

B IOMATERIAIS APLICADOS AO
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
TERAPÊUTICOS AVANÇADOS

B IOMATERIALES APLICADOS
AL DISEÑO DE SISTEMAS
TERAPÉUTICOS AVANZADOS

Hermínio C. de Sousa
Mara E. M. Braga
Alejandro Sosnik
(editores)

CAPÍTULO 5. MICELAS POLIMÉRICAS PARA ENCAPSULACIÓN, VECTORIZACIÓN Y CESIÓN DE FÁRMACOS.

Carmen Alvarez Lorenzo, Angel Concheiro, Alejandro Sosnik

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,

Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

The Group of Biomaterials and Nanotechnology for Improved Medicines (BIONIMED),

Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica,

Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires,

Argentina.

Resumen:

En los últimos años se ha intensificado el desarrollo de formas de dosificación que permitan mejorar el perfil de eficacia/seguridad de fármacos disponibles en el mercado y de nuevas entidades químicas. En este capítulo se analizan las posibilidades que ofrecen las micelas poliméricas en la formulación de fármacos de baja solubilidad, insuficiente permeabilidad, baja estabilidad y elevada toxicidad. Se describen los copolímeros de bloque más utilizados y los procedimientos de preparación y de caracterización de micelas poliméricas, resaltando sus principales ventajas e inconvenientes desde el punto de vista de sus prestaciones en la encapsulación de fármacos para ser administrados por diversas vías y como nanotransportadores para vectorización pasiva y activa. Finalmente, se discuten algunas aplicaciones recientes de micelas poliméricas sensibles a estímulos, como cambios de pH, temperatura o potencial redox o la aplicación de luz o de ultrasonidos,

para cesión selectiva en tejidos o células específicas. Todas estas propiedades junto con la capacidad de algunos copolímeros de bloque para inhibir bombas de eflujo hacen que las micelas poliméricas despierten un interés creciente en el tratamiento del cáncer y de otras patologías que requieren que el fármaco alcance concentraciones eficaces en estructuras poco accesibles.

Palabras clave: Micelas poliméricas; copolímeros de bloque; nano-transportador; solubilización; sensibilidad a estímulos; vectorización de fármacos.

Abstract:

Last years have witnessed a remarkable intensification of research on development of dosage forms aimed to improve efficacy/safety profile of both already marketed drugs and new chemical entities. In this chapter the suitability of polymeric micelles for the formulation of drugs showing poor solubility in water, low permeability, limited stability and high toxicity is discussed. Commonly used block copolymers and methods of preparation and characterization of polymeric micelles are described, highlighting their main advantages and disadvantages from the point of view of their performance in the encapsulation of drugs to be administered by various routes and as nanocarriers for passive and active targeting. Last sections focus on recent applications of polymeric micelles that are sensitive to stimuli, such as changes in pH, temperature or redox potential or the application of light or ultrasound, for selectively drug release into specific tissues or cells. All these properties along with the ability some block copolymers to inhibit efflux pumps make polymeric micelles particularly attractive for treatment of cancer and other diseases that require the drug to achieve effective concentrations in hardly accessible structures.

Keywords: Polymeric micelles; block copolymers; nanocarrier; solubilization; stimuli responsiveness; drug targeting.

5.1. Sistemas nanométricos para transporte de fármacos

El diseño racional de nuevos fármacos ha incorporado en las últimas décadas herramientas computacionales que permiten limitar el número de moléculas que ingresan a las etapas preclínicas y clínicas y de esta manera reducir de forma sustancial el coste involucrado en el proceso de desarrollo [1]. Sin embargo, la eficiencia alcanzada en la transferencia a la clínica (en inglés *bench-to-bedside translation*) continúa siendo relativamente baja en relación con el crecimiento de la inversión [2], contribuyendo a mantener las altas tasas de atrición, que son del orden de 95% en cáncer [3].

Los costes dependen del tipo de fármaco, de las posibilidades de fracaso del proyecto, del tiempo requerido para el desarrollo y también de si la nueva entidad química se basa o no en la modificación de una molécula ya empleada en algún producto farmacéutico. Por ejemplo, en el caso de los fármacos innovadores, el desarrollo demanda aproximadamente 12 años y el coste asociado se estima en US\$800 millones [4]. Es interesante destacar, que el porcentaje de falla en ensayos clínicos ha aumentado en los últimos años debido a los criterios cada vez más exigentes que se aplican para su aprobación y a la creciente predisposición a ensayar moléculas que encierran mayores riesgos. Por otro lado, las compañías farmacéuticas más grandes han desplazado su interés hacia el desarrollo de fármacos destinados al tratamiento de dolencias crónicas, y los ensayos clínicos resultan más costosos que los que se llevan a cabo con fármacos empleados en enfermedades agudas. Los fármacos modificados incrementalmente son aquellos cuya manufactura se ha modificado para mejorar algún aspecto como seguridad, efectividad o facilidad de uso. El desarrollo de fármacos modificados incrementalmente es, generalmente, menos oneroso, aunque esto depende de que sea necesario o no llevar a cabo ensayos clínicos y de la envergadura de éstos. Los fármacos modificados comprenden el 66% de los aprobados por la US-Food and Drug Administration (US-FDA) pero sólo representan un 33% de los gastos en Investigación y Desarrollo (I+D) de la industria farmacéutica [5].

Otro obstáculo relevante es que las diferentes moléculas con acción farmacológica despliegan diversas desventajas biofarmacéuticas que afectan a su eficiencia. Entre ellas, cabe mencionar la baja solubilidad en agua, la inestabilidad fisicoquímica en el entorno biológico, el tiempo de vida media corto y los efectos adversos graves, entre otros. Por ejemplo, más del 50% de los fármacos actualmente comercializados y aproximadamente el 70% de las nuevas entidades químicas son hidrofóbicas y, en consecuencia, pobremente solubles en agua [6-8], lo cual plantea desafíos en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas que aseguren la adecuada disolución y biodisponibilidad.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica agrupa a los fármacos hidrofóbicos en dos clases, Clase II y Clase IV [9,10]. Los de Clase II presentan alta permeabilidad a través de mucosas, mientras que la permeabilidad de los de Clase IV es baja. Un aumento de la solubilidad puede resultar en una mejora de la biodisponibilidad oral, sobre todo en el caso de los fármacos de Clase II.

La nanotecnología ha generado la capacidad de manipular, controlar y caracterizar de forma exhaustiva las estructuras a nivel nanométrico. En este contexto, se han desarrollado diversas estrategias de formulación para optimizar las propiedades biofarmacéuticas de fármacos y de nuevas entidades químicas [11-14] y así alcanzar la adecuada liberación temporal y espacial de los fármacos, reduciendo la exposición sistémica a agentes tóxicos y la aparición de efectos adversos, mejorando el índice terapéutico. Por ejemplo, gracias a su pequeño tamaño, los nanotransportadores se pueden acumular de forma preferente en tumores sólidos altamente vascularizados; un fenómeno que se conoce como efecto de permeación y retención aumentadas (EPR, del inglés *enhanced permeation and retention effect*) [15,16]. Desde los primeros trabajos sobre liposomas publicados hace casi cuatro décadas [17] se han diseñado, desarrollado y evaluado preclínica y clínicamente una gran variedad de nanotransportadores lipídicos, poliméricos y metálicos [18-22]. Unos pocos han alcanzado ya el mercado [18-22].

Entre los nanotransportadores poliméricos más populares destacan las nanopartículas poliméricas [23,24], los dendrímeros [25,26] y sistemas

auto-ensamblables como micelas poliméricas [27,28] y más recientemente vesículas poliméricas o polimersomas [29,30]. Esta explosión en el desarrollo de sistemas transportadores de fármaco innovadores ha dado lugar a una extensa propiedad intelectual, expresada por el aumento pronunciado en el número de solicitudes de patente durante el último decenio [20].

Las micelas poliméricas combinan características únicas que las convierten en nanotransportadores de fármacos muy versátiles. Sin embargo, y a pesar de sus aplicaciones potenciales en el desarrollo de medicamentos innovadores, todavía son escasamente utilizadas y sólo unos pocos productos han alcanzado las etapas clínicas avanzadas [31]. Este capítulo se inicia con la descripción de los aspectos fundamentales de producción y caracterización de micelas poliméricas, señalando sus principales ventajas e inconvenientes. A continuación, se discuten las aplicaciones más recientes de micelas poliméricas sensibles al pH, la temperatura y otros estímulos, incluyendo sistemas multisensibles, para cesión controlada y vectorización de fármacos.

5.2. Micelas poliméricas

Las micelas poliméricas son estructuras que se forman espontáneamente mediante auto-ensamblado de moléculas poliméricas anfifílicas (generalmente copolímeros bloque), una vez que se supera la concentración micelar crítica (CMC), y pueden alcanzar tamaños de hasta varios cientos de nanómetros [27]. Los bloques hidrofóbicos se asocian para formar un dominio interno denominado núcleo micelar, que es capaz de solubilizar y albergar fármacos liposolubles, mientras que los bloques hidrofílicos conforman una corona que se encuentra en contacto directo con el medio externo, usualmente acuoso, estabilizando físicamente la micela [28]. Además, la encapsulación del fármaco dentro de la micela previene su interacción con el medio externo, aumentando su estabilidad fisicoquímica. La corona también constituye la interfase entre el reservorio de fármaco y el medio. Por ello, dependiendo de propiedades como micro-viscosidad, espesor y porosidad y de la interacción fármaco/núcleo,

la cesión del fármaco encapsulado será más o menos rápida. La CMC, el número de agregación (número de moléculas de polímero por micela), el tamaño micelar, el tamaño del núcleo y la morfología de la micela dependen de la longitud de los bloques y del balance hidrofilia-lipofilia (HLB). La molécula de polímero anfifílico puede ser diseñada para ajustar estas propiedades a requerimientos específicos.

Además, el pequeño tamaño de las micelas poliméricas determina que se acumulen en tumores altamente vascularizados por el efecto EPR (vectorización pasiva) [31]. La superficie de la micela se puede “decorar” con ligandos con el fin de que puedan ser reconocidas por receptores celulares específicos y captadas selectivamente por células concretas. Esta aproximación se conoce como vectorización activa [32,33]. Finalmente, algunos polímeros pueden disminuir, cuando se encuentran individualizados (unímeros), la expresión de genes que codifican para la producción de bombas de eflujo de la superfamilia ABC (del inglés *ATP-binding cassette*) [34] y consecuentemente inhibir su actividad [35-38]. Estas bombas expulsan moléculas de fármaco en contra del gradiente de concentración y están asociadas a fenómenos de multi-resistencia a fármacos (MDR, del inglés *multidrug resistance*). La capacidad para inhibir las bombas de eflujo está gobernada por propiedades como peso molecular, HLB y arquitectura molecular y no todos los copolímeros anfifílicos formadores de micelas la despliegan. Además, existen al menos 48 transportadores ABC, siendo algunos copolímeros efectivos sobre unos pero no sobre otros.

Las micelas poliméricas se pueden administrar por vía oral [39,40], ocular [41,42] y más comúnmente parenteral [27] y presentan una toxicidad más baja que las micelas de tensoactivos comunes [43]. También, son físicamente más estables frente a la dilución, manteniéndose agregadas aún después de ser diluidas hasta concentraciones finales por debajo de la CMC. Esto contribuye a que mantengan su integridad durante un tiempo más prolongado cuando se encuentran en el torrente circulatorio. Por el contrario, las micelas de tensoactivos comunes se desagregan con facilidad, liberando instantáneamente el fármaco encapsulado al medio. La estabilidad física de las micelas poliméricas frente a la dilución depende de la diferencia entre la CMC y la concentración final, el peso molecular

y el HLB del polímero, y también de la naturaleza del fármaco encapsulado. Por ejemplo, efavirenz (EFV) [44] e ibuprofeno [45] favorecen la auto-agregación del copolímero y disminuyen la CMC.

5.2.1. Encapsulación de fármacos en micelas poliméricas

La capacidad de las micelas poliméricas para encapsular un fármaco determinado se puede expresar de diversas formas. Las más comunes son:

- (i) La relación entre las cantidades de fármaco dentro y fuera de la micela, denominada coeficiente de reparto micela-agua; en este caso, la cantidad de fármaco no encapsulado se estima a partir de la solubilidad intrínseca en el mismo medio sin las micelas [46,47].
- (ii) El número de moles de fármaco solubilizados por gramo de bloque hidrofóbico.
- (iii) La relación de solubilización molar (MSR, del inglés *molar solubilization ratio*) que es la relación molar fármaco/copolímero.

Algunos copolímeros en concentraciones inferiores a la CMC aumentan levemente la solubilidad acuosa de fármacos a través de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, etc., pero su contribución es muy inferior a la de las micelas [48]. La incorporación de una molécula al núcleo micelar es un proceso complejo que depende de parámetros moleculares y fisicoquímicos tanto de la micela como del fármaco. En lo que se refiere al copolímero, las propiedades más relevantes son el peso molecular y el HLB. Para pesos moleculares similares, los copolímeros más hidrofóbicos generan núcleos de mayor tamaño y con mayor capacidad de encapsulación. Si los valores de HLB similares, los copolímeros de mayor peso molecular son los más eficientes. La arquitectura molecular y el ordenamiento de los bloques hidrofílicos e hidrofóbicos a lo largo de la cadena polimérica también pueden afectar a la encapsulación. Por último, propiedades del fármaco como peso molecular, volumen, lipofilia (coeficiente de reparto, $\log P$), punto de fusión, tendencia a la agregación y presencia de grupos funcionales

específicos que puedan interactuar con la micela también condicionan su incorporación a la misma. En cualquier caso, el comportamiento de cada copolímero debe ser investigado para cada fármaco en particular.

La intensidad de las interacciones entre las moléculas de fármaco afecta considerablemente a su solubilidad. Cuando las fuerzas intermoleculares son muy intensas, los sólidos presentan temperaturas de fusión (T_f) elevadas. La solubilización requiere el establecimiento de interacciones soluto-disolvente de mayor intensidad que las fuerzas soluto-soluto. En el caso particular de la solubilización micelar, las interacciones fármaco-micela desempeñan un papel fundamental. Cuanto más intensas sean éstas, mayor será la capacidad de solubilización de las micelas. En general, fármacos con T_f baja se encapsulan más eficientemente. Este fenómeno se puso claramente de manifiesto con dos fármacos antibacterianos, triclosano (289,5 g/mol; $T_f = 55-57^\circ\text{C}$) y triclocarban (315,6 g/mol; $T_f = 255^\circ\text{C}$), que se encapsularon en micelas de diferentes copolímeros ramificados de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) de la familia de las poloxaminas [49,50]. Los sistemas cargados con triclosano fueron muy estables físicamente manteniéndose en estado coloidal durante más de tres meses [49], mientras que en los cargados con triclocarban, el fármaco experimentó un proceso de cristalización y precipitó parcialmente al cabo de un mes debido a la formación de intensas uniones intermoleculares [50].

5.2.2. Preparación y caracterización de micelas poliméricas

Dependiendo de las propiedades del polímero y del fármaco, se puede acudir a diferentes técnicas de preparación (Figura 5.1) [51,52].

El método directo o de equilibrio simple consiste en preparar primero las micelas disolviendo el copolímero en agua, estabilizar la suspensión micelar a una temperatura adecuada y por último añadir el fármaco al medio, para que se incorpore a las micelas dando lugar a un sistema generalmente translúcido. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio suele estar comprendido entre 48 y 72 h. Cuando la capacidad de encapsulación de un determinado fármaco no se conoce, el fármaco se

añade en exceso para facilitar la saturación de las micelas. El fármaco no solubilizado se elimina por filtración. La carga de fármaco dentro de las micelas se determina por una técnica analítica adecuada como espectrofotometría UV-visible o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El método directo es el más simple y se suele utilizar en el caso de copolímeros con bloques de hidrofobicidad intermedia, como por ejemplo PPO, y fármacos de peso molecular medio o bajo, pues no requiere el uso de disolventes orgánicos que deben ser posteriormente eliminados. Sin embargo, en el caso de copolímeros con bloques hidrofóbicos más insolubles que no pueden ser solubilizados directamente en agua, hay que disolver inicialmente el copolímero y el fármaco en un medio orgánico miscible con el agua y a continuación mezclar esta disolución con una fase acuosa. Una vez formadas las micelas se elimina el disolvente orgánico por diálisis o evaporación. En este caso, la concentración máxima de copolímero que se puede alcanzar es relativamente baja (1 a 2%) ya que a concentraciones altas el copolímero tiende a precipitar. También se pueden aplicar metodologías más innovadoras para producir micelas poliméricas como la microfluídica [53], si bien pequeños cambios en el procedimiento pueden dar lugar a modificaciones notables en la carga de fármaco y en el tamaño y la distribución de tamaños y la estabilidad fisicoquímica de las micelas [54,55]. Para seleccionar el procedimiento más adecuado, hay que prestar también atención a las posibilidades de escalado.

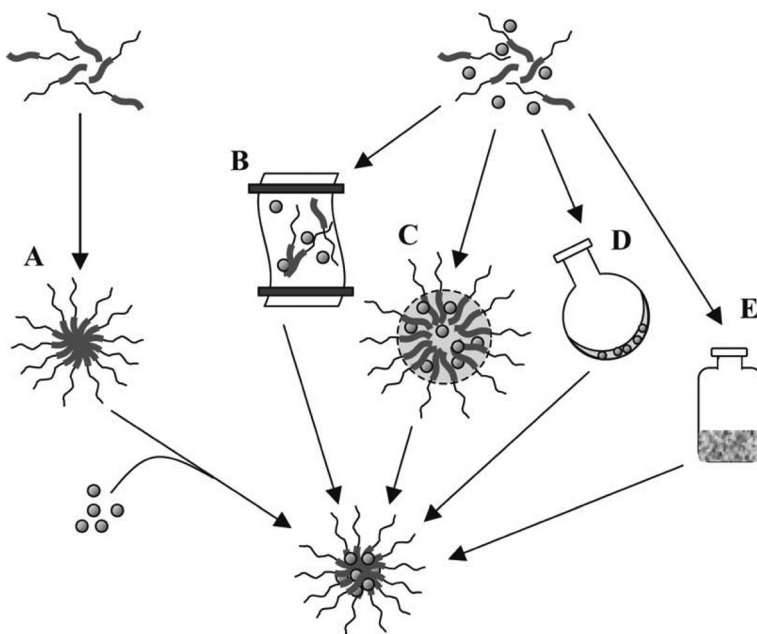


Figura 5.1. Métodos de preparación de micelas poliméricas cargadas con fármaco: (A) equilibrio simple (método directo), (B) diálisis, (C) emulsión aceite-en-agua, (D) hidratación de película y (E) liofilización. Reproducido de la Referencia 52 con permiso de Elsevier.

El estudio de los fenómenos de agregación y de propiedades de las micelas poliméricas prístinas y cargadas con fármaco, como número de agregación, tamaño hidrodinámico, distribución de tamaños (polidispersión) y morfología, constituye un aspecto crucial para comprender el comportamiento fisicoquímico y biológico de estos nanotransportadores. La CMC se puede determinar empleando diferentes técnicas como medidas de tensión superficial, cambios en los patrones de emisión de colorantes fluorescentes como pireno, difracción dinámica de luz láser (DLS, del inglés *dynamic light scattering*) o calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés *differential scanning calorimetry*) [56-58]. Cada una de estas técnicas se basa en la medida de un fenómeno diferente y su sensibilidad es también distinta, con lo que se suelen obtener valores de CMC no coincidentes [59]. No obstante, en general, los valores están en el mismo orden de magnitud, independientemente del método que se use. Además,

cambios en las condiciones en que se lleva a cabo la determinación, como temperatura, pH, presencia de moléculas orgánicas pequeñas y electrolitos, pueden afectar al resultado de las determinaciones [60], por lo que los estudios de caracterización deben ser lo más amplios que sea posible para permitir futuras comparaciones entre diferentes sistemas micelares. Otro parámetro útil para caracterizar para anfólitos poliméricos termosensibles es la temperatura micelar crítica (CMT, del inglés *critical micellar temperature*) que se define como la temperatura mínima a la que se forman micelas para una concentración de copolímero determinada. Este parámetro se suele determinar por DSC, observándose la transición endotérmica que se produce en el momento de la autoagregación [61] o por DLS en equipos que permiten un adecuado control de la temperatura.

El número de agregación es el número de moléculas de copolímero anfifílico que conforman una micela una vez superada la CMC y su valor determina el tamaño del núcleo, de la corona y en consecuencia de la micela. En general, el número de agregación se mantiene constante bajo condiciones determinadas y si aumenta la concentración de copolímero, se incrementa el número de micelas en la dispersión. Sin embargo, en algunos casos, se pueden producir fenómenos de agregación secundaria o fusión micelar que dan lugar a micelas de mayor número de agregación y tamaño. Si bien una de las técnicas más difundidas para su determinación es la difracción estática de luz láser (SLS, del inglés *static light scattering*) [59,62], también se han reportado estudios empleando colorantes fluorescentes como por ejemplo 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno [63]. Además, se puede acudir a equipos más sofisticados que permiten cuantificar el número de nanoestructuras por unidad de volumen, como NanoSight® con *Nanoparticle Track Analysis* (NTA, NanoSight®) [64], aunque sus capacidades y limitaciones han sido aun poco exploradas. Por otro lado, la carga superficial de las micelas se puede estimar a través de medidas de potencial zeta.

El tamaño hidrodinámico y la polidispersión pueden afectar la estabilidad física, la interacción con células y la biodistribución de las micelas en el organismo. Para evaluar este aspecto, una de las técnicas más versátiles y rápidas es el DLS [65]. La microscopía electrónica de transmisión

(TEM, del inglés *transmisión electrón microscopy*) puede complementar dicho análisis y además aportar información sobre la morfología de las mismas. El contraste entre las micelas y el medio dispersante debe ser suficientemente intenso para permitir la visualización, por lo que se puede requerir la tinción negativa de las micelas con acetato de uranilo o ácido fosfotúngstico. Por otro lado, el estudio de las muestras en condiciones criogénicas (cryo-TEM) en torno a -196°C permite en algunos casos la visualización detallada de subestructuras (por ejemplo, la corona y el núcleo) dentro de la micela (Figura 5.2) [66].

La estabilidad física de las micelas se puede monitorizar midiendo el tamaño hidrodinámico y la distribución de tamaños a distintos tiempos. Los fenómenos de inestabilidad se manifiestan por un aumento del tamaño y de la polidispersión. Una metodología complementaria que permite determinar el peso molecular de micelas poliméricas y a partir de él, el número de agregación es la cromatografía de permeación de geles (GPC, del inglés *gel permeation chromatography*) [67-69].

Otras técnicas han sido menos utilizadas a pesar de que aportan información valiosa sobre las cualidades de las micelas, entre las que destacan las medidas de (i) punto de enturbiamiento (del inglés *cloud point*), (ii) microfluidez y micropolaridad de la corona y del núcleo, que pueden condicionar la capacidad de encapsulación y la cinética de liberación del fármaco, y (iii) difusión. La resonancia de espín electrónico (ESR, del inglés *electrón spin resonance*) permite evaluar cambios en la fluidez y la polaridad del microentorno de un marcador que cuenta con un radical libre que se incorpora a la micela [70-72]. Chiappetta y colaboradores emplearon esta técnica para estudiar la formación y las propiedades de micelas poliméricas puras y mixtas de diferentes copolímeros lineales y ramificados de PEO-PPO [72]. En este estudio se seleccionó inicialmente el marcador hidrosoluble 2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil (TEMPO) pero no se incorporó a las micelas. En consecuencia, se reemplazó por marcadores anfífilos derivados del ácido esteárico que presentan el radical libre en diferentes posiciones a lo largo de la cadena del ácido graso; 5-doxil ácido esteárico (5DSA) y 16-doxil ácido esteárico (16DSA) con el radical libre cerca de la cabeza polar y la cola hidrofóbica, respectivamente (Figura 5.3) [73].

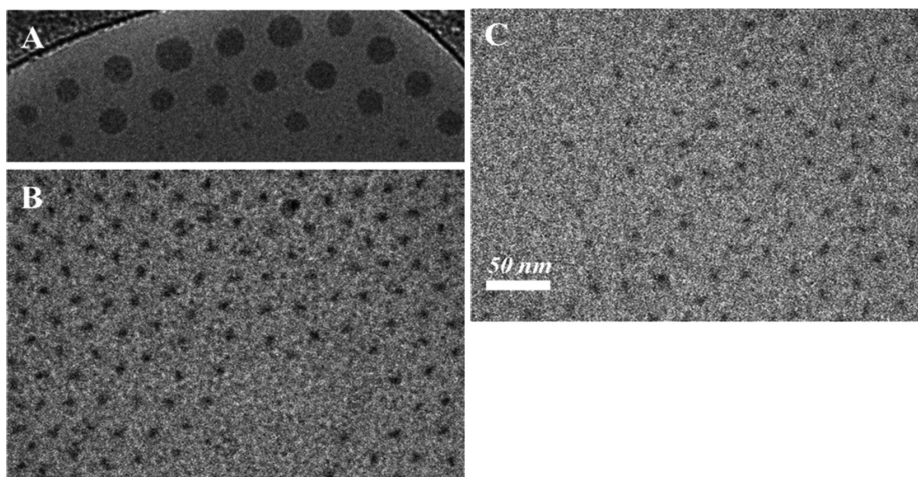


Figura 5.2. Micrografías Cryo-TEM de micelas poliméricas de copolímeros poli(etilenglicol) y ácido poli(láctico) sin fármaco (A,B) y cargadas con haloperidol (C). Reproducido de la Referencia 66 con permiso de American Chemical Society.

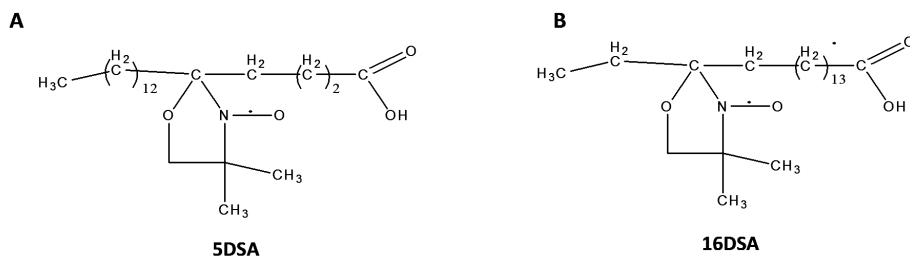


Figura 5.3. Estructura molecular de (A) 5-doxil ácido esteárico (5DSA) y (B) 16-doxil ácido esteárico (16DSA) [73].

Los cambios en la fluidez de la micela se manifestaron por el ensanchamiento de los tres picos de resonancia simétricos que son característicos del marcador en agua (donde la molécula se mueve libremente) y dieron lugar a modificaciones del valor del parámetro $2T_L$ que indicaron una pérdida de movilidad. Por otra parte, los cambios en la polaridad modificaron la constante de acoplamiento hiperfina, a_N (Figura 5.4) [72]. La interacción entre la micela y la molécula de marcador no se debe alterar por la posición del radical libre. No obstante, la sensibilidad del método no siempre es adecuada para revelar cambios en las propiedades de las micelas [73].

El punto de enturbiamiento es la temperatura a la que se insolubiliza el copolímero en un medio acuoso, separándose como una segunda fase y precipitando [74,75]. Este fenómeno da lugar a la aparición de una turbidez que se puede detectar visual o espectrofotométricamente a 550-600 nm [75]. Finalmente, una técnica que puede evidenciar cambios en fenómenos estructurales, de dinámica de difusión desde y hacia la micela y de localización del fármaco encapsulado es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones ($^1\text{H-NMR}$) convencional y en su modalidad de difusión (del inglés *self-diffusion*) [76-78]. La desaparición parcial o total de las señales del fármaco en el espectro cuando las determinaciones se realizan en D_2O revela que el fármaco se ha incorporado al núcleo micelar. Por el contrario, si la molécula de fármaco se aloja en la corona, la desaparición de las señales es menos pronunciada o no ocurre. La interacción del fármaco con el copolímero también se puede caracterizar a través de los cambios que se producen en las isothermas de presión *versus* área molecular (π -A) utilizando una balanza de tensiones superficiales [79]. La Tabla 5.1 resume los métodos más comunes para la caracterización de micelas poliméricas.

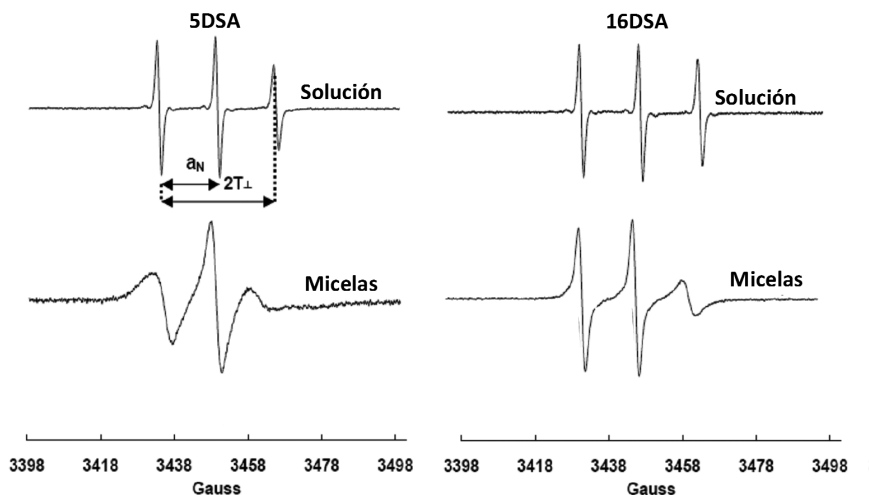


Figura 5.4. Espectros ESR de 5DSA y 16DSA en disolución tampón y en micelas poliméricas del derivado lineal de PEO-PPO-PEO Pluronic® F127. Reproducido y adaptado de la Referencia 72 con permiso de Elsevier.

Tabla 5.1. Técnicas más comunes de caracterización de micelas poliméricas.

Técnica	Parámetro
DLS	Tamaño hidrodinámico, polidispersión, CMC,
SLS	Número de agregación, tamaño de núcleo, corona y micela
Análisis térmico (DSC, micro-DSC)	CMC, CMT
NTA	Tamaño hidrodinámico, polidispersión, cantidad por unidad de volumen
ESR	Microfluidez y micropolaridad
GPC	Peso molecular y número de agregación
Espectrofotometría visible	Punto de enturbiamiento
Espectrofotometría de fluorescencia	CMC
¹ H-NMR	Encapsulación de fármaco
TEM, cryo-TEM	Morfología, tamaño
Tensión superficial	CMC
Potencial zeta	Carga superficial
Balanza de tensión superficial	Conformación de los unímeros e interacción con el fármaco en la interfase, y predicción de la localización del fármaco en las micelas.

5.2.3. Estabilidad física y estabilización de las micelas poliméricas

Una de las limitaciones más importantes de las micelas poliméricas es su tendencia a desagregarse cuando se diluyen en el medio biológico. Este fenómeno es independiente de la vía de administración, excepto en lo que se refiere al volumen en que se produce la dilución. Una vez desagregadas, las micelas liberan el fármaco encapsulado, que podría llegar a precipitar. Si bien el sistema es termodinámicamente inestable por debajo de la CMC, la cinética de desagregación depende de propiedades del copolímero tales como peso molecular, HLB, cristalinidad del núcleo micelar y cohesión [80,81]. Como ya se ha señalado, algunos fármacos inducen la agregación del copolímero a concentraciones menores que las observadas en sistemas libres de fármaco [44,45]. Para un peso molecular similar, la estabilidad de micelas de copolímeros hidrofílicos es menor que la de los más hidrofóbicos. Esto se debe a que la diferencia entre la concentración final y la CMC luego de la dilución suele ser mayor. Con el objetivo de disminuir la CMC y aumentar la estabilidad física en dilución, algunos grupos han desarrollado derivados anfifílicos más hidrofóbicos sustituyendo bloques de hidrofobicidad intermedia (PPO)

por otros altamente hidrofóbicos como poli(óxido de estireno), poli(óxido de butileno) y poli(glicidil éter) [82-87]. Sin embargo, el diseño y el ajuste de las propiedades moleculares no es un proceso simple, ya que un aumento excesivo de la hidrofobicidad puede dificultar notablemente la dispersión coloidal. Además, hay que tener en cuenta las propiedades intrínsecas del fármaco, que puede desestabilizar [49,50,88] o estabilizar [44] la micela una vez encapsulado. Por ello, es importante estudiar las características de la micela en el momento de la preparación y también en el transcurso del tiempo bajo condiciones de temperatura y dilución relevantes para las aplicaciones clínicas (por ejemplo, pH ácido y neutro si se trata de una formulación para vía oral).

Para preparar micelas con mayor estabilidad física y prevenir la desagregación causada por la dilución, se puede modificar químicamente el copolímero o entrecruzar física o químicamente el núcleo o la corona [89]. Ambas aproximaciones cuentan con ventajas y desventajas. El entrecruzamiento del núcleo conserva la funcionalidad de los grupos terminales en la superficie de la micela y permite la conjugación de ligandos de reconocimiento útiles para la vectorización activa a células y tejidos específicos [90-94]. Sin embargo, este procedimiento reduce de forma pronunciada la porosidad del núcleo y en consecuencia la capacidad para cargar de fármacos. El entrecruzamiento de la corona requiere la presencia de grupos terminales reactivos en el bloque hidrofílico que permitan su acoplamiento con agentes bifuncionales o a través de reacciones de polimerización de radicales libres. En este caso, el entrecruzamiento modifica la porosidad y la permeabilidad de la corona, lo que también puede afectar a la capacidad de encapsulación y la cinética de liberación [95-98]. Este aspecto es particularmente interesante ya que ofrece la posibilidad de preparar micelas con una corona capaz de controlar la liberación. El entrecruzamiento covalente es más estable, pero puede comprometer la eliminación del nanotransportador una vez cumplida su función, por lo que en el diseño se debe prestar atención a los posibles problemas de biocompatibilidad y acumulación en el organismo que pueden plantearse [81]. Esta limitación se puede salvar utilizando sistemas biodegradables [99-102]. Por otro lado, es im-

portante señalar que la estabilización de las micelas y la prolongación del tiempo de circulación no implican necesariamente un aumento de la eficacia del tratamiento, como se explica en el apartado siguiente [103].

5.2.4. Micelas poliméricas sensibles al pH

Si se pretende que las micelas dirijan el fármaco y lo cedan en un determinado tejido o en el interior de células afectadas por una determinada patología, no deben ceder el fármaco prematuramente durante su desplazamiento por el organismo; es decir, deben actuar como barreras eficaces que impidan la salida del fármaco de su interior. Por el contrario, cuando llegan al órgano diana (por efecto EPR o por vectorización activa) deben ceder el fármaco a una velocidad suficientemente rápida para que se alcancen concentraciones terapéuticas. Una cesión de fármaco muy lenta puede no sólo resultar ineficaz, sino que puede dar lugar a la aparición de células resistentes (no sensibles) al fármaco, principalmente en el caso de tumores y de procesos infecciosos. Para compatibilizar las premisas “mínima pérdida de fármaco antes de alcanzar el tejido diana” y “cesión rápida una vez que haya llegado a él”, la micela debe incorporar componentes que causen una desestabilización muy rápida en el tejido diana. Esto se consigue con polímeros que incorporan grupos sensibles a ciertas variables internas (temperatura, pH, iones) o externas (luz, campo magnético, ultrasonidos) al organismo (Figura 5.5) [104]. La cesión se puede completar en una única descarga o ajustarse a secuencias pulsátiles, dependiendo de las necesidades terapéuticas. Los nanotransportadores que responden a estímulos de una manera predecible y reproducible se denominan inteligentes por su capacidad para reproducir, en mayor o en menor medida, el comportamiento propio de los sistemas biológicos, haciendo posible que se active o se module la liberación del fármaco en respuesta a señales emitidas desde el exterior o por efecto de cambios en el entorno biológico. El nivel de desarrollo que han alcanzado los procedimientos de síntesis y las técnicas analíticas permite obtener y caracterizar exhaustivamente polímeros con capacidad para desempeñar funciones que hasta hace pocos años eran difíciles de imaginar [105].

Como se comentó en apartados anteriores, las micelas poliméricas se forman espontáneamente en medio acuoso por autoasociación de copolímeros anfífilicos (unímeros). La autoasociación se debe, sobre todo, a las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre los grupos apolares de diferentes cadenas cuando se supera la CMC, si bien las interacciones electrostáticas y la formación de estereocomplejos también pueden tener una intervención relevante. La introducción de grupos con funcionalidades específicas en los unímeros puede conducir a la obtención de micelas inteligentes, que mantienen el fármaco atrapado en su interior hasta que, por efecto de un cambio en las condiciones fisiológicas o fisiopatológicas del entorno o por un estímulo externo, se altera la hidrofilia o la conformación de los unímeros. El número de micelas que se desagregan o se desestabilizan, y consecuentemente el perfil de liberación, depende de la intensidad del estímulo. Una vez que el estímulo cesa, se reconstituyen las micelas y se interrumpe la cesión.

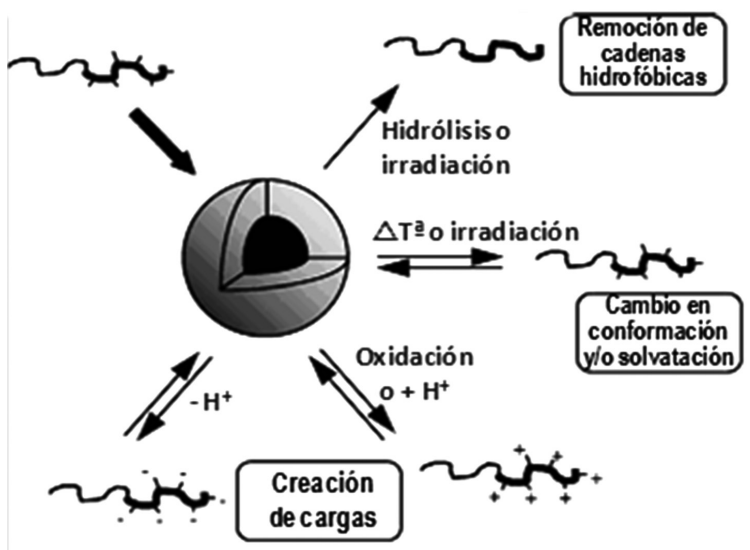


Figura 5.5. Esquema de una micela sensible a diferentes estímulos y mecanismo de respuesta que da lugar a la separación de los unímeros. La hidrofobicidad de los segmentos de polímero que forman el núcleo micelar se puede alterar por diversos mecanismos: modificación del grado de ionización inducida por un cambio de pH o del estado de oxidación, rotura o formación de puentes de hidrógeno inducida por un cambio de temperatura, o alteración conformacional inducida, por ejemplo, por la luz. También se puede producir un cambio de polaridad por una reacción de hidrólisis, si bien en este caso el proceso es irreversible.

Un los estímulos internos que resulta particularmente útil para regular la cesión del fármaco son los cambios de pH. Además de las diferencias características del tracto gastrointestinal, en otras zonas del organismo existen marcados gradientes de pH. Por ejemplo, el pH extracelular de los tejidos tumorales (7,0) es ligeramente inferior al de la sangre y los tejidos sanos (7,4) [106]. Además, en el interior de la célula las diferencias de pH entre el citosol (7,4), el endosoma (5,5-6,0) y los lisosomas (5,0) son considerables. Para dotar a las micelas poliméricas de propiedades de liberación modulables por cambios de pH, se incorporan a su estructura polímeros con grupos ionizables. Una modificación del pH, en torno al pK_a de uno de estos grupos, afectará de una manera muy importante a su grado de ionización y a su estado de hidratación. La ionización genera fuerzas electrostáticas repulsivas que pueden conducir a la desestabilización del núcleo de la micela. El pH crítico desencadenante de la respuesta se puede ajustar a las necesidades de cada aplicación concreta modificando el pK_a de los grupos ionizables mediante la incorporación de co-monómeros hidrofóbicos [107]. Por ejemplo, para conseguir una liberación selectiva en tejidos tumorales, se han ensayado micelas constituidas por copolímeros anfífilicos que contienen grupos amino en uno de sus bloques. Estas micelas pueden responder a cambios de pH en un intervalo muy estrecho. En un medio de pH superior al pK_a , los bloques no están ionizados y se comportan como hidrofóbicos, pudiendo formar el núcleo micelar. Cuando el pH baja y los grupos se protonizan, se incrementa la hidrofilia y la micela se rompe. Así, poli(2-vinilpiridina)-b-poli(óxido de etileno) P2VP-b-PEO, poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato)-b-poli(óxido de etileno) PEO-DMAEMA, poli(óxido de etileno)-b-poli(L-histidina) PEG-b-PLH, y PEG-b-poli(ácido aspártico) se autoagregan en medios de pH mayor o igual a 7 y experimentan una desmicelización reversible cuando el medio se hace ligeramente ácido. Las micelas de estos polímeros retienen el fármaco mientras se encuentran en el torrente circulatorio (pH 7,4), se acumulan en los tejidos tumorales por efecto EPR, penetran en las células por endocitosis y ceden el fármaco en los endosomas o en los lisosomas (pH 5-6) [107], como se esquematiza en la Figura 5.6. La cesión selectiva que se consigue con estos sistemas micelares puede contribuir a mejorar la eficacia de los tratamientos anti-

neoplásicos, reduciendo al mismo tiempo sus efectos secundarios. Así, en un ensayo *in vivo* llevado a cabo con micelas de PEG metilester-b-poli(β -amino ester) MPEG-PAE, se comprobó que las micelas podían solubilizar y proteger eficazmente el agente antitumoral camptotecina en su interior y dar lugar a una acumulación del fármaco en el tejido tumoral mucho más alta que la que proporcionan micelas que no responden a cambios de pH [108]. En comparación con los liposomas que están ya comercializados como portadores de estos fármacos, las micelas poliméricas son más estables frente a la dilución y, por su menor tamaño, penetran más eficazmente en pequeños tumores sólidos y zonas avasculares, como las áreas cerebrales isquémicas que se caracterizan por presentar un ambiente ácido [109,110].

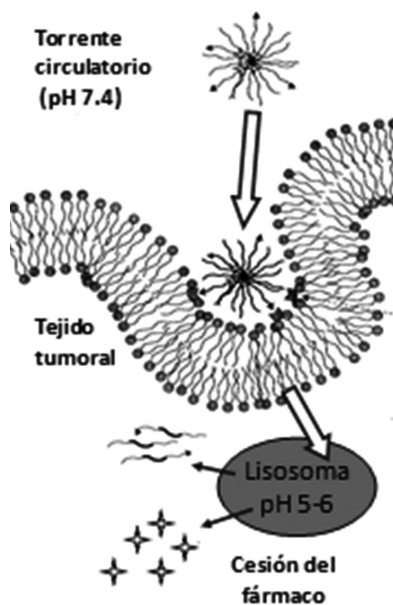


Figura 5.6. Acumulación de micelas en tejido tumoral, penetración en las células por endocitosis y cesión del fármaco en los endosomas o en los lisosomas.

Las micelas de copolímeros con grupos ionizables también tienen un gran potencial como vectores en terapia génica. ADN y ARN de interferencia (conocido como siRNA) pueden interactuar con los grupos amino del copolímero, formando un complejo hidrofóbico que es englobado en

las micelas (miceliplejo), que lo protegen de la acción degradativa de las enzimas. Por ejemplo, las micelas de copolímeros PEG-*b*-PMPA-*b*-PLL constituidos por un bloque de poli(etilenglicol), otro de poli(3-morfolinopropil) aspartamida de pK_a bajo, y un tercer bloque de poli(l-lisina) de pK_a más alto para condensar ADN, mostraron una excelente capacidad para cargar material genético y cederlo en el interior de las células respondiendo a los cambios de pH del microentorno (Figura 5.7) [111]. Recientemente, micelas de dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA), ácido acrílico y butilmetacrilato conteniendo siRNA mostraron mayor eficacia de transfección y menor toxicidad que los poliplejos convencionales [112].

Por otra parte, para dotar a las micelas de comportamiento inverso frente al pH, es decir, para que mantengan su estabilidad en medio ácido y se desagreguen en medio básico, se pueden incorporar grupos ácido débil a la estructura del copolímero. Estos sistemas pueden ser útiles para administrar por vía oral fármacos hidrofóbicos con problemas de estabilidad en el entorno gástrico o para conseguir una cesión selectiva en zonas específicas del aparato digestivo. Por ejemplo, se ha conseguido incrementar considerablemente la biodisponibilidad del fenofibrato incorporándolo a micelas de poli(etilenglicol)-*b*-poli(alquil acrilato-co-ácido metacrílico) [113].

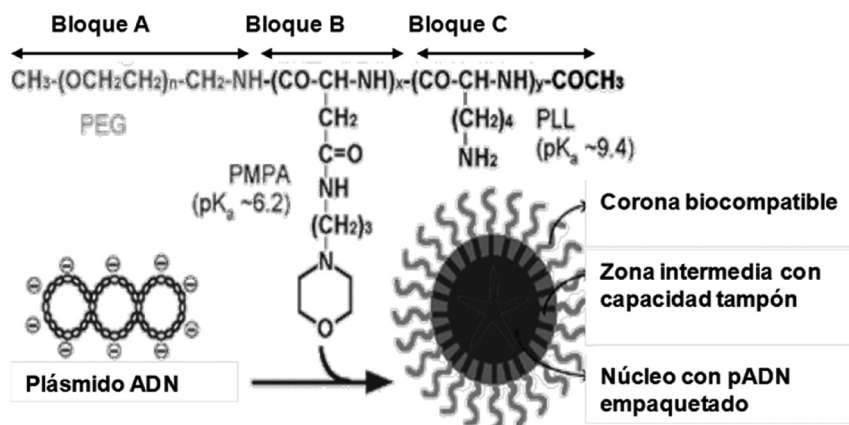


Figura 5.7. Copolímero útil para formar miceliplejos que responden a cambios de pH. Adaptado de la referencia 111 con permiso. Copyright (2005) American Chemical Society.

5.2.5. Micelas poliméricas sensibles a la temperatura

La hidrosolubilidad de los polímeros convencionales se incrementa a medida que sube la temperatura. En cambio, los polímeros termosensibles que se utilizan para preparar sistemas inteligentes se mantienen hidratados y con las interacciones intra- e interpoliméricas minimizadas por debajo de su Temperatura Crítica de Disolución (LCST, del inglés *Lower Critical Solution Temperature*). Cuando se supera este valor crítico, los puentes de hidrógeno polímero-agua se destruyen, se intensifican las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas, y el agua se expulsa del entramado. La LCST es característica de cada polímero pero se puede incrementar o reducir introduciendo en su estructura grupos hidrofílicos o grupos hidrofóbicos. La transición de fases inversa -que fue puesta de manifiesto experimentalmente por primera vez en 1978 por Toyochi Tanaka con poli(N-isopropilacrilamida), PNIPAAm [114]- se debe a un cambio conformacional en las cadenas que, de una disposición espacial expandida (estado soluble), pasan a otra contraída (conformación globular o estado insoluble). Para obtener micelas poliméricas sensibles a cambios de temperatura, se utilizan copolímeros anfifílicos con PNIPAAm o algún componente de la larga lista de polímeros con LCST de la que se dispone en la actualidad, entre los que cabe destacar poli(metil vinil eter) (PMVE), poli-N-vinilcaprolactama (PVCL), y copolímeros bloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) [115-117]. Por ejemplo, se ha diseñado un copolímero constituido por bloques de poli(ácido láctico) y de PNIPAAm copolimerizado con dimetilacrilamida, PLA-b-(PNIPA-co-DMAAm), que presenta una LCST próxima a 40°C. Las micelas de este copolímero cargadas con doxorubicina ceden muy lentamente el fármaco a 37°C, pero lo liberan con rapidez si la temperatura se eleva hasta 42°C [118]. Estas micelas pueden servir para desarrollar sistemas inteligentes útiles en la liberación sistémica de fármacos inducida por una hipertermia generalizada y también para conseguir una liberación localizada en procesos que cursen con hipertermia en un área específica (por ejemplo, un órgano inflamado o un tumor). La liberación también se puede desencadenar aplicando calor en una zona delimitada con ayuda de una fuente externa.

Para modular externamente la cesión, sin que influyan en el proceso los cambios de temperatura que se producen en el organismo, se han desarrollado micelas poliméricas que incorporan partículas de oro. Cuando se someten a irradiación local utilizando una fuente de luz laser, las partículas metálicas absorben la radiación infrarroja (1064 nm) y la temperatura del microentorno se eleva. De esta manera se puede conseguir una liberación pulsátil de fármacos convencionales o de proteínas [119].

5.2.6. Micelas poliméricas sensibles a otros estímulos

Un estímulo interno que ofrece grandes posibilidades para cesión selectiva en el interior de las células es la concentración de glutatión (GSH). Los compartimentos intracelulares (citósol, mitocondrias y núcleo) presentan niveles de GSH mucho más altos que el fluido extracelular (2-10 mM *versus* 2-20 μ M) [120]. Los copolímeros bloque que contienen enlaces disulfuro (-S-S-) experimentan reacciones de reducción en presencia de GSH, dando lugar a grupos -SH terminales [121]. La ruptura del polímero puede dar lugar a la desintegración de la micela [122] (Figura 5.8). Los puentes disulfuro también se pueden utilizar para reticular el núcleo o la corona de las micelas o para preparar coronas removibles, de manera que en el interior de la célula se rompan y conduzcan a la desestabilización de las micelas y a una rápida cesión del fármaco [123,124]. Para liberar fármacos en tejidos inflamados, se ha propuesto el uso de micelas con componentes cuya oxidación pueda ser inducida por moléculas secretadas por los macrófagos. Los sistemas sensibles a agentes oxidantes también pueden servir para desarrollar sistemas pulsátiles en los que el proceso de oxido-reducción se modula aplicando corrientes eléctricas [125].

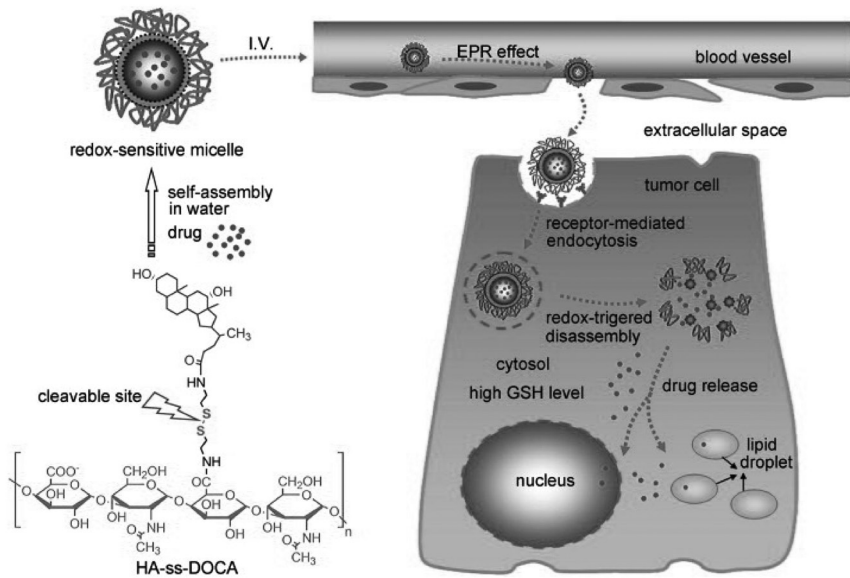


Figura 5.8. Autoagregación, acumulación en el tejido tumoral y evolución en el interior de las células de micelas de conjugados de ácido hialurónico y ácido deoxicólico (HA-ss-DOCA) sensibles a concentración de glutatión. Reproducido de la referencia 122 con permiso de Elsevier.

En lo que se refiere a los estímulos externos, la aplicación de radiación electromagnética en el intervalo del ultravioleta al infrarrojo cercano (NIR, del inglés *Near InfraRed*) permite regular a demanda e independientemente del estado del paciente, a cesión de fármaco en zonas muy bien delimitadas del organismo [126]. La luz ultravioleta o luz azul, utilizada habitualmente en terapia fotodinámica, tiene una baja capacidad de penetración en el organismo por lo que resulta útil para desestabilizar micelas que se utilizan en el tratamiento de patologías de la piel o las mucosas. Cuando la liberación se tiene que producir en áreas de más difícil acceso, resultan muy útiles las radiaciones de mayor longitud de onda (650-900 nm; NIR) que presentan una elevada capacidad de penetración y además son inocuas. Esto se debe a que la hemoglobina (principal absorbente de la luz visible) y el agua y los lípidos (que absorben en el infrarrojo) presentan coeficien-

tes de absorción muy bajos en la región NIR [127,128]. Para preparar micelas poliméricas fotosensibles se utilizan copolímeros con grupos fotoactivos que, cuando se exponen a la luz, sufren transformaciones que causan alteraciones reversibles del HLB. En este fenómeno pueden intervenir mecanismos muy diversos dependiendo de la estructura del grupo fotoactivo. Así, los grupos azobenceno cambian su momento dipolar al pasar de conformación trans a cis (Figura 5.9a), los grupos cinamoil se isomerizan en especies más hidrofílicas (por generación de cargas eléctricas) o forman dímeros (Figura 5.9b), los grupos espirobenzopirano dan lugar a la formación de zwitteriones (Figura 5.9c), y los grupos 2-diazo-1,2-naftoquinona experimentan un reordenamiento de Wolff (Figura 5.9d).

Entre los polímeros fotosensibles, los que contienen grupos azobenceno son los que han despertado mayor interés para desarrollar sistemas sensibles a luz UV. Cuando se irradian a 365 nm se produce rápidamente el paso de la forma trans (hidrófoba) a la cis (hidrófila) sin que tengan lugar reacciones químicas secundarias. Además, si se incorporan sustituyentes adecuados al cromóforo, se puede modificar la longitud de onda que induce la isomerización. La forma cis es inestable a la temperatura corporal de manera que, en la oscuridad o expuesta a luz de longitud de onda más alta, revierte a la forma trans. Por lo tanto, se pueden conseguir ciclos de desestabilización/reconstitución micelar mediante la aplicación de pulsos de luz [129]. Los copolímeros anfifílicos con grupos azobenceno en sus cadenas laterales tienen tendencia a formar micelas por efecto de las interacciones que se establecen entre estos grupos cuando se mantienen en la oscuridad (conformación trans).

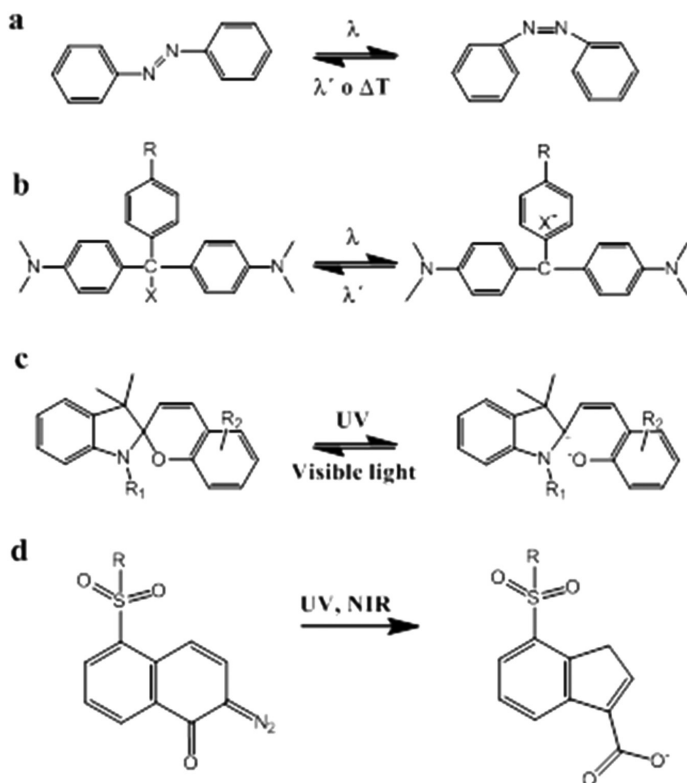


Figura 5.9. Efecto de la irradiación sobre la estructura de algunos grupos fotosensibles: (a) transición trans-cis, (b) ionización, (c) formación de un zwitterion y (d) reordenamiento de Wolff.

Como consecuencia de ello, las dispersiones de estos copolímeros presentan una viscosidad elevada. La conformación de los grupos azobenceno también resulta determinante para el establecimiento de interacciones entre estos copolímeros y los restos hidrofóbicos de otras macromoléculas. Por ejemplo, las dispersiones de micelas de copolímero de ácido poliacrílico y 1,2-aminoundecilamido-4-fenilazobenceno, a las que se ha incorporado seroalbúmina, mantienen una viscosidad elevada mientras el sistema se mantiene en la oscuridad debido a las interacciones intra e intermicelares. En estas condiciones, la proteína no se cede al medio. Al irradiar con luz ultravioleta, los grupos azo se isomerizan a la forma cis, las micelas se desagregan, la viscosidad cae y la proteína se cede. Si el sistema se lleva de nuevo a la oscuridad o se expone a luz visible

(436 nm), los grupos azo recuperan la conformación trans, la viscosidad recobra su valor inicial y la cesión se interrumpe. También se han preparado micelas sensibles a NIR a partir de dextrano modificado con grupos naftoquinona. La aplicación de un laser NIR provoca un cambio conformacional en la naftoquinona que la vuelve más hidrofílica y desencadena la separación de los unímeros y la cesión del fármaco [130].

Los ultrasonidos también se pueden utilizar como fuente externa de estímulos para facilitar la penetración de micelas en tejidos profundos del organismo y desencadenar el proceso de cesión. Utilizando equipos similares a los que se emplean en fisioterapia es posible provocar fenómenos de cavitación e incrementos locales de temperatura que dan lugar a la disgregación de las micelas [131-133]. Esta técnica se ha ensayado para la cesión específica de fármacos en tejidos tumorales. Las micelas cargadas con el fármaco se administran por vía intravenosa y se espera unas horas a que se acumulen en el tejido tumoral por efecto EPR (por ejemplo, 4-8 horas en el caso de micelas de Pluronic P105 cargadas con doxorrubicina) [134]. La cantidad de fármaco que se cede en cada pulso se puede modular ajustando la frecuencia, la potencia, la duración de los pulsos de ultrasonidos y el tiempo entre pulsos [135]. En modelos de ratón con tumores trasplantados se ha observado que el tratamiento con micelas cargadas con doxorrubicina seguido de la aplicación de ultrasonidos permite alcanzar concentraciones de fármaco nueve veces más altas que cuando se administra la doxorrubicina libre y tres veces mayores que cuando se formula en las micelas pero no se aplican ultrasonidos. Además, los niveles de fármaco en tejido sano fueron más bajos que los que se alcanzaron cuando se administró el fármaco libre [136].

5.2.7. Micelas poliméricas multisensibles

Para conseguir un ajuste muy fino de la liberación o una amplificación de la respuesta, se están desarrollando nuevos materiales con sensibilidad a dos (respuesta dual) o a más estímulos (respuesta múltiple o multiestímulo). Estos materiales pueden servir también para controlar la liberación

simultánea de varios fármacos respondiendo a diferentes señales del entorno biológico. Así, se han preparado micelas poliméricas con respuesta dual a temperatura y radiaciones utilizando un copolímero formado por NIPAAm y monómeros con grupos azobenceno. Mientras que no se irradia, el sistema muestra el comportamiento propio de un material sensible a cambios de temperatura. En cambio cuando se irradia, la hidrofilia del copolímero se incrementa como consecuencia de la fotoisomerización trans a cis de los grupos azobenceno, y el valor de la LCST se eleva. Bajo irradiación y a la temperatura corporal, el copolímero se vuelve muy hidrofílico y las micelas se rompen [137]. Con este mismo objetivo, se han preparado micelas mixtas que combinan copolímeros con grupos azobenceno y copolímeros tribloque termosensibles (Pluronic). Los grupos azobenceno modifican la temperatura a la que se produce la gelificación inducida por calor de las micelas de Pluronic, de manera que es posible preparar sistemas fluidos que presentan una baja viscosidad en la oscuridad pero que, cuando se irradian a 365 nm, se transforman en sistemas micelares con consistencia de gel (Figura 5.10). Estos cambios de consistencia encierran un gran potencial para modular la velocidad de liberación de fármacos [138].

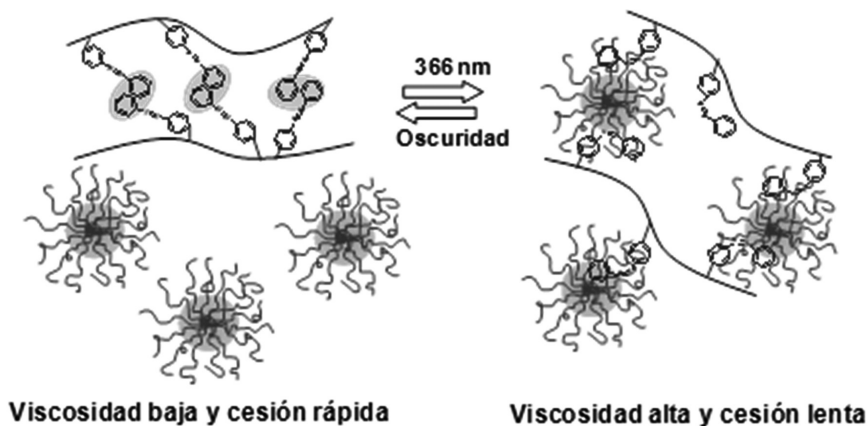


Figura 5.10. Respuesta a la luz de mezclas de poli(N,N-dimetilacrilamida-co-metacrililoiloxiazobenceno) (DMA-MOAB) y Pluronic F127. Reproducido de la referencia 138 con permiso. Copyright (2007) American Chemical Society.

También se ha conseguido producir ciclos reversibles de micelización/demicelización en respuesta a cambios en el pH y la temperatura utilizando

copolímeros bloque de Pluronic injertado en ambos extremos con poli(2-dietilaminoetil-metil metacrilato) (PDEAEM₂₅-PEO₁₀₀-PPO₆₅-PEO₁₀₀-PDEAEM₂₅) [139] y con copolímeros de NIPAAm, N,N-dimetilacrilamida y N-acriloilvalina [140]. Con poli(dimetilaminoetil metacrilato) funcionalizado con pireno se han diseñado micelas que responden simultáneamente a luz, temperatura y pH [141]. Por otra parte, copolímeros de poli[N-isopropilacrilamida-*b*-sodio-2-(acrilamido)-2-metilpropano sulfonato] marcados con dímeros de espiropirano permiten preparar micelas sensibles a luz, temperatura, iones metálicos y pH [142].

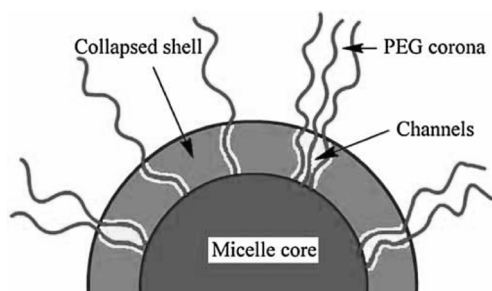


Figura 5.11. Esquema de la formación de canales en la corona de una micela polimérica. Reproducido de la Referencia 145 con permiso de John Wiley & Sons.

En los últimos años la aplicación de principios biomiméticos al diseño de sistemas de liberación de fármacos que puedan ofrecer prestaciones más avanzadas está adquiriendo una importancia creciente [143]. En esta línea se están evaluando las posibilidades que ofrece el desarrollo de micelas poliméricas con coronas que imiten la estructura de las membranas celulares y, en particular, su capacidad para regular la transferencia de sustancias a través de canales en los que participan proteínas transmembrana. Se ha ensayado ya la inserción de proteínas canal naturales en la corona micelar [144] y también la formación de mímicos artificiales obtenidos a partir de copolímeros que comparten el mismo bloque hidrofóbico pero presentan diferentes bloques hidrofílicos (Figura 5.11) [145]. Estos últimos copolímeros dan lugar a coronas que experimentan fenómenos de

separación de fases cuando se aplica el estímulo. La separación de fase genera poros a través de los que el fármaco puede abandonar la micela [146]. Se cuenta ya con prototipos de micelas con canales sensibles a temperatura, pH y fuerza iónica capaces de modular los perfiles de cesión [145].

5.3. Estado del arte en la clínica y perspectivas futuras

Aunque se dispone de abundante bibliografía científica sobre aspectos fundamentales de las micelas poliméricas como estrategia nanotecnológica para la encapsulación, vectorización y cesión de fármacos, la transferencia clínica avanza a un ritmo sustancialmente más lento. Actualmente existen seis medicamentos a base de micelas poliméricas comercializados o en fases avanzadas de evaluación clínica, todos ellos para el tratamiento del cáncer por vía intravenosa [31]. La mayor parte de estos medicamentos explotan el efecto EPR, aunque las micelas poliméricas cumplen también la función de incrementar la solubilidad de fármacos pobremente solubles, como paclitaxel, o de inhibir la actividad de la ABC glicoproteína P para evitar o revertir MDR. La gran versatilidad de los copolímeros empleados, la buena capacidad de encapsulación y la alta estabilidad física con respecto a micelas de tensoactivos convencionales han llevado a explorar otras vías de administración como la oral, la ocular y la intranasal. Aunque el tratamiento del cáncer lidera la innovación en el desarrollo farmacéutico, el conocimiento generado sobre micelas ha empezado a utilizarse en el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de otras patologías como Alzheimer, Parkinson y enfermedades infecciosas. La utilidad terapéutica y la aceptación de los productos innovadores ya aprobados por la agencias regulatorias por los pacientes y médicos serán decisivos para dictar el futuro de esta aproximación tecnológica en el ámbito de otras afecciones menos extendidas. La viabilidad de la transferencia debe ser cuidadosamente evaluada en cada caso teniendo en cuenta las posibilidades de los pacientes para acceder a los productos innovadores.

5.4. Referencias

- [1] J.T.L. Mah, E.S.H. Low, E. Lee. *Drug Discov. Today* 2011,16, 800-809.
- [2] S.M. Paul, D.S. Mytelka, C.T. Dunwiddie, C.C. Persinger, B.H. Munos, S.R. Lindborg, A.L. Schacht. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 203-214.
- [3] L. Hutchinson, R. Kirk. *Nat. Rev. Clinic. Oncol.* 2011, 8, 189-190.
- [4] J A. DiMasi, R.W. Hansen, H.G. Grabowski. *J. Health Econom.* 2003, 22, 151-185.
- [5] *Research and Development in the Pharmaceutical Industry*, The Congress of the United States, Congressional Budget Office, October 2006.
- [6] C. Lipinski. *Am. Pharm. Rev.* 2002, 5, 82-85.
- [7] P. Van Arnum. *Pharm. Technol.* 2011, 34, 50-56.
- [8] M. Lindenberg, S. Kopp, J.B. Dressman. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, 58, 265-278.
- [9] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison. *Pharm. Res.* 1995, 12, 413-420.
- [10] M. Lindenberg, S. Kopp, J.B. Dressman. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, 58, 265-278.
- [11] J. Hu, K.P. Johnston, R.O. Williams III. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2004, 30, 233-245.
- [12] K.A. Overhoff, J.D. Engstrom, B. Chen, B.D. Scherzer, T.E. Milner, K.P. Johnston, R.O. Williams 3rd. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007, 65, 57-67.
- [13] R.H. Müller, C. Jacobs, O. Kayser, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2001, 47, 3-19.
- [14] J.R. Kipp. *Int. J. Pharm.* 2004, 284, 109-122.
- [15] K. Greiesh, A.K. Iyer, J. Fang, M. Kawasuji, H. Maeda. In: V.P. Torchilin (Ed.), *Delivery of protein and peptide drugs in cancer*, Imperial College Press, London, 2006, pp. 37-52.
- [16] V. Torchilin. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2011, 63, 131-135.
- [17] G. Gregoriadis, E.J. Wills, C.P. Swain, A.S. Tavill. *Lancet* 1974, 1, 1313-1316.
- [18] P. Couvreur, C. Vauthier. *Pharm. Res.* 2006, 23, 1417-1450.
- [19] J. Szebeni, F. Muggia, A. Gabizon, Y. Barenholz. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2011, 63, 1020-1030.
- [20] A. Sosnik, A. Carcaboso, D.A. Chiappetta. *Recent Pat. Biomed. Eng.* 2008, 1, 43-59.
- [21] C.S.S.R. Kumar, F. Mohammad. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2011, 63, 789-808.
- [22] V.P. Torchilin. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 145-160.
- [23] L. Brannon-Peppas. *Int. J. Pharm.* 1995, 116, 1-9.
- [24] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski. *J. Control. Release* 2001, 70, 1-20.
- [25] S. Svenson, D.A. Tomalia. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2005, 57, 2106-2129.
- [26] S. Svenson, D.A. Tomalia. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2012, 64 (suppl.), 102-115.
- [27] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2001, 47, 113-131.
- [28] S.R. Croy, G.S. Kwon. *Curr. Pharm. Design* 2006, 12, 4669-4684.
- [29] D.E. Discher, F. Ahmed. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2006, 8, 323-341.
- [30] D.E. Discher, V. Ortiz, G. Srinivas, M.L. Klein, Y. Kim, D. Christian, S. Cai, P. Photos, F. Ahmed. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 838-857.
- [31] C. Alvarez-Lorenzo, A. Sosnik, A. Concheiro. *Curr. Drug Targets* 2011, 12, 1112-1130.
- [32] M.A. Moreton, D.A. Chiappetta, F. Andrade, J. das Neves, D. Ferreira, B. Sarmiento, A. Sosnik. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2013, 9, 1076-1087.

- [33] M.L. Cuestas, R.J. Glisoni, V.L. Mathet, A. Sosnik. *J. Nanopart. Res.*, 2013, 15, Art. 1389.
- [34] M.L. Cuestas, A. Castillo, A. Sosnik, V.L. Mathet. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 6577-6579.
- [35] A.V. Kabanov, E.V. Batrakova, V.Y. Alakhov. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2002, 54, 759-779.
- [36] A.V. Kabanov, E.V. Batrakova, D.W. Millar. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2003, 55, 151-165.
- [37] C. Alvarez-Lorenzo, A. Rey-Rico, J. Brea, M.I. Loza, A. Concheiro, A. Sosnik, *Nanomedicine (Lond.)* 2010, 5, 1371-1383.
- [38] M.L. Cuestas, A. Sosnik, V.L. Mathet. *Mol. Pharmaceut.* 2011, 8, 1152-1164.
- [39] L. Bromberg. *J. Control. Release* 2008, 128, 99-112.
- [40] G. Gaucher, P. Satturwar, M.C. Jones, A. Furtos, J.C. Leroux. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 76, 147-158.
- [41] R.C. Nagarwal, S. Kant, P.N. Singh, P. Maiti, J.K. Pandit. *J. Control. Release* 2009, 136, 2-13.
- [42] A. Ribeiro, A. Sosnik, D.A. Chiappetta, F. Veiga, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. *J. Royal Soc. Interface* 2012, 9, 2059-2069.
- [43] R.G. Strickley. *Pharm. Res.* 2004, 21, 201-230.
- [44] D.A. Chiappetta, C. Alvarez-Lorenzo, A. Rey-Rico, P. Taboada, A. Concheiro, A. Sosnik. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 76, 24-37.
- [45] B. Foster, T. Cosgrove, B. Hammouda, *Langmuir* 2009, 25, 6760-6766.
- [46] R. Nagarajan. *Polym. Adv. Tech.* 2001, 12, 23-43.
- [47] G. Riess. *Prog. Polym. Sci.* 2003, 28, 1107-1170.
- [48] I.F. Paterson, B.Z. Chowdhry, S.A. Leharne. *Langmuir* 1999, 15, 6187-6192.
- [49] D.A. Chiappetta, J. Degrossi, S. Teves, M. D'Áquino M, C. Bregni, A. Sosnik. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008, 69, 535-545.
- [50] D.A. Chiappetta, J. Degrossi, R.A. Lizarazo, D.L. Salinas, F. Martínez, A. Sosnik. In *Polymer Aging, Stabilizers and Amphiphilic Block Copolymers*, Eds. L. Segewicz and M. Petrowsky, Nova Publishers, Hauppauge, NY, 2010, p. 197.
- [51] M.C. Jones, J.C. Leroux. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1999, 48, 101-111.
- [52] G. Gaucher, M.H. Dufresne, V.P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, J.C. Leroux. *J. Control. Release* 2005, 109, 169-188.
- [53] L. Capretto, S. Mazzitelli, E. Brognara, I. Lampronti, D. Carugo, M. Hill, X. Zhang, R. Gambari, C. Nastruzzi. *Int. J. Nanomedicine.* 2012, 7, 307-324.
- [54] V.P. Sant, D. Smith, J.C. Leroux. *J. Control. Release* 2004, 97, 301-312.
- [55] P. Vangeyte, S. Gautier, R. Jerome. *Colloids Surf. A*, 2004, 242, 203-211.
- [56] A Patist, SS Bhagwat, KW Penfield, P Aikens, DO Shah. *J. Detergent. Surf.* 2000, 3, 53-58.
- [57] M. Bohorquez, C. Koch, T. Trygstad, N. Pandit. *J. Colloid Interf. Sci.* 1999, 216, 34-40.
- [58] S.C. Lee, Y. Chang, J.S. Yoon, C. Kim, I.C. Kwon, Y.H. Kim, S.Y. Jeong. *Macromolecules* 1999, 32, 1847-1852.
- [59] J. Gonzalez-Lopez, C. Alvarez-Lorenzo, P. Taboada, A. Sosnik, I. Sandez-Macho, A. Concheiro. *Langmuir* 2008, 24, 10688-10697.
- [60] D.A. Chiappetta, A. Sosnik. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007, 66, 303-317.
- [61] Q. Wang, L. Li, S. Jiang. *Langmuir* 2005, 21, 9068-9075.

- [62] K. Khougaz, I. Astafieva, A. Eisenberg. *Macromolecules* 1995, 28, 7135-7147.
- [63] P.J. Tummino, A. Gafni. *Biophys. J.* 1993, 64, 1580-1587.
- [64] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot. *Pharm. Res.* 2010, 27, 796-810.
- [65] S.W. Provencher. *Makromol. Chem.* 1979, 180, 201-209.
- [66] M. Hans, K. Shimoni, D. Danino, S.J. Siegel, A. Lowman. *Biomacromolecules* 2005, 6, 2708-2717.
- [67] S.B. La, T. Okano, K. Kataoka. *J. Pharm. Sci.* 1996, 85, 85-90.
- [68] H. Inoue, G. Chen, K. Nakamae, A.S. Hoffman. *J. Control. Release* 1998, 51, 221-229.
- [69] L. Yang, X. Qi, P. Liu, A. El Ghzaoui, S. Li. *Int. J. Pharm.* 2010, 394, 43-49.
- [70] D.J. Lurie, K. Mäder. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2005, 57, 1171-90.
- [71] S. Kempe, H. Metz, K. Mäder. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 74, 55-66.
- [72] D.A. Chiappetta, G. Facorro, E. Rubin de Celis, A. Sosnik. *Nanomedicine NMB* 2011, 7, 624-637.
- [73] M.A. Moretton. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 2013.
- [74] A. Ramzi, C.J.F. Rijcken, T.F.J. Veldhuis, D. Schwahn, W.E. Hennink, C.F. van Nostrum. *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 784-792.
- [75] R. Obeid, F. Tanaka, F.M. Winnik. *Macromolecules* 2009, 42, 5818-5828.
- [76] O. Söderman, P. Stilbs. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1994, 26, 445-482.
- [77] E. Pettersson, D. Topgaard, P. Stilbs, O. Söderman. *Langmuir* 2004, 20, 1138-1143.
- [78] B.V.N. Phani Kumar, S. Umayal Priyadharsini, G.K.S. Prameela, A. Baran Mandal. *J. Colloid Interf. Sci.* 2011, 360, 154-162.
- [79] J. Gonzalez-Lopez, I. Sandez-Macho, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, 1181-1189.
- [80] D. Maysinger, J. Lovrić, A. Eisenberg, R. Savić. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007, 65, 270-281.
- [81] X.B. Xiong, A. Falamarzian, S.M. Garg, A. Lavasanifar. *J. Control. Release* 2011, 155, 248-261.
- [82] C. Booth, D. Attwood. *Macromol. Rap. Comm.* 2000, 21, 501-527.
- [83] C. Booth, D. Attwood, C. Price. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006, 8, 3612-3622.
- [84] C.J. Rekasas, S. M. Mai, M. Crothers, M. Quinn, J.H. Collett, D. Attwood, F. Heatley, L. Martini, C. Booth. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2001, 3, 4769-4773.
- [85] M. Crothers, Z. Zhou, N.M.P.S. Ricardo, Z. Yang, P. Taboada, C. Chaibundit, D. Attwood, C. Booth. *Int. J. Pharm.* 2005, 293, 91-100.
- [86] P. Taboada, G. Velasquez, S. Barbosa, V. Castelletto, S.K. Nixon, Z. Yang, F. Heatley, I.W. Hamley, M. Ashford, V. Mosquera, D. Attwood, C. Booth. *Langmuir* 2005, 21, 5263-5271.
- [87] P. Taboada, G. Velasquez, S. Barbosa, Z. Yang, S.K. Nixon, Z. Zhou, F. Heatley, M. Ashford, V. Mosquera, D. Attwood, C. Booth. *Langmuir* 2006, 22, 7465-7470.
- [88] M.A. Moretton, R.J. Glisoni, D.A. Chiappetta, A. Sosnik. *Colloids Surf. B* 2010, 79, 467-479.
- [89] N. Rapoport. *Colloids Surf. B* 1999, 16, 93-111.
- [90] S.H. Kim, J.P. Tan, F. Nederberg, K. Fukushima, J. Colson, C. Yang, A. Nelson, Y.Y. Yang, J.L. Hedrick. *Biomaterials* 2010, 31, 8063-8071.

- [91] M. Iijima, Y. Nagasaki, T. Okada, M. Kato, K. Kataoka. *Macromolecules* 1999, 32, 1140-1146.
- [92] J.Q. Jiang, B. Qi, M. Lepage, Y. Zhao. *Macromolecules* 2007, 40, 790-792.
- [93] P. Petrov, M. Bozukov, C.B. Tsvetanov. *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 1481-1486.
- [94] J.D. Pruitt, G. Husseini, N. Rapoport, W.G. Pitt. *Macromolecules* 2000, 33, 9306-9309.
- [95] J. Rodríguez-Hernández, F. Chécot, Y. Gnanou, S. Lecommandoux. *Prog. Polym. Sci.* 2005, 30, 691-724.
- [96] K.H. Bae, S.H. Choi, S.Y. Park, Y. Lee, T.G. Park. *Langmuir* 2006, 22, 6380-6384.
- [97] T.F. Yang, C.N. Chen, M.C. Chen, C.H. Lai, H.F. Liang, H.W. Sung. *Biomaterials* 2007, 28, 725-734.
- [98] K.H. Bae, Y. Lee, T.G. Park. *Biomacromolecules* 2007, 8, 650-656.
- [99] Q. Jin, X. Liu, G. Liu, J. Ji. *Polymer* 2010, 51, 1311-1402.
- [100] Y. Kakizawa, A. Harada, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 11247-11248.
- [101] M.J. Heffernan, N. Murthy, *Ann. Biomed. Eng.* 2009, 37, 1993-2002.
- [102] S.M. Garg, X.B. Xiong, C. Lu, A. Lavasanifar, *Macromolecules* 2011, 44, 2058-2066.
- [103] A.V. Kabanov, V.Yu. Alakhov, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2002, 19, 1-72.
- [104] D. Schmaljohann. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2006, 58, 1655-1670.
- [105] C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2008, 8, 1065-1074.
- [106] A.S.E. Ojugo, P.M.J. Mesheedy, D.J.O. McIntyre, C. McCoy, M. Stubbs, M.O. Leach, I.R. Judson, J.R. Griffiths. *NMR Biomed.* 1999, 12, 495-504.
- [107] N. Nishiyama, Y. Bae, K. Miyata, S. Fukushima, K. Kataoka. *Drug Discov. Today: Technol.* 2005, 2, 21-26.
- [108] K.H. Min, J.H. Kim, S.M. Bae, H. Shin, M.S. Kim, S. Park, I.S. Kim, K. Kim, I.C. Kwon, S.Y. Jeong, D.S. Lee. *J. Control. Release* 2010, 144, 259-266.
- [109] Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro, K. Kataoka. *Bioconjug. Chem.* 2005, 16, 122-130.
- [110] G.H. Gao, J.W. Lee, M.K. Nguyen, G.H. Im, J. Yang, H. Heo, P. Jeon, T.G. Park, J.H. Lee, D.S. Lee. *J. Control. Release* 2011, 155, 11-20.
- [111] S. Fukushima, K. Miyata, N. Nishiyama, N. Kanayama, Y. Yamasaki, K. Kataoka. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 2810-2811.
- [112] A.J. Convertine, C. Diab, M. Prieve, A. Paschal, A.S. Hoffman, P.H. Johnson, et al. *Biomacromolecules* 2010, 11, 2904-2911.
- [113] V. P. Sant, D. Smith, J.C. Leroux. *J. Control. Release* 2005, 104, 289-300.
- [114] T. Tanaka. *Phys. Rev. A* 1978, 17, 763-766.
- [115] I.Y. Galaev, B. Mattiasson. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1993, 15, 354-366. .
- [116] J.E. Chung, M. Yokoyama, T. Okano. *J. Control. Release* 2000, 65, 93-103.
- [117] T.Y. Liu, S.H. Hu, D.M. Liu, S.Y. Chen, I.W. Chen. *Nano Today* 2009, 4, 52-65.
- [118] F. Kohori, K. Sakai, T. Aoyagi, M. Yokoyama, M. Yamato, Y. Sakurai, T. Okano. *Colloids Surf. B* 1999, 16, 195-205.
- [119] S.R. Sershen, S.L. Westcott, N.J. Hallas, J.L. West. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 5, 293-298.
- [120] F.Q. Schafer, G.R. Buettner. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30, 1191-1212.
- [121] R. Cheng, F. Feng, F. Meng, C. Deng, J. Feijen, Z. Zhong. *J. Control. Release*, 2011, 152, 2-12.

- [122] J. Li, M. Huo, J. Wang, J. Zhou, J.M. Mohammad, Y. Zhang, Q. Zhu, A.Y. Waddad, Q. Zhang. *Biomaterials* 2012, 33, 2310-2320.
- [123] L.Y. Tang, Y.C. Wang, Y. Li, J.Z. Du, J. Wang. *Bioconjugate Chem.* 2009, 20, 1095-1099.
- [124] L.P. Lv, J.P. Xu, X.S. Liu, G.Y. Liu, X. Yang, J. Ji. *Macromol. Chem. Phys.* 2010, 211, 2292-2300.
- [125] A. Napoli, M. Valentini, N. Tirelli, M. Muller, J.A. Hubbel. *Nat. Mater.* 2004, 3, 183-189.
- [126] J. Jiang, X. Tong, D. Morris, Y. Zhao. *Macromolecules* 2006, 39, 4633-4640.
- [127] C.P. McCoy, C. Rooney, C.R. Edwards, D.S. Jones, S.P. Gorman. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 9572-9573.
- [128] C. Alvarez-Lorenzo, L. Bromberg, A. Concheiro. *Photochem. Photobiol.* 2009, 85, 848-860.
- [129] X. Tong, G. Wang, A. Soldera, Y. Zhao. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 20281-20287.
- [130] L. Gong-Yan, C. Chao-Jian, L. Dan-Dan, S.S. Wang, J. Ji. *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 16865-16871.
- [131] N. Rapoport. *Int. J. Hypertherm.* 2012, 28, 374-385.
- [132] S. Hernot, A.L. Klibanov. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2008, 60, 1153-1166.
- [133] R. Deckers, C.T.W. Moonen. *J. Control. Release* 2010, 148, 25-33
- [134] N. Rapoport. In *Smart Nanoparticles in Nanomedicine*. R. Arshady, K. Kono, Eds.; Kentus Books, London, 2006, pp. 305-362
- [135] A.H. Ghaleb, D. Stevenson-Abouelnasr, W.G. Pitt, K.T. Assaleh, L.O. Farahat, J. Fahadi. *Colloids Surf A* 2010, 359, 18-24
- [136] H. Hasanzadeh, M. Mokhtari-Dizaji, S. Z. Bathaie, Z. M. Hassan. *Ultrason. Sonochem.* 2011, 18, 1165-1171.
- [137] K. Sugiyama, K. Sono. *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, 81, 3056-3063.
- [138] C. Alvarez-Lorenzo, S. Deshmukh, L. Bromberg, T.A. Hatton, I. Sández-Macho, A. Concheiro. *Langmuir* 2007, 23, 11475-11481.
- [139] M.D. Determan, J.P. Cox, S.K. Mallapragada. *J. Biomed. Mater. Res.* 2007, 81A, 326-333.
- [140] B.S. Lokitz, A.W. York, J.E. Stempka, N.D. Treat, Y. Li, W.L. Jarrett, C.L. McCormick. *Macromolecules* 2007, 40, 6473-6480.
- [141] J. Dong, Y. Wang, J. Zhang, X. Zhan, S. Zhu, H. Yang, G. Wang. *Soft Matter* 2013, 9, 370-373.
- [142] S. Guragain, B.P. Bastakoti, M. Ito, S. Yusa, K. Nakashima. *Soft Matter* 2012, 8, 9628-9634.
- [143] C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro. *Curr. Opin Biotech.* 2013, 24, 1167-1173.
- [144] P. Broz, S. Driamov, J. Ziegler, N. Ben-Haim, S. Marsch, W. Meier, P. Hunziker. *Nano Lett.* 2006, 6, 2349-2353.
- [145] R. Ma, L. Shi. *Macromol. Biosci.* 2010, 10, 1397-1405.
- [146] H.C. Chiu, Y.W. Lin, Y.F. Huang, C.K. Chuang, C.S. Chern. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 1875-1878.