme	13
1.4.1 Wirkstofffreisetzung aus <i>Drug Delivery</i> Systemen	14
1.4.2 Partikuläre Wirkstofffreisetzung	15
1.4.3 Der Sprühtrocknungsprozess	18
1.4.4 Wirkstoffverkapselung mittels Sprühtrocknung	21
1.4.5 Sprühtrocknung von Immunoglobulinen	22
1.4.6 Sprühtrocknung von Chitosan	23
1.4.7 Partikuläre <i>Drug Delivery</i> Systeme für die nasale Applikation	23
2. Zielsetzung und Hypothesen der Arbeit	25
2.1 Zielsetzung der Arbeit	25
2.2 Hypothesen der Arbeit	27
2.2.1 Hypothese I	27
2.2.2 Hypothese II	28
2.2.3 Hypothese III	28
2.2.4 Hypothese IV	29
3. Entwicklung von PLGA-Chitosan-basierten Nano-in-Mikro-Partikeln mittels Sprühtrocknung und Untersuchung deren Applikation auf porzinem olfaktorischen Epithel	31
3.0 Erklärung meiner eigenständigen Leistung	31
3.1 Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa	32
3.1.1 Abstract	33
3.1.2 Introduction	33
3.1.3 Materials and Methods	36
3.1.4 Results	40
3.1.5 Discussion	53

3.1.6 Conclusion.....	57
3.1.7 Acknowledgements	58
3.1.8 Supplementary Material	58
<i>4. Entwicklung und Charakterisierung Chitosan-basierter Wirkstoffformulierungen für die Verkapselung sensitiver niedrigmolekularer Moleküle und monoklonaler Antikörper mittels Sprühtrocknung als intranasales Drug Delivery System.....</i>	<i>63</i>
4.0 Erklärung meiner eigenständigen Leistung	63
4.1 Spray-dried Chitosan Particles as Controlled Intranasal Drug Delivery Systems with High Encapsulation Efficiency for Small Molecules and Monoclonal Antibodies.....	64
4.1.1 Abstract.....	65
4.1.2 Introduction	65
4.1.3 Materials and Methods	67
4.1.4 Results and Discussion	73
4.1.5 Conclusion.....	93
4.1.6 Acknowledgements	94
4.1.7 Supplementary Material.....	95
<i>5. Charakterisierung und Validierung eines artifiziellen Mukosa-Analogs hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit porciner olfaktorischer Mukosa und der daraufhin vergleichbaren Spreitung von Hyaluronsäurelösungen</i>	<i>97</i>
5.0 Erklärung meiner eigenständigen Leistung	97
5.1 Hyaluronate Spreading Validates Mucin-Agarose Analogs as Test Systems to Replace Porcine Nasal Mucosa Explants: An Experimental and Theoretical Investigation.....	98
5.1.1 Abstract.....	99
5.1.2 Introduction.....	99
5.1.3 Materials and Methods	101
5.1.4 Development of Theoretical Models.....	106
5.1.5 Results and Discussion	110
5.1.5 Model Validation with Porcine Nasal Mucosa and HA-Tyr	118
5.1.6 Conclusions	120
5.1.6 Nomenclature	121
5.1.6 Acknowledgements	123
5.1.7 Supplementary Material.....	124
<i>6. Diskussion.....</i>	<i>127</i>
6.1 Diskussion zu Hypothese I.....	127
6.2 Diskussion zu Hypothese II.....	132
6.3 Diskussion zu Hypothese III	137
6.4 Diskussion zu Hypothese IV	145
<i>7. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....</i>	<i>151</i>
<i>8. Ausblick.....</i>	<i>155</i>
<i>I. Anhang.....</i>	<i>CLVII</i>
I.1 Eidesstattliche Erklärung	CLVII
<i>II. Abbildungsverzeichnis</i>	<i>CLIX</i>
<i>III. Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>CLXV</i>
IV	

IV. Literaturverzeichnis CLXVII

Abkürzungsverzeichnis

BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i> , Glykoproteine als Oberflächenmerkmal einer Zelle
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DD	engl. <i>Degree of Deacetylation</i> , Deacetylierungsgrad
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DS	engl. <i>Degree of Substitution</i> , Substitutionsgrad
EMA	engl. <i>European Medical Agency</i> , Europäische Arzneimittelagentur
EU	engl. <i>European Union</i> , Europäische Union
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i> , Amerikanische Arzneimittelbehörde
GRAS	engl. <i>Generally Regarded as Safe</i> , als "generell sicher" zertifiziert
HA	engl. <i>Hyaluronic Acid</i> , Hyaluronsäure
HA-Tyr	Tyramin-modifizierte Hyaluronsäure
IEP	isoelektrischer Punkt
IgG	Immunoglobulin G
MA	Mukosa-Analog
mAb	monoklonaler Antikörper
MHC	engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MUC	engl. <i>Mucin</i> , Muzin
MS	Multiple Sklerose
MW	engl. <i>Molecular Weight</i> , Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
OSN	Olfaktorische Sensorische Neuronen
PBS	engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PGA	engl. <i>Polyglycolic Acid</i> , Polyglykolsäure
PHB	Polyhydroxybutyrat
Ph.D.	engl. <i>Doctor of Philosophy</i>
PLA	engl. <i>Polylactic Acid</i> , Polymilchsäure
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PPMS	Primäre Progressive Multiple Sklerose
RPMI	nasale humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RRMS	engl. <i>Relapsing Remitting MS</i> , schubförmige wiederkehrende Multiple Sklerose
SPMS	engl. <i>Secondary Progressive MS</i> , sekundäre progressive Multiple Sklerose
TCR	engl. <i>T-cell Receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
T _H	T-Helferzelle
TPP	Tripolyphosphat
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
3R	engl. <i>Replace, Reduce, Refine</i> ; Tierversuche vermeiden, reduzieren, ersetzen

Kurzzusammenfassung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Entwicklung und Charakterisierung biobasierter partikulärer Wirkstoffformulierungen für die Verabreichung von Wirkstoffen in der Riechrinne, lat. *Regio olfactoria*. Die *Regio olfactoria* ist über den Riechnerv und den Trigeminierv direkt mit dem Gehirn und dem zentralen Nervensystem verbunden. Die intranasale Wirkstoffapplikation ist eine innovative Route insbesondere für Makromoleküle und Proteine, die durch Transport entlang dieser Nerven die Umgehung der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht. Dieser sogenannte *Nose-to-Brain* Transport ist deshalb aktuell vor allem für die Therapie neurologischer Erkrankungen, wie Multiple Sklerose, beispielsweise mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern von Interesse.

Um derartige partikuläre Wirkstoffformulierungen zu erforschen, wurden zunächst Polylactid-co-Glycolid-Nanopartikel (PLGA) in Chitosan als Matrixmaterial mittels Sprühtrocknung zu PLGA-Chitosan-Nano-in-Mikro-Partikeln (NiMP) verkapselt. Solche sprühgetrockneten NiMPs wurden noch nie zuvor in der Literatur beschrieben, da bisher ausschließlich emulsionsbasierte Verfahren zur Beschichtung von PLGA-Nanopartikeln mit Chitosan genutzt wurden. Die in dieser Dissertation hergestellten NiMPs wiesen eine sphärische Form und Partikelgrößen von 5,75-6,61 μm auf. In *ex vivo* olfaktorischer Mukosa vom Schwein zeigten unverkapselte mit Emulsionspolymerisation hergestellte PLGA-Nanopartikel (80 nm, 175 nm, 520 nm) eine größen- und zeitabhängige Aufnahme. Es wurde ermittelt, dass 520 nm große PLGA-Partikel innerhalb von 15 min mit Zellkernen und Neurofilamenten assoziierten. Im Vergleich dazu steigerte Chitosan die Aufnahme der sprühgetrockneten NiMPs, was auf die Eigenschaft von Chitosan zurückgeführt wurde, *Tight Junctions* im olfaktorischen Epithel öffnen zu können und so einen parazellulären Transport zu ermöglichen. Die Öffnung von *Tight Junctions* durch die Wechselwirkung mit Chitosan wurde zum ersten Mal in olfaktorischem Gewebe mittels immunhistologischer Färbung des Proteins *Zonula Occludens 1* (ZO-1) gezeigt.

Anschließend wurde der Einfluss unterschiedlicher Chitosanderivate mit Deacetylierungsgraden (DD) von 80-90 % und Molekulargewichten (MW) von 20-500 kDa auf die Partikelmorphologie, die Partikelgrößenverteilung und die Partikelausbeute des Sprühtrocknungsprozesses untersucht. Das MW der Chitosan-Partikel, weniger hingegen deren DD beeinflusste die Morphologie und die Größenverteilung der aus der Sprühtrocknung resultierenden Partikel sowie die Ausbeute des Sprühtrocknungsprozesses. Bei 100 °C Einlasstemperatur konnten Partikel mit glatter Oberfläche, monomodaler Partikelgrößenverteilung (Polydispersitätsindex $0,02 \pm 0,01$) und 69 ± 9 nm Durchmesser produziert werden. Die in dieser Dissertation optimierten Prozessparameter ermöglichten zudem hohe Partikelausbeuten von über 60 % und eine kontinuierliche Produktion über einen Zeitraum von bis zu 40 min.

Darüber hinaus wurden die Wirkstoffe Biotin und Ocrelizumab in dieser Dissertation zum ersten Mal in Chitosan verkapselt; dabei konnte eine hohe Verkapselungseffizienz von über 80 % für Beladungen zwischen 5 gew.% (Biotin, Ocrelizumab) und 15 gew.% (Ocrelizumab) mittels Sprühtrocknung erzielt werden. Mittels spektroskopischer Methoden wurde kein Unterschied zum nativen Molekül festgestellt, was eine intakte primäre und sekundäre Proteinstruktur impliziert. Lediglich ein bis zu 18%iger Verlust der Bindungskapazität nach erneuter Freisetzung aus den sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln lies den Rückschluss auf Defekte der Tertiär- oder Quartärstruktur des Proteins zu. Die Glasübergangstemperatur der entwickelten Partikel betrug $T_g \approx 36$ °C und bestätigte deren Lagerstabilität über fünf Wochen bei Raumtemperatur. Die Dissolutionstests *in vitro* zeigten keinen *Burst-Release*. Der Diffusionskoeffizient von Biotin wurde durch die Verkapselung in die Chitosan-Partikelmatrix auf $D_{\text{Biotin-Partikel}} = 4,11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ reduziert. Für Ocrelizumab resultierte ein signifikant niedrigerer Diffusionskoeffizient mit $D_{\text{Ocrelizumab-Partikel}} = 1,79 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ aus den Partikeln. Nach 360 h wurden $84,43 \pm 4,85$ % Ocrelizumab freigesetzt. Die erhobenen Daten ließen die Anwendung des Korsmeyer-Peppas

Modells zu, welches eine vollständige Freisetzung des Wirkstoffs innerhalb von 395 h voraussagte und eine Wirkstofffreisetzung über anormalen Transport anzeigte.

Um die entwickelte Partikelformulierung an der *Regio olfactoria* fixieren zu können wurden native und Tyramin-modifizierte Hyaluronsäure-Lösungen (HA, HA-Tyr) als mögliche Beschichtung auf Mukosa untersucht. Dazu wurde das Spreitungsverhalten der HA-Lösungen unter Laborbedingungen und in einer Klimakammer - die physiologischen Bedingungen der Nase nachbildend – analysiert. Hierzu wurde ein Muzin-Agarose-basiertes artifizielles Mukosa-Analog mit der *ex vivo* Mukosa verglichen und validiert. Mit sinkender Polymerkonzentration der HA-Lösung reduzierte sich der Kontaktwinkel, das Seitenverhältnis des Tropfens stieg an und die Spreitung auf der Mukosa wurde beschleunigt. Die physiologischen Bedingungen der Nase begünstigten ebenfalls die Spreitung.

Insgesamt konnte in dieser Dissertation erfolgreich eine Chitosan-basierte partikuläre Wirkstoffformulierung mittels Sprühtrocknung entwickelt werden, welche die strukturell intakte Verkapselung niedrigmolekularer Wirkstoffe und monoklonaler Antikörper ermöglicht. Für den therapeutischen Antikörper Ocrelizumab konnte eine kontrollierte Freisetzung über 15 Tage erzielt werden und das Matrixmaterial Chitosan bewirkte die Öffnung von *Tight Junctions* in der olfaktorischen Mukosa vom Schwein. Dadurch konnte eine verstärkte Aufnahme im olfaktorischen Epithel erzielt werden, was der Überwindung dieser biologischen Barriere entspricht und die Eignung der entwickelten Partikel für die intranasale Applikation deutlich macht. Das Spreitungsverhalten UV-vernetzbarer HA-Tyr-Lösungen ist für die Applikation auf Mukosa, und damit als befestigende Komponente des in dieser Dissertation entwickelten *Drug Delivery Systems* in der Nase geeignet.

Abstract

This doctoral thesis deals with the development and characterization of bio-based particulate drug formulations for drug delivery in the olfactory cleft, lat. *Regio olfactoria*. The olfactory mucosa is directly connected to the brain and central nervous system via the olfactory nerve and trigeminal nerve. Intranasal drug delivery is an innovative route, especially for macromolecules and proteins, which allows bypassing the blood-brain barrier by transport along these nerves. The so-called nose-to-brain transport is therefore currently of particular interest for the therapy of neurological diseases, such as multiple sclerosis, with, for example, monoclonal antibodies.

In this dissertation, polylactide-co-glycolide (PLGA) nanoparticles were first encapsulated in chitosan as matrix material by spray drying. The resulting PLGA-chitosan-nano-in-micro particles (NiMP) exhibited a spherical shape and particle sizes of 5.75-6.61 μm . Such NiMPs have never been reported before in the literature, because the current standard is coating via emulsification.

In *ex vivo* porcine olfactory mucosa, unencapsulated PLGA nanoparticles (80 nm, 175 nm, 520 nm) prepared by emulsion polymerization showed size- and time-dependent uptake. It was determined that 520 nm PLGA particles associated with cell nuclei and neurofilaments within 15 min. In comparison, chitosan increased the uptake of spray-dried NiMPs, which was attributed to the property of chitosan to be able to open tight junctions in the olfactory epithelium, allowing paracellular transport. The opening of tight junctions by interaction with chitosan was demonstrated for the first time in olfactory tissue using immunohistochemical staining of the protein *Zonula Occludens 1* (ZO-1).

Subsequently, the influence of different chitosan derivatives with deacetylation degrees (DD) of 80-90 % and molecular weights (MW) of 20-500 kDa was investigated in terms of particle morphology, particle size distribution and particle yield of the spray-drying process. The MW of the chitosan particles, and the DD only to a minor extend, affected the particle morphology, particle size distribution and the yield of the spray drying process. At 100 °C inlet temperature of the spray drying process, particles with smooth surface, monomodal particle size distribution (polydispersity index 0.02 ± 0.01) and mean diameters of 69 ± 9 nm could be produced. The process parameters optimized in this dissertation also enabled high particle yields over 60 % and continuous production over a period of 40 min.

In addition, the active ingredients biotin and ocrelizumab were encapsulated in chitosan for the first time in this dissertation; a high encapsulation efficiency of over 80 % was achieved for loadings between 5 wt% (biotin, ocrelizumab) and 15 wt% (ocrelizumab) using spray drying. Ocrelizumab remained structurally largely intact after encapsulation, with only up to 18 % of binding capacity lost, which was attributed to changes in tertiary or quaternary structure.

The glass transition temperature of the developed particles was $T_g \approx 36$ °C, confirming their storage stability over five weeks at room temperature. Dissolution tests *in vitro* showed no burst release. The diffusion coefficient of biotin was reduced by encapsulation in the chitosan particle matrix to $D_{\text{Biotin particles}} = 4.11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. For ocrelizumab, a significantly lower diffusion coefficient of $D_{\text{Ocrelizumab particles}} = 1.79 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ resulted from the chitosan particles. After 360 h, 84.43 ± 4.85 % ocrelizumab was released. The data collected allowed the application of the Korsmeyer-Peppas model, which predicted a complete release of the drug within 395 h and explained a drug release via abnormal transport.

To be able to fix the developed particle formulation to the olfactory cleft, native and tyramine-modified hyaluronic acid solutions (HA, HA-Tyr) were investigated as a possible coating on mucosa. For this purpose, the spreading behavior of the HA solutions was analyzed under laboratory conditions and in a climatic chamber - simulating the physiological conditions of the nasal cavity. A mucin-agarose-based artificial mucosa analog was compared with *ex vivo* mucosa

and validated. As the polymer concentration of the HA solution decreased, the contact angle decreased, the aspect ratio of the droplet increased, and spreading on the mucosa was accelerated. The physiological conditions of the nose also favored spreading.

Overall, in this Ph.D. thesis a chitosan-based particulate drug formulation using spray drying was successfully developed, which enables structurally intact encapsulation of low molecular weight drugs and monoclonal antibodies. Controlled release over 15 days was achieved for the therapeutic antibody ocrelizumab, and the matrix material chitosan caused the opening of tight junctions in the porcine olfactory mucosa. This resulted in enhanced uptake in the olfactory epithelium, which is consistent with overcoming this biological barrier and highlights the suitability of the developed particles for intranasal delivery. The spreading behavior of UV-crosslinkable HA-Tyr solutions is suitable for application to mucosa, and thus as an attachment component of the intranasal drug delivery system developed in this dissertation.

1. Einleitung

1.1 Neurologische Erkrankungen

Mehr als eine Milliarde Menschen leiden nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) weltweit an Erkrankungen des zentralen Nervensystems (WHO, 2006). Neurologische Erkrankungen stellen damit eine gesellschaftliche Herausforderung für die öffentliche Gesundheit dar. Neben Hirn- und Rückenmarksverletzungen, entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen sind das vor allem neurologische und psychiatrische Erkrankungen wie Demenzen, Schlaganfälle, Epilepsien, Depressionen und Psychosen, aber auch Tumorerkrankungen.

Ein Großteil dieser Erkrankungen ist bislang nicht heilbar, die Therapie erfolgt deshalb meist ausschließlich symptomatisch. Neben dem unvorstellbar großen individuellen Leid, welches diese Erkrankungen verursachen, sind sie auch mit enormen Kosten für die Gesundheits- und Sozialsysteme verbunden. Effiziente und bezahlbare Behandlungsstrategien liegen hier bisher nur bedingt vor und eine alternde Gesellschaft im demographischen Wandel stellt die Gesundheitssysteme der Industrienationen vor enorme Herausforderungen. Es ist daher aus ethischen und sozialen, aber auch aus ökonomischen Gründen dringend erforderlich, die medizinische Versorgung in diesem Bereich zu verbessern.

Zu den zehn am häufigsten diagnostizierten neurologischen Erkrankungen zählen unter anderem Parkinson, Multiple Sklerose, Hirnhautentzündungen, Epilepsien und Alzheimer (Destatis, 2017). Aufgrund des demografischen Wandels treten vor allem Parkinson und Alzheimer in den vergangenen Jahren vermehrt auf. Die Behandlung dieser weit verbreiteten Erkrankungen war bislang allerdings ausschließlich symptomatisch möglich (DGN, 2016). Eine neue Studie erweckt seit vergangenem Jahr erstmals Hoffnung für einen vielversprechenden Therapieansatz in der Behandlung von Alzheimer-Demenzen mittels monoklonalen Antikörpern gegen β -Amyloid-Plaques (DGN, 2021a; Mintun et al., 2021). Das Risiko für Epilepsieerkrankungen nimmt mit steigendem Alter ebenfalls zu, wobei bereits ein Drittel aller Epilepsieausbrüche im Kindesalter auftritt (Elger & Berkenfeld, 2017). Im Gegensatz sind von Hirnhautentzündungen und Multipler Sklerose Menschen allen Alters betroffen. Die Multiple Sklerose betrifft etwa 120 000 Menschen in Deutschland, wobei diese die häufigste chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) in jungen Menschen ist und sogar die neurologische Erkrankung ist, die bereits im frühen Erwachsenenalter am häufigsten zu bleibender Behinderung führt (Hemmer, 2021). Besonders vielversprechend in der Therapie von Multipler Sklerose sind ebenfalls monoklonale Antikörper, welche in der neuesten Generation auf eine Anti-CD20-Therapie abzielen (A. L. Greenfield & Hauser, 2018).

1.1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist mit 2,5 Millionen Erkrankten weltweit aktuell die häufigste immunvermittelte chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS (Graf, Albrecht, Goebels, Aktas, & Hartung, 2020; WHO, 2006), wobei die Auslöser dieser Autoimmunität weitgehend ungeklärt sind. Ziel der Autoimmunreaktion sind Axone und das diese umgebende Myelin, welches im ZNS von Oligodendrozyten gebildet wird (Bunge, Bunge, & Ris, 1961). Folge dieser Autoimmunreaktion sind damit demyelinisierte Axone und Axonschäden, welche Gliose und Sklerose zur Folge haben (Hemmer, 2021; WHO, 2006). Aufgrund dieser Schädigungen ist eine

Reizweiterleitung nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr möglich, weshalb die Betroffenen meist Lähmungen oder verminderte Sensibilität, aber auch kognitive Einschränkungen als Symptome wahrnehmen. Da die zellulären Schädigungen allerdings überall im Gehirn oder Rückenmark auftreten können sind die Folgen und Einschränkungen dieser Erkrankung sehr breit gefächert. 85 % der Patienten werden mit schubförmiger wiederkehrender MS diagnostiziert (engl. *Relapsing Remitting MS*, RRMS). Dabei wechseln sich Schübe neurologischer Dysfunktion und Erholungsphasen ab. 80 % der Erkrankten entwickeln später entzündliche Läsionen, die zu Gewebeabbau führen. Diese Form der Erkrankung wird als sekundäre progressive MS (engl. *Secondary Progressive MS*, SPMS) bezeichnet. Die primäre progressive Form der MS (engl. *Primary Progressive MS*, PPMS) wird zwar bei nur etwa 10 % der Patienten diagnostiziert, geht allerdings von Beginn an mit Gewebeverlust der Hirnsubstanz einher und Erholungsphasen bleiben aus. (Dendrou, Fugger, & Friese, 2015)

Am pathologischen Autoimmunprozess der MS sind vor allem autoreaktive Lymphozyten beteiligt. Es konnten bereits die beiden CD4-positiven T-Helferzellen T_H1 und T_H17 als Auslöser identifiziert werden. In aktuelleren Studien ist vor allem die Beteiligung von B-Lymphozyten an der Autoimmunreaktion in den Vordergrund der Forschung gerückt, die bei MS Patienten mit Fortgang der Erkrankung vermehrt in das ZNS migrieren (Comi et al., 2021; Goldmann et al., 2016). B-Lymphozyten sind dabei zum einen durch die direkte Sekretion proinflammatorischer Zytokine an der Autoimmunreaktion beteiligt, zum anderen induzieren oder modulieren sie wiederum T-Zell-Reaktionen. Darüber hinaus wird das Immunsystem des ZNS hauptsächlich von Mikroglia-Zellen überwacht, welche die neuronale Aktivität prüfen, neuronale Vorläuferzellen und Synapsen während der Entwicklung zum Schutz umhüllen und auf Gewebeschäden reagieren (Goldmann et al., 2016; Norris & Kipnis, 2019). Nichtsdestotrotz werden B-Zellen hauptsächlich in der Peripherie des Körpers transportiert und migrieren aufgrund der Blut-Hirn-Schranke (BHS) bei gesunden Menschen und damit auch bei Beginn der MS Erkrankung nur in geringen Zahlen in das ZNS (R. Li, Patterson, & Bar-Or, 2018).

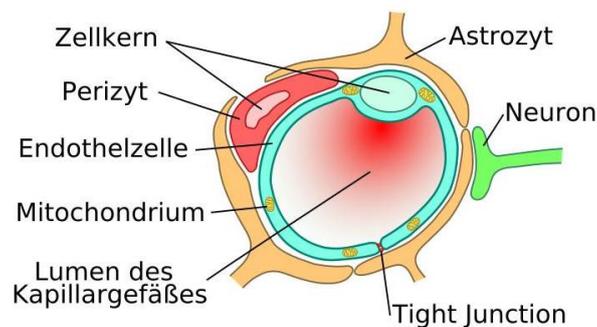


Abbildung 1: Aufbau und Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke (Kübelbeck, 2020).

Die BHS stellt einen natürlichen Schutzmechanismus des Körpers dar, um Pathogene vom ZNS fernzuhalten und ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die wichtigsten vier Bestandteile sind das Kapillarendothel, die *Tight Junctions*, die Perizyten und die Astrozyten. Dabei besteht das Endothel der Kapillaren, die das ZNS vaskularisieren aus den Endothelzellen und Zell-Zell-Kontakten, den *Tight Junctions*. Die aus Occludin- und Claudin-Transmembran-Proteinen bestehenden *Tight Junctions* reduzieren den parazellulären Transport von vor allem polaren Substanzen, wie Peptiden und Proteinen signifikant (Begley, 2004; Patel & Patel, 2017). Die Perizyten der BHS bestehen vor allem aus dem Strukturprotein Aktin, unterstützen die Aufrechterhaltung der BHS und regulieren den Blutfluss (Herman & D'Amore, 1985; Rucker,

Wynder, & Thomas, 2000). Zudem ist das Vorkommen der Perizyten mit der Dichte an *Tight Junctions* korreliert. Eine Besonderheit der Perizyten ist außerdem deren makrozytische Eigenschaft, welche es ihnen ermöglicht - ähnlich wie Makrophagen - Phagozytose und Antigen-Präsentation zu betreiben (Balabanov, Washington, Wagnerova, & Dore-Duffy, 1996; Hickey & Kimura, 1988). Dies ermöglicht im Umkehrschluss die unmittelbare Entfernung von Schadstoffen an der BHS. Die Astrozyten zählen zu den Makroglia-Zellen und sind hauptsächlich für die Versorgung von Nervenzellen mit Nährstoffen verantwortlich. Darüber hinaus sind sie über ihre Ausläufer direkt mit dem Kapillarendothel in Verbindung, bedecken 99 % dessen Fläche und tauschen Botenstoffe mit diesem aus, um die Zell-Differenzierung und die Barrierefunktion der BHS aufrechtzuerhalten. (Johanson, 1980; Pardridge, 2005)

1.1.2 Die Behandlung von Multipler Sklerose

Obwohl MS zu den bislang noch nicht heilbaren Erkrankungen zählt hat die Forschung der letzten Jahre enorm verbesserte Therapiemöglichkeiten hervorgebracht (Graf et al., 2020). Der aktuell vielversprechendste Ansatz für die erfolgreiche Behandlung von RRMS und PPMS sind Anti-CD20-Therapien mit monoklonalen Antikörpern. Da, wie bereits beschrieben, B-Lymphozyten nachweislich selbst an der Auslösung einer zellulären Autoimmunreaktion oder an der Aktivierung proinflammatorischer T-Zellen beteiligt sind hat es sich als sinnvoll herausgestellt diese zu inhibieren. Die zelluläre Autoimmunreaktion sowie die Depletion der proinflammatorischen CD20⁺-B-Zellen sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Die Inhibition von CD20⁺-B-Zellen und deren dadurch ausgelöste Apoptose kann die im Blut vorherrschende Zahl naiver und proinflammatorischer B-Zellen effektiv reduzieren, was das Auftreten neuer Schübe nachweislich unterdrückt (A. L. Greenfield & Hauser, 2018). Von der daraufhin ausgelösten etwa sechs bis neun Monate andauernden B-Zell-Depletion sind Pro-B-Zellen und ausdifferenzierte Plasmazellen nicht betroffen. CD20⁺-B-Zellen in Lymphknoten werden davon ebenfalls weniger erreicht und eine Depletion von B-Zellen innerhalb des ZNS fehlte bislang, was wiederum mit der abschirmenden Funktion der BHS zusammenhängt, die insbesondere auch den Wirkstofftransport vom lymphatischen System und dem Blutkreislauf in das ZNS signifikant reduziert (Begley, 2004; Patel & Patel, 2017; Hartwig Wolburg et al., 1994). Für die Permeation von Proteinen wurde bereits eine CSF-Serum-Diffusionsrate beschrieben, die mit dem isoelektrischen Punkt (IEP) des Proteins korreliert (Trojano et al., 1986). Insbesondere für Immunglobuline G (IgG) wurde im Vergleich zu kleineren Proteinen ein reduzierter Permeabilitätskoeffizient (CSF/Serum) von 0.36 bis 0.54 beschrieben (Livera et al., 1984).

Aktuell werden die drei monoklonalen IgG Antikörper Rituximab, Ocrelizumab und Ofatumumab als Anti-CD20-Wirkstoffe in der klinischen Forschung untersucht. Seit 2018 ist der humanisierte Antikörper Ocrelizumab für die Behandlung von RRMS und PPMS zugelassen und wird zweimal jährlich als Infusion mit jeweils 600 mg Wirkstoff verabreicht. Ocrelizumab bewirkt eine effektive B-Zell-Depletion, allerdings wird dadurch nicht nur die Autoimmunreaktion reduziert, sondern es kann auch zu einer Immunsuppression im übrigen Blutkreislauf kommen. Beschriebene Nebenwirkungen sind moderate Reaktionen im Zusammenhang mit der Infusion, Schwindel, Übelkeit und das erhöhte Risiko für Erkrankungen der Atemwege sowie Herpes (DGN, 2018). Aktuelle klinische Studien mit Ocrelizumab wiesen eine Serumkonzentration von ca. $100 \mu\text{g mL}_{\text{serum}}^{-1}$ 15 Tage nach der Infusion mit 600 mg Ocrelizumab nach, diese nahm nach 30 Tagen auf ca. $50 \mu\text{g mL}_{\text{serum}}^{-1}$ und nach 58 Tagen auf ca. $20 \mu\text{g mL}_{\text{serum}}^{-1}$ ab (Gibiansky et al., 2021). Die therapeutisch wirksame Konzentration von Ocrelizumab in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF)

von Patienten ist hingegen bislang nicht bekannt. Seit 2021 ist nun auch der humane Antikörper Ofatumumab für die Behandlung von RRMS auf dem deutschen Markt verfügbar. Dabei werden 20 mg des Wirkstoffs einmal monatlich subkutan vom Patienten selbst verabreicht. Die beschriebenen Nebenwirkungen sind ebenfalls Atemwegserkrankungen, systemische injektionsbedingte Reaktionen und Harnwegsinfektionen (DGN, 2021b).

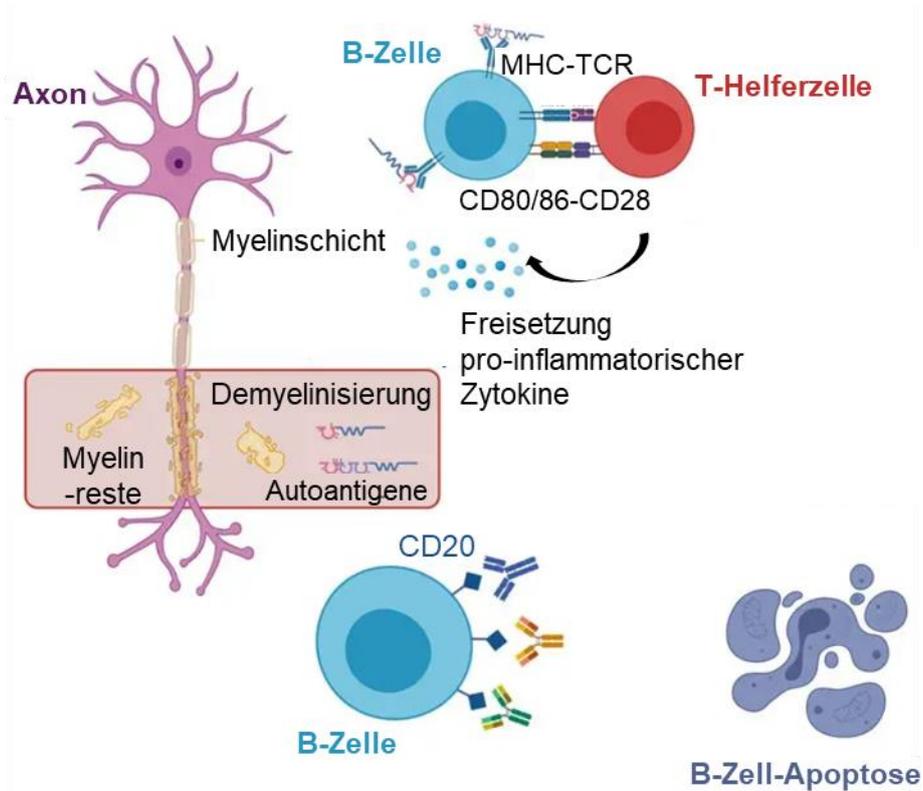


Abbildung 2: Wirkmechanismus der Anti-CD20-Therapie für die Behandlung von Multipler Sklerose. Während der Demyelinisierung von Axonen bei Multipler Sklerose werden Myelinreste als Autoantigene von B-Zellen erkannt. Die dadurch aktivierten B-Zellen rekrutieren T-Helferzellen. Über die Bindung des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC) an den T-Zell-Rezeptor (engl. T-cell Receptor, TCR), sowie eines der glykosylierten Phosphoproteine CD80 und CD86 an CD28 auf der T-Helferzelle wird diese zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Autoantikörpern gegen die Autoantigene der Myelinfragmente stimuliert. Durch die Therapie mit Rituximab, Ocrelizumab oder Ofatumumab wird CD20 auf CD20⁺ B-Zellen gebunden, welche dadurch Selbstzerstörung durch Apoptose auslösen und so keine weitere Autoimmunreaktion modulieren können (verändert nach (Maucher, 2021)).

Zudem werden auch niedrigmolekulare Wirkstoffe wie Glatirameracetat, Dimethylfumarat oder Cladribin in der Behandlung von MS eingesetzt, allerdings meist für RRMS im späten Stadium (Hemmer, 2021). Zudem wurde das Vitamin Biotin bereits in klinischen Studien als Wirkstoff oder für die Unterstützung der Therapie von PPMS untersucht (Sedel et al., 2015; Tourbah, Lebrun-Frenay, & Edan, 2016). Dabei wurde festgestellt, dass eine tägliche orale Dosis von 100 mg Biotin zur Verbesserung der PPMS-Symptome beitrug, was auf die erhöhte Energieproduktion in demyelinisierten Axonen zurückgeführt wurde und damit die Myelinsynthese in den Oligodendrozyten fördern könnte (Peyro Saint Paul, Debruyne, Bernard, Mock, & Defer, 2016).

Trotz der relativ guten Therapieerfolge der beschriebenen Anti-CD20-Therapien sind die aktuell verwendeten Behandlungen limitiert. Die therapeutisch wirksame Dosis wurde erst in den letzten Jahren zunächst für Ocrelizumab, dann auch für Ofatumumab aufgeklärt. Dabei sind allerdings

vergleichsweise hohe Mengen der teuren Biopharmazeutika notwendig und deren Wirkung im ZNS, am Ort der Erkrankung, ist eingeschränkt, da nur wenige inhibierte B-Zellen im ZNS nachgewiesen werden konnten (A. L. Greenfield & Hauser, 2018). Durch die vergleichsweise hohe notwendige Dosis entstehenden nicht nur dem Gesundheitssystem hohen Kosten, sondern die deutlich einschränkenden Nebenwirkungen reduzieren auch den Patientenkomfort, sowie die Akzeptanz der Patienten. Dies macht den Bedarf weiterer Optimierungen dieser Therapien deutlich. Allen gängigen enteralen und parenteralen Applikationsformen ist die abschirmende BHS als Herausforderung gemein. Sobald insbesondere proteinogene Wirkstoffe wie monoklonale Antikörper oral, intravenös oder subkutan verabreicht werden, kann nur ein Bruchteil der verabreichten Dosis das Gehirn und das Rückenmark erreichen, wobei die Datenlage hierbei bisher dürftig ist. Um eine hohe Dosierung im ZNS zu erreichen wird für schwerwiegende Erkrankungen deshalb sogar die intrathekale Applikation - direkt in das Rückenmark - verwendet, um die BHS zu umgehen. Diese Verabreichungsform ist jedoch für die Patienten sehr unangenehm. Insbesondere bei MS und den vor allem jungen Patientinnen und Patienten ist die Bereitschaft unangenehme Therapien zur Prävention zu durchlaufen ausgesprochen gering (Kobelt, Thompson, Berg, Gannedahl, & Eriksson, 2017), da das individuelle Leid zu Beginn der Erkrankung meist gering ist und Betroffene zunächst oft nur einen einzelnen Krankheitsschub erleben. Um die Bereitschaft für Therapien im frühen Stadium dennoch zu fördern und dabei die zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend intakte BHS zu umgehen stellt die intranasale Applikation einen innovativen Ansatz dar, der nicht nur einfach und schnell umsetzbar sein könnte, sondern seit den letzten Jahren bereits zunehmend in der Forschung etabliert ist. Die Umgehung der BHS über intranasale Applikation folgt dem Prinzip des *Nose-to-Brain* Transports, bei dem applizierte Wirkstoffe nicht in das Blut aufgenommen werden, sondern über oder entlang von Nervenzellen transportiert werden.

1.2 *Nose-to-Brain* Transport

Die direkte Verbindung zwischen Nase und Gehirn wurde 1990 zum ersten Mal beschrieben (Morrison & Costanzo, 1990, 1992). Die Ausläufer des Riechnervs (*Nervus olfactorius*) und der maxillaren Verzweigung des Hirnnervs (*Nervus trigeminus*) durchqueren den Schädelknochen und münden in die Riechrinne, lat. *Regio olfactoria*. Dieser schmale Bereich hat beim Mensch eine Fläche von 4 bis 5 cm², das entspricht etwa 3 % der Gesamtfläche der Nasenhöhle und ist nur durch das knöcherne, gelochte Siebbein vom Gehirn und von der CSF getrennt (Michael Ikehukwu Ugwoke, Verbeke, & Kinget, 2010). Unter dem Prinzip des *Nose-to-Brain* Transports wird die intranasale Applikation von Wirkstoffen verstanden, die dort nicht in das Blut, sondern unmittelbar in Nervenzellen aufgenommen werden und so die Blut-Hirn-Schranke umgehen können. Dieser Mechanismus wurde in der Forschung bereits für niedrigmolekulare Wirkstoffe sowie für makromolekulare Proteinwirkstoffe nachgewiesen, wobei der Transport von Wirkstoffen über die zwei beschriebenen Nerven erfolgen kann. Dementsprechend wird der *Nose-to-Brain* Transport in den Transport über den olfaktorischen Nerv und den Transport über den Trigeminusnerv unterschieden (J. M. Anderson, Rodriguez, & Chang, 2008; Ganger & Schindowski, 2018; Stützle, Flamm, Carle, & Schindowski, 2015b). Beide Haupttransportwege werden nochmals in intrazelluläre und extrazelluläre Aufnahme unterteilt. Diese Unterscheidung wird in Kapitel 1.2.2 genauer erläutert.

Die Forschung der intranasalen Applikation von Wirkstoffen beschäftigt sich bislang zum Großteil mit flüssigen Darreichungsformen. Dabei sind die physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs entscheidend für den Erfolg der Aufnahme in das Epithel und schließlich in das Gehirn. Die passive Diffusion und damit einhergehend die Größe des Wirkstoffs spielt eine signifikante Rolle (Warnken et al., 2016), allerdings scheint die Regulierung weniger strikt als an der BHS zu sein. Insgesamt erreichten Wirkstoffe bei der intranasalen Verabreichung dadurch bis zu 13-fach höhere Konzentrationen in der CSF im Vergleich zur intravenösen Verabreichung (F. Wang, 2003). Zudem kann Mukoadhäsion die Kontaktzeit einer Wirkstofflösung an der *Regio olfactoria* des Menschen von einer auf 14 Minuten verlängern (Charlton, Davis, & Illum, 2007). Die relative Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe war dadurch ebenfalls höher als bei der Verabreichung einer Lösung und gleich einer subkutanen Applikation (Teshima et al., 2002; Michael Ikechukwu Ugwoke, Exaud, Van Den Mooter, Verbeke, & Kinget, 1999). Die Mukoadhäsion stellt somit eine vielversprechende Möglichkeit dar, um die Verweilzeit von Wirkstoffformulierungen zu verlängern oder eine kontrollierte Freisetzung zu ermöglichen (M. I. Ugwoke, Agu, Verbeke, & Kinget, 2005). Insbesondere durch die Verkapselung der Wirkstoffe in Nano- und Mikropartikel konnte die Wirkstoffaufnahme noch weiter gesteigert werden (Warnken et al., 2016). Begründet werden kann diese weitere Verbesserung ebenfalls mit der verbesserten Adsorption, beispielsweise durch Mukoadhäsion und der erhöhten Stabilität der Wirkstoffe durch den Schutz der Verkapselung. Beim Vergleich zwischen Nanopartikeln aus Polyethylenglykol-co-Milchsäure (engl. *Polylactic acid*) (PEG-PLA) und der direkten intranasalen Wirkstoffverabreichung als Lösung konnten für die PEG-PLA-Partikel bis zu 8-fach höhere Wirkstoffkonzentrationen im Gehirn nachgewiesen werden (Gao et al., 2007). Folglich scheint die intranasale Applikation von Polymerpartikeln besonders vorteilhaft zu sein. Bislang ist hingegen noch nicht geklärt, ob Nanopartikel bei der intranasalen Applikation intakt in das Gehirn gelangen können, da dazu widersprüchliche Ergebnisse publiziert wurden (Fazil et al., 2012; Gao et al., 2007; A. Mistry, Stolnik, & Illum, 2015).

Bei den derzeit auf dem Markt erhältlichen Systemen handelt es sich vor allem um Nasensprays oder Nasentropfen (Kublik & Vidgren, 1998). Für partikuläre Formulierungen wurden Applikatoren entwickelt, welche Pulver elektrisch zerstäuben, komprimierte Luft als Druckgeber nutzen, oder auf die respiratorische Kraft des Patienten setzen (Djupestrand & Skretting, 2012). Diese Applikationsformen bedecken im Gegensatz zu handelsüblichen Nasensprays auch den Bereich der *Regio olfactoria* (Abbildung 3) (Warnken et al., 2016).

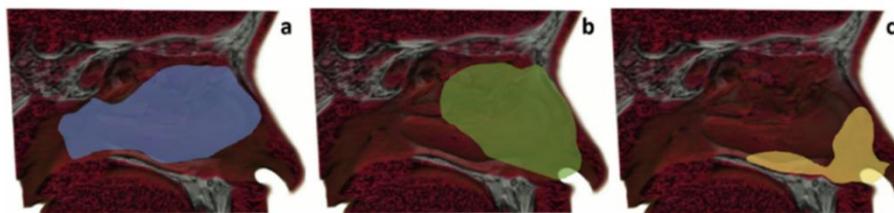


Abbildung 3: **a-c**: Verteilung von Wirkstoffformulierungen durch auf dem Markt vorhandene Applikatoren. **a**: Impel Neuropharma Precision Olfactory Delivery. **b**: Optinose Bi-Directional Applikator. **c**: Ein handelsübliches Nasenspray. (Charlton et al., 2007)

1.2.1 Die Anatomie der Nasenhöhle

Die Hauptfunktionen der menschlichen Nasenhöhle bestehen im Geruchssinn und in der Regulierung von Feuchtigkeit und Temperatur der eingeatmeten Luft sowie im Entfernen von

Schmutz und Mikroorganismen aus der Atemluft (Menache et al., 1997). Das Nasenseptum teilt den vorderen Teil der Nasenhöhle in zwei Kammern. Jede Nasenkammer kann wie in Abbildung 4 dargestellt in sieben Teile unterteilt werden, den Nasenvorhof (A), das Atrium (B), den respiratorischen Bereich bestehend aus unterer (C1), mittlerer (C2) und oberer (C3) Nasenmuschel; sowie den olfaktorischen Bereich (D) (*Regio olfactoria*) und den Nasopharynx (E) (Michael Ikechukwu Ugwoke et al., 2010). Die *Regio olfactoria* überlappt teilweise mit dem Septum und der oberen Nasenmuschel. Sie wird vom Luftstrom der Atmung normalerweise nicht erreicht, Duftstoffe werden stattdessen über Diffusion zu dieser sensiblen Region transportiert. In der Nasenhöhle reicht die Temperatur von 23 °C im Nasenvorhof bis 35 °C im Nasopharynx, wobei die Temperatur im Nasopharynx zwischen 34 °C und 35 °C schwankt (Ingelstedt & Ivstam, 1951; Keck, Leiacker, Riechelmann, & Rettinger, 2000). Die Luftfeuchtigkeit in der Nasenhöhle liegt zwischen 90 % und 95 %, wobei im Nasopharynx die höchste Luftfeuchtigkeit von 95 % gemessen wurde. Insgesamt hat die Nasenhöhle eine mit Mukosa ausgekleidete Fläche von 150-200 cm² (Bourganis, Kammona, Alexopoulos, & Kiparissides, 2018a; Gänger & Schindowski, 2018; Michael Ikechukwu Ugwoke et al., 2010), die bei gesunden Menschen einen relativ konstanten physiologischen pH-Wert zwischen pH 5,5 und pH 6,5 aufweist (R. J. England, J. J. Homer, L. C. Knight, & S. R. Ell, 1999).

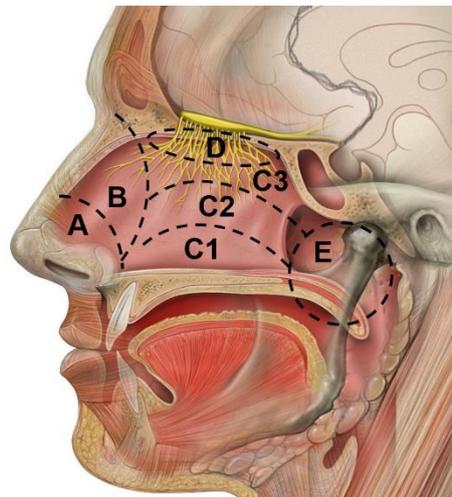


Abbildung 4: Schematischer Schädelquerschnitt mit Nasenvorhof (A), Atrium (B) und respiratorischer Region: unterer (C1), mittlerer (C2) und oberer (C3) Nasenmuschel, sowie Riechepithel (D) und Nasopharynx (E) (verändert nach Lynch, 2006)).

Das respiratorische Epithel bedeckt etwa 97 % der Nasenhöhle und besteht aus vier verschiedenen Zelltypen; Drüsenzellen mit und ohne Cilien, Basalzellen und Becherzellen. Die Becherzellen transportieren Wasser, Ionen und Mukus. Die Cilien der Drüsenzellen schlagen mit 1000 Schlägen pro Minute und transportieren Schmutz mit einer Geschwindigkeit von 5 mm pro Minute in die Richtung des Nasopharynx. Die Basalzellen sind multipotent und können sich in die übrigen Zellen differenzieren. (Michael Ikechukwu Ugwoke et al., 2010)

Das olfaktorische Epithel besteht aus olfaktorischen sensorischen Neuronen (OSN), daran anschließenden unmyelinisierten olfaktorischen Axonen, Stützzellen und Basalzellen (Bourganis et al., 2018a; Gänger & Schindowski, 2018). Die OSN sind bis zu 200 µm lang. Ihre Dendriten reichen bis in die darüber liegende Mukusschicht hinein, sind unbeweglich und funktionieren als Detektoren. Sie lösen bei einem Reiz die Depolarisierung des zugehörigen Axons aus. Die Zellkörper der OSN liegen zwischen den Stützzellen, welche der Stabilisierung und der Nährstoffversorgung dienen. Die olfaktorischen Axone sind von olfaktorischen Hüllzellen und

Fibroblasten ummantelt und bilden den Riechnerv. Die Reizweiterleitung erfolgt von dort aus zunächst zum Riechkolben und danach weiter in das ZNS. Die Mukusekretion findet im olfaktorischen Epithel über Bowmandrüsen statt, welche bis in die darunterliegende Bindegewebeschicht hineinreichen. Die Epithelien des olfaktorischen und des respiratorischen Bereichs liegen dieser Bindegewebeschicht, der *Lamina propria* auf, die hauptsächlich aus Fibroblasten besteht. In die *Lamina propria* der olfaktorischen Mukosa sind zudem Blutgefäße, Lymphgefäße, Lymphoidfollikel und autonome Nervenfasern als Ausläufer des Trigeminiernervs eingebunden. Im Gegensatz zur respiratorischen Mukosa ist die olfaktorische Mukosa von deutlich weniger Blutgefäßen durchzogen, was sich in einer fast weißen Färbung zeigt (Alpesh Mistry, Glud, et al., 2009; Stütze et al., 2015b) und beide Bereiche auch optisch einfach unterscheidbar macht. Beide Bereiche werden zudem von einer 5-15 µm hohen Mukusschicht abgeschlossen (M. I. Ugwoke et al., 2005). Mukus besteht zu ca. 95 gew.% aus Wasser, 0,5-1 gew.% aus Salzen, 1-2 gew.% aus Lipiden, 0,2-5 gew.% aus Muzinen, anderen Proteinen und Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Leal, Smyth, & Ghosh, 2017). Hauptbestandteil des Mukus neben Wasser sind damit die Muzine. Diese Glykoproteine haben ein Molekulargewicht von 10-40 MDa, besitzen lange Polysaccharide als Seitenketten und bewirken die Mukoadhäsion (Sheehan, Oates, & Carlstedt, 1986). Die Muzine der olfaktorischen Mukosa sind im Gegensatz zu anderen Muzinen im Körper sekretorisch, da sie abgesondert werden. In den Atemwegen kommen die sekretorischen Muzine MUC2, MUC5AC und MUC5B vor (Davies, Svitacheva, Lannefors, Kornfa, & Carlstedt, 1999).

1.2.2 Extrazelluläre und intrazelluläre Mechanismen der *Regio olfactoria*

Die dem *Nose-to-Brain* Transport zu Grunde liegenden Wege über den olfaktorischen Nerv oder den Trigeminiernerv können weiter in extrazellulären und intrazellulären Transport unterteilt werden. Für den extrazellulären Transport entscheidend sind beispielsweise, die auch im olfaktorischen Epithel vorkommenden *Tight Junctions*. Sie wirken wie an anderen biologischen Barrieren, zum Beispiel der bereits beschriebenen BHS, als selektive Barriere, die die Zellzwischenräume blockiert. Dadurch können zwar vor allem niedrigmolekulare Stoffe noch hindurchtreten, größere Moleküle wie Proteine können hingegen bei geschlossenen *Tight Junctions* weniger gut aufgenommen werden (Crowe, Greenlee, Kanthasamy, & Hsu, 2018). Die *Tight Junctions* besitzen im geöffneten Zustand einen Durchmesser von ca. 15 nm (Alpesh Mistry, Glud, et al., 2009; Miyamoto et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit für extrazellulären *Nose-to-Brain* Transport stellt der Erneuerungszyklus der OSN dar. Durch die Erneuerung der OSN nach 30-60 Tagen entsteht zwischen den Stützzellen temporär extrazellulärer Raum. Da die Ausbildung von *Tight Junctions* oder neuen OSN zeitverzögert stattfindet ist es wahrscheinlich, dass über diese extrazellulären Zwischenräume vermehrt Wirkstoffe aufgenommen werden können (Crowe et al., 2018; Y. Li, Field, & Raisman, 2005). Darüber hinaus kann der Transport von Wirkstoffen entlang der olfaktorischen Axone, zwischen diesen und den sie umgebenden Hüllzellen erfolgen. Dieser extrazelluläre Raum zwischen den olfaktorischen Axonen und ihren Hüllzellen ist unmittelbar mit dem Liquor verbunden, weshalb Wirkstoffe über diese Route das Gehirn und das Rückenmark direkt erreichen können. Da auch die Ausläufer des Trigeminiernervs bis in die olfaktorische Mukosa reichen, ist dieser als vergleichbarer extrazellulärer Transportpfad ebenso denkbar (Thorne, Pronk, Padmanabhan, & Frey, 2004).

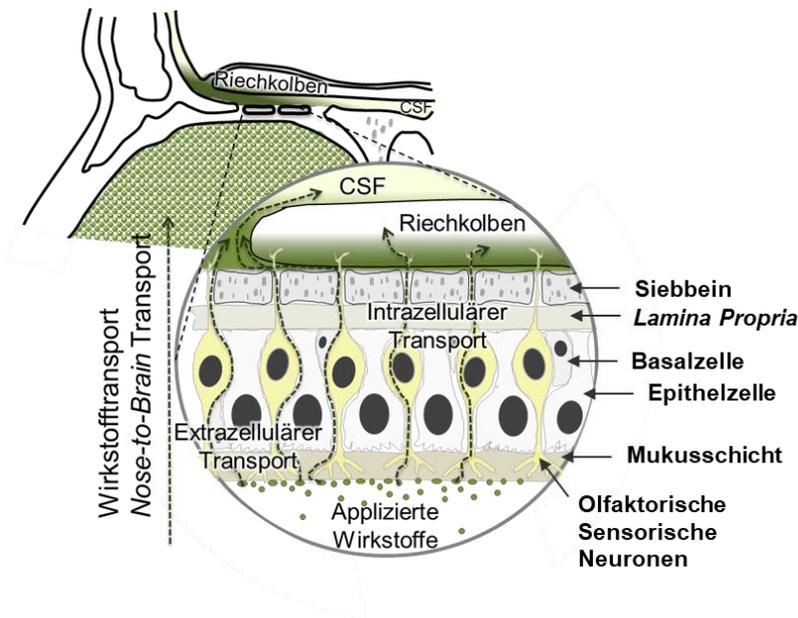


Abbildung 5: Schematische Darstellung der möglichen Nose-to-Brain Transportwege für intranasal applizierte Wirkstoffe in den Riechkolben und die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) (©Zimmermann, verändert nach Stützle et al. 2018).

Den intrazellulären Transportwegen des *Nose-to-Brain* Transports liegen Pinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose zu Grunde, welche sowohl für OSN als auch für den Trigeminusnerv beschrieben sind (Thorne 2004, Li & Field 2005, Crowe et al. 2018). Während für niedermolekulare Moleküle wie beispielsweise Aluminiumlaktat (294 Da) vor allem Pinozytose stattfindet, werden Makromoleküle wie das Agglutinin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (80 kDa) oder IgG Antikörper (150 kDa) eher über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen (Crowe et al., 2018; Ladel et al., 2018; Ladel et al., 2020). Aktuell wird vermutet, dass die initiale Aufnahme von IgGs am olfaktorischen Epithel über den neonatalen Fc Rezeptor (FcRn) und den Fc-gamma Rezeptor vermittelt wird (Ladel et al., 2020; Maigler et al., 2021), dabei konnte eine Fc-Rezeptor abhängige verzögerte Eliminierung von IgG innerhalb von 20 h statt innerhalb von 45 min in der *Regio olfactoria* von Mäusen festgestellt werden (Maigler et al. 2021). Die intranasal applizierten IgG konnten zudem im Riechkolben nach 45 min und nach 20 Stunden im Hippocampus nachgewiesen werden. Theoretisch wird von der olfaktorischen Mukosa ausgehend ein weiterer Vesikel-Transport über den Golgi-Apparat und danach entlang von Axonen zum Riechkolben angenommen (Crowe et al. 2018). Da dieser Transport allerdings für Zeitspannen zwischen 45 min und sechs Stunden nach intranasaler Applikation in Mäusen beschrieben ist (Crowe et al. 2018, Maigler et al. 2021), scheinen die Mechanismen des *Nose-to-Brain* Transports aktuell noch nicht vollständig verstanden zu sein und sollten folglich weiter intensiv untersucht werden.

1.2.3 *In vitro* Testsysteme für die intranasale Applikation

Nachdem bereits vielfach gezeigt werden konnte, dass intranasale Applikation und der zu Grunde liegende *Nose-to-Brain* Transport die Therapie des Gehirns und des ZNS verbessern bzw. erleichtern können, ist es essentiell die einzelnen Ebenen der bereits erläuterten Transportwege genauer zu untersuchen. Neben klassischen *in vivo* Studien mit Nagern werden in den vergangenen Jahren vermehrt *in vitro* und *ex vivo* Modell-Systeme eingesetzt, um dem bereits seit

1959 postulierten 3R-Konzept (engl. *Replace, Reduce, Refine*) gerecht zu werden (Russell & Burch, 1960). Um Tierversuche zu vermeiden, zu verringern und zu verbessern wird in der aktuellen Forschung des *Nose-to-Brain* Transports die Applikation von Wirkstoffen zunächst mit *in vitro* oder *ex vivo* Modellen getestet (Ladel et al., 2018; Ladel et al., 2020; Ladel et al., 2019; Alpesh Mistry, Glud, et al., 2009; Alpesh Mistry, Stolnik, & Illum, 2009). Auch um beispielsweise die zellulären Mechanismen direkt in der olfaktorischen Mukosa oder ausschließlich im Epithel vollumfänglich zu verstehen sind *ex vivo* und *in vitro* Modelle sehr gut geeignet.

Die beiden aktuell am häufigsten verwendeten Modelle in der Zellkultur sind die nasale humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie RPMI 2650, oder primäre olfaktorische Epithelzellen, die beispielsweise aus Biopsien des olfaktorischen Epithels von Schweinen extrahiert werden können (Ladel et al., 2018). Beide Zellformen können, um die Bedingungen der Nasenhöhle besser nachzubilden zudem in *Air-Liquid-Interface*-Kulturen kultiviert werden. Dabei werden sie auf Transwell-Inserts ausgesät und erhalten Nährstoffe nur vom unteren mit Zellkulturmedium gefüllten Kompartiment, während sie oben der Umgebungsluft ausgesetzt sind. Vom Schwein können bis zu 10 cm² der olfaktorischen Mukosa präpariert werden, hierzu werden Biopsien aus dem dorsalen Teil der oberen Nasenmuschel extrahiert (Getty, 1975; Alpesh Mistry, Stolnik, et al., 2009), welche dann auch als komplexeres Modell *ex vivo* verwendet werden, um die Mechanismen der olfaktorischen Mukosa zu untersuchen (Ladel et al., 2018; Alpesh Mistry, 2009). Um auch in diesem Modellsystem die Bedingungen der Nasenhöhle möglichst gut nachzubilden, werden ca. 2 cm² große Stücke der herauspräparierten Mukosa in *Side-by-Side*-Zellen beziehungsweise zwischen zwei Eppendorf-Gefäße ohne Deckel eingespannt. Das basolaterale Kompartiment wird zur Nährstoffversorgung des Gewebes mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) oder Zellkulturmedium befüllt, das apikale Kompartiment bleibt leer, sodass die Epithelzellen weiterhin der Umgebungsluft ausgesetzt sind. Die *Side-by-Side*-Zellen werden während der Untersuchung in einem Zellkulturinkubator inkubiert, um die Bedingungen in der Nasenhöhle zu simulieren.

1.3 Biobasierte Polymere

Biobasierte Polymere oder Biopolymere sind Makromoleküle natürlichen Ursprungs (IUPAC, 1992). Dabei kann es sich um Proteine, Nukleinsäuren und Polysaccharide handeln. Biopolymere können zudem in bioabbaubare und nicht bioabbaubare Biopolymere unterteilt werden. Weit verbreitete nicht bioabbaubare Biopolymere sind zum Beispiel Polypropylen und Polyethylen, die aufgrund ihrer Herstellung aus Bioethanol trotzdem als Biopolymere bezeichnet werden. Dennoch sind die meisten Biopolymere auf Stärke, Zellulose, Polyhydroxybutyrat (PHB) und Polymilchsäure (engl. *Polylactic acid*, PLA) basierend und damit auch biologisch abbaubar. Insgesamt gibt es bioabbaubare Biopolymere pflanzlichen, bakteriellen und tierischen Ursprungs. Während Stärke und Zellulose ursprünglich von Pflanzen stammen, sind Milcheiweiß, Kollagen und Hyaluronsäure ursprünglich tierischen Ursprungs. Die moderne Biotechnologie ermöglicht zudem die bakterielle Produktion von PHB, PLA, und Hyaluronsäure (HA) im großtechnischen Maßstab. Eine andere Möglichkeit ist die chemische Modifikation des ursprünglichen Rohstoffs, wie beispielsweise Chitin zu Chitosan, um dessen Nutzbarkeit zu verbessern.

Ein wichtiger Vorteil von Biopolymeren gegenüber anderen Polymeren ist deren Biokompatibilität, was bedeutet, dass sie keine Immunreaktion in Kontakt mit Zellen oder dem Körper auslösen. Die bioabbaubaren Biopolymere, allen voran PLA werden deshalb in der Medizintechnik beispielsweise

als resorbierbares Nahtmaterial eingesetzt, welches sich nach einigen Wochen bis Monaten im Körper zersetzt und deshalb nicht mehr chirurgisch entfernt werden muss. Stärke und Zellulose-Derivate werden flächendeckend in der Nahrungsergänzungsmittel- und Pharmaindustrie als Füllstoffe für Kapseln und Tabletten eingesetzt, da sie die enthaltenen Wirkstoffe vor Umwelteinflüssen schützen, eine einfache Dosierung ermöglichen und vom Körper entweder einfach (z. B. Stärke) abgebaut werden können, oder als Ballaststoff (z. B. Zellulose) im Darm von Bakterien zersetzt und wieder ausgeschieden werden.

1.3.1 Das Biopolymer Polylactid-co-Glycolid

Das bioabbaubare Biopolymer Polylactid-co-Glycolid (PLGA), ein Polyester aus D,L-Milchsäure und Glykolsäure, wird ebenfalls bereits in der Medizintechnik als chirurgisches Nahtmaterial und in der Pharmaindustrie für Depotmedikamente verwendet, da es von der Europäischen Arzneimittelagentur (engl. *European Medical Agency*, EMA) und von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen ist (Danhier et al., 2012). Lactid kann entweder durch säurekatalytische Kondensation aus Milchsäure gewonnen werden, oder biotechnologisch aus Glucose oder Melasse. Glycolid entsteht beim Erhitzen von Glykolsäure. Durch eine ringöffnende Polymerisation wird aus Glycolid anschließend Poly-Glycolid, das biologisch abbaubar ist. Die Esterbindung von PLGA kann im Körper bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,4 hydrolytisch gespalten werden, wobei die dabei entstehenden Oligofragmente in Lösung gehen und abtransportiert werden können. Durch das Massenverhältnis von PLA und Polyglykolsäure (engl. *Polyglycolic acid*, PGA) ist die Wirkstofffreisetzung flexibel einstellbar, wobei ein höherer PLA Gehalt eine langsamere Zersetzung und ein höherer PGA Gehalt eine schnellere Zersetzung bewirkt. Der Wirkstoff wird dabei entsprechend der Zersetzung ebenfalls langsamer oder schneller freigesetzt. Eine Ausnahme stellt das ausgeglichene Verhältnis von 50:50 (PLA:PGA) dar, dieses setzt besonders schnell verkapselte Wirkstoffe frei. (Brannon-Peppas & Vert, 2000)

1.3.2 Das Biopolymer Chitosan

Das Biopolymer Chitosan wird aus dem natürlich vorkommenden Chitin gewonnen und ist damit ein nachwachsender Rohstoff. Pilze und die Schale von Krustentieren bestehen aus Chitin, wobei die großtechnische Gewinnung von Chitosan vor allem über Chitin von Garnelenschalen erfolgt (Shahidi & Synowiecki, 1991). Die Umwandlung von Chitin in Chitosan erfolgt entweder über enzymatische Deacetylierung oder in Natronlauge. Das Polysaccharid setzt sich aus β -1,4-glykosidisch verknüpften D-Glukosaminen zusammen. Je nach Deacetylierungsgrad (engl. *Degree of Deacetylation*, DD) ist ein kleinerer oder größerer Anteil an N-Acetylglucosaminresten enthalten, da der DD den Anteil an deacetylierten Glucosaminen angibt. Gängige DDs, die für Forschungszwecke erhältlich sind, liegen zwischen 70 % und 95 %. Der DD bestimmt die physikochemischen Eigenschaften des Chitosans, wobei stark deacetylierte Derivate, also beispielsweise mit einem DD von 95 %, eine höhere Kristallinität und geringe Quellbarkeit aufweisen. Diese besitzen zudem eine höhere Reißfestigkeit und Dehnbarkeit, sowie eine höhere Viskosität als niedrig deacetylierte Derivate. Darüber hinaus ist Chitosan mukoadhäsiv, wobei mehr deacetylierte Gruppen dies verstärken und die Löslichkeit in Wasser erhöhen (George & Abraham, 2006; Wenling et al., 2005). Die Wechselwirkung zwischen den positiven Aminogruppen von Chitosan und mehreren negativen Gruppen in der Schleimhaut ermöglicht die

Mukoadhäsion, die wiederum vom Molekulargewicht des Chitosan abhängt (Henriksen, Green, Smart, Smista, & Karlsen, 1996). Die Länge der Chitosan Polymerketten und ihr durchschnittliches Molekulargewicht lassen sich durch enzymatische Zersetzung oder saure Hydrolyse steuern (Illum, 1998).

Chitosan findet vielfältig Anwendungen in der Kosmetik und Nahrungsmittelindustrie. Diese reichen von Zahnpasta über Fungizide, die Versiegelung von Nahrungsmitteln, bis hin zu Ballaststoffen als Nahrungsergänzungsmittel. Allerdings ist allein die Einfuhr von Chitosan-haltigen Lebens- und Nahrungsergänzungsmitteln erst seit 2017 in Deutschland erlaubt (LFGB, 2017) und die Zulassung der EMA für die Verwendung in Medikamenten für den europäischen Wirtschaftsraum fehlt bislang. Trotzdem wächst die Zahl an Forschungsstudien stetig. Aktuell befinden sich etwa zehn medizinische Produkte und Chitosan als Wirkstoff in klinischen Studien für die Behandlung von chronischen Wunden, Zahnmarknekrose, Parodontose, Atopische Dermatitis und sogar Prostatakrebs (Hepe, 2020). Chitosan als partikuläre Wirkstoffformulierung wurde bislang nur in der Forschung untersucht (Rabiee et al., 2020).

1.3.3 Das Biopolymer Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) ist ein in der extrazellulären Matrix von Wirbeltieren vorkommendes Glukosaminoglykan, also ein Mukopolysaccharid. Es besteht aus Disaccharid-Einheiten, die β -1,4-glykosidisch verknüpft sind. Ein Disaccharid setzt sich dabei aus einer D-Glucuronsäure und einem N-Acetylglukosamin zusammen. Die physiologische Synthese von HA im Körper von Wirbeltieren erfolgt über HA-Synthasen (Schulz, Schumacher, & Prehm, 2007). Die bakterielle Synthese von HA in *Streptococcus zooepidemicus* wurde bereits 1969 von Stoolmiller und Dorfman erforscht (Stoolmiller & Dorfman, 1969) und deckt heute einen Großteil der industriellen Produktion (Liu, Liu, Li, Du, & Chen, 2011). Die Eigenschaften von HA sind sehr gut auf deren Vorkommen im Körper von Wirbeltieren zurückzuführen. Besonders enorm ist ihre Kapazität Wasser zu speichern. HA bildet beispielsweise das Hydrogel im Glaskörper des Auges. Zudem besitzen HA-Hydrogele eine hohe Druckbeständigkeit, wie beispielsweise in den Bandscheiben. Außerdem ist HA Hauptbestandteil der Gelenkflüssigkeit und kann als natürliches Schmiermittel eingesetzt werden. Dort ist auch die scherverdünnende Eigenschaft von HA von Vorteil, welche dafür sorgt, dass die Viskosität von HA bei höheren Scherkräften sinkt. Im medizinischen Bereich findet das Natriumsalz der HA vielfach Verwendung, vor allem in der Therapie von Arthrose. Dabei werden HA-Lösungen in Gelenke gespritzt. Die sogenannte Viskosupplementation wirkt gleichzeitig als Stoßdämpfer und Schmiermittel, zum Beispiel im Kniegelenk (Rodriguez-Merchan, 2013; Trigkilidas & Anand, 2013). Besonders bekannt ist der Einsatz von HA in der Kosmetikindustrie, wobei hochmolekulare Derivate subkutan appliziert werden und niedrigmolekulare Derivate für die äußerliche Anwendung eingesetzt werden, um Falten zu mildern (Pavicic et al., 2011). Zudem ist der pharmazeutische Einsatz in der Augenheilkunde weit verbreitet, handelsübliche Augentropfen enthalten HA um gereizte Augen vor dem Austrocknen zu schützen und den Tränenfilm zu stabilisieren. Ebenso fördert HA die Wundheilung, wird als Kombi-Präparat bei Sodbrennen eingesetzt und wird für Nasensprays verwendet, welche die Schleimhaut langanhaltend befeuchten. (Aya & Stern, 2014; Savarino et al., 2017)

In den letzten 20 Jahren wurden zudem chemisch modifizierte HA-Derivate erforscht, da deren mechanische Eigenschaften über die chemische Struktur und Vernetzungsdichte gezielt einstellbar sind (Xu, Jha, Harrington, Farach-Carson, & Jia, 2012; Zhu & Marchant, 2011). Besonders

interessant ist hierbei das Tyramin-modifizierte Derivat der HA (HA-Tyr), da dieses enzymatisch oder mittels UV-Licht vernetzt werden kann (F. Lee, Chung, & Kurisawa, 2008b; J. H. Lee, 2018). Dadurch kann es zunächst als flüssige Lösung injiziert werden und nimmt nach der Vernetzung am Wirkort eine gezielt einstellbare Festigkeit als Hydrogel an. HA-Tyr-Hydrogele werden daher in der Reparatur von Knorpeldefekten und im *Tissue Engineering* verwendet (Donnelly et al., 2017; Motoichi Kurisawa, Joo Eun Chung, Yi Yan Yang, Shu Jun Gao, & Hiroshi Uyama, 2005; Ren, Gao, Kurisawa, & Ying, 2015).

1.4 Drug Delivery Systeme

Drug Delivery Systeme sind hochentwickelte Darreichungsformen, die durch ihre Beschaffenheit in der Lage sind, die Verfügbarkeit eines Arzneimittels für den Körper durch zeitliche oder räumliche Eingrenzung zu kontrollieren (Breuer, Chorghade, Fischer, & Golomb, 2009). Ein *Drug Delivery* System kann ein stationäres Implantat, aber auch ein aktives oder passives Transportsystem mit oder ohne spezifische Rezeptorfunktion sein (Vert et al., 2012). *Drug Delivery* Systeme umfassen zum Beispiel Nano- und Mikropartikel, Mizellen und Liposomen, aber auch Hydrogele, die eine effektive Wirkstoffkonzentration am Wirkort zum Ziel haben. Darüber hinaus sind der Verabreichungsweg, Nebenwirkungen, die Halbwertszeit des Wirkstoffs, die Freisetzung des Wirkstoffs, sowie die Pharmakokinetik, der Patientenkomfort und die Akzeptanz der Patienten bei der Entwicklung von *Drug Delivery* Systemen zu beachten. Im Gegensatz zu konventionellen Darreichungsformen, die den enthaltenen Wirkstoff in wässrigem Milieu unmittelbar freigeben, erzielen *Drug Delivery* Systeme eine kontinuierliche und kontrollierte Wirkstofffreisetzung über einen längeren Zeitraum (Breuer et al., 2009). Der Vergleich zwischen konventioneller Verabreichung und der Freisetzung eines *Drug Delivery* Systems in Bezug auf den therapeutischen Bereich des Medikaments ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

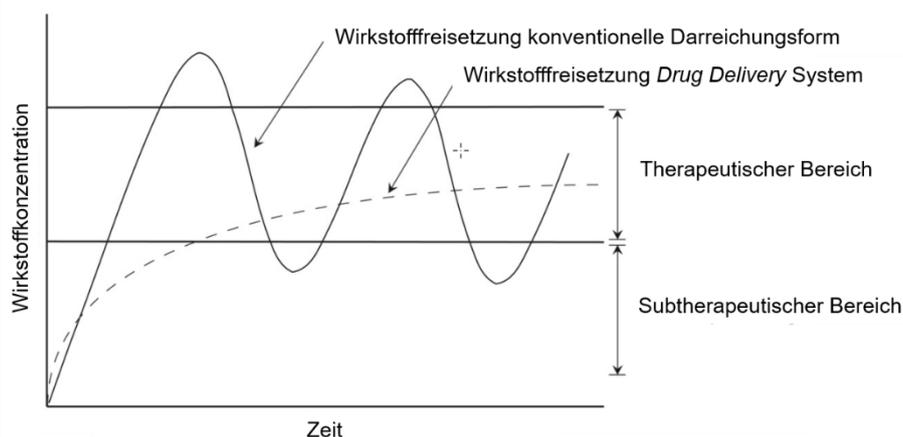


Abbildung 6: Auftragung einer Wirkstoffkonzentration über die Zeit für den schematischen Vergleich einer konventionellen Dosierung und eines *Drug Delivery* Systems (verändert nach (Janssen, Mihov, Welting, Thies, & Emans, 2014)).

Dabei kann die Einzeldosis eines oral verabreichten Medikaments mit verzögerter Wirkstofffreisetzung die Dauer der therapeutischen Wirkung, im Vergleich zu einer konventionellen Einzeldosis erhöhen; oder die kontrollierte Freisetzung findet nach Injektion statt und sorgt so für eine konstante Wirkstoffkonzentration im Blut oder Gewebe. Zunächst wurden die Begriffe „verlängerte Freisetzung“ (engl. *Prolonged Release*), „modifizierte Freisetzung“ (engl.

Modified Release) und „langsame Freisetzung“ (engl. *Slow Release*) synonym mit der kontrollierten Wirkstofffreisetzung (engl. *Controlled Release*) verwendet. Später wurde zwischen anhaltender Freisetzung (engl. *Sustained Release*) und der kontrollierten Wirkstofffreisetzung differenziert; demnach soll die kontrollierte Freisetzung auch pharmakokinetische Anforderungen erfüllen (Vert et al., 2012).

Historisch können *Drug Delivery* Systeme in drei Generationen eingeteilt werden (Yun, Lee, & Park, 2015). Die erste Generation umfasst dabei vor allem Wirkstoffformulierungen, die oral und transdermal verabreicht werden. Die zweite Generation zielt im Gegensatz dazu auf eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung ab, bei welcher der Wirkstoff innerhalb einer Matrix aus Hilfsstoffen immobilisiert wird und eine konstante Konzentration im Blut erreichen soll. Die dritte Generation schließlich zielt auf Wirkorte ab, die nicht klassisch enteral (über den Verdauungstrakt), oder parenteral (den Verdauungstrakt umgehend) erreichbar sind. Die *Drug Delivery* Systeme der dritten Generation sollen deshalb einen effektiven Wirkstofftransport über biologische Barrieren ermöglichen.

Als Wirkstoffträger (engl. *Drug Carrier*) sind Makromoleküle oder Polymere definiert, die für den Transport von Wirkstoffen verwendet werden und später durch abiotische oder biotische Prozesse den Wirkstoff freisetzen (Vert et al., 2012). Wirkstoffträgersysteme, die eine Wechselwirkung mit einem spezifischen Gewebe oder Rezeptor, beispielsweise eine Antikörper-Erkennung ermöglichen, oder die selektive Permeation durch Membranen oder Kapillaren bewirken, werden als *Targeted Drug Delivery* Systeme bezeichnet.

1.4.1 Wirkstofffreisetzung aus *Drug Delivery* Systemen

Bei der Wirkstofffreisetzung aus *Drug Delivery* Systemen werden grundsätzlich fünf verschiedene Mechanismen der Freisetzung unterschieden (Fredenberg, Wahlgren, Reslow, & Axelsson, 2011; Lengyel, Kállai-Szabó, Antal, Laki, & Antal, 2019). Diese sind schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

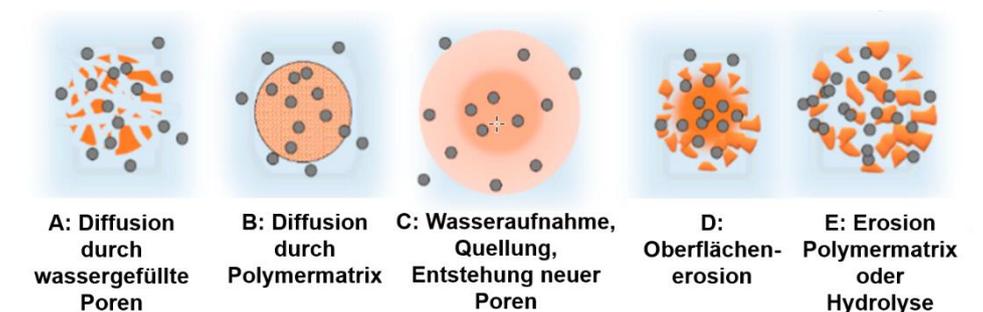


Abbildung 7: Molekulare Mechanismen der Wirkstofffreisetzung aus *Drug Delivery* Systemen. **A:** Diffusion aus wassergefüllten Poren, **B:** Diffusion durch das Trägermaterial (z. B. Polymermatrix), **C:** Quellung des Trägermaterials und dadurch vergrößerte sowie neue Poren, **D:** Oberflächenerosion, **E:** Zersetzung des Trägermaterials (verändert nach (Fredenberg et al., 2011; Lengyel et al., 2019)).

Handelt es sich bei dem untersuchten *Drug Delivery* System um ein poröses Wirkstoffträgermaterial, bieten die dort bereits vorhandenen Poren Zwischenräume, aus denen die Wirkstofffreisetzung stattfinden kann (Abbildung 7A). Dabei sind die Wirkstoffe in der porösen Matrix nicht immobilisiert, sie werden in Kontakt mit Wasser oder einem anderen Freisetzungsmittel aus den Poren herausgelöst. Die erste Form der Wirkstofffreisetzung ist

folglich ausschließlich von der Löslichkeit des Wirkstoffs im Freisetzungsmedium abhängig und dadurch wenig kontrolliert. Die zweite Form der Wirkstofffreisetzung ist diffusionsbasiert (Abbildung 7B). In diesem Fall handelt es sich bei der Wirkstoffträgermatrix um eine unlösliche, nicht-quellbare, poröse Polymermatrix. Die Wirkstofffreisetzung ist nicht nur von der Löslichkeit des Wirkstoffs selbst, sondern auch von der Porengröße des Trägermaterials abhängig. Je besser löslich der Wirkstoff im umgebenden Medium ist und je größer die Poren der Polymermatrix sind, desto schneller erfolgt die Wirkstofffreisetzung. Bei der dritten Form der Wirkstofffreisetzung handelt es sich um ein *Drug Delivery System*, welches ein unlösliches, quellbares Polymermaterial als Trägermatrix besitzt (Abbildung 7C). Sobald das *Drug Delivery System* in Kontakt mit dem Freisetzungsmedium kommt, nimmt dieses Wasser auf und die Polymer-basierte Trägermatrix quillt. Der Wirkstoff wird in diesem Fall durch die Vergrößerung der Poren erst im gequollenen Zustand, also verzögert, freigegeben. Bei dieser Form der Wirkstofffreisetzung ist zunächst die Quellbarkeit des Trägerpolymers für die Wirkstofffreisetzung entscheidend, damit einher geht die über die Zeit zunehmende Porengröße, welche die Wirkstofffreisetzung ebenfalls reguliert. Auch bei dieser Form ist zudem Voraussetzung, dass der Wirkstoff aufgrund seiner Löslichkeit im umgebenden Freisetzungsmedium herausdiffundiert. Die Quellung der Polymermatrix kann bei einigen Polymeren gezielt auf einen Reiz erfolgen, thermoresponsive Polymere können beispielsweise in Abhängigkeit der Temperatur gezielt quellen oder schrumpfen. Die vierte Form der Wirkstofffreisetzung findet durch Oberflächenerosion der Trägermatrix statt (Abbildung 7D). Dabei zersetzt sich das Trägermaterial durch den Kontakt mit dem Freisetzungsmedium oder durch einen spezifischen Reiz, wie beispielsweise den pH-Wert oder die Temperatur des Mediums. Dabei werden von außen beginnend Wirkstoffmoleküle freigesetzt, da das Matrixmaterial sich auflöst. Diese Form der Wirkstofffreisetzung ist folglich vor allem von den Eigenschaften des Matrixpolymers abhängig. Einen geringeren Anteil macht wiederum die Löslichkeit des Wirkstoffs im Freisetzungsmedium aus. Die fünfte Form der Wirkstofffreisetzung erfolgt schließlich durch Zersetzung des vollständigen *Drug Delivery Systems*, bzw. der polymeren Trägermatrix (Abbildung 7E). Die Wirkstofffreisetzung kann hierbei ebenfalls durch einen äußeren Reiz, wie beispielsweise einer pH-Wert- oder Temperatur-Änderung, ausgelöst werden. Die Wirkstofffreisetzung ist damit wiederum von den Eigenschaften des Matrixmaterials abhängig, während die Löslichkeit des Wirkstoffs keinen Einfluss hat. Die geeigneten Freisetzungsvarianten drei bis vier (Abbildung 7B-Abbildung 7D) haben außerdem gemeinsam, dass für diese entweder eine homogene Verteilung des Wirkstoffs in der Matrix, oder ein Depot im Zentrum vorliegen kann. Ein Wirkstoffdepot kann die Freisetzung über einen längeren Zeitraum zusätzlich begünstigen, während bei der ersten und fünften Variante (Abbildung 7A, Abbildung 7E) der komplette Wirkstoff auf einmal freigesetzt wird.

1.4.2 Partikuläre Wirkstofffreisetzung

Für die Wirkstofffreisetzung aus partikulären *Drug Delivery Systemen* wurden bereits verschiedene Freisetzungsprofile beschrieben. Die gewünschte kontinuierliche Freisetzung eines Wirkstoffs am Wirkort entspricht in einem geschlossenen System *in vitro* einer konstanten Wirkstoffakkumulation. Folglich sollte die Freisetzungskinetik einer linearen Wirkstoffzunahme über die Zeit entsprechen und wird als Freisetzungskinetik erster Ordnung definiert (Bruschi, 2015). Die Kinetik erster Ordnung wird von der verbleibenden Konzentration an Wirkstoff im Partikel und der Zeit bestimmt. Herausdiffundierende und noch verkapselte Menge an Wirkstoff sind zueinander proportional, da die enthaltene Wirkstoffmenge begrenzt ist. Stattdessen

beschreibt die Freisetzungskinetik nullter Ordnung die Freisetzung an einer Grenzfläche mit konstant bleibendem Wirkstoffreservoir, was aufgrund der dafür notwendigen Geometrie folglich ausschließlich für Pflaster oder Implantate möglich ist, die ein deutlich größeres Depot ermöglichen als Partikel, die ein begrenztes Volumen und eine maximale Beladungskapazität besitzen. Die unterschiedlichen für partikuläre *Drug Delivery* Systeme möglichen Freisetzungsverläufe sind beispielhaft in Abbildung 8 dargestellt.

Die meisten bisher beschriebenen Freisetzungskinetiken für Partikel sind in drei Phasen der Wirkstofffreisetzung unterteilbar. Zu Beginn der Wirkstofffreisetzung wird meist ein *Burst-Release* beschrieben, der sich durch eine stärkere Wirkstofffreisetzung mit höherer Steigung zeigt (Abbildung 8, alle außer schwarze Striche). Grund dafür sind nicht verkapselte Wirkstoffmoleküle, die auf der Partikeloberfläche adhäriert sind und bei Kontakt mit dem FreisetzungsmEDIUM schnell abgelöst werden können (Poulain et al., 2003; J. Wang, Wang, & Schwendeman, 2002). Risse oder teilweise zerstörte Partikel, die Wirkstoffe schneller freigeben, können ebenfalls einen *Burst-Release* auslösen (Huang & Brazel, 2001). Die zweite Phase ist von langsamer Wirkstofffreisetzung charakterisiert, in der die Steigung der Freisetzungskinetik folglich abflacht (Abbildung 8, leere Quadrate und gefüllte Rauten). In dieser Phase findet die Diffusion der Wirkstoffe aus der Polymermatrix statt (Fredenberg et al., 2011; Poulain et al., 2003). Je kleiner die Poren der Trägermatrix und je weniger porös das Trägerpolymer, desto langsamer die Freisetzung. Ebenfalls in dieser Phase findet in Abhängigkeit des gewählten Matrixmaterials und dessen Eigenschaften zusätzlich die Quellung der Polymerketten statt und kann somit ebenfalls einen Teil der Wirkstofffreisetzung ausmachen.

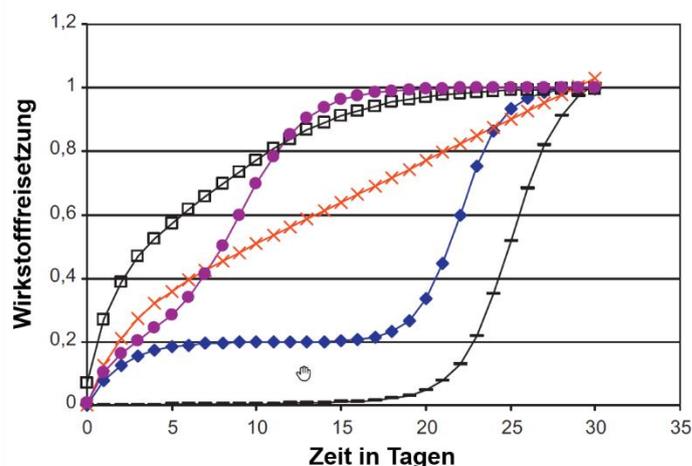


Abbildung 8: Freisetzungprofile, bestehend aus verschiedenen Phasen. **Leere Quadrate:** Burst-Release und eine schnelle Phase II. **Gefüllte Kreise:** Dreiphasige Freisetzung mit einer kurzen Phase II. **Kreuze:** Burst-Release und Freisetzung nullter Ordnung. **Gefüllte Rauten:** Dreiphasige sigmoidale Freisetzung. **Schwarze Striche:** Zweiphasige Freisetzung, ähnlich der dreiphasigen Freisetzung, aber ohne den Burst-Release (Fredenberg et al., 2011).

Die dritte und letzte Phase ist schließlich meist nochmal von einer starken Wirkstofffreisetzung charakterisiert, die in einem erneuten Steigungsanstieg der Freisetzungskinetik resultieren kann (Abbildung 8, gefüllte Rauten und schwarze Striche). Dadurch kann sich ein dreiphasiges, sigmoidales Freisetzungprofil ergeben (Abbildung 8, gefüllte Rauten). In dieser letzten Phase kommt es zur Zersetzung der Trägermatrix, weshalb alle noch enthaltenen Wirkstoffe schnell freigegeben werden. Je nachdem, welche Phase der Freisetzung am stärksten ausgeprägt ist verschiebt sich die Funktion der Freisetzungskinetik nach links oder rechts. Wenn zum Beispiel ein

initialer *Burst-Release* ausbleibt (Pan, Tang, Weng, Wang, & Huang, 2006), ist es sehr wahrscheinlich, dass später mehr Wirkstoffe freigesetzt werden. Ist die Wirkstofffreisetzung ausschließlich zersetzungsbasiert findet hingegen ausschließlich die dritte, schnelle, aber späte Freisetzung der Wirkstoffe statt (Abbildung 8, schwarze Striche).

Da für viele *Drug Delivery* Systeme zwar eine grobe Einteilung in die beschriebenen drei Phasen möglich ist, die molekularen Effekte sich aber meist überlagern, wurden Modelle entwickelt, um die experimentell bestimmten Freisetzungskinetiken besser einordnen und verstehen zu können. Des Weiteren können über Modell-Annahmen Rückschlüsse auf die Geometrie des *Drug Delivery* Systems gezogen werden. Für eine rein diffusionsbasierte Freisetzung, die über die gesamte Partikeloberfläche konstant stattfindet kann diese mit dem Higuchi-Modell beschrieben werden (Higuchi, 1963). Das Ritger-Peppas bzw. Korsmeyer-Peppas Modell ist ebenfalls für rein diffusionsbasierte Prozesse geeignet (Korsmeyer, Gurny, Doelker, Buri, & Peppas, 1983; Ritger & Peppas, 1987). Darüber hinaus können mit diesem Modell auch Freisetzungskinetiken beschrieben werden, die sich aus Diffusion und Polymerketten-Quellung zusammensetzen. Da dieses Modell für unterschiedliche Freisetzungsmechanismen anwendbar ist, ist es aktuell am verbreitetsten (Bruschi, 2015; Estevinho, Carlan, Blaga, & Rocha, 2016; Fazil et al., 2012; Fredenberg et al., 2011; Lengyel et al., 2019; Savin et al., 2019). Das Korsmeyer-Peppas Modell beschreibt mit M_t die Menge an freigesetztem Wirkstoff zum Zeitpunkt t , M_∞ ist die insgesamt verkapselte, also zur Freisetzung verfügbare Menge an Wirkstoff, K ist eine Konstante, die den Wirkstoffeinschluss beschreibt und n ist der Freisetzungsexponent.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n$$

Formel 1: Formel des Korsmeyer-Peppas Modells für die mathematische Beschreibung von Wirkstofffreisetzungen aus Drug Delivery Systemen (Bruschi, 2015).

Anhand des Freisetzungsexponenten n kann die Freisetzung in rein diffusionsbasiert (Ficksche Diffusion), hauptsächlich Diffusion mit einem geringen Anteil an Polymerquellung (*Case I* Transport), gleichförmige Diffusion und Quellung der Polymerketten (*Anomaler Transport*) und hauptsächlich bzw. ausschließliche Quellung der Polymerketten (*Super Case II* Transport), unterschieden werden (Bruschi, 2015). Die Zuordnung der einzelnen Werte des Freisetzungsexponenten n ist in Tabelle 1 dargestellt. Außerdem ist mit dem Korsmeyer-Peppas Modell jeweils die Unterscheidung in planare, zylindrische und sphärische *Drug Delivery* Systeme möglich. Darüber hinaus kann die Freisetzung aus zersetzbaren Polymeren mit dem Hopfenberg-Modell beschrieben werden (Katzhendler, Hoffman, Goldberger, & Friedman, 1997).

Tabelle 1: Zuordnung des Freisetzungsexponenten n des Korsmeyer-Peppas Modells für die Beschreibung von Wirkstofffreisetzungen aus Drug Delivery Systemen. Die Einteilung erfolgt entsprechend der Geometrie des untersuchten Drug Delivery Systems und dem stattfindenden molekularen Mechanismus der Wirkstofffreisetzung (verändert nach (Bruschi, 2015)).

Freisetzungsmechanismus	Geometrie des Drug Delivery Systems	Freisetzungsexponent n
Ficksche Diffusion	Planar, dünner Film	0,50
	Zylindrisch	0,45
	Sphärisch	0,43
Anomaler Transport (gleichförmige Diffusion und Polymerquellung)	Planar, dünner Film	$0,50 < n < 1,0$
	Zylindrisch	$0,45 < n < 0,89$
	Sphärisch	$0,43 < n < 0,85$
Case I Transport (hauptsächlich Diffusion, wenig Polymerquellung)	Planar, dünner Film	1,0
	Zylindrisch	0,89
	Sphärisch	0,85
Super Case II Transport (wenig Diffusion, hauptsächlich Polymerquellung)	Planar, dünner Film	> 1
	Zylindrisch	$> 0,89$
	Sphärisch	$> 0,85$

1.4.3 Der Sprühtrocknungsprozess

Partikuläre Wirkstoffformulierungen können entweder über fällungsbasierte Prozesse, Polymerisation oder Trocknung hergestellt werden. Während fällungs- und polymerisationsbasierte Prozesse meist große Mengen an Lösungsmitteln benötigen und die Partikel in einem zweiten Schritt über Filtration, Lösungsmittelverdampfung, oder Gefriertrocknung gewonnen werden müssen, ist die Sprühtrocknung ein effizienter einstufiger Prozess zur Partikelherstellung. Zudem ist die Sprühtrocknung in der Pharmaindustrie bereits etabliert (G. Lee, 2002; Stahl, 1980). Weitere Vorteile der Sprühtrocknung sind die einfache Skalierbarkeit und der kontinuierliche Prozess, welcher für die kosteneffiziente Produktion in der Industrie entscheidend ist und aktuell in Bezug auf Laborautomatisierung weiter an Bedeutung gewinnt. Nachteile sind hingegen die zunächst hohen Anschaffungskosten und der hohe Platzbedarf, welcher durch die bis zu meterhohen Trocknungstürme zustande kommt. Vorteilhaft für das Produkt, also die Partikel, sind die schonende Trocknung aufgrund der Trocknungszeit von wenigen Sekunden, sowie die gute Reproduzierbarkeit, welche eine gleichbleibende Produktqualität ermöglicht. Die erzeugten Partikel haben dabei eine Größe im Nano- und Mikrometerbereich, wodurch ein sehr feines Pulver entsteht. Es können sowohl Polymerlösungen, Wirkstoff-Polymer-Gemische, als auch feine Suspensionen, beispielsweise mit Nanopartikeln getrocknet werden. Für die Trocknung von wässrigen Lösungen oder Suspensionen wird Druckluft als Trocknungsgas verwendet. Für organische Lösungsmittel ist aufgrund der Explosionsgefahr durch das Erhitzen während des Prozesses die Verwendung des Inertgases Stickstoff als Trocknungsgas notwendig. Der Sprühtrocknungsprozess lässt sich in vier Phasen unterteilen:

Erstens, die Zerstäubung des Sprühtrocknungsfluids; zweitens, die Mischung des Sprühtrocknungsfluids mit dem Trocknungsgas; drittens, die Verdampfung des Lösungsmittels aus den Sprühtrocknungsfluid-Tröpfchen; und viertens, die Abscheidung des trockenen Produkts. Der Sprühtrocknungsprozess mit Düsenzerstäubung ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

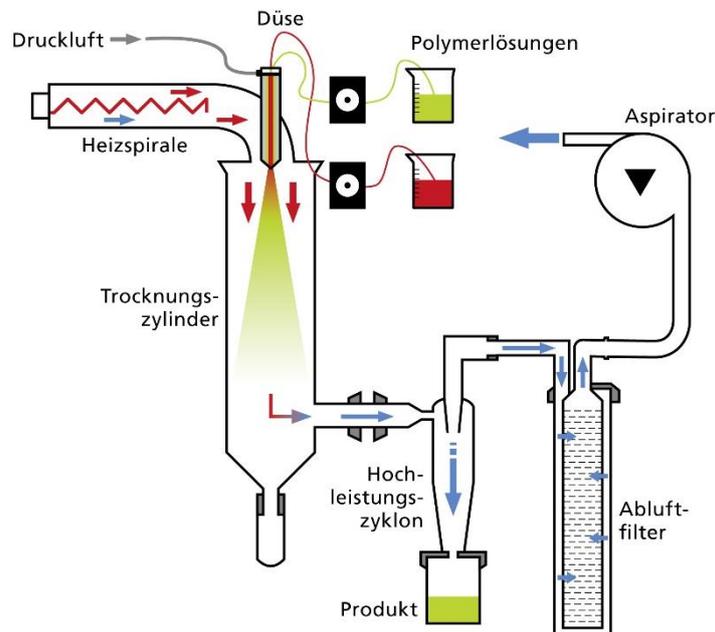


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Gleichstrom-Sprühtrockners mit Düsenzerstäubung, bei der entweder eine Polymer-Wirkstoff-Lösung oder zwei getrennte Lösungen für Polymer und Wirkstoff in die Düse gefördert werden können (©Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB).

Das Sprühtrocknungsfluid, meist bestehend aus einer homogenen Polymer-Wirkstoff-Mischung wird mit einer Pumpe in die Düse des Sprühtrockners gefördert. Bei schlecht mischbaren Lösungsmitteln ist auch die Förderung von zwei getrennten Lösungen in eine Düse möglich. Die Düse führt im inneren Kanal das zu verstäubende Sprühtrocknungsfluid. Im äußeren Kanal der Düse wird das Trocknungsgas gefördert. An der Düsen Spitze treffen Sprühtrocknungsfluid und Trocknungsgas aufeinander und der Tropfenaufritt und die Zerstäubung finden durch die Energie des Trocknungsgases statt. Daran ist nicht nur thermische Energie, sondern auch der im Sprühtrockner herrschende Unterdruck, Zentrifugalenergie und kinetische Energie beteiligt. Je größer dabei der Energieeintrag, desto kleiner die Tröpfchen. Durch die Zerstäubung in feine Mikrotröpfchen entsteht eine sehr große Oberfläche, welche die schnelle Verdampfung des Lösungsmittels ermöglicht. Die Trocknungszeit nimmt dabei proportional zur Tröpfchengröße ab. Beispielsweise kann ein Liter Flüssigkeit, bei einem Tröpfchenradius von einem Mikrometer innerhalb von nur 0,01 s getrocknet werden. Die Oberfläche der Tröpfchen entspricht dabei 600 m^2 (Stahl, 1980). Bei der Verdampfung wässriger Lösungen kommt es zur Bildung einer Wasserdampfhülle, die dafür sorgt, dass die zu trocknenden Stoffe nicht der heißen Umgebungstemperatur ausgesetzt sind (G. Lee, 2002). Die Verdampfung findet unmittelbar nach der Zerstäubung im Trocknungszylinder statt. Durch eine gleichmäßige Absaugung des Trocknungsgases mittels Aspirator am Ende des Sprühtrockners werden die durch die Verdampfung entstandenen Partikel zunächst nach unten abgesaugt und dann beispielsweise über einen Zyklon durch Strömungsabscheidung abgeschieden. Die trockenen Partikel werden schließlich als feines Pulver im Auffanggefäß gesammelt. Da die Strömungsabscheidung innerhalb eines bestimmten Größen- und Massebereichs der Partikel am besten funktioniert, wird ein kleiner

Teil nicht abgeschiedener Partikel in einem Filter am Ende des Sprühtrockners aufgefangen. Das gefilterte Trocknungsgas wird dann entweder nach außen abgeführt oder über den Aspirator in einem geschlossenen Kreislauf wieder zum Einlass des Sprühtrockners zurückgeführt. Bei dem in Abbildung 9 dargestellten Sprühtrockner handelt es sich um einen Gleichstrom-Sprühtrockner. Bei diesem verlaufen die Sprühtrocknungsfluid-Zerstäubung und der Trocknungsgasstrom gleichgerichtet. Diese Bauform ist für sensible Materialien wie Wirkstoffe besonders gut geeignet, da das Trocknungsgas im dem Bereich der Zerstäubung am wärmsten ist. Dadurch kommt das getrocknete, möglicherweise sensible Produkt nicht mit dem heißen Trocknungsgas in Kontakt, sondern nur mit der nach der Verdampfung deutlich reduzierten Austrittstemperatur.

Um die Produkteigenschaften der Partikel gezielt zu modifizieren sind die Eintrittstemperatur, die Pumprate des Sprühtrocknungsfluids, der Trocknungsgasstrom und die Konzentration des Sprühtrocknungsfluids einstellbare Parameter. Von diesen Parametern werden indirekt die Austrittstemperatur, die Partikelgröße, sowie die Restfeuchtigkeit der Partikel und die Partikelgröße bestimmt. Alle Parameterbezüge, sowie die Intensität des Einflusses sind in Tabelle 2 dargestellt.

Während sich die Eintrittstemperatur vor allem auf die Austrittstemperatur und die Restfeuchtigkeit des Produkts auswirkt, hat der Trocknungsgasstrom einen minimalen Einfluss auf die Austrittstemperatur und einen starken Einfluss auf die Partikelgröße. Die Pumprate des Sprühtrocknungsfluids wirkt sich vor allem auf die Austrittstemperatur und auf die Restfeuchtigkeit des Produkts aus. Eine Erhöhung der Konzentration des Sprühtrocknungsfluids wirkt sich sowohl auf die Austrittstemperatur als auch deutlich auf die Partikelgröße aus.

Tabelle 2: Nicht direkt einstellbare Parameter des Sprühtrocknungsprozesses (Austrittstemperatur, Partikelgröße, Restfeuchtigkeit des Produkts, Partikelgröße) in Abhängigkeit der einstellbaren Parameter (Eintrittstemperatur, Trocknungsgasstrom, Pumprate des Sprühtrocknungsfluids, Konzentration des Sprühtrocknungsfluids). Dargestellt ist der Einfluss für maximal hohe einstellbare Parameter, wobei (-) kein Einfluss, (↑) geringe Zunahme, (↑↑) mittlere Zunahme und (↑↑↑) große Zunahme der nicht einstellbaren Parameter bedeutet (verändert nach (Büchi, 1997).

Abhängigkeit der Parameter	Eintrittstemperatur ↑↑↑	Trocknungsgasstrom ↑↑↑	Pumprate Sprühtrocknungsfluid ↑↑↑	Konzentration Sprühtrocknungsfluid ↑↑↑
Austrittstemperatur	Direkt proportional ↑↑↑	Mehr kaltes Gas muss erwärmt werden ↓	Mehr Lösungsmittel muss verdampft werden ↓↓	Weniger Lösungsmittel muss verdampft werden ↑↑
Partikelgröße	-	Mehr Energie für Zerstäubung des Fluids ↓↓↓	Mehr Fluid muss zerstäubt werden ↑	Größere Masse der Partikel ↑↑↑
Restfeuchtigkeit der Partikel	Geringere relative Luftfeuchtigkeit ↓↓	-	Mehr verdampftes Lösungsmittel bewirkt höheren Partialdruck ↑↑	Weniger verdampftes Lösungsmittel bewirkt geringeren Partialdruck ↓
Partikelgröße	Trockeneres Produkt verhindert Agglomeration ↑	-	Abhängig vom einzelnen Versuch	Größere Partikel werden besser abgeschieden ↑

1.4.4 Wirkstoffverkapselung mittels Sprühtrocknung

Wie bereits beschrieben ist für die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen aus *Drug Delivery* Systemen entweder eine homogene Wirkstoffverteilung in der Partikelmatrix notwendig, oder die Wirkstoffe müssen durch die Trägermatrix vollständig eingeschlossen sein, um einen *Burst-Release* möglichst gering zu halten. Bei der Sprühtrocknung einer Wirkstoff-Polymer-Lösung haben die bereits beschriebenen Sprühtrocknungsparameter Eintritts- bzw. Austrittstemperatur, Pumprate des Sprühtrocknungsfluids und Konzentration des Sprühtrocknungsfluids, sowie die Trocknungszeit einen signifikanten Einfluss auf die Dichte der Partikel und die Polymer-Wirkstoff-Anordnung in den Partikeln. Der Einfluss homogener Lösungen oder inhomogener Dispersionen als Sprühtrocknungsfluid, sowie der Unterschied zwischen schneller Verdampfung und langsamer Verdampfung auf die gebildeten Partikel sind in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

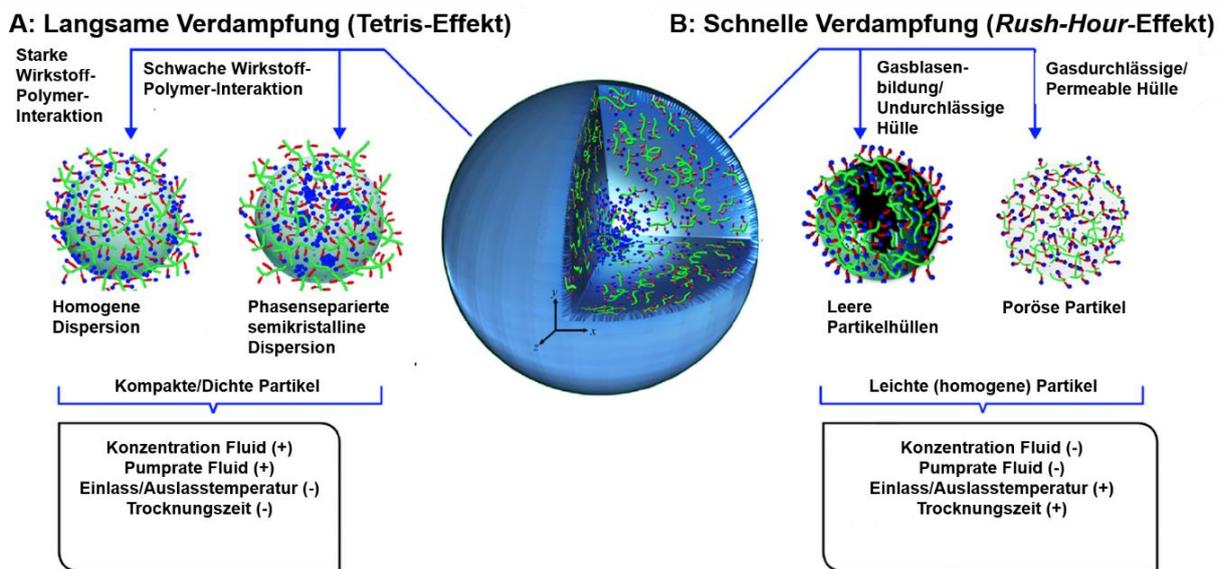


Abbildung 10: Einfluss von langsamer (A) und schneller Verdampfung (B) auf die Partikelmorphologie und die Wirkstoff-Polymer-Anordnung für die Herstellung von Wirkstoffformulierungen mittels Sprühtrocknung (verändert nach (Paudel, Worku, Meeus, Guns, & Van den Mooter, 2013)).

Bei langsamer Verdampfung (Abbildung 10A) entstehen dichte Partikel mit kompakter Polymer-Wirkstoff-Packung. Der dabei stattfindende Effekt wird als *Tetris-Effekt* bezeichnet (Paudel et al., 2013). Bei der langsamen Verdampfung homogener Lösungen entstehen starke Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffen und Polymer, die Wirkstoffe liegen in der Partikelmatrix homogen verteilt vor. Bei der Sprühtrocknung inhomogener, phasenseparierter Dispersionen entstehen hingegen schwache Wechselwirkungen zwischen den Wirkstoff- und den Polymermolekülen. Außerdem wirken sich eine höhere Sprühtrocknungsfluid-Konzentration, eine höhere Pumprate des Sprühtrocknungsfluids, geringere Eintritts- und Austrittstemperaturen, sowie eine kürzere Trocknungszeit positiv auf die Bildung kompakter Partikel mit homogener Matrix aus. Bei schneller Verdampfung entstehen hingegen leichte Partikel durch den sogenannten *Rush-Hour-Effekt* (Abbildung 10B). Dabei können aus einer homogenen Wirkstoff-Polymer-Lösung durch die Bildung von Gasblasen entweder hohle Partikel mit undurchlässiger Hülle entstehen, oder homogene poröse Partikel mit gasdurchlässiger Matrix. Bei den hohlen Partikeln sind die Wirkstoffe nur in der Partikelhülle enthalten, während in den porösen Partikeln die Polymer- und Wirkstoffmoleküle homogen verteilt sind. Die Bildung leichter Partikel wird zudem durch eine geringere Sprühtrocknungsfluid-Konzentration, eine geringere Pumprate des

Sprühtrocknungsfluids, höhere Eintritts- und Austrittstemperaturen und eine längere Trocknungszeit begünstigt.

Bisher untersuchte Ansätze zur Wirkstoffformulierung mit Sprühtrocknung haben gezeigt, dass die Verkapselung flüssiger Wirkstoffe gut möglich ist, wohingegen feste Stoffe schwierig zu verkapseln sind (Gouin, 2004). Zudem ist die Verkapselung lipophiler Moleküle einfacher als die Formulierung amphiphiler und hydrophiler Substanzen. Mit der Sprühtrocknung sind außerdem einfach thermoresponsive Wirkstoffformulierungen erzeugbar, wohingegen die Herstellung von *Drug Delivery* Systemen, die zeitverzögert oder durch die Verdauung im Körper induziert den Wirkstoff freisetzen als schwierig eingestuft wurde. Darüber hinaus ist bislang nicht eindeutig geklärt, ob es eine Größeneinschränkung für zu verkapselnde Wirkstoffe oder Nanopartikel gibt. (Estevinho et al., 2016)

1.4.5 Sprühtrocknung von Immunoglobulinen

Wie bereits beschrieben ist die Sprühtrocknung in der Pharmaindustrie bereits etabliert, sie kommt bei der Trocknung von Hilfsstoffen, Vitaminen, Enzymen, oder anderen Proteinen zum Einsatz (G. Lee, 2002; Stahl, 1980). Da das Erfolgspotential monoklonaler Antikörper groß ist, werden diese in großen Mengen produziert (Backer, Metzger, Slaber, Nevitt, & Boder, 1988). Nach der Produktion dieser sensiblen Makromoleküle ist vor allem deren Lagerung eine aktuelle Herausforderung (Bowen, Turok, & Maa, 2013). Da Medikamente, wie beispielsweise Kesimpta® und Ocrevus® als hochkonzentrierte Lösungen verabreicht werden, ist die Lagerung großer Produktionsansätze mit aufwändigen Kühlketten notwendig (Bowen et al., 2013). Dies verursacht hohe Kosten und großen Platzbedarf.

Aus diesem Grund wurde die Sprühtrocknung von monoklonalen IgG Antikörpern bereits in der Forschung untersucht. Da sich in der flüssigen Formulierung von IgG Antikörpern Zuckerderivate als Hilfsstoffe für deren Stabilität in Lösung bewährt haben, wurde zudem der Einfluss von Zuckerderivaten auf die Sprühtrocknung von IgGs untersucht (Henry R Costantino, Andya, Shire, & Hsu, 1997; Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, & Lee, 2005; Stefanie Schüle, Wolfgang Friess, Karoline Bechtold-Peters, & Patrick Garidel, 2007; Flávia Sousa, Cruz, Pinto, & Sarmento, 2018). Die Analyse möglicher Agglomerate und Degradation in Folge von Denaturierung erfolgte mittels Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (engl. *High Pressure Liquid Chromatography – Size Exclusion Chromatography*, HPLC-SEC) und dynamischer Lichtstreuung (engl. *Dynamic Light Scattering*, DLS). Die Integrität der Proteinstruktur wurde zudem mittels Intrinsischer Fluoreszenz, Zirkulardichroismus und Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) untersucht. Eine Forschungsgruppe analysierte außerdem die Bindungsaktivität der sprühgetrockneten IgGs mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (F. Sousa, Sarmento, & Neves-Petersen, 2017). 2007). Darüber hinaus untersuchte ebenfalls eine Forschungsgruppe die thermische Stabilität der sprühgetrockneten IgGs mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) (Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, et al., 2005). Die Lagerstabilität der mit Zuckerderivaten gesprühgetrockneten IgGs lag zwischen sechs Monaten und einem Jahr, wobei zwischen der Lagerung bei 2-8 °C und 25 °C kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Dabei stellte sich heraus, dass der Zusatz von 20-30 gew.% Sorbitol, Mannitol oder Trehalose vorteilhaft für den strukturellen Erhalt und die Lagerstabilität sprühgetrockneter IgGs war. Dies konnte sowohl im trockenen Zustand als auch nach der Rekonstitution des Pulvers in wässrigen Lösungen gezeigt werden. Dabei gingen die getrockneten IgG Moleküle innerhalb von

nur 120 s wieder vollständig in Lösung. Sprühtrocknung ist folglich für die Trocknung und Rückgewinnung von IgGs als *Bulk*-Material geeignet.

1.4.6 Sprühtrocknung von Chitosan

Wie für alle Sprühtrocknungsprozesse sind auch für die erfolgreiche Sprühtrocknung von Chitosan die zuvor beschriebenen Parameter Trocknungsgasstrom, Pumprate des Sprühtrocknungsfluids, Eintritts- und Austrittstemperatur, sowie die Konzentration des Sprühtrocknungsfluids entscheidend (Estevinho et al., 2016). Mit der Konzentration des Sprühtrocknungsfluids geht zudem die Viskosität der Lösung einher, welche für Chitosan-Lösungen besonders hoch sein kann und deshalb in der Prozessoptimierung beachtet werden sollte (Estevinho et al., 2016; Lorenzo-Lamosa, Remunan-Lopez, Vila-Jato, & Alonso, 1998). Außerdem hat der DD des verwendeten Chitosans einen Einfluss auf die Kristallinität der Partikel, sowie auf intermolekulare Wechselwirkungen und damit auch auf die Freisetzung von Wirkstoffen (Begley, 2004; Estevinho et al., 2016). Neben Cyclodextrin, Natrium-Diclophenac und anderen niedrigmolekularen Verbindungen wurden auch verdauungsfördernde Enzyme, wie alpha-Amylase und Lactose zusammen mit Chitosan gesprühtrocknet. Die Einlasstemperaturen reichten dabei von 105 °C bis 220 °C, wobei vor allem wässrige Systeme verwendet wurden. Die Pumprate des Sprühtrocknungsfluids lag zwischen 0,0693 L h⁻¹ und 3 L h⁻¹, wobei die Laborsprühtrockner B-190 und B-290 der Firma Büchi (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) am häufigsten eingesetzt wurden. Außerdem wird Tripolyphosphat (TPP) für die ionische Vernetzung von Chitosan bei der Sprühtrocknung eingesetzt, da es sich dabei um das stärkste, nicht toxische Vernetzungsreagenz handelt (Estevinho et al., 2016). Durch die Vernetzung mit TPP können die Partikeleigenschaften und die Wirkstofffreisetzungseigenschaften weiter modifiziert werden, beispielsweise bei der Formulierung von Laccase (Kašpar, Tokárová, Nyanhongo, Gübitz, & Štěpánek, 2013). Darüber hinaus wurden auch bereits Kombinationen aus Silber-Nanopartikeln und Chitosan mit Sprühtrocknung untersucht (Tokárová, Kašpar, Knejzlík, Ulbrich, & Štěpánek, 2013). Die Verkapselung von Proteinen als pharmazeutische Wirkstoffe oder die Verkapselung von monoklonalen Antikörpern in Chitosan wurde bislang noch nicht untersucht.

1.4.7 Partikuläre *Drug Delivery* Systeme für die nasale Applikation

Wie bereits beschrieben, wurden in der intranasalen Applikation für die Erforschung des *Nose-to-Brain* Transports nicht nur Wirkstofflösungen, sondern auch bereits Partikel untersucht. Diese stellten sich im Vergleich zu pur aufgetragenen Lösungen sogar als vorteilhaft heraus. Aus diesem Grund wird die intranasale Applikation partikulärer *Drug Delivery* Systeme in den letzten Jahren intensiv untersucht (Bourganis, Kammona, Alexopoulos, & Kiparissides, 2018b; Keller, Merkel, & Popp, 2021; Rabiee et al., 2020). Als besonders vorteilhafte Partikelmaterialien haben sich dabei die Biopolymere PLGA und Chitosan herausgestellt, wobei PLGA und Chitosan-Partikel bis zu einem Durchmesser von 250 µm über den olfaktorischen Nerv ins ZNS transportiert werden können (Rabiee et al., 2020). Für PLGA-Partikel mit Olanzapin wurde beispielsweise eine vielversprechende intranasale Applikation beschrieben, da die PLGA-Partikel langsam quollen und in der Nase ein langsam freisetzendes Depot bildeten, wodurch eine achtfach höhere Wirkstoffkonzentration als in gelöster Form erzielt werden konnte (Seju, Kumar, & Sawant, 2011). Außerdem wurde der Transport von PLGA-Partikeln kleiner 200 nm entlang von Axonen und

Nervenbündeln in der Riechschleimhaut beschrieben (Muntimadugu et al., 2016). Die parazelluläre Aufnahme von Partikeln wurde bereits in verschiedenen Studien mittels Epithelzellkulturen und Schleimhautgeweben untersucht (Fazil et al., 2012; Rassa et al., 2016; Sadeghi et al., 2008; Sonaje et al., 2012). Dabei stellte sich Chitosan als besonders interessantes Trägermaterial heraus, da Chitosan-Partikel einfach herzustellen und biokompatibel sind. Darüber hinaus wurde für Chitosan-Partikel die Eigenschaft beschrieben *Tight Junctions* öffnen zu können, was die Wirkstoffaufnahme nach intranasaler Gabe erhöhte und eine höhere Wirkstoffkonzentration im ZNS bewirkte (Bourganis et al., 2018a; Garcia-Fuentes & Alonso, 2012; Rabiee et al., 2020; Rassa et al., 2016). Für die intranasale Applikation von Partikeln ist es wichtig, deren Verteilung im Gewebe, deren Biokompatibilität, den biologischen Abbau und die mögliche Immunreaktionen zu kennen. Diese Aspekte sind allerdings bisher nur wenig beschrieben (Rabiee et al., 2020). Neueste Daten belegen, dass der Zusammenhang zwischen Wirkstoffformulierungen und intranasalen Verabreichungswegen noch weitgehend unbekannt ist und damit weitere Untersuchungen für die Entwicklung intranasaler Wirkstoffformulierungen notwendig sind. (Keller et al., 2021; Rabiee et al., 2020)

Im von der Europäischen Kommission geförderten *Horizon 2020 Research and Innovation* Forschungsprojekt *N2B-patch* (engl. *Nose-to-Brain-patch*, N2B) hat sich ein Konsortium aus elf europäischen Partnerorganisationen im Förderzeitraum von Januar 2017 bis Juni 2021 mit der Entwicklung einer innovativen intranasalen Applikationsform für die Behandlung von Multipler Sklerose beschäftigt. Das sogenannte *Nose-to-Brain*-Pflaster sollte aus einer partikulären Wirkstoffformulierung und einer Hydrogel-Matrix zur Befestigung der Wirkstoffformulierung in der Riechrinne bestehen. Darüber hinaus wurde ein spezieller Applikator entwickelt, um die beiden Komponenten in der Nasenhöhle exakt dosieren zu können. Diese Dissertation wurde im Rahmen dieses Projekts am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB in Stuttgart durchgeführt. In Zusammenarbeit mit weiteren Kooperationspartnern dieses Projekts haben sich wissenschaftliche Publikationen ergeben, die im Folgenden dargestellt sind. Die im folgenden dargestellte Zielsetzung dieser Dissertation wurde jedoch über die wissenschaftlichen Fragestellungen und fachlichen Anforderungen des *N2B-patch* Projektes hinausgehend formuliert und bearbeitet.

2. Zielsetzung und Hypothesen der Arbeit

2.1 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Dissertation war die Entwicklung und Charakterisierung einer partikulären biobasierten Wirkstoffformulierung für die kontrollierte Freisetzung an der *Regio olfactoria*. Diese Wirkstofffreisetzung ist schematisch in Abbildung 11 dargestellt. Für die Entwicklung der partikulären Wirkstoffformulierung als intranasales *Drug Delivery* System sollte zunächst ein langsam freisetzendes, biokompatibles Partikelmaterial ausgewählt werden und der Sprühtrocknungsprozess für die Herstellung von Wirkstoffpartikeln hinsichtlich des gewählten Biopolymers optimiert werden. Da sich Chitosan gegenüber anderen Biopolymeren als besonders geeignet für die intranasale Applikation von Wirkstoffen herausstellte, sollte im Folgenden die Applikation auf *ex vivo* Gewebebiopsien der *Regio olfactoria* vom Schwein untersucht werden. Hierzu wurde die Methode zur Extraktion des porzinen olfaktorischen Epithels sowie dessen histologische Analyse etabliert. Als erstes Modellsystem sollte die Aufnahme von PLGA-Nanopartikeln im Vergleich zu in Chitosan mittels Sprühtrocknung eingebetteten Chitosan-PLGA-Nano-in-Mikropartikeln untersucht werden. Damit sollte die Eigenschaft von Chitosan interzelluläre *Tight Junctions* öffnen zu können, bewiesen und damit die Eignung als intranasales *Drug Delivery* System gezeigt werden. Als nächstes sollten Partikel mit einem robusten und gut analysierbaren Modellwirkstoff aus Chitosan-Derivaten mit unterschiedlichem Deacetylierungsgrad und Molekulargewicht mittels Sprühtrocknung hergestellt und verglichen werden, um das am besten geeignete Chitosan-Derivat hinsichtlich Partikelabgabe, Restfeuchtigkeit, Partikelgrößenverteilung, Partikelmorphologie, Verkapselungseffizienz und kontrolliertem Freisetzungsverhalten *in vitro* zu identifizieren. Daraufhin sollte schließlich ein therapeutischer monoklonaler Antikörper, welcher für die intranasale Applikation und damit für *Nose-to-Brain-Transport* von wissenschaftlichem Interesse ist, in dieses Chitosan-Derivat mit einem möglichst hohen Beladungsgrad mittels Sprühtrocknung verkapselt und die resultierenden Partikel wiederum hinsichtlich der oben genannten relevanten Partikeleigenschaften charakterisiert werden. Da es sich bei monoklonalen Antikörpern um sensitive Makromoleküle handelt, sollten insbesondere diese zusätzlich auf deren verbleibende strukturelle Integrität und die Stabilität bei Raumtemperatur in den sprühgetrockneten Partikeln und nach der Freisetzung aus der Verkapselung untersucht werden. Um die Haftung der entwickelten pulverförmigen Chitosan-Partikel an der Riechschleimhaut sicherstellen zu können, sollten schließlich Hyaluronsäurelösungen als mögliche zusätzliche Komponente eines intranasalen *Drug Delivery* Systems untersucht werden. Hierfür wurde ein Muzin-Agarose-Hydrogel-Substrat als artifizielles Mukosa-Analog charakterisiert und das Spreitungsverhalten von Hyaluronsäurelösungen unterschiedlicher Konzentration darauf untersucht. Abschließend wurden vergleichende Untersuchungen mit einem, durch UV-Licht vernetzbaren, Tyramin-modifizierten Hyaluronsäurederivat auf dem Mukosa-Analog und *ex vivo* Gewebebiopsien vom Schwein durchgeführt. Dadurch sollte das Mukosa-Analog abschließend validiert werden, sowie die Eignung der, durch UV-Licht vernetzbaren, Tyramin-modifizierten Hydrogelvorläuferlösungen als stabilisierende Komponente für intranasal applizierte Partikel getestet werden.

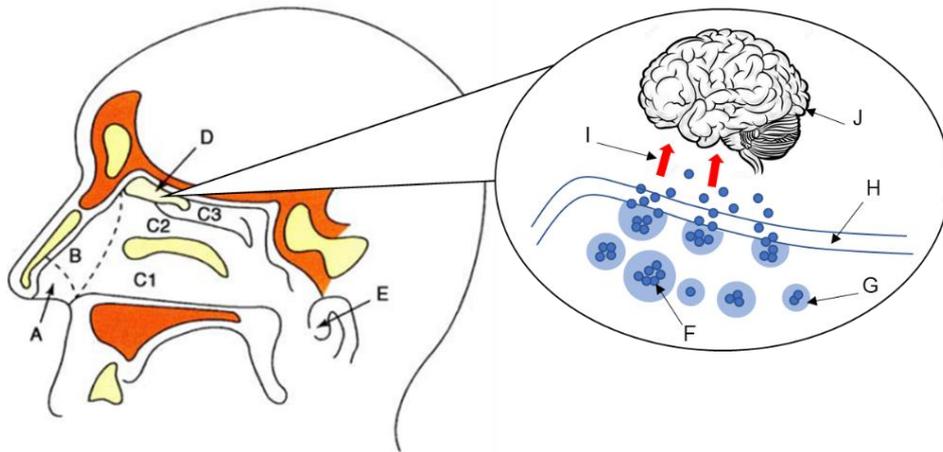


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Nasenhöhle eines Menschen mit Nasenvorhof (A), Atrium (B) und respiratorischer Region: unterer (C1), mittlerer (C2) und oberer (C3) Nasenmuschel, sowie Riechepithel (D) und Nasopharynx (E). Nahaufnahme der Freisetzung von Wirkstoffen (F) aus Partikeln (G) an der Regio olfactoria (H), sowie der schematische Transport der Wirkstoffmoleküle (I) zum Gehirn (J) (verändert nach (M. I. Ugwoke et al., 2005; Michael Ikechukwu Ugwoke et al., 2010))

Aus der Zielsetzung dieser Dissertation ergeben sich mehrere wissenschaftliche Fragestellungen. Um diese genau untersuchen und diskutieren zu können, habe ich die wissenschaftlichen Fragestellungen als Hypothesen formuliert. Diese vier Hypothesen sind in Abbildung 12 schematisch dargestellt und werden im Folgenden erläutert. Die darauffolgenden Ergebnisse der Untersuchungen zu den Hypothesen sind in Kapitel 3, 4 und 5 dargestellt und diskutiert. Alle Ergebnisse werden in Kapitel 6 im wissenschaftlichen Gesamtzusammenhang umfassend diskutiert. Die Zusammenfassung und die Schlussfolgerungen in Kapitel 7 sowie der Ausblick in Kapitel 8 schließen diese Arbeit ab.



Abbildung 12: Schematische Darstellung der vier Hypothesen für die Untersuchung und Diskussion der wissenschaftlichen Fragestellungen dieser Dissertation.

2.2 Hypothesen der Arbeit

2.2.1 Hypothese I

Biopolymerbasierte Partikel wie beispielsweise Polylactid-co-Glycolid-Nanopartikel (PLGA) finden vielseitig Anwendung als *Drug Delivery System* aufgrund der sehr gut einstellbaren Freisetzungseigenschaften von Wirkstoffen aus dem Biopolymer PLGA. Unzureichend verstanden hingegen sind die Applikation und die Aufnahme von Partikeln beispielsweise in Geweben. Generell sind hauptsächlich Ergebnisse publiziert, die die intrazelluläre Aufnahme von Nanopartikeln bis zu einer Größe von nur 250 nm bestätigen. Ob auch andere Transportrouten, wie beispielsweise die parazelluläre Aufnahme im olfaktorischen Epithel größenlimitieren wirkt, ist noch nicht vollständig verstanden. Weiterhin werden PLGA-Partikel teilweise mit Chitosan beschichtet, um entweder Mukoadhäsion zu erzielen oder die besondere Eigenschaft von Chitosan zu nutzen, dass dieses die Zell-Zell-Kontakte *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* öffnen kann. Dies ist über immunhistologische Färbung des Membranproteins *Zonula occludens Protein 1 (ZO-1)* nachweisbar. Allerdings werden in der Beschichtung von PLGA- oder anderen Nanopartikeln mit Chitosan meist lediglich dünne Lagen an Chitosan von wenigen Nanometern erzielt. Die Einbettung von PLGA-Nanopartikeln mittels Sprühtrocknung in Chitosan ist bislang noch nicht untersucht worden, insbesondere im Hinblick auf intranasale Applikation. Die folgende Hypothese wurde aufgestellt:

Polylactid-co-Glycolid (PLGA) Nanopartikel können unterhalb eines Durchmessers von 200 nm innerhalb von 15 min intrazellulär in die olfaktorische Mukosa des Schweins aufgenommen werden. Nanopartikel mit einer Größe von 500 nm werden nicht aufgenommen. Durch die Verpackung der PLGA-Nanopartikel in Chitosan mittels Sprühtrocknung entstehen sogenannte Nano-in-Mikro-Partikel mit hoher Verkapselungseffizienz und reproduzierbaren Partikeleigenschaften. Die Chitosan-Beschichtung ermöglicht auch die Aufnahme von PLGA-Nanopartikeln größer 200 nm, da Chitosan Zell-Zell-Kontakte im olfaktorischen Epithel des Schweins öffnet und so parazellulären Transport bewirkt. Die Öffnung der Zell-Zell-Kontakte kann mittels immunhistologischer Färbung nachgewiesen werden.

Die von dem Kooperationspartner *MyBiotech GmbH* aus Überherrn mittels Emulsionspolymerisation hergestellten PLGA-Nanopartikel mit den Durchmessern 81,6 nm, 174,4 nm und 519,7 nm wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und konfokaler *Laser-Scanning* Mikroskopie (LSM) charakterisiert und mittels Sprühtrocknung erfolgreich in Chitosan verkapselt. Die entstandenen Nano-in-Mikro Partikel wurden wiederum mittels REM und LSM untersucht, sowie über statische Lichtstreuung charakterisiert. Die Aufnahme von reinen PLGA-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe und die Aufnahme von Chitosan bzw. Chitosan-beschichteten Nanopartikeln wurde *ex vivo*, auf präparierter olfaktorischer Mukosa vom Schwein, untersucht. Diese Studie wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Frontiers in Pharmacology* mit dem Titel „*Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa*“ veröffentlicht (Spindler et al., 2021).

2.2.2 Hypothese II

In der pharmazeutischen Produktion wird das Verfahren der Sprühtrocknung bereits großtechnisch zur Trocknung von Wirkstoffen und Füllmaterialien eingesetzt. Die Forschung beschäftigt sich zudem mit der Verwendung von Sprühtrocknung zur Herstellung von partikulären Wirkstoffformulierungen auf Basis von Biomaterialien wie Chitosan. Die in der Literatur beschriebenen Prozesse hierzu sind jedoch oftmals nicht optimal ausgelegt, sodass inhomogene Partikel entstehen, nur wenige Milligramm an Partikeln produziert werden, oder die Angabe essenzieller Prozessparameter vollständig fehlt. Die folgende Hypothese wurde aufgestellt:

Die Wahl des Chitosan-Derivates hat bei identisch gewählten Prozessparametern einen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute des Sprühtrocknungsprozesses, die Partikelgrößenverteilung und die Partikelmorphologie der gebildeten Partikel. Durch die Wahl idealer Prozessparameter können reproduzierbar sphärische Chitosan-Partikel mit glatter Oberfläche hergestellt werden. Der robust gewählte Sprühtrocknungsprozess ermöglicht die kontinuierliche Produktion im Labormaßstab.

In diesem Kontext wurden sechs verschiedene Chitosan-Derivate mit Deacetylierungsgraden von 80 % und 95 % und Molekulargewichten zwischen 20 kDa und 500 kDa in der Sprühtrocknung zur Partikelherstellung eingesetzt. Der Einfluss der Temperatur und des Materials, sowie die Auswirkungen auf die Ausbeute wurden im kontinuierlichen Labormaßstab untersucht. Die gebildeten Partikel wurden hinsichtlich ihrer Restfeuchtigkeit gravimetrisch, der Partikelgröße mittels statischer Lichtstreuung und der Morphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert. Die optimalen Sprühtrocknungsparameter, sowie die Diskussion der Parameter, wurden zunächst exemplarisch für Chitosan-PLGA-Nano-in-Mikro Partikel in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Frontiers in Pharmacology* mit dem Titel „*Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa*“ veröffentlicht (Spindler et al., 2021). Die detaillierte Analyse der Partikel bestehend aus verschiedenen Chitosan-Derivaten, sowie die Diskussion der Chitosan-Derivat-Eigenschaften und deren Einfluss auf die Partikeleigenschaften, wurde anschließend in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *International Journal of Pharmaceutics* mit dem Titel „*Spray-dried Chitosan Particles as Controlled Intranasal Drug Delivery Systems for High Encapsulation Efficiency of Small Molecules and Monoclonal Antibodies*“ zur Veröffentlichung eingereicht.

2.2.3 Hypothese III

Für die kontinuierliche Dosierung von Wirkstoffen sind unter anderem partikuläre Wirkstoffformulierungen auf Basis von Chitosan Gegenstand der aktuellen Forschung. Um eine gleichförmige Wirkstofffreisetzungskinetik *in vitro* zu erreichen werden jedoch meist toxische Vernetzungsreagenzien wie beispielsweise Glutaraldehyd eingesetzt. Diese Vernetzungsreagenzien erzielen zwar ein verlangsamtes Freisetzungsprofil des Wirkstoffs aus den Partikeln, sind allerdings aufgrund der Toxizität nicht geeignet für die spätere Zulassung als mögliches Medikament. Darüber hinaus gibt es bislang nur wenige Studien in der Literatur, die sensitive Biopharmazeutika wie monoklonale Antikörper mit hoher Verkapselungseffizienz und gleichzeitiger Integrität als *Drug Delivery* System verkapseln. Die folgende Hypothese wurde formuliert:

Die Wahl eines geeigneten Chitosan-Derivates ermöglicht die erfolgreiche und strukturell intakte Verkapselung von niedrigmolekularen Molekülen und Antikörperwirkstoffen als *Drug Delivery System* mittels Sprühtrocknung. Daraus ergibt sich eine hohe Verkapselungseffizienz, Lagerstabilität bei Raumtemperatur und ein kontrolliertes Freisetzungsverhalten über mehrere Tage *in vitro*. Die robust gewählten Parameter des Sprühtrocknungsprozesses ermöglichen dabei die Beladung unterschiedlicher Wirkstoffkonzentrationen, ohne die erzielten Partikeleigenschaften zu beeinflussen.

2

Es wurde aus den sechs verschiedenen in **2.2.2 Hypothese II** untersuchten Chitosan-Derivaten für die Untersuchung von **2.2.3 Hypothese III** das Chitosan-Derivat mit 80 % deacetylierten Gruppen und einem Molekulargewicht von 150-300 kDa in Pharmaqualität ausgewählt, da sich dieses gegenüber den übrigen Chitosan-Derivaten hinsichtlich Partikelabgabe, Partikelmorphologie und Verkapselungseffizienz als besser herausstellte. Darin erfolgreich verkapselt wurde das niedrigmolekulare Vitamin Biotin (Vitamin B₇, Vitamin H) und der humanisierte monoklonale IgG1 Antikörper Ocrelizumab. Dabei konnten maximale Partikelbeladungen von ~5 gew. % Biotin, sowie ~5 gew. % und ~15 gew. % Ocrelizumab erzielt werden. Etwa 80 % der eingesetzten Wirkstoffe wurde erfolgreich in die Partikel verkapselt, damit konnte eine mittlere Verkapselungseffizienz von ≥ 80 % erzielt werden. Die strukturelle Integrität und die Lagerstabilität des Antikörpers Ocrelizumab wurde mittels Intrinsischer Fluoreszenzspektroskopie, Zirkulardichroismus, Fourier-Transformations Infrarotspektroskopie und dynamischer Differenzkalorimetrie nach der Verkapselung durch Sprühtrocknung untersucht. Weiterhin wurde die für die Bioaktivität essenzielle Bindungskapazität mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* ermittelt und mit dem Tripeptidgehalt, bestimmt mittels Mikro Bicinchoninsäure Assay, verglichen. Die entwickelten partikulären *Drug Delivery Systeme* mit Biotin und Ocrelizumab wurden zudem mittels Rasterelektronenmikroskopie und statischer Lichtstreuung charakterisiert, sowie deren Restfeuchtigkeit gravimetrisch bestimmt. Die Wirkstofffreisetzungskinetik der partikulären Wirkstoffformulierungen wurde über einen Zeitraum von 15 Tagen *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie wurden in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *International Journal of Pharmaceutics* mit dem Titel „*Spray-dried Chitosan Particles as Controlled Intranasal Drug Delivery Systems with High Encapsulation Efficiency for Small Molecules and Monoclonal Antibodies*“ zur Veröffentlichung eingereicht.

2.2.4 Hypothese IV

Hyaluronsäure Hydrogele werden aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und großen Adhäsionsfähigkeit vielseitig im *Tissue Engineering*, in der Chirurgie und als *Drug Delivery Systeme* eingesetzt. Obwohl die Eigenschaften der Hydrogele stark von dem Molekulargewicht, der Konzentration und den Umgebungsbedingungen beeinflusst werden sind diese grundlegenden Parameter in der Literatur nicht hinreichend dokumentiert und werden, in den verschiedenen genannten Anwendungen oftmals nicht berücksichtigt. Für die Untersuchung der Applikation auf Mukosa werden bislang zum Beispiel Mukosabiopsien tierischen Ursprungs verwendet, welche häufig nicht in der notwendigen Qualität verfügbar sind, ausschließlich frisch die benötigten Eigenschaften aufweisen und eine hohe Variabilität aufweisen können. Für vor allem oberflächenbasierte Fragestellungen, wie z.B. die Mukoadhäsion von pharmazeutischen Formulierungen sind in der Literatur bisher nur sehr wenige effiziente Testsysteme beschrieben. Der Kooperationspartner Dr. Johannes Flamm untersuchte in seiner Dissertation an der

Hochschule Biberach erstmals die Mukoadhäsion eines Hydrogel-Substrats bestehend aus Muzin und Agarose, im Vergleich zu Mukosa-Biopsien vom Schwein, als Mukosa-Analog. Die folgende Hypothese wurde formuliert:

2

Das Hydrogel-Substrat bestehend aus Muzin und Agarose ist nicht nur in Bezug auf vergleichbare Mukoadhäsion ein gut geeignetes Analog für ex vivo olfaktorische Mukosa, sondern stimmt auch hinsichtlich der Oberflächenrauigkeit, der Topografie und den Spreitungseigenschaften mit der natürlichen herauspräparierten Riechschleimhaut des Schweins überein. Aufgrund dieser vergleichbaren Eigenschaften kann das Spreitungsverhalten von Hyaluronsäurelösungen reproduzierbar auf dem Hydrogel-Substrat analysiert werden. Die Polymerkonzentration der Hyaluronsäurelösungen beeinflusst den Kontaktwinkel, das Seitenverhältnis des Tropfens und die Spreitungsgeschwindigkeit signifikant. Die physiologischen Bedingungen der Nase und die Tropfendosierung in *Sessile Drop* Konfiguration begünstigen die Hyaluronsäure-Spreitung. Die Spreitung der Hyaluronsäurelösung auf Glas ist im Vergleich zu dem Muzin-Agarose-basierten Hydrogel-Substrat reduziert, was größere Kontaktwinkel und ein niedrigeres Seitenverhältnis des Tropfens impliziert.

Das auf Objektträger beschichtete Hydrogel-Substrat bestehend aus Muzin und Agarose ist ein geeignetes Analog für olfaktorische Mukosa vom Schwein. Seine gleichbleibende Qualität, einfache Herstellung und kostengünstige Beschaffung machen es zu einem effizienteren Testsystem für pharmazeutische Applikationen auf Mukosa, als die bisher eingesetzten ex vivo Gewebebiopsien. In dieser Dissertation wurde die Herstellung des Muzin-Agarose-basierten Hydrogels, sowie die Präparation der Riechschleimhaut vom Schwein etabliert und durchgeführt. Daran anschließend erfolgte die umfassende, vergleichende Charakterisierung der Oberflächenrauigkeit und Topografie der artifiziellen Mukosa und den porzinen Gewebebiopsien der Riechschleimhaut. Die artifizielle Mukosa wurde dann als effizientes Testsystem für die Untersuchung von Hyaluronsäurelösungen eingesetzt. Für die Bestimmung, der für die Anwendung auf Mukosa relevanten Parameter - Kontaktwinkel, Seitenverhältnis des Tropfens, Spreitungsgeschwindigkeit und Grenzflächenspannung - wurden Kontaktwinkelmessungen von nativen Hyaluronsäurelösungen mit den Polymerkonzentrationen 10 mg mL^{-1} , 20 mg mL^{-1} und 30 mg mL^{-1} auf Glassubstraten und der artifiziellen Mukosa in *Sessile* und *Pendant Drop* Konfiguration durchgeführt. Abschließend wurden Spreitungsversuche mit, durch UV-Licht vernetzbaren, Tyramin-modifizierten Hyaluronsäurelösungen auf dem Hydrogel-Substrat und der ex vivo Mukosa vom Schwein durchgeführt. Die Spreitung der Tropfen wurde bei Laborbedingungen ($21,5 \text{ °C}$ und 50% Luftfeuchtigkeit) und in einer Klimakammer (34 °C und 90% Luftfeuchtigkeit) - die physiologischen Bedingungen der Nase nachbildend - aufgezeichnet. Damit konnte die artifizielle Mukosa validiert werden und die Eignung des UV-vernetzbaaren Hyaluronsäure-Derivates für die intranasale Applikation als mögliche Partikel-stabilisierende Komponente getestet werden. Diese Ergebnisse wurden in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* mit dem Titel „*Hyaluronate spreading validates mucin-agarose analogs as test systems to replace porcine nasal mucosa explants: An experimental and theoretical investigation*“ veröffentlicht.

3. Entwicklung von PLGA-Chitosan-basierten Nano-in-Mikro-Partikeln mittels Sprühtrocknung und Untersuchung deren Applikation auf porzinem olfaktorischen Epithel

Die Ergebnisse und die Diskussion zu den Hypothesen 1 und 2.1 sind in diesem Kapitel als Manuskript mit dem Titel "*Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa*" dargestellt. Dieses Manuskript wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Frontiers in Pharmacology* veröffentlicht. Darüber hinaus wird **2.2.1 Hypothese I** in Kapitel 6.1 und **2.2.2 Hypothese II** in Kapitel 6.2 zusammenfassend diskutiert.

Hinweis: Das Layout des Manuskripts wurde an das Layout dieser Dissertationsschrift angepasst. Die dadurch entstandenen Überarbeitungen haben den Inhalt der Veröffentlichung nicht verändert.

3.0 Erklärung meiner eigenständigen Leistung

3

Ich habe diese Studie zum größten Teil eigenständig konzipiert und ihre wissenschaftliche Methodik ausgearbeitet. Außerdem habe ich den Großteil der praktischen Arbeiten durchgeführt und angeleitet, dies beinhaltet konkret:

- Die Sprühtrocknungsparameter für einen robusten Prozess für das Biopolymer Chitosan wurden von mir etabliert und optimiert.
- Der Sprühtrocknungsversuch für die Nano-in-Mikro-Partikel (NiMPs) wurde von mir konzipiert und die Herstellung der NiMPs angeleitet.
- Die Gewebepreparation aus frischen Schweineschnauzen von der Metzgerei wurde von mir etabliert. Die Präparation der olfaktorischen Mukosa wurde von mir durchgeführt und erfolgte unter meiner Anleitung.
- Die Partikelapplikation der NiMPs sowie der puren PLGA Partikel auf *ex vivo* Gewebe-Biopsien vom Schwein wurde von mir durchgeführt und angeleitet.
- Die Methode zur Herstellung von Kryoschnitten der Gewebeproben sowie deren immunhistologische Färbung wurde von mir etabliert und erfolgte unter meiner Anleitung.
- Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden unter meiner Anleitung durchgeführt und ich habe die Analyse der Gewebeschnitte übernommen.
- Die konfokale *Laser-Scanning-Mikroskopie* wurde von mir durchgeführt.
- Die konfokalen Mikroskopie-Aufnahmen wurden von mir ausgewertet.
- Die Partikelgrößenbestimmung der NiMPs mittels statischer Lichtstreuungsmessung erfolgte unter meiner Anleitung.
- Die Zeta-Potential Messungen der NiMPs wurden von mir angeleitet.

Alle erhobenen Daten wurden von mir ausgewertet. Der weitaus größte Teil dieses *peer-reviewed* Fachartikels wurde von mir geschrieben, konkret habe ich den Original-Entwurf des Manuskripts konzipiert und geschrieben, sowie federführend die Änderungsvorschläge meiner Co-Autoren harmonisiert und eingearbeitet.

3.1 Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa

Lena Marie Spindler^{1,2}, Andreas Feuerhake¹, Simone Ladel^{3,4}, Cemre Günday⁵, Johannes Flamm^{3,4}, Nazende Günday-Türel⁵, Emre Türel⁵, Günter E. M. Tovar^{1,2}, Katharina Schindowski³, Carmen Gruber-Traub^{1*}

¹Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, Innovation Field Functional Surfaces and Materials, Fraunhofer-Gesellschaft, 70569 Stuttgart, Germany

²Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology, University of Stuttgart, 70569 Stuttgart, Germany

³Institute for Applied Biotechnology, Biberach University of Applied Science, Campus Aspach, 88400 Biberach, Germany

⁴University of Ulm, Faculty of Natural Science, 89081 Ulm, Germany

⁵MyBiotech GmbH, 66802 Überherrn, Germany

*Correspondence: Carmen Gruber-Traub, carmen.gruber-traub@fraunhofer.igb.de

Published in the peer-reviewed Journal *Frontiers in Pharmacology*

Publisher: Frontiers

This article was submitted to Translational Pharmacology, a section of the Journal Frontiers in Pharmacology.

This article is part of the Research Topic Intranasal Drug Delivery: Challenges and Opportunities.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.732954>

Volume 12, Article 732954

Received: 29 June 2021

Accepted: 16 August 2021

Published: 1 September 2021

3.1.1 Abstract

Intranasal delivery has gained prominence since 1990, when the olfactory mucosa was recognized as the window to the brain and the central nervous system (CNS); this has enabled the direct site specific targeting of neurological diseases for the first time. Intranasal delivery is a promising route because general limitations, such as the blood-brain barrier (BBB) are circumvented. In the treatment of multiple sclerosis (MS) or Alzheimer's disease, for example, future treatment prospects include specialized particles as delivery vehicles. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles are well known as promising delivery systems, especially in the area of nose-to-brain (N2B) delivery. Chitosan is also broadly known as a functional additive due to its ability to open tight junctions. In this study, we produced PLGA nanoparticles of different sizes and revealed for the first time their size-timedependent uptake mechanism into the *lamina propria* of porcine olfactory mucosa. The intracellular uptake was observed for 80 and 175 nm within only 5 min after application to the epithelium. After 15 min, even 520 nm particles were detected, associated with nuclei. Especially the presence of only 520 nm particles in neuronal fibers is remarkable, implying transcellular and intracellular transport via the olfactory or the trigeminal nerve to the brain and the CNS. Additionally, we developed successfully specialized Nano-in-Micro particles (NiMPs) for the first time via spray drying, consisting of PLGA nanoparticles embedded into chitosan microparticles, characterized by high encapsulation efficiencies up to 51 %, reproducible and uniform size distribution, as well as smooth surface. Application of NiMPs accelerated the uptake compared to purely applied PLGA nanoparticles. NiMPs were spread over the whole transverse section of the olfactory mucosa within 15 min. Faster uptake is attributed to additional paracellular transport, which was examined via tightjunction-opening. Furthermore, a separate chitosan penetration gradient of $\sim 150 \mu\text{m}$ caused by dissociation from PLGA nanoparticles was observed within 15 min in the *lamina propria*, which was demonstrated to be proportional to an immunoreactivity gradient of CD14. Due to the beneficial properties of the utilized chitosan-derivative, regarding molecular weight (150–300 kDa), degree of deacetylation (80 %), and particle size (0.1–10 μm) we concluded that M2-macrophages herein initiated an anti-inflammatory reaction, which seems to already take place within 15min following chitosan particle application. In conclusion, we demonstrated the possibility for PLGA nanoparticles, as well as for chitosan NiMPs, to take all three prominent intranasal delivery pathways to the brain and the CNS; namely transcellular, intracellular via neuronal cells, and paracellular transport.

3.1.2 Introduction

Intranasal delivery became more prominent in the last decades because modern treatments focus on biopharmaceuticals and concurrently reveal opportunities, but also provide challenges. Intranasal delivery is a promising route to overcome general limitations such as the blood-brain barrier (BBB). In the treatment of neurological disorders, for example multiple sclerosis or Alzheimer's disease. Future prospective treatments may also include not only proteins or antibodies, but also specialized particles as delivery vehicles, but the BBB is shielding the central nervous system (CNS) and the brain from the blood stream. Modern therapeutics, such as antibodies and proteins, are therefore banned through size exclusion and surface charge (Stützle, Flamm, Carle, & Schindowski, 2015a; Hartwig Wolburg et al., 1994), which is problematic for intravenous and oral administration in current therapeutic approaches. More than one billion people are currently affected by neurological diseases with a rising tendency (WHO, 2006). Further, the global need displays a great demand for effective treatments of the upper airways,

such as the nasal cavity. Covid-19 infections, as one prominent example, occur mainly from the initial contact to the nasalmucosa and can harm the brain (Layden et al., 2020; Yu et al., 2020). Therefore, to prevent greater damage, effective treatments should also occur along this route. As a consequence, the actual need for innovative intranasal delivery systems is rapidly increasing.

The nasal mucosa, as the first biological barrier in the nose to target the brain and the CNS, consists of respiratory and olfactory mucosa. The respiratory epithelium covers approximately 97 % of the nasal cavity in humans and is necessary for respiration (M. I. Ugwoke et al., 2005). Further, rapid clearance of dust and other foreign substances occurs via the directed movement of millions of cilia (Menache et al., 1997). In contrast to this, the olfactory mucosa is characterized by fewer long cilia, specialized to detect odorants, initializing an electric signal in olfactory sensory neurons to maintain olfaction (M. I. Ugwoke et al., 2005). The olfactory sensory neurons are located between epithelial cells and underlying basal cells, forming neuronal bundles, which protrude through the ethmoid bone and therefore directly connect the olfactory mucosa to the brain and the CNS (Morrison & Costanzo, 1990, 1992). Further, the olfactory mucosa consists of a *lamina propria* mainly built of fibroblastic cells. The olfactory epithelium covers 4–5 cm² in humans. Up to approximately 10 cm² of the olfactory mucosa can be excised from the dorsal part of the concha nasalis dorsalis in pigs (Getty, 1975; Ladel et al., 2018; Alpesh Mistry, 2009). The olfactory epithelium can be distinguished from the respiratory epithelium due to fewer blood capillaries and hence brighter color (Alpesh Mistry, 2009; Stütze et al., 2015a).

3

Polymeric nanoparticles embody convincing advantages such as stability, high loading capacity, and controlled drug release (Bourganis et al., 2018b; Rabiee et al., 2020). Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles especially are widely known as promising delivery vehicles. PLGA, consisting of lactic and glycolic acid, is a biodegradable biopolymer already approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicine Agency (EMA) (Danhier et al., 2012). Its release properties are tunable due to the mass ratio of lactic and glycolic acid. Exemplarily, a mass ratio of 50 % each results in a controlled release over several days. Degradation occurs through hydrolysis and the decomposition products are further metabolized. U. Seju et al. 2011 reported PLGA nanoparticles as promising delivery systems for nose-to-brain delivery because drug release of olanzapine occurs over several days due to slow swelling of PLGA and long-term residence of the resulting gel at the site of action, further 8-fold drug concentrations, compared to the solute form, have been achieved (Seju et al., 2011). Muntimadugu et al. 2016 reported the transport of PLGA nanoparticles with diameters below 200 nm along axons within the nasal mucosa (Muntimadugu et al., 2016).

Neuronal bundles within the olfactory mucosa being directly connected to the olfactory or trigeminal nerve is identified as one transport route to the brain and the CNS (J. M. Anderson et al., 2008; Gänger & Schindowski, 2018; Stütze et al., 2015a). PLGA and chitosan particles up to 250 µm were recently reported to be mainly transported via the olfactory route (Rabiee et al., 2020); however, uptake and distribution examinations of PLGA and chitosan particles in nasal mucosa samples are still rare. Additional nose-to-brain delivery routes are intracellular uptake and further transcytosis, as well as paracellular transport. Other research groups focused on the paracellular route in epithelial cell cultures and mucosal tissues (Fazil et al., 2012; Rassu et al., 2016; Sadeghi et al., 2008; Sonaje et al., 2012). Herein chitosan-based carriers have become one of the most promising and intensively-studied mucosal drug delivery systems (Garcia-Fuentes & Alonso, 2012). This is attributed to their mild and simple preparation technique as well as their capacity to associate biologics and enable transport across mucosal barriers.

Chitosan is a renewable biopolymer, which is gained from the naturally occurring chitin of crustaceans, extracted by deacetylation (Sarmiento & Neves, 2012; Wenling et al., 2005; Youling Yuan, Chesnutt, Haggard, & Bumgardner, 2011b). With at least 50 % N-deacetylated chemical groups, it is referred to as chitosan. The origin, as well as the degree of deacetylation, affects the polymer properties, such as solubility, swelling, and adhesion. The interaction between the positive amino groups of chitosan and several negative groups in the mucosa enables mucoadhesion, which is further dependent on the molecular weight of the chitosan (Henriksen et al., 1996). The length of the chitosan polymer chains and their average molecular weight can be controlled by enzyme-mediated decomposition or acid hydrolysis (Illum, 1998). The chitosan utilized in this study, for example, has 80 % deacetylated residues and is; therefore, mucoadhesive and well soluble in acidic solutions.

Chitosan can open tight junctions (Fazil et al., 2012; Rassu et al., 2016; Sonaje et al., 2012), which are the characteristic intercellular connections present in epithelial cells and endothelial cells. One major component Zonula occludens protein 1 (ZO-1) was initially explored, in 1986, by Stevenson et al. 1986 in epithelial cells (Stevenson, Siliciano, Mooseker, & Goodenough, 1986), it was later also documented in endothelial cells (James Melvin Anderson, Stevenson, Jesaitis, Goodenough, & Mooseker, 1988) and fibroblasts (Howarth, Hughes, & Stevenson, 1992; Itoh, Yonemura, Nagafuchi, Tsukita, & Tsukita, 1991). The above-mentioned research groups described the ability of chitosan to open tight junctions in cell culture, studying the impact of chitosan solutions on cellular interconnections. Further, other research groups have postulated that chitosan nanoparticles open tight junctions and; therewith, affect increased drug levels in the brain and the CNS, but did not directly prove the tight junction opening (Bourganis et al., 2018b; Rabiee et al., 2020; Rassu et al., 2016). Further experimental investigations of tight junction opening are, therefore, still needed to fully clarify intranasal transport routes of chitosan particles and encapsulated active pharmaceutical ingredients.

Together with the application of particles to the nasal mucosa, it is important to consider particle distribution in the olfactory tissue, biocompatibility, biodegradation, and especially immune response. Nevertheless, these aspects are rarely reported in literature for intranasal delivery and more research is needed (Rabiee et al., 2020). The nasal mucosa, as a biological barrier directly exposed to the environment, is a well-known immune active tissue (Bourganis et al., 2018b; Doty, 2015; Ladel et al., 2018; Morrison & Costanzo, 1990; Stütze et al., 2015a). Nasal-associated lymphoid tissue (NALT) includes immune active cells, either present between the epithelial layer and the *lamina propria*, infiltrated from blood vessels, or directly produced inside of lymphoid follicles located in the mucosa itself. Moreover, recent studies have revealed the still incomplete understanding of intranasal pathways and distribution routes of individual compounds, as well as formulation compositions (Keller et al., 2021; Rabiee et al., 2020). Which drug delivery system exactly triggers what specific pathway is mainly unclear up to now.

Consequently, clarification of distribution routes of individual compounds as well as formulation composition, such as the herein investigated prominent particle materials PLGA and chitosan, are needed to develop suitable drug delivery systems in the future. Within this study, we examined size- and time- dependent particle permeation studies on porcine olfactory mucosa. We compared the permeation of pure PLGA nanoparticles of different diameters up to 520 nm to spray-dried nano-in-micro particles (NiMPs) coated with chitosan to identify chitosan-mediated mechanisms important for intranasal delivery. Additionally, we utilized the unique benefits of the controlled release of PLGA nanoparticles over several days combined with the aforementioned abilities of

chitosan. Moreover, we investigated organoid accumulation, such as in glands and neuronal bundles as well as the local initial immune response within the olfactory mucosa.

3.1.3 Materials and Methods

Nanoparticle Preparation

3 Poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA nanoparticles with 80 and 175 nm diameter were prepared by precipitation. 5 mg ml⁻¹ PLGA 50:50 (Evonik, Essen, Germany) and 14 µg ml⁻¹ Lumogen (BTC Europe, Monheim, Germany), or 10 mg ml⁻¹ PLGA 50:50 (Evonik, Essen, Germany) and 28 µg ml⁻¹ Lumogen (BTC Europe, Monheim, Germany) were dissolved in Acetone for 80 and 175 nm particles respectively. This solution was mixed in a 1:2 solvent:nonsolvent ratio with distilled water containing 2.5 mg ml⁻¹ Pluronic F68 (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) by the use of amagnetic stirrer. PLGA nanoparticles with 520 nm diameter were prepared by two-step double emulsification to obtain water-oil-water emulsions (w/o/w). The first emulsification step was performed with Milli-Q water and 5 mg ml⁻¹ PLGA (Evonik, Essen, Germany) solution in Dichloromethane:Ethylacetate (1:3) as solvent. The water to organic phase ratio was 1:10. For labeling 28 µg ml⁻¹ Lumogen F Red (BTC Europe, Monheim, Germany) was added to the formulation dissolved in the organic phase. As a surfactant polyvinyl alcohol (PVA) with a molecular weight of 27 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) was used in the second emulsification. Therefore 1 wt% PVA was dissolved in water at 80 °C. The obtained primary emulsion and PVA containing aqueous phase were emulsified to achieve a w/o/w emulsion at a ratio of 1:10. Both emulsification steps were performed at the highest speed (26,000 rpm) for 1 min by using Silence Crusher M (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany) homogenization device. The finally obtained w/o/w emulsion was stirred moderately overnight to evaporate the organic phase.

Nano-in-Micro Particle Preparation via Spray Drying

A Büchi B-290 mini spray dryer (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) was used to encapsulate the previously prepared PLGA nanoparticles into a chitosan matrix. Chitosan 80/200 (Chitoceuticals, Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Germany), with a degree of deacetylation of 80 % and a molecular weight of 150–300 kDa, was dissolved in 0.5 vol% acetic acid at a concentration of 1 wt%. The chitosan matrix was labeled with fluorescein sodium salt (Honeywell Flunka, New Jersey, United States) at a concentration of 260 µg ml⁻¹ in the spray drying solution. The nanoparticle suspension (6.25 mg ml⁻¹ PLGA in Milli-Q water) was then mixed with the fluorescein labelled chitosan solution at a mass ratio of 1/3 or 2/3 before spray drying. Spray drying was performed with a twofluid nozzle and a nozzle cap diameter of 1.5 mm. The inlet temperature was set to 100 °C at a fluid feed rate of 4.46 ml min⁻¹, gas feed rate of 12.94 g min⁻¹, and an aspiration rate of 100 % equating with ~700 g min⁻¹. The system was equilibrated before use and washed after spray drying with Milli-Q water.

Scanning Electron Microscopy

For Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis, PLGA nanoparticle suspension (6.25 mg ml⁻¹ PLGA in Milli-Q water) was vortexed and 10 µL of the suspension was pipetted onto a clean silicon wafer, covered with a petri dish, and dried overnight at room temperature. Nano-in-micro particle powders were fixed with conductive electron microscopy tape directly onto a sample holder. A thin layer of platinum was sputtered on all samples before measurement. Measurements were performed at different magnifications with a Leo Gemini 1530 VP (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Germany) microscope at 5.00 kV using the InLens detector and SE2 for signal B.

Laser Scanning Microscopy

For Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) the nanoparticle suspension (6.25 mg ml⁻¹ PLGA in Milli-Q water) was vortexed and 10 µL were applied to a cover glass, which was then covered with a petri dish and dried at room temperature protected from light. Completely dried samples were measured upside down with a 63x water immersion objective. Nano-in-micro particles were deposited rarely with a sieve and a spatula onto a cover glass, covered with an additional cover glass and sealed gently with tape, to avoid contamination during analysis. Powder samples were measured immediately after preparation with the 63x water immersion objective. Most tissue samples have been measured with a 20x objective. All measurements have been performed with a confocal LSM 710 (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Germany). The utilized lasers and the corresponding emission filters for CLSM imaging are displayed in Supplementary Table S1. For three-dimensional information, z-stack measurements with a pitch of 0.5 µm for 63x recordings and 1 µm for 20x images were recorded and stitched together in a maximum intensity projection. For picture analysis and post-processing, ZEN software (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Germany) was used.

Particle Size Distribution

PLGA nanoparticles were measured as a suspension in Milli-Q water via dynamic light scattering using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom). Mean particle size and Polydispersity Index (PI), referred to as squared difference between standard deviation and average decay rate, were reported (ISO, 2017). The average decay rate is defined by diffusion coefficient and scattering vector as written in ISO standard 22412:2017. Since the Stokes-Einstein hydrodynamic diameter is inversely proportional to the decay rate, the average diameter is equal to the average decay rate. Nano-in-micro particles were measured via static light scattering at 1,500 rpm stirring velocity performed with a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) using its µP 2000 measurement cell. The spray-dried powder sample was first dispersed in 2-propanol via ultrasonic treatment for 3 s in an ultrasonic bath. Additional measurements at 1,50 rpm were performed after 1 min ultrasonic treatment in the measurement cell. Measuring chitosan particles is reported with the organic solvent ethanol (Kašpar et al., 2013; Tokárová et al., 2013), but we detected swelling of chitosan particles within several minutes in ethanol falsifying the particle size measurement as a result. Therefore, we only used 2-propanol as a solvent for static light scattering measurements. We calculated the mean particle diameter from the volume distribution output. Additionally, Scanning Electron Microscopy (SEM) images were analyzed with ImageJ software (Wayne Rasband, 1997). Particle diameters were extracted,

plotted, and fitted with a Gaussian fit in Origin Pro 2019 (Origin Lab, 1992). Further, the Polydispersity Index (Pdl) also for nano-in-micro particles (NiMPs) was calculated with Eq. 1 using the mean particle diameter d_m and the standard deviation of the particle size σ (Clayton, Salameh, Wereley, & Kinzer-Ursem, 2016), which is not automatically reported within the Mastersizer software (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom).

$$Pdl = \left(\frac{\sigma}{d_m} \right)^2 \quad (1)$$

Zeta Potential

3 Zeta potential was examined for PLGA nanoparticles and nano-in-micro particles (NiMPs) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) utilizing a folded capillary cell DTS 1070 (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom). The instrument was calibrated routinely with a -50 mV latex standard. PLGA nanoparticles were suspended in Milli-Q water, as well as in 2-propanol as comparison. Due to initially occurring agglomeration and swelling of chitosan NiMPs in Milli-Q water, NiMPs were suspended and measured only in 2-propanol via ultrasonic treatment of 30 s in an ultrasonic bath. For measurements in aqueous media Smoluchowski approximation and Huckel approximation for non-aqueous measurements in 2-propanol was used. The measurements were repeated five times at neutral pH and 25 °C after 600 s equilibration time.

Encapsulation Efficiency

The encapsulation efficiency of nano-in-micro particles (NiMPs) was examined via image analysis from Confocal Scanning Electron Microscopy images using the software ImageJ (Wayne Rasband, 1997) and two different calculations. First, the average number of PLGA nanoparticles colored in red incorporated in green stained chitosan microparticles was determined using the assumption of particles equal in size with the mean diameters extracted from light scattering measurements for nanoparticles and microparticles, respectively ($n = 5$). In the second calculation, the relative encapsulation efficiency was observed relating the total crosssection area of PLGA nanoparticles (red) to the cross-section area of nanoparticles solely outside of chitosan microparticles ($n = 5$). Consequently, the difference between total cross-section area of nanoparticles and cross-section area of nanoparticles outside of microparticles revealed the percentage of successfully encapsulated nanoparticles through spray drying.

Tissue Preparation

Pig snouts were purchased from a local slaughterhouse. Mucosa specimens were excised from the dorsal part of the concha nasalis dorsalis (Getty, 1975; Alpesh Mistry, 2009). The olfactory mucosa was gently removed from the underlying cartilage with the help of forceps (Ladel et al., 2018). Excised specimens were further dissected into 1–2 cm² samples. *Post mortem* delay of the mucosa was below 2 h.

Ex vivo Permeation Studies

For particle application, prepared mucosa specimens were put into a Petri dish. ~12 mg of NiMPs were administered to the olfactory mucosa, which due to the chitosan coating is equivalent to ~4 mg of PLGA particles for NiMPs with low chitosan ratio and ~2 mg for NiMPs with high chitosan content, examined from the actual encapsulation efficiency evaluated via image analysis from Confocal Laser Scanning Microscopy images. The mucosa was then placed into a modified side-by-side cell consisting of two micro reaction tubes (1.5 ml) between clamping tongs (Figure 3A), resulting with the inner radius 5 mm in a permeation area of 78.5 mm². The bottom microtube was filled with 260 µL of phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 before placing the mucosa with its basolateral side on top of it. The system was sealed to avoid leakage by closing the cell. Finally, the cell was put upside down into an incubator at 35 °C and 90 % humidity to simulate the natural conditions within the nasal cavity for 5 min to 2 h. As a comparison, 20 µL of the PLGA nanoparticle suspension was applied similarly; however, due to the production procedure ~0.2 mg particles were applied in this case, which does hence only allow a quantitative comparison among similar applied samples. Due to the sensitivity of PLGA nanoparticles they could not be dried and applied as a powder; however, the NiMPs could not be suspended in aqueous media due to the intense swelling of chitosan. Consequently, PLGA nanoparticles and NiMPs were treated differently in the experiments, which is considered in the comparison of the results. Control samples were taken respectively at time point 0 min directly after application. After the respective incubation times, the mucosa specimens were immediately fixed in 4 wt% paraformaldehyde for at least 2 h and stored in 30 wt% sucrose at 4 °C until sectioning. The tissue samples were cut in 20 µm slices at the site of applied particles in a cryostat at -25°C (HM560, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) and mounted on Superfrost®Plus Micro slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States).

3

Immunohistochemistry and Histological Staining

The structural integrity of the epithelial layer was confirmed by hematoxylin-eosin (HE) staining. HE-stained slides were dehydrated in ethanol and 2-propanol. Finally, they were embedded with Eukitt® Quick-hardening mounting medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) and covered with a coverslip. For observation via confocal laser scanning microscopy either solely cell nuclei were stained with DAPI (4',6- Diamidin-2-phenylindol 2HCl; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) or DAPI staining was performed after the immunohistochemistry staining procedure. Tissue explants viability was verified with control samples live-stained after incubation up to 5 h with Hoechst 33342 (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, United States). To visualize the initial immune reaction, CD14⁺ cells were stained via CD14 primary antibody (#NB100-77758, Novus Biologicals, Littleton, United States) and goat anti-mouse secondary IgG (H+L) Alexa Fluor® 647 (#A-21235, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States). Neurofilament heavy protein (200 kDa) NFH was marked to visualize co-localization with neuronal bundles and therefore stained with NF-H primary antibody (#PA1-10002, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States) and goat anti-chicken secondary IgY (H+L) FITC (#A16055, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States). Cell-cell junction protein 1 (Zonula occludens protein 1; ZO-1) was detected via ZO-1 primary antibody (#NBP1-85047, Novus Biologicals, Littleton, United States) and secondary goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 647 (#ab150083, Abcam, Cambridge, United Kingdom). The fluorescently stained samples were fixated with Fluoroshield™ mounting medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) and covered with a coverslip.

3.1.4 Results

Nanoparticles

Particle Size Distribution

The particle size of the poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA nanoparticles manufactured with precipitation was adjusted by the variation of PLGA concentration in the solvent phase. 5 mg mL⁻¹ PLGA starting concentration resulted in an average particle size of 81.6 nm with a Polydispersity index (PI) of 0.071, whereas characterization of the particles manufactured with 10 mg mL⁻¹ PLGA starting concentration revealed a mean particle size of 174.4 nm and a PI value of 0.037. Hence, both samples produced via precipitation resulted in monodisperse size distributions below the critical value of 0.1 (Hughes, Budd, Tiede, & Lewis, 2015). PLGA nanoparticles produced via the double emulsion method resulted in a medium size of 519.7 nm with a narrow size distribution characterized by a PI of 0.28.

3

Zeta Potential

The Zeta potential was characteristically negative for all prepared PLGA nanoparticles (Ravi Kumar, Bakowsky, & Lehr, 2004; Vila, Sanchez, Tobío, Calvo, & Alonso, 2002). However, 2-propanol is less polar than water and has a lower dielectric constant of 18.0 As Vm⁻¹ at 25°C compared to 78.5 As Vm⁻¹ of water (Akerlof, 1932), the resulting zeta potential in both investigated solvents did not differ significantly.

Morphology

PLGA nanoparticle morphology was examined using Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). As presented in Figure 1A, nanoparticles prepared by the double emulsion technique are spherical and show a smooth surface. Further, their successful labeling with Lumogen F Red was confirmed with their intense and homogenous color (Figure 1B).

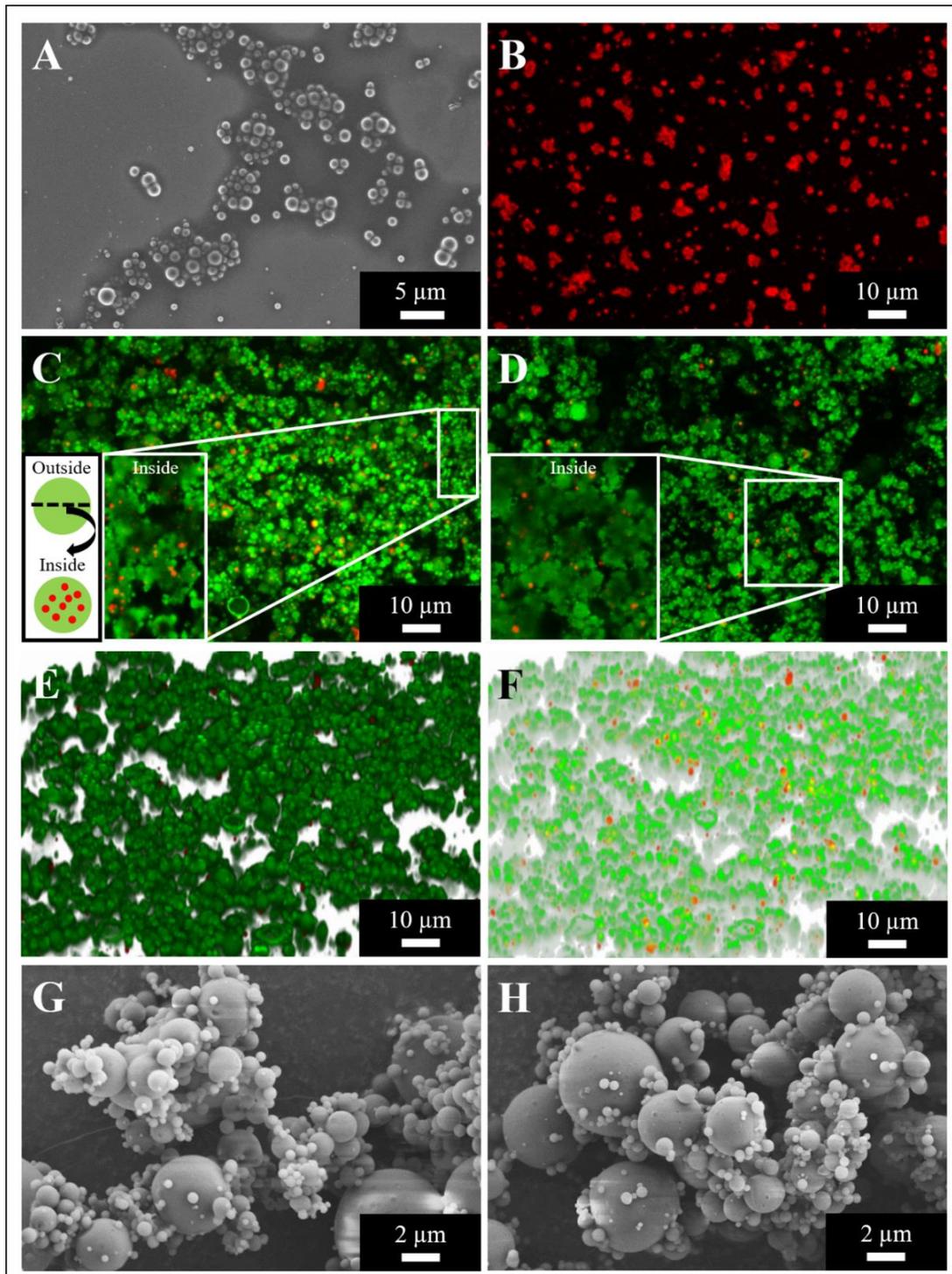


Figure 1: PLGA nanoparticles prepared by double emulsion technique (**A, B**) and spray dried nano-in-micro particles (NiMPs) prepared by spray drying at two different polymer ratios consisting of PLGA nanoparticles (520 nm) and chitosan as matrix material (**C-H**). (**A**) Scanning Electron Microscopy (SEM) image, magnification 5 kX. (**B**) Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) picture, mag. 630 X, maximum intensity projection (MIP) stitched together from a z-stack, particles labeled with Lumogen F Red. (**C**) CLSM image of NiMPs 1/3 chitosan:2/3 PLGA, mag. 630 X, MIP; Enlarged cross-section of particles and particle schematic; Chitosan (green) and PLGA nanoparticles (red). (**D**) CLSM image of NiMPs 2/3 chitosan:1/3 PLGA, mag. 630 X, MIP. (**E**) 3D projection of CLSM images (green: chitosan; red: PLGA) stitched together from a z-stack, mag. 630 X, external view. (**F**) Transparent 3D projection of CLSM images (green: chitosan; red: PLGA) stitched together from a z-stack, mag. 630 X, internal view. (**G**) SEM image of NiMPs 1/3 chitosan:2/3 PLGA, mag. 10 kX. (**H**) SEM picture of NiMPs 2/3 chitosan:1/3 PLGA, mag. 10 kX. 3D projections (external, transparent) of CLSM images from 2/3 chitosan:1/3 PLGA NiMPs displayed in Supplementary Figure S1.

Nano-in-Micro Particles

Particle Size Distribution

3 Herein prepared nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm) coated via spray-drying with chitosan varying the chitosan:PLGA polymer ratio. First, NiMPs with 1/3 chitosan:2/3 PLGA were prepared and analyzed via static light scattering (SLS), while stirring at 1,500 rpm in the μ P 2000 measurement cell. The resulting Gaussian shaped volume size distribution is presented in Figure 2A. Compared to the NiMPs with 2/3 chitosan:1/3 PLGA, the particle size increased with a higher chitosan ratio and the histogram is; therefore, shifted to the right towards bigger particle sizes. Further, we calculated the $d(0.5)$ value for both types of NiMPs representing 50 % of the particle populations respectively, as well as the mean particle size and thereof the Polydispersity Index (Pdl) to characterize the homogeneity of the particle population. These values are presented in Table 1. NiMPs with a higher chitosan ratio resulted in a $d(0.5)$ particle size of 8.65 μ m (Table 1) compared to the slightly smaller particles with less chitosan characterized by a $d(0.5)$ diameter of 8.10 μ m. Both spray-dried samples resulted in a unidisperse particle size distribution; however, the population of NiMPs with less chitosan is more homogenous than the sample with a higher chitosan ratio, characterized by a smaller Pdl (Table 1).

Second, the samples were treated with ultrasound for 1 min in the μ P 2000 measurement cell and afterwards measured again at 1,500 rpm. The second measurement cycle revealed a bidisperse size distribution for both sample types displayed in Figure 2B. The volume fraction is divided equally in a nanoparticle and a microparticle fraction, due to the split up of agglomerates. The nanoparticle fraction of NiMPs with low chitosan ratio (1/3 chitosan: 2/3 PLGA) is characterized by a mean particle diameter of 0.18 μ m compared to 0.21 μ m of NiMPs with high chitosan ratio (2/3 chitosan: 1/3 PLGA) (Table 1). Due to the previously described mean size of 519.7 nm of PLGA nanoparticles, the nanoparticle fractions of both NiMP samples should mainly consist of pure chitosan. Further, the nanoparticle fraction resulted in slightly bigger particles due to the higher chitosan ratio and the size distribution of this fraction is broader (Table 1). In contrast, the microparticle fraction of NiMPs with less chitosan is characterized by a mean particle diameter of 6.61 μ m, whereas NiMPs consisting of more chitosan have a smaller mean diameter of 5.75 μ m. Additionally, the microparticle fraction of NiMPs with high chitosan ratio is narrower than the microparticle fraction of NiMPs with low chitosan ratio (Table 1). These findings imply that additional chitosan in the spray drying process is mainly forming pure chitosan nanoparticles, not NiMPs. Therefore, it is important to compare the encapsulation efficiencies and understand, whether a higher matrix ratio is beneficial to encapsulate nanoparticles via spray drying, which is explained below.

Additionally, we measured the size distribution of NiMPs in representative Scanning Electron Microscopy (SEM) images using ImageJ software and plotted their resulting diameters against frequency. The following size distributions are presented in Figure 2C together with a non-linear Gaussian fit performed in OriginPro software. The majority of 1/3 chitosan:2/3 PLGA-NiMPs has a diameter of 0.45 μ m. NiMPs with high chitosan ratio (2/3 chitosan:1/3 PLGA) resulted in a slightly greater mean diameter of 0.52 μ m (Table 1), which confirms that more chitosan available during spray-drying as matrix material results mainly in bigger nanoparticles. Further, the displayed size distribution is monodisperse; however, very broad. This additional analysis shows, NiMPs (2/3 chitosan:1/3 PLGA) consisting of more chitosan result in a broader size distribution than NiMPs produced with less chitosan (1/3 chitosan:2/3 PLGA), which is attributed to the smaller sample size of the image analysis. In the size distribution extracted from SEM images further only few

microparticles occur. In contrast to this, the size distributions examined via static light scattering represent the samples volume fraction. In volumetric size distributions, few bigger particles represent a bigger fraction than in frequency displaying distributions, where the volume of the measured particles within the sample is not considered.

Table 1: Characteristic parameters of nano-in-micro particles (NiMPs) obtained from static light scattering measurements. $d(0.5)$ value represents the diameter of 50 % of the particle population. The Polydispersity index (Pdl) characterizes the homogeneity of the particle population; 1 min ultrasonic treatment (US).

Method	SLS	SLS	SLS	SEM
Condition	Agglomerated suspension in 2-propanol	Suspension in 2-propanol	Suspension in 2-propanol	Dry
Treatment	1,500 rpm	After US (First Peak)	After US (Second Peak)	None
d [μm] 1/3 chitosan: 2/3 PLGA	8.10	0.18	6.61	0.45
d [μm] 2/3 chitosan: 1/3 PLGA	8.65	0.21	5.75	0.56
Pdl 1/3 chitosan: 2/3 PLGA	0.99	0.70	1.89	0.6
Pdl 2/3 chitosan: 1/3 PLGA	1.17	0.87	1.84	1.3
Distribution	Monodisperse	Bidisperse	Bidisperse	Monodisperse

Zeta Potential

The examination of chitosan NiMPs in contrast to PLGA nanoparticles revealed an overall positive zeta potential, which is characteristically for chitosan (Ravi Kumar et al., 2004; Vila et al., 2002) and proves the successful encapsulation of PLGA nanoparticles into the chitosan matrix by spray drying.

Encapsulation Efficiency

Comparing both spray-dried NiMP samples with different polymer ratios, in NiMPs with less chitosan and higher PLGA ratio (1/3 chitosan:2/3 PLGA) generally about seven 519.7 nm PLGA nanoparticles (NP) per single chitosan 6.61 μm microparticle (MP) have been encapsulated (Figure 1C). Red nanoparticles are distributed inside of green chitosan microparticles (Figure 1F). Solely, a few nanoparticles remained on the surface (Figure 1E) and hence most nanoparticles were encapsulated successfully. Due to the higher chitosan ratio NiMPs with 2/3 chitosan:1/3 PLGA showed an average of only two 519.7 nm PLGA NP in one chitosan 5.75 μm MP (Figure 1D). Both samples further resulted in similar encapsulation efficiencies; however, NiMPs with a lower chitosan ratio were produced with proportionally less matrix material to cover PLGA nanoparticles. NiMPs consisting of 1/3 chitosan:2/3 PLGA resulted in an encapsulation efficiency of $39 \pm 19 \%$ (Figure 1C). NiMPs with a higher chitosan ratio (2/3 chitosan:1/3 PLGA) yielded in a higher encapsulation efficiency of $51 \pm 16 \%$ (Figure 1D), however this is not significant. Consequently,

PLGA nanoparticles were successfully encapsulated into chitosan via spray drying, but a 1/3 higher matrix composition did not significantly improve the encapsulation efficiency. Proportionally, even more nanoparticles were encapsulated with a lower chitosan amount.

Morphology

NiMPs were further investigated via Scanning Electron Microscopy (SEM). Exemplary pictures, at a magnification of 10 kX, are displayed in Figure 1E (1/3 chitosan:2/3 PLGA) and Figure 1F (2/3 chitosan: 1/3 PLGA). The previously-described effect, causing slightly bigger particles due to the increase in chitosan ratio during spray drying, can also be supported by the SEM analysis. Samples prepared with a ratio of 1/3 chitosan:2/3 PLGA show more particles below one micron (Figure 1G), which is additionally proved with the size distribution in Figure 2C. In contrast, spray-dried NiMPs with the opposite polymer ratio (2/3 chitosan:1/3 PLGA) are slightly bigger (Figure 1H, Figure 2C). Further, NiMPs are, independent of their polymer ratio, spherically shaped and show a smooth surface, which can be attributed to the spray drying inlet temperature of 100 °C and a resulting outlet temperature of 45 ± 1 °C, which allows continuous evaporation of the water phase and results in homogenous particles with dense pores and hence smooth appearing surface (Paudel et al., 2013).

3

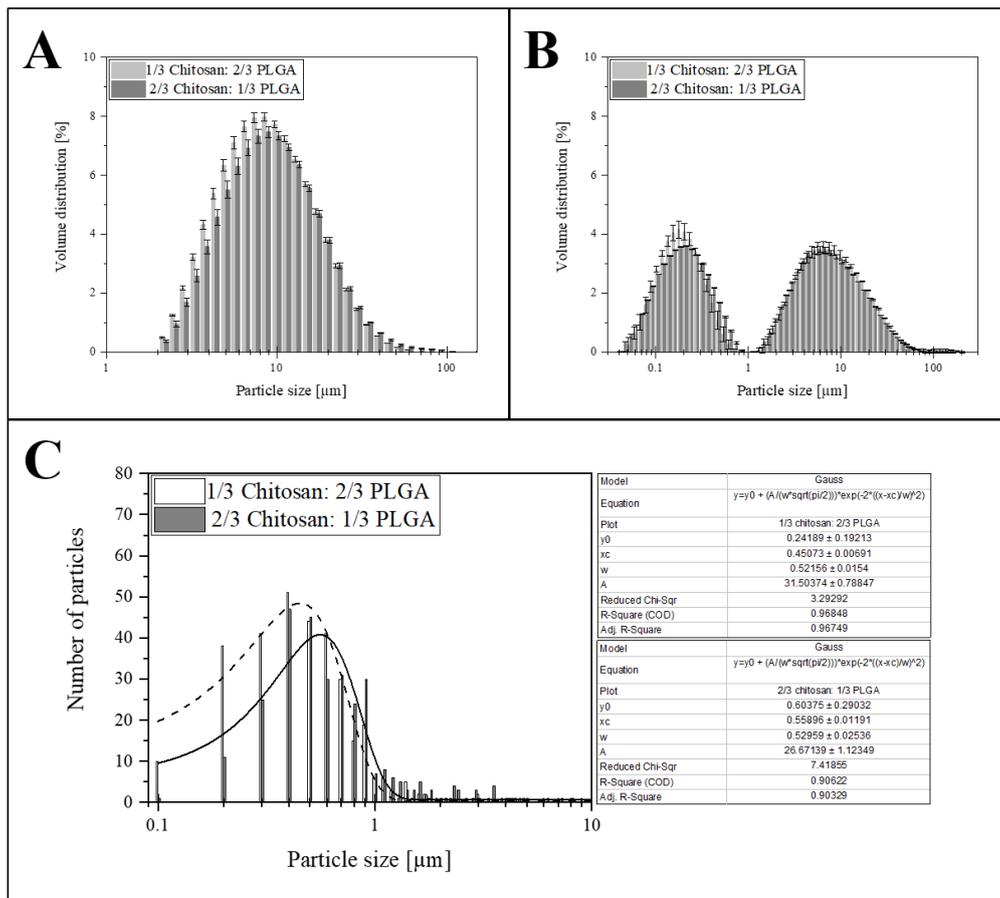


Figure 2: (A) Volume size distribution of nano-in-micro particles (NiMPs) produced via spray drying. Particles consist of PLGA nanoparticles (520 nm) coated with chitosan at a polymer ratio of either 1/3:2/3 or 2/3:1/3; (n = 5). (B) Volume size distribution of NiMPs after 1 min ultrasonic treatment in the measurement cell; (n = 5). (C) Particle number distribution (n = 307 particles) extracted from Scanning Electron Microscopy (SEM) images and fitted with a Gaussian fit; Dashed line (1/3 chitosan:2/3 PLGA) and full line (2/3 chitosan:1/3 PLGA).

Mucosal Uptake of PLGA Nanoparticles

In this study, we examined the uptake of PLGA nanoparticles with diameters of 80, 175, and 520 nm into olfactory mucosa tissue. Therefore, nanoparticle suspensions have been applied onto the apical site of explanted porcine mucosa specimens and incubated in specialized side-by-side cells at physiological conditions of 35 °C and 90 % humidity (Figure 3A) mimicking the nasal cavity. Quality control of olfactory mucosa biopsy and further processing steps including cutting, particle application, fixation, and cryo-sectioning occurred via hematoxylin-eosin (HE) staining. Only specimens with an intact epithelial layer were analyzed; those with a damaged epithelial layer were excluded from the study because a compromised epithelial layer could enhance particulate uptake. Further, sample thickness of ex vivo specimens was $1,273 \pm 356 \mu\text{m}$, whereas individual samples were not significantly different in thickness (Shapiro-Wilk normality test, One-Way-ANOVA with Levene's variance test and Bonferroni posthoc test; $p < 0.05$ respectively). Detailed thickness data and statistical analysis are presented in Supplementary Figure S2.

PLGA nanoparticles, with a diameter of 80 and 175 nm have been taken up immediately into the *lamina propria* of the olfactory mucosa within 5 min after application. Particles are spread over the *lamina propria*. 80 nm nanoparticles, co-localized with cell nuclei, have been observed in lymphoid follicles (Figure 3B) and the epithelial cell layer, which implies spontaneous cellular uptake of these nanoparticles. 175 nm particles have additionally been documented more prominent in glands than in lymphoid follicles (Figure 3C). In general, it is reported that cells can take up nanoparticles, with a diameter below 200 nm, intracellularly after intranasal administration (Bourganis et al., 2018b; Alpesh Mistry, 2009; Rabiee et al., 2020). Muntimadugu et al. 2016 has further already reported the transport of PLGA nanoparticles, with diameters below 200 nm, along axons within the nasal mucosa (Muntimadugu et al., 2016). This was also proven within our experiments for porcine olfactory mucosa. We further investigated PLGA nanoparticles with a 520 nm diameter. In contrast to intranasal application, Win and Feng et al. 2005 proved the intracellular uptake of 500 nm polymer particles into Caco-2 epithelial cells (Win & Feng, 2005). In our study, 10 min after application to the olfactory mucosa explants, cells also seemed able to take up 520 nm nanoparticles; these were found distributed in the epithelial layer and mainly in the outer 150 μm of the *lamina propria* (Figure 3D). Overall, the uptake of the larger-size particles occurred in slower motion compared to 80 and 175 nm particles. Further, 520 nm particles have not, in contrast to smaller nanoparticles, been observed primarily near nuclei within the first 15 min but between, hence intercellularly. Within 15 min, further 520 nm particles have been detected only sparsely in glands, not in deeper layers of the *lamina propria*, nor in the collagen tissue, which connects the porcine mucosa with the nasal septum *in vivo*. An overview of size- and time-dependent PLGA nanoparticle uptake and distribution is presented in Table 2: In summary, the uptake of PLGA nanoparticles, displayed in Table 2, is fast, within only 5 min after application to the apical side of olfactory mucosa, of PLGA nanoparticles up to a diameter of 520 nm, into the epithelial cell layer. Further size dependent penetration occurs within 10 min to the underlying *lamina propria*. Herein, 80 nm particles penetrate to a high extent, whereas similar amounts of 175 nm particles were taken up. 520 nm, in contrast, penetrated to a very low extent and, hence, were also slower. Further, many 80 nm particles were detected within 5 min, especially intracellularly within lymphoid follicles, which can imply an interaction with immune cells. In contrast, 175 nm particles were only rarely found associated with lymphoid follicles and 520 nm particles were, even within 15 min, not detected co-localized with lymphoid follicles. This indicates a size dependent relation in transport. The initial immune reaction was investigated

within this study and is described below. Supplementary, 175 nm particles have been detected after 5 min in glands, 520 nm particles only after 15 min, and 80 nm particles were not detected at all. This again implies a size dependent differentiation in transport routes, but does not impact transport towards the brain or the central nervous system (CNS). In contrast, gland associated nanoparticles might stuck in the mucosa and are, therefore, less effective as drug delivery system. Additionally, only 520 nm nanoparticles have been detected in neuronal bundles, which could enable further transport to the brain or the CNS. Consequently, especially 520 nm particles seem to have the ability for transcellular neuronal transport, in contrast, 80 and 175 nm do not. Those seem to be transported only transcellular across other cell types. Finally, none of the investigated pure PLGA nanoparticle samples were detected within the basolateral collagen tissue and, thereof, none of these penetrated the whole transverse section of the tissue samples within 15 min following application.

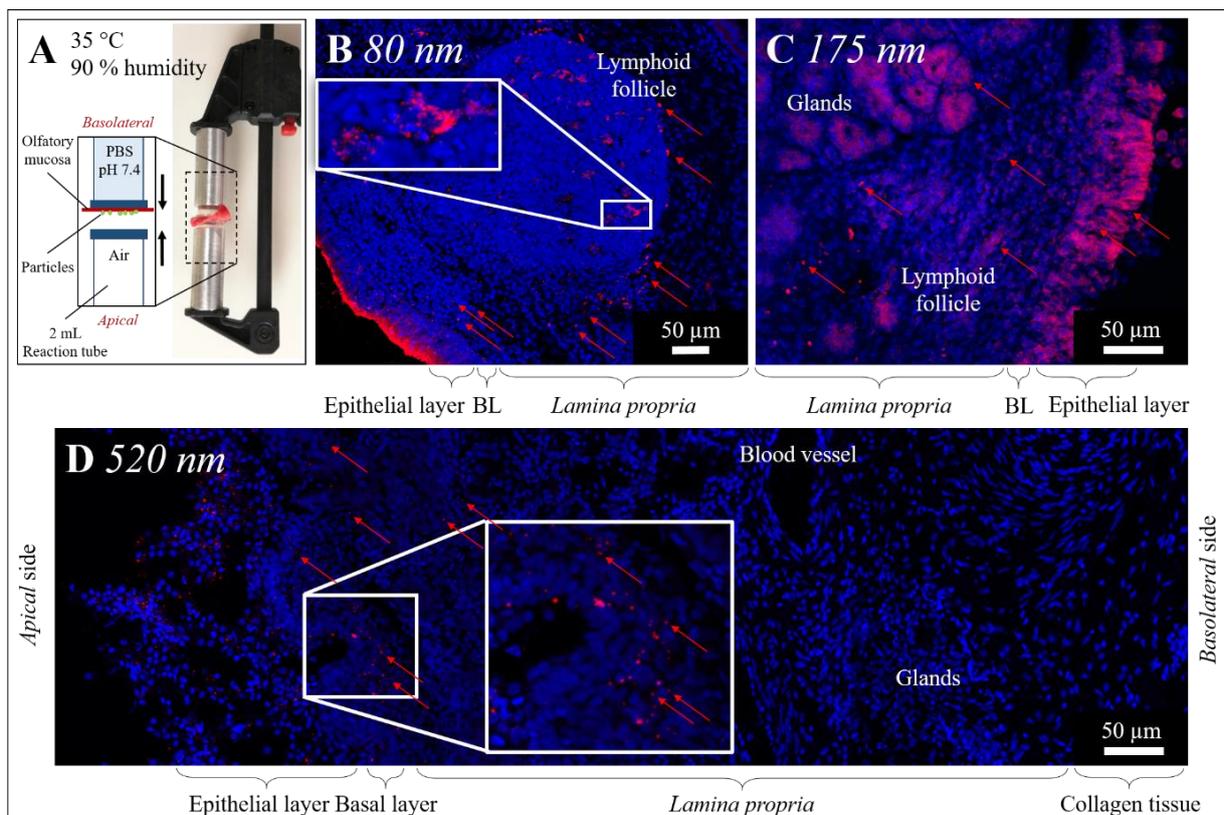


Figure 3: (A) Experimental setting of ex vivo particle permeation experiments, porcine olfactory mucosa incubated in specialized side-by-side cell at physiological conditions of the nasal cavity (35 °C, 90 % humidity). (B–D) Uptake of PLGA nanoparticles (red) 5 min (B, C) and 10 min (D) after application to the apical side of the olfactory mucosa. Maximum intensity projection (MIP) of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack. Cell nuclei stained with DAPI (blue). PLGA nanoparticles colored with $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ (80 nm), $28 \mu\text{g mL}^{-1}$ (175 nm), or $28 \mu\text{g mL}^{-1}$ (520 nm) Lumogen. Red arrows mark single particles. Area of particle accumulation enlarged.

Table 2: Size- and time-dependent uptake, as well as co-localization with sub structures in the olfactory mucosa, of PLGA nanoparticles (suspension) and spray dried nano-in-micro particles (NiMPs) (powder) consisting of 520 nm PLGA particles embedded in chitosan. 5 min, 10 min, or 15 min after particle application to the apical side and incubation at physiological conditions of the nasal cavity (35 °C, 90 % humidity). (+) rarely, (++) intermediately, (+++) often particles observed, or (-) no particles observed. Examined samples: PLGA nanoparticles (n = 3), respectively; NiMPs (n6). Quantitative comparison only applicable for PLGA nanoparticles among each other and NiMPs separately due to different applied particle amounts (suspension versus powder).

5 min after application	Epithelium (apical)	Lamina propria	Lymphoid follicle	Gland	Neuronal bundle	Collagen tissue (basolateral)
10 min after application						
15 min after application						
PLGA 80 nm	+++	++	+++	-	-	-
PLGA 175 nm	+++	++	+	++	-	-
PLGA 520 nm	+++	+	-	+	+	-
NiMP (PLGA+chitosan)	+++	+	+++	++	+	++

3

Nano-in-Micro Particle Uptake

PLGA nanoparticles, with a 520 nm diameter, were embedded in a second production step via spray drying in chitosan. The previously-described variation of polymer ratio PLGA:chitosan showed no impact on olfactory uptake. Therefore, the following results are true for all, herein produced and described, nano-in-micro particles (NiMPs). ~12 mg NiMPs were applied onto porcine olfactory mucosa specimens and incubated similarly to pure nanoparticles, in a side-by-side cell at 35 °C and 90 % humidity, mimicking the nasal cavity (Figure 3A). Due to the different application of PLGA nanoparticle suspensions as powder here, only the occurrence of NiMPs and chitosan-coated PLGA particles is examined, but not the quantitative particle amount. This is because more PLGA particles have been applied, respectively, on powder samples. The applied particle patch (red) covered the epithelial layer completely (Figure 4). In contrast to the above described, the distribution of purely applied 520 nm PLGA particles in the outer ~150 µm of the *lamina propria*, chitosan-coated NiMPs have been detected 15 min after application spread deep within the *lamina propria* even distributed over the entire width of the olfactory mucosa sample reaching the collagen tissue at the basolateral side (Supplementary Figure S3). All findings of NiMP-uptake within the initial 15 min after application to the olfactory mucosa are summarized and displayed in Table 2. Due to the complete coverage of the epithelial layer with the applied particle layer, initially within 5 min, many NiMPs were found associated with the epithelium. Fewer NiMPs were found in the *lamina propria*; however, the penetration occurred faster than for pure 520 nm PLGA particles without chitosan coating. Within 10 min, NiMPs were mainly detected associated with lymphoid follicles (Supplementary Figure S4). After 15 min, NiMPs were finally detected in glands and neuronal bundles to a slightly lower extent. Finally, within 15 min, NiMPs were detected spread over the whole transverse section of the mucosal tissue sample, even distributed at the basolateral side in the collagen tissue. Consequently, the chitosan-coating herein accelerated the uptake of NiMPs, compared to the identical purely-applied PLGA particles, with 520 nm in the initial 15 min after application. However, to analyze the quantitative amount further

investigations are needed, due to the different particle amounts applied, caused by the sampling procedure.

30 min following particle application, surface located bowman glands have been detected, where the gland-overlying particle patch was cleared (Figure 4A and Supplementary Figure S6). Therefore, epithelial glands seem to be able to either take up particles within 30 min, resulting in enhanced uptake compared to the surrounding epithelial layer, or transport overlying particles away due to the ongoing mucus production mechanism (T.J. Aspden, Adler, Davis, Skaugrud, & Ilium, 1995; Trudi J. Aspden et al., 1997; Sadé, Eliezer, Silberberg, & Nevo, 1970). For this reason, we additionally stained control samples, after 5 h incubation, with Hoechst 33342 dye, which solely stains intact cell nuclei to prove cell viability within and after the experiments. This live-stain experiment proved that cells of the excised mucosa samples were alive throughout the whole duration of the experiments (data not shown). As a result, it could be assumed that the monitored glands were also able to produce mucus during the experiment and, therefore, possibly transported overlying particles away.

3

Samples examined 2 h after particle application showed similar results to the above described results 15 min following application. NiMPs were observed over the whole transverse section of the porcine olfactory mucosa, including collagen tissue layers at the basolateral side of the sample (Supplementary Figure S5). Furthermore, 520 nm particles were detected in mucus-producing glands within the tissue (Figure 4B), and in the outer zone of lymphoid follicles (Figures 4B–E). Therefore, NiMPs also seem to be transported to lymphoid follicles, as similar behavior was found after 5 min for nanoparticles with 80 nm diameter. Due to the green labeling of chitosan in NiMPs, we were able to additionally prove the colocalization of chitosan (Figures 4C, D) with PLGA nanoparticles (red) (Figures 4C, E) in the outer zone of lymphoid follicles. Consequently, not only the pure PLGA particles were transported there but also chitosan-coated NiMPs. Co-localization with glands (Figure 4B) could also be attributed to the mucoadhesive properties of chitosan (Henriksen et al., 1996). When passing glands, mucus in these glands seems to hold up chitosan-coated nanoparticles due to mucoadhesion.

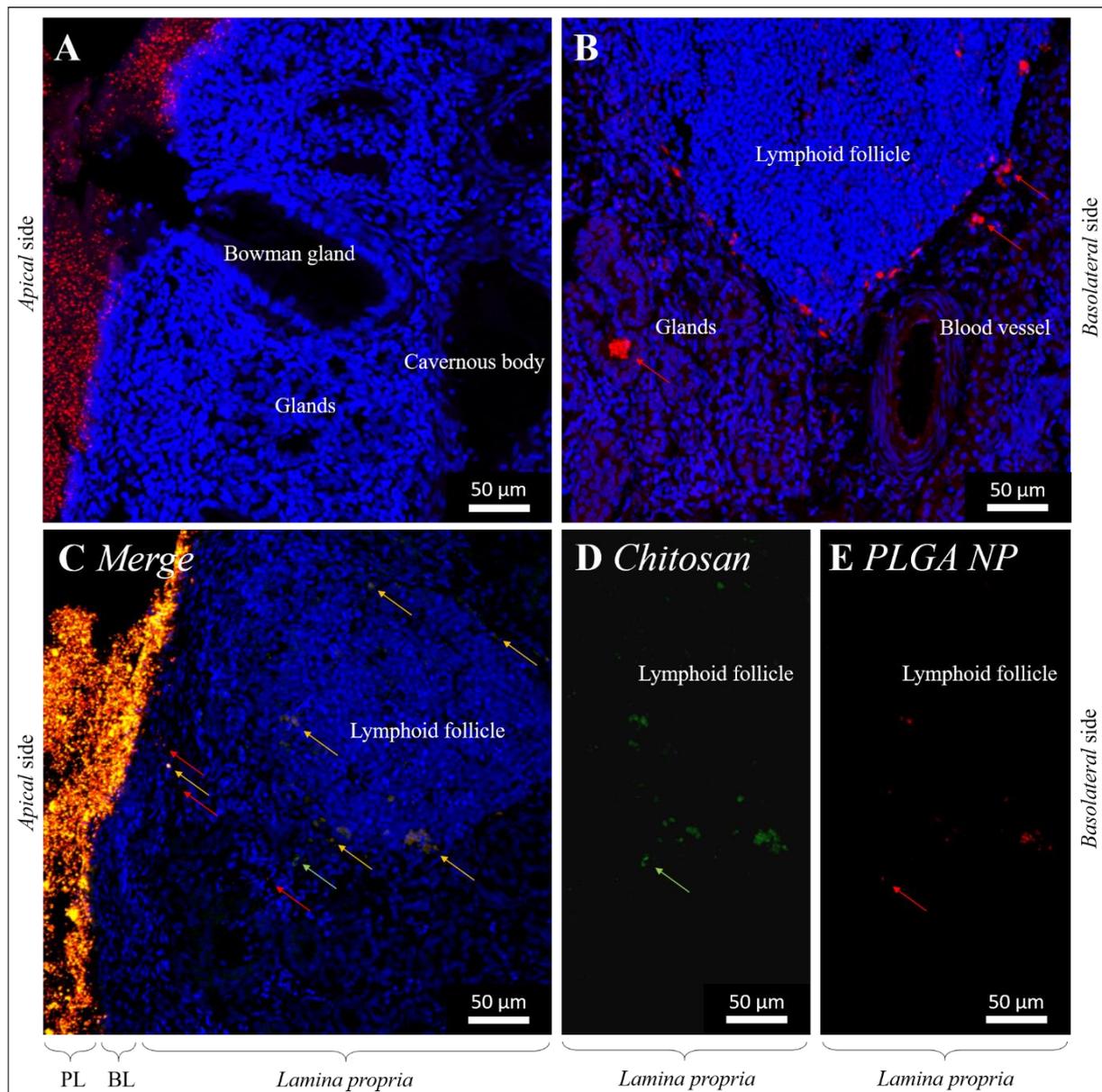


Figure 4: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan applied to the apical side of porcine olfactory mucosa. Maximum intensity projection (MIP) of Confocal Laser Scanning Electron Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Images taken after 30 min (A) or 2 h (B–E). (C) Merged image shows overlapping signals of nanoparticles (red) and chitosan labeled with fluorescein (green) appearing yellow. (D) Corresponding single channel of chitosan (green). (E) Corresponding single channel of nanoparticles (red). (Red arrow) PLGA nanoparticles, (green arrow) chitosan, (yellow arrow) co-localized PLGA nanoparticles and chitosan. PL, Particle layer; BL, Basal layer.

Influence of Chitosan Coating

In general, the interaction of chitosan and PLGA nanoparticles within mucosal tissues is not yet well characterized. We, therefore, examined the following immunohistochemistry studies and compared purely applied 80, 175, and 520 nm PLGA particles with nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of 520 nm PLGA nanoparticles embedded in chitosan via spray drying.

Co-Localization with Initial Immune Cells and Neuronal Fibers

When pure PLGA nanoparticles were applied to the porcine olfactory mucosa sample, several nanoparticles were taken up into the epithelial layer, these also passed the basal cell layer (BL), and permeated into outer layers of the *lamina propria* (LP) as already described in the previous chapter. We additionally labeled CD14⁺ cells via immunofluorescence staining. As shown in Figure 5A (merge) and Figure 5B (single channel), CD14 was mostly detected homogeneously distributed within the olfactory mucosa, since this biological barrier is an important immunologically-active tissue. Further, an increased signal was detected, particularly within blood vessels and lymphatic vessels, because CD14⁺ monocytes roll along with endothelial cells and are moving from the immunogenic active tissue site into the bloodstream.

Due to the application of pure 80, 175 and 520 nm PLGA nanoparticles without chitosan, no chitosan signal was detectable in this kind of sample, which serves as a control here (Figure 5C). Significant agglomerates of several nanoparticles have been further observed near nuclei (Figure 5D), 520 nm particles especially in neuronal bundles (Figure 5E) stained against the marker neuronal filament heavy protein (NF-H). Neuronal bundles are axonal fibers of primary neurons that merge in the *lamina propria* and connect the olfactory mucosa via the olfactory or the trigeminal nerve directly to the brain (Morrison & Costanzo, 1990, 1992). When chitosan-coated NiMPs have been applied to the porcine olfactory mucosa, within 15 min several chitosan-coated nanoparticles were also detected in the outer area of the sample, including the epithelial layer, basal cell layer (BL), and the outer layers of the *lamina propria* (LP) (previous chapter). NiMPs have also been observed in neuronal bundles (data not shown) and could, therefore, possibly be also transported along the olfactory and trigeminal nerve to the brain and the central nervous system (CNS). As stated before, we have already proved that not only pure PLGA nanoparticles can penetrate the olfactory mucosa, but also chitosan associated with these nanoparticles, and even to a faster extent.

In Figure 5H, we solely displayed the penetration of chitosan labeled with fluorescein, which indicates, that chitosan is also able to dissociate from PLGA nanoparticles and independently penetrate the outer ~150 μm of the olfactory mucosa within 15min after application to the apical side of the sample. Further, an intensity gradient of chitosan is visible decreasing to deeper layers within the tissue. In the examination of CD14⁺ cells after application of chitosan-coated NiMPs, a CD14⁺ signal was detected on the surface of single epithelial cells; however, the epithelial layer herein was completely covered by the particle patch (Figure 5F). Further, CD14⁺ monocytes were again detected at the inner wall of blood vessels. Additionally, an accumulation of CD14⁺ immunoreactivity was monitored in the outer layers of the *lamina propria* (Figure 5G), where no blood or lymphatic vessel is present. Moreover, in Figure 5I, we found a CD14⁺ signal surrounding a lymphoid follicle present in the *lamina propria*; especially one CD14⁺ cell directly associated with NiMPs on its surface, as well as intracellularly, seems to express CD14 on its cell surface (Figure 5J). In contrast to this, direct cellular CD14-association with pure 520 nm PLGA particles could not be found. Bringing this together with the described chitosan penetration gradient (Figure 5H), we conclude that an attraction of immune cells occurred due to the presence of chitosan recognized by CD14⁺ monocytes or macrophages. This could be assigned to the lipopolysaccharide-receptor, which CD14 is part of, resulting in either a pro-inflammatory event triggered by M1-macrophages, or a wound healing procedure described by the increased presence of M2-macrophages (Davis et al., 2018).

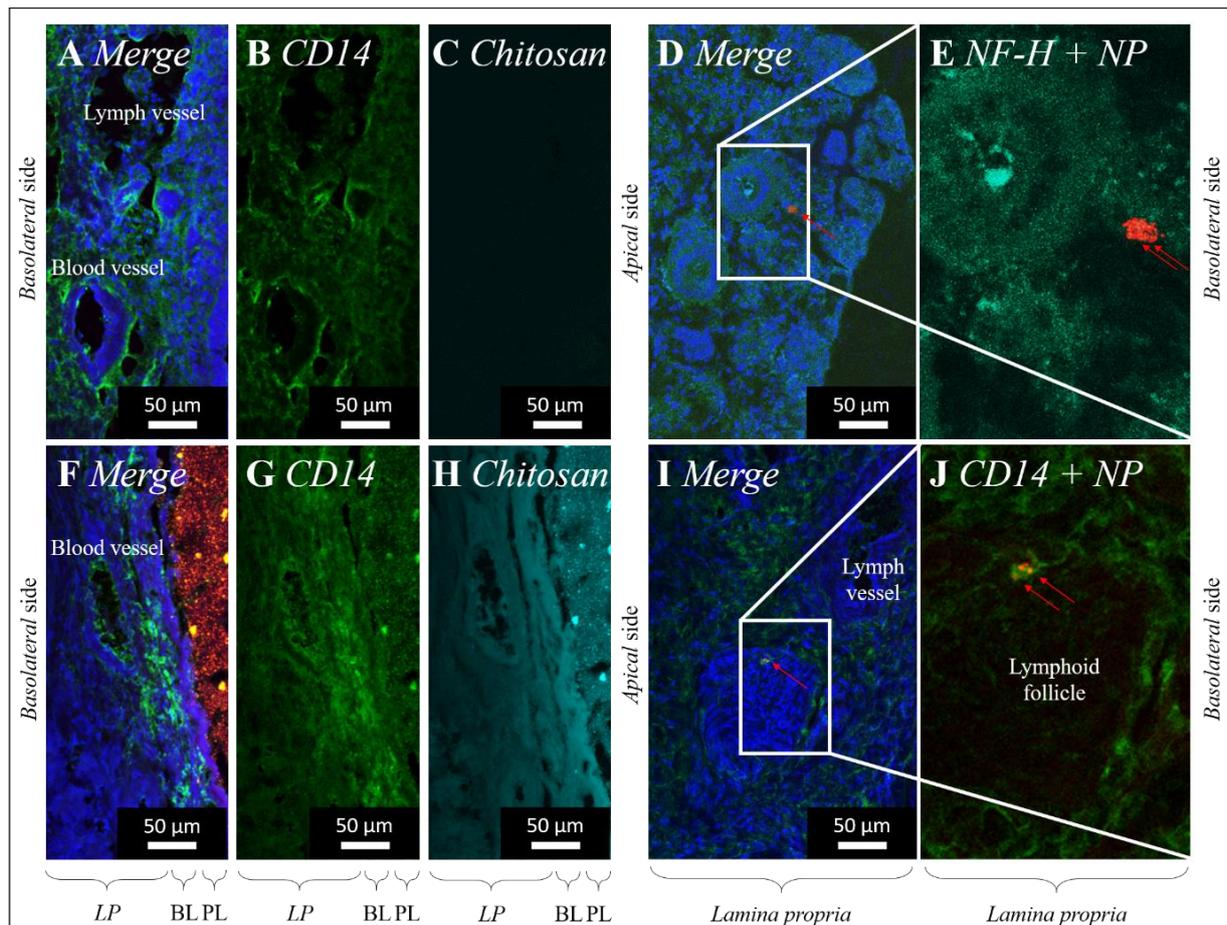


Figure 5: Permeation of PLGA nanoparticles (520 nm; red) (A–E) and PLGA-chitosan nano-in-micro particles (NiMPs) (F–J). Maximum intensity projection (MIP) of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack, taken 15 min after application to the apical side of porcine olfactory mucosa. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Red arrows mark nanoparticles (red) within the tissue. CD14 (green) labelled with anti-mouse Alexa Fluor® 647 secondary antibody (A, B, F, G). NF-H (cyan) labelled with anti-chicken FITC secondary antibody (D, E). Chitosan labeled with fluorescein (cyan) (H). Overlapping signals of red and green appear yellow (F) due to co-localization of PLGA nanoparticles (red) and chitosan (green). PLGA nanoparticles (single red channel) displayed in Supplementary Figure S6B, C. LP, Lamina propria; BL, Basal cell layer; PL, Particle layer; EL, Epithelial cell layer.

Cell Junction Opening

Chitosan can open tight junctions (Fazil et al., 2012; Rassu et al., 2016; Sonaje et al., 2012), which are the characteristic intercellular connections present in epithelial cells and endothelial cells. We, therefore, stained the prominent component *Zonula occludens* protein 1 ZO-1 via immunohistochemistry. As already described above, within 15 min after application PLGA nanoparticles (520 nm) permeated into the olfactory tissue sample (Figures 6A, B). ZO-1 protein was detected mainly between epithelial cells forming the wellknown tight junctions (Figures 6A, C). When pure PLGA nanoparticles have been applied, higher magnification revealed characteristically honeycomb-like staining resulting from intercellular present ZO-1, which was earlier described in cell culture (James Melvin Anderson et al., 1988; Stevenson et al., 1986). The underlying *lamina propria* consists, to large extent, of fibroblastic cells, where ZO-1 is mainly localized in endothelial cells. The localization in blood vessels was also proven in this study (Figures 6A, D). Open tight junctions are characterized by another conformation than in the closed stage.

The membrane protein ZO-1 is internalized into the cytoplasm, resulting in loosening of the intercellular connection (Smith, Wood, & Dornish, 2004). Consequently, due to the internalization of the former membrane protein, immunohistochemically targeting of ZO-1 in the open conformation is hence not possible anymore, which results in discoloring. Comparing the results of nanoparticle permeation to the application of chitosan-embedded NiMPs, we not only detected the above described uptake of PLGA nanoparticles associated with chitosan polymer molecules, we additionally displayed the ability of chitosan to penetrate the *lamina propria* dissociated from nanoparticles, approximately 150 μm , within 15 min after particle application to the olfactory epithelium (Figure 5H). Additionally, we investigated the presence of ZO-1 signal in tight junctions. Following the application of NiMPs, we again detected a gradient signal (Figure 6F) reverse to the above-shown chitosan gradient (Figure 5H); therefore, matching the previously-described chitosan penetration of approximately 150 μm into the *lamina propria*, which caused ZO-1 internalization and tight junction opening. Foremost in deeper layers of the *lamina propria*, ZO-1 signal was still apparent proving working cell-cell junctions. Especially in the wall of blood vessels, the ZO-1 immunoreactivity (Figures 6D, F) indicated still active tight junctions. Epithelial cells, which directly underlie the applied NiMPs faded also within 15 min and were therefore found discolored (Figures 6D, F) caused by chitosan mediated tight junction opening.

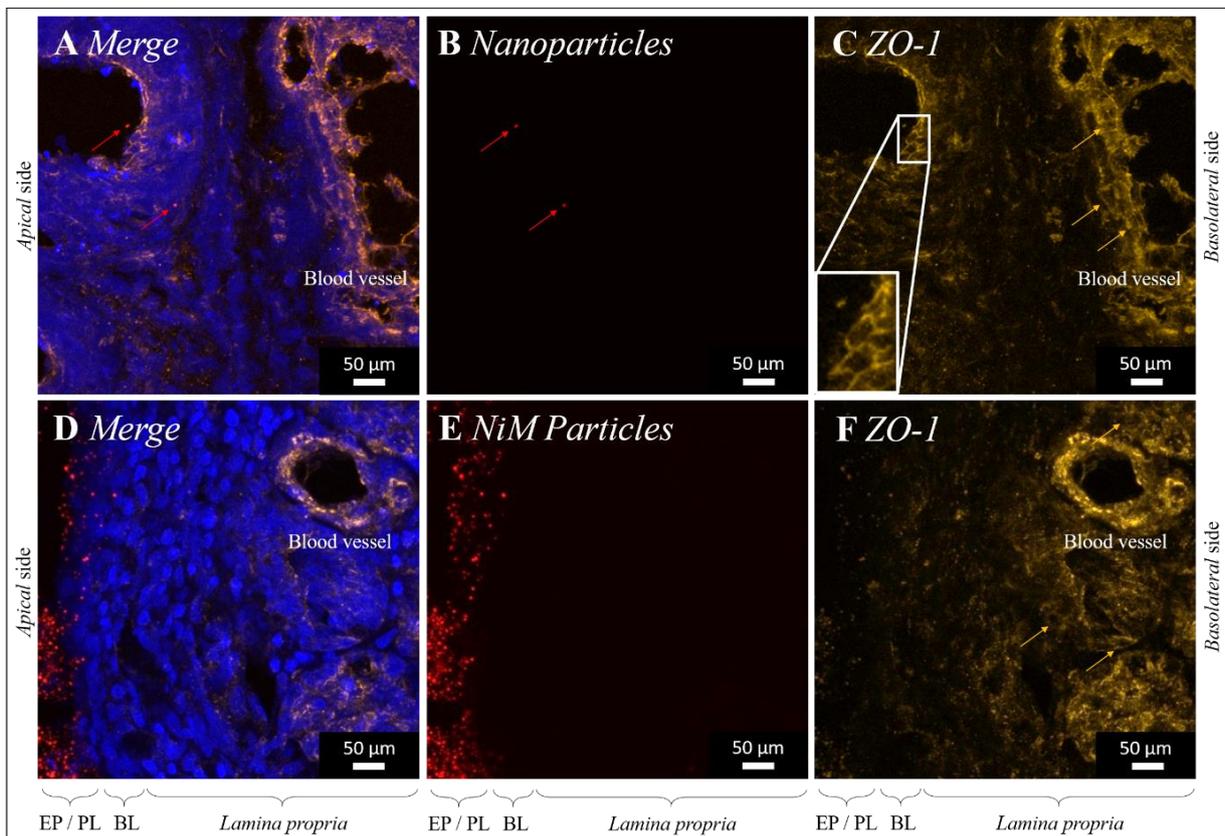


Figure 6: Permeation of PLGA nanoparticles (520 nm; red) (**A, B, C**) and PLGA-chitosan nano-in-micro particles (NiMPs) (**D, E, F**). Maximum intensity projection (MIP) of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack, taken 15 min after application to the apical side of porcine olfactory mucosa. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Zonula occludens protein 1 (ZO-1) (amber) labeled with anti-rabbit Alexa Fluor® 647 secondary antibody (**A, C, D, F**). EL, Epithelial cell layer; PL, Particle layer; BL, Basal cell layer.

3.1.5 Discussion

In this study, we successfully prepared poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA nanoparticles of different sizes (80, 175, and 520 nm) using the precipitation and double emulsion method. Further, we produced specialized nano-in-micro particles (NiMPs) via spray drying, consisting of PLGA nanoparticles (520 nm), embedded into the matrix polymer chitosan. NiMPs have in this study been produced via spray drying. In contrast to other innovative methods for nano- and microparticle production, e.g. electrospraying or supercritical CO₂ assisted electrohydrodynamic processes (L. Baldino, S. Cardea, & E. Reverchon, 2019; Lucia Baldino, Stefano Cardea, & Ernesto Reverchon, 2019; Jaworek & Sobczyk, 2008), spray drying is an even commercially used formulation process.

Especially the pharmaceutical industry (G. Lee, 2002; Stahl, 1980) benefits from high throughput production of spray drying, concurrently resource-friendly, as well as from high resulting encapsulation efficiencies of up to 100 % (Walz, Hirth, & Weber, 2018). Spray drying of chitosan has been already reported in the literature; however, ineffective process parameters or inhomogeneous particles have mainly been documented (He, Davis, & Illum, 1999b; Tokárová et al., 2013). To achieve a robust production process and reproducible particles, with homogenous size distribution and morphology, it is necessary to choose suitable process parameters, such as inlet temperature, feed rate, and gas flow (Paudel et al., 2013). The crucial factors in this process are droplet atomization followed by feed evaporation. To generate homogenous particles, atomization should be uniform, resulting in fine droplets at the first stage. These droplets then need to evaporate continuously in the second step, to achieve homogenous particles with smooth surface. Droplets dry from the outer to the inner phase, meaning that the remaining liquid in the center of the particle needs to evaporate through the already partly dried matrix. When evaporation takes place too fast at inlet temperatures above 100 °C, either hollow particles are formed through the so-called Rush-hour effect (Paudel et al., 2013), or they even burst and empty shells remain. Contrary to common knowledge, wrinkled surfaces of spray-dried chitosan particles do not occur from the polymeric properties of chitosan itself, but mainly from the process parameters of spray-drying. When particles cool down at the end of the process, they shrink and characteristic wrinkles occur. Hence, it is possible to prepare reproducible smooth chitosan particles utilizing suitable spray drying parameters like the ones reported herein. With moderate evaporation rates, dense and homogenous particles were achieved. Consequently, we developed a robust spray drying process. The morphology of all particulate samples in this study was spherical, with smooth surfaces because we optimized the spray drying process performed with a Büchi B-290 Mini-Spray dryer. An inlet temperature of 100 °C was identified, as a crucial parameter, which resulted in an outlet temperature of 45 ± 1 °C. This allowed the polymer droplets to continuously evaporate, ultimately resulting in homogenous and smooth particles.

For the chitosan:PLGA polymer ratio of NiMPs, a higher chitosan ratio resulted in increased particle diameters determined via image analysis of Scanning Electron Microscopy images and static light scattering; however, NiMPs tend to agglomerate in suspension. They were split up during static light scattering after an additional ultrasonic treatment within the measurement cell, which then revealed a bidisperse size distribution with a nanoparticle and a microparticle fraction. A higher chitosan ratio mainly influenced the nanoparticle fraction, which is attributed to the formation of additional, and slightly bigger pure chitosan nanoparticles during spray drying. Generally, due to the higher PLGA content about seven PLGA nanoparticles with a mean diameter of 519.7 nm were found in one chitosan microparticle with a mean diameter of 6.61 µm for low chitosan ratio, whereas, high chitosan ratio during spray drying resulted in an encapsulation of about two

519.7 nm PLGA-nanoparticles per chitosan microparticle with a mean diameter of 5.75 μm . The achieved encapsulation efficiency of NiMPs was either $39 \pm 19 \%$ (1/3 chitosan:2/3 PLGA) or $51 \pm 16 \%$ (2/3 chitosan:1/3 PLGA); and therefore, not significantly different. Although, 1/3 more chitosan as matrix material was present, the encapsulation efficiency did not significantly increase. This is again attributed to the formation of additional pure chitosan nanoparticles, which were determined via static light scattering measurements after additional ultrasonic treatment. Consequently, spray drying is a very efficient method to encapsulate nanoparticles up to a mass ratio of 2/3, covering them successfully with the added matrix polymer, even more beneficial when using less matrix material.

3 The polymer ratio variation had no impact on the following *ex vivo* experiments. Mucosal uptake of PLGA nanoparticles and NiMPs was investigated, with porcine olfactory mucosa specimens, in specialized side-by-side cells, mimicking the upside-down orientation and physiological conditions within the nasal cavity at 35 °C and 90 % humidity. Overall, a size- and time-dependent uptake of PLGA nanoparticles was observed. Smaller PLGA nanoparticles, with 80 nm diameter, were taken up immediately deep into the *lamina propria* 5 min after application to the epithelium. Fewer 175 nm particles penetrated the epithelial and the basal layer within 5 min. For 520 nm PLGA nanoparticles, slower uptake was observed, reaching the outer $\sim 150 \mu\text{m}$ of the *lamina propria* within 10 min. Additionally, 80 and 175 nm particles were documented to directly associate with cell nuclei within 5 min, which implies intracellular uptake. In contrast, 520 nm particles have not initially been observed near nuclei, but after 15 min, and to lower amounts, compared to the smaller nanoparticles. The occurring decelerated penetration due to increasing particle size is already reported in the literature (Bourganis et al., 2018b; Alpesh Mistry, Glud, et al., 2009). Further, reported critical particle size enabling transcellular transport after intranasal administration is 200 nm (Bourganis et al., 2018b; Rabiee et al., 2020). However, Musumeci et al. (2018) reported that PLGA nanoparticles, up to 300 nm, reach and accumulate in the brain of rats, but did not clarify the occurring transport mechanism (Musumeci et al., 2018). Nanoparticles with diameters greater than 500 nm have not yet been reported for nose-to-brain (N2B) targeting (Bourganis et al., 2018b; Rabiee et al., 2020), but size-dependent intracellular uptake is possible also for 200, 500 and even 1,000 nm particles in epithelial cells (Caco-2) (Win & Feng, 2005). Remarkably, we reported herein co-localization of 520 nm PLGA particles with nuclei, especially accumulated in neuronal bundles, which implies intracellular uptake in neuronal axons and could enable transcellular transport within the olfactory, or trigeminal nerve pathway to reach the brain and the central nervous system (CNS) (Bourganis et al., 2018b; Ganger & Schindowski, 2018; Keller et al., 2021; Rabiee et al., 2020). The diameter of axons in humans ranges from 100 to 700 nm (Alpesh Mistry, 2009; Morrison & Costanzo, 1990, 1992). It is broadly reported that directed transport along with neuronal cells and posterior neuronal bundles is one of the most promising routes for nose-to-brain delivery. To further investigate this phenomenon, additional experiments visualizing the exact cellular uptake and transport mechanism could be helpful. Hence, live imaging or *in vivo* experiments with particle sizes above 200 nm should again also be taken into account.

Contrasting the observations of 520 nm pure PLGA particles to the similar 520 nm PLGA particles embedded into chitosan, NiMPs were taken up faster and deeper in the *lamina propria*. A quantitative analysis was herein not possible because sample sizes differed between PLGA nanoparticle suspension and NiMP powder samples. The effect of applied polymer amount and sample condition needs hence to be investigated in future studies. Within 15 min high amounts of NiMPs were detected spread over the whole olfactory mucosa section, reaching the collagen

tissue at the basolateral side, where none of the purely applied PLGA nanoparticles were found. Furthermore, chitosan has been detected associated with the penetrated PLGA nanoparticles within the olfactory mucosa. Especially after 2 h, several 520 nm particles have been found together with chitosan in the outer zone of lymphoid follicles, where usually T-cells and B-cells are present in the porcine olfactory mucosa (Ladel et al., 2018). Small pure PLGA nanoparticles (80 and 175 nm) have also been detected in this area after approximately 5 min. In contrast to this, purely applied 520 nm PLGA particles were not found associated with lymphoid follicles. Ladel et al. (2018) showed CD3⁺, CD20⁺, and CD14⁺ cells in the outer area of the porcine olfactory epithelium-associated lymphoid follicles (Ladel et al., 2018). This finding further matches the subepithelial dome more prominent in intestinal Peyer's patch but also found in young adults and sheep.

Also within this study, we consequently examined the general initial immune reaction, which is mediated by CD14⁺ immune cells, namely monocytes and macrophages. It takes place within the first few hours after contact with a biomaterial (J. M. Anderson et al., 2008). We further monitored the presence of CD14 around lymphoid follicles. In our study, PLGA was not found colocalized with CD14⁺ cells, thus seems not to be recognized by CD14. Therefore, it is assumed that PLGA nanoparticles can pass the olfactory epithelium reaching for example, neuronal bundles, and could then be further transported to the brain and the CNS. Nevertheless, 80 nm PLGA nanoparticles especially have been documented associated with lymphoid follicles, which should be further clarified. Although this result is not attributable to the recognition by monocytes or macrophages, an interaction mechanism with other present immune cells could still be possible and should be explored in future studies. The chitosan penetration gradient within the olfactory mucosa was found in our study to be proportional to a gradient of the initial immune response. Chitosan, therefore, seemed to cause a migration of CD14⁺ cells to the particles underlying the *lamina propria* within 15 min after particle application to the epithelium. The membrane located glycoprotein CD14 forms together with the lipopolysaccharide-binding protein (LPB), the lipopolysaccharide-receptor (LPR), which recognizes bacterial endotoxin lipopolysaccharides lipopolysaccharide-receptor present on the surface of Gram-negative bacteria (Wright, Ramos, Tobias, Ulevitch, & Mathison, 1990). Lipopolysaccharide-induced upregulation of the CD14 membrane receptor is known as an initial immune reaction in mucosal tissues, such as the intestine (Frolova, Drastich, Rossmann, Klimesova, & Tlaskalova-Hogenova, 2008; Funda et al., 2001). Otterlei et al. (1994) initially described chitosan-recognition by CD14 on monocytes (Otterlei, Vhrum, Ryan, & Espevik, 1994). To the contrary, Qiao et al. (2010) reported the reduction of pro-inflammatory cytokines through chitosan oligosaccharides (Qiao et al., 2010). Recently, Chang et al. (2019) differentiated between low molecular (below 7.1 kDa) and high molecular (above 72 kDa) chitosan in the macrophage-binding mechanism. They reported that only low molecular weight chitosan up to 7.1 kDa would bind CD14 and interpreted it as an activation of a pro-inflammatory cascade (Chang, Lin, Wu, Huang, & Tsai, 2019). Studies describing the immune reaction of applied chitosan microparticles are still rather poor. Solely, S. Davis et al. (2018) proved chitosan particles with a high degree of deacetylation with sizes of 1–10 μm causing less M1-macrophage activation than similar chitin particles (Davis et al., 2018). Consequently, either the pro- or anti-inflammatory ability of chitosan particles is dependent on molecular weight, particle size, and degree of deacetylation. Taking this into account, we assume that in our study the observed CD14⁺ signal should be anti-inflammatory inducing a wound healing cascade, because the herein utilized chitosan has a molecular weight of 150–300 kDa. This should hence not be critical because Chang et al. (2019) reported for chitosans with molecular weights above 72 kDa solely anti-inflammatory reactions. Further, a high degree of 80 % deacetylation and lastly a

particle size ranging through agglomerates from approximately one micron up to 100 μm supports this reasoning. Nevertheless, the herein investigated CD14 immunohistochemical staining does not allow us to distinguish between M1- and M2-macrophages, which should be further evaluated in cell culture experiments, because, for example, a quantitative cell assay with altering cytokine concentrations would be needed as a reference (Zarif et al., 2016). This was not possible with the *ex vivo* samples of this study.

Moreover, the chitosan coating of NiMPs revealed several other interesting findings different from the purely applied identical PLGA nanoparticles. Chitosan was found to penetrate the olfactorymucosa approximately $\sim 150 \mu\text{m}$ within 15 min. Further, it accelerated the penetration of coated nanoparticles significantly and enables transport over the whole transverse tissue section within 15 min as described above. This is attributed to the swelling of chitosan on the top of the mucosa because the naturally occurring pH value in the nose of healthy individuals ranges around pH 6 (R. J. A. England, J. J. Homer, L. C. Knight, & S. R. Ell, 1999). Unmodified chitosan does not completely dissolve at physiological pH values in the nose due to its pKa value of ~ 6.5 but it is swelling and single chitosan polymer chains can move into the tissue. One explanation of enhanced uptake and accelerated permeation into the olfactory mucosa could be attributed to the well-known ability of chitosan to open tight junctions or more general cell-cell junctions enabling paracellular transport.

3

The membrane protein *Zonula occludens* protein 1 (ZO-1) is part of tight junctions within the epithelial cell layer as well as endothelial cells, and adherens junctions within the *lamina propria* (Steinke, Meier-Stiegen, Drenckhahn, & Asan, 2008; H. Wolburg et al., 2008). When tight junctions are opened due to chitosan treatment, the membrane protein ZO-1 immunohistological staining fades. V. Dodane et al. previously reported this in 1999 in the cell culture of Caco-2 cells. The underlying mechanism caused by the internalization of this specific protein from the membrane to the cytoskeleton was later clarified by Smith et al. (2004) (Smith et al., 2004). This ability in cell culture has been proved by several research groups in the past decades (Dodane, Khan, & Merwin, 1999; Rassu et al., 2016); nevertheless, the chitosan application onto tissues is rarely reported. The opening mechanism in epithelial cells, previously reported by Dodane et al. (1999) to take place after 1 h and regenerate within 24 h also observed through fading and recovery of ZO-1 staining (Dodane et al., 1999), however, they investigated acidic solutions at low chitosan concentrations. Smith et al. (2004) further described a concentration-dependent internalization of ZO-1 on Caco-2-monolayers within 1 h. M. Fazil et al. (2012) additionally showed increased brain uptake caused by chitosan particles but did not show ZO-1 staining as reference (Fazil et al., 2012). We, herein, showed for the first time that this is also true in the naturally occurring environment of porcine olfactory mucosa as a prominent biological barrier. The ZO-1 discoloring is attributed to internalization and opening of cell-cell junctions occurring in the *ex vivo* setting within only 15 min, including swelling of the dry chitosan-coated particles, which was never previously reported. To better understand which dosage of chitosan is most effective to promote paracellular transport, further experiments with different concentrations, particle amounts, as well as shorter timeframes would be interesting.

Finally, local particle clearance was observed above surfacelocated bowman glands. NiMPs have been cleared completely within 30 min, which could be attributed either to accelerated particle uptake within glands or ongoing mucus production resulting in continuously pushing away the overlaying particle layer. Ongoing mucus production even in *ex vivo* setting was already early described to last at least 4–5 h for frog palate mucosa (T.J. Aspden et al., 1995; Sadé et al., 1970), later also for human specimens (Trudi J. Aspden et al., 1997) and ferret trachea with velocities up

to $9.5 \pm 3.5 \text{ mm min}^{-1}$ (Abanses, Arima, & Rubin, 2009; Jeong, Joo, Hwang, & Wine, 2014). Further, chitosan was found to reduce mucociliary transport rate (MTR) proportionally to its molecular weight (T.J. Aspden et al., 1995), which was attributed only to its physical interaction with mucins not harming the mucosa itself (Trudi J. Aspden et al., 1997). Unfortunately, no further tracking of particles was possible in this study because no particles have been detected directly associated with the gland ensheathing cells, or the underlying cells of the *lamina propria*, and continuous monitoring was not possible due to the sampling procedure. As Raber et al. (2014) also described enhanced uptake of chitosan-coated PLGA nanoparticles in glandular ducts of hair follicles (Raber et al., 2014), mucosal glands could also function as uptake enhancing mucosa components. For the clarification of the role of surface-associated glands, it would be interesting to continuously monitor the site of action. It would be beneficial to monitor organoids, such as glands, using a complex model of the olfactory mucosa. For example an organ-on-a-chip model, a so-called nose-on-a-chip.

3.1.6 Conclusion

Within this study, we successfully developed specialized Nano-in-Micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles embedded into chitosan microparticles via spray drying. We evolved a robust spray-drying process resulting in homogenous microparticles with high encapsulation efficiency, uniform size distribution, smooth surface, and dense pores. We demonstrated, that not only 80 and 175 nm PLGA nanoparticles purely applied to the olfactory mucosa can be taken up intracellularly within only 5 min, but also 520 nm PLGA particles are associated with nuclei and neuronal fibers after 15 min, which can imply transcellular transport within the olfactory epithelium and intracellular uptake into neuronal cells following transport along those to the olfactory or trigeminal nerve, which finally enables targeting of the brain and the central nervous system (CNS). These findings were further proved to be size-time-proportional, resulting in smaller particles moving faster (within only 5 min) and to a higher extent into the *lamina propria*. Chitosan-coated NiMPs were identified as even more interesting nanoparticle carriers and are auspicious delivery vehicles themselves. Their chitosan coating is subsequently swelling on the mucosal barrier; therefore, single chitosan polymer chains penetrate within 15 min approximately 150 μm into the olfactory mucosa. With this, the chitosan penetration affects the opening of tight junctions and, therefore, can additionally enable paracellular transport through the olfactory epithelium. Consequently, the accelerated uptake of chitosan-coated nanoparticles was examined. PLGA nanoparticles, as well as, NiMPs were found in lymphoid follicles; however, only NiMPs were co-localized after 15 min with the immunoreactivity signal of membrane protein CD14 present on monocytes and macrophages. Hence, we assume any other interaction for PLGA nanoparticles e.g., T- or B-cell mediated binding, which needs to be investigated in future studies. NiMPs herein showed the ability to initialize an anti-inflammatory cascade within 15 min after particle application, due to the beneficial properties of the herein utilized chitosan (molecular weight, degree of deacetylation, and particle size). However, CD14⁺ macrophages could be either pro-inflammatory M1-macrophages or anti-inflammatory M2-macrophages effecting wound healing, which could not be fully clarified within this study because therefore cytokine levels are needed as a reference, which should be investigated in cell culture. Additionally, particle clearance of gland overlaying particles was herein documented, but could not be fully enlightened, because the sampling procedure was limited and continuously monitoring was not possible. In conclusion, within this study, we demonstrated the possibility for PLGA nanoparticles as well as for chitosan NiMPs to take all three prominent pathways to the brain and the CNS, namely transcellular,

intracellular via neuronal cells, and paracellular transport. Overall, although polymeric particles are broadly reported as promising drug delivery systems, not only for intranasal application the usage in the clinic is still lacking. Up to now, no nano-based system has entered advanced clinical trials. Consequently, still more research is needed to collect additional data and unravel the complex phenomena within the nasal mucosa, to clarify the different transport mechanisms and the role of special organoids, like bowman glands. Further, verifying specific influences of particle material, other formulation components, and particle sizes.

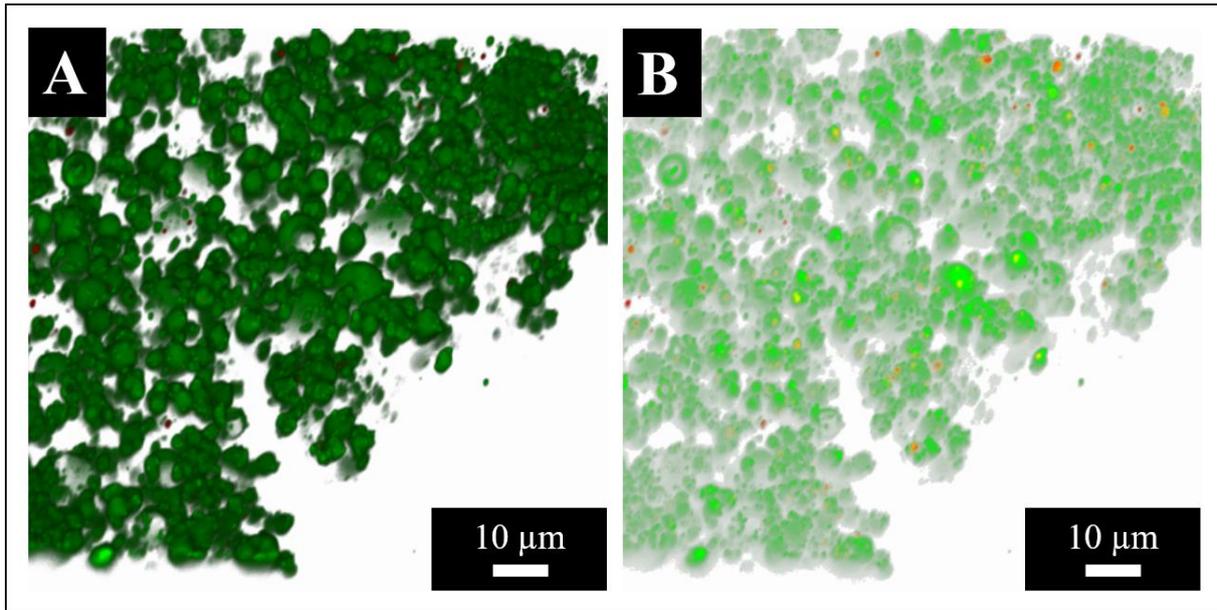
3.1.7 Acknowledgements

This study has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 721098 (www.n2b-patch.eu) to AF, CG, NG-T, ET, GT, KS and CG-T. LS thanks the Studienstiftung des deutschen Volkes for her Ph.D. scholarship. SL and JF thank the Stiftung der deutschen Wirtschaft for their Ph.D. fellowships. All authors thank Sue Child and Matthew Burton for their language review.

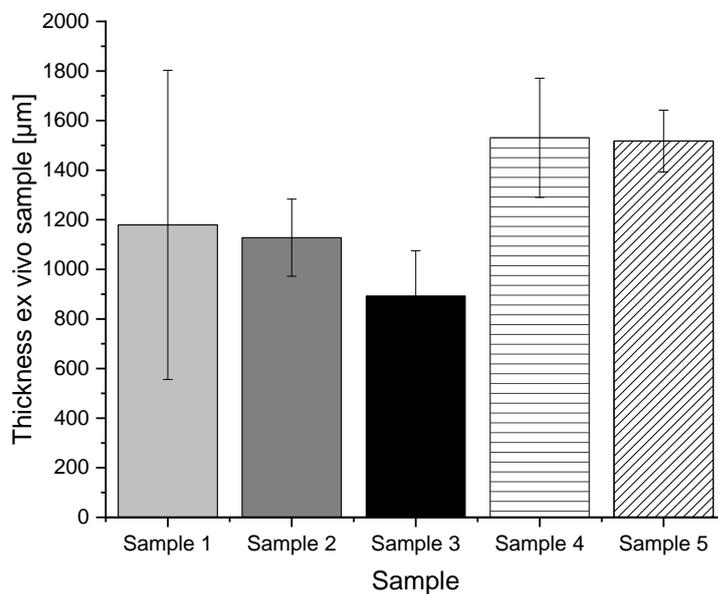
3.1.8 Supplementary Material

Supplementary Table 1: Lasers and corresponding emission filters utilized for Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) of different fluorophores with a confocal LSM 710 (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Germany).

Fluorophore	Laser	Emission filter
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol 2HCl)	405 nm	410-501 nm
Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)	488 nm	493-562 nm
Fluorescein sodium salt	488 nm	493-562 nm
Lumogen	514 nm	566-703 nm
Alexa Fluor® 647	633 nm	638-755 nm

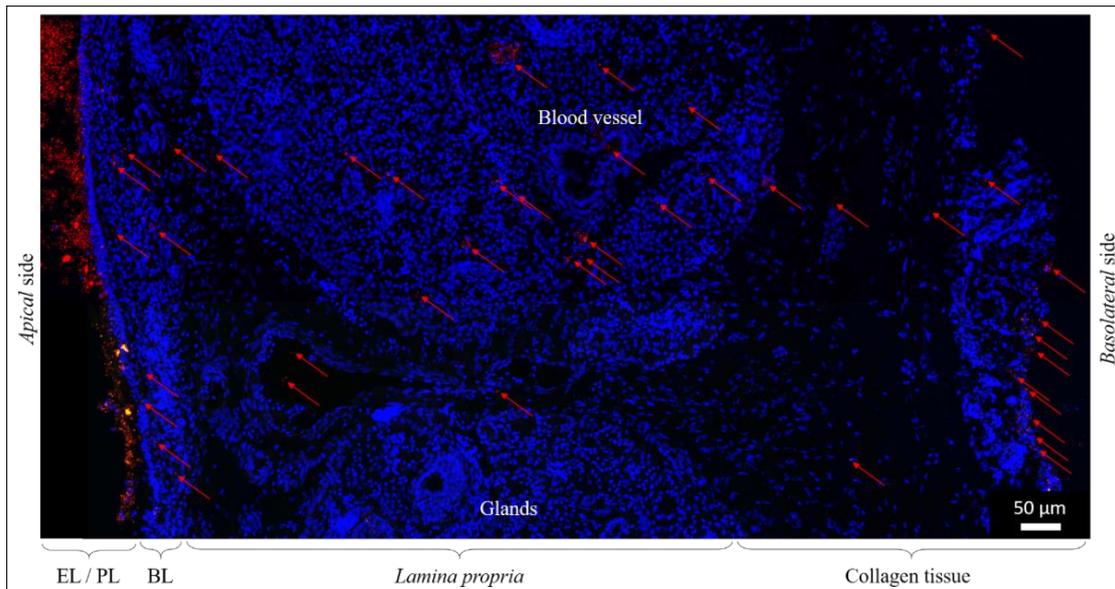


Supplementary Figure S1: Spray dried nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of 1/3 PLGA nanoparticles (520 nm) and 2/3 chitosan by weight. **(A)** 3D projection of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images (green: chitosan; red: PLGA) stitched together from a z-stack, mag. 630 X, external view. **(B)** Transparent 3D projection of CLSM images (green: chitosan; red: PLGA) stitched together from a z-stack, mag. 630 X, internal view.

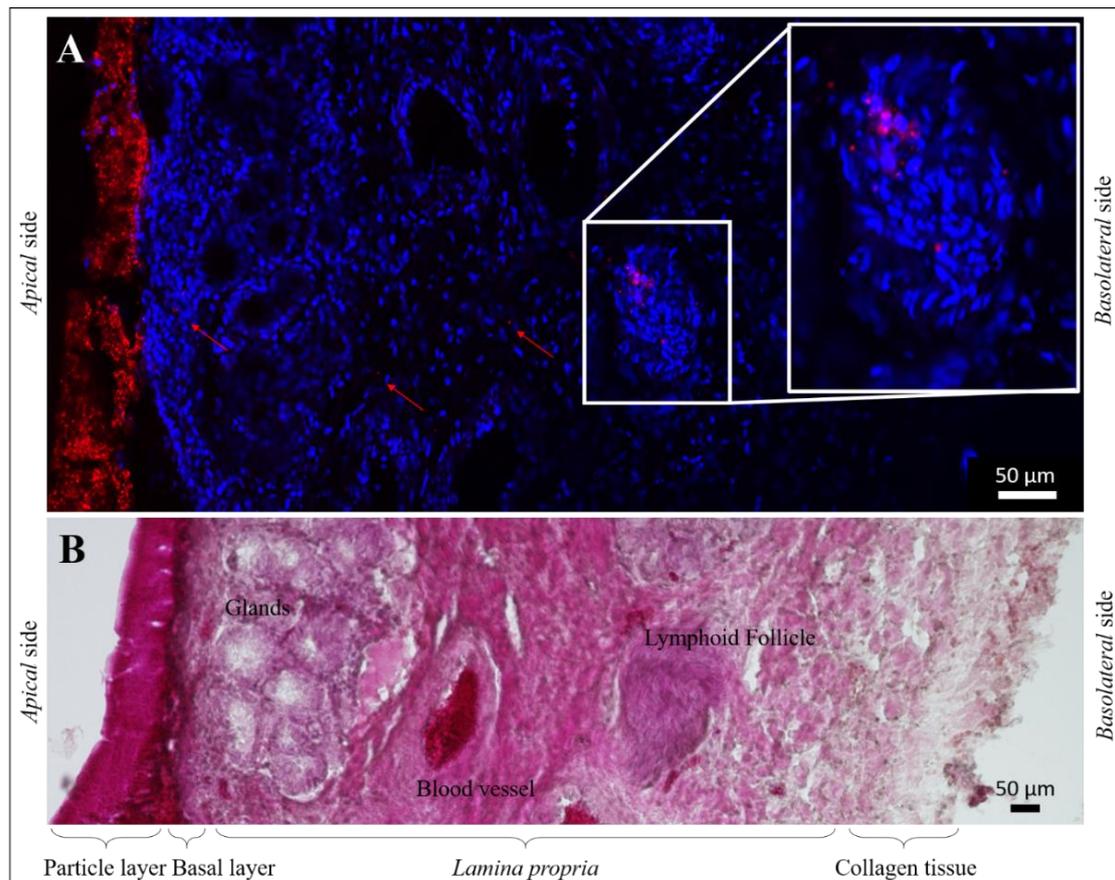


Supplementary Figure S2: Thickness of porcine olfactory mucosa explants after permeation experiment fixed and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) staining. Thickness differs not significantly between individual samples ($n=3$). Statistical analysis was performed with Shaapiro-Wilk normality test, One-Way-ANOVA with Levene's variance test and Bonferoni posthoc test at a significance niveau of $p < 0.05$ respectively.

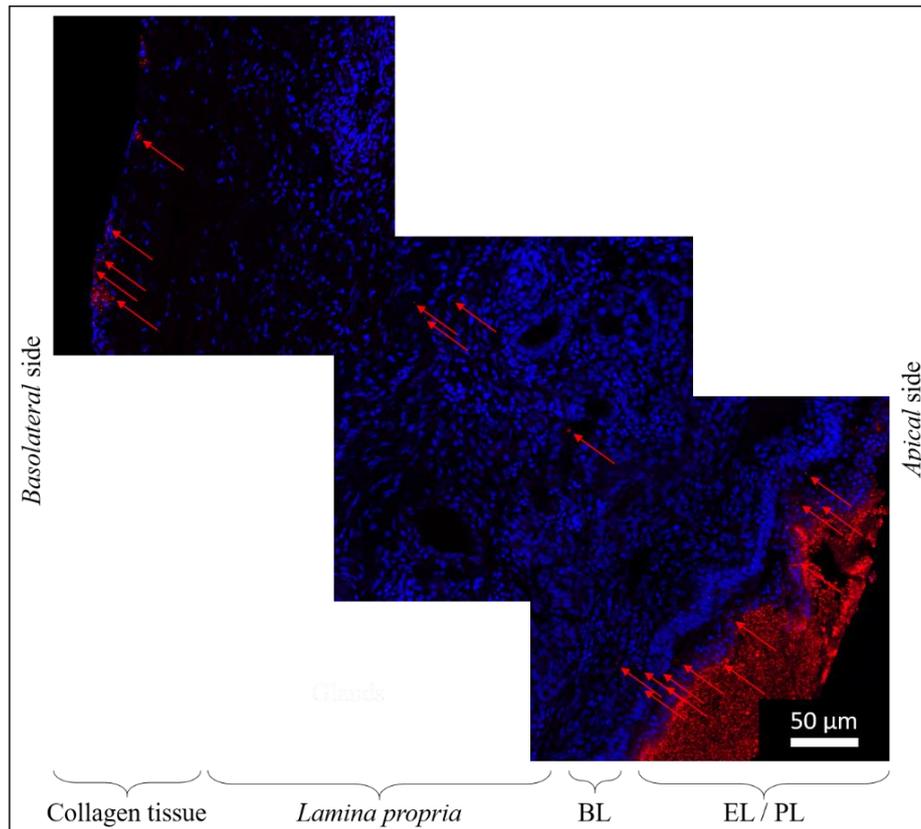
3



Supplementary Figure S3: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan applied to the apical side of porcine olfactory mucosa. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Red arrows mark particles. Chitosan labeled with fluorescein (green). Overlapping signals of red (nanoparticles) and green (chitosan) appear yellow. Image taken 15 min after application. EL: Epithelial cell layer; PL: Particle layer; BL: Basal cell layer.

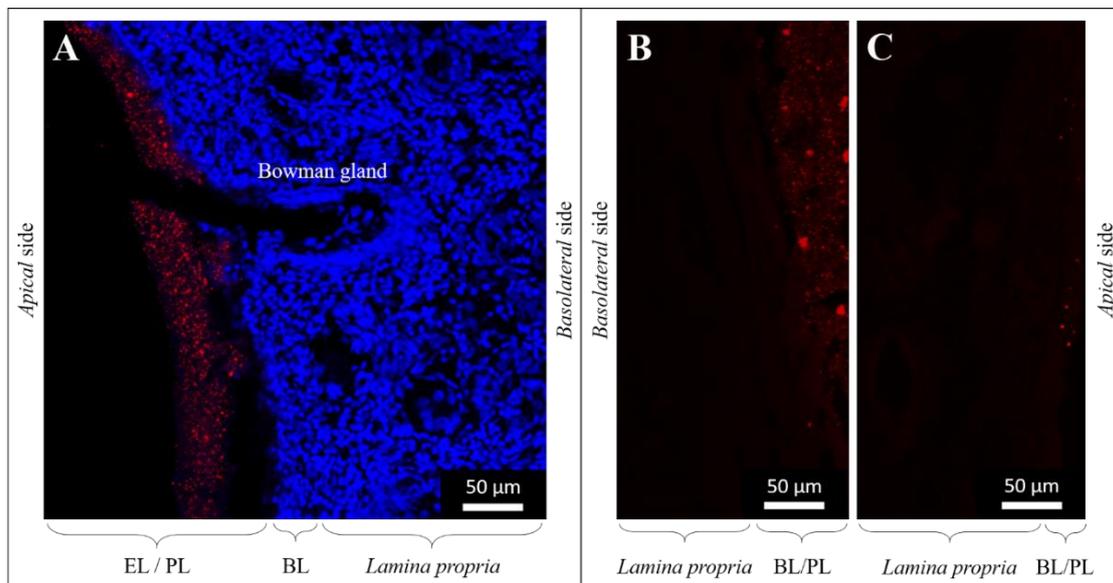


Supplementary Figure S4: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan. Images taken 15 min after application. (A) Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) image stitched together from a z-stack; Cell nuclei stained with DAPI (blue), red arrows mark single particles. (B) Light Microscopy (LM) image; Hematoxylin-Eosin (HE) staining.



3

Supplementary Figure S5: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan applied to the apical side of porcine olfactory mucosa. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Red arrows mark particles; Chitosan unlabeled; Image taken 2 h after application. EL: Epithelial cell layer; PL: Particle layer; BL: Basal cell layer.



Supplementary Figure S6: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan applied to the apical side of porcine olfactory mucosa. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images. (A) Cell nuclei stained with DAPI (blue). Chitosan unlabeled, image taken 30 min after application. (B) NiMPs 15 min after application to the apical side, PLGA nanoparticles (red) belonging to Figure 4F original manuscript. (C) PLGA nanoparticles (red) 15 min after application to the apical side belonging to Figure 4A original manuscript. EL: Epithelial cell layer; PL: Particle layer; BL: Basal cell layer.

4. Entwicklung und Charakterisierung Chitosan-basierter Wirkstoffformulierungen für die Verkapselung sensitiver niedrigmolekularer Moleküle und monoklonaler Antikörper mittels Sprühtrocknung als intranasales *Drug Delivery System*

Die Ergebnisse und die Diskussion zu den Hypothesen 2.2 und 3 werden in diesem Kapitel dargestellt. Die Untersuchungen zu diesen beiden Hypothesen sind als Manuskript mit dem Titel "*Spray-dried Chitosan Particles as Controlled Intranasal Drug Delivery Systems with High Encapsulation Efficiency for Small Molecules and Monoclonal Antibodies*" dargestellt. Dieses Manuskript wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *International Journal of Pharmaceutics* zur Veröffentlichung eingereicht. **2.2.2 Hypothese II** wird in Kapitel 6.2 und **2.2.3 Hypothese III** in Kapitel 6.3 zusammenfassend diskutiert.

Hinweis: Das Layout des Manuskripts wurde an das Layout dieser Dissertationsschrift angepasst. Die dadurch entstandenen Überarbeitungen haben den Inhalt nicht verändert.

4.0 Erklärung meiner eigenständigen Leistung

Ich habe diese Studie zum größten Teil eigenständig konzipiert und ihre wissenschaftliche Methodik ausgearbeitet. Außerdem habe ich den Großteil der praktischen Arbeiten angeleitet, dies beinhaltet konkret:

- Die Sprühtrocknungsparameter für einen robusten Prozess für die Verkapselung von Farbstoffen, Biotin, Bevacizumab und Ocrelizumab wurden von mir etabliert und optimiert.
- Die Sprühtrocknungsversuche für die Verkapselung der Wirkstoffe wurden von mir angeleitet.
- Die Untersuchung der Restfeuchtigkeit der Partikel sowie die Untersuchung der Lagerstabilität erfolgte unter meiner Anleitung.
- Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilungen wurde von mir durchgeführt oder angeleitet.
- Die Untersuchung der Verkapselungseffizienz und molekularen Integrität von Ocrelizumab nach der Verkapselung mittels Sprühtrocknung wurde von mir konzipiert und angeleitet.
- Die Dissolutionstests *in vitro* sowie die Bestimmungen der Wirkstofffreisetzung wurde von mir konzipiert, optimiert und angeleitet.
- Die Berechnungen und theoretischen Abschätzungen der Verkapselungseffizienz in Bezug auf die Partikelgröße wurden von mir durchgeführt.
- Die Abschätzung der therapeutischen Relevanz der entwickelten Wirkstoffformulierung wurde von mir recherchiert und berechnet.

Alle erhobenen Daten, außer die Daten der Intrinsischen Fluoreszenz Emission und des Zirkulardichroismus, wurden von mir ausgewertet und analysiert. Der weitaus größte Teil dieses *peer-reviewed* Fachartikels wurde von mir geschrieben, konkret habe ich den Original-Entwurf des Manuskripts konzipiert und geschrieben, sowie federführend die Änderungsvorschläge meiner Co-Autoren harmonisiert und eingearbeitet.

4.1 Spray-dried Chitosan Particles as Controlled Intranasal Drug Delivery Systems with High Encapsulation Efficiency for Small Molecules and Monoclonal Antibodies

Lena Marie Spindler^{1,2}, Rick Wiegand², Jan Bröckel², Sarah V. Gmünder², Tim Völkerath², Alexander Schütz², Claudia Capitini^{3,4}, Martino Calamai^{3,4}, Katharina Schindowski⁵, Carmen Gruber-Traub², and Günter E. M. Tovar^{1,2,*}

¹ Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology IGVP, University of Stuttgart, 70569 Stuttgart, Germany; guenter.tovar@igvp.uni-stuttgart.de

² Department Interfacial Engineering and Materials Science, Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB, 70569 Stuttgart, Germany; carmen.gruber-traub@igb.fraunhofer.de

³ LENS - European Laboratory for Non-Linear Spectroscopy, University of Florence, 50019 Florence, Italy

⁴ National Institute of Optics - National Research Council (CNR-INO), Sesto Fiorentino, Italy.

4 ⁵ Institute for Applied Biotechnology, Biberach University of Applied Science, Campus Aspach, 88400 Biberach, Germany

*Correspondence: Carmen Gruber-Traub, carmen.gruber-traub@fraunhofer.igb.de and Günter E. M. Tovar, guenter.tovar@igvp.uni-stuttgart.de

Submitted to the peer-reviewed Journal *International Journal of Pharmaceutics*

Publisher: Elsevier

4.1.1 Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) play a key role in modern therapy of chronic diseases and are promising for the therapy of central nervous system (CNS) diseases. Despite their great potential, there are also challenges, mainly to overcome their poor storage stability with suitable formulations or their low bioavailability in the CNS caused by the blood-brain barrier (BBB). Intranasal delivery can target drugs such as mAbs to the CNS, thereby circumventing the BBB. Using an encapsulation approach, we addressed both challenges and achieved robust storage stability ($\geq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, > 5 weeks) of encapsulated mAbs and a sustained and successful controlled release *in vitro* ($\geq 85\%$ after 15 days) under simulated nasal conditions. We report here for the first time a spray-dried chitosan formulation containing mAbs achieving a high spray drying yield ($\geq 60\%$), with reproducible particle morphology, monomodal size distribution (PDI 0.02) and an average diameter of $\sim 69\pm 9$ nm. Particle loadings of 4.42 ± 0.03 wt% biotin and 15.64 ± 1.02 wt% of the therapeutic mAb ocrelizumab (encapsulation efficiencies $\geq 80\%$) were achieved. The sensitive mAbs remained structurally intact as shown by Intrinsic Fluorescence-, Circular Dichroism- and FT-IR-Spectroscopy, Differential Scanning Calorimetry, and ELISA. The high binding activity of $\geq 82\%$ was maintained during storage. The determined release mechanism is very well described by the Korsmeyer-Peppas model resulting in anomalous transport.

4.1.2 Introduction

The effective treatment of diseases of the central nervous system (CNS) is one of the greatest challenges in modern medicine. On the one hand, a large number of biopharmaceuticals enable the successful treatment of, for example, multiple sclerosis (MS) or Alzheimer's disease, thus opening up a completely new and promising therapeutic field. On the other hand, however, there are also major drawbacks, as the bioavailability of these macromolecules is low due to exclusion by the blood-brain barrier (BBB) (Hartwig Wolburg et al., 1994). This naturally existing protective system consists of a tight endothelial cell barrier with distinct transport functions for nutrients, but excludes most proteins. Thereby, the BBB limits the permeation of active pharmaceutical ingredients (APIs) from blood and lymphatic system to the CNS (Begley, 2004; Patel & Patel, 2017).

Intranasal administration of therapeutic biologics seems to be very promising since Morrison and Costanzo 1990 discovered the direct connection of the olfactory mucosa to the brain and the CNS (Morrison & Costanzo, 1990, 1992). Olfactory neurons are located directly in the nasal cavity and form bundles of neurons that pass through the olfactory mucosa and through the ethmoid bone building the olfactory and trigeminal nerve and are hence connected to the brain. Several research groups have already demonstrated higher concentrations of active pharmaceutical ingredients (APIs) in the brain and the CNS *in vivo* after intranasal administration compared to intravenous or oral administration (Maigler et al., 2021; Muntimadugu et al., 2016; Seju et al., 2011; Stütze et al., 2015a). There is however still a great need for effective methods to present macromolecules such as mAbs for transport from the nose to the brain.

State-of-the-art therapies with mAbs, such as ocrelizumab for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis (RMS) as well as primary progressive MS (PPMS) (Hemmer, 2021) are currently administered intravenously, and require a high dose (e.g., 600 mg ocrelizumab per 6 months) to reach the therapeutically sufficient dose. The medicinal effect of ocrelizumab is characterized by binding to CD20 on B lymphocytes, leading IgG-mediated depletion of B cells (Graf et al., 2020;

A. L. Greenfield & Hauser, 2018). Reducing the number of CD20-positive pro-inflammatory B cells is highly effective to reduce relapses and the formation of new lesions. Based on these results, ocrelizumab is a good candidate for future formulation approaches to enable different administration routes.

In the present study, we encapsulated ocrelizumab and bevacizumab into a particle-based drug delivery system tailored for intranasal administration, with the aim of opening the way for innovative formulations and potential new applications.

Bioavailability does not depend only on the presence of the API used at the target site. Rather, bioavailability is only achieved when the active ingredient used is constantly present at the target site and at the specific concentration required for a measurable mechanism of action. Consequently, not only the transport to the brain and the CNS is critical, but also the provision of a constant drug level. To achieve constant drug levels, drug delivery systems consisting mainly of particulate formulations are used (A. Mistry et al., 2015; J. J. Wang et al., 2011; Yun et al., 2015). Encapsulation in nano- or microparticles can achieve a controlled release from the matrix material, depending on the encapsulation polymer used and the dissolution conditions.

Chitosan is regarded as a promising drug delivery material for intranasal delivery (Bourganis et al., 2018b; Garcia-Fuentes & Alonso, 2012; Keller et al., 2021; Rabiee et al., 2020; Spindler et al., 2021). In addition to its advantages as a renewable biopolymer (Sarmiento & Neves, 2012; Wenling et al., 2005; Youling Yuan, Chesnutt, Haggard, & Bumgardner, 2011a), it is biocompatible and mucoadhesive; moreover, its solubility in water makes it easy to process in acidic solutions, and its properties are easily tunable due to its degree of deacetylation (DD) and molecular weight (MW) (Henriksen et al., 1996).

Another unique feature of chitosan is its demonstrated ability to open tight junctions (Fazil et al., 2012; Rassu et al., 2016; Sonaje et al., 2012; Spindler et al., 2021). Tight junctions are not only the gatekeeper in the shielding BBB but are also present in the olfactory mucosa towards the brain and CNS, which in addition should allow for significantly increased drug concentrations through paracellular transport pathways. We previously reported the ability of a chitosan derivative with DD80 and a MW of 150-300 kDa to open the tight junction protein *zonula occludens one* (ZO-1) in porcine olfactory mucosa samples (Spindler et al., 2021).

Another challenge is preserving the bioactive form of mAbs during its storage, whether in solution or dried. The current method is frozen storage of highly concentrated liquid formulations (Bowen et al., 2013; Maury, Murphy, Kumar, Shi, & Lee, 2005), but this is not only costly but also difficult to practice due to the required cold chain. Consequently, there is a strong interest in making mAbs storable by encapsulation in a suitable formulation, in the best case to allow storage in the dried state (Bowen et al., 2013). Major advantages of dry formulations are higher stability and easy storage conditions at room temperature or 2-8 °C.

Of course, ensuring the bioactivity of these sensitive macromolecules during encapsulation is a particular challenge. Various parameters associated with spray drying can damage mAbs during processing, such as agitation, temperature, light exposure, oxidation, or shear stress, leading to degradation and agglomeration (Kaur, 2021). Therefore, it is of great importance to accurately characterize the remaining structural integrity that determines bioactivity immediately after the process and after storage. Structural integrity has been studied mainly by spectroscopic methods such as intrinsic fluorescence (IF), circular dichroism (CD), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), while agglomerates are identified by either size-exclusion high-pressure liquid chromatography (HPLC-SEC) or dynamic light scattering (DLS) measurements (Henry R Costantino

et al., 1997; Dani, Platz, & Tzannis, 2007; Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, et al., 2005; Mutukuri, Maa, Gikanga, Sakhnovsky, & Zhou, 2021; Stefanie Schüle et al., 2007). To date, binding-specific analysis *in vitro* is not well represented, although this property is essential to answer the question of residual bioactivity. It is therefore of great importance to compare common spectroscopic and chromatographic methods with bioassays to gain insight into the residual binding activity required for bioactivity.

Since 1998, spray-dried formulations supplemented with sugar molecules as excipients have proven to be particularly effective for various protein powder formulations, e.g., mannitol-stabilized monoclonal immunoglobulin E (IgE) (Henry R. Costantino et al., 1998), trypsinogen packed in sucrose (Tzannis & Prestrelski, 1999), or lysozyme sprayed with trehalose and sucrose (Liao, Brown, Nazir, Quader, & Martin, 2002). These are also beneficial for improved storage stability of liquid and solid formulations, which has been studied more intensively in the last 20 years. The current formulation approaches for monoclonal antibodies by spray drying are mainly aimed at improving storage and ease of handling of biopharmaceuticals. Therefore, the formulations consist solely of mAbs and sugars, with Maury et al. (2005) considering a sugar content of 20-30 wt% to be better, which was later confirmed by Schüle et al. (2008). They proposed an IgG/sugar ratio of 80/20, which is the most suitable in terms of storage stability and reconstitution in ultrapure water within 120 seconds to easily recover the bulk material (Schüle, Schulz-Fademrecht, Garidel, Bechtold-Peters, & Frieb, 2008). Consequently, they found a promising formulation for improved bulk storage but did not address the formulation aspects of a controlled release drug delivery system.

Savin et al. (2019) recently investigated the controlled release of bevacizumab from chitosan-polyethylene-glycol-methacrylate (chitosan-PEGMA) particles, reporting a release rate of 51 % after 168 h and 100 % bevacizumab released within 600 h. The bevacizumab-loaded chitosan-PEGMA particles were prepared by a double cross-linking reverse emulsion method and achieved a high drug loading of 32.7 wt% with an encapsulation efficiency of 39 wt%. In contrast, ocrelizumab has not been previously studied in particular or hydrogel formulations for a controlled release approach. Consequently, to our knowledge, the approach to formulate mAbs in chitosan as drug delivery systems for controlled release via spray drying has not yet been addressed.

One aim of the present study, was to investigate a spray drying formulation approach using chitosan for encapsulation of mAbs, here ocrelizumab and bevacizumab, and simultaneously address storage stability and controlled release of biopharmaceuticals for the first time. Another aim of our study was to encapsulate for comparison small molecule compounds with the same formulation as aimed for encapsulation of the biopharmaceuticals. To this end, we chose small dye molecules that are easily traceable by analytical methods and biotin (vitamin B₇, vitamin H). The release behavior of ocrelizumab and biotin encapsulated in chitosan should be comprehensively investigated. The bioactivity of the released ocrelizumab should be recorded and the suitability of this drug delivery approach for intranasal delivery should be evaluated.

4.1.3 Materials and Methods

Particle Formulation via Spray-Drying & Particle Yield

For the production of particles containing D(+)-biotin (Chemodex Ltd., St. Gallen, Switzerland) - hereafter referred to as biotin - fluorescein sodium salt (Honeywell Flunka, New Jersey, USA), fluoresceinamine (Honeywell Flunka, New Jersey, USA), and rhodamin B (SERVA Electrophoresis

GmbH, Heidelberg, Germany) a stock solution with concentrations up to 50 mg mL⁻¹ was prepared in MilliQ water. For biotin the stock solution was heated to 60 °C. For the preparation of the chitosan solutions 300-2500 mg (Chitoceuticals, Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Germany) were dissolved at 40 °C while stirring at 600 rpm to achieve a 1 wt% solution in 0.5 vol% acetic acid in MilliQ (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Only the derivatives with molecular weight 200-500 kDa were dissolved at 0.25 wt% in 1.5 vol% acetic acid solution.

For the preparation of particles loaded with bevacizumab (manufactured at Biberach University of Applied Science, Germany) or ocrelizumab (Ocrevus®; Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany), the 1 wt% chitosan solution was prepared in 0.5 vol% acetic acid (MilliQ) as described above. For the monoclonal antibodies (mAbs), stock solutions of up to 30 mg mL⁻¹ in phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 0.05 vol% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (PBST) were used. Since the original infusion solution contains stabilizing agents in addition to the monoclonal antibody ocrelizumab, the auxiliary components were removed immediately before spray drying by centrifuging the infusion solution in a desalting column (Zeba Spin, MWCO 40K; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), thus transferring the ocrelizumab to PBST. To determine the correct mass ratio of chitosan, ocrelizumab, and remaining trehalose in the spray-dried particles, a trehalose assay (K-TRE, Megazyme, Wicklow, Ireland) was performed after buffer transfer according to the manufacturer's instruction.

4

Both the chitosan and low molecular weight API solutions were cooled to room temperature (RT) under tap water. Immediately prior to the spray-drying experiment, the respective API stock solution and the chitosan solution were mixed to achieve a homogenous spray drying solution.

A Büchi B-290 mini spray dryer (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) equipped with a two-fluid nozzle with 1.5 mm nozzle cap diameter was heated to either 100 °C or 160 °C inlet temperature using compressed air with a flow rate of 12.94 g min⁻¹ and an aspiration rate of 100 %, corresponding to ~700 g min⁻¹ in the open system. Once inlet and outlet temperature reached stable values, the system was purged with MilliQ water for 1.5 min. The API-chitosan feed solution was then pumped at 4.46 mL min⁻¹ while stirring at 300 rpm. After the experiment, the system was again quickly rinsed with water.

The particle yield is referred to as the difference between the sum of the original weight of chitosan and the respective API used and the total weight of particles produced.

$$Particle\ Yield\ [\%] = \frac{m_{particles}}{m_{chitosan} + m_{API}} \times 100 \quad (2)$$

Determination of Residual Moisture Initially and After Storage

Initial residual moisture was determined for three samples of each particulate sample by weighing 5 mg into an 8 mL glass vial and drying at 60 °C for 24 hours. The weight loss due to evaporation is referred to as initial residual moisture.

$$Initial\ Residual\ Moisture\ [\%] = \frac{m_{dried\ particles}}{m_{fresh\ particles}} \times 100 \quad (3)$$

To characterize the water uptake of spray-dried particles during storage, three samples of 10 mg particles each were stored for seven days and five weeks, respectively. The weight gain during storage is referred to as water uptake.

$$\text{Residual Moisture after Storage [\%]} = \frac{m_{\text{fresh particles}}}{m_{\text{stored particles}}} \times 100 \quad (4)$$

Scanning Electron Microscopy

The powder samples were fixed directly on a sample holder with conductive scanning electron microscopy (SEM) tape. A thin layer of platinum was sprayed on all samples before measurement. Measurements were performed at a magnification of 5 kX using either a Leo Gemini 1530 VP microscope at 5.00 kV or a Gemini SEM 500 at 3.00 kV (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Germany) using the InLens detector and SE2 for signal B.

Particle Size Distribution

Numeric and Volumetric Size Distribution

Spray-dried particulate samples were measured by static light scattering at a stirring speed of 1500 rpm using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) and its μP 2000 measuring cell. The spray-dried powder sample was first dispersed in 2-propanol (VWR International, Radnor, USA) by sonicating for 3 s. Samples were measured and automatically displayed in the sensitive volumetric size distribution. The results were additionally converted to a numerical size distribution using Malvern Mastersizer 2000 software (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom), taking into account particles ranging from 20 nm to 2 mm.

4

Polydispersity Index

The polydispersity index (Pdl), which is not automatically reported by the Mastersizer 2000 software, was calculated following Equation (4) with the mean particle diameter d_m in μm and the standard deviation σ (Clayton et al., 2016). Particles are described as monomodal for Pdl values below 0.1 (Hughes et al., 2015).

$$Pdl = \left(\frac{\sigma}{d_m} \right)^2 \quad (5)$$

Theoretical Assumption of Loading Dependent Increasing Amount of mAb Molecules and Decrease of Chitosan Molecules

To validate the measured increase in particle size by comparing the particles loaded with 5 wt% mAb to the particles loaded with 15 wt%, we calculated the expected increase in mAb molecules and the decrease in chitosan molecules. The encapsulated mAb ocrelizumab is characterized by a molecular weight of 145568 Da (FDA, 2017), whereas 1 Da corresponds to $1.66 \cdot 10^{-18} \mu\text{g}$. The chitosan derivative studied here is characterized by a molecular weight (MW) of 150-300 kDa, so we assumed a mean MW of 225 kDa. For a 1000 μg particle sample the number of molecules was assumed according to Equations (5) and (6). Additional minor components of the spray-dried particles, such as trehalose or acetic acid residues, were not considered in this theoretical assumption.

$$\text{Number of mAb molecules} = \left(\frac{50 \mu\text{g}}{145568 \text{ Da} * 1.66 \cdot 10^{-18}} \right) = 2.06 \cdot 10^{14} \quad (6)$$

$$\text{Number of chitosan molecules} = \left(\frac{950 \mu\text{g}}{225000 \text{ Da} * 1.66 \cdot 10^{-18}} \right) = 2.54 \cdot 10^{15} \quad (7)$$

$$\text{Increase of mAb molecules} = \frac{\text{Number of mAb at 15\%wt.}}{\text{Number of mAb at 5\%wt.}} = \frac{6.21 \cdot 10^{14}}{2.06 \cdot 10^{14}} = 3 \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \text{Decrease of chitosan molecules} &= \frac{\text{Number of chitosan molecules 5\%wt.}}{\text{Number of chitosan molecules 15\%wt.}} \quad (9) \\ &= \frac{2.54 \cdot 10^{15}}{2.27 \cdot 10^{15}} = 1.12 \end{aligned}$$

High Pressure Liquid Chromatography

To quantify the amount of biotin released either after particle encapsulation or during *in vitro* dissolution assays, we have developed a new isocratic and rapid HPLC method. Biotin can be analyzed in the range of 1–200 mg mL⁻¹. For quantification, a C18 silica column Superspher 100 RP 18.4 μm and 125 mm x 4 mm (Dr. A. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch, Germany) was used, equilibrated for 60 min at 40 °C with 18 vol% methanol (VWR International, Radnor, USA) and 82 vol% 0.1 vol% acetic acid (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) prior to usage. When 20 μL per sample is injected, the retention time of biotin is ~7 min at a pump flow rate of 1 mL min⁻¹. The sample can be detected at 12.5 Hz, 1.2 nm slit width, and 210 nm using a photodiode array detector (deuterium lamp, SPD-M20A, Shimadzu, Kyōto, Japan). A Shimadzu HPLC instrument (Kyōto, Japan) was used for the measurements, and the initial sample analysis was performed using LC solution software (Shimadzu, Kyōto, Japan).

Spectroscopic Analysis

Intrinsic Fluorescence and Circular Dichroism

The spray-dried particles and ocrelizumab were diluted in 5 mM acetate buffer, 2 mM dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) at pH 5.5 and a final concentration of 1 and 0.1 mg mL⁻¹, respectively. Intrinsic Fluorescence (IF) tryptophan spectra were then recorded at 25 °C from 300 to 450 nm (excitation at 280 nm) using a 3×3 mm black wall quartz on an Agilent Cary Eclipse spectrofluorimeter (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) equipped with a temperatured cuvette holder connected to an PCB 1500 water Peltier system (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

Far-UV circular dichroism spectra were recorded at 205–250 nm and 25 °C using a 1 mm path length on a Jasco J-810 spectropolarimeter (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a temperatured cell holder connected to a Thermo Haake C25P water bath (Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Germany). To obtain a reference spectrum for the denatured ocrelizumab, it was incubated at 0.1 mg mL⁻¹ in 6 M guanidine hydrochloride for 30 min. The spectrum of the non-loaded chitosan particles was subtracted from the spectrum of the ocrelizumab-containing particles, then all spectra were normalized to the maximum value of IF and compared. In CD

experiments, the spectra cannot be simply normalized to mean residue ellipticity, where $[\theta]$ is the mean residue ellipticity in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, θ is the ellipticity in mdeg, optical path length is in cm, concentration in g L^{-1} , and molecular weight in g mol^{-1} . We therefore considered the wavelengths corresponding to the lowest negative peak.

$$[\theta] = \frac{\theta}{\left(\frac{10 \cdot N \cdot \text{residues} \cdot \text{optical path} \cdot \text{concentration}}{\text{molecular weight}}\right)} \quad (10)$$

Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) analysis was performed using a Vertex 70 instrument equipped with an attenuated total reflection (ATR) crystal (Bruker Corporation, Billerica, USA). 5 mg spray-dried powder samples were pressed onto the ATR crystal and measured in the range of 400 to 4000 cm^{-1} . Atmospheric compensation, baseline correction, and normalization of the obtained spectra were performed in Opus software (Bruker Corporation, Billerica, USA). The second derivative of the amide I band in the range 1560 to 1720 cm^{-1} was calculated in Origin software (OriginLab, Northampton, USA), plotted, and smoothed with a fifth-order polynomial fit.

Differential Scanning Calorimetry

DSC measurements were performed using a DSC 200 F3 calorimeter (Erich Netzsch GmbH & Co. Holding KG, Selb, Germany). 12 mg of the particulate powder sample was placed in an aluminum crucible and sealed. The heating cycle was performed at a heating rate of 10 K per minute between 20 °C and 200 °C. The heat flux was recorded, and T_g was extracted as the maximum of the endothermic shift from the first derivative of the data.

Micro-BCA Assay and Sandwich ELISA

Micro-Bicinchoninic Assay

To quantify the amount of encapsulated and released ocrelizumab a micro-BCA assay (Micro BCA Protein Assay Kit 23235, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) was performed according to the manufacturer's protocol. Due to the substantial difference in size, ocrelizumab (eight standards, 0.5-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was used for the standard curve instead of the bovine serum albumin supplied. Either samples from dissolution assays were analyzed directly or, for the determination of encapsulation efficiency, 5 mg of spray-dried particles were completely dissolved in 0.5 vol% acetic acid (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) containing 0.05 vol% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and analyzed accordingly. If necessary, samples were further diluted.

Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

To quantify the structural integrity of mAbs, we performed a sandwich ELISA with Microlon 96-well high binding microtiter plates (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). The coating was performed overnight at 4 °C with anti-human kappa light chain coating-antibody from goat (K3502, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluted at 0.22 µg mL⁻¹ in coating buffer (30 mM sodium carbonate, 70 mM sodium hydrogen carbonate; Carl Roth, Karlsruhe, Germany). After washing (three times 200 µL per well) with PBST (0.05% Tween 20 PBST, 140 mM NaCl, pH 7.4), 200 µL/well Pierce Protein Free Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) were added and incubated for at least 1 hour at 37 °C. After an additional washing step, 100 µL of samples or standards (0.0005-3 µg mL⁻¹) were added per well and incubated for 30 min at 37 °C. After another washing step, 100 µL/well of the detection antibody directed against the human Fc domain and coupled with horseradish peroxidase (HRP) (A0170, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany; diluted 1:6000 in PBS) were added and incubated for at least 30 min at 37 °C. After a final washing step, 50 µL of 3',3',5',5'-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) were added to each well and incubated at room temperature (RT) in the dark until a sufficient color development was observable (> 30 minutes). The enzymatic reaction was stopped by pipetting 50 µL of 0.5 M sulfuric acid (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) into each well. Readings were taken immediately at 450 nm using a BioTek Synergy 2 Microplate Reader (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). All determinations were done at least in triplicate. The analysis was performed either for samples from the dissolution assay or for 5 mg spray-dried samples dissolved in 0.5 vol% acetic acid containing 0.05 vol% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). If necessary, samples were further diluted in PBST.

4

Encapsulation Efficiency

To determine the encapsulation efficiency of spray-dried chitosan particles, at least three replicates of 5 mg each were weighed into glass vials and mixed with 5 mL of 0.5 % acetic acid by volume (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) supplemented with 0.05 vol%. Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and completely dissolved with shaking at 500 rpm and RT. For quantification of biotin by HPLC, the dissolved chitosan was precipitated by adding 1 wt% TPP (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). After shaking at 500 rpm and RT for 20 min, the samples were centrifuged at RT and 15000 rpm for 10 min. 500 µL of the supernatant were transferred to an HPLC vial using a 0.1 µm syringe filter and analyzed. For quantification of ocrelizumab by micro-BCA assay or ELISA, the sample was diluted in either 0.5 vol% acetic acid with 0.05 vol% Tween 20 or PBST pH 7.4 (140 mM NaCl) to achieve the detection range of the standard curve.

***In Vitro* Dissolution Testing and Diffusion Coefficient**

***In Vitro* Dissolution Testing**

In vitro dissolution tests were performed in 100 mL flasks (Schott AG, Mainz, Germany) near physiological conditions at the olfactory mucosa, pH 6.5 and 37 °C. Spray-dried particles containing biotin were analyzed in PBS (pH 6.5). For this purpose, 100 mg of particles were weighed into a dialysis adapter (USP 4 particle adapter; Erweka GmbH, Langen, Germany) equipped with Spectra/Por 3 RC standard dialysis tubing (MWCO 3.5 kDa, 18 mm width) (Repligen, Waltham, USA). The adapter was placed in a flask containing 50 mL of PBS and incubated at 37 °C and 125 rpm on a thermo shaker. After 0-144 hours, 500 µL samples were

taken each time. Chitosan particles containing ocrelizumab were analyzed in PBST (140 mM NaCl, pH 6.5). 50 mg of the particles were weighed into a dialysis adapter (USP 4 crème cell adapter; Erweka GmbH, Langen, Germany) equipped with a polycarbonate membrane (0.2 µm pore size; Osmonics Inc., Hopkins, USA). The adapter was placed in a flask containing 30 mL PBST and incubated at 37 °C and 50 rpm on a thermo shaker. 600 µL samples were drawn and replaced with 600 µL PBST after 0-360 h each.

Diffusion Coefficient

Diffusion coefficients D in $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ for biotin and ocrelizumab were calculated for the utilized dissolution setting, taking the time of complete concentration balance equivalent to complete release $t_{\text{Complete Release}}$ and the area of the adapter membrane A_{Membrane} into account.

$$D_{\text{Membrane}} = \frac{A_{\text{Membrane}}}{t_{\text{Complete Release}}} \quad (11)$$

4.1.4 Results and Discussion

A series of different chitosans were spray-dried with and without the presence of mAbs or low molecular weight compounds at two different temperatures (100 °C and 160 °C). Spray drying temperatures between 70 °C and 220 °C were previously reported for IgG molecules, whereas Bowen et al. 2013 investigated different trehalose ratios at spray drying inlet temperatures of 100-220 °C. Surprisingly, even spray-dried formulations prepared at inlet temperatures ≥ 180 °C caused less denaturation and aggregation than similar freeze-dried samples (Bowen et al., 2013), demonstrating the generally less harsh conditions of spray drying compared to widespread methods such as freeze-drying, and consequently revealing spray drying as a promising method for industrial production of antibody formulations. Maury et al. (2005) studied the formulation of IgG with sorbitol and trehalose at spray-drying temperatures of 190 °C or 130 °C, with 130 °C resulting in beneficial stability monitored by FT-IR, HPLC-SEC, and DSC. Dani et al. (2007) studied spray drying of IgG at an inlet temperature of 70 °C. They investigated the integrity of IgG by FT-IR, CD, and ELISA to demonstrate protein structure integrity and binding ability. Mutukuri et al. (2021) on the contrary recently reported that spray drying of mAbs at an inlet temperature of 70 °C was unsuccessful. Consequently, the spray drying process is rather limited to temperatures ≥ 70 °C because of the needed evaporative pressure. The upper limit of spray drying temperatures, on the other hand, is not well defined yet. In addition, it is known from DSC measurements that Fab and Fc subunits of IgG molecules have different T_g and therefore unfold sequentially. The T_g of Fab has been found to be ~ 61 °C, while the Fc fragment should be stable up to ~ 71 °C (Kaur, 2021; Nemergut et al., 2017; Sedlák, Schaefer, Marek, Gimeson, & Plückthun, 2015; Vermeer & Norde, 2000). Therefore, we investigated herein the spray drying inlet temperatures 100 °C and 160 °C, because 100 °C should result in outlet temperatures below IgG subunit melting temperatures, whereas 160 °C should result in temperatures above those.

Further, the spray drying process and the obtained product were extensively studied and characterized, i.e., in terms of yield, residual moisture in the product, particle morphology, and particle size distribution. The encapsulation efficiency and structural integrity of encapsulated APIs was investigated, as well as the sustained release of ocrelizumab and biotin. Biotin especially was

considered as low molecular weight API, since it has already been investigated in pilot studies in patients to combat PPMS (Sedel et al., 2015; Tourbah et al., 2016). Biotin was found to benefit the improvement of PPMS symptoms by increasing energy production in demyelinated axons and enhancing myelin synthesis in oligodendrocytes (Peyro Saint Paul et al., 2016). Since the low molecular weight compounds used (biotin, fluorescein sodium salt, fluorescein amine, and rhodamine B) are orders of magnitude lighter and smaller compared to the mAbs, they are summarized as "small molecules" in the following. Besides the previously described mAb ocrelizumab, we herein used bevacizumab. This mAb is currently under investigation for the intranasal treatment of hereditary hemorrhagic telangiectasia-associated epistaxis (Cheng, Bao, & Rich, 2010; Diaz et al., 2017; Karnezis & Davidson, 2012) and may also hold promise for intranasal use in the treatment of glioblastoma, as it was generally approved for glioblastoma in 2009 (Diaz et al., 2017).

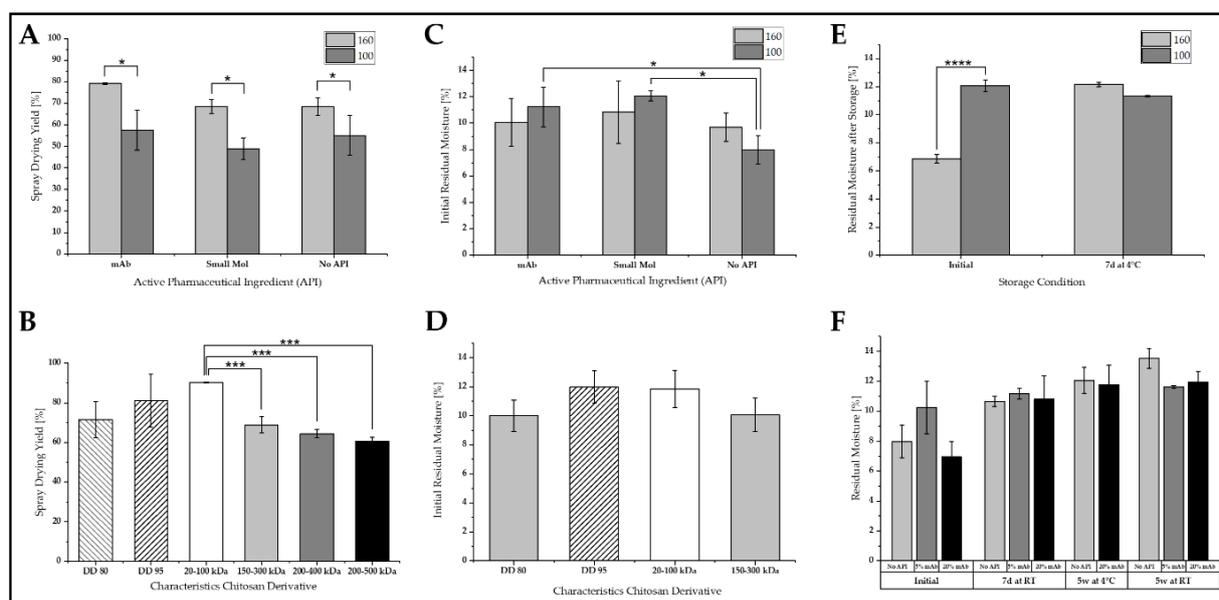


Figure 7: **A:** Powder yield for encapsulation of monoclonal antibodies (mAb), small molecules (Small Mol) and non-loaded particles (No API), impact of spray drying inlet temperature (100 °C, 160 °C). **B:** Particle yield at 160 °C inlet temperature, effect of chitosan properties (degree of deacetylation (DD) & molecular weight (MW)). **C:** Comparison of initial residual moisture (RM) after production with respect to encapsulated active ingredient (mAb, Small Mol, and No API) and temperature (100 °C, 160 °C). **D:** Initial RM of non-loaded particles, impact of chitosan properties (DD, MW). **E:** Influence of temperature (100 °C, 160 °C) on initial RM and RM after seven days storage in refrigerator at 4 °C and 26±1 % relative humidity (RH), exemplified for particles containing 5 wt% biotin (Small Mol). **F:** Influence of mAb loading concentration on initial RM, RM after seven days of storage at room temperature (RT) and 19±1 % RH, after five weeks at RT and 19±1 % RH, and after five weeks at 4 °C and 26±1 % RH. ($n \geq 3$).

Yield at Spray Drying Temperatures 100 °C and 160 °C

For a new spray drying process, the total particle yield is one of the most important parameters for future production and scale-up scenarios. Non-loaded chitosan particles and particles loaded with small molecules (biotin, fluorescein sodium salt, fluoresceinamine, and rhodamine B) achieved similarly high yields of 68.43±4.16 % and 68.51±3.36 % (Figure 7A) at spray drying inlet temperature of 160 °C. Thus, we concluded that despite the differences in the chemical nature of the low molecular weight compounds used in this study, their molecular composition had no significant effect on the spray drying process. The encapsulation of mAbs resulted in even

higher yields of 79.20 ± 0.42 %, whereas the encapsulation of mAbs at 100 °C inlet temperature caused no change compared with non-loaded chitosan particles. At a spray drying inlet temperature of 100 °C, similar yields for non-loaded chitosan particles and 5 wt% mAb loaded ones (55.12 ± 9.18 %; 57.63 ± 9.32 %) were observed. Consequently, spray drying at constant inlet temperature is highly reproducible across different APIs, demonstrating the robustness of the process.

In contrast, particles prepared at 160 °C spray drying inlet temperature resulted in significantly higher yield than similar ones spray-dried at 100 °C, whereas the yield of non-loaded particles increased significantly from 55.12 ± 9.18 % to 68.43 ± 4.16 % (Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$), the yield for the encapsulation of small molecules from 48.99 ± 4.45 % to 68.51 ± 3.36 % (Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$), and for mAbs from 57.63 ± 9.32 % to 79.20 ± 0.42 % (unpaired t-test, $p < 0.05$). As a consequence, the spray drying temperature was found to be a significant factor affecting yield across all samples, regardless of the encapsulated API (unpaired t-test, $p < 0.0001$). This effect is described by a known parameter proportionality between yield and spray drying temperatures, where higher inlet temperatures result in higher outlet temperatures, thus preventing sticking of particles to the spray dryer walls (Büchi, 1997; Ozmen & Langrish, 2002; Paudel et al., 2013; Stahl, 1980). Consequently, particles with a lower water content result in a more separable dry product, which increases particle yield.

In addition, the threefold increase to a 15 wt% mAb loading concentration did not result in significantly different yields (59.44 ± 2.63 %). The determined slight increase in particle yield from 5 wt% to 15 wt% mAb loading can be explained by the increase in particle size due to the higher drug concentration. Therefore, sequentially more particle material passes per time point through the spray drying nozzle, resulting in a higher particle mass, thus benefiting particle separation (Büchi, 1997; Paudel et al., 2013; Stahl, 1980).

The comparison of small lab scale (batch size 300 mg) and continuous larger lab scale (batch size 2500 mg) up to 40 min revealed similar yields, both at 100 °C (e.g., "mAb"; small scale 60.17 ± 6.59 %; large scale 54.36 ± 9.81 %) and at 160 °C inlet temperature (e.g., "Small Mol"; small scale 67.45 ± 0.69 %; large scale 70.62 ± 4.34 %). Consequently, batch scale is not a significant factor impacting yield and the spray drying parameters developed here are not only advantageous at very small laboratory scale to study various expensive biomolecules, but they are also suitable for continuous production up to 40 min, which is very promising for further scale-up and continuous industrial production.

The spray drying yield was significantly influenced by the MW of the chitosans investigated but not by their DD. In order to gain deeper insight into which chitosan properties affected the particle yield, we used different native chitosan derivatives varying in their DD (DD80, DD95) and their MW (20 - 100 kDa, 150 - 300 kDa, 200 - 400 kDa, and 200 - 500 kDa) and examined their influence on the particle yield resulting from the spray drying process. The results are displayed in Figure 7B and reveal that the DD did not significantly influence the spray drying yield. In contrast, the achieved particle yield was significantly higher for the chitosan derivative with a MW of 20 - 100 kDa compared to 150 - 300 kDa, 200 - 400 kDa, and 200 - 500 kDa high molecular derivatives (ANOVA, $p < 0.0005$). This is attributable to the significantly lower viscosity of the utilized 1 wt% feed solution, which is 8 - 15 mPa s in a 1 % acetic acid solution at 20 °C (Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Germany) for the low molecular derivative (20 - 100 kDa) and in contrast 151 - 350 mPa s for the medium molecular derivative (150 - 300 kDa). Despite the high viscosities ranging from 351 - 750 mPa s and 751 - 1250 mPa s in 1 % acetic acid at 20 °C (Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Germany) of the high molecular chitosans (200 - 400 kDa, 200 - 500 kDa),

we herein processed these derivatives at a solution concentration of 0.25 wt%, enabling successful processivity in spray drying, but nevertheless resulting in lower yields than the 150-300 kDa derivative. In contrast, 1 wt% solutions of these derivatives were not usable for particle production, because the droplet separation was very limited, forming films instead of particles. For high molecular weight particles, deposition at the walls of the drying chamber was observed, which could have caused the reported yield loss of $\geq 20\%$. However, no significant difference between the high molecular derivatives was observed, and there is a trend of proportional increase in yield with lower MW, which could be attributed to the polymer length influencing droplet atomization at the nozzle tip. Therefore, solution viscosities should be adjusted to values below 350 mPa s to achieve high and reproducible spray drying yields $\geq 60\%$.

From the studies on the influence of DD and MW, we concluded that it would be advisable to select the chitosan derivative with 80 % deacetylated residues and a MW of 150-300 kDa for the further drug encapsulation studies. Sun et al. (2009) also reported chitosan derivatives of medium molecular weight (480 kDa) as beneficial in terms of spray drying, encapsulation efficiency, and controlled release behavior (Sun et al., 2009). However, the low molecular weight derivative (20-100 kDa) used here was more beneficial in terms of yield but could not be used for drug encapsulation studies because it would dissolve too quickly *in vitro* as also previously described by Sun et al. (2009), and therefore no controlled release of APIs could have been achieved.

4

Residual Moisture and Storage

Initial Residual Moisture

The residual moisture of the produced particles was investigated as it is a critical parameter for the manufacturability, storage stability and thus bioactivity of the encapsulated API. At 160 °C spray drying inlet temperature, the resulting residual moisture remained constant regardless of the encapsulated API ("no API" 9.69 \pm 1.07 %, "Small Mol" 10.82 \pm 2.37 %, "mAb" 10.07 \pm 1.82 %; Figure 7C). For particles prepared at an inlet temperature of 100 °C, the addition of either small molecules or mAbs significantly increased the residual moisture from 7.99 \pm 1.09 % (no API) to 12.07 \pm 0.40 % (Small Mol) and 11.22 \pm 1.51 % (mAb) (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). The addition of the drug could have slightly increased the viscosity of the spray drying solution, e.g. through the possible intermolecular forces acting between the API and chitosan molecule, and thus slightly decreased the evaporation of the droplets, which could lead to the observed increased residual moisture content compared to empty chitosan particles. In contrast, the degree of deacetylation and the molecular weight of the chitosan derivative used, did not significantly affect the initial residual moisture of the particles (Figure 7D). The batch scale did slightly reduce the initial water content of the spray-dried particles with e.g., 9.91 \pm 2.89 wt% (small scale, 300 mg) and 8.91 \pm 1.95 wt% (large scale, 2500 mg) for the encapsulation of mAbs at 100 °C, or 12.27 \pm 2.73 wt% (small scale, 300 mg) and 8.38 \pm 1.84 wt% (large scale, 2500 mg) for the encapsulation of small molecules at 160 °C. We concluded that a robust spray drying setup with well-defined parameters can be efficiently used for various chitosan derivatives, and continuous production is even slightly beneficial for reducing the residual moisture of spray-dried particles, thus indicating promising potential for further scale-up in industrial production. The 3-fold increase in API loading resulted in significantly lower residual moisture content of 6.95 \pm 1.01 wt% (15 wt% mAb) compared to 11.22 \pm 1.51 wt% (5 wt% mAb) (Mann-Whitney U test, $p < 0.005$). This could be explained by an overall lower moisture content in the system due to the higher mass concentration of the feed solution. Consequently, more particle material is fed through the spray

drying nozzle per time point, resulting concurrently in less water present per time point at the nozzle tip, thus favoring drying (Büchi, 1997; Paudel et al., 2013).

Residual Moisture after Storage

In addition, the storage stability of the clinically relevant APIs biotin and ocrelizumab was investigated by residual moisture determination after different storage times at RT and 19±1 % relative humidity (RH) or in the refrigerator at 4 °C and 26±1 % RH. The initial residual moisture of particles containing 5 wt% biotin prepared at a spray drying inlet temperature of 160 °C resulting in an outlet temperature of 72±2 °C was 6.87±0.31 wt%. The observed initial residual moisture at 160 °C was lower than 12.07±0.40 wt% of particles produced at 100 °C inlet temperature and a resulting outlet temperature of 38±2 °C (Figure 7E). After seven days of storage at 4 °C and 26±1 % RH, the residual moisture of the drier particles prepared at 160 °C increased significantly (unpaired t-test, $p < 0.0001$) to 12.17±0.15 wt%, while it balanced with the nearly constant residual moisture of 12.07±0.40 wt% of the particles prepared at 100 °C. 5 weeks storage at RT and 19±1 % RH or in the refrigerator at 4 °C and 26±1 % RH resulted in higher moisture than 7 days storage at RT (19±1 % RH) (Figure 7F), i.e. 13.54±0.67 wt% (No API), 11.47±0.75 wt% (5 wt% mAb), and 11.95±0.70 wt% (20 wt% mAb) after 5 weeks storage at RT (19±1 % RH). Overall, storage was found as a significant factor influencing residual moisture (Two-Way ANOVA, $p < 0.0001$), as evidenced by increased residual moisture after storage. Storage at RT is more beneficial than storage in the refrigerator due to the 7±1 % higher humidity in the refrigerator. This was observed despite the use of closed glass vials for particle storage. In contrast, loading did not show any significant effect on residual moisture after storage, which consequently leads to beneficial storage at RT regardless of the amount of drug encapsulated.

4

Particle Morphology

For non-loaded chitosan particles composed of a DD80 chitosan derivative with a MW of 150-300 kDa, surface wrinkles appeared at 160 °C inlet temperature and 74±2 °C outlet temperature (Figure 8G). Particles loaded with small molecules, such as 5 wt% biotin, revealed the same behavior (Figure 8A, B). When the chitosan (DD80, 150-300 kDa) was instead loaded with 5 wt% ocrelizumab, a rough surface with broad wrinkles appeared at 160 °C inlet temperature (Figure 8C), which is attributed to the discontinuous evaporation at outlet temperatures of 74±2 °C due to the high evaporation pressure. At the same time, a so-called rush-hour effect (Paudel et al., 2013) takes place, which causes a larger inflated shell to break into surface wrinkles upon cooling. We previously published 100 °C as the optimal inlet temperature for the preparation of chitosan particles with smooth surfaces (Figure 8E) (Spindler et al., 2021), because at a resulting outlet temperature of 38±2 °C, evaporation occurs continuously and allows the formation of small pores in the matrix material. Consequently, the spray drying inlet temperature of 160 °C compared to 100 °C showed a significant effect on particle morphology. In contrast to the non-loaded particles and the particles containing 5wt% biotin, a finer surface roughness with denser wrinkles (Figure 8D) formed in the particles loaded with the high molecular weight antibody at 100 °C. The outlet temperature of 38±2 °C again leads to a lower evaporation pressure, but the viscosity increases due to the high molecular weight mAb, which in turn causes discontinuous evaporation and thus a rougher surface. Due to the partially lower evaporation pressure, the surface wrinkles are finer than at 160 °C.

Furthermore, we investigated loading with 15 wt% ocrelizumab (Figure 8F) at 100 °C. The chitosan particles loaded with 15 wt% again showed a rougher surface and wider wrinkles on the surface compared to the particles loaded with 5 wt% ocrelizumab at 100 °C, but similar to the particles loaded with 5 wt% ocrelizumab at 160 °C. Firstly, this could be due to the slightly higher outlet temperature of 43 ± 2 °C, which in turn results in a higher evaporation pressure leading to a stronger blow-up effect. Secondly, the increased viscosity of the 15 wt% solution compared to the 5 wt% feed solution is due to the three times higher mAb loading higher, which additionally causes discontinuous evaporation. The total evaporation enthalpy as a combination of the two influencing parameters (higher outlet temperature and higher viscosity) can be assumed to be similar to that of the lower viscosity 5 wt% mAb solution at 160 °C and therefore leads to a comparable surface morphology. Consequently, discontinuous evaporation is caused either by higher spray drying temperatures and thus high evaporation pressure or by highly viscous solutions hindering evaporation. Therefore, to achieve continuous evaporation for highly viscous solutions, e.g., by loading with high molecular weight APIs, it is necessary to apply a low inlet temperature in the spray drying process. The optimal inlet temperature for encapsulation of 5 wt% mAb is therefore assumed to be just below 100 °C. Due to the previously reported minimum required temperature successful in spray drying (Dani et al., 2007; Mutukuri et al., 2021) we suggest for 15 wt% loaded mAb even lower inlet temperatures between 70 °C and 100 °C, which could further benefit the bioactivity of the encapsulated sensitive biomolecules.

- 4 Additionally, different DDs and MWs of chitosan were investigated at 160 °C inlet temperature. The comparison of particles prepared with DD80 and a MW of 150-300 kDa (Figure 8I) with DD95 and identical MW (Figure 8G) revealed only a slight difference in the morphology, while no difference was found in the outlet temperature (75 ± 1 °C). The particles with more deacetylated groups seem to form a rougher surface structure with more pronounced wrinkles, which could be explained by the higher elasticity and viscosity of the raw material (Wenling et al., 2005), thus causing discontinuous evaporation, i.e., a blow-up effect, as described above. This effect is less pronounced for low molecular weight chitosan derivatives. Particles with MW 20-100 kDa and DD80 (Figure 8H) resemble DD95 particles (Figure 8J), which could be explained by the lower viscosity of the low molecular weight solutions, resulting in more pronounced continuous evaporation, leading to smoother particle surfaces as described above. This effect was supported by the observed lower outlet temperature of 72.5 ± 1.5 °C for low molecular weight derivatives. Consequently, the smoother surface morphology is again more pronounced at a lower DD and MW and at lower exit temperatures due to continuous evaporation during spray drying.

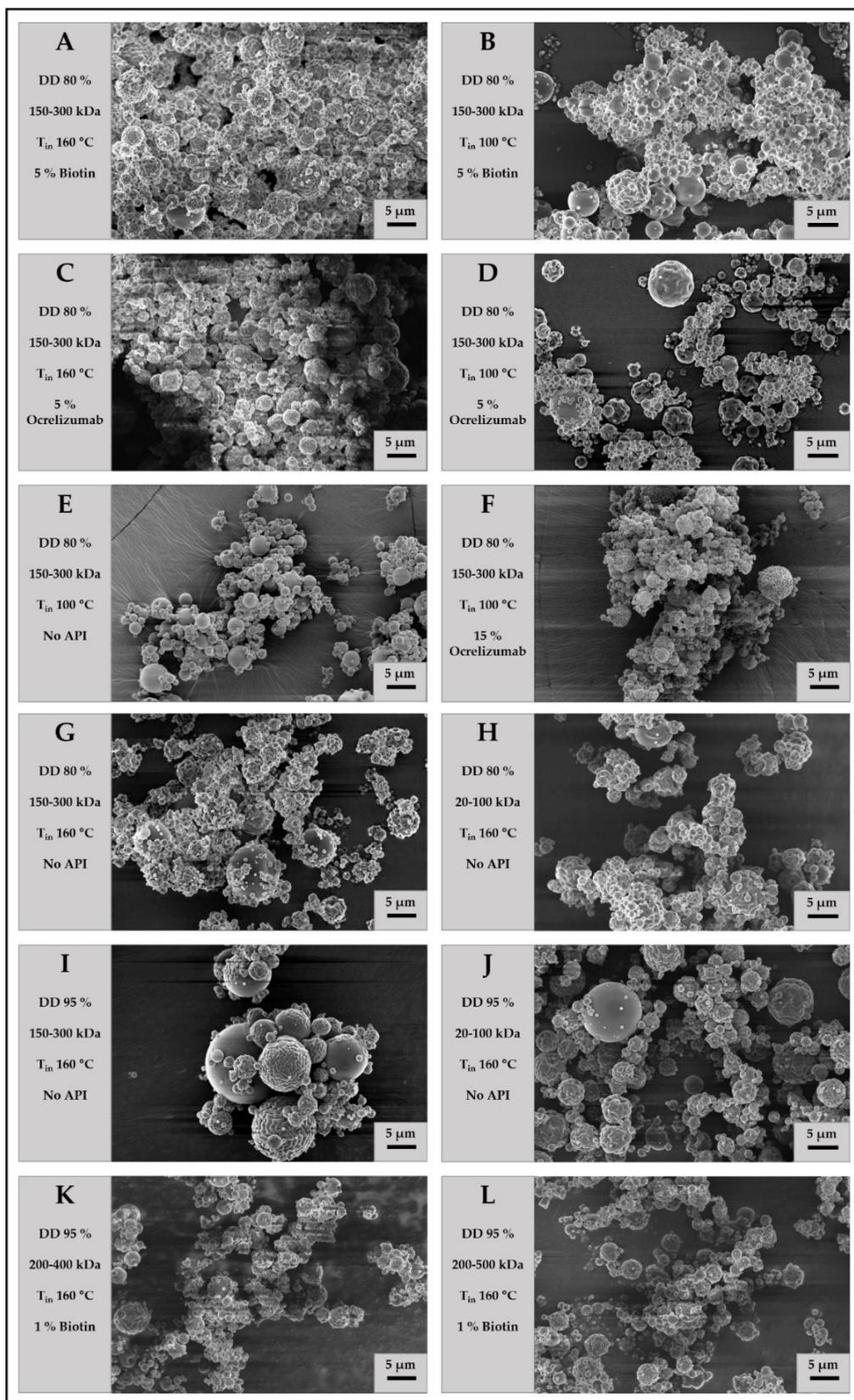


Figure 8: Scanning Electron Microscopy images of dry powder samples at magnification 5000x. **A-G**: Spray-dried particles of 80 % deacetylated (DD80) chitosan with a molecular weight (MW) of 150-300 kDa prepared at spray drying inlet temperatures of 160 °C or 100 °C without an active pharmaceutical ingredient (API) (**E**, **G**), with 5 wt% encapsulated biotin (**A**, **B**), 5 wt% encapsulated monoclonal antibody ocrelizumab (**C**, **D**), or 15 wt% encapsulated ocrelizumab (**F**). **H-L**: Spray-dried chitosan particles prepared at 160 °C consisting of DD80 chitosan with a MW of 20-100 kDa (**H**), or DD95 chitosans with MWs 150-300 kDa (**I**), 20-100 kDa (**J**), 200-400 kDa (**K**), and 200-500 kDa (**L**).

Finally, chitosan derivatives DD95 with MW 200-400 kDa and 200-500 kDa were investigated. These resulted in similar particle and surface morphologies (Figure 8K, L). Therefore, no effect of MW increase by ~100 kDa could be detected. In contrast, the resulting morphology was comparable to previously described particles with DD80 and MW 150-300 kDa, which could be due to similar solution viscosity. The same proportionality was previously found for the spray drying yield.

Overall, the MW of the chitosan derivative used proved to be a more significant factor than the DD in particle preparation by spray drying, which can be explained by similar viscosities in the range of DD70 to DD95 across all MWs). A significant influence of MW on mucoadhesion, controlled release behavior, and particle size distribution has been already reported by Sun et al. (2009) for spray-dried chitosan particles with DD96 and MWs between 40 kDa and 850 kDa.

Particle Size Distribution

The particles prepared by spray drying exhibit a similar monodisperse numerical size distribution with a maximum at 69 ± 9 nm diameter (Figure 9A) characterized by Pdl values of 0.02 ± 0.01 . Thus, all particles studied here exhibited similar numeric particle size distributions, further emphasizing the robustness of the spray drying parameters used here. In order to assess minor differences between individual particle samples, i.e., influence of MW, DD, spray drying inlet temperature, mAb loading concentration and batch size, the more sensitive volume distribution was used.

4

First, particles prepared with chitosan derivatives with MW of 20-100 kDa consist of more nanoparticles and smaller microparticles in the 1-20 μm diameter range (Figure 9B), whereas particles spray-dried with chitosan derivatives with MW of 150-300 kDa consist of fewer nanoparticles and larger microparticles up to 50 μm . This can be attributed to the higher viscosity of the spray-drying solution of higher molecular chitosan derivatives and thus larger droplets at the nozzle tip that subsequently dry into larger particles (Hede, Bach, & Jensen, 2008). This proportionality of increasing particle size with increasing MW has also been previously reported for emulsion-based preparation of chitosan nanoparticles (Benjamin R Riegger, Bäurer, Mirzayeva, Tovar, & Bach, 2018) and for spray drying (He, Davis, & Illum, 1999a; Sun et al., 2009).

Second, the chitosan particles that consist of DD80 chitosan showed slightly larger particles and more microparticles compared to the DD95 particles. This trend may be attributed to the higher swelling ability of DD80 chitosan compared to DD95 derivatives (Wenling et al., 2005). Due to the higher crystallinity of DD95 chitosan, the particles swell less and therefore fewer nanoparticles tend to agglomerate. Overall, the DD showed a smaller effect on the particle size distribution than the MW of the chitosan derivative.

Third, the non-loaded particles (DD80, 150-300 kDa) prepared at 100 °C compared to 160 °C inlet temperature show a broader size distribution characterized by more microparticles (Figure 9C). This may be attributed to the lower drying capacity at lower temperature, which may cause more droplet coalescence prior to drying. Comparing the non-loaded chitosan particles (100 °C) with the particles loaded with 5 wt% biotin (100 °C), the encapsulation of the small molecule biotin had no negative effect on the particle size. In contrast, the distribution has more nanoparticles and the microparticle fraction is narrower. The same result was observed for particles prepared at 160 °C. Thus, the encapsulation of biotin seems to stabilize the droplets during particle formation, which in turn leads to a more homogeneous product. Comparing the particles prepared at 160 °C containing 5 wt% biotin with the particles prepared at 100 °C, the second peak in particular is less broad at 100 °C, which is due to fewer agglomerates and could

be explained, for example, by the surface roughness of the particles. The particles prepared at 160 °C have a rougher surface with wrinkles, as described above (Section 3.3), which could favor the intermolecular forces manifested in the form of sticking and agglomeration of the particles.

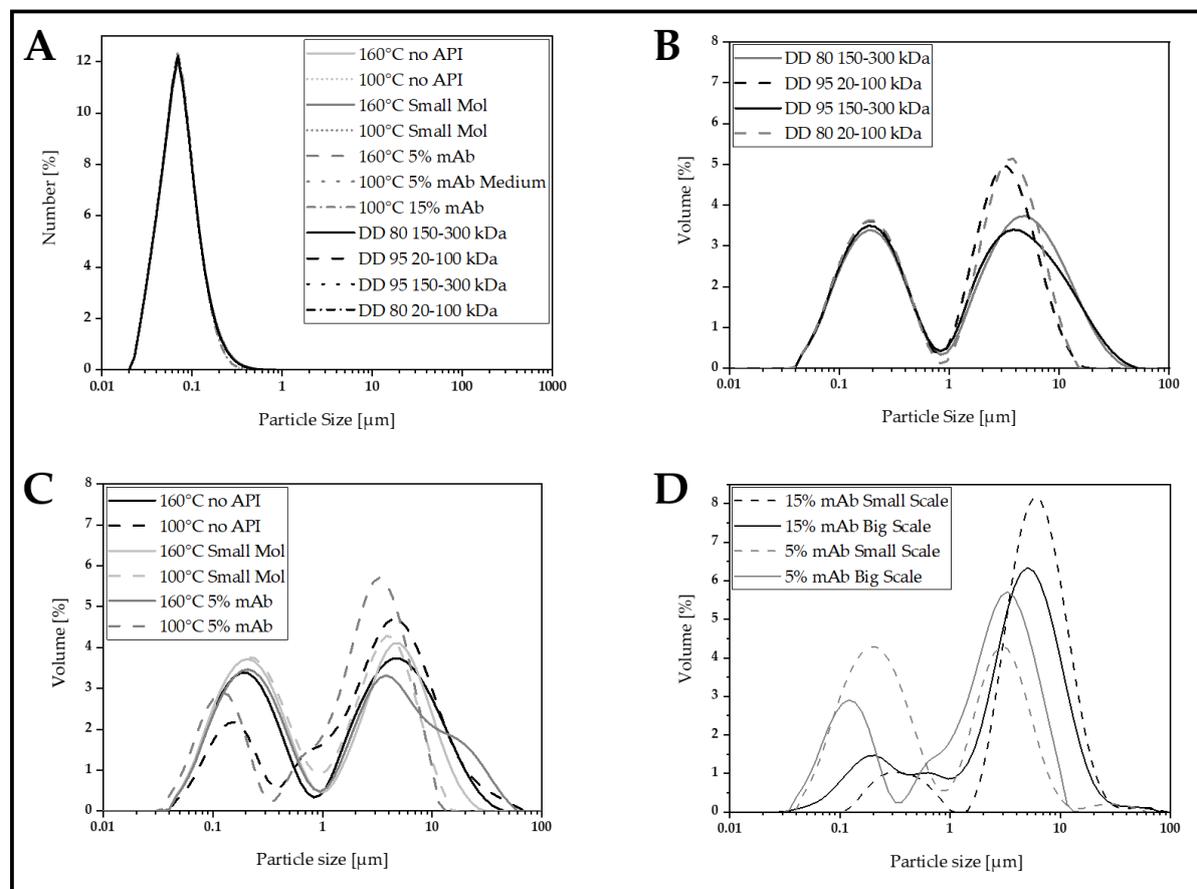


Figure 9: Numeric (A) and Volumetric (B-D) particle size distributions of particles spray dried at 100 °C or 160 °C inlet temperature determined via static light scattering. A: Comparison of different active pharmaceutical ingredients (API) (No API, Small Molecule, 5 wt% monoclonal antibody (mAb), 15 wt% mAb) and different chitosan derivatives. B: Comparison of 80 % deacetylated (DD80) and DD95 derivatives with molecular weights of 20-100 kDa and 150-300 kDa. C: Effect of temperature (100 °C vs. 160 °C) on particle size distribution. D: Comparison of mAb loading concentration (5 wt% vs. 15 wt%) and batch size scaling (300 mg vs. 2500 mg), exemplified for particles produced at 100 °C.

Particles containing 5 wt% of ocrelizumab consisted of significantly more microparticles and agglomerates, and the maximum particle diameter increased up to 50 μm. The increased number of microparticles could be attributed to either the higher MW and hydrodynamic volume of the API, or the positive charge of the mAb and the chitosan polymer, which repel each other. The encapsulated ocrelizumab is characterized by its isoelectric point at 9.2 (FDA, 2017). Therefore, the antibody is positively charged in the 0.5 vol% acetic acid spray-drying solution. The observed higher tendency for agglomeration could be again due to the rough surface of the particles as described above.

Finally, the impact of mAb concentration in the particles and batch size of the spray drying process are presented in Figure 9D. When comparing particles loaded with 5 wt% and 15 wt% prepared at a small scale of 300 mg per batch, the 3-fold increase in encapsulated mAb resulted in a shift to larger particles. The most prominent microparticle diameter (second peak) increased from ~2 μm to ~5 μm, representing a 150 % increase in diameter. The fraction of nanoparticles (first peak) decreased significantly, which can be attributed to the larger volume required to

encapsulate a larger amount of mAb molecules due to their MW and hydrodynamic volume. In addition, it is assumed that part of the nanoparticle fraction is empty due to the steric hindrances in the encapsulation of high molecular weight drugs. Thus, fewer nanoparticles are likely to be generated during spray drying due to the higher mAb concentration in the sample. Additionally, the densest sphere packing limits the number of encapsulated mAb in a single particle. The increase in particle size can be attributed to the increased amount of IgG molecules present, changing the ideal conformation to larger droplets. We have assumed here the hydrodynamic diameter of mAb molecules, since we assume that even in solid powder formulations the proteins should be in the amorphous state to ensure their natural conformation necessary for bioactivity.

Theoretically, a volume increase of 21 % is expected, since three times the amount of mAb molecules should be present in a single particle (calculated in Section 2.4). For a particle with a diameter of 2 μm , such as the microparticles described here (Figure 9D), $10.92 \cdot 10^6$ instead of $3.64 \cdot 10^6$ mAb molecules could be present in a single spray-dried particle if the mAb loading is increased from 5 wt% to 15 wt%. Assuming a hydrodynamic diameter of ~ 13 nm (Gagnon, Nian, Leong, & Hoi, 2015; S. K. Li, Liddell, & Wen, 2011) and a globular shape of the IgG molecules, the increased amount of mAb molecules would result in a volume increase of $8.37 \mu\text{m}^3$ and the particle diameter would theoretically increase to 2.88 μm , resulting in a 44 % increase in diameter. The same proportionality was observed for particles prepared at a batch size of 2500 mg, where the diameter of the microparticle majority was shifted from $\sim 2 \mu\text{m}$ (5 wt%) to $\sim 4 \mu\text{m}$ (15 wt%), corresponding to a 100 % increase in particle diameter. This calculation did not take into account possible steric hindrances due to the molecular charge and space requirements of the chitosan molecules, which are assumed to cause the remaining 56-106% of the increase in particle diameter compared to the experimentally determined results.

4

In continuous production (2500 mg, 40 min), the proportion of nanoparticles also decreased significantly. Fewer agglomerates with a diameter of up to 80 μm were observed on the large scale than on the small scale described previously. It is assumed that the agglomerate formation at the beginning of the process is likely due to particles adhering to and falling from the glass parts of the spray dryer. Once the system is in operation, no additional particles adhere and deposition in the sample vessel is not further affected. The $\sim 1 \mu\text{m}$ smaller majority of microparticles observed in continuous production compared to small scale can also be explained by the stabilization of the process over time. In addition, the surface tension of initial droplets could be affected by the initial dry and hot nozzle channel and tip, which slightly changes the atomization profile. Consequently, these larger particles and agglomerates are also present in the larger sample, but do not affect the overall particle size distribution because they represent a smaller fraction of the total sample than in the small scale.

Encapsulation Efficiency and Structural Integrity of Encapsulated API

The therapeutically relevant APIs biotin (small molecule) and ocrelizumab (mAb) were successfully encapsulated in chitosan by spray drying, with biotin yielding a particle loading of 4.42 ± 0.03 wt% (Table 1). A comparable loading of 4.30 ± 0.26 wt% was achieved for the high molecular mAb ocrelizumab. In addition, a highly successful loading of 15.64 ± 1.02 wt% of ocrelizumab was achieved. The corresponding encapsulation efficiencies determined by HPLC for biotin and micro-BCA assay for ocrelizumab are shown in Table 3.

Table 3: Quantitative loading of active pharmaceutical ingredients achieved by spray drying in chitosan with 80 % deacetylated residues and a molecular weight of 150-300 kDa. Remaining salt content from phosphate buffered saline supplemented with Tween 20 and additionally contained trehalose.

Active pharmaceutical ingredient (API)	API loading [wt%]	Trehalose content [wt%]	Salt content [wt%]
Ocrelizumab	15.64±1.02	4.45±0.23	5.16±0.80
Ocrelizumab	4.30±0.26	6.28±0.47	0.75±0.16
Biotin	4.42±0.03	-	-

In the chitosan derivative with DD80 and a MW of 150-300 kDa, 88.44±1.16 wt% biotin was successfully encapsulated (Figure 10A), while in the DD95 derivative with MW 200-500 kDa only 71.34±4.32 wt% and in the DD95 derivative with MW 200-400 kDa only 68.80±3.82 wt% were present, although the latter two derivatives did not differ significantly as their molecular weight varied only by 100 kDa. Consequently, the chitosan derivative used significantly affected the encapsulation efficiency (OneWay ANOVA with Bonferroni post hoc test; $p < 0.0001$). The higher encapsulation efficiency of the DD80 150-300 kDa derivative can be attributed to the better mixing of biotin and chitosan due to the shorter polymer length (Paudel et al., 2013). In addition, for processability reasons, the high molecular weight derivatives were spray-dried at a concentration of 0.25 wt% instead of 1 wt%, with consequently less chitosan present to incorporate biotin molecules, which further explains the lower encapsulation efficiency of high molecular weight chitosans.

Since we used the infusion solution containing ocrelizumab as raw material, the original solution was purified over desalting columns prior to spray drying to allow the high loading of 15 wt% (actual; 20 wt% theoretical) of ocrelizumab in chitosan. Ocrelizumab was transferred into PBST for the production of these particles. The remaining trehalose and salt content of spray-dried particles containing 4.30±0.26 wt% ocrelizumab - in general referred to as 5 wt% - was found to be 6.28±0.47 wt% trehalose and 0.75±0.16 wt% salts, while particles loaded with 15.64±1.02 wt% ocrelizumab - in general referred to as 15 wt% - contained 4.45±0.23 wt% trehalose and 5.16±0.8 wt% salts (Table 3).

The total amount of ocrelizumab encapsulated and released was quantified by micro-BCA assay and revealed an overall high encapsulation efficiency of 83.41±8.24 % for ocrelizumab (Figure 10B), whereas particles loaded with 5 wt% yielded an encapsulation efficiency of 86.03±9.17 % and particles theoretically loaded with 20 wt% yielded an encapsulation efficiency of 78.18±6.98 %. Consequently, a high loading capacity of mAbs was achieved simultaneously, supplemented with ~5 wt% trehalose, which is known as a stabilizing agent in spray-dried IgG formulations (Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, et al., 2005; Flávia Sousa et al., 2018). Since the bioactivity of encapsulated and released proteins is often critical, we additionally analyzed the remaining binding capacity of released ocrelizumab by sandwich ELISA. No significant difference was detected compared to drug levels determined at the tripeptide level (micro-BCA assay). The resulting mean binding capacity with 70.18±11.39 wt% (Figure 10B, structurally intact) is still high, suggesting structural integrity of ocrelizumab and thus promising for further testing of the developed particles in cell culture or *in vivo*.

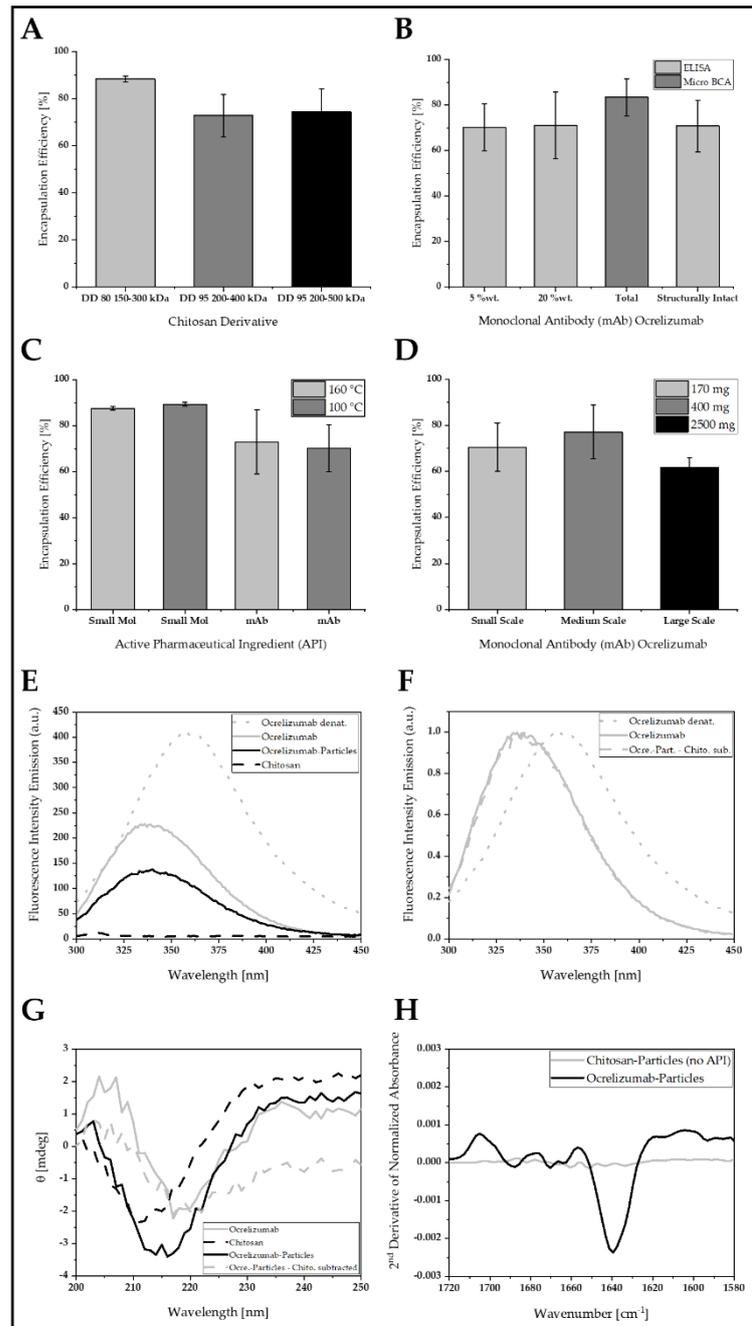


Figure 10: **A**: Influence of the utilized chitosan derivative at 160 °C spray drying inlet temperature on the encapsulation of biotin. Comparison of 80% deacetylated (DD80) chitosan with a molecular weight (MW) of 150-300 kDa to DD95 derivatives with MWs of 200-400 kDa and 200-500 kDa ($n=3$). **B**: Encapsulation efficiency of ocrelizumab (monoclonal antibody, mAb) in DD80 chitosan with a MW of 150-300 kDa. Comparison of total amount (micro-bicinchoninic acid (BCA) assay) and mean remaining binding capacity determined via sandwich ELISA (enzyme linked immunosorbent assay; "Structurally Intact"), as well as for 5 wt% and 20 wt%, respectively ($n=3$). **C**: Influence of spray drying temperature on the encapsulation of 5 wt% biotin and ocrelizumab (mAb; ELISA) ($n=3$). **D**: Influence of spray drying process batch size on the encapsulation of mAbs (≤ 160 °C, ≤ 15 wt%), 170 mg (small), 400 mg (medium) to 2500 mg (big) lab scale ($n=3$). **E**: Intrinsic fluorescence spectrum of ocrelizumab released from chitosan particles in comparison to pure chitosan and denatured ocrelizumab. **F**: Intrinsic fluorescence spectrum of pure ocrelizumab and ocrelizumab-chitosan particles in comparison to denatured ocrelizumab. **G**: Circular Dichroism spectrum of ocrelizumab in comparison to pure chitosan and ocrelizumab together with chitosan. **H**: Second derivative of Fourier-transform Infrared Spectrum of the amide-I band of ocrelizumab (mAb) encapsulated in chitosan (DD80, 150-300 kDa) and non-loaded spray-dried chitosan particles (DD80, 150-300 kDa; no API).

The spray-drying temperature of 100 °C compared with 160 °C was beneficial for the encapsulation of biotin (t-test; $p < 0.05$) (Figure 10C), but there was no detectable change in encapsulation efficiency or binding capacity for ocrelizumab, as the ELISA as a bio-based assay implies a higher standard deviation than the HPLC method used for the quantification of released biotin. Moreover, neither increasing the drug loading from 5 wt% to 15 wt% (Figure 10B) nor increasing the batch size 13-fold from 170 mg (small) to 2500 mg (large) affected the encapsulation efficiency (Figure 10C). These results again demonstrate the robustness of the spray drying parameters used, which are promising for further scale up and continuous production at industrial scale.

Furthermore, we investigated the structural integrity of the monoclonal antibody after encapsulation and release from the spray-dried chitosan particles using spectroscopic methods. Comparing the intrinsic fluorescence emission (Figure 10E and 10G) and circular dichroism of native ocrelizumab, denatured ocrelizumab, and the encapsulated mAb (Figure 10F), it can be seen that the IF and CD spectra did not change significantly after encapsulation compared with the native condition. The perfect overlap of the spectra of native ocrelizumab and encapsulated ocrelizumab (Figure 10F) is clearly seen, especially when compared to the denatured spectrum of ocrelizumab. The emission spectrum can be used as a structural signature because the peak of the spectrum shifts depending on the state of exposure of the fluorescent amino acids to water (Royer, 2006). For example, in a denatured protein, tryptophan residues that are in native state buried in the protein core are exposed to water and the spectrum hence differs from that of the native state.

In the CD experiments, chitosan shows a peculiar spectrum with minimal ellipticity values around 210 nm (Equation (5)). In contrast, the minimum measured for ocrelizumab is around 220 nm, indicating a mixture of alpha and beta structure (for a denatured protein with random coil structure, a negative peak would be observed below 200 nm) (N. J. Greenfield, 2006). The spectrum of chitosan particles containing ocrelizumab shows a mean minimal peak at 215 nm. The spectrum generated after subtracting the spectrum of the non-loaded chitosan particles from that of the ocrelizumab-containing particles shows a minimal peak at 220 nm and appears to be very similar to that of ocrelizumab alone. Consequently, the results of the IF and the CD experiments agree well, indicating that ocrelizumab retained its native structure after the encapsulation process.

In addition, the FT-IR spectrum of the spray-dried particles containing ocrelizumab showed the characteristic amide-I band of proteins, especially for IgGs, ranging from 1720 to 1560 cm^{-1} (Fu, Deoliveira, Trumble, Sarkar, & Singh, 1994; Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, et al., 2005). Despite the presence of N-acetylglucosamine subunits and free amino groups in the chitosan matrix, no signals were observed in the second derivative of the amide-I band for pure non-loaded spray-dried chitosan particles (Figure 10H). Therefore, FT-IR analysis of proteins and IgG molecules encapsulated in chitosan is reliable. When analyzing the spectrum of ocrelizumab encapsulated in chitosan, characteristic bands were observed in the second derivative at 1687 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} and 1614 cm^{-1} , which are similar to the bands of native IgG molecules reported by Costantino et al. (1997), Maury et al. (2005), and Schüle et al. (2007) (see Table 4). Recently, Sousa et al. (2018) reported similar wavenumbers for bevacizumab encapsulated in PLGA nanoparticles (Flávia Sousa et al., 2018) and Mutukuri et al. (2021) presented a comparable spectrum for electrostatic spray-dried mAb formulations - however they did not give specific values.

To determine the storability of the developed formulation containing 15 wt% ocrelizumab, we additionally determined the glass transition temperature (T_g) of the spray-dried chitosan particles by differential scanning calorimetry. The particles loaded with 15 wt% ocrelizumab had a T_g of 35.86 °C (Supplementary Figure S7), whereas pure crystalline chitosan is described by T_g values between 75 °C and 150 °C (Dong, Ruan, Wang, Zhao, & Bi, 2004). Pure trehalose is characterized by a T_g of 115 °C (Miller, de Pablo, & Corti, 1997) and IgGs are characterized by T_g values between 62 °C and 82 °C (Kaur, 2021; Nemergut et al., 2017; Sedlák et al., 2015; Vermeer & Norde, 2000). Nevertheless, Maury et al. 2005 reported a T_g of 42.8 °C for spray-dried IgG/trehalose (80:20) mixtures, similar to the results observed here. We additionally analyzed the T_g of non-loaded chitosan particles, which was 36.68 °C (Supplementary Figure S7). Consequently, the spray drying process itself already seems to cause the reduction of T_g .

Table 4: Amide-I band corresponding wavenumbers [cm^{-1}] reported for IgG molecules determined via Fourier-transform Infrared (FT-IR) spectroscopy.

Authors	Analyzed formulation	Wavenumber extracted from the 2 nd derivative FT-IR signals associated as amide-I band [cm^{-1}]				
		β -sheet	turn	turn	β -sheet	β -sheet or side chain
Fu et al. 1994	IgG molecule	1690	1677	1661	1637	1615
Costantino et al. 1997	Recombinant humanized immunoglobulin G, 20-60 wt% lactose	1691 \pm 2	1667 \pm 2	1661 \pm 2	1641 \pm 1	1615 \pm 1
Maury et al. 2005	Human IgG, 20 wt% trehalose (+ 8 wt% residual sorbitol)	1691	1674	1661	1637	1615
Schüle et al. 2007	Humanized chimeric IgG1, 20-80 wt% mannitol	~1690	-	~1665	~1639	~1616
Sousa et al. 2018	Avastin ® containing bevacizumab, 10 wt% trehalose	1691	-	-	1635	1614
In this study	15.64 \pm 0.03 wt% ocrelizumab, 4.45 \pm 0.23 wt% trehalose, ~79.91 wt% chitosan	1687	1670	1662	1639	1614

In addition, it is known that residual moisture significantly lowers the T_g of a formulation (Ozmen & Langrish, 2002). For example, an increase from 1.65 to 4.52 wt% water in spray-dried skim milk powder decreased the T_g from 87.7 °C to 46.7 °C. Maury et al. (2005) reported a residual moisture content of 5.3 % for their IgG formulation with 20 wt% trehalose. Non-loaded chitosan particles resulted here in a residual moisture of 7.99 \pm 1.09 %. Due to the residual moisture content of 6.95 \pm 1.01 wt% observed here for the particles loaded with 15 wt% mAb, it is clear that this moisture content contributed mainly to the reported low T_g of this formulation and is comparable to the formulation obtained by Maury et al. (2005). After storage for 5 weeks at RT, the T_g exhibited an decrease to 35.37 °C (Supplementary Figure S7), which however was not significant. In addition, the binding capacity by ELISA, suggesting bioactivity, remained constant with

14.62±0.67 wt% demonstrating storage stability and the remaining integrity of the drug. The developed spray-dried formulation with 15 wt% mAb is a promising formulation that is assumed to be long-term stable even at storage temperatures up to 35 °C, since it was described by Duddu et al. 1997 that increased molecular mobility and thus aggregation is only likely at storage temperatures above the T_g of the formulation (Duddu & Dal Monte, 1997). The long-term stability of this consequently promising formulation will be investigated in a follow-up study.

Controlled Release of Ocrelizumab and Biotin

The release kinetic of spray-dried particles was investigated in a dissolution setting *in vitro* at pH 6.5 and 37 °C comparable to the physiological conditions at the olfactory mucosa. The released API amounts were normalized with the respective encapsulation efficiencies.

We investigated the release kinetics of 5 wt% of the small molecule biotin encapsulated in different chitosan derivatives with varying degrees of deacetylation (DD80, DD95) and MW (150-300 kDa, 200-400 kDa, and 200-500 kDa). All chitosan derivatives tested did not result in a significant initial burst release within the first few hours (Figure 11A), which was due to the fact that the vitamin molecules were successfully encapsulated into the chitosan matrix material and there were no or only small amounts of molecules adhered to the surface of the particles (Paudel et al., 2013; Poulain et al., 2003). Furthermore, a complete release of 100 % biotin was achieved within 48 hours, followed by a plateau where all released molecules remained in the test environment. Furthermore, the different spray drying inlet temperatures investigated (100 °C, 160 °C) showed no significant effect on the release of biotin (Figure 11A). In comparison, the dialysis tubing used with a cutoff of 3.5 kDa and the low solubility of 200 mg L⁻¹ biotin in water itself resulted in complete diffusion within 24 h (Figure 11D). Consequently, the spray-dried chitosan formulation successfully prolonged the release of biotin for at least an additional 24 h, while diffusion itself was not the cause of the continuous release achieved. Considering the complete release within 24 h, the diffusion of biotin through the dialysis membrane gave a diffusion coefficient D_{Biotin} of $8.21 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Figure 11E). For the spray-dried particles (DD80, MW 150-300 kDa), a complete release of biotin was reported after 48 h (Figure 11B), thus leading to a reduced diffusion coefficient $D_{Biotin-particles}$ of $4.11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Figure 11E). Consequently, the diffusion coefficient of biotin was reduced by $4.11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ by formulating it in chitosan using spray drying.

In addition, the release of the therapeutic monoclonal antibody ocrelizumab was investigated. Concentration equilibration through the polycarbonate membrane used with a pore size of 0.2 µm was achieved within 21.72 h (Figure 11D). Subsequently, the diffusion coefficient D_{Ocre} for ocrelizumab in the dissolution setup was calculated to be $3.25 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Figure 11E), which is in the same order of magnitude as the diffusion coefficient of biotin in the dissolution setup used. The release kinetics of ocrelizumab from spray-dried chitosan particles (DD80, 150-300 kDa, 100 °C) within the first 48 hours (Figure 11B) was continuous, with only 20 % of the encapsulated mAb molecules released in 24 h. The results of the two quantification methods used, micro-BCA assay for quantification at the tripeptide level and ELISA for structurally intact and still binding molecules, did not differ (Figure 11C), proving high integrity of the released mAbs. Overall, the release kinetics of ocrelizumab from the spray-dried particles were significantly lower compared to biotin (Figure 11B and 11C).

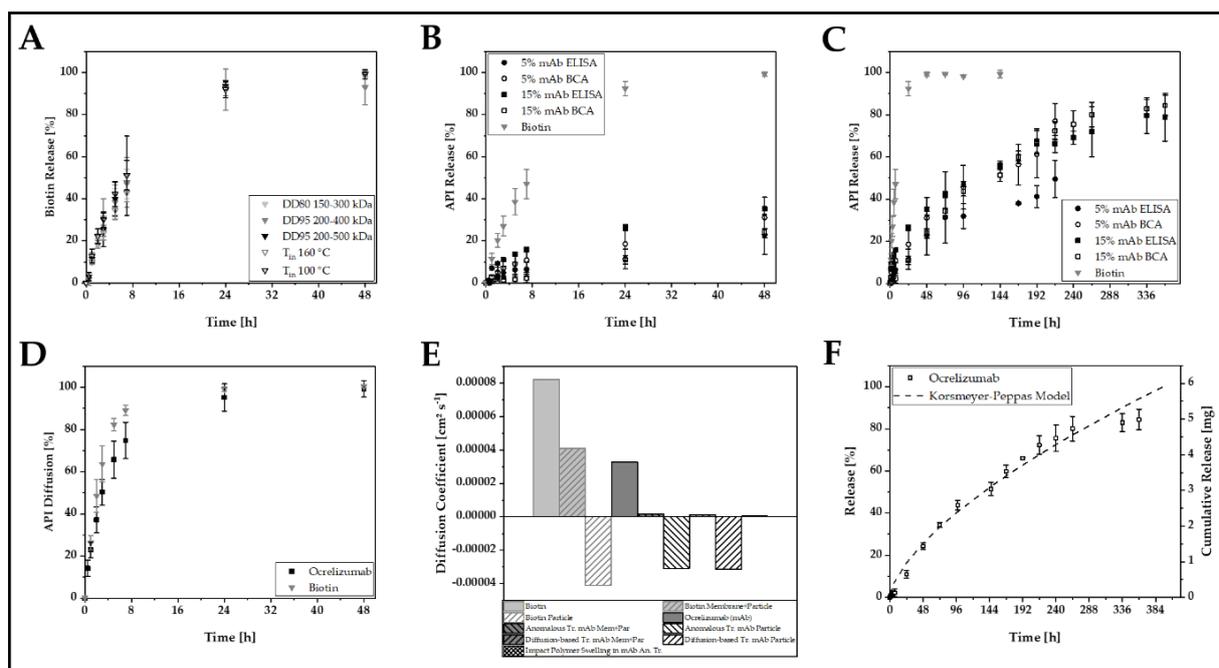


Figure 11: **A:** Comparison of biotin release kinetics from different chitosan derivatives (80 % deacetylated chitosan (DD80) with a molecular weight (MW) of 150-300 kDa, DD95 chitosans with MW of 200-400 kDa and 200-500 kDa), and DD80 150-300 kDa chitosan produced at spray drying inlet temperature T_{in} 160 °C or 100 °C. **B:** Release kinetics of ocrelizumab (mAb) from spray-dried particles consisting of DD80 chitosan with a MW of 150-300 kDa in the initial 48 h, comparison of data quantified via micro-bicinchoninic (BCA) assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **C:** Release kinetic of ocrelizumab over 360 h. **D:** Diffusion kinetics of pure active pharmaceutical ingredients (APIs) as reference for dissolution setting. **E:** Diffusion coefficients of biotin and ocrelizumab (mAb) calculated for the dissolution test setting (membrane adapters) and during release from spray-dried particles, respectively. **F:** Release kinetic of 15 wt% ocrelizumab loaded chitosan particles fitted to the Korsmeyer-Peppas model approach with constants $K = 2.11$ and $n = 0.65$.

Furthermore, the release kinetics of particles loaded with 5 wt% and 15 wt% ocrelizumab did not differ significantly (Figure 11C), proving that the threefold increase in the amount of mAbs had no effect on the release kinetics and thus proving that the slow and continuous release is due to the APIs being entrapped reproducibly for particle loadings up to at least 15 wt%. No burst release was observed implying that no or only minor amount of molecules were adhered to the surface (Paudel et al., 2013; Poulain et al., 2003). Consequently, the high molecular ocrelizumab was also successfully encapsulated in the chitosan matrix material with the spray drying parameters used here. In detail, a maximum of 84.43 ± 4.85 % ocrelizumab was successfully released from the 15 wt% loaded particles after 360 hours (Figure 11C). At this time point, the release was already slowing down but had not yet reached a plateau, suggesting incomplete release of the encapsulated mAb. Furthermore, the observed release kinetic was fitted to the Korsmeyer-Peppas model (Equation 12), resulting in a very good fit (Figure 11F), providing insight into the molecular release mechanism.

$$Release [\%] = \frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (12)$$

The fit shown in Figure 11F is characterized by the release rate constants $K = 2.11$ and $n = 0.65$. Thus, complete release of ocrelizumab in the studied dissolution setup would be achieved within 395 h. As recommended by Bruschi (2015), we calculated the values for the exponent n of the release curve range at which the release is below 60 % to achieve high agreement with the model

(Bruschi, 2015). Considering the determined value of $n = 0.65$, the observed release kinetic seems to follow an anomalous transport described for $0.5 < n < 1$, characterizing a drug release mechanism governed by uniform diffusion and swelling. The slow rearrangement of polymeric chains and the diffusion process should simultaneously cause the time-dependent anomalous effects (Bruschi, 2015). This is further consistent with the described parameter n , which ranges from 0.43 to 0.85 for spherical drug delivery system geometries.

Considering the complete release of ocrelizumab from chitosan particles calculated by Korsmeyer-Peppas fit after 395 h, the diffusion coefficient $D_{Ocre-particles}$ is $1.79 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Figure 11E), which is an order of magnitude lower than the diffusion coefficient of the pure mAb through the membrane and compared with the biotin-chitosan particles. Assuming anomalous transport, the particle matrix material causes a $3.08 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ decrease in the calculated diffusion coefficient. To distinguish between diffusion and polymer swelling in the dissolution experiment, we additionally assumed an exclusively diffusion-based release mechanism for ocrelizumab-chitosan particles, which would be characterized by $n < 0.43$. Under this approach, complete release of the mAb molecules would be achieved within ~580 h and would consequently result in a lower particle diffusion coefficient of $1.22 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for ocrelizumab. In comparison, anomalous transport exhibits a diffusion coefficient increased by a factor of 1.02 and a reduction of the overall release kinetics by 185 h through additional polymer swelling (Figure 11E).

Finally, for the first time, we achieved a high cumulative release of $5.20 \pm 0.30 \text{ mg}/50 \text{ mg}_{particles}$ of ocrelizumab, equivalent to a total release of $0.104 \pm 0.006 \text{ mg}/\text{mg}_{particle}$. By comparison, Savin et al. (2019) recently reported a similarly high release of $0.327 \text{ mg}/\text{mg}_{nanoparticles}$ of the therapeutic antibody bevacizumab from chitosan-PEGMA nanoparticles, but they used a reverse emulsion double crosslinking method and therefore achieved only a low encapsulation efficiency of 39 % (Savin et al., 2019). They described a release of 51 % within 168 h (PBS, pH 7.4, 37 °C) as slow and also did not report burst release. They also used the Korsmeyer-Peppas model to fit their release kinetics and classified transport as normal Fickian diffusion, achieving complete release of bevacizumab after 600 h. The group of Kirchhof et al. (2015) and Gregoritz et al. (2016) also investigated the release of bevacizumab, but developed eight armed polyethylene-glycol-40kC₆ hydrogels as drug carrier material. They initially reported a release of 1.25 mg bevacizumab from 250 μL hydrogels within 10 days (Kirchhof, Abrami, et al., 2015; Kirchhof, Gregoritz, et al., 2015) and later extended the release to 30 days in PBS at pH 7.4 and 37 °C by using a higher degree of polymer modification, while 60 % was released after 20 days (Gregoritz, Goepferich, & Brandl, 2016). In addition, they reported a complete release caused by degradation of the polymer between days 20 and 25. These results are comparable to the cumulative amount of ocrelizumab released here.

To classify the results obtained here in terms of clinical relevance, we compared the average daily released amount of 290 μg ocrelizumab reported herein with the results of clinical studies. In clinical trials, an average serum concentration of $\sim 100 \mu\text{g mL}_{serum}^{-1}$ ocrelizumab was reported 15 days after infusion with 600 mg ocrelizumab (Gibiansky et al., 2021). Serum levels are described to decrease to $\sim 50 \mu\text{g mL}_{serum}^{-1}$ after 29.5 days and to $\sim 20 \mu\text{g mL}_{serum}^{-1}$ after 57.6 days. Trojano et al. (1986) described an isoelectric point (IEP) dependent CSF/serum diffusion ratio of albumin, whereas higher IEPs reduce protein transport to the CSF and a minimum relative permeability coefficient (CSF/serum) of ~ 0.5 was found for proteins with IEP 8.65 (Trojano et al., 1986). In addition, Livera et al. (1984) already defined a partial regression coefficient of 0.36 to 0.54 for IgG CSF/serum diffusion ratio to albumin CSF/serum diffusion ratio (Livera et al., 1984).

Therefore we calculated for ocrelizumab with its IEP at 9.2 (FDA, 2017) a CSF/serum diffusion ratio of 0.738 ± 0.5 . Taking a partial regression coefficient between 0.36 and 0.54 for the CSF/serum diffusion ratio into account (Livera et al., 1984), it is thought that the minimum CSF/serum diffusion ratio for ocrelizumab could be assumed between 8.6 % and 12.9 %. Bringing this together with the known serum levels of ocrelizumab after infusion, CSF ocrelizumab concentrations between 12.85 and $1.71 \mu\text{g mL}_{\text{CSF}}^{-1}$ for the period between days 15 and 57.2 after infusion could be assumed. However, no ocrelizumab concentrations have yet been reported for the CSF of MS patients, and consequently, to our knowledge, the therapeutic range of ocrelizumab in CSF is unknown. Nevertheless, for our formulation here, we assume ideally a high direct uptake into the CNS via transport from the nose to the brain. Consequently, we would ideally assume a maximum concentration of $290 \mu\text{g}/150 \text{ mL}_{\text{CSF}}^{-1}$ per day, equal to $1.93 \mu\text{g mL}_{\text{CSF}}^{-1}$ after intranasal administration. Therefore, our formulation developed here could result in a comparable dosing range of $\geq 1.71 \mu\text{g mL}_{\text{CSF}}^{-1}$ and could be a promising new administration approach. However, this needs to be investigated in detail in *in vivo* experiments. Other advantages of the intranasal formulation and application studied here could include higher patient compliance and fewer side effects than intravenous use.

4

Overall, the spray drying process for the production of chitosan particles in this study was robust and achieved high particle yields, low residual moisture, and reproducible spherical particles with a monomodal size distribution (Pdl 0.02 ± 0.01) in the nanometer range ($69.9 \pm 9 \text{ nm}$) independent of the active ingredient and loading concentration. High loading concentrations of clinically relevant APIs, i.e., $4.42 \pm 0.03 \text{ wt}\%$ for biotin (referred to as 5 wt%), as well as $4.30 \pm 0.26 \text{ wt}\%$ and $15.64 \pm 1.02 \text{ wt}\%$ for ocrelizumab (referred to as 5 wt% and 15 wt%) were achieved. At the same time, high encapsulation efficiency ($\geq 80 \%$) was achieved while maintaining the structural integrity and binding activity ($\geq 82 \%$) of the mAb, as well as storage stability over five weeks at RT and $19 \pm 1 \%$ RH and sustained release over 15 days *in vitro*. To our knowledge, successful encapsulation of monoclonal antibodies in chitosan by spray drying has never been described before. The results of this study show for the first time a sustained release approach of mAbs from spray-dried chitosan particles, particularly for the therapeutic antibody ocrelizumab.

The developed spray-dried chitosan formulations resulted in high particle yields for small molecules ($68.51 \pm 3.36 \%$; biotin, fluorescein sodium salt, fluoresceinamine, and rhodamine B), while encapsulation of mAbs (ocrelizumab, bevacizumab) further increased the yield to $79.20 \pm 0.42 \%$ at spray drying inlet temperatures of $160 \text{ }^\circ\text{C}$. Increasing the mAb loading from 5 wt% to 15 wt% ($100 \text{ }^\circ\text{C}$) also increased the particle yield slightly but was not significant. Consequently, the molecular weight (MW) of the encapsulated drug may increase the particle yield due to the increased mass, which facilitates particle separation (Büchi, 1997; Paudel et al., 2013). For the encapsulation of, for example, small molecules at $160 \text{ }^\circ\text{C}$ inlet temperature, similar yields were obtained at small laboratory scale with batch size $\sim 300 \text{ mg}$ ($67.45 \pm 0.69 \%$) and at larger laboratory scale with batch size $\geq 2500 \text{ mg}$ ($70.62 \pm 4.34 \%$) during continuous production. Consequently, the spray drying parameters developed here are not only advantageous at very small laboratory scale to study various expensive biomolecules, but they are also usable for continuous production up to at least 40 min. This is regarded as very promising for potential future scale-up in industrial production.

It was found that the MW of the chitosans used significantly affects the yield. However, the DD of the chitosans had no influence on the yield. Lower MW significantly increases the yield, which is in accordance to the literature (Sun et al., 2009). We attributed this finding to the fact that the

viscosity of the spray drying solution depends on the length of the polymer chain, which affects droplet separation at the nozzle tip and thus successful particle formation and separation (Büchi, 1997; Hede et al., 2008; Paudel et al., 2013). Therefore, to achieve high yields $\geq 60\%$, the spray drying solutions should be adjusted to viscosities below 350 mPa s, which was never clarified before.

The initial residual moisture of spray-dried particles was not affected by DD or MW of chitosan, nor did the spray drying temperature impact the water content significantly. Nevertheless, at 100 °C increased residual moisture was observed for encapsulation of APIs compared to non-loaded particles, which we attributed to the change in evaporation again due to the increase in viscosity, and possibly due to the intermolecular forces acting between API molecules and chitosan (Büchi, 1997; Paudel et al., 2013). Continuous production was beneficial regarding water content of the particles, whereas residual moisture was decreased at 100 °C from 8.91 ± 1.95 wt% to 8.38 ± 1.84 wt% (mAb). In addition, the threefold loading increase of mAbs led to a decrease of the initial residual moisture from 11.2 ± 1.51 wt% to 6.95 ± 1.01 wt%, which we attributed to the higher mass ratio known to reduce the humidity in the system, resulting in a dryer product (Büchi, 1997; Paudel et al., 2013).

In addition, the herein developed formulations consisting of DD80 chitosan with 150-300 kDa containing the clinically relevant APIs biotin and ocrelizumab, were investigated in terms of particle morphology, particle size distribution, encapsulation efficiency (EE), storage stability over five weeks and release behavior *in vitro*.

The particle morphology was mainly influenced by the spray drying inlet temperature as well as the MW of both the chitosan as well as that of the API, and the API concentration. The significant effect of the MW of the chitosan on the viscosity of the spray-drying solution also affects the evaporation during the particle formation. Smooth particle surfaces are more pronounced especially for low MW chitosan derivatives and at lower DDs. The inlet temperature of 160 °C caused wrinkled particle surface morphology, which is due to the faster and thus discontinuous evaporation causing a blow-up effect of the particles during drying, leading to surface wrinkles upon cooling. For both non-loaded chitosan particles and biotin-loaded particles, smooth particles were obtained for 100 °C and a resulting outlet temperature of 38 ± 2 °C. Particles loaded with 5 wt% mAb resulted in a slightly wrinkled surface at the same outlet temperature, which was attributed to the increased viscosity of the spray drying solution caused by the high MW API, again leading to discontinuous evaporation. This effect was even more pronounced for the particles loaded with 15 wt% ocrelizumab. Discontinuous evaporation was consequently found in this study to be either caused by higher spray drying temperatures and resultant high evaporation pressure or by highly viscous solutions that hinder evaporation. To achieve a smooth surface during encapsulation of high molecular APIs, low inlet temperatures between 70-100 °C resulting in outlet temperatures 38 ± 2 °C are required.

The spray-dried chitosan particles in this study yielded monomodal size distributions with Pdl's of 0.02 ± 0.01 and mean diameters of 69 ± 9 nm. All particle populations contained small fractions of microparticles up to 50 μ m. Minor effects of spray drying inlet temperature, DD, MW and loading concentration were evident in the volumetric size distribution. Again, the DD showed a smaller effect than the MW, while the MW (chitosan, API) increased the particle size in agreement with the literature (He et al., 1999a; Hede et al., 2008; B. R. Riegger, Baurer, Mirzayeva, Tovar, & Bach, 2018; Sun et al., 2009), due to the reduced droplet atomization and increased viscosity. Due to process stabilization during continuous production, a narrower particle size distribution could be

achieved at the large laboratory scale. Once the process is in equilibrium, particles with high reproducibility are produced. A threefold increase in mAb concentration in the particles was calculated based on the experimentally measured particle diameters and the hydrodynamic radius of the IgG molecules to result in a tripling of the mAb molecule amount and thereby explained the experimentally determined increase in particle diameter of 100-150 %.

Low MW chitosan resulted in significantly higher EE in accordance with Sun et al. (2009), while the maximum EE of 88.44 ± 1.16 % was achieved for DD80 150-300 kDa chitosan and biotin, which is assumed due to the more homogeneous mixture of polymer and drug in the spray drying solution. Chitosan particles loaded with ocrelizumab gave a similar high EE of 86.03 ± 9.17 % (5 wt%; micro-BCA assay) and 78.18 ± 6.98 % (15 wt%; micro-BCA assay). The 13-fold increase in batch size resulted in similarly high EEs, again demonstrating the robustness of the spray drying parameters used, which are consequently promising for industrial scale.

In addition, the structural integrity of ocrelizumab in spray-dried particles and after release from the particles was investigated by IF, CD, and FT-IR. The results of the IF and CD measurements were in good agreement, demonstrating that ocrelizumab retained its native structure after the encapsulation process. The FT-IR measurements also showed characteristic amide-I-band signals at 1687 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} , and 1614 cm^{-1} (Henry R Costantino et al., 1997; Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, et al., 2005; Mutukuri et al., 2021; S. Schüle, W. Friess, K. Bechtold-Peters, & P. Garidel, 2007; F. Sousa et al., 2017) characterizing secondary structure elements of the IgG, thus proving its native conformation, even in the dried state. Moreover, the residual binding capacity of encapsulated ocrelizumab after release gave high values of 70.18 ± 11.39 % (ELISA). Consequently, the encapsulated ocrelizumab remained intact at primary and secondary protein structure levels. Only a loss of ≤ 18 % in binding activity (ELISA) was observed and hence attributed to defects in the tertiary or quaternary structure. Thus, the spray-dried particles developed here are a promising formulation for sensitive macromolecules, such as IgGs.

Overall, five weeks of storage at RT and 19 ± 1 % relative humidity resulted in maximum water contents of 13.54 ± 0.67 wt% (no API), 11.47 ± 0.75 wt% (5 wt% mAb), and 11.95 ± 0.70 wt% (15 wt% mAb) and is more beneficial than refrigerator storage ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 26 ± 1 % RH). Storage stability was also investigated using DSC. The formulation containing 15 wt% ocrelizumab was found to have a T_g of $35.86 \text{ }^\circ\text{C}$, which in accordance to Maury et al. (2005) due to the T_g s of the raw materials and the observed residual moisture of the formulation. Moreover, T_g remained constant during the five weeks of storage at RT and 19 ± 1 % RH. Consequently, the highly loaded chitosan formulation presented here is a promising dosage form that is assumed to be long term stable at storage temperatures up to $\sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$ according to Duddu et al. (1997).

Finally, a sustained release behavior of the API-loaded spray-dried chitosan particles was achieved *in vitro*, mimicking conditions in the nasal cavity. While the spray drying inlet temperature and the MW of chitosan had no effect on the release kinetics, a complete release of 5 wt% biotin was achieved within 48 hours. No initial burst release was observed, demonstrating that the vitamin was successfully encapsulated within the particles as explained by Poulain et al. (2003) (Poulain et al., 2003). The particulate formulation was found to reduce the diffusion coefficient of biotin D_{Biotin} $8.22 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ by about $4.11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ to result in a remaining diffusion coefficient of $D_{\text{Biotin-particles}}$ $4.11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. For ocrelizumab, an even longer release was achieved, with only 20 % released within the first 24 hours, again demonstrating successful encapsulation of the drug regardless of loading concentration (5 wt%, 15 wt%). Over 360 h, a maximum of 84.43 ± 4.85 % ocrelizumab was successfully released. No plateau was reached during this period, indicating

incomplete release. The Korsmeyer-Peppas model was applicable and predicted that complete release would have occurred after 395 h, resulting in a decrease of $3.08 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ from D_{Ocre} $3.25 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ to the resulting diffusion coefficient $D_{Ocre-particles}$ of $1.79 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for the IgG released from the chitosan particles. The model's assumptions further suggested that the molecular mechanism of release corresponded to anomalous transport. We consequently assumed following Bruschi (2015) that this release mechanism was determined in equal parts by diffusion and swelling of the chitosan polymer chains, additionally in accordance to the classification of spherically shaped drug delivery systems (Bruschi, 2015). In comparison, the encapsulation into chitosan by spray drying resulted for biotin in a 1.34-fold stronger reduction of the diffusion than for ocrelizumab, because for ocrelizumab the release is already partly reduced by naturally occurring slower diffusion due to its high MW.

Moreover, the achieved daily release of ocrelizumab applied intranasally could be comparable to the therapeutic concentration in CSF that was assumed to be achieved with intravenous application following theoretical assumptions based on the recently published ocrelizumab serum levels of MS patients (Gibiansky et al., 2021). In contrast, to our knowledge, specific ocrelizumab concentrations in CSF of MS patients have not yet been published. Therefore, future studies are needed to compare intravenous administration to the performance of the formulation developed herein *in vivo* and thus to evaluate more reliably its potential clinical relevance.

4.1.5 Conclusion

To our knowledge, successful encapsulation of monoclonal antibodies in chitosan by spray drying has never been described before. Consequently, the results of this study showed for the first time a controlled release approach of mAbs from spray-dried chitosan particles, particularly for the therapeutically relevant APIs biotin and ocrelizumab.

The developed spray drying process in this study was robust and achieved high particle yields, low residual moisture, and reproducible spherical particles with a monomodal size distribution (Pdl 0.02 ± 0.01) in the nanometer range ($69.9 \pm 9 \text{ nm}$) independent of the active ingredient and loading concentration.

To achieve high yields $\geq 60\%$, the spray drying solutions should be adjusted to viscosities below 350 mPa s , which was reported here for the first time. It was also found that the MW of the chitosans used, but not their DD, significantly affected the yield, while a lower MW significantly increased the yield. Consequently, due to the high yield independent of batch size, the spray drying parameters developed here are very promising for possible future scale-up in industrial production.

High loading concentrations of clinically relevant APIs, i.e., $4.42 \pm 0.03 \text{ wt}\%$ for biotin, as well as $4.30 \pm 0.26 \text{ wt}\%$ and $15.64 \pm 1.02 \text{ wt}\%$ for ocrelizumab were achieved. Low MW chitosan resulted in significantly higher encapsulation efficiency, while the maximum EE of $88.44 \pm 1.16 \%$ was achieved for DD80 150-300 kDa chitosan and biotin. Chitosan particles loaded with ocrelizumab gave a similarly high EE of $86.03 \pm 9.17 \%$. The 13-fold increased batch size resulted also in similarly high EEs, again demonstrating the robustness of the spray-drying parameters used and potential promise for industrial scale.

The smoothness of the particle's surfaces were more pronounced, especially for low MW chitosan derivatives, and at lower DDs. The significant impact of the spray drying inlet temperature causing wrinkled particle surfaces at $160 \text{ }^\circ\text{C}$ was clarified in this study. Discontinuous evaporation was

found to be either caused by higher spray drying temperatures ($\geq 100\text{ }^{\circ}\text{C}$), and thus high evaporation pressure, or by highly viscous solutions ($> 350\text{ mPa s}$) that hinder evaporation. Low inlet temperatures between $70\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$, resulting in even lower outlet temperatures ($38\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), are required to achieve a smooth particle surface for the encapsulation of high molecular APIs.

Detailed characterization of ocrelizumab encapsulated by spray drying and released from the particles clearly showed that their primary and secondary protein structure remained intact. However, the ELISA assay showed a slight loss of binding activity. We concluded that the spray-dried particles developed here represent a promising formulation for sensitive macromolecules such as IgG.

The formulation containing 15 wt% ocrelizumab was found to have a T_g of $35.86\text{ }^{\circ}\text{C}$. Consequently, the highly loaded chitosan formulation presented here, is a promising dosage form that is assumed to be long term stable at storage temperatures up to $\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Finally, a controlled release behavior of spray-dried chitosan particles was achieved *in vitro*, mimicking conditions in the nasal cavity. A complete release of 5 wt% biotin was achieved within 48 hours. No initial burst release was observed demonstrating that both, biotin and ocrelizumab, were successfully encapsulated and the formulation significantly reduced their diffusion coefficients. Within the first 24 hours, only 20 % of ocrelizumab was released followed by a release of $84.43\pm 4.85\%$ ocrelizumab over 360 h. The Korsmeyer-Peppas model was applicable and predicted a completed release of the mAb after 395 h. The determined release constants confirmed that the morphology of the developed drug delivery system is spherical. Also, the model predicted that the occurring release mechanism followed anomalous transport.

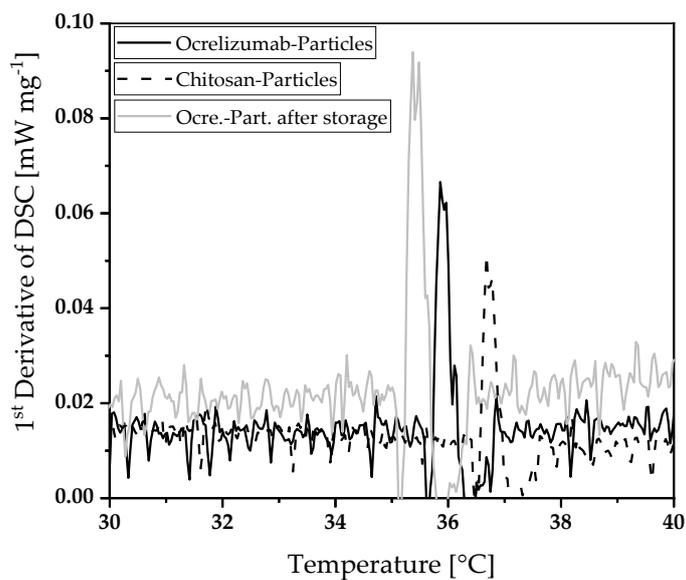
The resulting diffusion coefficient of biotin after encapsulation in chitosan was reduced 1.34-fold compared to ocrelizumab also encapsulated in chitosan. This finding supports the successful inclusion of low-molecular-weight biotin in the particle matrix.

The study presented here suggests that it is reasonable to assume that 50 mg of the spray-dried chitosan particles explored here can provide a daily release of ocrelizumab at a relevant CSF concentration following intranasal administration. However, to our knowledge, specific ocrelizumab concentrations in the CSF of MS patients have not yet been published. Therefore, future studies are needed to compare ocrelizumab concentrations in CSF after intravenous and intranasal administration to clarify the potential clinical relevance of the formulation presented here.

4.1.6 Acknowledgements

This study has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 721098 (www.n2b-patch.eu) to R.W., J.B., S.G., C.C., M.C., K.S., C.G-T., and G.T. L.S. thanks the Studienstiftung des deutschen Volkes for her Ph.D. fellowship. All authors thank Monika Riedl (Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB, Stuttgart, Germany) for the acquisition of scanning electron microscopy images, Fabrizio Chiti and Silvia Errico (both, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Florence, Florence, Italy) for technical support, and Erik Taylor (Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB and Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology IGVP, University of Stuttgart, Stuttgart, Germany) for grammatical review.

4.1.7 Supplementary Material



Supplementary Figure S7: First derivative of the heatflux determined via differential scanning calorimetry (DSC) for non-loaded chitosan-particles and ocrelizumab containing particles, as well as ocrelizumab-particles after 5 weeks of storage at room temperature and 19 ± 1 % relative humidity; the glass transition temperature T_g is displayed as maximum, respectively.

5. Charakterisierung und Validierung eines artifiziellen Mukosa-Analogs hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit porciner olfaktorischer Mukosa und der daraufhin vergleichbaren Spreitung von Hyaluronsäurelösungen

Die Ergebnisse und Diskussion der Hypothese 4 werden in diesem Kapitel erläutert. Die Studie zu Hypothese 4 ist als Manuskript mit dem Titel „*Hyaluronate spreading validates mucin-agarose analogs as test systems to replace porcine nasal mucosa explants: An experimental and theoretical investigation*“ wiedergegeben. Dieses Manuskript wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* publiziert. Darüber hinaus wird **2.2.4 Hypothese IV** in Kapitel 6.4 zusammenfassend diskutiert.

Hinweis: Das Layout des Manuskripts wurde an das Layout dieser Dissertationsschrift angepasst. Die dadurch entstandenen Überarbeitungen haben den Inhalt nicht verändert.

5.0 Erklärung meiner eigenständigen Leistung

Ich habe diese Studie zu großen Teilen eigenständig konzipiert und ihre wissenschaftliche Methodik ausgearbeitet. Außerdem habe ich den Großteil der experimentellen Arbeiten angeleitet, dies beinhaltet konkret:

- Die Reproduktion und Optimierung des Muzin-Agarose-basierten Mukosa-Analogs wurde von mir durchgeführt.
- Die Berechnung der Oberflächenspannung der Hyaluronsäurelösungen wurde von mir durchgeführt.
- Der Großteil der Kontaktwinkelmessungen erfolgte unter meiner Anleitung.
- Die *Laser-Scanning* Mikroskopie Messungen und deren Auswertung wurden von mir durchgeführt und angeleitet.
- Die Gewebepräparation aus frischen Schweineschnauzen von der Metzgerei wurde von mir etabliert. Die Präparation der olfaktorischen Mukosa wurde von mir durchgeführt oder erfolgte unter meiner Anleitung.

5

Bis auf die Kontaktwinkelmessungen der nativen Hyaluronsäurelösungen und die experimentelle Bestimmung der Viskosität der Hyaluronsäurelösungen wurden alle experimentellen Daten von mir oder unter meiner Anleitung ausgewertet. Das aus den erhobenen Daten entstandene mathematische Modell wurde von der Kooperationspartnerin Stefania Serpetsi am *Centre for Research and Technology Hellas* in Thessaloniki entwickelt. Der größte Teil dieses *peer-reviewed* Fachartikels wurde von mir geschrieben und ich habe federführend die Änderungsvorschläge meiner Co-Autoren harmonisiert und eingearbeitet.

5.1 Hyaluronate Spreading Validates Mucin-Agarose Analogs as Test Systems to Replace Porcine Nasal Mucosa Explants: An Experimental and Theoretical Investigation

Lena Marie Spindler^{a,b,#}, Stefania Serpetsi^{c,#}, Johannes Flamm^d, Andreas Feuerhake^a, Lisa Böhler^{a,b}, Martin Pravda^e, Kirsten Borchers^{a,b}, Günter E. M. Tovar^{a,b,*}, Katharina Schindowski^d, Carmen Gruber-Traub^{a*}

^aInnovation Field Functional Surfaces and Materials, Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, 70569 Stuttgart, Germany

^bInstitute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology, University of Stuttgart, 70569 Stuttgart, Germany

^cChemical Process & Energy Resources Institute, Centre for Research and Technology Hellas, 57001 Thessaloniki, Greece

^dInstitute for Applied Biotechnology, Biberach University of Applied Science, Campus Aspach, 88400 Biberach, Germany

^eContipro a.s., 561 02 Dolní Dobrouč, Czech Republic

#These authors contributed equally to this work.

*Correspondence: Günter E. M. Tovar, guenter.tovar@igvp.uni-stuttgart.de and Carmen Gruber-Traub, carmen.gruber-traub@fraunhofer.igb.de

5

Published in the peer-reviewed Journal *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*

Publisher: Elsevier

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112689>

Volume 217, Article 112689

Received: 11 April 2022

Accepted: 4 August 2022

Published: 8 July 2022

5.1.1 Abstract

To rationally design intranasal drug delivery systems, i.e., for the assessment of the administered formulation properties, *ex vivo* porcine nasal mucosa (PNM) explants are one modern but complex standard. Therefore, the development of artificial mucosa substrates as straight-forward PNM analogs is important. The mucosa analog (MA; 5 wt% mucin and 1 wt% agarose coating on glass) was found to be a sufficient substitute of PNM. It exhibited similar mucoadhesive properties as determined by detachment force measurements (MA: 0.04 ± 0.01 N mm; PNM: 0.03 ± 0.01 N mm) and its' topological surface properties (i.e., roughness ratio r ; and mean arithmetic surface height S_a) were in good agreement with the natural tissue (r_{MA} : 1.12, r_{PNM} : 1.17; $S_{a,MA}$: 7.80 ± 1.95 μm , $S_{a,PNM}$: 7.61 ± 0.72 μm). Using this MA, the present study describes an experimental and theoretical spreading approach using hyaluronic acid (HA) in various concentrations (10-30 mg mL⁻¹), molecular weights (280-1260 kDa), and tyramine modifications (HA-Tyr). The spreading behavior of HA and HA-Tyr was determined in different environments (laboratory conditions, climatic chamber) on specific substrates (PNM, artificial mucosa, and glass). An exponential relationship between HA concentration and viscosity was determined. Higher humidity, use of HA-Tyr, and sessile droplet orientation improved spreading. The dynamic spreading model was then developed mathematically and validated experimentally. Parameters such as molecular weight, droplet volume, and surface tension are also covered by this mathematical model. The present study demonstrates that this MA combines attractive features such as broad availability, good reproducibility, high stability under physiological conditions, ease of fabrication and low production cost.

5.1.2 Introduction

The concept of replacing, reducing, and refining (3 R) animal testing for the evaluation of medical and pharmaceutical products was proposed in 1959 as one of the foundations of scientific work (Russell & Burch, 1960). Today, it is more relevant than ever. Since 2010, this concept has been officially filed on the European legal basis 2010/63/EU of animal welfare (EU, 2010). In the field of intranasal delivery, air-liquid interface cell culture systems (Ladel et al., 2018; Ladel et al., 2019) and *ex vivo* models, such as the one used here, based on biopsies obtained from slaughterhouse material (Ladel et al., 2018; Alpesh Mistry, 2009; Spindler et al., 2021) to avoid animal testing are used. Working with animal derived samples additionally brings along difficulty in purchase, varying quality and is time critical, e.g., biopsies can only be used a few hours until they lose essential properties such as cell viability and mucus production. The cell viability in porcine nasal mucosa lasts for at least 5h under *ex vivo* conditions (Spindler et al., 2021), whereas mucus transport remains stable for up to 5 h in frog palate mucosa (T.J. Aspden et al., 1995; Sadé et al., 1970) and human samples (Trudi J. Aspden et al., 1997). In the present study, the current models are further replaced by an artificial mucosa substrate that does not even require fresh tissue from slaughtered animals, is of constantly good quality and can simply be prepared in the laboratory.

Hyaluronate (sodium hyaluronate, hyaluronan, hyaluronic acid, HA) is a naturally occurring linear polysaccharide typically found in vertebrate connective tissues (Dicker et al., 2014). Common forms are either hyaluronic acid or sodium hyaluronate, where it exists as hyaluronate in aqueous solutions containing hydrogen or sodium ions, respectively. The functionality of hyaluronate as a medical formulation is attributed to its unique biophysical properties. The protective and reinforcing effect of HA on tissues is based on its ability to absorb a large amount of water and

dissipate mechanical forces (Aya & Stern, 2014). Therefore, HA is used as a therapeutic agent due to its ability as a lubricant, e.g., in ophthalmology, as a coating, or to repair damaged tissue (Abatangelo, Vindigni, Avruscio, Pandis, & Brun, 2020; Kuo, 2005). Tyramine-modified HA (HA-Tyr) is an interesting derivative for drug delivery and tissue engineering applications (M. Kurisawa, J. E. Chung, Y. Y. Yang, S. J. Gao, & H. Uyama, 2005) because it is injectable (F. Lee et al., 2008b) and has tunable mechanical properties through UV light crosslinking, making it interesting, e.g., for cartilage repair (Donnelly et al., 2017; Ren et al., 2015).

HA-based hydrogels are biocompatible, and their properties can be efficiently tuned by changes in crosslinking density and chemical structure (Xu et al., 2012; Zhu & Marchant, 2011). Therefore, they are considered versatile materials and are used in various clinical applications as materials to supplement viscosity or protect delicate tissues from synovial fluid during surgical procedures, e.g., ophthalmic surgery, and prevent tissue adhesion during major surgery, e.g., laparotomy, etc. (Balazs, 2004). In addition, significant interest has emerged in their use as bioadhesives in applications involving pharmaceutical drug delivery systems at mucosal barriers, e.g., in the nasal cavity (Bourganis et al., 2018a; Chaturvedi, Kumar, & Pathak, 2011; Shaikh, Raj Singh, Garland, Woolfson, & Donnelly, 2011). In particular, the adhesion of these hydrogels to the nasal mucosa is of great interest for drug delivery from the nose to the brain, e.g., in the treatment of central nervous system (CNS) diseases (Keller et al., 2021; Stütze et al., 2015a). This route is promising for the delivery of nanoparticles or high molecular weight active pharmaceutical ingredients such as proteins and antibodies that are normally inhibited by the blood-brain barrier (Illum, 2000; Spindler et al., 2021; Stütze et al., 2015b; Hartwig Wolburg et al., 1994). Drug delivery via the nasal olfactory mucosa, which is located in the roof of the nasal cavity, was recently demonstrated to achieve a reasonable CNS bioavailability for small molecules but also for immunoglobulins (Flamm et al., 2022; Maigler et al., 2021). The olfactory region is directly connected to the CNS via the trigeminal and olfactory nerves and only the ethmoid bone separates it from the brain (Morrison & Costanzo, 1990, 1992).

5

Moreover, the importance of intranasal treatments currently continues to increase, especially since the Covid-19 pandemic (WHO, 2020; Wu et al., 2020). Due to the high viral concentrations in nasal swabs (Yu et al., 2020; Zou et al., 2020), it is important to specifically consider the nasal route of application for effective and promising treatment of Covid-19 or similar respiratory diseases. In addition, there is an ever-growing general need for the delivery of sophisticated molecules such as biopharmaceuticals to either prevent severe infections or provide therapeutics for the brain and central nervous system (Bourganis et al., 2018b; Keller et al., 2021).

Like all mucosal surfaces in higher organisms both, the nasal olfactory and respiratory mucosa are covered with a protective gel layer called mucus (Hansson, 2012). Mucins are the main components responsible for the gel-like and adhesive characteristics of mucus. Bioadhesion describes a condition in which two materials, at least one of which is of biological origin, are held together by interfacial forces over an extended period of time (Duchêne, Touchard, & Peppas, 1988; Jiménez-castellanos, Zia, & Rhodes, 1993). In pharmaceutical sciences, the phenomenon is referred to as mucoadhesion when adhesive attachment occurs to mucus or a mucous membrane (Ways, Mohammed, Lau, & Khutoryanskiy, 2018). In the last two decades, mucoadhesion has attracted considerable interest due to its potential to optimize local drug delivery by keeping a formulation in close contact with the target site, such as the nasal cavity (Duchêne et al., 1988; M. I. Ugwoke et al., 2005).

A mandatory prerequisite for achieving close contact at the target site by adhesion is wetting. The wetting theory is primarily applied to fluid systems and concerns the ability of a fluid to spread

spontaneously on a surface (Bianco-Peled & Davidovich-Pinhas, 2015). The affinity of a liquid for a surface can be studied using techniques such as contact angle goniometry to measure the contact angle of the liquid on the surface, with the general rule that the greater the affinity of the liquid for the solid, the smaller the contact angle (Kabza, Gestwicki, & McGrath, 2000). Contact angle measurements can help in predicting the bioadhesive character of different polymer systems and emphasize the role of surface and interfacial properties in the adhesion process (Shaikh et al., 2011). In addition, contact angle analysis can be used to predict mucoadhesive properties, leading to an estimate of the affinity of mucoadhesive materials to mucus substrates (Bonn, Eggers, Indekeu, Meunier, & Rolley, 2009; Huhtamäki, Tian, Korhonen, & Ras, 2018). Spreading and wetting phenomena on biological substrates have been scarcely studied due to their complexity and the numerous factors that need to be considered (Alexopoulos & Kiparissides, 2018; Nonomura et al., 2010; Uppal, Craster, & Matar, 2017). For example, during spreading, the hydrogel may change chemically or physically, leading to a dynamic change in the rheological properties of the formulation, which is a complicating factor in simulations.

Other aspects to be considered in the simulations are the roughness of the biological substrate and the mechanisms for the dynamics of contact line motion. The spreading behavior of a liquid on a biological surface is determined by viscous, capillary and gravitational forces. This phenomenon is strongly influenced by the wettability of the substrate (Bonn et al., 2009; Chen & Bonaccorso, 2014). The detailed computational description of the dispersion and adhesion behavior of droplets on biological substrates is characterized by weak defects. This is inherently an extremely challenging problem as it involves complex flow fields, moving boundaries, and deformations of the droplet interface, thus changing the computational domain. Until now, computational strategies for solving this type of problem have been developed using a problem-based approach for each individual case. There is a need to provide a straightforward approach to describe the spreading behavior of complex fluids on biological substrates in order to obtain more meaningful data and a better understanding of the mechanisms governing these processes (Alexopoulos & Kiparissides, 2018).

The aim of the present study is to develop an experimental and theoretical approach to describe the shear propagation of HA and to provide an artificial mucosa analog. The wetting behavior of native microbial HA on partially wettable glass and mucin-agarose coated substrates, i.e., artificial mucosa analogs (MA) in sessile configuration is investigated experimentally and by mathematical modeling. Sessile and pendant droplet configurations were also studied in comparison on MA. In a second set of spreading experiments, the wetting behavior of HA-Tyr on explants of olfactory porcine nasal mucosa (PNM) is investigated. These explants were taken freshly *post-mortem* from slaughter pigs as described elsewhere (Getty, 1975; Ladel et al., 2018; Alpesh Mistry, 2009). A dynamic droplet deformation model was developed to simulate the spreading behavior of deposited native HA or HA-Tyr droplets on the different substrates.

5.1.3 Materials and Methods

Preparation of Artificial Mucosa Substrates

A surrogate nasal mucosa substrate was developed by studying and comparing the wetting and adhesion properties of HA solutions applied to olfactory PNM, biopsies were extracted as described elsewhere (Getty, 1975; Ladel et al., 2018; Alpesh Mistry, 2009). The preparation of MAs is shown in Supplementary Figure S8 in section 5.1.7. To prepare MAs in Petri dishes 1 wt%

low-melting agarose (Sigma Aldrich, St. Louis, United States) was dissolved in ultrapure water (MilliQ) at 60 °C under stirring. Then, 2.5 wt% or 5 wt% mucin (porcine mucin type II; Sigma Aldrich, St. Louis, United States) was suspended in the agarose-solution at 40 °C under stirring. Approximately 5 mL of the resulting mucin-agarose solution were then poured into Petri dishes, allowed to cool and gel. The resulting MA plates were used for detachment force measurements within 24 h. The adhesion was determined using a Texture Analyzer (TA.XT plus, Stable Micro Systems, Godalming, United Kingdom) by measuring the detachment force of a mucoadhesive hydroxypropylmethylcellulose (HPMC; Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Germany) film in contact with PNM or MA according to Singh et al. (2017) and Ramana et al. (2007) (Ramana, Nagda, & Himaja, 2007; Singh, Sharma, & Garg, 2017). Each measurement was repeated four times. The utilized HPMC films were prepared by drying 6.3 mL of a HPMC-MilliQ 6 wt% solution in a Petri dish with 90 mm diameter in a drying oven at 45 °C for 24 h. An appropriate round piece of HPMC film was attached to the measuring cylinder of the Texture Analyzer with double-sided adhesive tape and placed in the direction of the MA swollen in Petri dishes during the measurement. The HPMC film and the MA sample were attached to each other for 10 s with a force of 0.1 N. Mucoadhesion was then determined by separation with a detachment rate of 0.1 mm s⁻¹ and calculation of the resulting integral using Exponent Plus software (Stable Micro Systems, Godalming, United Kingdom).

5 MAs were prepared in reproducible geometry for further analysis, i.e., surface roughness and contact angle, by use of Gene Frames (1.9 cm x 6.0 cm, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, United States) on standard glass slides (GS). For the preparation of MAs on GS, 5 wt% was first dissolved in MilliQ water for 25 min at 50 °C under stirring. Then, low-melting agarose (Sigma Aldrich, St. Louis, United States) was added to obtain a 1 wt% agarose suspension together with 5 wt% mucin. The resulting mucin-agarose suspension was then heated carefully in a microwave for 30 s to dissolve the agarose in the mucin solution. The mucin used here is stable at 70 °C for at least 24 h (Product Information Sheet, Sigma Aldrich, St. Louis, United States), although exposure to intense heat should be kept to a minimum to avoid denaturation. GS were heated to 50 °C and then, 700 µL of the resulting mucin-agarose solution were pipetted into the gene frames. The MAs were covered with damp paper towel in Petri dishes and stored overnight at 4 °C to gel the solution. The resulting MA substrates were used for surface roughness and contact angle measurements within 24 h. Pure GS were cleaned with ethyl acetate and isopropyl alcohol before the measurements.

Measurements of Surface Roughness Parameters and Topography by Laser-scanning Microscopy

The surface roughness and topography of olfactory PNM biopsies and MAs were examined using a Keyence VK X200 laser-scanning microscope (Keyence Corporation, Japan) under laboratory conditions (21.5 °C and 50 % humidity). Measurements were performed in quadruplicate, whereas PNM biopsies were from four individual pigs. High quality images (10.2 mm x 1 µm) were obtained using a 10x magnification, a resolution of 5 µm in the z-axis, and short measurement times of 3-4 min to prevent the samples from drying out. Image analysis was performed using the MultiFileAnalyzer software (Keyence Corporation, Osaka, Japan). The observed elevation surfaces were quantified by their respective color using ImageJ software.

To characterize and compare the substrate surfaces of PNM and the MA, the arithmetic average of the measured surface heights S_a were calculated by Equation (13).

$$S_a = \frac{1}{A} \iint_A |Z(x, y)| dx dy \quad (13)$$

The function $Z(x, y)$ represents the two dimensional (x, y) topology of the surface and A is the cross-sectional area of the scanned sample.

Another parameter that is commonly used to characterize the roughness of a surface is the ratio r of the sample textured area to the sample cross-sectional area that can be calculated by the following equation:

$$r = 1 + \frac{1}{A} \left[\iint_A \left(\sqrt{1 + \left(\frac{\partial Z(x, y)}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial Z(x, y)}{\partial y} \right)^2} - 1 \right) dx dy \right] \quad (14)$$

Determination of HA Solution Viscosity

A series of solution viscosity measurements were performed for HA (10, 20, and 30 mg mL⁻¹) with three replicates each. The HA (1260 kDa) solutions in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 were provided by Contipro a.s. (Dolní Dobrouč, Czech Republic) meeting the required specifications; (i) the HA solutions can be deposited via a syringe to the site of action (nasal mucosa in the olfactory region); (ii) the HA solutions are adequately viscous to avoid liquid dripping.

Rheology experiments were performed with a solution volume of 1000 μL at 25 °C and a shear rate of 0.1 s⁻¹ (Rheometer Malvern Panalytical Ltd, Malvern, United Kingdom; cone plate 60 mm, 1°).

The viscosity of a dilute polymer solution η is described by the well-known Huggins equation (Huggins, 1943).

$$\eta = \eta_0 [1 + [\eta]c + k_H [\eta]^2 c^2 + \dots] \quad (15)$$

η_0 is the viscosity of the solvent, $[\eta]$ is the intrinsic viscosity, c is the concentration of the polymer in the solution, and k_H is the Huggins coefficient. The intrinsic viscosity of a polymer $[\eta]$ is directly related to the size and shape of the polymer chains in solution and therefore to its molecular structure and weight, while k_H is a function of the pair-wise interactions between the solvent- and the polymer molecules (Schué, 2004).

From Equation (15), the reduced viscosity η_{red} of a polymer solution can be obtained.

$$\eta_{red} = \frac{\left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1 \right)}{c} = [\eta] + k_H [\eta]^2 c \quad (16)$$

Equation (16) shows that the reduced viscosity will be a linear function of polymer concentration. Thus, from a linear plot of η_{red} values versus the HA concentration, the intrinsic viscosity of HA $[\eta]$ and k_H can be calculated by the intercept and slope ($k_H [\eta]^2$) of the linear dependence, respectively.

Subsequently, using the calculated value of $[\eta]$ of HA and the well-known Mark-Houwink equation,

$$[\eta] = KM_v^a \quad (17)$$

the viscosity average molecular weight M_v of HA can be calculated. The numerical values of K and a constants in Equation (17) were $0.057 \cdot 10^{-3} \text{ mL g}^{-1}$ and 0.76, respectively (Shimada & Matsumura, 1975).

Dynamic Droplet Spreading Experiments

A series of experiments were performed with HA solutions (10, 20, and 30 mg mL⁻¹; 1260 kDa; in PBS pH 7.4) and HA-Tyr solutions (10 mg mL⁻¹; 240-360 kDa; degree of substitution of 2-3 %; in 9 mg mL⁻¹ NaCl). All HA samples were provided by Contipro a.s. (Dolní Dobrouč, Czech Republic). The solutions were applied as 14 µL droplets using syringes with an outer diameter of 1.65 mm and an automated contact angle measurement device (OCA 40, Data Physics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany) with an integrated light source, monitoring the droplet with a high-speed video camera (UpHSV 1220, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany) approximately 2 minutes until the droplet shape reached an equilibrium state. The camera signal was transmitted to a digital processor (Videopix, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany). HA solutions were deposited on GS and MAs in sessile and pendant configuration, respectively, in quadruplicate. HA-Tyr droplets were applied to MA and PNM explants in sessile configuration in triplicate, whereas PNM experiments were repeated with samples from three individual pigs.

Droplet spreading measurements were performed under laboratory conditions (L; 21.5 °C and 50 % humidity) and in an automatically controlled climatic chamber (CC; 34 °C and 90 % relative humidity) (Thermostat 5510, Thermometrics Corporation, Northridge, United States). The environmental conditions in the CC experiments corresponded to the physiological conditions in the nasal cavity.

An image analysis program (DropSnake plugin, ImageJ software) (Stalder, Kulik, Sage, Barbieri, & Hoffmann, 2006) was used to measure the droplet contact angle (CA) at different times. Initially, seven nodes are placed along the contour of the droplet, starting at the lower left tri-phase point (Williams et al., 2010), see exemplarily Figure 12a). A line is then drawn across the baseline of the droplet connecting the left and right tri-phase points. The angle of the baseline and the drop-edge tangent provides an estimate of the CA. The exemplarily measured CAs in Figure 12a were 29.879° (left CA) and 28.123° (right CA). All reported values of the CA are calculated as average values of the left and right angle measurements.

The ratio between the radius of the droplet base radius r and the droplet height h is referred to as the aspect ratio z with $z = r/h$. z as well as the contact angle θ , are commonly used as measures of the deformation and spreading ability of a liquid droplet deposited on a substrate. The dynamic evolution of r and h was measured using a second image analysis software (Digimizer, MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; see exemplarily Figure 12a). From the measurement of the geometric features of the droplet at different time points, z and θ at different time points were additionally calculated.

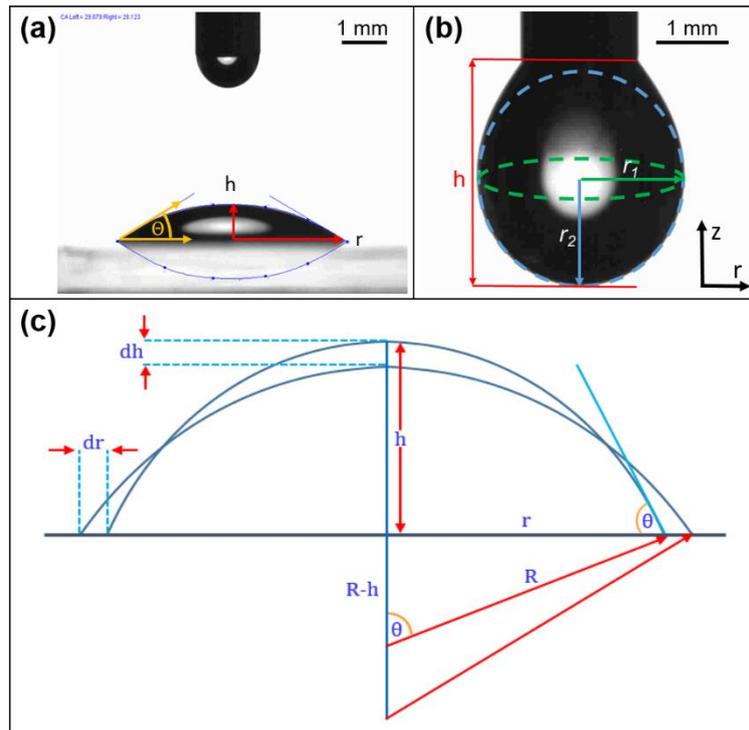


Figure 12: (a) Representative image of droplet analysis determining the contact angle (CA; θ), as well as the droplet base radius (r) and droplet height (h) using two image analysis software. (b) Schematic representation of pendant drop measurements (r_1 , r_2 , and h) for the determination of the surface tension of HA and HA-Tyr solutions. (c) Schematic dynamic droplet deformation and spreading of a liquid droplet deposited on a partially wettable substrate.

Droplet Volume Calculation

To confirm the droplet volume values automatically reported by the contact angle software (SCA 20, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany), the droplet volume V was recalculated using the collected droplet snapshots. The droplet is characterized by N individual pixels with known integer coordinates (x, y) . Assuming that the drop shape can be described by a general rotationally symmetric model of a known contour function with respect to its vertical axis, the drop volume was calculated in terms of the y -dependent drop diameter $D(y)$ using the following integral Equation (18) (Hugli & Gonzalez, 2000).

$$V = \frac{\pi}{4} \int_{y_1}^{y_2} D^2(y) dy \quad (18)$$

Surface Tension Measurements

The surface tension of the HA and HA-Tyr solutions was experimentally determined by the pendant droplet method for a droplet formed at the edge of a tube containing the liquid (Figure 12b). At equilibrium, the liquid pendant drop assumes a shape under the influence of gravity, which satisfies the Young–Laplace equation (Hartland, 2004).

$$\gamma_{lv} = \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) = \Delta P \equiv \Delta P_0 - \Delta \rho g h \quad (19)$$

The Young-Laplace Equation relates the pressure difference ΔP at the surface of the droplet to the surface tension of the liquid γ_{lv} and the principal radii of curvature r_1 and r_2 of the pendant droplet (see Figure 12b). ΔP_0 is a reference pressure at $z = 0$. The term $\Delta\rho gh$ accounts for the contribution of the hydrostatic pressure. $\Delta\rho$ denotes the density difference between the liquid and vapor phases, the droplet height h , and the gravitational acceleration constant g . Thus, from the measurements of r_1, r_2 , and h using the image analysis software (Digimizer, MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium) and the known value of $\Delta\rho$, the numerical values of the interfacial tension of a liquid γ_{sl} were determined.

5.1.4 Development of Theoretical Models

Surface Wetting and Contact Angle

In this section, the basic principles of liquid droplet spreading on a partially wettable substrate (i.e., GS, MA, and PNM) are reviewed. In this process, the surface tension of the liquid γ_{lv} , the surface tension of the substrate γ_{sv} , and the interfacial tension between the substrate and the liquid γ_{sl} , interact synergistically. At the three-phase point of solid, liquid, and vapor, the solid/vapor surface tension γ_{sv} is opposed by the solid/liquid surface tension γ_{sl} , and a component of the liquid/vapor surface tension γ_{lv} , so that the three surface tensions are in mechanical equilibrium (force equilibrium, see Supplementary Figure S9). θ_{eq} is the angle between the tangent to the liquid at the contact line of the liquid to the solid surface. The relationship between the equilibrium contact angle θ_{eq} and the combination of the three surface tensions is described by the well-known Young's equation (Pierre-Gilles de Gennes & Quere, 2004).

5

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta_{eq} \quad (20)$$

In Supplementary Figure S9b, the different droplet configurations on a substrate are shown.

The Equilibrium Spreading Coefficient

When a liquid is applied to a solid surface, it spreads out as a film if the adhesion forces between the liquid molecules and the substrate molecules are greater than the cohesion forces between the liquid molecules themselves. Thus, the work of adhesion W_a is defined as the energy required to break the attractive forces between the dissimilar liquid and substrate molecules. It is the sum of the energies (surface tensions) of the two new surfaces that are formed, minus the substrate-liquid energy of the interface that is lost.

$$W_a = \gamma_{lv} + \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad (21)$$

From Equations (20) and (21), the work of adhesion W_a can be expressed as follows:

$$W_a = \gamma_{lv}(1 + \cos \theta_{eq}) \quad (22)$$

Alternatively, the work of adhesion W_a can be calculated by the following Equation (23) (Grifalco & Good, 1957).

$$W_a = 2\Phi(\gamma_{lv}\gamma_{sv})^{1/2} \quad (23)$$

Where Φ is an interaction parameter taking values in the range $0.5 < \Phi < 1.15$. A high value of the interaction parameter Φ (i.e., close to unity) is indicative of strong interactions between the liquid droplet and substrate molecules.

From Equations (21) and (23), the substrate-liquid interfacial tension γ_{sl} can be calculated in terms of the interaction parameter Φ .

$$\gamma_{sl} = \gamma_{sv} + \gamma_{lv} - 2\Phi(\gamma_{sv}\gamma_{lv})^{1/2} \quad (24)$$

Accordingly, the work of cohesion W_c is the energy required to separate two "clods" of the spreading liquid and is given by:

$$W_c = 2\gamma_{lv} \quad (25)$$

Note that from Equations (20), (21), and (25), the equilibrium contact angle θ_{eq} can be calculated from the ratio of the work of adhesion and the work of cohesion as follows:

$$\cos \theta_{eq} = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}} = 2W_a/W_c - 1 \quad (26)$$

From Equation (26), the following limiting values for the equilibrium contact angle can be obtained.

$$W_a = W_c; \cos \theta_{eq} = 1 \text{ and } \theta_{eq} = 0^\circ \quad (27)$$

$$W_a = W_c/2; \cos \theta_{eq} = 0 \text{ and } \theta_{eq} = 90^\circ \quad (28)$$

$$W_a \ll W_c; \cos \theta_{eq} \rightarrow -1 \text{ and } \theta_{eq} \rightarrow 180^\circ \quad (29)$$

The distinction between the different wetting states of a substrate by a spreading liquid (see Supplementary Figure S9b) can alternatively be made using the equilibrium spreading coefficient, S_{eq} which is defined by the difference between the work of adhesion and the work of cohesion.

$$S_{eq} = W_a - W_c = \gamma_{sv} - (\gamma_{sl} + \gamma_{lv}) \quad (30)$$

Equations (20) and (30) can be used to derive the following expression for the equilibrium spreading coefficient S_{eq} known as the Young-Dupré Equation (Pierre-Gilles de Gennes & Quere, 2004).

$$S_{eq} = \gamma_{lv}(\cos \theta_{eq} - 1) \quad (31)$$

If the values of θ_{eq} and γ_{lv} are known or measured, the numerical value of S_{eq} can be calculated for a smooth surface. However, various substrate defects, including surface roughness, chemical heterogeneity, and the presence of granulation, can affect the local value of the spreading coefficient (Bonn et al., 2009). When the surface is rough, the number of liquid-solid contacts increases and so does the liquid spreading on the substrate. This increase in solid-liquid interactions, caused by the increased interface area under the droplet, leads to a decrease in the apparent contact angle θ_w , described by the well-known Wenzel wetting equation (Bormashenko, 2018).

$$\cos \theta_w = r (\gamma_{sv} - \gamma_{sl}) / \gamma_{lv} = r \cos \theta_{eq} \quad (32)$$

The apparent equilibrium contact angle θ_w accounts for the increased interface area under the droplet in contact with the rough substrate. r denotes the surface roughness and is given by the ratio of the real (actual area of the rough surface) to the projected area covered by the liquid droplet. A roughness value greater than one ($r > 1$) enhances the wetting properties of a smooth substrate, which is consistent with the contact angle experiments of Bico et al. (2001) and Shibuichi et al. (1996) (Bico, Tordeux, & Quéré, 2001; Shibuichi, Onda, Satoh, & Tsujii, 1996).

Development of a Dynamic Droplet Spreading Model

The dynamic spreading of HA and HA-Tyr droplets deposited on different substrates (i.e., GS, MA, PNM), under different environmental conditions (i.e., L and CC) and droplet configurations (i.e., pendant or sessile), was modeled by developing a dynamic droplet deformation model following the original developments of Härth and Schubert (2012) and Alexopoulos and Kiparissides (2018) (Alexopoulos & Kiparissides, 2018; Härth & Schubert, 2012).

The dynamic evolution of the droplet geometry was approximated by a spherical cap (see Figure 12c). This approximation applies to liquid droplets where the droplet radius r is smaller than the capillary length L_c .

$$r < L_c = \sqrt{\gamma_{lv} / \rho g} \quad (33)$$

ρ is the density of the liquid and g is the gravitational acceleration constant.

For a spherical droplet cap with a base radius r , and height h , the droplet volume V , will be given by

$$V(r, h) = \frac{\pi}{6} (3r^2h + h^3) = \text{const} \quad (34)$$

The droplet volume V remains constant with time as long as no physical (e.g., evaporation) or chemical (e.g., reaction) changes take place in the liquid phase. By differentiating Equation (34) the following relationship between dh and dr is obtained.

$$dh = -\frac{2rh}{r^2 + h^2} dr \quad (35)$$

In general, the dynamic spreading of a liquid droplet on a substrate is determined by the equilibrium of capillary, viscous, and gravitational forces acting on the droplet. The total force F_{tot} is therefore represented by Equation (36).

$$F_{tot} = F_C + F_G - F_V \quad (36)$$

The capillary force F_C for a liquid droplet partially wetting the substrate is given by (Härth & Schubert, 2012).

$$F_C = 2\pi r \left(S(t) + \gamma_{lv} \frac{2r^2}{r^2 + h^2} \right) \quad (37)$$

Here, $S(t)$ is a time-varying spreading coefficient. In the present work, the time-varying spreading coefficient was calculated using the following Equation (38) expressed in terms of the time-varying contact angle θ for a rough surface and the calculated equilibrium values of S_{eq} and θ_{eq} .

$$S(t) = \frac{S_{eq}(\cos\theta - 1)}{\cos\theta_{eq} - 1} \quad (38)$$

The values of S_{eq} and θ_{eq} for different HA concentrations and substrates are reported in Table 6. The time-varying contact angle θ can be calculated by (see Figure 12c):

$$\cos\theta = \frac{R - h}{R} = \frac{r^2 - h^2}{r^2 + h^2} \quad (39)$$

Where R is the radius of the spherical cap, equal to

$$R = \frac{r^2 + h^2}{2h} \quad (40)$$

The gravitational force F_G is given by (Härth & Schubert, 2012):

$$F_G = \frac{\rho g \pi r^3 h}{6R} \quad (41)$$

Finally, the viscous force F_V for a liquid droplet, undergoing simple shear flow, will be proportional to the product of the shear stress, τ , and the surface area, A , parallel to the flow direction (Fara, 2000).

$$F_V = \tau A = n\dot{\gamma} A = \eta \left(\frac{dr}{dt} \right) 2\pi r \quad (42)$$

Where η is the viscosity of the deposited liquid droplet and $\dot{\gamma}$ is the shear rate (i.e., dr/dt).

Assuming that the forces acting on the liquid droplet are in the pseudo-stationary state (i.e., $F_{tot} \approx 0$), and substituting Equations (37), (41), and (42) into Equation (36), the following Equation is obtained:

$$0 \approx 2\pi r \left(S(t) + \gamma_{lv} \frac{2r^2}{r^2 + h^2} \right) + \rho g \frac{\pi r^3 h}{6R} - 2\pi r \eta \frac{dr}{dt} \quad (43)$$

From Equation (44), the shear rate dr/dt can be calculated.

$$\frac{dr}{dt} = \frac{S(t)}{\eta} + \frac{2\gamma_{lv}}{\eta} \frac{r^2}{r^2 + h^2} + \frac{1}{12} \frac{\rho g r^2 h}{\eta R} \quad (44)$$

Accordingly, the time variation of the droplet height dh/dt can be calculated from Equation (45).

$$\frac{dh}{dt} = -\frac{2rh}{r^2 + h^2} \frac{dr}{dt} \quad (45)$$

From the numerical solution of the two differential Equations (44) and (45), the time variation of the droplet radius r , droplet height h , aspect ratio $z = r/h$ and contact angle θ can be calculated. A MATLAB code was developed for the integration of the governing coupled differential equations using a variable time-step Runge-Kutta method.

Comparison of Experimental Data and Model Predictions

To compare experimentally acquired data with the predictions obtained from the developed theoretical model for droplet spreading results, i.e., the evolution of the contact angle θ and aspect ratio z , the Spearman correlation coefficient r_s was calculated according to Equation (46) using the rank correlation of experimental values x and predicted values y .

$$r_s = \frac{\sum_{i=1}^n (r(x_i) - \bar{r}_x)(r(y_i) - \bar{r}_y)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (r(x_i) - \bar{r}_x)^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (r(y_i) - \bar{r}_y)^2}} \quad (46)$$

5

5.1.5 Results and Discussion

Comparison of Porcine Nasal Mucosa and Artificial Analogs

To develop a suitable analog of the nasal mucosa, two different mucin concentrations (porcine mucin type II, 2.5 wt% and 5 wt%) were prepared in a 1 % low-melting agarose base to mimic the physiological mucus. Naturally occurring mucus is consisting of 0.2-5 wt% mucin, 1-2 wt% lipids, 0.5-1 wt% physiological salts and 95 wt% water (Kaliner et al., 1986; Leal et al., 2017). The selection criteria for an artificial MA for spreading studies were: (i) detachment force of the artificial MA comparable to that of the PNM explants using mucoadhesive hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films as a reference; (ii) the formation of a reproducible surface stable under physiological conditions of the nasal cavity (i.e., 33 to 34 °C in the nasopharynx and 90 to 95 % relative humidity) (Ingelstedt & Ivstam, 1951; Keck et al., 2000); (iii) comparable spreading behavior on MA and PNM. The obvious advantages of artificial mucosa compared to mucosa explants (obtained from slaughter) are: (I) the general availability of artificial mucosa; (II) low production costs; (III) the ease of preparation and low variability of samples due to age, sex, breeder, and post-mortem delay of the pigs; (IV) no need for fresh nasal mucosa from slaughter pigs.

Using a texture analyzer and a hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) film as complementary surface, the measured adhesiveness was similar for the MA composed of 5 wt% mucin 0.04 ± 0.01 N mm and for the PNM 0.07 ± 0.01 N mm (Figure 13a). In contrast, the artificial mucosa with a composition of 2.5 wt% mucin showed an adhesiveness of 0.10 ± 0.02 N mm, which was significantly higher than that of the original PNM (t-test, *** $p < 0.001$). Therefore, the

composition of 5 wt% mucin was chosen as MA for all subsequent experiments and is consequently a suitable analog for PNM in terms of mucoadhesion, which was determined by measuring the detachment force (see selection criterion (i) above).

Figure 13b shows the value of the average surface roughness S_a of PNM samples obtained from four individual pigs (see Equation (14)). The measured average value was $7.61 \pm 0.73 \mu\text{m}$. Moreover, the average value of S_a of the artificial MA with 5 wt% mucin was comparable to PNM with $7.80 \pm 1.95 \mu\text{m}$. The difference in standard deviations of both materials should be noted. The values of the surface roughness ratio r for the artificial mucosa and PNM, measured under laboratory conditions, were 1.12 and 1.17, respectively. Consequently, MA exhibited reproducible surface properties similar to those of PNM and is therefore evaluated as a reproducible surface and PNM analog (see selection criterion (ii) above).

Figure 13c and Figure 13d show laser-scanning microscopy images, measured surface height profiles, and 3D images of PNM and artificial mucosa. From the comparison of the laser-scanning and 3D images of PNM and MA substrates, it is evident that the PNM surface is flatter compared to the MA substrate, whereas the latter images show some granulation. The observed granulation of the MA substrate could be due to insufficient dissolution of mucin and agarose during the preparation of the glass coating solution, resulting in the presence of some insoluble residues. Despite the observed differences in the laser-scanning images, the measured height profiles of both samples were comparable in color. Both samples are generally flat, as shown by the large blue, turquoise, and green regions in Figure 13c and Figure 13e, covering about 75 % of the PNM samples and about 85 % of the MA substrates. Some random elevations of up to $9 \mu\text{m}$ (PNM) and $10 \mu\text{m}$ (MA) were detected. Small patches of maximum height are displayed in red, but account for only about 1 % of the PNM and MA samples (Figure 13e). The MA samples are flatter, possibly confirming the presence of insoluble residues, while the PNM samples have more transitions indicated by approximately 23 % yellow and orange areas (Figure 13e) resulting from the curvature of the extracted natural tissue. Thus, the artificial mucosa developed in this study fulfilled the desired specifications described above and is a sufficient analog of PNM for various experimental setups (see selection criteria (i) and (ii) above).

In intranasal delivery, model systems based on e.g., air-liquid interface cell culture systems are being developed (Ladel et al., 2018; Ladel et al., 2019), where co-culture of epithelial cells and supporting cells using trans-well inserts in cell culture plates is realized to mimic physiological conditions and investigate cellular mechanisms, such as protein and IgG antibody uptake. In addition, *ex vivo* models as the one used here, based on biopsies obtained from slaughterhouse material to avoid animal testing, are used to study nose-to-brain approaches (Ladel et al., 2018; Alpesh Mistry, 2009; Spindler et al., 2021) as close as possible to physiological conditions by investigating the complete intact olfactory mucosa tissue. As demonstrated here, these models can be further replaced and simplified by the above-characterized artificial MA that does not even require fresh tissue from slaughtered animals but can simply be prepared in the laboratory, e.g., in mucoadhesion research and for studying mucoadhesive formulations, such as intranasal drug delivery formulations or swelling studies of hydrogels and particles. Investigation of mucosal uptake of drugs from drug delivery systems as a secondary approach requires the *ex vivo* models or cell culture assays described above. Consequently, the developed MA is limited to surface-based and application-oriented mucosa research questions, but at the same time covers initial important questions for mucoadhesive applications as well as mucosal drug delivery systems and allows rapid screening of different polymer candidates without extensive tissue preparation and cell culture infrastructure. All these approaches follow the concept of replacing, reducing, and refining (3R)

animal testing for the evaluation of medical and pharmaceutical products (EU, 2010; Russell & Burch, 1960).

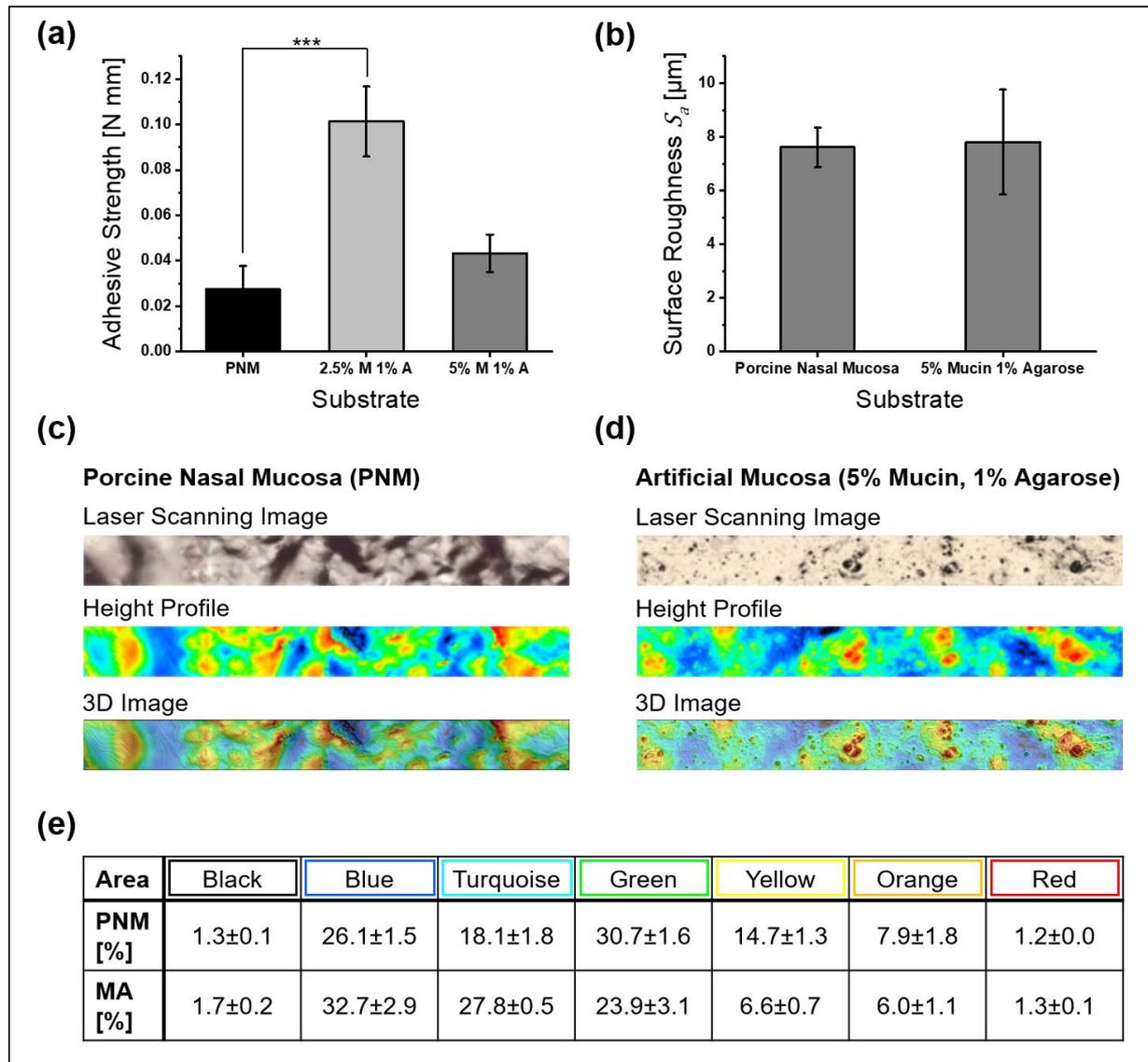


Figure 13: Comparison of fresh ex vivo porcine nasal mucosa (PNM) and artificial mucin-agarose mucosa analogs (MA) under laboratory conditions (21.5 °C and 50 % humidity). (a) Measured adhesiveness of a hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) film on PNM and MA substrates of different compositions (2.5 wt% or 5 wt% mucin). The indicated adhesiveness is the average value of four measurements (n = 4; t-test, ***p < 0.001); (b) Average values of surface roughness S_a [μm] of PNM and MA substrates (N = 4); (c) 10203 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ laser-scanning image, height profile, and reconstructed 3D image of PNM. (d) 10236 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ laser-scanning image, height profile, and reconstructed 3D image of MA substrate (5 wt% M, 1 wt% A). High quality images of the scanned areas were acquired with a 10x magnification and a resolution of 5 μm in the z-axis. (e) Quantified color areas in percent of height profiles of PNM and MA substrate (n = 3).

Droplet Volumes, Solution Viscosity and Surface Tension

Table 5 compares the droplet volumes automatically measured by the contact angle software with the droplet volumes calculated according to Equation (18) for the three HA concentrations (10, 20, and 30 mg mL^{-1}), two different substrates (GS and MA (5 wt% mucin, 1 wt% agarose)), and

two different conditions (L at 21.5 °C and 50 % humidity, CC at 34 °C and 90 % humidity mimicking the environment in the nasal cavity).

Table 5: Comparison of the experimentally measured and calculated droplet volumes. Hyaluronate (HA) solutions of different concentrations (10 mg mL⁻¹, 20 mg mL⁻¹, and 30 mg mL⁻¹) deposited on standard glass slides (GS) and artificial mucosa (MA; 5 wt% mucin and 1 wt% agarose) under different conditions (laboratory environment (L) at 21.5 °C and 50 % humidity, climatic chamber (CC) at 34 °C and 90 % humidity). The reported results are the average values of three experiments (n = 3). Calculated values of HA and hyaluronate tyramine (HA-Tyr) solution viscosities η and surface tensions γ_{lv} . n.d.: not determined.

Substrate	Polymer	Concentration c [mg mL⁻¹]	Dosed Droplet Volume V [μL]	Calculated Droplet Volume V [μL], Eq.(18)	Calculated Solution Viscosity η [Pa·s]	Calculated Surface Tension γ_{lv} [mN m⁻¹]
GS, L	HA	10	14	13.9	0.5852±0.0192	46.82
GS, L	HA	20	14	14.0	2.9617±0.1609	46.82
GS, L	HA	30	14	14.1	7.4887±0.2714	46.82
Artificial Mucosa, CC	HA	10	14	14.0	0.5852±0.0192	46.82
Artificial Mucosa, CC	HA	20	12	12.0	2.9617±0.1609	46.82
Artificial Mucosa, CC	HA	30	12-14	13.2	7.4887±0.2714	46.82
Artificial Mucosa, L	HA	10	14	14.0	0.5852±0.0192	46.82
Artificial Mucosa, L	HA	20	14	14.1	2.9617±0.1609	46.82
Artificial Mucosa, L	HA	30	14	14.0	7.4887±0.2714	46.82
Artificial Mucosa, L	HA-Tyr	10	14	n.d.	0.0650±0.0310	44.86

As shown in Table 5, the calculated droplet volumes are in excellent agreement with the values determined by the contact angle software for the dosed droplets.

The interfacial tension of aqueous HA solutions was determined by the pendant droplet method. This yielded values of 46.82 mN m⁻¹ for HA (1260 kDa) and 44.86 mN m⁻¹ for HA-Tyr (240-360 kDa), respectively. Thus, neither the chemical modification nor the difference in molecular weight (MW) had a strong influence on the interfacial tension of the solution.

The developed equations were solved numerically with the known/measured values of physical properties (i.e., density ρ , viscosity η , surface tension γ_{lv}) of the tested HA and HA-Tyr solutions

(Table 5). The densities of the HA and HA-Tyr solutions were 1.0197 g cm^{-3} and 1.0191 g cm^{-3} , respectively.

Figure 14a shows the rheologically measured change in viscosity of the HA solution η as a function of HA concentration c . It can be seen that with increasing HA concentration, the viscosity of the HA solution increases from about 0.6 Pa s at an HA concentration of 10 mg mL^{-1} to about 7.5 Pa s at an HA concentration of 30 mg mL^{-1} . The calculated viscosity (Equation (15)) of the HA solution (Figure 14a; dashed line) is in excellent agreement with the experimentally measured viscosity values (Figure 14a; discrete dots).

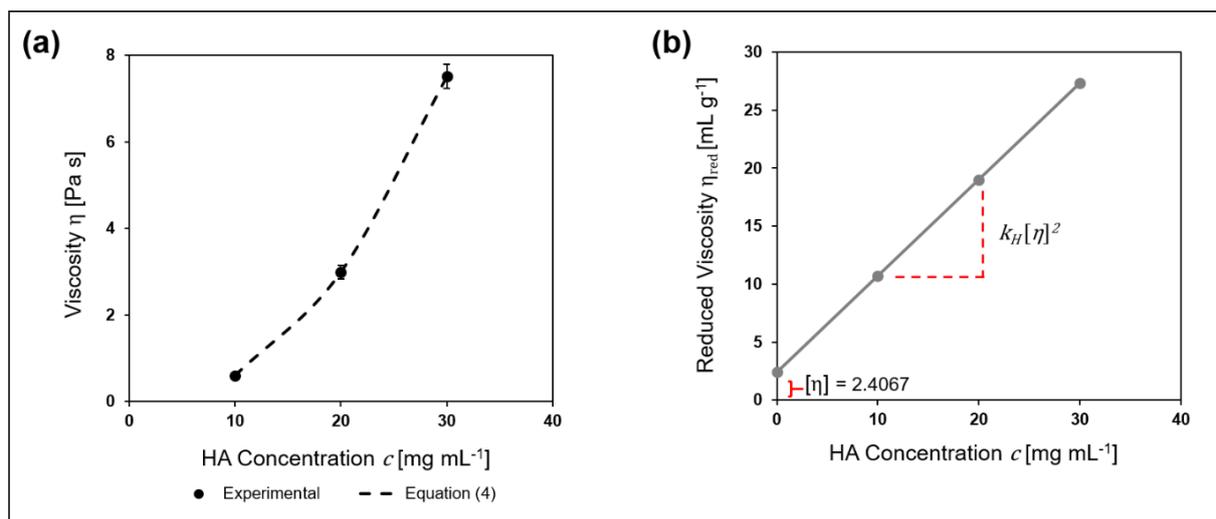


Figure 14: (a) Dependence of solution viscosity η on hyaluronate (HA) concentration c . The experimental viscosity results are the average values of three experiments ($n = 3$). (b) Reduced viscosity η_{red} in terms of HA concentration c . $[\eta]$: Intrinsic viscosity of HA; k_H : Huggins coefficient.

5

The reduced viscosity η_{red} is a linear function of the HA polymer concentration c . Therefore, from a linear plot of η_{red} values as a function of c , the intrinsic viscosity of HA $[\eta]$ and the Huggins coefficient k_H can be calculated by the intercept and slope $k_H [\eta]^2$ of the linear line, respectively. From the results of Figure 14b, the values of $[\eta]$ and k_H are 2.4067 mL g^{-1} and 0.83 , respectively. Using these values, the average molecular weight M_v of HA was calculated (Equation (17)) confirming that it is 1260 kDa .

In contrast, the viscosity of HA-Tyr was determined to be $0.0650 \pm 0.0310 \text{ Pa s}$, while the native HA with the identical concentration of 10 mg mL^{-1} yielded $0.5852 \pm 0.0192 \text{ Pa s}$, which can be attributed to the different MW. The native HA used has a MW of 1260 kDa , whereas the HA-Tyr used here is composed of $240\text{-}360 \text{ kDa}$ units. Due to the approximately 10-fold higher MW of the native HA, its viscosity at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ is an order of magnitude higher, so that the solution viscosity increases proportionally to the MW of the HA used.

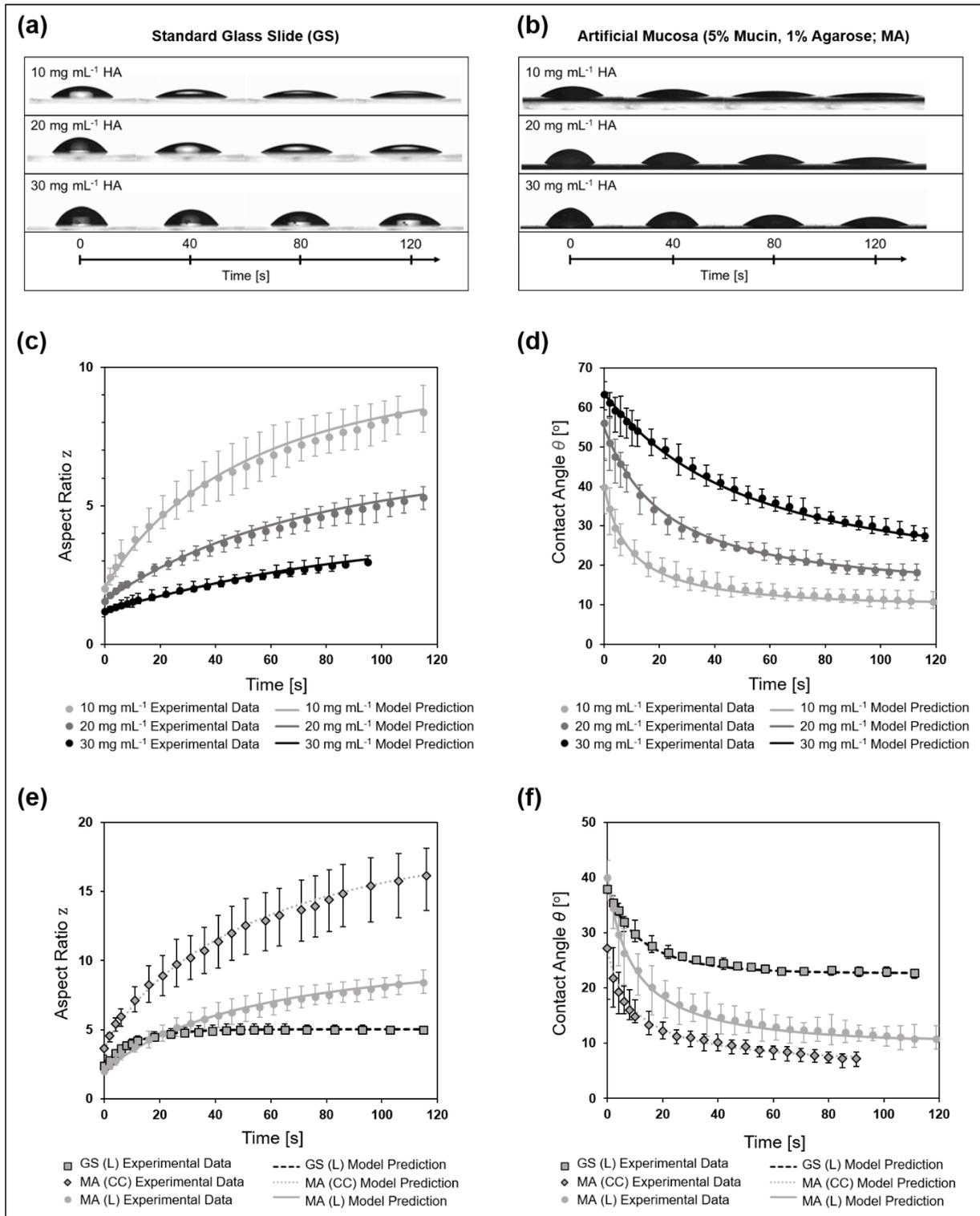


Figure 15: Effect of the hyaluronate (HA) concentration (1260 kDa, PBS, pH 7.4) on the dynamic evolution of droplet spreading on (a) a standard glass slide (GS) and (b) an artificial mucosa substrate (MA; 5 wt% mucin, 1 wt% agarose). (c-f) Comparison of experimental measurements (discrete dots) with the predictions obtained from the developed theoretical model (continuous and dotted lines). The Spearman correlation coefficient r_s is 1.00 in all cases (c-f). Dynamic evolution of the aspect ratio z (c) and the contact angle θ (d) for different HA concentrations (10, 20, and 30 mg mL⁻¹) on MA in laboratory environment (L; at 21.5 °C and 50 % humidity). Effect of substrate and environmental conditions on the dynamic evolution of z (e) and θ (f) for HA (10 mg mL⁻¹) on GS or MA substrate in L or in climate chamber (CC; ca. 34 °C and 90 % humidity) environment. The reported experimental results are the average values of four measurements ($n = 4$).

Dynamic Droplet Spreading and Parameter Predictions

For experimental measurements of aspect ratio and contact angle as a function of time, 14 μL of HA solution (10, 20 and 30 mg mL^{-1}) was applied as a liquid droplet to the selected substrate (i.e., GS, MA (5 wt% mucin and 1 wt% agarose)) and recorded approximately 2 min until the droplet shape reached an equilibrium state. Figure 15a (GS) and Figure 15b (MA) show characteristic snapshots of the deformed droplets. Figures 15c and Figure 15d show experimental results of the time evolution of aspect ratio z and contact angle θ for HA solutions deposited as sessile droplets on the MA substrate in laboratory environment. The same procedure was followed for all other droplet deposition experiments on different substrates. The experimental results for deposition of HA solutions on different substrates were similar to those shown in Figures 15c and Figure 15d and are presented in Supplementary Figure S10 for brevity.

Effect of HA Concentration on Droplet Spreading

The dynamic model predictions (Figure 15c and Figure 15d) for z and θ are compared to the corresponding experimentally measured values for different HA concentrations on artificial mucosa. In all cases, the model predictions agree closely with the respective experimental measurements. The Spearman correlation coefficient showed $r_s = 1.00$ in all cases. From the results in Figure 15c, it can be seen that z decreases with increasing HA concentration, which is due to the increased viscosity of the solution (see Table 5). Consequently, more viscous solutions result in less pronounced wetting of the substrate and less deformation of the droplets (i.e., lower aspect ratio values). Also, with increasing HA concentration, θ increases (Figure 15d) due to the higher solution viscosity η , higher values of interfacial tension between substrate and liquid γ_{sl} and higher absolute values of the spreading coefficient S_{eq} (see Table 6).

5

Effect of Substrate and Environment on Droplet Spreading

The dynamic model predictions (continuous lines) for z and θ with the corresponding experimentally measured values for an HA solution concentration of 10 mg mL^{-1} on GS and MA substrate in CC and L environment are shown in Figure 15e and Figure 15f. In all cases, the model predictions again agree closely with the respective experimental measurements and the Spearman correlation coefficient resulted in $r_s = 1.00$ in all cases. Moreover, the MA substrate was stable under physiological conditions in the climate chamber at 34 $^{\circ}\text{C}$ and 90 % humidity throughout all droplet spreading investigation and thus confirmed its suitability as PNM analog (see selection criterion (iii)). From the results in Figure 15e, the aspect ratio values for the artificial mucosa are higher than the corresponding values for the GS, indicating a stronger spreading and thus a greater affinity of the HA solution for the mucin-agarose substrate compared to glass. The better wetting of the MA could also be due to the physiological surface roughness ($r > 1$) leading to lower contact angles as a larger substrate-liquid interface is formed, as predicted by Wenzel's wetting Equation (Equation (32)). In addition, the contact angle values for the GS (Figure 15b) are higher than those for the MA due to the higher value of the substrate-liquid interfacial tension γ_{sl} , the lower value of the interaction coefficient Φ , and the higher absolute value of the spreading coefficient S_{eq} (see Table 6).

The aspect ratio values in the CC were higher than those obtained under L conditions (see Figure 15e), which can be attributed to the higher humidity in the CC, which significantly reduces water

evaporation from the liquid droplets. As water evaporation rate increases, the viscosity η of the liquid droplet increases and, at the same time, the deformation of the droplet decreases. A similar difference between the measured and predicted contact angles can be seen in Figure 15f, which can be attributed to the higher humidity in the CC. The experimental and model results for HA concentrations of 20 and 30 mg mL⁻¹ are shown in Supplementary Figure S10.

The Equilibrium Spreading Coefficient

Determining the interfacial and adhesion properties of a liquid-droplet-substrate-system is critical to predicting the wetting and adhesion properties of a substrate by a liquid. The work of adhesion W_a is a measure of the strength of the interactions between the adhesive liquid and the adherent substrate (Park & Seo, 2011). Thus, the greater the interfacial tension between the solid and the liquid γ_{sl} , the greater W_a between the two surfaces. The higher W_a values calculated for the HA-artificial-mucosa-system (see Table 5, MA) indicate that a larger amount of energy is required to separate the two surfaces and that the affinity of the HA-MA system is consequently greater than that of the HA-glass system. Moreover, the stronger interaction of the HA droplet with the artificial mucosa is supported by the higher values of the interaction parameter Φ (Equation (23)) compared to the corresponding values of Φ for GS.

Table 6 shows the measured values of the apparent contact angle at equilibrium θ_w and the calculated values of the solid-liquid interfacial tension γ_{sl} , the work of adhesion W_a , the interaction parameter Φ , and the equilibrium spreading coefficient S_{eq} for three aqueous HA solutions (10, 20, and 30 mg mL⁻¹) deposited on GS and artificial MA.

Table 6: Apparent contact angle (θ_w), work of adhesion (W_a), interaction parameter (Φ), interfacial tension (γ_{sl}), and equilibrium spreading coefficient (S_{eq}) of three hyaluronate (HA) solutions with concentrations (c) of 10 mg mL⁻¹, 20 mg mL⁻¹, and 30 mg mL⁻¹ on standard glass slides (GS) and artificial mucosa analogs (MA; 5 wt% mucin and 1 wt% agarose), measured in laboratory environment (L) at 21.5 °C and 50 % humidity as well as in a climatic chamber (CC) at 34 °C and 90 % humidity. The reported experimental results are the average values of four measurements ($n = 4$).

Substrate	HA Concn. c [mg mL ⁻¹]	Apparent Contact Angle θ_w [°]	Work of Adhesion W_a [mN m ⁻¹] Eq. (10)	Interaction Parameter Φ [-] Eq. (11)	Interfacial Tension γ_{sl} [mN m ⁻¹] Eq. (12)	Eq. Spread. Coefficient S_{eq} [mN m ⁻¹] Eq. (18)
GS, L	10	22.4	90.11	0.76	31.71	-3.5
GS, L	20	27.2	88.46	0.75	33.36	-5.2
GS, L	30	42.5	81.36	0.69	40.46	-12.3
MA, CC	10	7.60	93.23	0.96	3.59	-0.4
MA, CC	20	12.3	92.57	0.96	4.25	-1.1
MA, CC	30	16.9	91.62	0.95	5.20	-2.0
MA, L	10	10.9	92.80	0.96	4.02	-0.8
MA, L	20	17.9	91.37	0.94	5.45	-2.3
MA, L	30	27.2	88.46	0.91	8.36	-5.2

From the results of Table 6 and Equation (32), the value of the surface roughness ratio r for the GS and MA substrates in L environment, and for the MA substrate in CC environment was calculated and found to be equal to 1.00, 1.12, and 1.12, respectively. The calculated value of r for the artificial mucosa (L) is consistent with the experimentally value r measured by laser-scanning microscopy (see Equation (14)), and is also comparable to the surface roughness of 1.17 of the natural PNM.

5.1.5 Model Validation with Porcine Nasal Mucosa and HA-Tyr

To validate the developed dynamic spreading model, droplet aspect ratios z and contact angles θ were predicted for HA-Tyr (10 mg mL^{-1}) in sessile configuration on MA in the CC and under L conditions. In addition, dynamic spreading of HA-Tyr solutions was predicted and validated for explants of PNM under L conditions. In Figure 16a and Figure 16b, the predictions of the dynamic model (continuous and dotted lines) for z and θ are compared with the corresponding experimentally measured values (discrete dots). In all cases, the model predictions agree well with the respective experimental measurements. The results for both the MA and PNM substrates show strong spreading and a large affinity of the HA-Tyr solution for the substrate, which is confirmed by the calculated values of interfacial tension γ_{sl} , interaction coefficient Φ , work of adhesion W_a , and spreading coefficient S_{eq} for the HA-Tyr-MA and HA-Tyr-PNM systems (see Table 7). The most favorable droplet spreading is observed for the artificial mucosa in CC environment (Figure 16a, Figure 16b) due to the high relative humidity of 90 %, whereas contact angles for MA and PNM in L environment were very similar and the MA even revealed more intense spreading than PNM, which is displayed in higher aspect ratios over time.

5 Comparison of the spreading of native HA (Figure 15e, Figure 15f) and HA-Tyr (Figure 16a, Figure 16b), both at a solution concentration of 10 mg mL^{-1} , showed lower contact angles for HA-Tyr but had no effect on the aspect ratio during spreading. In the L environment, z for HA-Tyr varied from 4 to 8, while HA resulted in z values of 2-8. In the CC environment, z for HA-Tyr ranged from 4 to 10, while HA led to z 4-15. It was found that θ s were higher for HA compared with HA-Tyr, starting at 40° (HA) instead of $20\text{-}30^\circ$ (HA-Tyr), which could be explained by the higher MW of native HA (1260 kDa) compared with the HA-Tyr used (240-360 kDa). In addition, a sigmoidal curvature was observed for HA-Tyr, described by an initial strong change in the spreading velocity. For HA-Tyr, the greatest spreading occurred within the first 40-60 s, followed by an equilibrium approach, which may be attributed to the mucoadhesion that occurs, forcing the initial spreading. In contrast, the evolution of z and θ in the native HA solution was more uniform within the 120 s studied, and the contact angle was affected by the MW. Consequently, for solutions with higher MWs, such as native HA in this case, the viscoelastic properties of the solution seem to override the mucoadhesion, leading to a more continuous spreading.

Figure 16c and Figure 16d show the dynamic model predictions for z and θ with the corresponding experimentally measured values for HA-Tyr (10 mg mL^{-1}) in sessile and pendant configurations on MA in L environment. In all cases, the model predictions again agree well with the respective experimental measurements. Pendant droplet configurations were investigated because the geometry of the nasal cavity might force the deposition and spreading of the solution on an inverted substrate. From the results of Figure 16c and Figure 16d, it can be seen that a higher z and a lower θ are observed for the sessile droplet configuration ($g > 0$), indicating a stronger spreading compared to the pendant droplet configuration ($g < 0$). This is due to the fact that if a

sessile droplet spreads on a substrate, gravity acts synergistically with the capillary force to assist spreading, whereas in the case of a pendant droplet configuration, gravity acts in the opposite direction and presents an additional obstacle to the development of spreading (Equation (44)). Despite the fact that the strongest spreading occurs in the case of the sessile drop configuration, it is evident from the results (Figure 16c and Figure 16d, Table 7) that stable pendant droplets can also be acquired and exhibit intense spreading, albeit to a lesser extent than the corresponding sessile droplets.

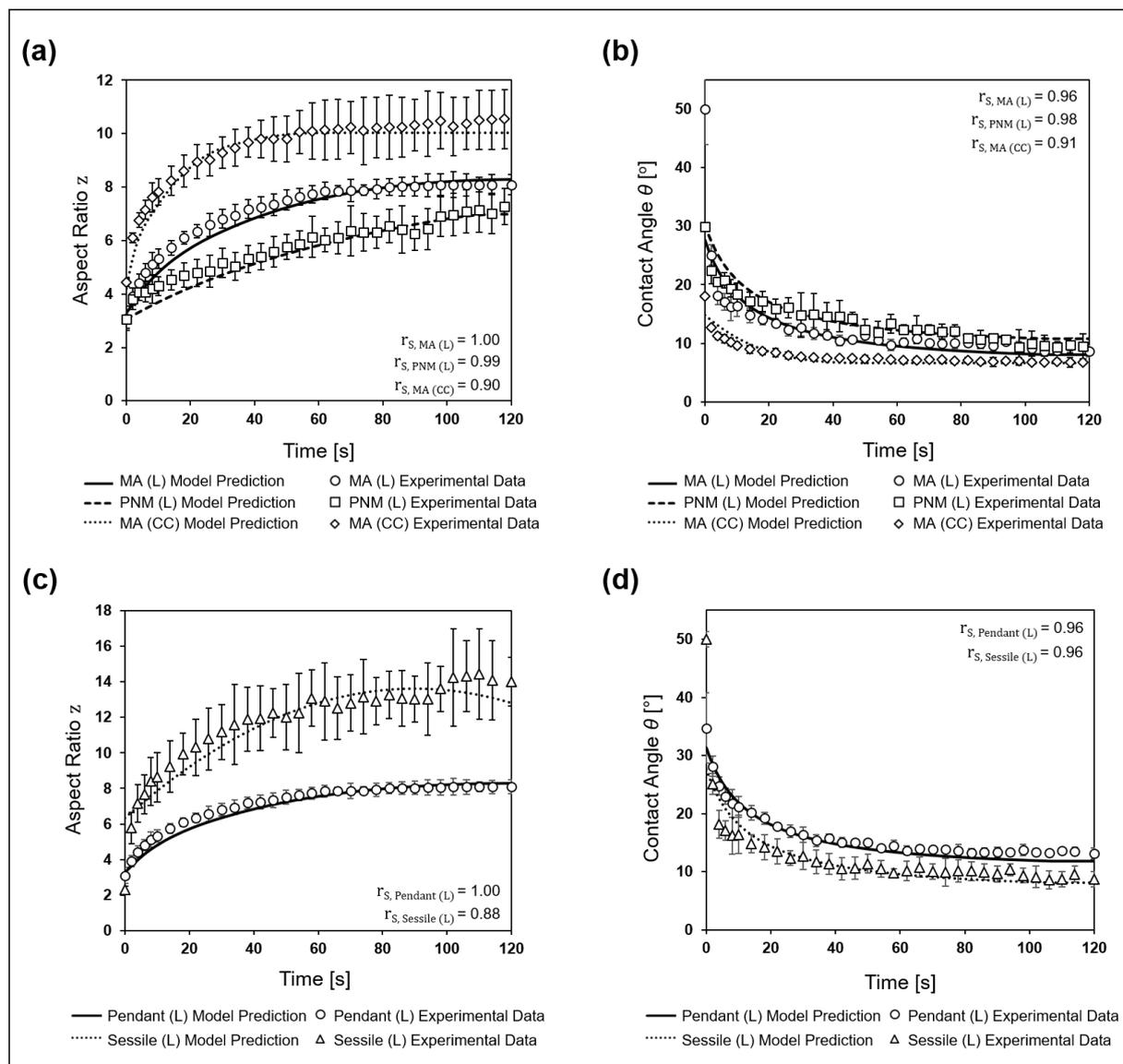


Figure 16: Comparison of predictions obtained from the developed theoretical model (continuous and dotted lines) with experimental measurements (discrete dots). The Spearman correlation coefficient r_s indicates their correlation. Dynamic evolution of (a) the aspect ratio z and (b) the contact angle θ for a tyramine-modified hyaluronic acid (HA-Tyr) (240-360 kDa, DS 2-3 %, 10 mg mL⁻¹ in NaCl solution (9 mg mL⁻¹)) on a mucosa analog (MA; 5 wt% mucin, 1 wt% agarose), in a climatic chamber (CC; ca. 34 °C and 90 % humidity) and in laboratory environment (L; 21.5 °C and 50 % humidity), as well as on olfactory porcine nasal mucosa (PNM) explants in L environment (N = 3). Dynamic evolution of z (c) and θ (d) of HA-Tyr (10 mg mL⁻¹) on MA in L environment in sessile and pendant droplet configuration. The reported experimental results are the average values of three measurements (n = 3).

Table 7 shows the measured values of the apparent contact angle at equilibrium θ_w , and the calculated values of the solid-liquid surface tension γ_{sl} , the work of adhesion W_a , the interaction parameter Φ , and the equilibrium spreading coefficient S_{eq} , for HA-Tyr solutions (10 mg mL⁻¹) applied to the artificial MA and PNM explants for both, sessile and pendant droplet configuration.

Table 7: Apparent contact angle (θ_w), work of adhesion (W_a), interaction parameter (Φ), interfacial tension (γ_{sl}), and equilibrium spreading coefficient (S_{eq}) of tyramine-modified hyaluronate (HA-Tyr) solutions with concentration of 10 mg mL⁻¹ in sessile or pendant droplet configuration, on mucosa analogs (MA; 5 wt% mucin and 1 wt% agarose) and olfactory porcine nasal mucosa (PNM) explants measured in laboratory environment (L) at 21.5 °C and 50 % humidity, as well as in a climatic chamber (CC) at 34 °C and 90 % humidity. The reported experimental results are the average values of three measurements ($N = 3$, $n = 3$).

Substrate	HA-Tyr Concen. c [mg mL ⁻¹]	Apparent Contact Angle θ_w [°]	Work of Adhesion W_a [mN m ⁻¹] Eq. (10)	Interaction Parameter Φ [-] Eq. (11)	Interfacial Tension γ_{sl} [mN m ⁻¹] Eq. (12)	Eq. Spread. Coefficient S_{eq} [mN m ⁻¹] Eq. (18)
MA, L Pend.	10	13.17	88.54	0.935	6.32	-1.2
MA, L Ses.	10	8.67	89.21	0.942	5.65	-0.5
MA, CC	10	6.57	89.43	0.944	5.43	-0.3
PNM, L	10	9.63	89.09	0.941	5.77	-0.6

5

From the results of Table 7 and Equation (32), the value of r for the PNM substrate in L environment was calculated as 1.17. Thus, both, the calculated values of 1.12 (see Table 6) and 1.17 (see Table 7) for the artificial mucosa and PNM in L environment, respectively, agree with the experimentally determined roughness ratio r measured by laser-scanning microscopy and Equation (14).

5.1.6 Conclusions

In the present study, an artificial MA analog following the 3R concept was prepared. Its' validation exhibited very comparable properties to those of the olfactory PNM explants. Thus, it offers a valid alternative to animal experiments or other more complex 3R approaches, i.e., *ex vivo* tissue studies to investigate mucoadhesion, swelling, or other surface-related properties of hydrogels and drug delivery systems. The developed artificial mucosa has distinct advantages over the PNM, such as a constant quality, easy manufacturing at low cost and no variabilities due to different age, sex, breeding or housing conditions. Additionally, the ingredients of MA are easy to obtain compared to fresh mucosa biopsies from slaughtered pigs. MA therefore allows rapid screening of early-stage polymer candidates without extensive tissue preparation or cell culture infrastructure and is the ideal mucosa analog for surface- and application-based studies.

HA concentration was found to be significant for spreading and related parameters, whereas higher concentration increased contact angles and decreased droplet aspect ratios over time. MA proved to pronounce spreading in contrast to standard glass slides, as it caused higher affinity, i.e. through its' mucoadhesive components. HA-Tyr showed similarly high affinity for MA and PNM and sessile droplet orientation was beneficial compared to pendant dosing. Consequently,

inverted dosing - probably necessary for intranasal applications of HA solutions, slightly reduces spreading. On the contrary, the physiological conditions of the nasal cavity, i.e. elevated temperature and humidity increased spreading and thereby could neutralize this effect. The mathematical model developed in this study is not limited to a particular data set as it was able to predict the dynamic spreading behavior of different formulations (native HA, HA-Tyr) with different molecular weights (280-1260 kDa), on different substrates (glass, MA, PNM), in different environments (L, CC) and configurations (pendant or sessile).

The presented model establishes a link between the solution properties (rheological data, chemical composition, and concentration of the formulation), the surface properties of the substrate (e.g., surface tension and surface roughness), the environmental conditions (influence of humidity and temperature) and the spreading behavior of the solution. Among the various potential model improvements, the most interesting could be seen in the more realistic description of the geometry of the nasal cavity or else biological surfaces, which can be achieved by taking into account the spreading dynamics of a droplet on a curved substrate, as well as the effect of the viscoelastic properties, i.e., of the olfactory mucosa

5.1.6 Nomenclature

a	Mark-Houwink parameter [-]
A	Surface area parallel to the direction of flow [mm ²]
A	Cross-sectional area of the sample for the roughness measurement [μm ²]
c	Polymer concentration in the solution [mg mL ⁻¹]
F_{tot}	Total radial force acting on the droplet [N]
F_C	Capillary force [N]
F_G	Gravitational force [N]
F_V	Viscous force [N]
g	Gravitational acceleration constant [m s ⁻²]
h	Height of the spherical droplet cap [cm]
K	Mark-Houwink parameter [mL g ⁻¹]
k_H	Huggins coefficient [-]
L_c	Capillary length [mm]
M_v	Viscosity-average molecular weight [MDa]
R	Radius of the spherical droplet cap [mm]
r	Base radius of the spherical droplet cap [mm]
r_s	Spearman correlation coefficient [-]
r_x	Rank of experimental values [-]
r_y	Rank of predicted values from the developed theoretical model [-]

r_1, r_2	Principal radii of curvature of the pendant droplet [m]
$S(t)$	Time-varying spreading coefficient [mN m^{-1}]
S_a	Roughness parameter [μm]
S_{dr}	Ratio between interfacial and projected area [-]
S_{eq}	Spreading coefficient at steady state [mN m^{-1}]
t	Time [s]
V	Droplet volume [μL]
W_a	Work of adhesion [mN m^{-1}]
W_c	Work of cohesion [mN m^{-1}]
x	Experimental values [-]
y	Predicted values from the developed theoretical model [-]
Z	Height of the surface [μm]
z	Aspect ratio [-]

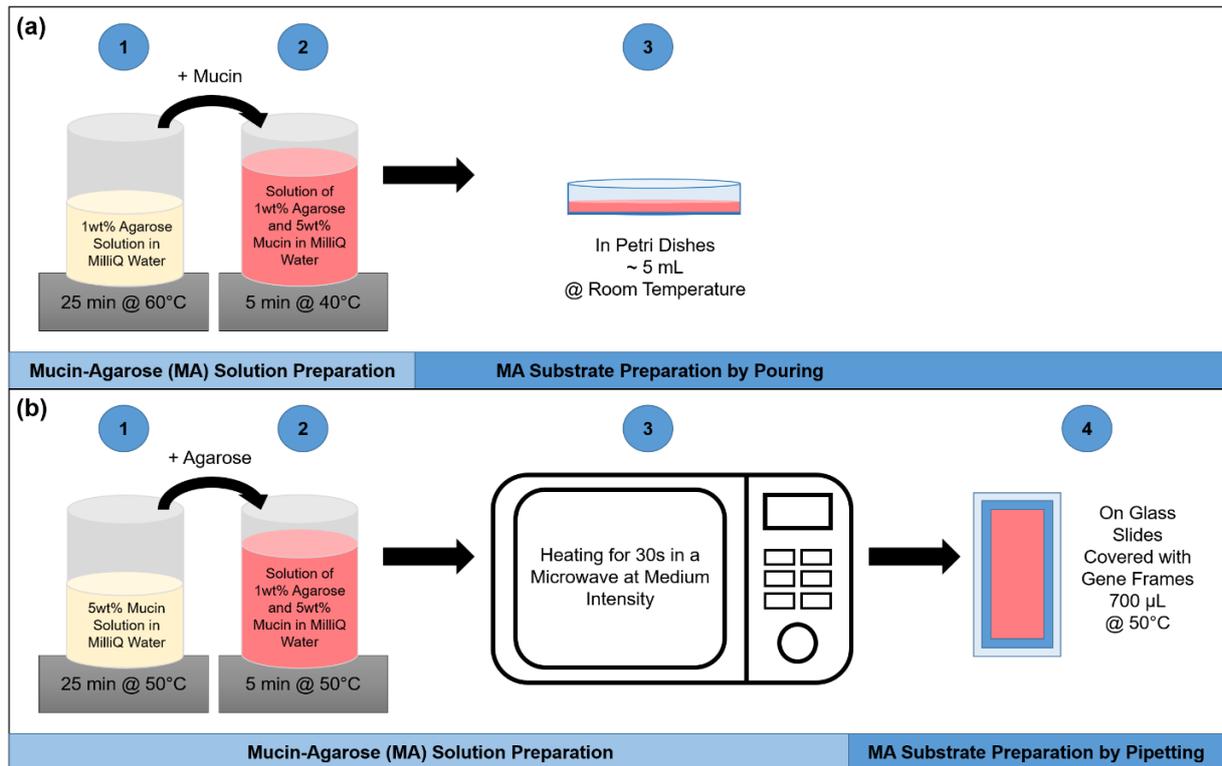
Greek Symbols

$\dot{\gamma}$	Shear rate [s^{-1}]
γ_{sv}	Solid/vapor surface tension of the substrate [N m^{-1}]
γ_{sl}	Solid/liquid interfacial tension [N m^{-1}]
γ_{lv}	Liquid/vapor surface tension [N m^{-1}]
ΔP	Pressure difference across the droplet's surface [Pa]
$\Delta\rho$	Density difference [kg m^{-3}]
η	Viscosity of the polymer solution [Pa s]
η_0	Viscosity of the solvent [Pa s]
η_{red}	Reduced viscosity of the polymer solution [mL g^{-1}]
$[\eta]$	Intrinsic viscosity [mL g^{-1}]
θ	Time-varying contact angle [$^\circ$]
θ_{eq}	Contact angle at steady state [$^\circ$]
θ_w	Apparent equilibrium contact angle on a rough substrate [$^\circ$]
ρ	Density of the solution [g cm^{-3}]
τ	Shear stress [N m^{-2}]
Φ	Interaction parameter [-]

5.1.6 Acknowledgements

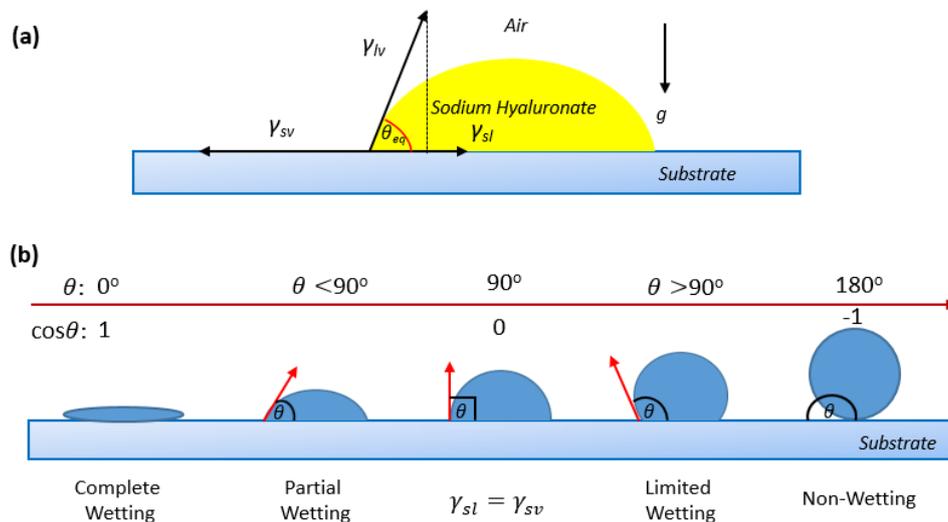
This study was supported by the EU grant “N2B-patch” under the *European Framework Program for Research and Innovation Horizon 2020* (Grant agreement No. 721098; www.n2b-patch.eu) to SS, AF, LB, KB, GT, KS, and CG-T and from fellowships from the *Studienstiftung des Deutschen Volkes* to LS and the *Stiftung der Deutschen Wirtschaft* to JF. The authors thank Lenka Kovářová (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Czech Republic) for rheological measurements, Veronika Schönhaar and Sleem Muadel (both Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB, Stuttgart, Germany) for contact angle measurements, Heinz Greisiger (Fraunhofer Institute for Manufacturing Engineering and Automation IPA, Stuttgart, Germany) for access to the laser-scanning microscope, and Erik Taylor (Fraunhofer IGB and Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology IGVP, University of Stuttgart; Stuttgart; Germany) for grammatical review.

5.1.7 Supplementary Material

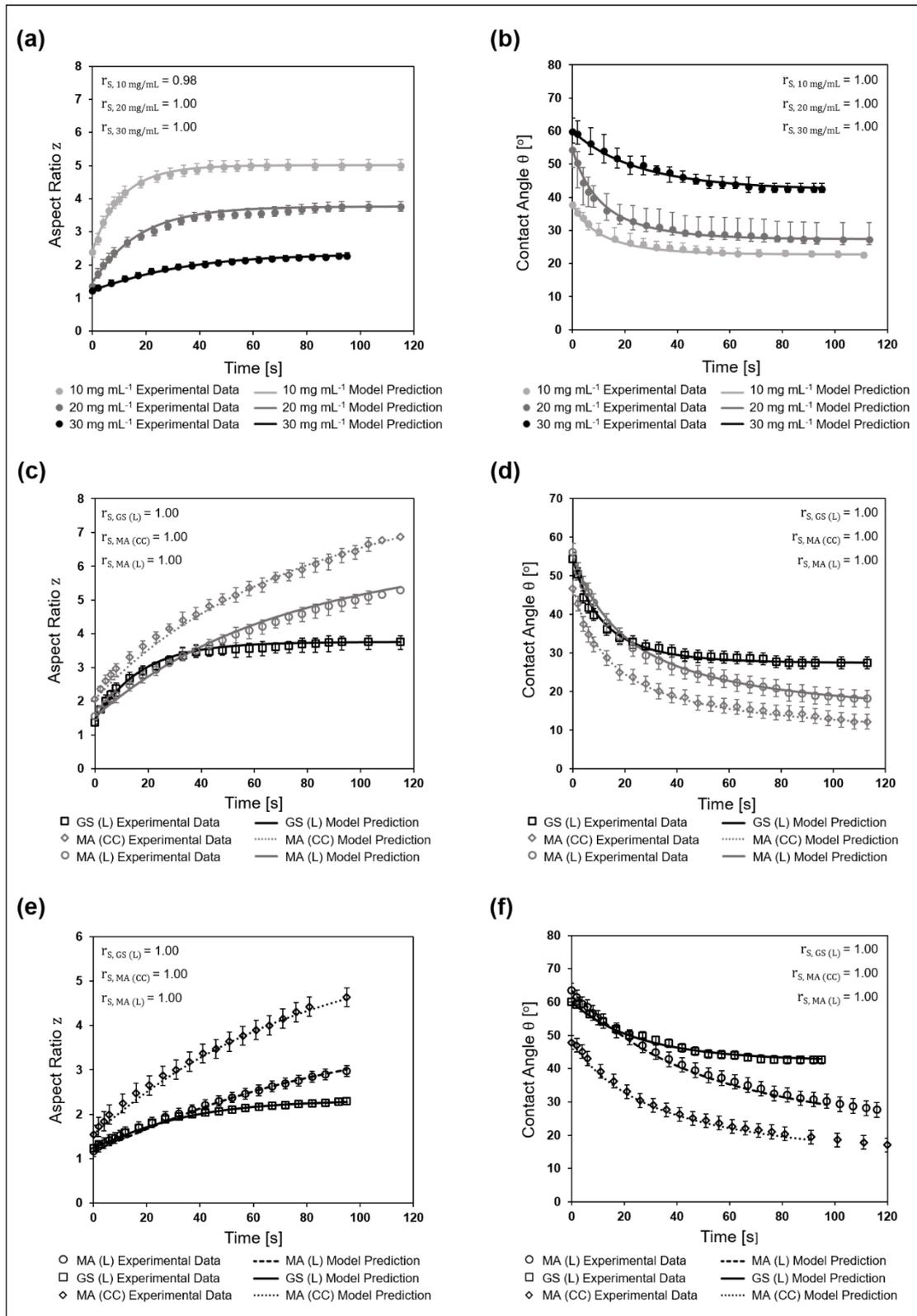


Supplementary Figure S8: Preparation of mucosa analogs (MAs) in Petri dishes by pouring (a) for detachment force measurements and on glass slides (GS) with gene frames by pipetting (b) for roughness and contact angle measurements.

5



Supplementary Figure S9: (a) Schematic partial wetting of a sodium hyaluronate (HA) aqueous solution droplet on a substrate; γ_{sv} : substrate surface tension, γ_{lv} : liquid surface tension, γ_{sl} : substrate liquid interfacial tension, θ_{eq} : equilibrium contact angle, g : gravitational acceleration constant. (b) Wetting regimes and contact angles θ of a liquid droplet deposited on a substrate. Depending on the numerical value of θ_{eq} , a solid surface can be characterized as (i) completely wettable surface ($\theta_{eq} = 0^\circ$, i.e., $\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv}$), the liquid is perfectly spread over the substrate; (ii) partially wettable surface ($0^\circ < \theta_{eq} < 90^\circ$, i.e., $\gamma_{sv} > \gamma_{sl}$), the liquid is partially spread over the substrate; (iii) non-wettable surface ($90^\circ < \theta_{eq} < 180^\circ$, i.e., $\gamma_{sv} < \gamma_{sl}$), non-wetting liquid conditions; (iv) perfectly non-wettable surface ($\theta_{eq} = 180^\circ$) (Yuehua Yuan & Lee, 2013).



Supplementary Figure S10: Experimental results (discrete dots) and prediction obtained from the developed theoretical model (continuous and dotted lines) of the aspect ratio z and the contact angle θ in laboratory (L; 21.5 °C and 50 % humidity) and climate chamber (CC; 34 °C and 90 % humidity) environment over time. The Spearman correlation coefficient r_s indicates their correlation. **(a, b)** Hyaluronate (HA) solutions droplet spreading with concentrations 10, 20, and 30 mg mL⁻¹ (1260 kDa, in PBS, pH 7.4) on standard glass slides (GS). **(c, d)** HA solution (20 mg mL⁻¹) on GS or mucosa analog (MA; 5 wt% mucin, 1 wt% agarose). **(e, f)** HA solution (30 mg mL⁻¹) on GS or MA. The reported experimental results are the average values of three measurements ($n=3$).

6. Diskussion

Die wissenschaftlichen Ergebnisse dieser Dissertation wurden in den vorangegangenen Kapiteln 3, 4 und 5 in Form von *peer-reviewed* Fachartikeln bzw. Manuskripten, die zur Veröffentlichung in *peer-reviewed* Fachzeitschriften eingereicht wurden, dargestellt und ausführlich diskutiert. In diesem Kapitel werden die vier von mir für die Bearbeitung der wissenschaftlichen Fragestellungen in Kapitel 2 aufgestellten Hypothesen zusammengefasst, diskutiert und abschließend bewertet. Die sich daraus ergebende Zusammenfassung und Schlussfolgerungen sind in Kapitel 7 und der Ausblick dieser Dissertation ist in Kapitel 8 dargestellt.

6.1 Diskussion zu Hypothese I

Partikuläre Wirkstoffformulierungen können die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen ermöglichen und werden dann als *Drug Delivery* Systeme bezeichnet. Die genaue Definition dieser Klassifizierung ist in Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben. Ein für diese Anwendung besonders bekanntes und in der Literatur weit verbreitetes Biopolymer ist Polylactic-co-Glycolid (PLGA), da über die anteilige Zusammensetzung dieses Copolymers aus Polymilchsäure und Glykolsäure gezielt ein definiertes Freisetzungsverhalten zwischen wenigen Stunden und mehreren Tagen bis Wochen eingestellt werden kann (Brannon-Peppas & Vert, 2000). Die genauen Eigenschaften und die Anwendung dieses Biopolymers sind in Kapitel 1.3.1 erläutert.

In den letzten Jahren gewinnt besonders der Anwendungsbereich von *Drug Delivery* Systemen für die intranasale Applikation von Wirkstoffen an Bedeutung (Bourganis et al., 2018b; Keller et al., 2021; Rabiee et al., 2020). Diese Applikationsform ist in der Literatur dafür bekannt, *Nose-to-Brain* Transport, also die gezielte Verabreichung von Wirkstoffen für die Therapie im Gehirn und im Rückenmark, zu ermöglichen (Bourganis et al., 2018b; Rabiee et al., 2020; Rassu et al., 2016; Seju et al., 2011). Der *Nose-to-Brain* Transport wird in Kapitel 1.2 genau erläutert. Die zugrundeliegende Anatomie der *Regio olfactoria* und die bisher bereits erforschten Transportwege sind in Kapitel 1.2.1 und 1.2.2 erklärt. Nach intranasaler Applikation konnten für pure Wirkstoffe bereits signifikant höhere Konzentrationen in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) nachgewiesen werden, als nach oraler oder intravenöser Wirkstoffverabreichung (Stützle et al., 2015a; Teshima et al., 2002; Michael Ikechukwu Ugwoke et al., 1999; F. Wang, 2003). Grund dafür ist die Umgehung der Blut-Hirn-Schranke (BHS), welche insbesondere Makromoleküle aber auch Wirkstoffpartikel vom zentralen Nervensystem (ZNS) abschirmt und so Therapieerfolge von hochmolekularen Biopharmazeutika erschwert (Begley, 2004; Patel & Patel, 2017).

Im Zusammenhang mit der BHS spielt das Biopolymer Chitosan eine zentrale Rolle in der Entwicklung innovativer *Drug Delivery* Systeme, da dieses die Eigenschaft besitzt, die in der BHS vorherrschenden, interzellulären *Tight Junctions* reversibel zu öffnen und so parazellulären Transport für Wirkstoffpartikel und Makromoleküle zu ermöglichen. Diese Eigenschaft von Chitosan ist in Kapitel 1.4.7 ausführlich beschrieben, die allgemeinen Eigenschaften des Biopolymers Chitosan sind in Kapitel 1.3.2 erläutert. Obwohl Chitosan auch bereits als intranasales *Drug Delivery* System von anderen Arbeitsgruppen untersucht wurde, gab es noch keine Studie dazu, die Eigenschaft *Tight Junctions* reversibel zu öffnen, direkt im Gewebe nachzuweisen. Die bisher in der Literatur beschriebenen Studien beschränken sich zum einen vor allem auf Chitosanlösungen (Charlton et al., 2007; Teshima et al., 2002; Michael Ikechukwu Ugwoke et al., 1999), die mit den zu verabreichenden Wirkstoffen gemischt wurden, oder zum anderen auf die

Untersuchung von Partikeln in der Zellkultur (Fazil et al., 2012; Rassu et al., 2016; Sonaje et al., 2012). Zudem wurden vernetzte Chitosan-Nanopartikel kleiner 250 nm, die im ZNS von Nagern nachgewiesen wurden analysiert (Al-Ghananeem, Saeed, Florence, Yokel, & Malkawi, 2010; Elnaggar, Etman, Abdelmonsif, & Abdallah, 2015; Fazil et al., 2012; Feng, Liu, Zhao, & Hu, 2012; Md et al., 2013; X. Wang, Chi, & Tang, 2008). Der Aufnahmemechanismus von PLGA-Partikeln und Chitosa-Partikeln unmittelbar am olfaktorischen Epithel, sowie die Rolle der dort ebenfalls vorhandenen *Tight Junctions* ist hingegen noch weitgehend ungeklärt. Die Interaktion von Chitosan-Partikeln mit *Tight Junctions* wurde bislang ausschließlich mittels Epithelzellen in Kultur untersucht (Fazil et al., 2012; Rassu et al., 2016; Sonaje et al., 2012). Deshalb wurde in Kapitel **2.2.1 Hypothese I** aufgestellt und untersucht.

In dieser Dissertation konnte zum ersten Mal die größen- und zeitabhängige Aufnahme von PLGA-Nanopartikeln, welche mittels Emulsionspolymerisation hergestellt wurden, in *ex vivo* Riechschleimhaut vom Schwein gezeigt werden. Zudem konnte dabei zum ersten Mal die intrazelluläre Co-Lokalisation von 520 nm großen PLGA-Partikeln mit Zellkernen und Nervenfasern in der Bindegewebsschicht der Riechschleimhaut immunhistologisch nachgewiesen werden. Außerdem wurden in dieser Dissertation zum ersten Mal erfolgreich PLGA-Nanopartikel mittels Sprühtrocknung in Chitosan verkapselt und dadurch PLGA-Chitosan-Nano-in-Mikro-Partikel (NiMPs) erzeugt, sowie deren Applikation auf *ex vivo* Riechschleimhaut vom Schwein untersucht. Schließlich konnte zum ersten Mal die Öffnung von *Tight Junctions*, durch die Internalisierung des Membranproteins *Zonula occludens* Protein 1 (ZO-1), nach der Applikation der PLGA-Chitosan NiMPs in olfaktorischen Gewebebiopsie-Proben gezeigt werden. Diese Ergebnisse werden im Folgenden umfassend diskutiert:

Zum ersten Mal wurde in dieser Dissertation die größen- und zeitabhängige Aufnahme von mittels Emulsionspolymerisation hergestellten PLGA-Nanopartikeln, unter den physiologischen Bedingungen der Nasenhöhle bei 35 °C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit, nach *ex vivo* Applikation der Nanopartikel auf frische olfaktorische Mukosa vom Schwein nachgewiesen. Dabei konnten die PLGA-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 81,6 nm – im Folgenden als 80 nm bezeichnet, und 174,4 nm – im Folgenden als 175 nm bezeichnet, bereits nach nur fünf Minuten mittels konfokaler *Laser-Scanning* Mikroskopie in tiefen Schichten der *Lamina propria* nachgewiesen werden. Hierbei wurden mehr 80 nm Partikel als 175 nm Partikel in die tiefen Schichten aufgenommen. Nach zehn Minuten permeierten wenige PLGA-Nanopartikel mit Durchmesser 519,7 nm – im Folgenden als 520 nm bezeichnet, ca. 150 µm tief in die Bindegewebsschicht und wurden nach 15 min sogar mit Zellkernen assoziiert immunhistologisch nachgewiesen. Bei diesen Ergebnissen handelt es sich um Nachweise von intrazellulärer Aufnahme, welche für 500 nm große PLGA-Partikel in der Literatur bislang nur für die Darmkrebs-Epithelzelllinie Caco-2 (Win & Feng, 2005), jedoch nicht für *Nose-to-Brain*-Transport oder eine nasale Epithelzelllinie beschrieben wurden (Bourganis et al., 2018b; Rabiee et al., 2020). Der größenabhängige Transport von kleineren Nanopartikeln ist bereits hinreichend bekannt (Bourganis et al., 2018b; Alpesh Mistry, 2009; Rabiee et al., 2020), wohingegen bislang die intrazelluläre Aufnahme vor allem für Partikel kleiner 250 nm beschrieben ist (Bourganis et al., 2018b; Rabiee et al., 2020). Im Gegensatz dazu haben Musumeci et al. (2018) den Nachweis von 300 nm großen PLGA-Nanopartikeln im Gehirn von Ratten nach intranasaler Applikation publiziert, aber sind dabei nicht auf die ablaufenden Transportprozesse eingegangen (Musumeci et al., 2018).

Besonders bemerkenswert ist zudem, dass in dieser Dissertation insbesondere die 520 nm großen PLGA-Partikel in neuronalen Fasern nachgewiesen wurden, was darauf hindeutet, dass es sich dabei um den Beginn intrazellulären und transzellulären Transports über den Riech- oder

Trigeminusnerv zum Gehirn und dem ZNS handeln könnte (Bourganis et al., 2018b; Gänger & Schindowski, 2018; Keller et al., 2021; Rabiee et al., 2020). Der Durchmesser von menschlichen Axonen liegt zwischen 100 nm und 700 nm (Alpesh Mistry, 2009; Morrison & Costanzo, 1990, 1992), weshalb die intrazelluläre Aufnahme in neuronale Zellen und der Transport entlang von Axonen möglich wäre. Um diesen Mechanismus weiter aufzuklären könnten, im Anschluss an diese Dissertation, spezifische Rezeptoren immunhistologisch angefärbt werden, möglich wäre dies zum Beispiel in Zellkulturversuchen mittels *Live-Cell-Imaging* oder *in vivo*. Dabei sollten insbesondere auch Partikel größer 250 nm weiter untersucht werden.

Mittels Sprühtrocknung wurden 520 nm große PLGA-Nanopartikel erfolgreich in Chitosan verkapselt. Diese Chitosan-PLGA-NiMPs wurden noch nie zuvor in der Literatur beschrieben. Bisher wurden PLGA-Partikel ausschließlich mit einer dünnen Schicht von Chitosan ge-coated (Kaur, 2021; Raber et al., 2014). Die in dieser Dissertation hergestellten NiMPs waren reproduzierbar sphärisch, mit glatter Oberflächenmorphologie und reproduzierbarer bidisperser Partikelgrößenverteilung bestehend aus einer Mikropartikelfraktion, die den NiMPs entspricht und einer zusätzlichen Chitosan-Nanopartikel-Fraktion, welche bei der Sprühtrocknung gebildet wurde. Es wurden die beiden unterschiedlichen Verhältnisse 1/3:2/3 und 2/3:1/3 Chitosan zu PLGA untersucht, wobei beide Partikelchargen eine bidisperse Partikelgrößenverteilung aufwiesen. Der höhere Chitosan-Anteil im Sprühtrocknungsfluid bewirkte vor allem eine Vergrößerung des Durchmessers in der Chitosan-Nanopartikel-Fraktion. Dies kann damit erklärt werden, dass wahrscheinlich größere reine Chitosan-Partikel gebildet wurden, da mehr Chitosan pro Zeiteinheit während des Sprühtrocknungsprozesses zur Verfügung stand und ein höherer Massenanteil größere Partikel erzeugt (Hede et al., 2008). NiMPs mit einem 1/3-Gewichtsanteil an Chitosan umschlossen durchschnittlich sieben 520 nm große PLGA-Nanopartikel in einem NiMP mit 6,61 µm Durchmesser. Im Gegensatz dazu wurden in den NiMPs mit 2/3 Chitosan-Gewichtsanteil nur zwei 520 nm große PLGA-Nanopartikel in einen NiMP mit einem Durchmesser von 5,75 µm verkapselt. Dies führte zu einer Verkapselungseffizienz von $39 \pm 19 \%$ für die Partikel bestehend aus 2/3 Chitosan und 1/3 PLGA, wohingegen die Erhöhung des PLGA Anteils auf 2/3 eine höhere Verkapselungseffizienz von $51 \pm 16 \%$ erzielte. Die Partikelausbeute des Sprühtrocknungsprozesses lag für die NiMPs mit 1/3 Chitosan zwischen 40,00 % und 46,68 % und für die NiMPs mit 2/3 Chitosan zwischen 47,00 % und 61,47 %. Folglich konnten mittels Sprühtrocknung effizient NiMPs hergestellt werden, wobei ein höherer Anteil an PLGA-Nanopartikeln die Verkapselungseffizienz begünstigte und die Bereitstellung von mehr Chitosan-Matrixmaterial die Partikelausbeute zwar begünstigte, dabei aber vor allem zusätzliche Chitosan-Nanopartikel gebildet wurden.

Bei Applikation der NiMPs auf die *ex vivo* Riechschleimhaut vom Schwein wurden die Chitosan-beschichteten Nanopartikel schneller und tiefer in die *Lamina propria* aufgenommen als die zum Vergleich auf einer anderen Biopsie-Probe aufgetragenen reinen PLGA-Nanopartikel derselben Größe. Der Vergleich zwischen den NiMPs mit unterschiedlichem Chitosan-PLGA-Verhältnis zeigte hingegen keinen Unterschied. Innerhalb von 15 Minuten nach der Applikation auf das Epithel wurden die mit Chitosan-beschichteten PLGA-Nanopartikel (NiMPs) verteilt über den gesamten Querschnitt der olfaktorischen Mukosa bis zum angrenzenden Kollagengewebe auf der *basolateralen* Seite der Biopsie-Probe nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurden die pur aufgetragenen, unbeschichteten PLGA-Nanopartikel nicht so tief in das Gewebe aufgenommen.

Diese, in dieser Dissertation gezeigte, beschleunigte Aufnahme von NiMPs und die gesteigerte Permeation der NiMPs im Vergleich zu den unbeschichteten PLGA-Partikeln konnte mit der durch Chitosan bewirkten Öffnung von interzellulären Kontakten erklärt werden. Da nach der Applikation der NiMPs auf die *ex vivo* Riechschleimhaut das *Tight Junction* Protein ZO-1 nicht mehr immunhistologisch im Gewebe nachgewiesen werden konnte, wurde von einer Internalisierung dieses Proteins und einer damit einhergehenden Öffnung der olfaktorischen *Tight*

Junctions ausgegangen. Durch die Öffnung der *Tight Junctions* wurde wahrscheinlich zusätzlich parazellulärer Transport in und durch das olfaktorische Gewebe ermöglicht. Das Membranprotein ZO-1 ist ein Teil von *Tight Junctions* in der Epithelzellschicht sowie in Endothelzellen (Steinke et al., 2008; H. Wolburg et al., 2008). Die Öffnung der *Tight Junctions* kann dadurch nachgewiesen werden, dass die immunhistologische Färbung des Membranproteins ZO-1 verblasst. Der zugrundeliegende Mechanismus ist die Internalisierung dieses spezifischen Proteins von der Membran in das Zytoskelett (Smith et al., 2004). Diese Fähigkeit von Chitosan wurde in den letzten Jahrzehnten bereits von Forschungsgruppen in der Zellkultur nachgewiesen (Dodane et al., 1999; Rassa et al., 2016); über die Anwendung von Chitosan in Geweben wird jedoch nur selten berichtet. Dodane et al. (1999) zeigten in einer Caco-2-Darmkrebs-Epithelzelllinie das Verblässen der ZO-1-Färbung und damit den Öffnungsmechanismus der *Tight Junctions*, eine Stunde nach der Applikation saurer, niedrigkonzentrierter Chitosan-Lösungen. Die Regeneration der *Tight Junctions* durch das erneute Auftreten der ZO-1-Färbung wiesen sie zudem innerhalb von 24 Stunden nach (Dodane et al., 1999). Smith et al. (2004) beschrieben eine konzentrationsabhängige Internalisierung von ZO-1 auf Caco-2-Monolayern innerhalb von einer Stunde, während M. Fazil et al. (2012) eine erhöhte Gehirnaufnahme durch die Applikation von Chitosan-Partikeln publizierten, dabei aber keine ZO-1-Färbung als Referenz lieferten (Fazil et al., 2012). In dieser Dissertation wurde folglich zum ersten Mal gezeigt, dass die Öffnung von ZO-1 durch Chitosan auch in Gewebebiopsien aus der Riechschleimhaut von Schweinen stattfindet und so die Überwindung dieser biologischen Barriere ermöglicht. Das Verblässen der immunhistologischen ZO-1-Färbung wurde hier nach nur 15 Minuten nachgewiesen, wobei diese Zeitspanne zusätzlich die Quellung der trockenen Chitosan-NiMPs auf der Mukosa einschloss. Damit konnte zu ersten Mal gezeigt werden, dass die Zell-Zell-Kontakte des olfaktorischen Epithels bereits innerhalb weniger Minuten nach der Applikation von Chitosan-Partikeln geöffnet werden. Um besser zu verstehen, welche Chitosan-Dosierung für die Förderung des parazellulären Transports am effektivsten ist, wären im Anschluss an diese Dissertation weitere Experimente mit unterschiedlichen Chitosan-Konzentrationen, verschiedenen applizierten Partikelmengen und Zeiträume kürzer 15 min interessant.

6

Gleichzeitig wurde ein Chitosan-Diffusionsgradient innerhalb von 15 Minuten nach der Applikation der NiMPs auf die *ex vivo* Riechschleimhaut, ausgehend von der Partikelbeschichtung bis ca. 150 μm tief in die Bindegewebsschicht der porzinen olfaktorischen Mukosa mit konfokaler *Laser-Scanning* Mikroskopie nachgewiesen. Dieser kann auf von den Partikeln dissoziiertes Chitosan zurückgeführt werden, da die Chitosan-Partikel nicht vernetzt wurden und somit auf der Mukosa quollen. Die Dissoziation einzelner Chitosan-Polymerketten war möglich, da der natürlich vorkommende pH-Wert in der menschlichen Nase zwischen pH 5,5 und pH 6 liegt (R. J. A. England et al., 1999). Natives Chitosan löst sich somit unter physiologischen pH-Werten in der Nase aufgrund seines pKa-Wertes von $\sim 6,5$ nicht vollständig auf, sondern quillt hauptsächlich. Zudem wurden zwei Stunden nach der Partikelapplikation die 520 nm großen aus den NiMP dissoziierten PLGA-Nanopartikel zusammen mit Chitosan in der äußeren Zone von Lymphoidfollikeln nachgewiesen. In diesem Bereich der porzinen olfaktorischen Mukosa befinden sich normalerweise vor allem CD3⁺ T-Zellen und CD20⁺ B-Zellen, aber auch Monozyten und Makrophagen mit dem charakteristischen Membranprotein CD14 (Ladel et al., 2018). Proportional zu diesem Chitosangradient wurde in dieser Dissertation mittels immunhistologischer Färbung das Membranprotein CD14 nachgewiesen und als Immunreaktivitätsgradient gewertet. Demnach scheint die Partikelapplikation innerhalb von ca. 15 Minuten die Einwanderung von Monozyten oder Makrophagen in die *Lamina propria* bewirkt zu haben, wobei eine initiale Immunreaktion allgemein innerhalb der ersten Stunden beschrieben ist (J. M. Anderson et al., 2008). Das membranständige Glykoprotein CD14 bildet zusammen mit dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP) den Lipopolysaccharidrezeptor (LPR), welcher Lipopolysaccharide, zum

Beispiel auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien, binden kann (Wright et al., 1990). Die Lipopolysaccharid-induzierte Hochregulierung des CD14-Membranrezeptors wurde bereits als erste Immunreaktion in Schleimhautgeweben, wie beispielsweise dem Darm beschrieben (Frolova et al., 2008; Funda et al., 2001). Otterlei et al. (1994) beschrieben zunächst die Chitosan-Erkennung durch CD14 auf Monozyten (Otterlei et al., 1994). Im Gegensatz dazu berichteten Qiao et al. (2010) die Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Chitosan-Oligosaccharide (Qiao et al., 2010). Kürzlich untersuchten Chang et al. (2019) den Einfluss von niedrigmolekularem ($\leq 7,1$ kDa) und hochmolekularem (≥ 72 kDa) Chitosan auf die Bindung von Makrophagen (Chang et al., 2019). Dabei wurde ausschließlich niedermolekulares Chitosan mit einem Molekulargewicht von bis zu 7,1 kDa an CD14 gebunden, was die Wissenschaftler als Aktivierung einer proinflammatorischen Kaskade interpretierten. Im Gegensatz dazu gibt es bisher nur wenig Literatur zur Immunreaktion bei applizierten Chitosan-Partikeln. Lediglich Davis et al. (2018) konnten für Chitosan-Partikel mit einem hohen Grad an Deacetylierung und einer Größe von 1-10 μm eine geringere M1-Makrophagenaktivierung nachweisen als für Chitin-Partikel vergleichbarer Größe (Davis et al., 2018). Folglich ist die pro- oder antiinflammatorische Eigenschaft von Chitosan-Partikeln vom Molekulargewicht, der Partikelgröße und dem Deacetylierungsgrad abhängig und die in dieser Dissertation entwickelten Chitosan-Partikel lösten, aufgrund des Molekulargewichts (150-300 kDa), des Deacetylierungsgrades (80 %) und der Partikelgröße (0,1-10 μm), wahrscheinlich eine durch M2-Makrophagen bestimmte entzündungshemmende Reaktion aus. Allerdings konnte dies in dieser Dissertation nicht vollumfänglich geklärt werden, da zur Differenzierung zwischen proinflammatorischen M1- und entzündungshemmenden M2-Makrophagen weitere Untersuchungen in der Zellkultur notwendig sind, um dabei die spezifisch vorherrschenden Zytokin-Konzentrationen bestimmen zu können (Zarif et al., 2016).

Schließlich wurden in dieser Dissertation fehlende Abschnitte der Partikelbeschichtung, insbesondere oberhalb von Drüsen beobachtet. Die NiMPs konnten dort bereits nach 30 Minuten mit konfokaler *Laser-Scanning* Mikroskopie nicht mehr gezeigt werden, was entweder auf eine beschleunigte Partikelaufnahme in den Drüsen oder auf eine anhaltende Schleimproduktion, welche die darüber liegende Partikelschicht kontinuierlich wegdrückt, zurückzuführen ist. Eine kontinuierliche Schleimproduktion wurde bereits früh für die Gaumenschleimhaut von Fröschen (T.J. Aspden et al., 1995; Sadé et al., 1970), später auch für menschliche Proben (Trudi J. Aspden et al., 1997) und die Luftröhre von Frettchen mit Geschwindigkeiten von bis zu $9,5 \pm 3,5 \text{ mm min}^{-1}$ (Abanses et al., 2009; Jeong et al., 2014) beschrieben, wobei die Schleimproduktion sogar in *ex vivo* Untersuchungen mindestens vier bis fünf Stunden andauerte. Zudem ist bekannt, dass Chitosan die mukoziliäre Transportrate proportional zu seinem Molekulargewicht verringert (T.J. Aspden et al., 1995). Dies ist ausschließlich auf seine physikalische Wechselwirkung mit Muzinen zurückzuführen, wobei die Mukosa nicht geschädigt wurde (Trudi J. Aspden et al., 1997). Im Gegensatz dazu beschrieben Raber et al. (2014) eine verstärkte Aufnahme von Chitosan-beschichteten PLGA-Nanopartikeln in Drüsengängen von Haarfollikeln (Raber et al., 2014), weshalb auch die Drüsen in der olfaktorischen Mukosa Partikel aufnehmen könnten. Leider war in den Experimenten dieser Dissertation keine weitere Verfolgung der Partikel möglich, da keine Partikel mit drüsenumgebenden Zellen assoziiert, oder in der drüsenunterliegenden *Lamina propria* nachgewiesen werden konnten. Außerdem konnte die Beprobung ausschließlich zu festgelegten Zeitpunkten erfolgen und mit der gewählten *ex vivo* Untersuchung war keine kontinuierliche Überwachung des Geschehens auf zellulärer Ebene möglich. Um die Rolle der oberflächenassoziierten Drüsen vollständig zu klären, wäre es interessant, diese im Anschluss an diese Dissertation kontinuierlich zu überwachen. Dies wäre zum Beispiel mit einem komplexen Modell der Riechschleimhaut denkbar, beispielsweise mit einem *Organ-on-a-Chip*-Modell.

Somit kann der erste Teil von **2.2.1 Hypothese I** bestätigt werden, da 80 nm und 175 nm große PLGA-Partikel innerhalb von fünf Minuten intrazellulär in das olfaktorische Epithel und in die darunter liegende *Lamina propria* aufgenommen wurden. Der zweite Teil von **2.2.1 Hypothese I** kann wiederlegt werden, da sogar 520 nm große PLGA-Partikel nach 15 min mit Zellkernen und Neurofilamenten assoziiert vorlagen, was deren intrazelluläre Aufnahme impliziert. Der dritte Teil von **2.2.1 Hypothese I** wird wiederum bestätigt, da in dieser Dissertation zum ersten Mal PLGA-Chitosan-Nano-in-Mikro-Partikel mittels Sprühtrocknung hergestellt wurden und diese eine reproduzierbare Partikelgrößenverteilung, eine sphärische Form, glatte Oberflächen, eine Partikelausbeute zwischen 40,00 % und 61,47 % und eine hohe Verkapselungseffizienz von 51 ± 16 % erzielten. Der letzte Teil von **2.2.1 Hypothese I** kann schließlich ebenfalls bestätigt werden, da durch die Einbettung der 520 nm PLGA-Partikel in Chitosan die ohnehin schon beobachtete Aufnahme verstärkt und beschleunigt wurde. Dies kann auf die mittels ZO-1 Färbung nachgewiesene Öffnung der *Tight Junctions* zurückgeführt werden, welche zusätzlichen parazellulären Transport ermöglicht hat.

6.2 Diskussion zu Hypothese II

Das Verfahren der Sprühtrocknung wird in der pharmazeutischen Industrie bereits seit vielen Jahren großtechnisch in Maßstäben von Kilogramm bis Tonnen eingesetzt (G. Lee, 2002; Stahl, 1980). Vorteile gegenüber anderen Verfahren sind dabei die einfache Skalierbarkeit des Prozesses, die sparsame Verwendung von organischen Lösungsmitteln, die Möglichkeit zur Wärmerückführung in einem geschlossenen Kreislauf, sowie der kontinuierliche Ablauf des einstufigen Prozesses. Neben Füllstoffen wie Zellulose oder Zuckerderivaten werden auch Wirkstoffe, zum Beispiel Vitamine und Peptide oder Proteine getrocknet. Die Trocknung ist dabei gleichzeitig kontinuierlich und schonend möglich, und stellt entweder die Produktion pulverförmiger Präparate oder die Vorstufe für Medikamente in Tablettenform dar. Der Ablauf des Sprühtrocknungsprozesses, bestehend aus Zerstäubung einer Lösung oder Suspension, der Mischung des zu trocknenden Fluids mit dem Trocknungsgas, das Verdampfen des Fluids, sowie das Abscheiden des Produkts ist in Kapitel 1.4.3 detailliert erläutert.

6

In der aktuellen Forschung sind vor allem Wirkstoffformulierungen Ziel der Sprühtrocknung, diese werden in Kapitel 1.4.4 detailliert erläutert. Die Sprühtrocknung wird dabei verwendet, um schwerlösliche Wirkstoffe durch die Formulierung mit Hilfsstoffen besser löslich zu machen, sensitive Wirkstoffe im trockenen Zustand zu stabilisieren, eine hohe Verkapselungseffizienz oder eine kontinuierliche Freisetzung als *Drug Delivery System* zu erreichen (Estevinho et al., 2016; Gouin, 2004). Die Stabilisierung sensitiver Wirkstoffe mittels Sprühtrocknung, sowie die Erzielung hoher Verkapselungseffizienzen und einer kontinuierlichen Freisetzung von verkapselten Wirkstoffen *in vitro* wird in **2.2.3 Hypothese III** genau untersucht sowie im nächsten Kapitel 6.3 diskutiert. Die Definition eines *Drug Delivery Systems* ist in Kapitel 1.4 beschrieben.

Das Biopolymer Chitosan ist nicht nur ein nachwachsender Rohstoff, sondern ist biokompatibel, mukoadhäsiv und aufgrund seiner Löslichkeit in sauren, wässrigen Lösungen einfach zu verarbeiten. Die Herstellung von Chitosan aus dem natürlich vorkommenden Rohstoff Chitin, die chemische Zusammensetzung von Chitosan und die damit einhergehende Eigenschaften sind in Kapitel 1.3.2 ausführlich erläutert. In der Literatur ist bereits bekannt, dass der Deacetylierungsgrad (DD) und das Molekulargewicht (MW) von Chitosan dessen Eigenschaften beeinflussen und im Umkehrschluss je nach geplanter Anwendung gezielt wählbar sind (George & Abraham, 2006; Henriksen et al., 1996; Wenling et al., 2005).

Der Großteil der in der Literatur beschriebenen Chitosan-Partikel wurde allerdings mittels emulsionsbasierter Verfahren und unter Verwendung toxischer Vernetzungsreagenzien, wie zum

Beispiel Glutaraldehyd, hergestellt. Damit einher gehen folglich zum einen Probleme der Biokompatibilität, was die Verwendung der bisher in der Literatur entwickelten Chitosan-Partikel stark einschränkt. Zum anderen wurden bislang vor allem emulsionsbasierte Verfahren publiziert (Bourganis et al., 2018b; Fazil et al., 2012; Rabiee et al., 2020; B. R. Riegger et al., 2018), diese sind jedoch nicht gut skalierbar und aufgrund des hohen Verbrauchs an organischen Lösungsmitteln nicht ressourcenschonend. Es gab zudem wenige Studien zur Sprühtrocknung von Proteinen und sensitiven Wirkstoffen mit Chitosan (Estevinho et al., 2016). Bei diesen wurden meist nur sehr kleine Probenmengen versprüht und inhomogene Partikel erzeugt (He et al., 1999a; Kašpar et al., 2013). Weiterhin wurden essentielle Prozessparameter oft nicht dokumentiert, weshalb eine Reproduktion der Daten in dieser Dissertation nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde in Kapitel **2.2.2 Hypothese II** aufgestellt und untersucht.

Aufgrund der geplanten Anwendung, der in dieser Dissertation entwickelten und untersuchten Partikel, als intranasale *Drug Delivery* Systeme wurden sechs verschiedene Chitosanderivate in Pharmaqualität verwendet. Die Chitosanderivate wurden gezielt mit hohen Deacetylierungsgraden zwischen 80 % und 95 % gewählt, da diese Mukoadhäsion begünstigen (Henriksen et al., 1996; Wenling et al., 2005) und damit besser für die Anwendung auf olfaktorischer Mukosa geeignet sind als niedrig deacetylierte Derivate. Die Molekulargewichte wurden im Hinblick auf eine gute Prozessierbarkeit mittels Sprühtrocknung, sowie eine reproduzierbare Partikelgrößenverteilung, eine hohe Verkapselungseffizienz, die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen und eine verbesserte Mukoadhäsion ausgewählt (Henriksen et al., 1996; Sun et al., 2009). Während vor allem niedrigmolekulare Chitosane eine hohe Partikelausbeute während der Sprühtrocknung ermöglichen, sind diese weniger gut für die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen geeignet (Sun et al., 2009), da sie zu schnell im Freisetzungsmitteln quellen oder sich lösen. Chitosanderivate mit hohem MW (> 500 kDa) hingegen quellen sehr langsam und erzielen damit eine verzögerte Freisetzung von Wirkstoffen. Aufgrund der hochviskosen Lösungen funktioniert die Tröpfchenzerstäubung und Abscheidung in der Sprühtrocknung jedoch nicht, weshalb hochmolekulare Derivate nicht für die Wirkstoffformulierungen in dieser Dissertation geeignet waren. Für die Untersuchungen in dieser Dissertation wurden folglich Chitosane mit mittleren Molekulargewichten von 20 kDa bis 500 kDa ausgewählt, da diese sowohl eine gute Partikelausbeute als auch eine kontrollierte Freisetzung ermöglichen sollten. Der Einfluss von DD und MW der untersuchten Chitosanderivate auf die Verkapselungseffizienz und die Wirkstofffreisetzung *in vitro* werden im nächsten Kapitel 6.3 **(2.2.3 Hypothese III)** ausführlich diskutiert.

In dieser Dissertation konnte durch die Optimierung der Sprühtrocknungsparameter Einlasstemperatur, Pumprate des Sprühtrocknungsfluids, Trocknungsgasstromrate, und Konzentration des Sprühtrocknungsfluids ein reproduzierbarer Sprühtrocknungsprozess für Chitosan etabliert werden. Die identifizierten Parameter waren für alle sechs untersuchten Chitosan-Derivate geeignet, um reproduzierbare Partikel zu erzeugen. In dieser Dissertation konnte zudem zum ersten Mal eindeutig geklärt werden, dass die Morphologie der Partikeloberfläche von sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln hauptsächlich von der Einlass- bzw. dadurch indirekt beeinflussten Auslasstemperatur und der Viskosität des Sprühtrocknungsfluids beeinflusst wird. Außerdem wurde in dieser Dissertation zum ersten Mal eine konkrete Viskosität von 350 mPa s als kritischer Wert für die Produktion von Chitosan-Partikeln mit glatter Oberfläche identifiziert. Im Folgenden wird der Einfluss dieser Sprühtrocknungsparameter sowie der Einfluss des Deacetylierungsgrades und des Molekulargewichts der verwendeten sechs Chitosan-Derivate auf die Partikeleigenschaften Morphologie und Partikelgrößenverteilung, sowie auf die Partikelausbeute des Sprühtrocknungsprozesses ausführlich diskutiert:

Um einen robusten Sprühtrocknungsprozess und reproduzierbare Partikel mit homogener Größenverteilung und Morphologie zu etablieren, wurden in dieser Dissertation geeignete

Prozessparameter ausgewählt. Dabei wurden insbesondere die Einlasstemperatur, die Pumpgeschwindigkeit des zu trocknenden Fluids, die Flussrate des Trocknungsgases und die Aspiratorleistung experimentell variiert und untersucht. Auf die Partikelbildung wirkten sich konkret vor allem die Tröpfchenzerstäubung und deren anschließende Verdampfung aus. Partikel homogener Größe und mit schmaler Partikelgrößenverteilung können erzeugt werden, wenn im ersten Schritt der Tropfenabriss an der Düsen Spitze gleichmäßig erfolgt (Walzel, 1990). Je höher der Gasstrom des Trocknungsgases, desto stärker die Zerstäubung an der Düsen Spitze aufgrund von angreifenden Scherkräften. Durch stärkere Zerstäubung entstehen kleinere Tropfen und damit auch kleinere Partikel. Die Tropfenbildung an der Düsen Spitze ist außerdem abhängig von der Viskosität, der Oberflächenspannung und der Flussrate der Lösung. (Hede et al., 2008)

Im zweiten Schritt der Sprühtrocknung ist die kontinuierliche Verdampfung des Lösungsmittels aus den Tröpfchen entscheidend, um homogene Partikel mit glatter Oberfläche zu erzeugen (Paudel et al., 2013). Die Tröpfchen trocknen dabei von außen nach innen, was bedeutet, dass die verbleibende Flüssigkeit in der Mitte des Partikels durch die bereits teilweise getrocknete Matrix hindurch verdampft. Wenn die Verdampfung, vor allem bei Einlasstemperaturen über 100 °C, dabei zu schnell erfolgt, bilden sich entweder hohle Partikel durch den sogenannten *Rush-Hour*-Effekt (Paudel et al., 2013), oder die anfangs gebildete Hülle platzt sogar auf, wodurch aufgebrochene Schalen entstehen.

In dieser Dissertation konnte beobachtet werden, dass Partikel stark gedehnt wurden und durch Abkühlen in sich zusammenfielen. Dieser beobachtete Effekt wird im Folgenden als *Blow-up*-Effekt bezeichnet. Sprühgetrocknete Chitosan-Partikel wurden bislang in der Literatur mit eingefalteter „gehirnähnlicher“ Oberflächenmorphologie beschrieben (He et al., 1999a; Kašpar et al., 2013; Tokárová et al., 2013). Entgegen der Interpretation in der Literatur, konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass die eingefalteten Oberflächen nicht durch die Materialeigenschaften des Chitosans allein, sondern hauptsächlich durch die verwendeten Prozessparameter der Sprühtrocknung entstehen. Wenn zu hart getrocknete Partikel am Ende des Prozesses abkühlten, schrumpften sie und die charakteristischen Falten entstanden. In dieser Dissertation konnten reproduzierbar Chitosan-Partikel mit glatter Oberfläche mittels Sprühtrocknung erzeugt werden, indem geeignete Sprühtrocknungsparameter gewählt wurden. Die dafür notwendigen Parameter wurden im Labormaßstab mit Hilfe des Mini Sprühtrockners B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) untersucht und definiert. Die umfassende Untersuchung der Sprühtrocknungsparameter in dieser Dissertation ergab für alle sechs untersuchten Chitosanderivate einschließlich der Herstellung von NiMPs für die Sprühtrocknung mit einer Zweistoffdüse (Durchmesser Düsenkappe 1,5 mm) die folgenden optimalen Parameter: Die Einlasstemperatur von 100 °C, was in Austrittstemperaturen von 45 ± 5 °C resultierte, die Pumpgeschwindigkeit des Sprühtrocknungsfluids mit $4,46 \text{ mL min}^{-1}$, die Flussrate des Trocknungsgasstroms von 601 L h^{-1} und die Aspiratorleistung 100 %. Für diese Parameter entspricht bei ~ 45 °C und 905 mbar im Sprühtrockner (Filterdruck -95 mbar) sowie einem Volumenstrom von 1052 L h^{-1} die Durchflussrate insgesamt 610 g min^{-1} Luft. Mit Hilfe dieser Parameter konnten sowohl gleichförmige, sphärische PLGA-Chitosan-Nano-in-Mikro-Partikel (NiMP), als auch unbeladene Chitosan-Partikel mit glatter Oberfläche erzeugt werden, da die Verdampfung gleichmäßig erfolgte und kein *Blow-up*-Effekt auftrat. Stattdessen entstand eine Partikelmatrix mit feinen Poren durch die kontinuierlich weiter Verdampfung stattfinden konnte (Paudel et al., 2013).

Die Partikelmorphologie der unbeladenen Chitosan-Partikel mit DD zwischen 80 % und 95 % sowie MWs von 20-100 kDa, 150-300 kDa, 200-400 kDa und 200-500 kDa wurde hauptsächlich durch die Sprühtrocknungseinlasstemperatur und das MW des Chitosanderivates beeinflusst. Der Vergleich zwischen Partikeln mit DD80 und einem MW von 150-300 kDa und Partikeln mit DD95 aber identischem MW ergab nur einen geringen Unterschied in der Morphologie (Figure 8), wobei

keine unterschiedliche Austrittstemperatur (75 ± 1 °C) während der Sprühversuche festgestellt werden konnte. Die DD95-Partikel schienen im Vergleich zu den DD80-Partikeln eine minimal rauere Oberflächenstruktur mit ausgeprägteren Falten zu bilden, was durch die höhere Elastizität und Viskosität des Rohmaterials erklärt werden könnte (Wenling et al., 2005) und wahrscheinlich eine diskontinuierliche Verdampfung gefolgt von einem *Blow-up*-Effekt verursacht hat. Dieser Effekt war bei Chitosan-Derivaten mit niedrigem Molekulargewicht weniger ausgeprägt. Partikel mit einem Molekulargewicht von 20-100 kDa und DD80 ähnelten den DD95-Partikeln, was durch die niedrigere Viskosität der Lösungen mit niedrigem MW erklärt werden kann. Das niedrigere MW begünstigte eine kontinuierliche Verdampfung und führte damit zu glatteren Partikeloberflächen. Dieser Effekt wurde durch die beobachtete ebenfalls niedrigere Austrittstemperatur von $72,5 \pm 1,5$ °C unterstützt. Folglich ist die glattere Oberflächenmorphologie vor allem bei niedrigen MWs sowie bei niedrigeren Austrittstemperaturen und tendenziell auch bei niedrigeren DDs aufgrund der kontinuierlichen Verdampfung während der Sprühtrocknung stärker ausgeprägt.

Insgesamt ergaben die in dieser Dissertation untersuchten sprühgetrockneten Chitosanformulierungen (DD80-95 %, 20-500 kDa) reproduzierbare monomodale Größenverteilungen mit durchschnittlichen Polydispersitätsindices (Pdis) von $0,02 \pm 0,01$. Es wurden sowohl die anzahlgewichtete als auch die volumengewichtete Partikelgrößenverteilung untersucht. Die mittleren Durchmesser der anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung, welche die Gesamtheit der Probe besser wiedergibt lagen bei 69 ± 9 nm. Bei der volumengewichteten Partikelgrößenverteilung gehen einzelne große Partikel prozentual deutlich stärker in die Partikelgrößenverteilung ein, weshalb diese sensitiver für kleine Änderungen der Partikelprobe ist. Die sensitiveren volumengewichteten Partikelgrößenverteilungen zeigten in dieser Dissertation kleine Fraktionen von Mikropartikeln in allen untersuchten Proben. In diesen volumengewichteten Partikelgrößenverteilungen konnte zudem ein Einfluss der Sprühtrocknungseinlasstemperatur, des DD und des MW gezeigt werden (Figure 9). Die Chitosan-Partikel mit MW 20-100 kDa zeigten einen höheren Anteil an Nanopartikeln und kleinere Mikropartikel mit Durchmessern von 1-20 μm . Im Gegensatz wiesen Partikel mit MW 150-300 kDa weniger Nanopartikel und größere Mikropartikel bis zu 50 μm auf. Dieser Unterschied in der volumengewichteten Partikelgrößenverteilung kann auf die höhere Viskosität der Sprühtrocknungslösung, durch den Einsatz des Chitosans mit einem höheren Molekulargewicht, zurückgeführt werden (Estevinho et al., 2016; Lorenzo-Lamosa et al., 1998). Dadurch sind größere Tropfen an der Düsenspitze, die anschließend zu größeren Partikeln getrocknet sind, entstanden (Hede et al., 2008). Diese Proportionalität zwischen dem Molekulargewicht und der Partikelgröße stimmt sowohl mit vorangegangenen Studien für die emulsionsbasierte Herstellung von Chitosan-Nanopartikeln (B. R. Riegger et al., 2018), als auch für die Sprühtrocknung (He et al., 1999a; Sun et al., 2009) überein. Die DD80-Chitosan-Partikel bestanden aus etwas größeren Partikeln und mehr Mikropartikeln im Vergleich zu den DD95-Chitosan-Partikeln. Dieser Trend könnte auf die höhere Quellfähigkeit von DD80-Chitosan im Vergleich zu DD95-Derivaten zurückgeführt werden (Wenling et al., 2005). Aufgrund der höheren Kristallinität von DD95-Chitosan quellen die Partikel möglicherweise weniger auf, so dass weniger Nanopartikel zur Agglomeration neigen. Insgesamt hatte das MW des verwendeten Chitosanderivates bei der Partikelherstellung durch Sprühtrocknung in dieser Dissertation einen größeren Einfluss als der DD des eingesetzten Chitosanderivates. Dies ist auf die ähnliche Viskosität unterschiedlicher Chitosan-Derivate im Bereich von DD70 bis DD95 unabhängig des MWs zurückzuführen (Chitoceuticals, Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Deutschland).

Die in dieser Dissertation entwickelten sprühgetrockneten Chitosan-Formulierungen ergaben hohe Partikelausbeuten von durchschnittlich $68,51 \pm 3,36$ %. Unbeladene Chitosan-Partikel erzielten bei einer Sprühtrocknungseinlasstemperatur von 100 °C Ausbeuten von $55,12 \pm 9,18$ %,

während die Ausbeute der unbeladenen Partikel bei 160 °C signifikant auf $68,43 \pm 4,16$ % anstieg (Figure 10A). Die Sprühtrocknungstemperatur war zudem ein signifikanter Faktor für die Ausbeute aller untersuchten unbeladenen und beladenen Partikel (ungepaarter t-Test, $p < 0,0001$). Dieser Effekt wird durch eine bekannte Parameterproportionalität zwischen Ausbeute und Sprühtrocknungstemperaturen beschrieben; eine höhere Einlasstemperatur bewirkt eine höhere Auslasstemperatur und verhindert so das Anhaften von Partikeln an den Sprühtrocknerwänden (Büchi, 1997; Ozmen & Langrish, 2002; Paudel et al., 2013; Stahl, 1980). Insgesamt steigt die Partikel ausbeute mit sinkendem Restfeuchtegehalt der Partikel.

Darüber hinaus blieb die Partikel ausbeute vom kleinen (~300 mg) bis zum größeren kontinuierlichen Labormaßstab (≥ 2500 mg) konstant (Figure 10D). Bei einer Einlasstemperatur von 160 °C wurden bei einer Ansatzgröße von ~300 mg (DD80, MW 150-300 kDa Chitosan) Ausbeuten von $67,45 \pm 0,69$ % erzielt. Für eine Ansatzgröße von ≥ 2500 mg konnten sogar $70,62 \pm 4,34$ % (DD80, MW 150-300 kDa Chitosan) der Partikel gewonnen werden. Bei der kontinuierlichen Produktion (2500 mg, 40 min) nahm zudem der Anteil an Nanopartikeln deutlich ab. Im großen Maßstab wurden weniger Agglomerate mit einem Durchmesser von bis zu 80 μm beobachtet als im kleinen Maßstab. Es wurde vermutet, dass die Agglomeratbildung zu Beginn des Prozesses wahrscheinlich auf Partikel zurückzuführen ist, die an den Glasteilen des Sprühtrockners haften und von diesen herunterfallen. Sobald das System im Gleichgewicht ist, bleiben keine weiteren Partikel haften und die Ablagerung im Probengefäß wird nicht weiter beeinträchtigt. Zu Beginn des Sprühtrocknungsprozesses ist beispielsweise der Sprühtrockner noch nicht vollständig äquilibriert; außerdem könnte die Oberflächenspannung der Tröpfchen zu Beginn durch den trockenen und heißen Düsenkanal und die Düsen spitze beeinflusst werden, was sich wiederum auf das Zerstäubungsprofil auswirken könnte. Die zu Anfang entstandenen größeren Partikel und Agglomerate sind zwar auch in mengenmäßig größeren Proben enthalten, haben dort aber keinen Einfluss auf die Gesamtpartikelgrößenverteilung, da sie einen geringeren Anteil an der Gesamtprobe ausmachen als im kleinen Maßstab. Folglich sind die in dieser Dissertation optimierten Sprühtrocknungsparameter nicht nur im sehr kleinen Labormaßstab vielversprechend, um insbesondere teure Biomoleküle zu verkapseln, sondern die definierten Parameter sind ebenso für die kontinuierliche Produktion bis zu 40 min geeignet, was folglich für eine mögliche zukünftige industrielle Produktion vorteilhaft sein könnte.

6 Es wurde zudem festgestellt, dass das MW der verwendeten Chitosane, nicht aber der DD, die Ausbeute beeinflusste. Das Chitosanderivat mit MW 20-100 kDa erzielte eine signifikant höhere Ausbeute als die höhermolekularen Derivate mit 150-300 kDa, 200-400 kDa und 200-500 kDa (ANOVA, $p < 0,0005$). Dies wurde auf die deutlich geringere Viskosität der eingesetzten 1 gew.%igen Sprühtrocknungslösung zurückgeführt. Für das niedermolekulare Derivat (20-100 kDa) lag die Viskosität bei 8-15 mPa s (Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Deutschland), während das mittelmolekulare Derivat (150-300 kDa) eine Viskosität von 151-350 mPa s aufwies. Aufgrund der hohen Viskositäten von 351-750 mPa s und 751-1250 mPa s (Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Deutschland) der hochmolekularen Chitosane (200-400 kDa, 200-500 kDa) konnten diese nicht gleichermaßen verarbeitet werden. Die Partikelabscheidung scheiterte und es entstanden Chitosan-Filme statt Partikel. Deshalb wurde die Sprühtrocknungslösung dieser hochmolekularen Chitosan-Derivate von 1 gew.% auf eine Konzentration von 0,25 gew.% verdünnt, was dann zwar eine erfolgreiche Sprühtrocknung ermöglichte, aber dennoch zu geringeren Ausbeuten führte als die geringeren molekularen Derivate. Dieser Effekt war zwar nicht mehr signifikant, da die Viskosität der Lösungen bereits angepasst wurde, kann aber dennoch damit erklärt werden, dass eine kürzere Polymerlänge vorteilhaft für die Tröpfchenzerstäubung an der Düsen spitze ist.

Die Ergebnisse dieser Dissertation ergaben insgesamt, dass die Viskosität des Sprühtrocknungsfluids unter 350 mPa s eingestellt werden sollte, um hohe Partikel ausbeuten von

mehr als 60 % zu erreichen. Dies wurde bislang noch nicht konkret in der Literatur beschrieben. Es konnte zudem das Chitosanderivat mit 80 % deacetylierten Resten und einem MW von 150-300 kDa als vorteilhaft hinsichtlich Partikelmorphologie, Partikelgrößenverteilung und vor allem Ausbeute identifiziert werden. Dieses Derivat (DD80, MW 150-300 kDa) wurde daraufhin für die Verkapselung von Wirkstoffen ausgewählt. Das in dieser Dissertation untersuchte Chitosan-Derivat mit niedrigem Molekulargewicht (20-100 kDa) war zwar in Bezug auf die Ausbeute ebenfalls vorteilhaft, konnte aber dennoch nicht für die Untersuchung zur Verkapselung von Wirkstoffen verwendet werden, da es sich *in vitro* zu schnell auflösen würde und dadurch keine kontrollierte Freisetzung möglich wäre (Sun et al., 2009).

Somit kann der erste Teil von **2.2.2 Hypothese II** bestätigt werden. Das MW des gewählten Chitosanderivates hatte einen signifikanten Einfluss auf die Partikel ausbeute des Sprühtrocknungsprozesses, wobei die Partikel ausbeute für Derivate mit MW 20-100 kDa signifikant höher war als für Derivate mit MW 150-300 kDa. Die Derivate mit MW 200-400 kDa und 200-500 kDa konnten nicht als 1 gew.%ige Sprühlösung verarbeitet werden und deren Ausbeute war dadurch signifikant geringer als die der Derivate mit MW 150-300 kDa. Die Variation des DD zwischen 80 % und 95 % hatte keine Auswirkung auf die Ausbeute. Weder der DD noch das MW wirkten sich auf die robustere anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung aus, was den zweiten Teil von **2.2.2 Hypothese II** bestätigt, dass in dieser Dissertation robuste Sprühtrocknungsparameter definiert werden konnten. Weiterhin konnten Partikel mit glatter Oberfläche für Sprühtrocknungs-Einlasstemperaturen von 100 °C reproduzierbar hergestellt werden. Die sensitivere volumengewichtete Partikelgrößenverteilung zeigte zudem tendenziell größere Partikel für höhere MWs und höhere DDs. Die etablierten Sprühtrocknungsparameter ermöglichten darüber hinaus eine kontinuierliche Produktion über 40 min während der Herstellung einer Probenmenge von 2500 mg.

6.3 Diskussion zu Hypothese III

Die Verkapselung von Wirkstoffen in der pharmazeutischen Forschung wird entweder zu der Verbesserung der Löslichkeit schwerlöslicher Verbindungen, der Stabilisierung sensitiver Moleküle, oder der gezielten Dosierung von Wirkstoffen eingesetzt. Verkapselungen, die eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs zum Ziel haben, werden dabei als *Drug Delivery* Systeme bezeichnet und sind im Kapitel 1.4 genau erläutert. Eine in der Forschung weit verbreitete Form von *Drug Delivery* Systemen sind partikuläre Wirkstoffformulierungen, da deren Eigenschaften gezielt über die Wahl des Kapselmaterials einstellbar sind. Partikuläre Wirkstoffformulierungen als *Drug Delivery* Systeme werden in Kapitel 1.4.2 ausführlich beschrieben. Insbesondere Nanopartikel besitzen eine große Oberfläche im Verhältnis zum Volumen, was eine gleichmäßige Freigabe der verkapselten Wirkstoffe ermöglicht (Fredenberg et al., 2011). Voraussetzung für eine kontrollierte Freisetzung ist auch der vollständige Einschluss der zu verkapselnden Wirkstoffe, da diese sonst zu schnell von der Partikeloberfläche abgelöst werden und ein *Burst-Release* stattfindet (Poulain et al., 2003; J. Wang et al., 2002).

Wie bereits für **2.2.2 Hypothese II** im vorangegangenen Kapitel 6.2 erläutert, werden in der Literatur vielfach vor allem emulsionsbasierten Verfahren zur Partikelherstellung mit Chitosan beschrieben (Bourganis et al., 2018a; Rabiee et al., 2020; Benjamin R Riegger et al., 2018). Diese erreichen allerdings weniger hohe Verkapselungseffizienzen als die Sprühtrocknung, sind zudem in der Ansatzgröße limitiert und gehen mit einem vergleichsweise hohen Verbrauch an organischen Lösungsmitteln einher. Hinzu kommt die Verwendung toxischer Vernetzungsreagenzien, welche deren Applikation aufgrund der fehlenden Biokompatibilität weiter einschränkt. Die Sprühtrocknung ist hingegen ein besonders geeignetes Verfahren, das

bereits in der pharmazeutischen Industrie etabliert ist und die effiziente Verkapselung von Wirkstoffen mit hoher Verkapselungseffizienz ermöglicht (Walz et al., 2018). Der Prozess der Sprühtrocknung ist in Kapitel 1.4.3 ausführlich beschrieben und dessen bisherige Anwendung für die Verkapselung von Wirkstoffen ist in Kapitel 1.4.4 erläutert.

Die Sprühtrocknung wurde zudem auch bereits als Verfahren zur Stabilisierung sensibler Proteine und Antikörper untersucht, da deren Lagerung als flüssiges Bulkmaterial bisher durch die Notwendigkeit von Kühlketten kostenintensiv und aufwändig ist (Bowen et al., 2013). Wie auch bei der Lagerung hochkonzentrierte Lösungen hat sich für die Sprühtrocknung von Antikörpern die Supplementierung von Zuckerderivaten als stabilisierende Hilfsstoffe bewährt (Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, et al., 2005; S. Schüle et al., 2007; Flávia Sousa et al., 2018). Die Sprühtrocknung von Immunglobulinen ist in Kapitel 1.4.5 ausführlich erklärt.

Wie zuvor bereits beschrieben ist das Biopolymer Chitosan für die intranasale Applikation von besonderem Interesse, da es *Tight Junctions* öffnen und damit eine gesteigerte Aufnahme durch zusätzlichen parazellulären Transport ermöglichen kann. Dies wurde in **2.2.1 Hypothese I** untersucht und in Kapitel 6.1 für olfaktorische Mukosa vom Schwein evaluiert. Die Verarbeitung unterschiedlicher Chitosanderivate mittels Sprühtrocknung sowie die daraus resultierenden Partikeleigenschaften wurden mit **2.2.2 Hypothese II** untersucht und im vorangegangenen Kapitel 6.2 ausführlich diskutiert.

Um die Vorteile der Sprühtrocknung für Antikörper mit den Eigenschaften von Chitosan erstmals zu kombinieren und diese Kombination auf die Eignung als *Drug Delivery System*, insbesondere für die intranasale Applikation, zu prüfen wurde in Kapitel **2.2.3 Hypothese III** aufgestellt. Für die Herstellung der Chitosanformulierungen wurden die beiden therapeutischen Wirkstoffe Biotin und Ocrelizumab als zu verkapselnde Wirkstoffe eingesetzt, da diese konkret in klinischen Studien und in der Behandlung von Multipler Sklerose verwendet werden. Daher könnte eine intranasale Applikation dieser beiden Wirkstoffe von Interesse sein. Die Wirkmechanismen von Ocrelizumab und Biotin sind in Kapitel 1.1.2 ausführlich erläutert. Im Folgenden wird die Verkapselung der beiden Wirkstoffe mittels Sprühtrocknung ausführlich diskutiert. Dabei werden zunächst die Beladung und die erzielte Verkapselungseffizienz in das zuvor ausgewählte Chitosan-Derivat mit 80 % deacetylierten Resten und einem MW von 150-300 kDa evaluiert. Anschließend werden die erzielten Partikelmorphologien der Chitosan-Partikel mit Biotin und Ocrelizumab sowie der Einfluss der Wirkstoffkonzentration auf die Partikelgrößenverteilung evaluiert. Für den Einfluss der Wirkstoffkonzentration auf die Partikelgröße wurden zudem theoretische Abschätzungen als Validierung herangezogen. Für die Wirkstoffformulierung mit dem verkapselten sensitiven Immunglobulin G (IgG) Ocrelizumab wird im Folgenden außerdem die verbleibende Integrität des IgG nach Verkapselung, die Lagerstabilität der sprühgetrockneten Ocrelizumab-Chitosan-Partikel und das Freisetzungverhalten von Ocrelizumab im Vergleich zu Biotin *in vitro* diskutiert. Schließlich wird in Bezug auf die insgesamt aus den Chitosan-Partikeln freigesetzte Wirkstoffmenge an Ocrelizumab auf die mögliche therapeutische Relevanz der entwickelten sprühgetrockneten Partikelformulierung eingegangen.

In dieser Dissertation wurden das niedrigmolekulare Vitamin Biotin und der hochmolekulare monoklonale IgG1 Antikörper Ocrelizumab zum ersten Mal erfolgreich mittels Sprühtrocknung in Chitosan mit einem DD von 80 % und einem MW von 150-300 kDa verkapselt. Die verwendeten Sprühtrocknungsparameter sind in Kapitel 6.1 definiert. Die Auswahl dieses Chitosanderivates ist in Kapitel 6.2 begründet. Die Verkapselung von Biotin erzielte dabei erstmals eine hohe Beladung von $4,42 \pm 0,03$ gew.% in Chitosan. Für Ocrelizumab konnte sowohl eine vergleichbare Beladung von $4,30 \pm 0,26$ gew.%, als darüber hinaus auch eine sehr hohe Beladung von $15,64 \pm 1,02$ gew.% erreicht werden, was zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Die erzielten Beladungen werden im Folgenden als 5 gew.% und 15 gew.% bezeichnet. Die Ocrelizumab-

Partikel enthielten zudem aufgrund der Gewinnung des Antikörpers aus der originalen Trehalosehaltigen Infusionslösung jeweils einen Anteil von $6,28 \pm 0,47$ gew.% (5 gew.% Ocrelizumab) und $4,45 \pm 0,23$ gew.% (15 gew.% Ocrelizumab) Trehalose. Neben der Trehalose enthielten die Partikel außerdem Salze, welche durch die Verarbeitung in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) zusammen mit dem Antikörper in Chitosan verkapselt wurden. Es handelte sich dabei um einen Salzgehalt von $0,75 \pm 0,16$ gew.% (5 gew.% Ocrelizumab) und $5,16 \pm 0,80$ gew.% (15 gew.% Ocrelizumab). Der so entstandene Salzgehalt der Formulierung ist nicht vermeidbar, da die Antikörper vor der Verkapselung in der Sprühhlösung ohne stabilisierende Salze nicht stabil wären. Der geringe in den Ocrelizumab-Chitosan-Partikeln zusätzlich enthaltene Trehaloseanteil wurde nicht weiter reduziert, da wie bereits beschrieben Zuckerderivate vorteilhaft für die Stabilisierung von Antikörpern sind (Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, et al., 2005; S. Schüle et al., 2007; Flávia Sousa et al., 2018). Dass der Trehaloseanteil in den Ocrelizumab-Chitosan-Partikeln wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Lagerstabilität dieser Wirkstoffformulierung hatte wird in einem der folgenden Abschnitte genauer diskutiert.

Die Partikelmorphologie der wirkstoffbeladenen Partikel wurde hauptsächlich durch das MW des Wirkstoffs und die Wirkstoffkonzentration beeinflusst. Für die mit Biotin beladenen Partikel wurden bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ Sprühtrocknungseinlasstemperatur und einer resultierenden Auslasstemperatur von $38 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ glatte Partikeloberflächen erzeugt, analog zu den Oberflächen der bereits im vorhergehenden Kapitel beschriebenen unbeladenen Partikel (Figure 8). Partikel, die mit 5 gew.% Ocrelizumab beladen waren, wiesen hingegen bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine leicht faltige Oberfläche auf. Dies ist auf eine erhöhte Viskosität der Sprühtrocknungslösung durch das höhere Molekulargewicht des eingesetzten Wirkstoffs zurückzuführen. Daraus resultierte eine diskontinuierliche Verdampfung, ein *Blow-up*-Effekt und die Entstehung von Falten während der Abkühlung der Partikel. Dieser Effekt war bei den mit 15 gew.% Ocrelizumab beladenen Partikeln noch stärker ausgeprägt. Durch die höhere Konzentration des eingesetzten hochmolekularen Wirkstoffs wurde die Viskosität deutlich erhöht und die kontinuierliche Verdampfung somit weiter eingeschränkt. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigten folglich, dass diskontinuierliche Verdampfung entweder durch höhere Sprühtrocknungstemperaturen (vgl. **2.2.2 Hypothese II**, Kapitel 6.2) und damit hohem Verdampfungsdruck oder durch hochviskose Lösungen verursacht werden können, die die kontinuierliche Verdampfung der Sprühtrocknungslösung behindern. In dieser Arbeit konnte damit erstmals eine konkrete Sprühtrocknungs-Austrittstemperatur von $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ definiert werden, und somit bei der Verkapselung von hochmolekularen Wirkstoffen in Chitosan mittels Sprühtrocknung reproduzierbar glatte Partikeloberflächen erreicht werden.

Insgesamt gingen auch die Ergebnisse der Partikelgrößenverteilungen der mit Wirkstoffen beladenen Chitosan-Partikelformulierungen in dieselben, bereits beschriebenen reproduzierbaren monomodalen Größenverteilungen mit Polydispersitätsindices (PdIs) von $0,02 \pm 0,01$ und mittleren Durchmessern von 69 ± 9 nm ein (Figure 9). Diese Ergebnisse wurden bereits in Kapitel **2.2.2 Hypothese II** untersucht und in Kapitel 6.2 diskutiert. Alle Partikelpopulationen enthielten neben hauptsächlich Nanopartikeln, kleine Fraktionen von Mikropartikeln bis $50\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser. Darüber hinaus waren geringfügige Auswirkungen des MWs des Wirkstoffs sowie der Wirkstoffbeladung in der sensitiveren volumetrischen Größenverteilung zu erkennen. Die Partikelgröße wurde dabei durch das MW des zugegebenen Wirkstoffs und die größere Menge an zugegebenen Wirkstoffen wiederum aufgrund des dadurch bewirkten Anstiegs der Viskosität tendenziell vergrößert.

Der durchschnittliche Durchmesser der Mikropartikelfraktion stieg bei einer Probengröße von ~ 300 mg von $\sim 2\text{ }\mu\text{m}$ (5 gew.% Ocrelizumab) auf $\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ (15 gew.% Ocrelizumab), was einer Zunahme des Durchmessers um 150 % entspricht. Bei Probengrößen von ~ 2500 mg nahm der mittlere Durchmesser der Mikropartikelfraktion durch die Verdreifachung der Beladungskonzentration von $\sim 2\text{ }\mu\text{m}$ auf $\sim 4\text{ }\mu\text{m}$ zu, was einer Zunahme des Durchmessers um

100 % entspricht. Der Anteil an Nanopartikeln nahm hingegen deutlich ab. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein, da bei der höheren eingesetzten Wirkstoffkonzentration in der Sprühtrocknungslösung pro Zeiteinheit mehr Masse im Sprühtrocknungsprozess gefördert wurde und dadurch größere Partikel entstanden sind (Büchi, 1997; Hede et al., 2008). Es wurde in dieser Dissertation angenommen, dass ein Teil der Nanopartikelfraktion aufgrund der sterischen Hinderung und des hydrodynamischen Durchmessers von ~13 nm der IgG Antikörper (Gagnon et al., 2015; S. K. Li et al., 2011) nur wenige oder keine Antikörpermoleküle enthielt, da der Platzbedarf in den einzelnen Nanopartikeln nicht ausreichte. Durch die Präsenz mehrerer Antikörpermoleküle stieg folglich die Tendenz zur Bildung größerer Partikel, die den Platzbedarf der hochmolekularen Wirkstoffe besser decken konnten. Zudem, begrenzte die dichteste mögliche Kugelpackung die Anzahl der eingekapselten Antikörper in einem einzelnen Partikel wahrscheinlich.

Die dreifach erhöhte Massenkonzentration von 5 gew.% auf 15 gew.% Ocrelizumab wurde in dieser Dissertation mit Hilfe des Molekulargewichts des IgG Antikörpers als dreifache Anzahl an Ocrelizumab-Molekülen berechnet. Damit waren in einem Partikel mit Durchmesser 2 μm theoretisch 10923987 (15 gew.%) statt 3641329 (5 gew.%) Ocrelizumab-Moleküle vorhanden (Berechnung in Kapitel 4.1.3). Aus der Anzahl an verkapselten Ocrelizumab-Molekülen konnte zudem eine theoretisch zu erwartende Zunahme des Partikeldurchmessers von ursprünglich 2 μm (5 gew.% Ocrelizumab) auf 2,88 μm berechnet werden. Dies entspricht einer 44 %igen Zunahme des Partikeldurchmessers durch die theoretische Konzentrationserhöhung auf 15 gew.% Ocrelizumab. Mit dieser Berechnung konnte die in den experimentellen Daten beobachtete Proportionalität, dass der Partikeldurchmesser mit steigender Wirkstoffkonzentration zunahm, theoretisch bestätigt werden. Für diese Berechnung wurden mögliche sterische Hindernisse aufgrund der molekularen Ladung und des Platzbedarfs der Chitosanmoleküle nicht berücksichtigt. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die sterische Hinderung und der Platzbedarf der Chitosanmoleküle die restliche 56-106 %ige Zunahme des experimentell bestimmten Partikeldurchmessers im Vergleich zu der theoretischen Berechnung bewirkt haben könnten.

6 In dieser Dissertation wurden für die Verkapselung von Biotin maximale Verkapselungseffizienzen von $88,44 \pm 1,16$ % erreicht (Figure 10). Diese hohe Verkapselungsrate wurde auf die homogene Mischung des Wirkstoffs und der Chitosanmoleküle in der Sprühtrocknungslösung zurückgeführt (Paudel et al., 2013). Die Verkapselungseffizienz der sprühgetrockneten Biotin-Chitosan-Partikel wurde für Biotin mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) bestimmt, wofür eine gut geeignete HPLC-Messmethode entwickelt wurde. Da die HPLC-Messungen aller Partikelchargen einen schmalen Peak aufwiesen wurde daraus geschlossen, dass Biotin zunächst strukturell intakt verkapselt wurden und auch strukturell intakt wieder aus den sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln freigesetzt wurde. Die sprühgetrockneten Ocrelizumab-Chitosan-Partikel erreichten eine ähnlich hohe Verkapselungseffizienz von $86,03 \pm 9,17$ % (5 gew.%) und $78,18 \pm 6,98$ % (15 gew.%), die nach der Freisetzung aus den Partikeln mittels Mikro-Bicinchoninsäure-Assay bestimmt wurde (Figure 10). Die 13-fache Erhöhung der Chargengröße von ~300 mg auf ~2500 mg ergab keinen Einfluss auf die Verkapselungseffizienzen. Hierdurch konnte die Robustheit der in dieser Dissertation etablierten Sprühtrocknungsparameter wiederum bestätigt werden. Die gewählten Sprühtrocknungsparameter sind folglich auch für die Verkapselung von Wirkstoffen im industriellen Maßstab vielversprechend.

Darüber hinaus wurde die strukturelle Integrität des sensitiven IgG Antikörpers Ocrelizumab in den sprühgetrockneten Partikeln mittels Fourier-Transformations Infrarotspektroskopie (FT-IR) untersucht. Das FT-IR-Spektrum der sprühgetrockneten Partikel, die Ocrelizumab enthielten, zeigte die für IgG-Antikörper charakteristische Amid-I-Bande im Bereich von $1720-1560 \text{ cm}^{-1}$ des Spektrums (Fu et al., 1994; Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, et al., 2005). Trotz der in der

Chitosan-Matrix vorhandenen N-Acetylglucosamin-Untereinheiten und freien Aminogruppen wurden in der zweiten Ableitung der Amid-I-Bande für reine, nicht beladene Chitosan-Partikel keine Signale beobachtet (Figure 10). Bei der Analyse des Spektrums von in Chitosan eingekapseltem Ocrelizumab wurden in der zweiten Ableitung charakteristische Banden bei 1687 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} und 1614 cm^{-1} beobachtet, die den Banden nativer IgG-Moleküle entsprechen, die von Costantino et al. (1997), Maury et al. (2005) und Schüle et al. (2007) beschrieben wurden (Henry R Costantino et al., 1997; Maury, Murphy, Kumar, Mauerer, et al., 2005; S. Schüle et al., 2007). Aus der Position dieser Banden konnte gefolgert werden, dass die Zusammensetzung aus β -Faltblatt und β -Schleifen von Ocrelizumab in den sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln identisch mit der nativen Konformation anderer IgG Moleküle war (Table 4) und Ocrelizumab in dieser Dissertation somit mit intakter Sekundärstruktur verkapselt werden konnte. Die FT-IR-Analyse von in Chitosan eingekapselten Proteinen und IgG-Molekülen ist insgesamt möglich, was in dieser Dissertation zum ersten Mal hinsichtlich der strukturellen Integrität des IgG Antikörpers untersucht und beschrieben wurde.

Die verbleibende Bindungskapazität von Ocrelizumab wurde zudem mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Die Bindungskapazität von Ocrelizumab lag nach der Freisetzung des Antikörpers aus den sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln bei $70,18 \pm 11,39\%$ (Figure 10). Damit wurde die Bindungskapazität von Ocrelizumab durch die Verkapselung um $\leq 18\%$ im Vergleich zum unverkapselten Ocrelizumab reduziert. Aufgrund der vorhergegangenen Analysen wurde diese Reduktion auf Defekte in der Tertiär- oder Quartärstruktur des Wirkstoffs eingegrenzt. Die Bindungskapazität und damit auch die strukturelle Integrität von Ocrelizumab wurde folglich nach der Verkapselung und Freisetzung aus den sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln zum Großteil erfolgreich erhalten, was die in dieser Dissertation entwickelte Wirkstoffformulierung vielversprechend für die Übertragung auf andere Antikörperwirkstoffe macht.

Die Verkapselung der Wirkstoffe erhöhte die Restfeuchte der sprühgetrockneten Partikel im Vergleich zu unbeladenen Chitosan-Partikeln ($9,69 \pm 1,07\%$), für Biotin auf $10,82 \pm 2,37\%$ und für Ocrelizumab auf $10,07 \pm 1,82\%$ was auf die erhöhte Viskosität des Sprühtrocknungsfluids zurückgeführt wurde, die wie bereits oben beschrieben die Verdampfung reduzierte und so einen höheren Wassergehalt in den Partikeln bewirkte. Die kontinuierliche Herstellung der wirkstoffbeladenen Chitosan-Partikel mit Sprühtrocknung bis zu einer Sprühtrocknungsprozessdauer von 40 min wirkte sich tendenziell positiv auf die Restfeuchtigkeit der Partikel aus, wobei dieser Effekt nicht signifikant war. Darüber hinaus führte die dreifach - von 5 gew.% auf 15 gew.% Ocrelizumab - erhöhte Wirkstoffbeladung der Partikel zu einer Reduktion der Partikelrestfeuchte auf $6,95 \pm 1,01\%$. Dies wurde wiederum auf die erhöhte Masse pro Zeiteinheit im System zurückgeführt, da pro Zeiteinheit weniger Wasser im System war und so ein trockeneres Produkt gebildet werden konnte (Büchi, 1997; Hede et al., 2008).

Um die Lagerstabilität der in dieser Dissertation entwickelten Wirkstoffformulierung zu untersuchen wurden die sprühgetrockneten Chitosan-Partikel fünf Wochen im Kühlschrank bei 4 °C und $26 \pm 1\%$ relativer Feuchtigkeit (RH) sowie bei Raumtemperatur (RT) und $19 \pm 1\%$ Luftfeuchtigkeit gelagert. Entscheidend für die Beurteilung der Lagerstabilität ist die Restfeuchtigkeit der Partikel nach der Lagerung sowie deren Glasübergangspunkt (T_g). Insgesamt führte die fünfwöchige Lagerung bei RT zu maximalen Wassergehalten der unbeladenen Chitosan-Partikel von $13,54 \pm 0,67\%$, $11,47 \pm 0,75\%$ Restfeuchtigkeit der Chitosan-Partikel mit 5 gew.% Ocrelizumab und $11,95 \pm 0,70\%$ Restfeuchte für die mit 15 gew.% Ocrelizumab beladenen Chitosan-Partikel. Die Lagerung bei RT und $19 \pm 1\%$ Luftfeuchtigkeit stellte sich in dieser Dissertation insgesamt als vorteilhaft gegenüber der Lagerung im Kühlschrank (4 °C , $26 \pm 1\%$ RH) heraus, was auf die höhere relative Luftfeuchtigkeit im Kühlschrank zurückgeführt wurde. Die

höhere relative Luftfeuchtigkeit begünstigte wahrscheinlich die Wasseraufnahme der dort gelagerten Chitosan-Partikel, trotz der Lagerung in geschlossenen Glasgefäßen.

Die Lagerstabilität der in dieser Dissertation entwickelten Wirkstoffformulierung wurde zudem mit Hilfe von dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) untersucht. Die Glasübergangstemperatur (T_g) der mit 15 gew.% Ocrelizumab beladenen Partikel betrug 35,9 °C. Reines kristallines Chitosan wird durch T_g -Werte zwischen 75 °C und 150 °C beschrieben (Dong et al., 2004). Reine Trehalose ist durch eine T_g von 115 °C gekennzeichnet (Miller et al., 1997) und für IgGs sind T_g -Werte zwischen 62 °C und 82 °C beschrieben (Kaur, 2021; Nemergut et al., 2017; Sedlák et al., 2015; Vermeer & Norde, 2000). Dennoch berichteten Maury et al. (2005) über eine T_g von 42,8 °C für sprühgetrocknete IgG-Trehalose-Mischungen (80:20, IgG:Trehalose), was den in dieser Dissertation erzielten Ergebnissen nahe kommt. Die T_g der unbeladenen Chitosan-Partikel in dieser Dissertation betrug zum Vergleich 36,7 °C. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Restfeuchtigkeit die T_g einer Formulierung erheblich senkt (Ozmen & Langrish, 2002), was auf Wassermoleküle zwischen den Wirkstoffen und der Partikelmatrix zurückgeführt werden könnte und wahrscheinlich eine Lockerung der intermolekularen Wechselwirkungen durch die Interaktion mit den Wassermolekülen hervorruft. Zum Beispiel verringerte eine Erhöhung von 1,65 gew.% auf 4,52 gew.% Wasser in sprühgetrocknetem Magermilchpulver die T_g von 87,7 °C auf 46,7 °C. Maury et al. (2005) berichteten über einen Restfeuchtigkeitsgehalt von 5,3 % für ihre IgG-Formulierung mit 20 gew.% Trehalose. Der Restfeuchtegehalt von $6,95 \pm 1,01$ gew.% der mit 15 gew.% beladenen Ocrelizumab-Partikel in dieser Dissertation trug folglich ebenfalls zur Reduzierung der gemessenen T_g bei. Folglich bewirkte der Sprühtrocknungsprozess und die damit einhergehende Erhöhung der Restfeuchtigkeit der Partikel eine deutliche Reduktion der T_g s im Vergleich zu den verwendeten Rohstoffen. Nach 5 Wochen Lagerung bei RT sank die T_g leicht auf 35,4 °C, was jedoch nicht signifikant war. Darüber hinaus blieb die ELISA-Bindungskapazität nach fünfwöchiger Lagerung bei RT und 19 ± 1 % RH mit $14,62 \pm 0,67$ gew.% ebenfalls konstant gegenüber der ursprünglich unmittelbar nach der Herstellung bestimmten Bindungskapazität. Dies belegte folglich die Lagerstabilität und die verbleibende Integrität des Wirkstoffs Ocrelizumab in den sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln. Folglich ist die hier entwickelte, mit 15 gew.% beladene Ocrelizumab-Chitosan-Formulierung eine vielversprechende feste Darreichungsform, von der sogar angenommen werden kann, dass sie auch bei Temperaturen bis 35 °C langzeitstabil sein könnte. Dies wurde aus den experimentellen Daten gefolgert, da bereits Duddu et al. (1997) beschrieben, dass eine erhöhte molekulare Beweglichkeit und damit eine Aggregation der Wirkstoffe nur bei Lagertemperaturen oberhalb der T_g der Formulierung wahrscheinlich ist.

6

Schließlich wurde mittels Dissolutionstests bei pH 6,5 und 37 °C *in vitro*, den physiologischen Bedingungen der Nase nahekommend, in dieser Dissertation zum ersten Mal eine kontrollierte Freisetzung der verkapselten Wirkstoffe Biotin und Ocrelizumab aus den sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln erzielt. Das verkapselte Biotin wurde vollständige innerhalb von 48 Stunden freigesetzt, wobei kein *Burst-Release* beobachtet wurde (Figure 11). Dies deutet daraufhin, dass das Vitamin erfolgreich in die Partikel eingekapselt wurde und nur wenige oder keine Moleküle an der Oberfläche adhäriert vorlagen (Paudel et al., 2013; Poulain et al., 2003). Der Diffusionskoeffizient von Biotin betrug in dem verwendeten Dissolutionssystem mit Partikeladapter $D_{\text{Biotin}} = 8,22 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Dieser Diffusionskoeffizient wurde durch die erfolgreiche Verkapselung mittels Sprühtrocknung in Chitosan um $4,11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ reduziert, sodass der Diffusionskoeffizient für Biotin aus den sprühgetrockneten Partikeln mit $D_{\text{Biotin-Partikel}} = 4,11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ berechnet werden konnte. Für Ocrelizumab wurde im Gegensatz zu Biotin eine signifikant langsamere Freisetzung mittels Micro-BCA-Assay bestimmt, wobei nur ca. 20 % des verkapselten Wirkstoffs innerhalb der ersten 24 Stunden freigesetzt wurden. Es trat somit ebenfalls kein *Burst-Release* auf, was wiederum die erfolgreiche Verkapselung von Ocrelizumab belegte. Für beide Ocrelizumab-Beladungen (5 gew.%, 15 gew.%) verlief die

Freisetzung identisch, was zeigte, dass die erzielten Freisetzungseigenschaften der Wirkstoffformulierung unabhängig von der Beladungskonzentration waren. Innerhalb von 360 h (15 Tagen) wurden aus der, in dieser Dissertation entwickelten Wirkstoffformulierung $84,43 \pm 4,85$ % Ocrelizumab erfolgreich freigesetzt (Figure 11). Während dieses Zeitraums wurde kein Plateau erreicht, was einer kontrollierten und langsamen Freisetzung entspricht und ähnlich für nicht sprühgetrocknete Partikel und Hydrogele mit verkapseltem Bevacizumab beschrieben wurde (Gregoritza et al., 2016; Kirchhof, Gregoritza, et al., 2015; Savin et al., 2019). Dadurch, dass kein Plateau erreicht wurde und noch nicht 100 % des verkapselten Ocrelizumabs nach 360 h freigesetzt waren entsprach dies einer noch unvollständigen Freisetzung. Um den Zeitpunkt einer vollständigen Wirkstofffreisetzung des verkapselten Ocrelizumabs vorhersagen zu können und den während der Freisetzung ablaufenden molekularen Mechanismus einschätzen zu können, wurde die Ocrelizumab-Freisetzungskinetik mit Hilfe des Korsmeyer-Peppas-Modells bestimmt. Das Korsmeyer-Peppas-Modell ergab ein hohes Bestimmtheitsmaß zwischen dessen mathematischer Funktion und den experimentellen Daten der Ocrelizumab-Freisetzung aus den sprühgetrockneten Partikeln und war damit sehr gut auf die experimentellen Daten dieser Dissertation anwendbar. Wie von Bruschi et al. (2015) empfohlen, wurde der Exponent n für den Freisetzungskurvenbereich unterhalb von 60 % des freigesetzten Wirkstoffs bestimmt, um eine hohe Übereinstimmung mit dem Modell zu erzielen. Die beste Übereinstimmung ergab die Funktion mit der Konstante $K=2,11$ für die Beschreibung des Wirkstoffeinschlusses und des Freisetzungsexponenten $n=0,65$ (Figure 11). Mit Hilfe des ermittelten Werts $n=0,65$ konnte die beobachtete Freisetzungskinetik zudem als anomaler Transport charakterisiert werden (Bruschi, 2015), bei dem sich der molekulare Wirkstofffreisetzungsmechanismus wahrscheinlich zu gleichen Teilen aus Diffusion und Quellung der Chitosan-Partikelmatrix zusammensetzte. Dies stimmte außerdem mit dem für sphärische Wirkstofffreisetzungssysteme beschriebenen Parameter n mit Werten zwischen 0,43 und 0,85 überein.

Mit Hilfe des Korsmeyer-Peppas-Modells konnte zudem eine vollständige Freisetzung von Ocrelizumab nach etwa 395 h vorhergesagt werden und daraus der Diffusionskoeffizient von Ocrelizumab aus den sprühgetrockneten Partikeln bestimmt werden. Der Diffusionskoeffizient für den reinen Antikörper wurde mit $D_{\text{Ocrelizumab}} = 3,25 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ im Dissolutionsversuch mit Partikeladapter bestimmt. Durch die Verkapselung von Ocrelizumab in Chitosan mittels Sprühtrocknung wurde der Diffusionskoeffizient auf $D_{\text{Ocrelizumab-Partikel}} = 1,79 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, also um etwa eine Größenordnung reduziert. Unter Annahme anderer Konstanten und damit eines rein diffusionsbasierten Freisetzungsmechanismus mit Hilfe des Korsmeyer-Peppas-Modells, wäre Ocrelizumab im Gegensatz dazu ausschließlich durch Diffusion voraussichtlich erst nach etwa 580 h vollständig freigesetzt worden. Damit kann angenommen werden, dass die Quellung der Chitosan-Polymerketten der sprühgetrockneten Partikel wahrscheinlich eine Beschleunigung und dadurch eine Verkürzung der Freisetzung um etwa 185 h bewirken kann.

In dieser Dissertation wurde damit zum ersten Mal eine kontrollierte Freisetzung von monoklonalen Antikörpern, insbesondere Ocrelizumab, aus sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln erreicht. Diese entsprach einer hohen kumulativen Freisetzung von $0,104 \pm 0,006 \text{ mg}_{\text{Ocrelizumab}} \text{ mg}_{\text{Partikel}}^{-1}$ und stimmt mit der bisher beschriebenen Freisetzung von Bevacizumab aus anderen nicht sprühgetrockneten partikulären und Hydrogel-basierten Drug Delivery Systemen überein (Gregoritza et al., 2016; Kirchhof, Gregoritza, et al., 2015; Savin et al., 2019). Savin et al. (2019) berichteten über eine vergleichbare Freisetzung von $0,327 \text{ mg}_{\text{Bevacizumab}} \text{ mg}_{\text{Nanopartikel}}^{-1}$ aus Chitosan-Polyethylen-Glykol-Methacrylat-Nanopartikeln (PEGMA). Diese Nanopartikel wurden allerdings über Emulsionspolymerisation hergestellt und erzielten daher nur eine geringe Verkapselungseffizienz von 39 % (Savin et al., 2019). Die dort beschriebene Verkapselungseffizienz lag damit deutlich unter den in dieser Dissertation mittels Sprühtrocknung erzielten Verkapselungseffizienzen von über 80 %. Auch die in dieser Dissertation erzielte

Freisetzungskinetik war der für Chitosan-PEGMA-Nanopartikel beschriebenen ähnlich, wobei Savin et al. (2019) eine vollständige Freisetzung von Bevacizumab nach 600 h erzielten und diesen Freisetzungsmechanismus als normale Fick'sche Diffusion einordneten. Der unterschiedlich vermutete molekulare Freisetzungsmechanismus zwischen den hier generierten Daten und den Chitosan-PEGMA-Nanopartikeln kann wahrscheinlich damit begründet werden, dass die in dieser Dissertation mittels Sprühtrocknung hergestellten Chitosan-Partikel nicht vernetzt wurden und deshalb noch Quellung stattfinden konnte.

Um abschließend die potentielle klinische Relevanz der in dieser Dissertation entwickelten Wirkstoffformulierung einschätzen zu können, wurde die experimentell erzielte durchschnittliche Freisetzungsmenge von 290 µg Ocrelizumab - aus 50 mg der sprühgetrockneten Chitosan-Partikel pro Tag über 15 Tage - mit Ergebnissen aus einer klinischen Studie verglichen. In dieser klinischen Studie betrug die Ocrelizumab Serumkonzentration $\sim 100 \mu\text{g mL}_{\text{serum}}^{-1}$, 15 Tage nach der Infusion mit 600 mg Ocrelizumab (Gibiansky et al., 2021). Die Serumkonzentration der Probanden lag nach 30 Tagen bei $\sim 50 \mu\text{g mL}_{\text{serum}}^{-1}$ und nach 58 Tagen bei $\sim 20 \mu\text{g mL}_{\text{serum}}^{-1}$. Da die Blut-Hirnschranke die zu erwartende Wirkstoffkonzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) signifikant reduziert, aber hierzu keine Daten von Patienten publiziert wurden, wurde diese zu erwartende Reduktion der Wirkstoffkonzentration in dieser Dissertation abgeschätzt. Unter Berücksichtigung des isoelektrischen Punktes von Ocrelizumab bei 9,2 (FDA, 2017) wurde ein Liquor-Serum-Diffusions-Koeffizient von 0,086-0,129 berechnet (Livera et al., 1984; Trojano et al., 1986). Aus den bekannten Serumkonzentrationen nach der Infusion wurde die zu erwartende Serumkonzentration im Liquor damit zwischen $12,85 \mu\text{g mL}_{\text{CSF}}^{-1}$ und $1,71 \mu\text{g mL}_{\text{CSF}}^{-1}$ für den Zeitraum zwischen Tag 15 und Tag 58 nach der Infusion bestimmt. Voraussetzung für eine therapeutisch relevante Wirkstoffkonzentration im Liquor nach intranasaler Applikation von 50 mg Partikel mit einer Ocrelizumab-Beladung von 15 gew.%, der in dieser Dissertation entwickelten Formulierung, wäre eine maximale Wirkstoffaufnahme und Bioverfügbarkeit mittels *Nose-to-Brain* Transport. Die maximale Ocrelizumab-Verfügbarkeit könnte dann im Idealfall in einer Konzentration von $290 \mu\text{g mL}_{\text{CSF}}^{-1}$ resultieren, was $1,93 \mu\text{g mL}_{\text{CSF}}^{-1}$ entspricht. Die in dieser Dissertation entwickelte Wirkstoffformulierung wurde damit als vergleichbar zu der für die intravenöse Applikation abgeschätzten Konzentration von $\geq 1,71 \mu\text{g mL}_{\text{CSF}}^{-1}$ eingestuft und könnte folglich tatsächlich ein interessanter neuer Applikationsansatz sein. Vorteile der hier angedachten intranasalen Anwendung im Vergleich zur aktuell verwendeten Infusion könnten zum einen ein höherer Patientenkomfort sein, da eine einfache Verabreichung beim Hausarzt oder zu Hause denkbar wäre, die nur wenige Minuten statt mehrere Stunden dauert. Zum anderen würden möglicherweise Nebenwirkungen reduziert werden, da die im Liquor benötigte Wirkstoffmenge mit höherem Wirkungsgrad verabreicht werden könnte und die Antikörper nicht im gesamten Körper des Patienten CD20⁺ B-Zellen blockieren würden, was eine geringere Immunsuppression während der Therapie zur Folge hätte. Da die in dieser Arbeit getroffene Abschätzung allerdings viele bislang nicht bestätigte Annahmen enthält ist es dringend notwendig belastbare Daten der tatsächlichen Ocrelizumab-Konzentration im Liquor von Patienten zu berücksichtigen und die in dieser Dissertation entwickelte Formulierung *in vivo* weiter zu untersuchen und dabei direkt mit der intravenösen Applikation zu vergleichen.

Somit kann der erste Teil von **2.2.3 Hypothese III** weitgehend bestätigt werden, da sowohl das niedrigmolekulare Vitamin Biotin, als auch der hochmolekulare IgG1 Antikörper Ocrelizumab erfolgreich und weitgehend strukturell intakt in Chitosan mit 80 % deacetylierten Gruppen und einem Molekulargewicht von 150-300 kDa verkapselt wurden. Der Verlust der Bindungskapazität von Ocrelizumab von $\leq 18 \%$ nach der Freisetzung aus den Partikeln, wurde Defekten in der Tertiär- oder Quartärstruktur zugeordnet, da mittels Spektroskopie kein Unterschied zu nativen Molekülen festgestellt wurde. Der zweite Teil dieser Hypothese kann ebenfalls bestätigt werden, da die Biotin-Partikel eine hohe Verkapselungseffizienz von $88,44 \pm 1,16 \%$ und die Ocrelizumab-

Partikel $86,03 \pm 9,17$ % für 5 gew.% Beladung und $78,18 \pm 6,98$ % für 15 gew.% Beladung aufwiesen. Darüber hinaus waren die, in dieser Dissertation entwickelten Partikel über fünf Wochen bei Raumtemperatur und 19 ± 1 % Luftfeuchtigkeit stabil und zeigten ein kontrolliertes Freisetzungsverhalten *in vitro*. Dabei wurde kein *Burst-Release* beobachtet, Biotin wurde innerhalb von 48 Stunden vollständig und $84,43 \pm 4,85$ % Ocrelizumab innerhalb von 15 Tagen freigesetzt. Der letzte Teil von **2.2.3 Hypothese III** kann teilweise bestätigt werden, da die unterschiedlichen Beladungskonzentrationen von Ocrelizumab die Partikeleigenschaften zwar minimal beeinflussten, aber dennoch reproduzierbar sphärische Partikel mit gleichbleibend schmaler Partikelgrößenverteilung produziert wurden. Auf die Freisetzungskinetik wirkte sich die Beladungskonzentration schließlich nicht aus.

6.4 Diskussion zu Hypothese IV

Hydrogele auf Hyaluronsäure-Basis (HA) sind aufgrund ihrer guten Biokompatibilität bereits für verschiedene klinische Anwendungen im Einsatz, beispielsweise zum Schutz empfindlicher Gewebe oder zur Verhinderung von Gewebeanhaftung bei Operationen (Balazs, 2004). In der Forschung kommen HA-Hydrogele außerdem im *Tissue Engineering* (M. Kurisawa et al., 2005), zum Beispiel bei der Reparatur von Knorpeldefekten zum Einsatz (Donnelly et al., 2017). Das Biopolymer HA ist in Kapitel 1.3.3 detailliert erläutert. Zudem kann dieses Biopolymer gezielt modifiziert werden, beispielsweise über chemische Vernetzung (Xu et al., 2012; Zhu & Marchant, 2011). Das Tyramin-modifizierte Derivat von HA (HA-Tyr) ist injizierbar (F. Lee, Chung, & Kurisawa, 2008a) und entweder enzymatisch oder mittels UV-Licht effektiv vernetzbar und kann somit als Hydrogel mit gezielt einstellbaren mechanischen Eigenschaften eingesetzt werden. Aufgrund der Photovernetzbarkeit und der ohnehin vorhandenen mukoadhäsiven Eigenschaft von HA ist das HA-Tyr Derivat besonders interessant, um die in dieser Dissertation entwickelte partikuläre Wirkstoffformulierung an der *Regio olfactoria* zu fixieren. HA-Hydrogele wurden auch bereits für die Applikation von pharmazeutischen Formulierungen auf Mukosa untersucht, insbesondere für die intranasale Applikation (Chaturvedi et al., 2011; Shaikh et al., 2011). Dabei können sie entweder als *Drug Delivery System* oder als Beschichtung eingesetzt werden. Die Definition von *Drug Delivery Systemen* ist in Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben.

Die Mukoadhäsion beruht nicht allein auf den Eigenschaften des applizierten Biopolymers, sondern auch auf der Zusammensetzung der Mukosa selbst. Die Anatomie der Nase und die Struktur der *Regio olfactoria* sind in Kapitel 1.2.1 und Kapitel 1.2.2 ausführlich erläutert. Die Hauptkomponente des für Mukosa charakteristischen Schleims sind die darin enthaltenen Muzine. In der pharmazeutischen Forschung wird die Bindung an Mukus oder eine Schleimhaut als Mukoadhäsion bezeichnet (Ways et al., 2018). Da durch diese Haftung die Kontaktzeit einer Formulierung am Zielort erhöht werden kann und daraus eine bessere Wirkstoffverfügbarkeit resultiert (Duchêne et al., 1988; M. I. Ugwoke et al., 2005), ist sie auch für die Fragestellung dieser Dissertation von Bedeutung.

Formulierungen für die intranasale Applikation werden aktuell entweder *in vivo* in Nagern oder in der Zellkultur untersucht. In den letzten Jahren wurden zudem neue *in vitro* Testsysteme entwickelt, um Tierversuche weitgehend zu vermeiden und die komplexe Struktur der Mukosa gleichzeitig möglichst gut nachzubilden. Diese *in vitro* Testsysteme werden in Kapitel 1.2.3 detailliert vorgestellt, insbesondere auch das in dieser Dissertation verwendete *ex vivo* Testsystem. Dieses ist besonders vorteilhaft für Fragestellungen, die den zellulären Mechanismus der Mukosa einschließen. Im Gegensatz dazu gibt es bislang für ausschließlich topische Fragestellungen kein etabliertes einfacheres Testsystem. Aus diesem Grund wurde das von dem Kooperationspartner Dr. Johannes Flamm am Institut für Angewandte Biotechnologie der Hochschule Biberach

entwickelte Mukosa-Analog umfassend charakterisiert und validiert. Dafür wurde in Kapitel **2.2.4 Hypothese IV** aufgestellt und untersucht.

Das von Dr. Johannes Flamm im Hinblick auf optimale Mukoadhäsion ausgewählte artifizielle Hydrogel-Substrat bestehend aus 5 gew.% Muzin, 1 gew.% Agarose und 94 gew.% hochreinem Wasser wurde erfolgreich reproduziert. Dieses artifizielle Hydrogel-Substrat wurde in dieser Dissertation dann hinsichtlich der Oberflächenrauigkeit und Topografie mittels *Laser-Scanning* Mikroskopie charakterisiert und mit frisch herauspräparierter olfaktorischer Mukosa vom Schwein verglichen (Figure 13). Die Analyse der original gescannten Aufnahme, sowie das daraus automatisch generierte Höhenprofil und dreidimensionale (3D) Bild ergab für die *ex vivo* porcine Mukosa ein hügeliges Höhenprofil mit flachen Übergängen und einer maximalen Strukturhöhe von 8,59 μm . Im Vergleich dazu war das Höhenprofil des Muzin-Agarose-Analogs sehr ähnlich. In der original gescannten Aufnahme und im 3D Bild wurde allerdings deutlich, dass die Grundfläche der artifizierten Mukosa flacher war, aber eine stärkere Granulierung aufwies. Die maximale Strukturhöhe des Mukosa-Analogs (MA) lag bei 9,38 μm . Nichtsdestotrotz stimmte die Oberflächenrauigkeit S_a des MA und der *ex vivo* Mukosa insgesamt gut überein, wobei die natürliche Mukosa vom Schwein einen Wert von $S_{a, \text{Schwein}} = 7,61 \pm 0,73$ ergab und der korrespondierende Wert für das artifizielle Substrat bei $S_{a, \text{MA}} = 7,80 \pm 1,95$ lag. Die höhere Standardabweichung der Oberflächenrauigkeit des MA im Vergleich zur natürlichen Mukosa kann mit der beobachteten stärkeren Granulierung erklärt werden, die darauf zurückgeführt wurde, dass beim Lösen der Feststoffe Muzin und Agarose des MA möglicherweise ungelöste Reste der Feststoffe zurückblieben, die bei der Auftragung und anschließenden Gelierung des Hydrogel-Substrats als Feststoffe erhalten blieben. Dies kann auf die sehr hohe Viskosität und damit eingeschränkte Lösungskapazität der Hydrogelvorläuferlösung zurückgeführt werden. Durch längeres Lösen und Ultraschallbehandlung der Hydrogelvorläuferlösung wurden die beobachteten unlöslichen Feststoffreste in der Hydrogelvorläuferlösung bereits vor der Oberflächenanalytik minimiert, waren aber dennoch messbar und führten so wahrscheinlich zur Granulierung des MA. Eine höhere Temperatur für das Lösen der Rohstoffe konnte hingegen nicht eingesetzt werden, da die enthaltenen Muzine aufgrund ihrer Eigenschaften als Glykoproteine nur eingeschränkt thermisch stabil sind.

6

Um das Spreitungsverhalten von HA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration charakterisieren zu können und eine geeignete HA-Lösung als potentielle Beschichtung der, in dieser Dissertation entwickelten partikulären Chitosan-Wirkstoffformulierung zu bestimmen, wurde zunächst die Oberflächenspannung der 10 mg mL^{-1} HA-Lösung mittels *Pendant Drop* Methode bestimmt. Die Oberflächenspannung der nativen HA-Lösung mit einem Molekulargewicht (MW) der HA von 1260 kDa wurde mit 46.82 mN m^{-1} bestimmt. Dies stimmt mit den experimentellen Daten von Ribeiro et al. (2007) überein, die für HA-Lösungen eine sigmoidale Abnahme der Oberflächenspannung mit zunehmender Konzentration bis 3,5 mg mL^{-1} zeigten. Die Oberflächenspannung für eine HA-Lösung mit 3,5 mg mL^{-1} betrug $\sim 50 \text{ mN m}^{-1}$ (Ribeiro, Mata, & Saramago, 2007). Da die Proportionalitätsfunktion dort bereits die untere Konstante erreichte entsprach die in dieser Dissertation bestimmte Oberflächenspannung von 46.82 mN m^{-1} dem Erwartungswert. Zudem wurde auch für die in dieser Dissertation untersuchte Tyramin-modifizierte HA-Lösung (HA-Tyr) mit MW 240-360 kDa und einer Polymerkonzentration von 10 mg mL^{-1} einer Oberflächenspannung von 44.86 mN m^{-1} bestimmt. Die chemische Modifikation hatte folglich nur eine minimale Reduktion zur Folge.

Die Kontaktwinkelmessungen der HA-Lösungen unterschiedlicher Polymerkonzentration (10 mg mL^{-1} , 20 mg mL^{-1} und 30 mg mL^{-1}) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf dem artifizierten MA bis zur maximalen Spreitung der Tropfen nach etwa 120 s analysiert. Alle Messwerte des Kontaktwinkels und des Seitenverhältnisses der HA-Tropfen wurden zur Analyse gegen die Zeit aufgetragen (Figure 15). Beim Vergleich der unterschiedlich konzentrierten HA-

Lösungen wurde deutlich, dass die 10 mg mL⁻¹ HA-Lösung am schnellsten spreitete und die Lösung mit einer Konzentration von 30 mg mL⁻¹ am langsamsten. Zudem ergaben sich für die geringste Polymerkonzentration die kleinsten Kontaktwinkelwerte und für die höchste Konzentration entsprechend die größten Kontaktwinkelwerte. Dementsprechend nahm aufgrund der schnellen Spreitung das Seitenverhältnis der 10 mg mL⁻¹ HA-Lösung über die Zeit schneller zu, wobei für die 30 mg mL⁻¹ HA-Lösung ein fast linearer Anstieg des Seitenverhältnisses beobachtet wurde. Diese Verhältnismäßigkeit konnte dadurch erklärt werden, dass die Viskosität exponentiell mit steigender Polymerkonzentration zunahm (Figure 14) und diese die Flexibilität der Lösung deutlich reduzierte. Dies ist außerdem auf die Dichte der Lösungen zurückzuführen, da bei höherer Konzentration mehr hochmolekulare HA-Moleküle in dem Tropfen vorliegen. Dieselbe Proportionalität wurde sowohl unter Laborbedingungen (21,5 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit), als auch in einer Klimakammer, die physiologischen Bedingungen der Nasenhöhle nachbildend, beobachtet. Für die Klimakammer wurden 34 °C und 90 % Luftfeuchtigkeit gewählt, da für den Nasopharynx gesunder Menschen Temperaturen von 33-34 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 90-95 % beschrieben sind (Ingelstedt & Ivstam, 1951), und die beschriebene Region des Nasopharynx den Bedingungen der *Regio olfactoria* am nächsten kommt.

Der Vergleich zwischen den Ergebnissen unter Laborbedingungen und in der Klimakammer ergab für alle Konzentrationen gleichermaßen, eine beschleunigte Spreitung der HA-Tropfen in der Klimakammer. Damit einher gingen schneller über die Zeit abflachende Kontaktwinkelwerte in der Klimakammer und eine tendenziell stärkere finale Spreitung im Gleichgewichtszustand nach ~120 s. Erhöhte Feuchtigkeit und Temperatur, wie beispielsweise unter physiologischen Bedingungen der Nasenhöhle begünstigen damit die Spreitung und erleichtern somit die potentielle Applikation einer HA-Lösung an der *Regio olfactoria*.

Auf den untersuchten gereinigten Glassubstraten erfolgte für alle HA-Lösungen (10 mg mL⁻¹, 20 mg mL⁻¹ und 30 mg mL⁻¹) eine langsamere Spreitung im Vergleich zu dem artifiziellen MA, wodurch die Kontaktwinkelwerte auf Glas über die Zeit nur langsam abnahmen. Dies wurde damit erklärt, dass weniger starke Adhäsionskräfte auf dem Glassubstrat wirkten, da dieses keine Muzine oder andere Bestandteile enthält, die Mukoadhäsion bewirken. Die Spreitung auf Glas erreichte schon nach ≤ 40 s einen Gleichgewichtszustand. Dadurch stellte sich ein konstanter Kontaktwinkel ein (Figure 15, Supplementary Figure S10). Die finalen Kontaktwinkel auf Glas waren damit zudem signifikant höher, als die Gleichgewichtskontaktwinkel der HA-Lösungen auf dem MA. Die zeitliche Entwicklung des Seitenverhältnisses der Tropfen war für das Glassubstrat und das MA innerhalb der ersten 20 s unter Laborbedingungen identisch, was darauf zurückgeführt wurde, dass die initiale Spreitung hauptsächlich von der Temperatur und der relativen Feuchtigkeit, aber weniger vom Substrat bestimmt wird. Diese initiale Spreitung wird folglich vor allem von den Umgebungsbedingungen und wie bereits beschrieben der Polymerkonzentration der Lösung beeinflusst. Der Einfluss des Substrats kam im Umkehrschluss vor allem in der zweiten Phase der Spreitung ≥ 20 s zum Ausdruck. Daraus folgend konnte zudem auch der Einfluss der Polymerkonzentration, der Dauer der initialen Spreitungsphase zugeordnet werden, die 20-40 s dauerte. Für die HA-Lösungen mit 20 mg mL⁻¹ und 30 mg mL⁻¹ dauerte die initiale Spreitungsphase unter Laborbedingungen ~40 s (Supplementary Figure S10), während diese für die schnellere Spreitung der 10 mg mL⁻¹ HA-Lösung nur ~20 s lang erfolgte (Figure 15).

Darüber hinaus wurden in dieser Dissertation Spreitungsversuche mit einer HA-Tyr-Lösung mit einer Polymerkonzentration von 10 mg mL⁻¹ und einem HA-Tyr MW von 240-360 kDa auf dem artifiziellen MA in *Sessile* und *Pendant Drop* Konfiguration untersucht. Es konnte für die *Sessile* Konfiguration eine tendenziell schnellere Spreitung beobachtet werden, wobei die Abnahme der Kontaktwinkelwerte über die Zeit fast parallel verlief. Im Gegensatz dazu wurde bei der Analyse des Seitenverhältnisses des Tropfens deutlich, dass dieses in der *Sessile* Orientierung deutlich schneller und stärker zunahm, was die flächigere Ausbreitung des Tropfens beschreibt. Damit

einher gingen gleichzeitig größere Standardabweichungen der Messung, da die Tropfen nach wenigen Sekunden bereits so flach waren, dass deren Höhe und Radius in der Bildanalyse nur noch schwierig ausgemessen werden konnten. Die verstärkte Spreitung in der *Sessile* Konfiguration konnte damit erklärt werden, dass die Gravitationskraft die Kraft der Mukoadhäsion verstärkt, da beide Kräfte in die gleiche Richtung wirken. Bei der *Pendant* Konfiguration wird der Tropfen hingegen von unten, also entgegen der Gravitationskraft, dosiert. Damit wirkt die Schwerkraft, die die Masse des Tropfens nach unten zieht entgegen der Mukoadhäsionskraft, die den Tropfen nach oben zieht, was insgesamt die Mukoadhäsion und so die Spreitung reduziert.

Beim Vergleich der Spreitung der HA-Tyr Lösung unter Laborbedingungen und in der Klimakammer (34 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit) konnte der zuvor bereits beschriebene Einfluss der Temperatur und der Feuchtigkeit bestätigt werden. Auch für dieses HA-Derivat erfolgte die Spreitung in der Klimakammer schneller, was mit einer schnelleren Abnahme der Kontaktwinkelwerte über die Zeit und einer Zunahme des Seitenverhältnisses des Tropfens einherging (Figure 16). Die Kontaktwinkelentwicklung der nativen HA-Lösung und der HA-Tyr Lösung jeweils mit 10 mg mL⁻¹ Polymerkonzentration war ähnlich, wobei für beide Derivate ein Gleichgewichtskontaktwinkel von ~10 ° erreicht wurde. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die beiden Derivate im Seitenverhältnis des Tropfens deutlich. Überraschenderweise erzielte die native HA-Lösung mit MW 1260 kDa ein maximales Seitenverhältnis von ~15 und die HA-Tyr Lösung mit MW 240-360 kDa nur ein maximales Seitenverhältnis von ~10, was bedeutet, dass die native HA-Lösung trotz des deutlich höheren MW tendenziell stärker spreitete als die niedriger molekulare HA-Tyr Lösung. Im Umkehrschluss scheinen die Tyramin-modifizierten Gruppen des Polymers einen größeren Einfluss auf die Spreitung als das Molekulargewicht zu haben. Dieser Effekt war allerdings nicht signifikant, da aufgrund der sehr flachen Tropfen die Standardabweichungen beider Ergebnisse relativ hoch waren. Eine mögliche Fehlerquelle war zudem das nur teilweise verdunkelte Tageslicht während der Messungen, welches bereits teilweise eine Vernetzungsreaktion des modifizierten Derivates hervorgerufen haben kann, was dann durch die vereinzelt vernetzten Gruppen die Viskosität der Lösung entsprechend erhöht haben könnte.

6 Schließlich wurde das Spreitungsverhalten der HA-Tyr-Lösung unter Laborbedingungen auf dem artifiziellen MA und der *ex vivo* Mukosa verglichen (Figure 16). Ein Vergleich in der Klimakammer war hingegen nicht möglich, da die Tropfen zu flach für eine Bildanalyse waren. Die Spreitung der HA-Tyr-Lösung war auf beiden Substraten ähnlich, wobei die Kontaktwinkelentwicklung über die Zeit nahezu identisch war. Lediglich die wiederum sensitivere Analyse des Seitenverhältnisses des Tropfens zeigte einen minimalen Unterschied. Überraschenderweise stieg das Seitenverhältnis des Tropfens auf dem MA initial stärker an, aber glich sich nach ~120 s wieder mit dem Seitenverhältnis des Tropfens auf der natürlichen olfaktorischen Mukosa aus. Daraus wurde gefolgert, dass die Spreitung von MA und *ex vivo* Mukosa insgesamt sehr gut vergleichbar sind, da die zwischenzeitliche Abweichung auch damit erklärt werden könnte, dass die *ex vivo* Mukosa aufgrund ihrer von Natur aus welligen Struktur die Tropfenanalyse erschwerte. Dies wurde auch durch die schwankenden Standardabweichungen deutlich. Da für diese Untersuchungen derzeit keine vergleichbare Literatur verfügbar ist, wurde davon ausgegangen, dass möglicherweise auch für die zeitliche Entwicklung des Seitenverhältnisses des Tropfens der beiden Substrate identische Werte erzielt werden, wenn die *ex vivo* Mukosa während der Analyse fixiert oder sogar minimal gespannt werden würde. Hierzu wären im Anschluss an diese Dissertation beispielsweise weitere Versuche mit einer Probenhalterung denkbar.

Insgesamt konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass die artifizielle Mukosa basierend auf Muzin und Agarose in der Oberflächenrauigkeit, Topografie und dem Spreitungsverhalten von Hyaluronsäurelösungen, insbesondere in der Kontaktwinkelentwicklung, mit der *ex vivo* olfaktorischen Mukosa vom Schwein sehr gut übereinstimmte. Damit stellt sie ein valides vereinfachtes Modells substrat für die Analyse topischer Applikationsformen dar. Somit kann der

erste Teil von **2.2.4 Hypothese IV** erfolgreich angenommen werden. Das Spreitungsverhalten der HA-Lösungen konnte reproduzierbar auf der artifiziiellen Mukosa analysiert werden. Je höher die Polymerkonzentration der HA-Lösung, desto höher der Kontaktwinkel, desto geringer das Seitenverhältnis des Tropfens und desto langsamer die Spreitung. Der zweite Teil von **2.2.4 Hypothese IV** kann bestätigt werden, da die Polymerkonzentration einen signifikanten Effekt hatte. Der letzte Teil von **2.2.4 Hypothese IV** kann schließlich ebenfalls angenommen werden, da die *Sessile Drop* Konfiguration und die erhöhte Temperatur von 34 °C sowie 90 % Luftfeuchtigkeit – vergleichlich den Bedingungen der Nase - die Spreitung verstärkten, während das Glassubstrat aufgrund fehlender mukoadhäsiver Eigenschaften die Spreitung reduzierte.

7. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Entwicklung und Charakterisierung von partikulären Wirkstoffformulierungen als intranasales *Drug Delivery System*, da die *Regio olfactoria* über olfaktorische Nerven direkt mit dem Gehirn und dem zentralen Nervensystem (ZNS) verbunden ist und so eine innovative Route für die Verabreichung von Wirkstoffen direkt in das Gehirn und in das ZNS darstellt. Aktuell werden neurologische Erkrankungen, wie Multiple Sklerose, beispielsweise mit monoklonalen IgG Antikörpern behandelt, die subkutan oder als Infusion verabreicht werden. Dabei erreicht allerdings nur ein geringer Anteil der Wirkstoffe das ZNS, da Makromoleküle und vor allem Proteine von der Blut-Hirn-Schranke (BHS) abgeschirmt werden. Ein innovativer Ansatz für die Behandlung von Erkrankungen des ZNS ist daher der sogenannte *Nose-to-Brain* Transport, der die Umgehung der BHS dadurch ermöglicht, dass Wirkstoffe entlang des Riechnervs und des Trigeminusnervs transportiert werden. Zudem wurden bereits intrazellulärer Transport in Nervenzellen und parazellulärer Transport beschrieben. Dadurch konnten höhere Wirkstoffkonzentrationen im Gehirn und ZNS von Nagern nachgewiesen werden als nach subkutaner oder intravenöser Applikation.

In dieser Dissertation wurde Chitosan als mukoadhäsives biobasiertes Partikelmaterial ausgewählt. Als Modellsystem wurden zunächst mittels Emulsionspolymerisation hergestellte PLGA-Nanopartikel in Chitosan reproduzierbar mittels Sprühtrocknung verkapselt, was noch nie zuvor beschrieben wurde. Die dadurch entstandenen Nano-in-Mikro-Partikel (NiMP) wiesen eine gleichmäßige sphärische Form mit glatter Oberfläche und mittleren Partikeldurchmessern von 5,75 µm bis 6,61 µm auf. Die Applikation der unverkapselten PLGA-Nanopartikel unterschiedlicher Größe (80 nm, 175 nm, 520 nm) zeigte deren größen- und zeitabhängige Aufnahme in *ex vivo* olfaktorische Mukosa vom Schwein. Dabei konnten 520 nm große PLGA-Partikel nach 15 min mit Zellkernen assoziiert immunhistologisch nachgewiesen, was deren intrazelluläre Aufnahme impliziert. Die Applikation von NiMPs beschleunigte die Aufnahme der darin enthaltenen PLGA-Nanopartikel, was auf die Eigenschaft von Chitosan, *Tight Junctions* im olfaktorischen Epithel zu öffnen und so zusätzlich parazellulären Transport zu ermöglichen, zurückgeführt wurde. Diese Eigenschaft konnte zudem mittels immunhistologischer Färbung des *Tight Junction Proteins Zonula Occludens ZO-1* in dieser Dissertation zum ersten Mal in olfaktorischem Gewebe unmittelbar nach Partikelapplikation gezeigt werden. Proportional zu dem applizierten Chitosan wurde in der immunhistologischen Gewebeanalyse ein Gradient CD14-positiver Zellen beobachtet. Das Molekulargewicht und der Deacetylierungsgrad des verwendeten Chitosanderivates sowie die Partikelgröße der applizierten sprühgetrockneten Chitosan-Partikel sprachen dabei für eine antiinflammatorische M2-Makrophagen Reaktion. Dies konnte allerdings aufgrund der gewählten *ex vivo* Präparation des olfaktorischen Gewebes vom Schwein als Untersuchungsmethode nicht vollständig geklärt werden. Ebenso wurde ein Fehlen der Partikelbeschichtung oberhalb von Drüsen der olfaktorischen Mukosa beobachtet, die Ursache für dieses Ergebnis konnte aber ebenfalls aufgrund der Präparationsmethode nicht vollständig geklärt werden. Insgesamt konnte im ersten Teil dieser Dissertation gezeigt werden, dass Chitosan für die Herstellung intranasaler Wirkstoffformulierungen geeignet ist und Chitosan-basierte sprühgetrocknete Partikel ein vielversprechendes System für die intranasale Applikation sind, da sie *Nose-to-Brain* Transport begünstigen können.

In einem zweiten Teil dieser Dissertation wurde der initial etablierte und optimierte Sprühtrocknungsprozess für sechs verschiedene Chitosanderivate mit Deacetylierungsgraden von 80-90 % und Molekulargewichten von 20-500 kDa untersucht. Als besonders entscheidender Faktor für die Sprühtrocknung homogener Partikel mit glatter Oberfläche hat sich die Einlasstemperatur des Sprühtrocknungsprozesses herausgestellt. Während bei 160 °C vor allem Partikel mit rauer Oberfläche entstanden, konnten bei 100 °C reproduzierbar Partikel mit glatter

Oberfläche, monomodaler Partikelgrößenverteilung (Polydispersitätsindex $0,02\pm 0,01$) und mittleren Durchmessern von 69 ± 9 nm hergestellt werden. Die in dieser Dissertation ermittelten Prozessparameter ermöglichten zudem hohe Partikelausbeuten von über 60 % und eine kontinuierliche Produktion über eine Dauer von 40 min. Somit konnten in dieser Dissertation erfolgreich robuste Sprühtrocknungsparameter definiert werden, sowie die Einlasstemperatur 100 °C und eine Viskosität geringer 350 mPa s zum ersten Mal als kritische Parameter für die Herstellung reproduzierbarer Chitosan-Partikel mit glatter Oberfläche konkret beschrieben werden. Zudem konnte dadurch das Chitosanderivat mit DD 80 % und MW 150-300 kDa für die Wirkstoffverkapselung ausgewählt werden, da dieses Chitosanderivat sich hinsichtlich Partikelausbeute, Partikelmorphologie und Verkapselungseffizienz für Wirkstoffformulierungen als am besten geeignet herausstellte.

In einem dritten Teil dieser Arbeit wurden niedrigmolekulare Moleküle wie das Vitamin Biotin und hochmolekulare monoklonale IgG Antikörper wie Ocrelizumab erfolgreich verkapselt. Die Verkapselung von monoklonalen Antikörpern mittels Sprühtrocknung in Chitosan wurde noch nie zuvor beschrieben. Dabei konnten mehr als 80 % der eingesetzten Wirkstoffe erfolgreich in Chitosan mit DD80 und MW 150-300 kDa verkapselt werden und damit hohe Verkapselungseffizienzen größer 80 % für Beladungen zwischen 5 gew.% (Biotin, Ocrelizumab) und 15 gew.% (Ocrelizumab) erzielt werden. Ocrelizumab konnte darüber hinaus weitgehend strukturell intakt verkapselt werden. Mittels spektroskopischer Methoden wurde kein Unterschied zum nativen Molekül festgestellt, was eine intakte primäre und sekundäre Proteinstruktur impliziert. Lediglich ein bis zu 18%iger Verlust der Bindungskapazität nach erneuter Freisetzung aus den sprühgetrockneten Chitosan-Partikeln lies den Rückschluss auf Defekte der Tertiär- oder Quartärstruktur des Proteins zu. Die kontrollierte Freisetzung der Wirkstoffe aus den entwickelten Partikeln wurde *in vitro*, den physiologischen Bedingungen der Nase nahekommend, untersucht. Die dazu ausgeführten Dissolutionstests zeigten sowohl für die Freisetzung von Biotin als auch für die Freisetzung von Ocrelizumab aus den sprühgetrockneten Partikeln (DD80, 150-300 kDa) keinen *Burst-Release*, was bewies, dass die Moleküle erfolgreich in die Partikelmatrix eingebettet vorlagen und nur wenige Moleküle an der Partikeloberfläche adhärirt sein konnten. Die Freisetzung von Biotin wurde durch die Partikelmatrix gegenüber des unverkapselten Wirkstoffs um 24 h verlangsamt, was zu einer Reduktion des Diffusionskoeffizienten von $D_{\text{Biotin}} 8,22 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ auf $D_{\text{Biotin-Partikel}} 4,11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ führte. Die Freisetzung von Ocrelizumab erfolgte signifikant langsamer, wobei die Chitosan-Partikelmatrix eine Reduktion des Diffusionskoeffizienten von $D_{\text{Ocrelizumab}} 3,25 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ auf $D_{\text{Ocrelizumab-Partikel}} 1,79 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bewirkte. Innerhalb von 15 Tagen (360 h) Freisetzung wurden $84,43\pm 4,85\%$ Ocrelizumab erfolgreich freigesetzt, wobei noch kein Plateau erreicht wurde. Das Korsmeyer-Peppas-Modell war anwendbar und sagte eine vollständige Freisetzung des Wirkstoffs nach 395 h voraus, wobei der ablaufende Freisetzungsmechanismus als anomaler Transport charakterisiert wurde, bei dem sich die Wirkstofffreisetzung zu gleichen Teilen aus der Diffusion des Wirkstoffs aus der Polymermatrix und der Quellung der Polymerketten zusammensetzt. Im Vergleich dazu konnte für einen rein diffusionsbasierten Freisetzungsmechanismus von Ocrelizumab eine maximale Freisetzung nach 580 h berechnet werden. Dementsprechend konnte davon ausgegangen werden, dass die Quellung des Chitosans die Freisetzung um etwa 185 h beschleunigte. Die innerhalb von 15 Tagen kontrolliert aus den sprühgetrockneten Partikeln freigesetzte Menge an Ocrelizumab könnte zudem in etwa der therapeutischen Konzentration an Ocrelizumab in der Cerebrospinalflüssigkeit nach intravenöser Applikation entsprechen. Allerdings sind zu der exakten therapeutischen Konzentration von Ocrelizumab im Liquor von MS Patienten derzeit keine Daten veröffentlicht, weshalb diese Abschätzung nur theoretisch erfolgen konnte. Somit konnten im dritten Teil dieser Dissertation erfolgreich biobasierte partikuläre Wirkstoffformulierungen für die intranasale Applikation mit Biotin und Ocrelizumab, als erstem monoklonalen Antikörper, mittels Sprühtrocknung in Chitosan hergestellt werden. Die

kontrollierte Freisetzung über 15 Tage *in vitro* zeigte, dass es sich bei den entwickelten Partikeln um ein vielversprechendes *Drug Delivery* System für die intranasale Applikation handelt, da die Wirkstofffreisetzung nahezu kontinuierlich erfolgte und den theoretischen Abschätzungen der therapeutisch benötigten Konzentration an Ocrelizumab nahekam.

Schließlich wurden in dieser Dissertation in einem vierten Teil native Hyaluronsäure-Lösungen (HA) und mittels UV-Licht vernetzbare Tyramin-modifizierte Hyaluronsäure-Hydrogelvorläuferlösungen (HA-Tyr) auf deren Spreitungsverhalten untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten unter Laborbedingungen und in einer Klimakammer bei 35 °C und 90 % Luftfeuchtigkeit, die physiologischen Bedingungen in der Nasenhöhle nachbildend, auf Mukosa. Damit wurden die HA-Lösungen als mögliche befestigende Beschichtung der in dieser Dissertation entwickelten sprühgetrockneten Wirkstoffformulierung nach intranasaler Applikation charakterisiert. Hierzu wurde ein Muzin-Agarose-basiertes artifizielles Mukosa-Analog mit *ex vivo* olfaktorischer Mukosa vom Schwein hinsichtlich der Oberflächenrauigkeit und Topografie verglichen. Die Charakterisierung ergab, dass das Muzin-Agarose-basierte Mukosa-Analog ein gut geeignetes, einfach herstellbares, kostengünstiges Modellsustrat mit gleichbleibender Qualität darstellt. Es wurde zudem die Tropfenspreitung nativer HA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration und exemplarisch eine Lösung mit 10 mg mL⁻¹ HA-Tyr-Polymerkonzentration getestet. Der Kontaktwinkel und das Seitenverhältnis des Tropfens wurden für alle HA- und HA-Tyr-Lösungen mittels Kontaktwinkelmessungen über die Zeit aufgezeichnet und untersucht. Mit sinkender Polymerkonzentration der Lösungen nahm der Kontaktwinkel ab, das Seitenverhältnis des Tropfens zu und die Spreitung wurde beschleunigt. Die physiologischen Bedingungen der Nase und die Applikation in der *Sessile Drop* Konfiguration begünstigten ebenfalls die Spreitung der HA- und HA-Tyr-Lösungen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Muzin-Agarose-basierte artifizielle Mukosa ein geeignetes Modellsustrat für olfaktorische Mukosa ist und damit topische Formulierungen für die intranasale Applikation untersucht werden können. Zudem stellte sich heraus, dass HA-Lösungen bzw. HA-Tyr-Hydrogelvorläuferlösungen für die Applikation und die Spreitung auf Mukosa geeignet sind und somit eine relevante Darreichungsform für die in dieser Dissertation entwickelte partikuläre Wirkstoffformulierung sein können.

Insgesamt wurde in dieser Dissertation zum ersten Mal das bereits in der Pharmaindustrie etablierte, robuste Verfahren der Sprühtrocknung genutzt, um sensitive monoklonale IgG Antikörper nicht nur zur Stabilisierung als *Bulk*-Material mit Zuckerderivaten als Hilfsstoffe zu trocknen, sondern die IgG Antikörper mit hoher Verkapselungseffizienz und weitgehend intakt erfolgreich in Chitosan zu verkapseln. Die dadurch in dieser Dissertation entwickelte Wirkstoffformulierung erzielte eine fast kontinuierliche Freisetzung des IgG Ocrelizumab *in vitro*, und könnte der therapeutisch relevanten Konzentration an Ocrelizumab theoretischen Abschätzungen zu Folge entsprechen. Außerdem konnte in dieser Dissertation zum ersten Mal gezeigt werden, dass die sprühgetrockneten Chitosan-Partikel das *Tight Junction* Protein ZO-1 in der olfaktorischen Mukosa öffnen können. Somit konnte in dieser Dissertation erfolgreich ein neuartiges *Drug Delivery* System erforscht und entwickelt werden, welches aufgrund der kontrollierten Freisetzung in einem wahrscheinlich relevanten Konzentrationsbereich als *Controlled Drug Delivery* System klassifiziert werden kann und einem *Drug Delivery* System der aktuellen dritten Generation entspricht, da es die Überwindung biologischer Barrieren durch die Öffnung von *Tight Junctions* ermöglichen kann.

8. Ausblick

Die erfolgreichen Arbeiten dieser Dissertation erlauben einige Anknüpfungspunkte für fortführende oder aufklärende Arbeiten, welche im Folgenden erläutert werden:

In dieser Dissertation wurde 15 min nach der Applikation von PLGA-Chitosan-Nano-in-Mikro-Partikeln auf die olfaktorische Mukosa vom Schwein ein immunhistologischer Gradient CD14-positiver Zellen in der *Lamina propria* beobachtet. Dieser konnte als wahrscheinlich antiinflammatorisch eingeordnet werden, da der Deacetylierungsgrad (80 %) und das Molekulargewicht des Chitosan (150-300 kDa), sowie die Partikelgröße zwischen 1-10 µm wahrscheinlich M2-Makrophagen stimulierten. Um diese Reaktion vollständig aufzuklären, könnten im Anschluss an diese Dissertation Zellkulturversuche ausgeführt werden, um Zytokinkonzentrationen während dieser stattfindenden Reaktion zu bestimmen. Darüber könnte zwischen M1- und M2-Makrophagen besser differenziert werden als im *ex vivo* Gewebe, da die immunhistologische Konzentrationsbestimmung dort eingeschränkt ist und die einzelnen Zeitpunkte der Probennahme die zeitliche Einschätzung schwierig machen.

Zudem konnte in dieser Dissertation immunhistologisch gezeigt werden, dass die Partikelbeschichtung mit NiMPs oberhalb von Drüsen der olfaktorischen Mukosa zu späteren Probezeitpunkten fehlte. Dies konnte darauf eingegrenzt werden, dass die Partikel entweder durch die weitere Mukussekretion, während der Inkubation im Versuch weggeschoben wurden, oder das Chitosan durch seine Eigenschaft interzelluläre Kontakte zu öffnen, die Aufnahme der Partikel in den Drüsen signifikant beschleunigte. Um den Grund dieser Beobachtungen aufzuklären, könnten entweder zu verkürzten Probezeiten Daten erhoben werden, oder ein komplexes Modell für die olfaktorische Mukosa entwickelt werden, beispielsweise ein *Organ-on-a-Chip* Modell, um die Vorgänge der Drüsen *in vitro* gezielt zu überwachen.

Außerdem konnte in dieser Dissertation nach der Partikelapplikation purer PLGA-Nanopartikel und der Chitosan-beschichteten NiMPs eine Co-Lokalisation von 520 nm großen PLGA Partikeln mit Zellkernen und Neurofilamenten immunhistologisch nachgewiesen werden. Dies entspricht allerdings nur dem ersten Schritt eines möglichen *Nose-to-Brain* Transports. Im Anschluss an diese Dissertation könnte deshalb geklärt werden, wie die Partikel weiter transportiert werden. Um beispielsweise zwischen intrazellulärem oder extrazellulärem Transport entlang der Nerven differenzieren zu können, wären spezifische Vesikelmarker interessant, die entweder im *ex vivo* Gewebe immunhistologisch angefärbt werden könnten, oder nach Applikation der entwickelten NiMPs in der Zellkultur verfolgt werden könnten, zum Beispiel mit *Live-Cell-Imaging*.

Da sich die in dieser Dissertation entwickelte Wirkstoffformulierung insbesondere für die Verkapselung und anschließende kontrollierte Freisetzung von Ocrelizumab als vielversprechend herausgestellt hat, könnte im Anschluss an diese Dissertation die Applikation der wirkstoffbeladenen Partikel auf *ex vivo* Gewebe untersucht werden. Da die Freisetzung auf der Mukosa allerdings aufgrund der weniger wässrigen Umgebung auf der Schleimhaut wahrscheinlich langsamer erfolgt als *in vitro*, könnte dabei nur die initiale Wirkstofffreisetzung untersucht werden. Folglich steht diese Untersuchungsmethode aufgrund der Zellviabilität innerhalb eines Intervalls von etwa acht Stunden nach Präparation im Widerspruch zu der in dieser Dissertation erzielten und auch gewünschten langsam und kontrolliert freisetzenden Wirkstoffformulierung. Aus diesem Grund wäre eine Untersuchung der entwickelten Wirkstoffformulierung *in vivo* notwendig und im Vergleich zur intravenösen Applikation von Ocrelizumab besonders interessant. *In vivo* könnte auch die therapeutische Relevanz der entwickelten Formulierung durch die Bestimmung der Ocrelizumab-Konzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit nach intranasaler und intravenöser Applikation besser aufgeklärt werden.

Schließlich konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass UV-Licht vernetzbare HA-Tyr Hydrogelvorläuferlösungen aufgrund ihres Spreitungsverhaltens auf *ex vivo* olfaktorischer Mukosa und dem artifiziellen Mukosa-Analog als mögliche stabilisierende Beschichtung für die in dieser Dissertation entwickelte partikuläre Wirkstoffformulierung geeignet sein sollten. Aus diesem Grund könnte im Anschluss an diese Dissertation die Applikation der sprühgetrockneten Partikel zusammen mit HA-Tyr-Hydrogelvorläuferlösungen genauer untersucht werden, sowie die Vernetzung der HA-Tyr-Hydrogelvorläuferlösungen mit UV-Licht auf *ex vivo* Mukosa oder auf dem Mukosa-Analog.

Im Rahmen des dieser Dissertation übergeordneten Projekts *N2B-patch* wurde bereits eine erste Machbarkeitsstudie mit Mini-Schweinen durchgeführt. Dabei wurde die Applikation von sprühgetrockneten Partikeln und Hydrogelbeschichtung mit einem im Projekt neu entwickelten Applikator getestet. Es wurden sowohl sprühgetrocknete NiMPs alleine, als auch die sprühgetrockneten NiMPs überschichtet mit UV-Licht vernetzten HA-Tyr-Hydrogelen intranasal appliziert und über fünf Tage beprobt. Sowohl die NiMPs alleine, als auch die NiMPs in Kombination mit dem Hydrogel, erreichten eine messbare Wirkstoffkonzentration im Riechkolben, wobei diese bei der Kombination aus Partikeln und Hydrogel länger konstant blieb. Somit könnte insbesondere die Kombination von sprühgetrockneten Partikeln mit dem HA-Tyr-Hydrogel weiter untersucht werden und die therapeutische Konzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit aufgeklärt werden, um die Wirkstoffformulierung gegebenenfalls weiter optimieren zu können.

I. Anhang

I.I Eidesstattliche Erklärung

Ich, Lena Marie Spindler versichere, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Entwicklung und Charakterisierung einer biobasierten partikulären Wirkstoffformulierung zur kontrollierten Freisetzung an der *Regio olfactoria*“

eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Angaben, die wörtlich oder sinngemäß fremden Quellen entnommen wurden, sind unter Angabe des Ursprungs kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde zu keiner Zeit in derselben oder einer substantiell ähnlichen Version bei einem anderen Prüfungsamt eingereicht.

Lena Marie Spindler

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke (Kübelbeck 2020).....	2
Abbildung 2: Wirkmechanismus der Anti-CD20-Therapie für die Behandlung von Multipler Sklerose. Während der Demyelinisierung von Axonen bei Multipler Sklerose werden Myelinreste als Autoantigene von B-Zellen erkannt. Die dadurch aktivierten B-Zellen rekrutieren T-Helferzellen. Über die Bindung des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC) an den T-Zell-Rezeptor (engl. T-cell Receptor, TCR), sowie eines der glykosylierten Phosphoproteine CD80 und CD86 an CD28 auf der T-Helferzelle wird diese zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Autoantikörpern gegen die Autoantigene der Myelinfragmente stimuliert. Durch die Therapie mit Rituximab, Ocrelizumab oder Ofatumumab wird CD20 auf CD20 ⁺ B-Zellen gebunden, welche dadurch Selbstzerstörung durch Apoptose auslösen und so keine weitere Autoimmunreaktion modulieren können (verändert nach (Maucher 2021)).....	4
Abbildung 3: a-c : Verteilung von Wirkstoffformulierungen durch auf dem Markt vorhandene Applikatoren. a : Impel Neuropharma Precision Olfactory Delivery. b : Optinose Bi-Directional Applikator. c : Ein handelsübliches Nasenspray. (Charlton, Davis et al. 2007).....	6
Abbildung 4: Schematischer Schädelquerschnitt mit Nasenvorhof (A), Atrium (B) und respiratorischer Region: unterer (C1), mittlerer (C2) und oberer (C3) Nasenmuschel, sowie Riechepithel (D) und Nasopharynx (E) (verändert nach (Lynch 2006))......	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung der möglichen Nose-to-Brain Transportwege für intranasal applizierte Wirkstoffe in den Riechkolben und die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) (©Zimmermann, verändert nach Stützle et al. 2018)......	9
Abbildung 6: Auftragung einer Wirkstoffkonzentration über die Zeit für den schematischen Vergleich einer konventionellen Dosierung und eines Drug Delivery Systems (verändert nach (Janssen, Mihov et al. 2014)).	13
Abbildung 7: Molekulare Mechanismen der Wirkstofffreisetzung aus Drug Delivery Systemen. A : Diffusion aus wassergefüllten Poren, B : Diffusion durch das Trägermaterial (z. B. Polymermatrix), C : Quellung des Trägermaterials und dadurch vergrößerte sowie neue Poren, D : Oberflächenerosion, E : Zersetzung des Trägermaterials (verändert nach (Fredenberg, Wahlgren et al. 2011, Lengyel, Kállai-Szabó et al. 2019))......	14
Abbildung 8: Freisetzungsprofile, bestehend aus verschiedenen Phasen. Leere Quadrate : Burst-Release und eine schnelle Phase II. Gefüllte Kreise : Dreiphasige Freisetzung mit einer kurzen Phase II. Kreuze : Burst-Release und Freisetzung nullter Ordnung. Gefüllte Rauten : Dreiphasige sigmoidale Freisetzung. Schwarze Striche : Zweiphasige Freisetzung, ähnlich der dreiphasigen Freisetzung, aber ohne den Burst-Release (Fredenberg, Wahlgren et al. 2011)......	16
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Gleichstrom-Sprührockners mit Düsenzerstäubung, bei der entweder eine Polymer-Wirkstoff-Lösung oder zwei getrennte Lösungen für Polymer und Wirkstoff in die Düse gefördert werden können (©Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB).	19
Abbildung 10: Einfluss von langsamer (A) und schneller Verdampfung (B) auf die Partikelmorphologie und die Wirkstoff-Polymer-Anordnung für die Herstellung von Wirkstoffformulierungen mittels Sprührocknung (verändert nach (Paudel, Worku et al. 2013)).	21
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Nasenhöhle eines Menschen mit Nasenvorhof (A), Atrium (B) und respiratorischer Region: unterer (C1), mittlerer (C2) und oberer (C3) Nasenmuschel, sowie Riechepithel (D) und Nasopharynx (E). Nahaufnahme der Freisetzung von Wirkstoffen (F) aus Partikeln (G) an der Regio olfactoria (H), sowie der schematische Transport	

der Wirkstoffmoleküle **(I)** zum Gehirn **(J)** (verändert nach (Ugwoke, Agu et al. 2005, Ugwoke, Verbeke et al. 2010)) 26

Abbildung 12: Schematische Darstellung der vier Hypothesen für die Untersuchung und Diskussion der wissenschaftlichen Fragestellungen dieser Dissertation. 26

Figure 1: PLGA nanoparticles prepared by double emulsion technique **(A, B)** and spray dried nano-in-micro particles (NiMPs) prepared by spray drying at two different polymer ratios consisting of PLGA nanoparticles (520 nm) and chitosan as matrix material **(C–H)**. **(A)** Scanning Electron Microscopy (SEM) image, magnification 5 kX. **(B)** Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) picture, mag. 630 X, maximum intensity projection (MIP) stitched together from a z-stack, particles labeled with Lumogen F Red. **(C)** CLSM image of NiMPs 1/3 chitosan:2/3 PLGA, mag. 630 X, MIP; Enlarged cross-section of particles and particle schematic; Chitosan (green) and PLGA nanoparticles (red). **(D)** CLSM image of NiMPs 2/3 chitosan:1/3 PLGA, mag. 630 X, MIP. **(E)** 3D projection of CLSM images (green: chitosan; red: PLGA) stitched together from a z-stack, mag. 630 X, external view. **(F)** Transparent 3D projection of CLSM images (green: chitosan; red: PLGA) stitched together from a z-stack, mag. 630 X, internal view. **(G)** SEM image of NiMPs 1/3 chitosan:2/3 PLGA, mag. 10 kX. **(H)** SEM picture of NiMPs 2/3 chitosan:1/3 PLGA, mag. 10 kX. 3D projections (external, transparent) of CLSM images from 2/3 chitosan:1/3 PLGA NiMPs displayed in Supplementary Figure S1. 41

Figure 2: **(A)** Volume size distribution of nano-in-micro particles (NiMPs) produced via spray drying. Particles consist of PLGA nanoparticles (520 nm) coated with chitosan at a polymer ratio of either 1/3:2/3 or 2/3:1/3; (n = 5). **(B)** Volume size distribution of NiMPs after 1 min ultrasonic treatment in the measurement cell; (n = 5). **(C)** Particle number distribution (n = 307 particles) extracted from Scanning Electron Microscopy (SEM) images and fitted with a Gaussian fit; Dashed line (1/3 chitosan:2/3 PLGA) and full line (2/3 chitosan:1/3 PLGA). 44

Figure 3: **(A)** Experimental setting of ex vivo particle permeation experiments, porcine olfactory mucosa incubated in specialized side-by-side cell at physiological conditions of the nasal cavity (35 °C, 90 % humidity). **(B–D)** Uptake of PLGA nanoparticles (red) 5 min **(B, C)** and 10 min **(D)** after application to the apical side of the olfactory mucosa. Maximum intensity projection (MIP) of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack. Cell nuclei stained with DAPI (blue). PLGA nanoparticles colored with 14 µg mL⁻¹ (80 nm), 28 µg mL⁻¹ (175 nm), or 28 µg mL⁻¹ (520 nm) Lumogen. Red arrows mark single particles. Area of particle accumulation enlarged. 46

Figure 4: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan applied to the apical side of porcine olfactory mucosa. Maximum intensity projection (MIP) of Confocal Laser Scanning Electron Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Images taken after 30 min **(A)** or 2 h **(B–E)**. **(C)** Merged image shows overlapping signals of nanoparticles (red) and chitosan labeled with fluorescein (green) appearing yellow. **(D)** Corresponding single channel of chitosan (green). **(E)** Corresponding single channel of nanoparticles (red). (Red arrow) PLGA nanoparticles, (green arrow) chitosan, (yellow arrow) co-localized PLGA nanoparticles and chitosan. PL, Particle layer; BL, Basal layer. 49

Figure 5: Permeation of PLGA nanoparticles (520 nm; red) **(A–E)** and PLGA-chitosan nano-in-micro particles (NiMPs) **(F–J)**. Maximum intensity projection (MIP) of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack, taken 15 min after application to the apical side of porcine olfactory mucosa. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Red arrows mark nanoparticles (red) within the tissue. CD14 (green) labelled with anti-mouse Alexa Fluor® 647 secondary antibody **(A, B, F, G)**. NF-H (cyan) labelled with anti-chicken FITC secondary

antibody (**D, E**). Chitosan labeled with fluorescein (cyan) (**H**). Overlapping signals of red and green appear yellow (**F**) due to co-localization of PLGA nanoparticles (red) and chitosan (green). PLGA nanoparticles (single red channel) displayed in Supplementary Figure S6B, C. LP, Lamina propria; BL, Basal cell layer; PL, Particle layer; EL, Epithelial cell layer. 51

Figure 6: Permeation of PLGA nanoparticles (520 nm; red) (**A, B, C**) and PLGA-chitosan nano-in-micro particles (NiMPs) (**D, E, F**). Maximum intensity projection (MIP) of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack, taken 15 min after application to the apical side of porcine olfactory mucosa. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Zonula occludens protein 1 (ZO-1) (amber) labeled with anti-rabbit Alexa Fluor® 647 secondary antibody (**A, C, D, F**). EL, Epithelial cell layer; PL, Particle layer; BL, Basal cell layer. 52

Figure 7: **A**: Powder yield for encapsulation of monoclonal antibodies (mAb), small molecules (Small Mol) and non-loaded particles (No API), impact of spray drying inlet temperature (100 °C, 160 °C). **B**: Particle yield at 160 °C inlet temperature, effect of chitosan properties (degree of deacetylation (DD) & molecular weight (MW)). **C**: Comparison of initial residual moisture (RM) after production with respect to encapsulated active ingredient (mAb, Small Mol, and No API) and temperature (100 °C, 160 °C). **D**: Initial RM of non-loaded particles, impact of chitosan properties (DD, MW). **E**: Influence of temperature (100 °C, 160 °C) on initial RM and RM after seven days storage in refrigerator at 4 °C and 26±1 % relative humidity (RH), exemplified for particles containing 5 wt% biotin (Small Mol). **F**: Influence of mAb loading concentration on initial RM, RM after seven days of storage at room temperature (RT) and 19±1 % RH, after five weeks at RT and 19±1 % RH, and after five weeks at 4 °C and 26±1 % RH. (n ≥ 3). 74

Figure 8: Scanning Electron Microscopy images of dry powder samples at magnification 5000x. **A-G**: Spray-dried particles of 80 % deacetylated (DD80) chitosan with a molecular weight (MW) of 150-300 kDa prepared at spray drying inlet temperatures of 160 °C or 100 °C without an active pharmaceutical ingredient (API) (**E, G**), with 5 wt% encapsulated biotin (**A, B**), 5 wt% encapsulated monoclonal antibody ocrelizumab (**C, D**), or 15 wt% encapsulated ocrelizumab (**F**). **H-L**: Spray-dried chitosan particles prepared at 160 °C consisting of DD80 chitosan with a MW of 20-100 kDa (**H**), or DD95 chitosans with MWs 150-300 kDa (**I**), 20-100 kDa (**J**), 200-400 kDa (**K**), and 200-500 kDa (**L**). 79

Figure 9: Numeric (**A**) and Volumetric (**B-D**) particle size distributions of particles spray dried at 100 °C or 160 °C inlet temperature determined via static light scattering. **A**: Comparison of different active pharmaceutical ingredients (API) (No API, Small Molecule, 5 wt% monoclonal antibody (mAb), 15 wt% mAb) and different chitosan derivatives. **B**: Comparison of 80 % deacetylated (DD80) and DD95 derivatives with molecular weights of 20-100 kDa and 150-300 kDa. **C**: Effect of temperature (100 °C vs. 160 °C) on particle size distribution. **D**: Comparison of mAb loading concentration (5 wt% vs. 15 wt%) and batch size scaling (300 mg vs. 2500 mg), exemplified for particles produced at 100 °C. 81

Figure 10: **A**: Influence of the utilized chitosan derivative at 160 °C spray drying inlet temperature on the encapsulation of biotin. Comparison of 80% deacetylated (DD80) chitosan with a molecular weight (MW) of 150-300 kDa to DD95 derivatives with MWs of 200-400 kDa and 200-500 kDa (n=3). **B**: Encapsulation efficiency of ocrelizumab (monoclonal antibody, mAb) in DD80 chitosan with a MW of 150-300 kDa. Comparison of total amount (micro-bicinchoninic acid (BCA) assay) and mean remaining binding capacity determined via sandwich ELISA (enzyme linked immunosorbent assay; "Structurally Intact"), as well as for 5 wt% and 20 wt%, respectively (n=3). **C**: Influence of spray drying temperature on the encapsulation of 5 wt% biotin and ocrelizumab (mAb; ELISA) (n=3). **D**: Influence of spray drying process batch size on the encapsulation of mAbs (≤ 160 °C, ≤ 15 wt%), 170 mg (small), 400 mg (medium) to 2500 mg (big) lab scale (n=3). **E**: Intrinsic fluorescence spectrum of ocrelizumab released from chitosan particles in comparison to pure chitosan and denaturated ocrelizumab. **F**: Intrinsic fluorescence spectrum of pure ocrelizumab and ocrelizumab-chitosan particles in comparison to denaturated ocrelizumab. **G**: Circular Dichroism spectrum of ocrelizumab in comparison to pure

chitosan and ocrelizumab together with chitosan. **H**: Second derivative of Fourier-transform Infrared Spectrum of the amide-I band of ocrelizumab (mAb) encapsulated in chitosan (DD80, 150-300 kDa) and non-loaded spray-dried chitosan particles (DD80, 150-300 kDa; no API). 84

Figure 11: **A**: Comparison of biotin release kinetics from different chitosan derivatives (80 % deacetylated chitosan (DD80) with a molecular weight (MW) of 150-300 kDa, DD95 chitosans with MW of 200-400 kDa and 200-500 kDa), and DD80 150-300 kDa chitosan produced at spray drying inlet temperature T_{in} 160 °C or 100 °C. **B**: Release kinetics of ocrelizumab (mAb) from spray-dried particles consisting of DD80 chitosan with a MW of 150-300 kDa in the initial 48 h, comparison of data quantified via micro-bicinchoninic (BCA) assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **C**: Release kinetic of ocrelizumab over 360 h. **D**: Diffusion kinetics of pure active pharmaceutical ingredients (APIs) as reference for dissolution setting. **E**: Diffusion coefficients of biotin and ocrelizumab (mAb) calculated for the dissolution test setting (membrane adapters) and during release from spray-dried particles, respectively. **F**: Release kinetic of 15 wt% ocrelizumab loaded chitosan particles fitted to the Korsmeyer-Peppas model approach with constants $K = 2.11$ and $n = 0.65$ 88

Figure 12: **(a)** Representative image of droplet analysis determining the contact angle (CA; θ), as well as the droplet base radius (r) and droplet height (h) using two image analysis software. **(b)** Schematic representation of pendant drop measurements (r_1 , r_2 , and h) for the determination of the surface tension of HA and HA-Tyr solutions. **(c)** Schematic dynamic droplet deformation and spreading of a liquid droplet deposited on a partially wettable substrate. 105

Figure 13: Comparison of fresh ex vivo porcine nasal mucosa (PNM) and artificial mucin-agarose mucosa analogs (MA) under laboratory conditions (21.5 °C and 50 % humidity). **(a)** Measured adhesiveness of a hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) film on PNM and MA substrates of different compositions (2.5 wt% or 5 wt% mucin). The indicated adhesiveness is the average value of four measurements ($n = 4$; t-test, $***p < 0.001$); **(b)** Average values of surface roughness S_a [μm] of PNM and MA substrates ($N = 4$); **(c)** 10203 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ laser-scanning image, height profile, and reconstructed 3D image of PNM. **(d)** 10236 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ laser-scanning image, height profile, and reconstructed 3D image of MA substrate (5 wt% M, 1 wt% A). High quality images of the scanned areas were acquired with a 10x magnification and a resolution of 5 μm in the z-axis. **(e)** Quantified color areas in percent of height profiles of PNM and MA substrate ($n = 3$). 112

Figure 14: **(a)** Dependence of solution viscosity η on hyaluronate (HA) concentration c . The experimental viscosity results are the average values of three experiments ($n = 3$). **(b)** Reduced viscosity η_{red} in terms of HA concentration c . [η]: Intrinsic viscosity of HA; k_H : Huggins coefficient. 114

Figure 15: Effect of the hyaluronate (HA) concentration (1260 kDa, PBS, pH 7.4) on the dynamic evolution of droplet spreading on **(a)** a standard glass slide (GS) and **(b)** an artificial mucosa substrate (MA; 5 wt% mucin, 1 wt% agarose). **(c-f)** Comparison of experimental measurements (discrete dots) with the predictions obtained from the developed theoretical model (continuous and dotted lines). The Spearman correlation coefficient r_s is 1.00 in all cases **(c-f)**. Dynamic evolution of the aspect ratio z **(c)** and the contact angle θ **(d)** for different HA concentrations (10, 20, and 30 mg mL^{-1}) on MA in laboratory environment (L; at 21.5 °C and 50 % humidity). Effect of substrate and environmental conditions on the dynamic evolution of z **(e)** and θ **(f)** for HA (10 mg mL^{-1}) on GS or MA substrate in L or in climate chamber (CC; ca. 34 °C and 90 % humidity) environment. The reported experimental results are the average values of four measurements ($n = 4$). 115

Figure 16: Comparison of predictions obtained from the developed theoretical model (continuous and dotted lines) with experimental measurements (discrete dots). The Spearman correlation coefficient r_s indicates their correlation. Dynamic evolution of **(a)** the aspect ratio z and **(b)** the contact angle θ for a tyramine-modified hyaluronic acid (HA-Tyr) (240-360 kDa, CLXII

DS 2-3 %, 10 mg mL^{-1} in NaCl solution (9 mg mL^{-1})) on a mucosa analog (MA; 5 wt% mucin, 1 wt% agarose), in a climatic chamber (CC; ca. 34 °C and 90 % humidity) and in laboratory environment (L; 21.5 °C and 50 % humidity), as well as on olfactory porcine nasal mucosa (PNM) explants in L environment (N = 3). Dynamic evolution of z (**c**) and θ (**d**) of HA-Tyr (10 mg mL^{-1}) on MA in L environment in sessile and pendant droplet configuration. The reported experimental results are the average values of three measurements (n = 3). 119

Supplementary Figure S1: Spray dried nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of 1/3 PLGA nanoparticles (520 nm) and 2/3 chitosan by weight. **(A)** 3D projection of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images (green: chitosan; red: PLGA) stitched together from a z-stack, mag. 630 X, external view. **(B)** Transparent 3D projection of CLSM images (green: chitosan; red: PLGA) stitched together from a z-stack, mag. 630 X, internal view. 59

Supplementary Figure S2: Thickness of porcine olfactory mucosa explants after permeation experiment fixed and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) staining. Thickness differs not significantly between individual samples (n=3). Statistical analysis was performed with Shapiro-Wilk normality test, One-Way-ANOVA with Levene's variance test and Bonferoni posthoc test at a significance niveau of $p < 0.05$ respectively. 59

Supplementary Figure S3: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan applied to the apical side of porcine olfactory mucosa. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Red arrows mark particles. Chitosan labeled with fluorescein (green). Overlapping signals of red (nanoparticles) and green (chitosan) appear yellow. Image taken 15 min after application. EL: Epithelial cell layer; PL: Particle layer; BL: Basal cell layer. 60

Supplementary Figure S4: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan. Images taken 15 min after application. **(A)** Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) image stitched together from a z-stack; Cell nuclei stained with DAPI (blue), red arrows mark single particles. **(B)** Light Microscopy (LM) image; Hematoxylin-Eosin (HE) staining. 60

Supplementary Figure S5: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan applied to the apical side of porcine olfactory mucosa. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images stitched together from a z-stack. Cell nuclei stained with DAPI (blue). Red arrows mark particles; Chitosan unlabeled; Image taken 2 h after application. EL: Epithelial cell layer; PL: Particle layer; BL: Basal cell layer. 61

Supplementary Figure S6: Permeation of nano-in-micro particles (NiMPs) consisting of PLGA nanoparticles (520 nm; red) encapsulated in chitosan applied to the apical side of porcine olfactory mucosa. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images. **(A)** Cell nuclei stained with DAPI (blue). Chitosan unlabeled, image taken 30 min after application. **(B)** NiMPs 15 min after application to the apical side, PLGA nanoparticles (red) belonging to Figure 4F original manuscript. **(C)** PLGA nanoparticles (red) 15 min after application to the apical side belonging to Figure 4A original manuscript. EL: Epithelial cell layer; PL: Particle layer; BL: Basal cell layer. 61

Supplementary Figure S7: First derivative of the heatflux determined via differential scanning calorimetry (DSC) for non-loaded chitosan-particles and ocrelizumab containing particles, as well as ocrelizumab-particles after 5 weeks of storage at room temperature and 19 ± 1 % relative humidity; the glass transition temperature T_g is displayed as maximum, respectively. 95

Supplementary Figure S8: Preparation of mucosa analogs (MAs) in Petri dishes by pouring **(a)** for detachment force measurements and on glass slides (GS) with gene frames by pipetting **(b)** for roughness and contact angle measurements. 124

Supplementary Figure S9: **(a)** Schematic partial wetting of a sodium hyaluronate (HA) aqueous solution droplet on a substrate; γ_{sv} : substrate surface tension, γ_{lv} : liquid surface tension, γ_{sl} : substrate liquid interfacial tension, θ_{eq} : equilibrium contact angle, g : gravitational acceleration constant. **(b)** Wetting regimes and contact angles θ of a liquid droplet deposited on a substrate. Depending on the numerical value of θ_{eq} , a solid surface can be characterized as (i) completely wettable surface ($\theta_{eq} = 0$, i.e., $\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv}$), the liquid is perfectly spread over the substrate; (ii) partially wettable surface ($0^\circ < \theta_{eq} < 90^\circ$, i.e., $\gamma_{sv} > \gamma_{sl}$), the liquid is partially spread over the substrate; (iii) non-wettable surface ($90^\circ < \theta_{eq} < 180^\circ$, i.e., $\gamma_{sv} < \gamma_{sl}$), non-wetting liquid conditions; (iv) perfectly non-wettable surface ($\theta_{eq} = 180^\circ$) (Yuan and Lee 2013)..... 124

Supplementary Figure S10: Experimental results (discrete dots) and prediction obtained from the developed theoretical model (continuous and dotted lines) of the aspect ratio z and the contact angle θ in laboratory (L; 21.5 °C and 50 % humidity) and climate chamber (CC; 34 °C and 90 % humidity) environment over time. The Spearman correlation coefficient r_s indicates their correlation. **(a, b)** Hyaluronate (HA) solutions droplet spreading with concentrations 10, 20, and 30 mg mL⁻¹ (1260 kDa, in PBS, pH 7.4) on standard glass slides (GS). **(c, d)** HA solution (20 mg mL⁻¹) on GS or mucosa analog (MA; 5 wt% mucin, 1 wt% agarose). **(e, f)**: HA solution (30 mg mL⁻¹) on GS or MA. The reported experimental results are the average values of three measurements (n=3)..... 125

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zuordnung des Freisetzungsexponenten n des Korsmeyer-Peppas Modells für die Beschreibung von Wirkstofffreisetzungen aus Drug Delivery Systemen. Die Einteilung erfolgt entsprechend der Geometrie des untersuchten Drug Delivery Systems und dem stattfindenden molekularen Mechanismus der Wirkstofffreisetzung (verändert nach (Bruschi 2015)). 18

Tabelle 2: Nicht direkt einstellbare Parameter des Sprühtrocknungsprozesses (Austrittstemperatur, Partikelgröße, Restfeuchtigkeit des Produkts, Partikelausbeute) in Abhängigkeit der einstellbaren Parameter (Eintrittstemperatur, Trocknungsgasstrom, Pumprate des Sprühtrocknungsfluids, Konzentration des Sprühtrocknungsfluids). Dargestellt ist der Einfluss für maximal hohe einstellbare Parameter, wobei (-) kein Einfluss, (↑) geringe Zunahme, (↑↑) mittlere Zunahme und (↑↑↑) große Zunahme der nicht einstellbaren Parameter bedeutet (verändert nach (Büchi 1997)). 20

Table 1: Characteristic parameters of nano-in-micro particles (NiMPs) obtained from static light scattering measurements. $d(0.5)$ value represents the diameter of 50 % of the particle population. The Polydispersity index (Pdl) characterizes the homogeneity of the particle population; 1 min ultrasonic treatment (US). 43

Table 2: Size- and time-dependent uptake, as well as co-localization with sub structures in the olfactory mucosa, of PLGA nanoparticles (suspension) and spray dried nano-in-micro particles (NiMPs) (powder) consisting of 520 nm PLGA particles embedded in chitosan. 5 min, 10 min, or 15 min after particle application to the apical side and incubation at physiological conditions of the nasal cavity (35 °C, 90 % humidity). (+) rarely, (++) intermediately, (+++) often particles observed, or (-) no particles observed. Examined samples: PLGA nanoparticles ($n = 3$), respectively; NiMPs ($n6$). Quantitative comparison only applicable for PLGA nanoparticles among each other and NiMPs separately due to different applied particle amounts (suspension versus powder). 47

Table 3: Quantitative loading of active pharmaceutical ingredients achieved by spray drying in chitosan with 80 % deacetylated residues and a molecular weight of 150-300 kDa. Remaining salt content from phosphate buffered saline supplemented with Tween 20 and additionally contained trehalose. 83

Table 4: Amide-I band corresponding wavenumbers [cm^{-1}] reported for IgG molecules determined via Fourier-transform Infrared (FT-IR) spectroscopy. 86

Table 5: Comparison of the experimentally measured and calculated droplet volumes. Hyaluronate (HA) solutions of different concentrations (10 mg mL^{-1} , 20 mg mL^{-1} , and 30 mg mL^{-1}) deposited on standard glass slides (GS) and artificial mucosa (MA; 5 wt% mucin and 1 wt% agarose) under different conditions (laboratory environment (L) at 21.5 °C and 50 % humidity, climatic chamber (CC) at 34 °C and 90 % humidity). The reported results are the average values of three experiments ($n = 3$). Calculated values of HA and hyaluronate tyramine (HA-Tyr) solution viscosities η and surface tensions γ_{lv} . n.d.: not determined. 113

Table 6: Apparent contact angle (θ_w), work of adhesion (W_a), interaction parameter (Φ), interfacial tension (γ_{sl}), and equilibrium spreading coefficient (S_{eq}) of three hyaluronate (HA) solutions with concentrations (c) of 10 mg mL^{-1} , 20 mg mL^{-1} , and 30 mg mL^{-1} on standard glass slides (GS) and artificial mucosa analogs (MA; 5 wt% mucin and 1 wt% agarose), measured in laboratory environment (L) at 21.5 °C and 50 % humidity as well as in a climatic chamber (CC) at 34 °C and 90 % humidity. The reported experimental results are the average values of four measurements ($n = 4$). 117

Table 7: Apparent contact angle (θ_w), work of adhesion (W_a), interaction parameter (Φ), interfacial tension (γ_{sl}), and equilibrium spreading coefficient (S_{eq}) of tyramine-modified

hyaluronate (HA-Tyr) solutions with concentration of 10 mg mL^{-1} in sessile or pendant droplet configuration, on mucosa analogs (MA; 5 wt% mucin and 1 wt% agarose) and olfactory porcine nasal mucosa (PNM) explants measured in laboratory environment (L) at $21.5 \text{ }^\circ\text{C}$ and 50 % humidity, as well as in a climatic chamber (CC) at $34 \text{ }^\circ\text{C}$ and 90 % humidity. The reported experimental results are the average values of three measurements ($N = 3, n = 3$). 120

IV. Literaturverzeichnis

- Abanses, J. C., Arima, S., & Rubin, B. K. (2009). Vicks VapoRub Induces Mucin Secretion, Decreases Ciliary Beat Frequency, and Increases Tracheal Mucus Transport in the Ferret Trachea. *CHEST*, 135(1), 143-148.
- Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L., & Brun, P. (2020). Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*, 9(7), 1743.
- Akerlof, G. (1932). Dielectric Constants of Some Organic Solvent-Water Mixtures at Various Temperatures. *Journal of the American Chemical Society*, 54(11), 4125-4139.
- Al-Ghananeem, A. M., Saeed, H., Florence, R., Yokel, R. A., & Malkawi, A. H. (2010). Intranasal drug delivery of didanosine-loaded chitosan nanoparticles for brain targeting; an attractive route against infections caused by AIDS viruses. *Journal of Drug Targeting*, 18(5), 381-388.
- Alexopoulos, A. H., & Kiparissides, C. (2018). A Computational Model for the Analysis of Spreading of Viscoelastic Droplets over Flat Surfaces. *Fluids*, 3(4), 78.
- Anderson, J. M., Rodriguez, A., & Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*, 20(2), 86-100.
- Anderson, J. M., Stevenson, B. R., Jesaitis, L. A., Goodenough, D. A., & Mooseker, M. S. (1988). Characterization of ZO-1, a Protein Component of the Tight Junction from Mouse Liver and Madin-Darby Canine Kidney Cells. *The Journal of cell biology*, 106, 1141-1149.
- Aspden, T. J., Adler, J., Davis, S. S., Skaugrud, O., & Ilium, L. (1995). Chitosan as a nasal delivery system: Evaluation of the effect of chitosan on mucociliary clearance rate in the frog palate model. *Int J Pharm*, 122(1-2), 69-78.
- Aspden, T. J., Mason, J. D. T., Jones, N. S., Lowe, J., Skaugrud, Ø., & Ilium, L. (1997). Chitosan as a Nasal Delivery System: The Effect of Chitosan Solutions on in Vitro and in Vivo Mucociliary Transport Rates in Human Turbinates and Volunteers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(4), 509-513.
- Aya, K. L., & Stern, R. (2014). Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. *Wound Repair Regen*, 22(5), 579-593.
- Backer, M., Metzger, L., Slaber, P., Nevitt, K., & Boder, G. (1988). Large-scale production of monoclonal antibodies in suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(8), 993-1000.
- Balabanov, R., Washington, R., Wagnerova, J., & Dore-Duffy, P. (1996). CNS Microvascular Pericytes Express Macrophage-like Function, Cell Surface Integrin α M, and Macrophage Marker ED-21. *Microvascular Research*, 52, 127-142.
- Balazs, E. A. (2004). Viscosupplementation for treatment of osteoarthritis: from initial discovery to current status and results. *Surgical technology international*, 12, 278-289.
- Baldino, L., Cardea, S., & Reverchon, E. (2019). Supercritical Assisted Electrospray: An Improved Micronization Process. *Polymers (Basel)*, 11(2).
- Baldino, L., Cardea, S., & Reverchon, E. (2019). A supercritical CO₂ assisted electrohydrodynamic process used to produce microparticles and microfibers of a model polymer. *Journal of CO₂ Utilization*, 33, 532-540.
- Begley, D. J. (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & Therapeutics*, 104(1), 29-45.
- Bianco-Peled, H., & Davidovich-Pinhas, M. (2015). *Bioadhesion and biomimetics: from nature to applications*: CRC Press.
- Bico, J., Tordeux, C., & Quéré, D. (2001). Rough wetting. *Europhysics Letters*, 55(2), 214.
- Bonn, D., Eggers, J., Indekeu, J., Meunier, J., & Rolley, E. (2009). Wetting and spreading. *Reviews of Modern Physics*, 81(2), 739-805.
- Bormashenko, E. Y. (2018). *Wetting of Real Surfaces*: De Gruyter.
- Bourganis, V., Kammona, O., Alexopoulos, A., & Kiparissides, C. (2018a). Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*, 128, 337-362.

- Bourganis, V., Kammona, O., Alexopoulos, A., & Kiparissides, C. (2018b). Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 128, 337-362.
- Bowen, M., Turok, R., & Maa, Y.-F. (2013). Spray Drying of Monoclonal Antibodies: Investigating Powder-Based Biologic Drug Substance Bulk Storage. *Drying Technology*, 31(13-14), 1441-1450.
- Brannon-Peppas, L., & Vert, M. (2000). Polylactic and polyglycolic acids as drug delivery carriers. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*, 99-130.
- Breuer, E., Chorghade, M. S., Fischer, J., & Golomb, G. (2009). Glossary of terms related to pharmaceuticals (IUPAC Recommendations 2009). *Pure and Applied Chemistry*, 81(5), 971-999.
- Bruschi. (2015). *Mathematical models of drug release*. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 63-86)
- Büchi. (1997). Schulungsunterlagen Sprühtrocknung. CH-9230 Flawil: Büchi Labortechnik AG.
- Bunge, M. B., Bunge, R. P., & Ris, H. (1961). Ultrastructural Study of Remyelination in an Experimental Lesion in Adult Cat Spinal Cord. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 10, 29.
- Chang, S.-H., Lin, Y.-Y., Wu, G.-J., Huang, C.-H., & Tsai, G. J. (2019). Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW 264.7 macrophage model. *Int J Biol Macromol*, 131, 167-175.
- Charlton, S. T., Davis, S. S., & Illum, L. (2007). Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: In vitro characterisation studies. *Journal of Controlled Release*, 118(2), 225-234.
- Chaturvedi, M., Kumar, M., & Pathak, K. (2011). A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(4), 215-222.
- Chen, L., & Bonaccorso, E. (2014). Effects of surface wettability and liquid viscosity on the dynamic wetting of individual drops. *Physical Review E*, 90(2), 022401.
- Cheng, L., Bao, S., & Rich, J. N. (2010). Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochemical pharmacology*, 80(5), 654-665.
- Clayton, K. N., Salameh, J. W., Wereley, S. T., & Kinzer-Ursem, T. L. (2016). Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics*, 10(5), 054107.
- Comi, G., Bar-Or, A., Lassmann, H., Uccelli, A., Hartung, H. P., Montalban, X., . . . Expert Panel of the 27th Annual Meeting of the European Charcot, F. (2021). Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann Neurol*, 89(1), 13-23.
- Costantino, H. R., Andya, J. D., Nguyen, P.-A., Dasovich, N., Sweeney, T. D., Shire, S. J., . . . Maa, Y.-F. (1998). Effect of Mannitol Crystallization on the Stability and Aerosol Performance of a Spray-Dried Pharmaceutical Protein, Recombinant Humanized Anti-IgE Monoclonal Antibody. *Pharmaceutical Research and Development*, 87, 1406-1411.
- Costantino, H. R., Andya, J. D., Shire, S. J., & Hsu, C. C. (1997). Fourier-transform infrared spectroscopic analysis of the secondary structure of recombinant humanized immunoglobulin G. *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 3(3), 121-128.
- Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G., & Hsu, W. H. (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, 195, 44-52.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Préat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 505-522.
- Dani, B., Platz, R., & Tzannis, S. T. (2007). High concentration formulation feasibility of human immunoglobulin G for subcutaneous administration. *J Pharm Sci*, 96(6), 1504-1517.
- Davies, J. R., Svitacheva, N., Lannefors, L., Kornfa, R., & Carlstedt, I. (1999). Identification of MUC5B, MUC5AC and small amounts of MUC2 mucins in cystic fibrosis airway secretions. *Biochemical Journal*, 344, 321-330.

- Davis, S., Cirone, A. M., Menzie, J., Russell, F., Dorey, C. K., Shibata, Y., . . . Nan, C. (2018). Phagocytosis-mediated M1 activation by chitin but not by chitosan. *Am J Physiol Cell Physiol*, 315(1), C62-C72.
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545-558.
- Destatis. (2017). Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Diagnosen, Prozeduren, Fallpauschalen und Case Mix der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern. (Vol. 12). Stuttgart: Statistisches Bundesamt.
- DGN. (2016). *Idiopathisches Parkinson-Syndrom*. Berlin: Deutsche Gesellschaft für Neurologie DGN.
- DGN. (2018). Patientenaufklärung zur Behandlung mit Ocrevus®. Kompetenznetz Multiple Sklerose.
- DGN. (2021a). Monoklonale Antikörper gegen Alzheimer-Demenz. In D. B. Albers (Ed.). Berlin: Deutsche Gesellschaft für Neurologie DGN.
- DGN. (2021b). Patientenaufklärung zur Behandlung mit Kesimpta®. Kompetenznetz Multiple Sklerose.
- Diaz, R. J., Ali, S., Qadir, M. G., De La Fuente, M. I., Ivan, M. E., & Komotar, R. J. (2017). The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol*, 133(3), 455-467.
- Dicker, K. T., Gurski, L. A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R. L., Farach-Carson, M. C., & Jia, X. (2014). Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater*, 10(4), 1558-1570.
- Djupesland, P. G., & Skretting, A. (2012). Nasal deposition and clearance in man: comparison of a bidirectional powder device and a traditional liquid spray pump. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 25(5), 280-289.
- Dodane, V., Khan, M. A., & Merwin, J. R. (1999). Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm*, 182, 21-32.
- Dong, Y., Ruan, Y., Wang, H., Zhao, Y., & Bi, D. (2004). Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1553-1558.
- Donnelly, P. E., Chen, T., Finch, A., Brial, C., Maher, S. A., & Torzilli, P. A. (2017). Photocrosslinked tyramine-substituted hyaluronate hydrogels with tunable mechanical properties improve immediate tissue-hydrogel interfacial strength in articular cartilage. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28(6), 582-600.
- Doty, R. L. (2015). *Handbook of Olfaction and Gustation*. New Jersey, United States: John Wiley & Sons.
- Duchêne, D., Touchard, F., & Peppas, N. A. (1988). Pharmaceutical and Medical Aspects of Bioadhesive Systems for Drug Administration. *Drug Dev Ind Pharm*, 14(2-3), 283-318.
- Duddu, S. P., & Dal Monte, P. R. (1997). Effect of glass transition temperature on the stability of lyophilized formulations containing a chimeric therapeutic monoclonal antibody. *Pharmaceutical Research*, 14(5), 591-595.
- Elger, C. E., & Berkenfeld, R. (2017). *Erster epileptischer Anfall und Epilepsien im Erwachsenenalter*. Berlin: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN).
- Elnaggar, Y. S., Etman, S. M., Abdelmonsif, D. A., & Abdallah, O. Y. (2015). Intranasal piperine-loaded chitosan nanoparticles as brain-targeted therapy in Alzheimer's disease: optimization, biological efficacy, and potential toxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(10), 3544-3556.
- England, R. J., Homer, J. J., Knight, L. C., & Ell, S. R. (1999). Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clinical otolaryngology and allied sciences*, 24(1), 67-68.
- England, R. J. A., Homer, J. J., Knight, L. C., & Ell, S. R. (1999). Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 24(1), 67-68.
- Estevinho, B. N., Carlan, I., Blaga, A., & Rocha, F. (2016). Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. *Powder Technology*, 289, 71-78.

- EU. (2010). Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. *Amtsblatt der Europäischen Union*, 276, 33-79.
- Fara, P. (2000). Niccolò Guicciardini, Reading the Principia: The Debate on Newton's Mathematical Methods for Natural Philosophy from 1687 to 1736. Cambridge: Cambridge University Press, 1999, cloth £50.00. ISBN: 0 521 64066 0. *The British Journal for the Philosophy of Science*, 51(4), 935-939.
- Fazil, M., Md, S., Haque, S., Kumar, M., Baboota, S., Sahni, J. K., & Ali, J. (2012). Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *Eur J Pharm Sci*, 47(1), 6-15.
- FDA. (2017). First Approval for Indication Breakthrough Review BLA 761053 Ocrelizumab. In S. B. Kennett (Ed.), *Executive Summary Addendum* (Vol. Review 02, p. 81): U. S. Food and Drug Administration.
- Feng, F., Liu, Y., Zhao, B., & Hu, K. (2012). Characterization of half N-acetylated chitosan powders and films. *Procedia Engineering*, 27, 718-732.
- Flamm, J., Hartung, S., Gänger, S., Maigler, F., Pitzer, C., & Schindowski, K. (2022). Establishment of an Olfactory Region-specific Intranasal Delivery Technique in Mice to Target the Central Nervous System. *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., & Axelsson, A. (2011). The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int J Pharm*, 415(1-2), 34-52.
- Frolova, L., Drastich, P., Rossmann, P., Klimesova, K., & Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem*, 56(3), 267-274.
- Fu, F.-N., Deoliveira, D. B., Trumble, W. R., Sarkar, H. K., & Singh, B. R. (1994). Secondary Structure Estimation of Proteins Using the Amide III Region of Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Application to Analyze Calcium-Binding-Induced Structural Changes in Calsequestrin. *Applied Spectroscopy*, 48(11), 1432-1441.
- Funda, D. P., Tuckova, L., Farre, M. A., Iwase, T., Moro, I., & Tlaskalova-Hogenova, H. (2001). CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro: lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infect Immun*, 69(6), 3772-3781.
- Gagnon, P., Nian, R., Leong, D., & Hoi, A. (2015). Transient conformational modification of immunoglobulin G during purification by protein A affinity chromatography. *J Chromatogr A*, 1395, 136-142.
- Ganger, S., & Schindowski, K. (2018). Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*, 10(3).
- Gänger, S., & Schindowski, K. (2018). Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*, 10(3), 116.
- Gao, X., Wu, B., Zhang, Q., Chen, J., Zhu, J., Zhang, W., . . . Jiang, X. (2007). Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration. *J Control Release*, 121(3), 156-167.
- Garcia-Fuentes, M., & Alonso, M. J. (2012). Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *J Control Release*, 161(2), 496-504.
- George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *J Control Release*, 114(1), 1-14.
- Getty, R. (1975). *Sisson and Grossman's: The Anatomy of the Domestic Animals*. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Gibiansky, E., Petry, C., Mercier, F., Gunther, A., Herman, A., Kappos, L., . . . Kletzl, H. (2021). Ocrelizumab in relapsing and primary progressive multiple sclerosis: Pharmacokinetic and

- pharmacodynamic analyses of OPERA I, OPERA II and ORATORIO. *Br J Clin Pharmacol*, 87(6), 2511-2520.
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M. J. C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., . . . Prinz, M. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature Immunology*, 17(7), 797-805.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7), 330-347.
- Graf, J., Albrecht, P., Goebels, N., Aktas, O., & Hartung, H. P. (2020). Ocrelizumab for treatment of multiple sclerosis. *Nervenarzt*, 91(8), 722-734.
- Greenfield, A. L., & Hauser, S. L. (2018). B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. *Ann Neurol*, 83(1), 13-26.
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 1(6), 2876-2890.
- Gregoritza, M., Goepferich, A. M., & Brandl, F. P. (2016). Polyanions effectively prevent protein conjugation and activity loss during hydrogel cross-linking. *J Control Release*, 238, 92-102.
- Grifalco, L., & Good, R. (1957). A theory for the estimation of surface and interfacial energies. *J Phys. Chem*, 61(13), 904-909.
- Hansson, G. C. (2012). Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 57-62.
- Härth, M., & Schubert, D. W. (2012). Simple Approach for Spreading Dynamics of Polymeric Fluids. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 213(6), 654-665.
- Hartland, S. (2004). *Surface and interfacial tension: measurement, theory, and applications*: CRC Press.
- He, P., Davis, S. S., & Illum, L. (1999a). Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int J Pharm*, 187, 53-65.
- He, P., Davis, S. S., & Illum, L. (1999b). Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int J Pharm*(187), 53-65.
- Hede, P. D., Bach, P., & Jensen, A. D. (2008). Two-fluid spray atomisation and pneumatic nozzles for fluid bed coating/agglomeration purposes: A review. *Chemical Engineering Science*, 63(14), 3821-3842.
- Hemmer, B. (2021). *Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-opticaSpektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen*. Berlin: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN).
- Henriksen, I., Green, K. L., Smart, J. D., Smista, G., & Karlsen, J. (1996). Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, 145, 231-240.
- Heppe. (2020). Aktuelle klinische Studien mit Chitosan. In H. M. C. GmbH (Ed.). Halle (Saale).
- Herman, I. M., & D'Amore, P. A. (1985). Microvascular Pericytes Contain Muscle and Nonmuscle Actins. *The Journal of cell biology*, 101, 43-52.
- Hickey, W. F., & Kimura, H. (1988). Perivascular Microglial Cells of the CNS Are Bone Marrow-Derived and Present Antigen in Vivo. *Science*, 239(4837).
- Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(12), 1145-1149.
- Howarth, A. G., Hughes, M. R., & Stevenson, B. R. (1992). Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 262(2), C461-C469.
- Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2-3), 121-136.
- Huggins, M. L. (1943). Molecular Weights of High Polymers. *Industrial & Engineering Chemistry*, 35(9), 980-986.

- Hughes, J. M., Budd, P. M., Tiede, K., & Lewis, J. (2015). Polymerized high internal phase emulsion monoliths for the chromatographic separation of engineered nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(1).
- Hugli, H., & Gonzalez, J. (2000). *Drop volume measurements by vision*: SPIE.
- Huhtamäki, T., Tian, X., Korhonen, J. T., & Ras, R. H. A. (2018). Surface-wetting characterization using contact-angle measurements. *Nature Protocols*, 13(7), 1521-1538.
- Illum, L. (1998). Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharmaceutical Research*, 15, 1326–1331.
- Illum, L. (2000). Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 1-18.
- Ingelstedt, S., & Ivstam, B. (1951). Study in the Humidifying Capacity of the Nose. *Acta Oto-Laryngologica*, 39(4), 286-290.
- ISO. (2017). Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS). 22412 (Vol. 02, p. 44). Geneva, Switzerland: International Standard.
- Itoh, M., Yonemura, S., Nagafuchi, A., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1991). A220-kD Undercoat-constitutive Protein: Its Specific Localization at Cadherin-based Cell-Cell Adhesion Sites. *The Journal of cell biology*, 111(5), 1449-1462.
- IUPAC. (1992). Glossary for Chemists of terms used in Biotechnology. In B. Nagel, H. Dellweg & L. M. Gierasch (Eds.), (Vol. 64, pp. 143-168). Great Britain: International Union of Pure and Applied Chemistry.
- Janssen, M., Mihov, G., Welting, T., Thies, J., & Emans, P. (2014). Drugs and Polymers for Delivery Systems in OA Joints: Clinical Needs and Opportunities. *Polymers (Basel)*, 6(3), 799–819.
- Jaworek, A., & Sobczyk, A. T. (2008). Electro spraying route to nanotechnology: An overview. *Journal of Electrostatics*, 66(3-4), 197-219.
- Jeong, J. H., Joo, N. S., Hwang, P. H., & Wine, J. J. (2014). Mucociliary clearance and submucosal gland secretion in the ex vivo ferret trachea. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307(1), L83-93.
- Jiménez-castellanos, M. R., Zia, H., & Rhodes, C. T. (1993). Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 19(1-2), 143-194.
- Johanson, C. E. (1980). Permeability and vascularity of the developing brain: cerebellum vs cerebral cortex. *Brain Res*, 190(1), 3-16.
- Kabza, K. G., Gestwicki, J. E., & McGrath, J. L. (2000). Contact angle goniometry as a tool for surface tension measurements of solids, using zisman plot method. A physical chemistry experiment. *Journal of Chemical Education*, 77(1), 63.
- Kaliner, M., Shelhamer, J. H., Borson, B., Nadel, J., Patow, C., & Marom, Z. (1986). Human Respiratory Mucus. *American Review of Respiratory Disease*, 134(3), 612-621.
- Karnezis, T. T., & Davidson, T. M. (2012). Treatment of hereditary hemorrhagic telangiectasia with submucosal and topical bevacizumab therapy. *The Laryngoscope*, 122(3), 495-497.
- Kašpar, O., Tokárová, V., Nyanhongo, G. S., Gübitz, G., & Štěpánek, F. (2013). Effect of cross-linking method on the activity of spray-dried chitosan microparticles with immobilized laccase. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 525-533.
- Katzhendler, I., Hoffman, A., Goldberger, A., & Friedman, M. (1997). Modeling of drug release from erodible tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(1), 110-115.
- Kaur, H. (2021). Stability testing in monoclonal antibodies. *Crit Rev Biotechnol*, 41(5), 692-714.
- Keck, T., Leiacker, R., Riechelmann, H., & Rettinger, G. (2000). Temperature Profile in the Nasal Cavity. *The Laryngoscope*, 110(4), 651-654.
- Keller, L. A., Merkel, O., & Popp, A. (2021). Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development. *Drug Deliv Transl Res*.
- Kirchhof, S., Abrami, M., Messmann, V., Hammer, N., Goepferich, A. M., Grassi, M., & Brandl, F. P. (2015). Diels-Alder Hydrogels for Controlled Antibody Release: Correlation between Mesh Size and Release Rate. *Mol Pharm*, 12(9), 3358-3368.

- Kirchhof, S., Gregoritzka, M., Messmann, V., Hammer, N., Goepferich, A. M., & Brandl, F. P. (2015). Diels-Alder hydrogels with enhanced stability: First step toward controlled release of bevacizumab. *Eur J Pharm Biopharm*, 96, 217-225.
- Kobelt, G., Thompson, A., Berg, J., Gannedahl, M., & Eriksson, J. (2017). New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Multiple Sclerosis Journal*, 23(8), 1123-1136.
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm*, 15(1), 25-35.
- Kübelbeck, A. (2020). Zerebrale Kapillare. Wikipedia.
- Kublik, H., & Vidgren, M. T. (1998). Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Adv Drug Deliv Rev*, 29(1), 157-177.
- Kuo, J. (2005). *Practical aspects of hyaluronan based medical products*: CRC Press.
- Kurisawa, M., Chung, J. E., Yang, Y. Y., Gao, S. J., & Uyama, H. (2005). Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chem Commun (Camb)*(34), 4312-4314.
- Kurisawa, M., Chung, J. E., Yang, Y. Y., Gao, S. J., & Uyama, H. (2005). Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chemical Communications*(34), 4312-4314.
- Ladel, S., Flamm, J., Zadeh, A. S., Filzwieser, D., Walter, J. C., Schlossbauer, P., . . . Schindowski, K. (2018). Allogenic Fc Domain-Facilitated Uptake of IgG in Nasal Lamina Propria: Friend or Foe for Intranasal CNS Delivery? *Pharmaceutics*, 10(3).
- Ladel, S., Maigler, F., Flamm, J., Schlossbauer, P., Handl, A., Hermann, R., . . . Schindowski, K. (2020). Impact of Glycosylation and Species Origin on the Uptake and Permeation of IgGs through the Nasal Airway Mucosa. *Pharmaceutics*, 12(11).
- Ladel, S., Schlossbauer, P., Flamm, J., Luksch, H., Mizaikoff, B., & Schindowski, K. (2019). Improved In Vitro Model for Intranasal Mucosal Drug Delivery: Primary Olfactory and Respiratory Epithelial Cells Compared with the Permanent Nasal Cell Line RPMI 2650. *Pharmaceutics*, 11(8).
- Layden, J. E., Ghinai, I., Pray, I., Kimball, A., Layer, M., Tenforde, M. W., . . . Meiman, J. (2020). Pulmonary Illness Related to E-Cigarette Use in Illinois and Wisconsin - Final Report. *N Engl J Med*, 382(10), 903-916.
- Leal, J., Smyth, H. D. C., & Ghosh, D. (2017). Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int J Pharm*, 532(1), 555-572.
- Lee, F., Chung, J. E., & Kurisawa, M. (2008a). An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate. *Soft Matter*, 4(4).
- Lee, F., Chung, J. E., & Kurisawa, M. (2008b). An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate. *Soft Matter*, 4(4), 880-887.
- Lee, G. (2002). *Spray-Drying of Proteins*. In J. F. Carpenter & M. C. Manning (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology* (pp. 135-158). Boston: Springer
- Lee, J. H. (2018). Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomaterials research*, 22(1), 1-14.
- Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A. J., & Antal, I. (2019). Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3), 20.
- LFGB. (2017). Bekanntmachung einer Allgemeinverfügung gemäß § 54 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) für das Verbringen in die Bundesrepublik Deutschland und das Inverkehrbringen eines Nahrungsergänzungsmittels mit Zusatz von Chitosan. In G. Fricke (Ed.). Berlin: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
- Li, R., Patterson, K. R., & Bar-Or, A. (2018). Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nature Immunology*, 19(7), 696-707.

- Li, S. K., Liddell, M. R., & Wen, H. (2011). Effective electrophoretic mobilities and charges of anti-VEGF proteins determined by capillary zone electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*, 55(3), 603-607.
- Li, Y., Field, P. M., & Raisman, G. (2005). Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *Glia*, 52(3), 245-251.
- Liao, Y.-H., Brown, M. B., Nazir, T., Quader, A., & Martin, G. P. (2002). Effects of sucrose and trehalose on the preservation of the native structure of spray-dried lysozyme. *Pharmaceutical Research*, 19(12), 1847-1853.
- Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial cell factories*, 10(1), 1-9.
- Livera, P., Trojano, M., Simone, I. L., Zimatore, G. B., Pisicchio, L., Logroscino, G., & Cibelli, G. (1984). Heterogenous Models for Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Permeability to Serum Proteins in Normal and Abnormal Cerebrospinal Fluid/Serum Protein Concentration Gradients. *Journal of the Neurological Sciences*, 64, 245-258.
- Lorenzo-Lamosa, M., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J., & Alonso, M. (1998). Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 52(1-2), 109-118.
- Lynch, P. J. (2006). Head olfactory nerve. Wikimedia.
- Maigler, F., Ladel, S., Flamm, J., Gänger, S., Kurpiers, B., Kiderlen, S., . . . Schindowski, K. (2021). Selective CNS Targeting and Distribution with a Refined Region-Specific Intranasal Delivery Technique via the Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*, 13(11), 1904.
- Maucher, I. V. (2021). Neueinführung Kesimpta bei Multipler Sklerose. Langen: Vidal MMI Germany GmbH.
- Maury, M., Murphy, K., Kumar, S., Mauerer, A., & Lee, G. (2005). Spray-drying of proteins: effects of sorbitol and trehalose on aggregation and FT-IR amide I spectrum of an immunoglobulin G. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(2), 251-261.
- Maury, M., Murphy, K., Kumar, S., Shi, L., & Lee, G. (2005). Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(3), 565-573.
- Md, S., Khan, R. A., Mustafa, G., Chuttani, K., Baboota, S., Sahni, J. K., & Ali, J. (2013). Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: pharmacodynamic, pharmacokinetic and scintigraphy study in mice model. *Eur J Pharm Sci*, 48(3), 393-405.
- Menache, M. G., Hanna, L. M., Gross, E. A., Lou, S. R., Zinreich, S. J., Leopold, D. A., . . . Miller, F. J. (1997). Upper respiratory tract surface areas and volumes of laboratory animals and humans: considerations for dosimetry models. *J Toxicol Environ Health*, 50(5), 475-506.
- Miller, D. P., de Pablo, J. J., & Corti, H. (1997). Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions. *Pharmaceutical Research*, 14(5), 578-590.
- Mintun, M. A., Lo, A. C., Duggan Evans, C., Wessels, A. M., Ardayfio, P. A., Andersen, S. W., . . . Skovronsky, D. M. (2021). Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, 384(18), 1691-1704.
- Mistry, A. (2009). The development and application of biological models for evaluation of direct nose-to-brain drug delivery systems. (Vol. Doctor of Philosophy): University of Nottingham.
- Mistry, A., Glud, S. Z., Kjems, J., Randel, J., Howard, K. A., Stolnik, S., & Illum, L. (2009). Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. *Journal of Drug Targeting*, 17(7), 543-552.
- Mistry, A., Stolnik, S., & Illum, L. (2009). Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm*, 379(1), 146-157.

- Mistry, A., Stolnik, S., & Illum, L. (2015). Nose-to-Brain Delivery: Investigation of the Transport of Nanoparticles with Different Surface Characteristics and Sizes in Excised Porcine Olfactory Epithelium. *Mol Pharm*, 12(8), 2755-2766.
- Miyamoto, M., Natsume, H., Satoh, I., Ohtake, K., Yamaguchi, M., Kobayashi, D., . . . Morimoto, Y. (2001). Effect of poly-L-arginine on the nasal absorption of FITC-dextran of different molecular weights and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in rats. *Int J Pharm*, 226(1), 127-138.
- Morrison, E. E., & Costanzo, R. M. (1990). Morphology of the Human Olfactory Epithelium. *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY*(297), 1-13.
- Morrison, E. E., & Costanzo, R. M. (1992). Morphology of Olfactory Epithelium in Humans and Other Vertebrates. *Microscopy Research and Technique*(23), 49-61.
- Muntimadugu, E., Dhommatti, R., Jain, A., Challa, V. G., Shaheen, M., & Khan, W. (2016). Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Sci*, 92, 224-234.
- Musumeci, T., Serapide, M. F., Pellitteri, R., Dalpiaz, A., Ferraro, L., Magro, R. D., . . . Puglisi, G. (2018). Oxcarbazepine free or loaded PLGA nanoparticles as effective intranasal approach to control epileptic seizures in rodents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 133, 309-320.
- Mutukuri, T. T., Maa, Y.-F., Gikanga, B., Sakhnovsky, R., & Zhou, Q. T. (2021). Electrostatic spray drying for monoclonal antibody formulation. *Int J Pharm*, 607, 120942.
- Nemergut, M., Zoldak, G., Schaefer, J. V., Kast, F., Miskovsky, P., Pluckthun, A., & Sedlak, E. (2017). Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering. *Protein Sci*, 26(11), 2229-2239.
- Nonomura, Y., Morita, Y., Hikima, T., Seino, E., Chida, S., & Mayama, H. (2010). Spreading behavior of water droplets on fractal agar gel surfaces. *Langmuir*, 26(20), 16150-16154.
- Norris, G. T., & Kipnis, J. (2019). Immune cells and CNS physiology: Microglia and beyond. *J Exp Med*, 216(1), 60-70.
- Otterlei, M., Vhrum, K. M., Ryan, L., & Espevik, T. (1994). Characterization of binding and TNF- α inducing ability of chitosans on monocytes: the involvement of CD14. *Vaccine*, 12(9), 825-832.
- Ozmen, L., & Langrish, T. (2002). Comparison of glass transition temperature and sticky point temperature for skim milk powder. *Drying Technology*, 20(6), 1177-1192.
- Pan, C. J., Tang, J. J., Weng, Y. J., Wang, J., & Huang, N. (2006). Preparation, characterization and anticoagulation of curcumin-eluting controlled biodegradable coating stents. *Journal of Controlled Release*, 116(1), 42-49.
- Pardridge, W. M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2(1), 3-14.
- Park, S.-J., & Seo, M.-K. (2011). *Interface science and composites*: Academic Press.
- Patel, M. M., & Patel, B. M. (2017). Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. *CNS Drugs*, 31(2), 109-133.
- Paudel, A., Worku, Z. A., Meeus, J., Guns, S., & Van den Mooter, G. (2013). Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: formulation and process considerations. *Int J Pharm*, 453(1), 253-284.
- Pavicic, T., Gauglitz, G. G., Lersch, P., Schwach-Abdellaoui, K., Malle, B., Korting, H. C., & Farwick, M. (2011). Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 10(9), 990-1000.
- Peyro Saint Paul, L., Debruyne, D., Bernard, D., Mock, D. M., & Defer, G. L. (2016). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MD1003 (high-dose biotin) in the treatment of progressive multiple sclerosis. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 12(3), 327-344.
- Pierre-Gilles de Gennes, F., & Quere, D. (2004). Capillarity and Wetting Phenomena: Drops, Bubbles, Pearls, Waves. Springer Science & Business Media.

- Poulain, N., Dez, I., Perrio, C., Lasne, M.-C., Prud'homme, M.-P., & Nakache, E. (2003). Microspheres based on inulin for the controlled release of serine protease inhibitors: preparation, characterization and in vitro release. *Journal of Controlled Release*, 92(1-2), 27-38.
- Qiao, Y., Ruan, Y., Xiong, C., Xu, Q., Wei, P., Ma, P., . . . Du, Y. (2010). Chitosan oligosaccharides suppressant LPS binding to TLR4/MD-2 receptor complex. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 405-411.
- Raber, A. S., Mittal, A., Schafer, J., Bakowsky, U., Reichrath, J., Vogt, T., . . . Lehr, C. M. (2014). Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *J Control Release*, 179, 25-32.
- Rabiee, N., Ahmadi, S., Afshari, R., Khalaji, S., Rabiee, M., Bagherzadeh, M., . . . Webster, T. J. (2020). Polymeric Nanoparticles for Nasal Drug Delivery to the Brain: Relevance to Alzheimer's Disease. *Advanced Therapeutics*, 4(3).
- Ramana, M., Nagda, C., & Himaja, M. (2007). Design and evaluation of mucoadhesive buccal drug delivery systems containing metoprolol tartrate. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 69(4), 515.
- Rassu, G., Soddu, E., Cossu, M., Gavini, E., Giunchedi, P., & Dalpiaz, A. (2016). Particulate formulations based on chitosan for nose-to-brain delivery of drugs. A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32, 77-87.
- Ravi Kumar, M. N., Bakowsky, U., & Lehr, C. M. (2004). Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, 25(10), 1771-1777.
- Ren, C. D., Gao, S., Kurisawa, M., & Ying, J. Y. (2015). Cartilage synthesis in hyaluronic acid-tyramine constructs. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(9), 1942-1956.
- Ribeiro, W., Mata, J. L., & Saramago, B. (2007). Effect of Concentration and Temperature on Surface Tension of Sodium Hyaluronate Saline Solutions. *Langmuir*, 23(13), 7014-7017.
- Riegger, B. R., Bäurer, B., Mirzayeva, A., Tovar, G. E., & Bach, M. (2018). A systematic approach of chitosan nanoparticle preparation via emulsion crosslinking as potential adsorbent in wastewater treatment. *Carbohydrate Polymers*, 180, 46-54.
- Riegger, B. R., Baurer, B., Mirzayeva, A., Tovar, G. E. M., & Bach, M. (2018). A systematic approach of chitosan nanoparticle preparation via emulsion crosslinking as potential adsorbent in wastewater treatment. *Carbohydr Polym*, 180, 46-54.
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 37-42.
- Rodriguez-Merchan, E. C. (2013). Intra-articular injections of hyaluronic acid and other drugs in the knee joint. *HSS Journal*®, 9(2), 180-182.
- Royer, C. A. (2006). Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence. *Chemical Reviews*, 106(5), 1769-1784.
- Rucker, H. K., Wynder, H. J., & Thomas, W. E. (2000). Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Research Bulletin*, 51(5), 363-369.
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1960). The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia*, 1(13), 500-500.
- Sadé, J., Eliezer, N., Silberberg, A., & Nevo, A. C. (1970). The Role of Mucus in Transport by Cilia. *American Review of Respiratory Disease*, 102(1), 48-52.
- Sadeghi, A. M., Dorkoosh, F. A., Avadi, M. R., Weinhold, M., Bayat, A., Delie, F., . . . Junginger, H. E. (2008). Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells. *Eur J Pharm Biopharm*, 70(1), 270-278.
- Sarmento, B., & Neves, J. d. (2012). *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting, and biopolymer therapeutics*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.
- Savarino, V., Pace, F., Scarpignato, C., Group, E. S., Astegiano, M., Calabrese, C., . . . Costamagna, G. (2017). Randomised clinical trial: mucosal protection combined with

- acid suppression in the treatment of non-erosive reflux disease—efficacy of Esoxx, a hyaluronic acid–chondroitin sulphate based bioadhesive formulation. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 45(5), 631-642.
- Savin, C. L., Popa, M., Delaite, C., Costuleanu, M., Costin, D., & Peptu, C. A. (2019). Chitosan grafted-poly(ethylene glycol) methacrylate nanoparticles as carrier for controlled release of bevacizumab. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 98, 843-860.
- Schué, F. (2004). Colloids and interfaces with surfactants and polymers: an introduction. J Goodwin. John Wiley & Sons, Chichester, 2004. ISBN 0-470-84143-5. pp 285. *Polymer International*, 53(11), 1899-1899.
- Schüle, S., Friess, W., Bechtold-Peters, K., & Garidel, P. (2007). Conformational analysis of protein secondary structure during spray-drying of antibody/mannitol formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, 65(1), 1-9.
- Schüle, S., Friess, W., Bechtold-Peters, K., & Garidel, P. (2007). Conformational analysis of protein secondary structure during spray-drying of antibody/mannitol formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(1), 1–9.
- Schüle, S., Schulz-Fademrecht, T., Garidel, P., Bechtold-Peters, K., & Frieb, W. (2008). Stabilization of IgG1 in spray-dried powders for inhalation. *Eur J Pharm Biopharm*, 69(3), 793-807.
- Schulz, T., Schumacher, U., & Prehm, P. (2007). Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 20999-21004.
- Sedel, F., Papeix, C., Bellanger, A., Touitou, V., Lebrun-Frenay, C., Galanaud, D., . . . Tourbah, A. (2015). High doses of biotin in chronic progressive multiple sclerosis: a pilot study. *Mult Scler Relat Disord*, 4(2), 159-169.
- Sedláč, E., Schaefer, J. V., Marek, J., Gimeson, P., & Plückthun, A. (2015). Advanced analyses of kinetic stabilities of iggs modified by mutations and glycosylation. *Protein Science*, 24(7), 1100-1113.
- Seju, U., Kumar, A., & Sawant, K. K. (2011). Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: in vitro and in vivo studies. *Acta Biomater*, 7(12), 4169-4176.
- Shahidi, F., & Synowiecki, J. (1991). Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1527-1532.
- Shaikh, R., Raj Singh, T., Garland, M., Woolfson, A., & Donnelly, R. (2011). Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 3(1), 89-100.
- Sheehan, J. K., Oates, K., & Carlstedt, I. (1986). Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins. *Biochemical Journal*, 239(1), 147-153.
- Shibuichi, S., Onda, T., Satoh, N., & Tsujii, K. (1996). Super Water-Repellent Surfaces Resulting from Fractal Structure. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(50), 19512-19517.
- Shimada, E., & Matsumura, G. (1975). Viscosity and Molecular Weight of Hyaluronic Acids. *The Journal of Biochemistry*, 78(3), 513-517.
- Singh, R., Sharma, D., & Garg, R. (2017). Review on mucoadhesive drug delivery system with special emphasis on buccal route: an important tool in designing of novel controlled drug delivery system for the effective delivery of pharmaceuticals. *J Dev Drugs*, 6(01), 1-12.
- Smith, J., Wood, E., & Dornish, M. (2004). Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. *Pharmaceutical Research*, 21, 43-49.
- Sonaje, K., Chuang, E. Y., Lin, K. J., Yen, T. C., Su, F. Y., Tseng, M. T., & Sung, H. W. (2012). Opening of epithelial tight junctions and enhancement of paracellular permeation by chitosan: microscopic, ultrastructural, and computed-tomographic observations. *Mol Pharm*, 9(5), 1271-1279.
- Sousa, F., Cruz, A., Pinto, I. M., & Sarmiento, B. (2018). Nanoparticles provide long-term stability of bevacizumab preserving its antiangiogenic activity. *Acta Biomater*, 78, 285-295.

- Sousa, F., Sarmiento, B., & Neves-Petersen, M. T. (2017). Biophysical study of bevacizumab structure and bioactivity under thermal and pH-stresses. *Eur J Pharm Sci*, 105, 127-136.
- Spindler, L. M., Feuerhake, A., Ladel, S., Gunday, C., Flamm, J., Gunday-Tureli, N., . . . Gruber-Traub, C. (2021). Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa. *Front Pharmacol*, 12, 732954.
- Stahl, P. H. (1980). *Feuchtigkeit und Trocknen in der pharmazeutischen Technologie*. Heidelberg: Springer Verlag.
- Stalder, A. F., Kulik, G., Sage, D., Barbieri, L., & Hoffmann, P. (2006). A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 286(1), 92-103.
- Steinke, A., Meier-Stiegen, S., Drenckhahn, D., & Asan, E. (2008). Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and fila. *Histochem Cell Biol*, 130(2), 339-361.
- Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., & Goodenough, D. A. (1986). Identification of ZO-1: A High Molecular Weight Polypeptide Associated with the Tight Junction (Zonula Occludens) in a Variety of Epithelia. *The Journal of cell biology*, 103, 755-766.
- Stoolmiller, A., & Dorfman, A. (1969). The biosynthesis of hyaluronic acid by Streptococcus. *Journal of Biological Chemistry*, 244(2), 236-246.
- Stützle, M., Flamm, J., Carle, S., & Schindowski, K. (2015a). Nose-to-Brain delivery of insulin for Alzheimer's disease. *Admet & Dmpk*, 3(3).
- Stützle, M., Flamm, J., Carle, S., & Schindowski, K. (2015b). Nose-to-Brain delivery of insulin for Alzheimer's disease. *ADMET and DMPK*, 3(3), 190-202.
- Sun, Y., Cui, F., Shi, K., Wang, J., Niu, M., & Ma, R. (2009). The effect of chitosan molecular weight on the characteristics of spray-dried methotrexate-loaded chitosan microspheres for nasal administration. *Drug Dev Ind Pharm*, 35(3), 379-386.
- Teshima, D., Yamauchi, A., Makino, K., Kataoka, Y., Arita, Y., Nawata, H., & Oishi, R. (2002). Nasal glucagon delivery using microcrystalline cellulose in healthy volunteers. *Int J Pharm*, 233(1), 61-66.
- Thorne, R. G., Pronk, G. J., Padmanabhan, V., & Frey, W. H. (2004). Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, 127(2), 481-496.
- Tokárová, V., Kašpar, O., Knejzlík, Z., Ulbrich, P., & Štěpánek, F. (2013). Development of spray-dried chitosan microcarriers for nanoparticle delivery. *Powder Technology*, 235, 797-805.
- Tourbah, A., Lebrun-Frenay, C., & Edan, G. (2016). MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Multiple Sclerosis Journal*, 22(13), 1719-1731.
- Trigkilidas, D., & Anand, A. (2013). The effectiveness of hyaluronic acid intra-articular injections in managing osteoarthritic knee pain. *The Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 95(8), 545-551.
- Trojano, M., Simone, I. L., Logroscino, G., Piccchio, L., Rosato, A., Ragno, T., . . . Livrea, P. (1986). Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Permeability to Serum IgG Subfractions and Measurement of Intrathecal IgG Synthesis. *Journal of the Neurological Sciences*, 73, 325-338.
- Tzannis, S. T., & Prestrelski, S. J. (1999). Activity-stability considerations of trypsinogen during spray drying: effects of sucrose. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(3), 351-359.
- Ugwoke, M. I., Agu, R. U., Verbeke, N., & Kinget, R. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(11), 1640-1665.
- Ugwoke, M. I., Exaud, S., Van Den Mooter, G., Verbeke, N., & Kinget, R. (1999). Bioavailability of apomorphine following intranasal administration of mucoadhesive drug delivery systems in rabbits. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 213-219.

- Ugwoke, M. I., Verbeke, N., & Kinget, R. (2010). The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(1), 3-21.
- Uppal, A., Craster, R., & Matar, O. (2017). Dynamics of spreading thixotropic droplets. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 240, 1-14.
- Vermeer, A. W., & Norde, W. (2000). The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophysical journal*, 78(1), 394-404.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., . . . Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377-410.
- Vila, A., Sanchez, A., Tobío, M., Calvo, P., & Alonso, M. J. (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, 78(15-24).
- Walz, M., Hirth, T., & Weber, A. (2018). Investigation of chemically modified inulin as encapsulation material for pharmaceutical substances by spray-drying. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 536, 47-52.
- Walzel, P. (1990). Zerstäuben von Flüssigkeiten. *Chemie Ingenieur Technik*, 62(12), 983-994.
- Wang, F. (2003). Profiles of methotrexate in blood and CSF following intranasal and intravenous administration to rats. *Int J Pharm*, 263(1-2), 1-7.
- Wang, J., Wang, B. M., & Schwendeman, S. P. (2002). Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release*, 82(2-3), 289-307.
- Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., & Wang, S. L. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *11782013*, 6, 765-774.
- Wang, X., Chi, N., & Tang, X. (2008). Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(3), 735-740.
- Warnken, Z. N., Smyth, H. D. C., Watts, A. B., Weitman, S., Kuhn, J. G., & Williams, R. O. (2016). Formulation and device design to increase nose to brain drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 35, 213-222.
- Ways, M., Mohammed, T., Lau, W. M., & Khutoryanskiy, V. V. (2018). Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)*, 10(3), 267.
- Wenling, C., Duohui, J., Jiamou, L., Yandao, G., Nanming, Z., & Xiufang, Z. (2005). Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical properties and Schwann cell affinity of chitosan films. *J Biomater Appl*, 20(2), 157-177.
- WHO. (2006). Neurological disorders : public health challenges. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2020). Virtual press conference on COVID-19 - 11 March 2020. In T. Jasarevic (Ed.). Twitter, Facebook, and YouTube channels: World Health Organization.
- Williams, D. L., Kuhn, A. T., Amann, M. A., Hausinger, M. B., Konarik, M. M., & Nesselrode, E. I. (2010). Computerised measurement of contact angles. *Galvanotechnik*, 101(11), 2502.
- Win, K. Y., & Feng, S. S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15), 2713-2722.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniessel, U., Krauß, B., Schmid, E.-M., Öcalan, M., . . . Risau, W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *Journal of Cell Science*, 107 (5), 1347-1357.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Sam, H., Horvat, S., Deli, M. A., & Mack, A. F. (2008). Epithelial and endothelial barriers in the olfactory region of the nasal cavity of the rat. *Histochem Cell Biol*, 130(1), 127-140.

- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Mathison, J. C. (1990). CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. *Science*, 249(4975), 1431-1433.
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., . . . Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269.
- Xu, X., Jha, A. K., Harrington, D. A., Farach-Carson, M. C., & Jia, X. (2012). Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter*, 8(12), 3280-3294.
- Yu, F., Yan, L., Wang, N., Yang, S., Wang, L., Tang, Y., . . . Zhang, F. (2020). Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clin Infect Dis*, 71(15), 793-798.
- Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., & Bumgardner, J. D. (2011a). Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. *Materials*, 4(8), 1399–1416.
- Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., & Bumgardner, J. D. (2011b). Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. *Materials (Basel, Switzerland)*, 4(8), 1399–1416.
- Yuan, Y., & Lee, T. R. (2013). *Contact Angle and Wetting Properties*. In G. Bracco & B. Holst (Eds.), *Surface Science Techniques* (pp. 3-34). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Yun, Y. H., Lee, B. K., & Park, K. (2015). Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *J Control Release*, 219, 2-7.
- Zarif, J. C., Hernandez, J. R., Verdone, J. E., Campbell, S. P., Drake, C. G., & Pienta, K. J. (2016). A phased strategy to differentiate human CD14+ monocytes into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells. *Biotechniques*, 61(1), 33-41.
- Zhu, J., & Marchant, R. E. (2011). Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*, 8(5), 607-626.
- Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., . . . Wu, J. (2020). SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *New England Journal of Medicine*, 382(12), 1177-1179.