

In vitro evaluation of loading and release rate of two enteric coats for Nucleic Acid delivery

Momenzadeh S¹, Sadeghi A², Vatandoust N³, Salehi R⁴

1- Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Molecular and Medicine Research Center, Department of Biochemistry and Genetics, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received: 2 Feb 2014, Accepted: 5 March 2014

Abstract

Introduction: Gene therapy is a recent promising treatment that effective gene transfer is considered as its most important step. Furthermore noninvasive method of transfer will be important to, when gene therapy is supposed to be applied. Administration of drugs in oral rout is more appreciated by patients. Loading and release rates are very important in targeting and effectiveness of transfer in all different methods that have been used for oral drug transfer. Here, we have studied packing of gene particles into two different enteric coats and compared these two coats in loading of entrapped materials and there release rate in vitro.

Materials and Methods: First, DNA was mixed with chitosan by coacervation technique and resulted polyplexes were coated using solvent evaporation technique. FTIR and two different pHs, less and more but near eudragit pK_a, were used to evaluate formation of particles and their behavior

Results: Formed particles have similar stability in low pH and their differences are trivial. Eudragit L100 release rate is really slower than L100-55 and gradual. Eudragit L100 shows better ability in loading rate.

Conclusions: According to two formed particles' behavior, eudragit L100-55 might be used in oral gene transfer targeting of initial part of small intestine and eudragit L100 might be used for wider surface of small intestine, from the initial to the end part, and colon.

Keywords: Chitosan, Enteric coat, Eudragit, Oral delivery

*Corresponding author:

Address: Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan

Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

سنجش میزان بارگیری و رها سازی دو پوشش انتریک برای انتقال اسید نوکلئیک از طریق دهان

صدیقه مومن زاده¹، عبدالرحیم صادقی²، نسیمه وطن دوست³، رسول صالحی^{4*}

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 2- استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 3- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- 4- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: 92/11/13 تاریخ پذیرش: 92/12/14

چکیده

زمینه و هدف: ژن درمانی شیوه نوین و نوید بخش درمانی است که انتقال کارآمد ژن مهم ترین مرحله آن محسوب می گردد. علاوه بر این، انتقال به گونه ای غیرتهاجمی نیز در مرحله به کارگیری این روش اهمیت فراوان می یابد. تجویز دهانی روشی است که بسیار مورد اقبال بیماران قرار گرفته است. برای انتقال دهانی دارو، روش های متعددی به کار گرفته شده اند که در همه آنها میزان بارگیری و رهاسازی در هدفمند ساختن و کارایی انتقال بسیار موثر است. در این تحقیق بسته بندی ذرات ژنی در دو نوع پوشش انتریک و همچنین مقایسه میزان بارگیری و رهاسازی ماده محصور شده این دو پوشش، در شرایط آزمایشگاهی صورت پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ابتدا DNA به روش coacervation با کیتوزان ترکیب و سپس پلی پلکس های حاصل شده با روش تبخیر حلال، پوشش دهی شدند. به منظور بررسی تشکیل و رفتار ذرات از روش FTIR و دو محلول با pH های دو حاشیه ی PK_a پوشش انتریک استفاده شد.

یافته ها: ذرات تشکیل شده، پایداری مشابه در pH پایین دارند و تفاوت قابل توجهی نشان نمی دهند. میزان رهاسازی یودراجیت L100 نسبت به L100-55 آهسته تر و تدریجی است. یودراجیت L100 قابلیت بهتری در میزان بارگیری DNA نشان می دهد.

نتیجه گیری: بر اساس رفتار دو نوع پارتیکل تشکیل شده، در تجویز دهانی ژن می توان از یودراجیت L100-55 با هدف ترنسفکشن ابتدای روده کوچک و از یودراجیت L100 برای ترنسفکشن سطح وسیع تری از ابتدا تا انتهای روده کوچک و کولون استفاده کرد.

واژگان کلیدی: کیتوزان، پوشش انتریک، یودراجیت، انتقال دهانی

* نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی

Email: r-saleh@med.mui.ac.ir

مقدمه

ژن درمانی روش جدیدی در درمان بیماری‌های ژنتیکی است که در چند دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (1، 2). بسیاری از روش‌های تغییر در ماده ژنتیکی موجود زنده به مرحله‌ی عمل رسیده‌اند اما روش‌های موجود اکثراً تهاجمی هستند (3-5).

کاربرد روش‌های تهاجمی عملاً روند درمانی را با مشکل مواجه می‌سازند. به علاوه، عمر درمان در ژن درمانی مانند بسیاری از روش‌های دیگر درمان کوتاه است و اغلب نیاز به تکرار دوز وجود دارد. از این رو، روش انتقال اهمیت بیشتری می‌یابد. محققین در راستای یافتن روش‌های غیرتهاجمی برای انتقال دارو بدون نیاز به تزریق یا جراحی، به انتقال از طریق سیستم گوارشی روی آورده‌اند (6). استفاده از دستگاه گوارشی برای انتقال دارو از طریق دهان روشی بسیار منطقی است که نسبت به سایر روش‌های درمانی و تجویز با استقبال بسیار مناسبی از سوی بیماران مواجه شده است (7، 8). این روش انتقال در ژن درمانی نیز می‌تواند مفید باشد.

رودها در انتقال دهانی می‌توانند به منزله محل عمل دارو یا ژن یا به عنوان گذرگاهی اولیه برای انتقال به سایر نقاط بدن به کار روند. با این وجود دستگاه گوارش از نظر رسانش دارویی مسیر پرچالشی است که دارو در آن با شرایط دشواری از جمله pH پایین، آنزیم‌های گوارشی، فشارهای مکانیکی، موکوس روده و سایر موارد مواجه می‌گردد.

مهم‌ترین فاکتوری که در انتخاب یک سیستم رسانش دهانی با هدف روده‌ها باید در نظر گرفته شود، پایداری این سیستم در برابر pH معده است (9). pH پایین معده بزرگ‌ترین مانع در رسیدن دارو به نواحی پایین‌تر دستگاه گوارشی یعنی روده‌هاست. برای این منظور مواد مختلفی از جمله پلیمرهایی با pK_a بالاتر از pH اسید معده به کار گرفته شده‌اند. این مواد در pH پایین‌تر از pK_a خود به صورت ذراتی نامحلول باقی می‌مانند و به این ترتیب می‌توانند ماده محصور شده خود را از اثرات محیط حفظ نمایند. از جمله این پلیمرها می‌توان به آلژینات، هیدروکسی متیل سلولز، پلی کاپرولاکتون و یودراجیت اشاره کرد (7، 9-11).

استفاده از این مواد برای انتقال ژن نیز می‌تواند موثر باشد. از آن جایی که ژن درمانی روش بسیار پر هزینه‌ای است، سیستم انتخاب شده علاوه بر کارآمدی باید در دسترس بوده و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیز باشد. انواع مختلف یودراجیت که برای قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش طراحی شده‌اند هم اکنون به صورت تجاری موجود هستند. این پوشش‌ها که پوشش انتریک نامیده می‌شوند از نظر بالینی کاملاً مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و قابلیت زیست تجزیه پذیری و زیست تخریب پذیری مناسبی دارند.

انواع L100-55 و L100 که مربوط به روده کوچک هستند (12، 13)، گزینه‌ی مناسبی برای انتقال ژن به این ناحیه به شمار می‌روند. در انتقال ژن همانند دیگر داروها، مواردی مانند کپسوله شدن مناسب اسید نوکلئیک در ترکیب با پوشش و هم‌چنین میزان رهاسازی در pH هدف بسیار با اهمیت است.

یودراجیت یک پلیمر از اسید متاکریلیک است که ترکیب با اسید نوکلئیک به صورت مفید نیاز به واسطه‌ای با بار مثبت دارد. برای این منظور طیف وسیعی از مواد با بار مثبت می‌تواند به کار رود. کیتوزان یک پلیمر پلی ساکارییدی است که به دلیل ویژگی‌های مناسب مورد اقبال محققین قرار گرفته است (14).

این ماده به خوبی DNA را فشرده می‌سازد و از اثرات محیطی حفظ می‌نماید اما استفاده از این پلیمر در شرایط طبیعی دستگاه گوارشی به دلیل پروتونه شدن در pH پایین به تنهایی برای حفاظت و انتقال DNA کافی نیست و به منظور فراهمی زیستی بیشتر نیازمند همراهی ماده دیگر یا شکل استخلافی مقاوم‌تر است (15).

هدف از این تحقیق پوشش‌دهی مناسب پلی پلکس کیتوزان-DNA و هم‌چنین بررسی و مقایسه دو پوشش عمومی انتریک ویژه روده باریک در میزان کپسوله کردن و رهاسازی ماده ژنتیکی است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از پلاسמיד مارکر pDB2 با توالی و طول مشخص استفاده شد که از شرکت Addgene تهیه و در سوش Top 10 باکتری اشرشیاکلی کلون و تکثیر گردید و به وسیله کیت (Thermo scientific)

بررسی قرار گرفت. اندکی بار مثبت اضافی برای ترکیب پلی پلکس و پوشش روی آن در مرحله بعدی موثر خواهد بود.

روش solvent evaporation برای پوشش دهی پلی پلکس های DNA- کیتوزان استفاده شد به این ترتیب که مقدار 1 میلی گرم از هر دو نوع یودراجیت L100-55 و L100 به طور جداگانه در 13/5 میلی لیتر (17) از حلال استون/تانول (1:1) محلول گردید و مقدار 0/2 میلی گرم از پلی پلکس تهیه شده که حاوی 50 میکروگرم DNA است به صورت قطره قطره به هر کدام از محلول ها به میزان یکسان اضافه گردید. محلول ها روی هم زن مغناطیسی (IKA, Germany) باقی مانده تا حلال ارگانیک به تدریج از محیط خارج شود و پلیمرهای یودراجیت سطح پلی پلکس های DNA- کیتوزان را پوشانند. در نهایت امولسیون تشکیل شده دو بار با آب دیونیزه شستشو داده شد تا رسوب به دست آمده از هرگونه پلیمر آزاد و مونومری که در ساختار ذرات قرار نگرفته عاری باشد.

برای تعیین میزان کپسوله شدن، قبل از شستشو و خارج کردن مایع رویی امولسیون، میزان DNA موجود در محلول رویی امولسیون پس از سانتریفیوژ در 9500 دور به مدت 20 دقیقه، در طول موج 260 نانومتر اندازه گیری شد.

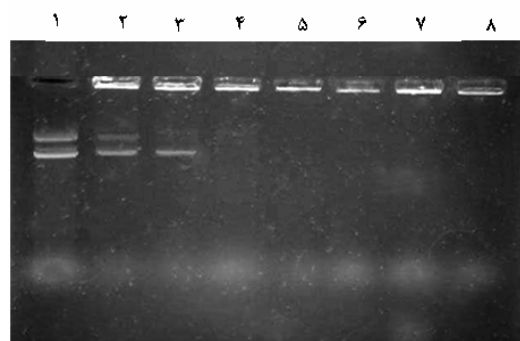
به منظور تایید و بررسی تشکیل شدن ذرات از روش (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) FTIR (Ray Light WQF-) (510, China) استفاده گردید که در این روش ماهیت شیمیایی ذرات و پیوندهای موجود در ترکیب مشخص می گردد (18). در این تست رسوب ذرات باید به خوبی خشک شود.

Gene Jet plasmid miniprepkit (USA) و طبق دستورالعمل کیت استخراج شد.

به منظور به دست آوردن رقت مناسب از کیتوزان که بیشترین برهمکنش با DNA را داشته باشد، حجم های مساوی از DNA با غلظت 100 نانوگرم در میکرولیتر و کیتوزان با غلظت های 0/01-0/07 درصد با هم ترکیب شدند (16).

پارتیکل ها به روش coacervation تهیه گردید به طوری که حجم مساوی از هر دو DNA در 25 میلی مول Na_2SO_4 و کیتوزان در اسید استیک 1 درصد در 55 درجه سانتی گراد حرارت داده شد و بلافاصله با هم مخلوط گردید و با حداکثر سرعت به مدت 30 ثانیه ورتکس شد.

غلظت های مختلف روی ژل آگارز 0/7 درصد در بافر تریس- بورات با ولتاژ 90 به مدت 15 دقیقه الکتروفورز گردید و بهترین غلظت از کیتوزان که ترکیب کاملی با DNA دارد تعیین گردید (شکل 1).



شکل 1. بررسی رقت های مختلف محلول کیتوزان در ترکیب با DNA
 ستون 1: پلاسمید pDB2 ، ستون 2: کیتوزان 0/005 درصد، ستون 3: کیتوزان 0/003 درصد، ستون 4: کیتوزان 0/002 درصد، ستون 5: کیتوزان 0/001 درصد، ستون 6: کیتوزان 0/0005 درصد، ستون 7: کیتوزان 0/0002 درصد، ستون 8: کیتوزان 0/0001 درصد

نمونه تهیه شده با غلظت 0/02 درصد کیتوزان به منظور تعیین ابعاد و پتانسیل الکتریکی با دستگاه زتاسایزر Malvern (Nano ZS, ZE3600, Malvern) (Instruments, Southborough, MA, USA) مورد

$$\text{Encapsulation efficiency(\%)} = \frac{\text{total amount of DNA used}(\mu\text{g}) - \text{nontrapped DNA}(\mu\text{g})}{\text{total amount of DNA used}(\mu\text{g})} \times 100$$

اسپکتروفوتومتر و میزان DNA بارگیری شده به صورت درصدی به دست می‌آید.

تست کمپلکس ها به صورت سه تایی انجام شد و میانگین، انحراف معیار با نرم افزار SPSS بررسی و میزان کپسوله شدن با آزمون تی مقایسه شد.

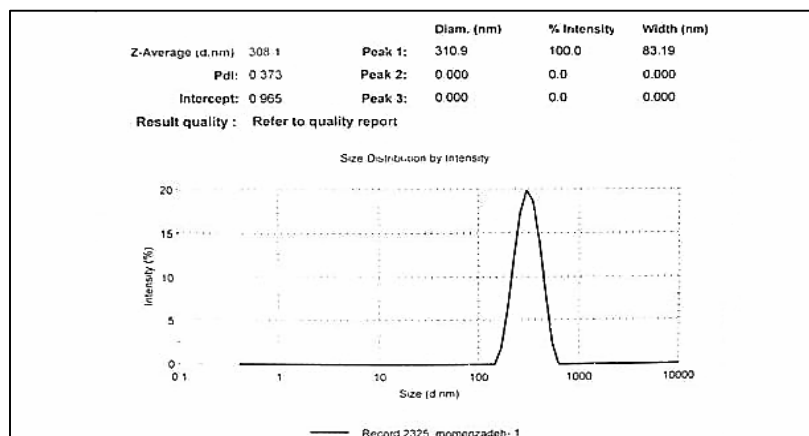
یافته‌ها

اندازه پلی پلکس‌های DNA-کیتوزان به دست آمده در حدود 300 نانومتر می‌باشد (شکل 2). میانگین بار کلی ذرات 14+ میلی ولت است (شکل 3).

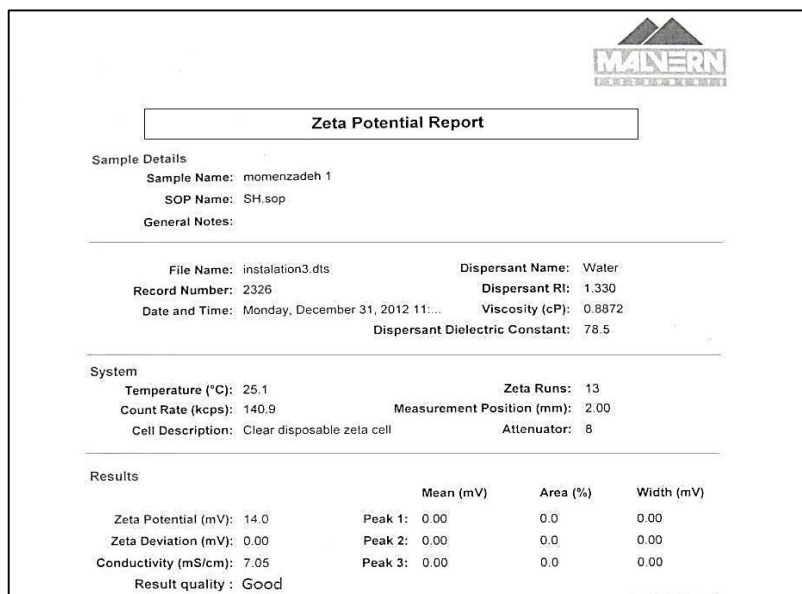
نتایج FTIR نشان از باندهای شیمیایی ترکیب پلی پلکس و هم‌چنین پوشش یودراجیت است. باند محدوددهی 1730cm^{-1} نشان از برهم کنش اسید و باز و تشکیل نمک دارد (19). تغییر در ارتعاش پیرانوز و رسیدن به سطح 1020cm^{-1} نیز دیده می‌شود. کاهش شدت باندها می‌تواند نشانی از پنهان شدن گروه‌های کیتوزان و به ویژه DNA و تشکیل ساختار هسته - پوسته باشد.

بررسی رفتار و عملکرد پارتیکل‌ها در pHهای حاشیه و نزدیک به pK_a یودراجیت می‌تواند تاییدی بر تشکیل یا عدم تشکیل ذرات باشد. pH پایین تر از pK_a یودراجیت به منظور سنجش پایداری ذرات در pHهای پایین و بالاتر از pK_a برای بررسی میزان آزادسازی DNA به کار می‌رود. برای این منظور pHهای 4/7 و 6/3 برای یودراجیت L100-55 و pHهای 5/2 و 6/8 برای یودراجیت L100 انتخاب شدند. ذرات، شسته و کاملاً خشک و وزن می‌شوند. برای هر کدام از ذرات پوشش داده شده میزان مساوی از نظر وزنی به دو تیوب با دو pH متفاوت منتقل گردید. پایداری ذرات در pH پایین تر از pK_a به صورت کسری از DNA رها شده در محلول پس از سانتریفیوژ و بررسی مایع رویی با اسپکتروفوتومتر و میزان DNA بارگیری شده در ذرات به صورت درصد به دست می‌آید.

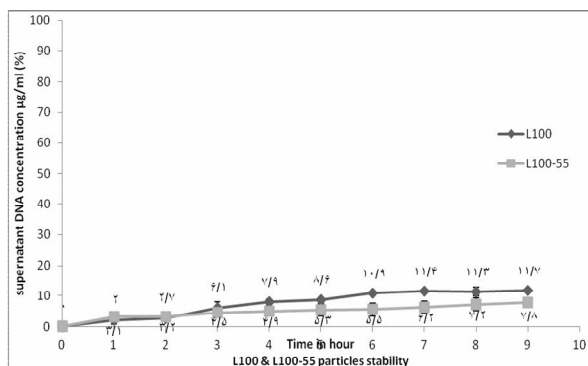
میزان رهایی DNA از ذرات پوشیده شده با یودراجیت به صورت کسری از میزان DNA آزاد شده در pH بالاتر از pK_a پس از سانتریفیوژ و بررسی با



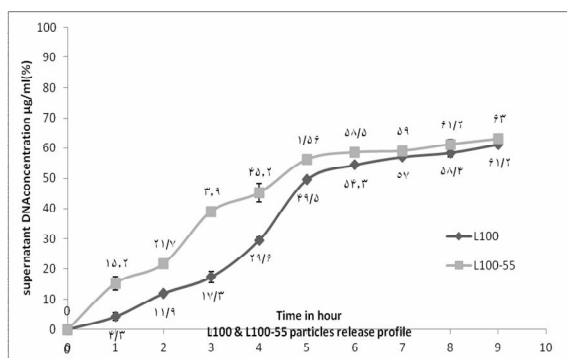
شکل 2. میانگین اندازه ذرات کیتوزان-DNA



شکل 3. پتانسیل زتا ذرات تشکیل شده کیتوزان-DNA



نمودار 1. مقایسه میزان پایداری ذرات کیتوزان-DNA پوشیده شده با دو نوع مختلف یودراجیت L100 و L100-55 در $pH < pK_a$



نمودار 2. مقایسه میزان رهاسازی ذرات کیتوزان-DNA پوشیده شده با دو نوع مختلف یودراجیت L100 و L100-55 در $pH > pK_a$

میزان بارگیری ذرات در یودراجیت L100-55 برابر 89/6 درصد (1/8) مقدار DNA موجود در سوپرناتانت: 5/2 میکروگرم) و میزان بارگیری ذرات در یودراجیت L100 72 درصد (4/97) مقدار DNA موجود در سوپرناتانت: 14 میکروگرم) می باشد. نتایج آماری اختلاف معنی داری در میزان کپسوله شدن نشان داد ($p=0/011$).

پایداری ذرات پوشیده شده با یودراجیت L100-55 و L100 در نمودار 1 در pH پایین تر از pK_a مقایسه شده است. همان گونه که در نمودار مشاهده می شوند هر دو پوشش دهی مقاومت نسبتا مناسبی در برابر pH ایجاد می کنند.

میزان رهاسازی ذرات به صورت درصد، به ویژه در ساعات اولیه در ذرات پوشیده شده با یودراجیت L100-55 بسیار بیشتر از ذرات پوشیده شده با یودراجیت L100 است (نمودار 2).

بحث

از آن جایی که تجویز دهانی دارو نقش بسیار ارزنده‌ای در درمان دارد (20) و انتقال دهانی ژن نیز اهمیت خاص و ویژه در این نوع درمان دارد (6) لذا در این تحقیق به منظور هدف قرار دادن روده‌ها به عنوان محل هدف ژن درمانی یا انتقال اولیه ژن، از سیستم مقاوم به pH پایین استفاده شده است که همانند گزارشات قبلی، پوشش اولیه کیتوزان با غلظت 0/02 درصد برای ترکیب کامل با DNA ضروری است (16).

تشکیل پارتیکل‌ها پس از پوشش دهی با دو نوع مختلف یودراجیت، توسط FTIR و تغییر در pH تایید شد. سنجش رفتار پارتیکل‌ها در pHهای مختلف نشان داد که پایداری دو نوع مختلف پارتیکل تشکیل شده در $pH < pK_a$ تفاوت چشم گیری ندارد و یودراجیت L100-55 به میزان جزئی DNA بیشتری در این pH آزاد می‌کند.

در مورد میزان آزادسازی در $pH > pK_a$ به طور کلی تفاوت قابل ملاحظه‌ای دیده نمی‌شود اما یودراجیت L100-55 آزادسازی بیشتری در ساعات اولیه دارد. این مسئله در مواردی که دوز ژنی بیشتری در ناحیه‌ی ابتدایی روده لازم است اهمیت می‌یابد. اما یودراجیت L100 در ساعات اولیه، آزادسازی کم‌تری نشان می‌دهد و افزایش در این میزان آزادسازی پس از 3 تا 4 ساعت قابل مشاهده است که نشان می‌دهد یودراجیت L100 قابلیت ترنسفاکشن طیف گسترده‌تری از سلول‌ها در روده را دارد و به شکل عمومی‌تری عمل می‌نماید.

در بررسی میزان کپسوله شدن توسط دو نوع یودراجیت، یودراجیت L100 میزان کپسوله شدن بالاتری را نشان می‌دهد که اهمیت زیادی در حفظ دوز مورد استفاده دارد.

نتیجه گیری

سیستم هسته - پوسته تشکیل شده حساسیت به pH و قابلیت رهاسازی DNA در pH هدف را دارد و گزینه مناسبی برای انتقال ژن به روده‌هاست. علاوه بر این، این

سیستم انعطاف پذیر نیز هست به طوری که با تغییر غلظت پلیمر و در نهایت تغییر در ضخامت پوسته می‌توان محل هدف دقیق‌تری برای رهاسازی DNA طراحی کرد.

تشکر و قدردانی

نتایج حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی به شماره 765 می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل همکاری صمیمانه در تامین منابع مالی و همچنین گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل فراهم نمودن محیط مناسب تحقیقاتی و همکاری صمیمانه علمی تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

1. Akhtar N, Akram M, Asif H, Usmanghani K, Ali Shah S, Rao SA. Gene therapy, a review article. *Fly1 J Med Plants Res.* 2011; 5(10): 1812-7.
2. Patil P, Chaudhari P, Sahu M, Duragkar N. Review article on gene therapy. *International Journal of Genetics.* 2012;4(1): 74-9.
3. Heller LC, Ugen K, Heller R. Electroporation for targeted gene transfer. *Expert opinion on drug delivery.* 2005;2(2):255-68.
4. Ulug P, Vasavda N, Kumar R, Keir L, Awogbade M, Cunningham J, et al. Hydroxyurea therapy lowers circulating DNA levels in sickle cell anemia. *American journal of hematology.* 2008;83(9):714-6.
5. Liu P, Santisteban I, Burroughs LM, Ochs HD, Torgerson TR, Hershfield MS, et al. Immunologic reconstitution during PEG-ADA therapy in an unusual mosaic ADA deficient patient. *Clinical Immunology.* 2009;130(2):162-74.
6. O'Neill MJ, Bourre L, Melgar S, O'Driscoll CM. Intestinal delivery of non-viral gene therapeutics: physiological barriers and preclinical models. *Drug discovery today.* 2011; 16(5): 203-18.
7. Makhlof A, Tozuka Y, Takeuchi H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *European journal of pharmaceutical sciences.* 2011; 42(5): 445-51.

8. Jain D, Panda AK, Majumdar DK. Eudragit S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. *Aaps Pharmscitech*. 2005;6(1):E100-E7.
9. Capurso NA, Fahmy TM. Development of a pH-Responsive Particulate Drug Delivery Vehicle for Localized Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *The Yale journal of biology and medicine*. 2011;84(3):285-6.
10. El-Sherbiny IM. Enhanced pH-responsive carrier system based on alginate and chemically modified carboxymethyl chitosan for oral delivery of protein drugs: Preparation and in-vitro assessment. *Carbohydrate Polymers*. 2010;80(4): 1125-36.
11. Kriegel C, Amiji M. Oral TNF- α gene silencing using a polymeric microsphere-based delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of controlled release*. 2011;150(1):77-86.
12. Galindo-Rodríguez SA, Puel F, Briançon S, Allémann E, Doelker E, Fessi H. Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2005; 25(4): 357-67.
13. Joshi M. Role of Eudragit in targeted drug delivery. *Int J Curr Pharma Res*. 2013;5:58-62.
14. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release*. 2004;100(1):5-28.
15. Nassar T, Rom A, Nyska A, Benita S. Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug. *Journal of controlled release*. 2009;133(1):77-84.
16. Corsi K, Chellat F, Yahia LH, Fernandes JC. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials*. 2003;24(7):1255-64.
17. Khamanga S, Parfitt N, Nyamuzhiwa T, Haidula H, Walker RB. The evaluation of eudragit microcapsules manufactured by solvent evaporation using USP apparatus 1. *Dissolution Technologies*. 2009;16(2):15-21.
18. Smith BC. *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*: CRC press; 2011.
19. Lorenzo-Lamosa M, Remunan-Lopez C, Vila-Jato J, Alonso M. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of controlled release*. 1998; 52(1):109-18.
20. Page DT, Cudmore S. Innovations in oral gene delivery: challenges and potentials. *Drug discovery today*. 2001;6(2):92-101.